



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Posible participación del factor de
virulencia WhiB5 en la
inmunopatogénesis de la tuberculosis.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A :

Gabriel Herrera Maya



**DIRECTOR DE TESIS: Dra. Diana Elodia
Aguilar León.**

2012



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.

In Memoriam:
Miriam Alejandra Maya Martínez
1987 - 2011

Dedicatoria

Silvia Hansen Bernal, Mostrando el camino cuando la mirada estaba perdida, por el valor de acercarse y compartir temores y alegrías.

José Fernando Herrera Gómez, por acompañar el camino de las decisiones difíciles emocionalmente y académicamente y enseñarme que la estadística es fácil.

María de los Ángeles Maya Sánchez, por apoyar en aspectos integrales de vida, estar ahí para poder soportar sarcasmos y siempre sacar una sonrisa en los momentos difíciles.

Miguel Herrera Maya, siempre con un sentido de vida que marca la diferencia entre lo que es uno y lo que quiere uno, obteniendo de él un punto de vista no antes conocido.

Gabriel León Braojos Maya, siempre prestando el departamento, y por tener una larga relación de amistad, así como de familia.

Estrella, por hacer más ameno el trabajo de laboratorio y siempre lograr sacar una sonrisa cuando el trabajo era extenso.

Yadira, Edgar, Camilo, Cesar, Jorge por su apreciada compañía y pláticas interminables en el laboratorio, siempre siendo crítico y honesto.

Eunice, Sol, Samanta, Fernando, Griselda, Adrián, Beatriz, Jaqueline, Marlene, Ivonne, Ixchel, Diego y demás compañeros de carrera por la compañía durante el largo tiempo que estuvimos en la carrera, por las experiencias, por las prácticas en las cuales nos desvelamos hasta sacar el trabajo.

Agradecimiento

Dra. Diana Elodia Aguilar León por permitirme ingresar a su espacio laboral durante la carrera, por la asesoría y tiempo invertido en la realización de este trabajo.

Dr. Rogelio Hernández Pando y al departamento de patología experimental del Instituto Nacional de la Nutrición y Ciencias Médicas por el apoyo para la realización de este proyecto.

Dr. Riccardo Manganeli por la construcción de las cepas mutantes.

Dr. Erasmo Martínez Cordero por permitirme trabajar en su materia y por las recomendaciones mostradas durante la elaboración del proyecto.

Al Taller de Respuesta inmune humoral y celular en diferentes tipos de hipersensibilidad, por la educación y tiempo empleado para la realización de este proyecto.

Estrella Tovar Calderón, por el apoyo académico y experimental de este proyecto.

A Gabriel León Braojos Maya, por la optimización de las imágenes incluidas en este texto.

A los compañeros de laboratorio, por las recomendaciones para mejorar la calidad del trabajo.

A mis sinodales, por el tiempo invertido en la revisión y anotación de sugerencias en la revisión de la esta tesis

A mis profesores, por introducir en mí el interés científico y motivarme a seguir el camino.

Facultad de Ciencias, por permitir estudiar en sus instalaciones.

A la UNAM por permitirme permanecer a la máxima casa de estudios.

Índice

Resumen	- 3 -
Introducción.....	- 5 -
Epidemiología.....	- 7 -
<i>EN EL MUNDO</i>	- 7 -
<i>MÉXICO</i>	- 10 -
Biología	- 12 -
<i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	- 12 -
<i>INMUNOLOGÍA</i>	- 14 -
<i>GENÉTICA</i>	- 18 -
Modelos experimentales de tuberculosis	- 20 -
<i>MODELO MURINO</i>	- 22 -
<i>CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS</i>	- 23 -
<i>LOCALIZACIÓN HISTOLÓGICA</i>	- 24 -
<i>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENÉTICA</i>	- 25 -
Vacunación	- 27 -
<i>BACILO CALMETT-GUÉRIN</i>	- 27 -
<i>BACTERIA VIVAS</i>	- 29 -
Factores de virulencia.....	- 32 -
Whib5	- 38 -
<i>SIGM</i>	- 45 -
<i>ESX 2 Y 4</i>	- 48 -
Tipos de mutantes.....	- 50 -
Hipótesis	- 53 -
Objetivos generales.....	- 53 -
OBJETIVOS PARTICULARES	- 53 -

Metodología.....	- 54 -
<i>PREPARACIÓN DE LAS CEPAS H37RV, WHIB5 KO Y WHIB5 COMPLEMENTADA</i>	- 54 -
<i>CUENTA BACTERIANA</i>	- 55 -
<i>INOCULACIÓN</i>	- 56 -
<i>ESTUDIO HISTOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO</i>	- 57 -
<i>MEDIO PARA ANÁLISIS DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA</i>	- 57 -
<i>HOMOGENEIZADO Y SEMBRADO DEL MEDIO</i>	- 57 -
<i>ANÁLISIS PARA LA EXPRESIÓN DE CITOSINAS PCR TIEMPO REAL (RT-PCR)</i>	- 58 -
<i>Aislamiento de marn</i>	- 58 -
<i>Obtención de cadn</i>	- 59 -
<i>Diseño de oligonucleótidos</i>	- 59 -
<i>Pcr-punto final</i>	- 59 -
<i>Análisis de citocinas por pcr-tiempo real</i>	- 60 -
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	- 60 -
<i>SOBREVIDAS</i>	- 60 -
Resultados.....	- 61 -
<i>SOBREVIDA</i>	- 61 -
<i>CARGA BACILAR E HISTOPATOLOGÍA</i>	- 63 -
<i>ANÁLISIS PARA LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS</i>	- 65 -
Análisis de resultados	- 67 -
Discusión	- 71 -
Conclusiones.....	- 74 -
Perspectivas	- 74 -
Bibliografía.....	- 75 -
Apéndice.....	- 81 -
<i>SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICAS PARA CITOSINAS</i>	- 81 -
<i>CURVA ESTÁNDAR PARA PCR-TIEMPO REAL</i>	- 82 -

Resumen

Los genes *wbl* (*whiB*-like) codifican factores transcripcionales putativos únicos de los actinomicetos. La primera de estas proteínas, *WhiB*, se identificó en mutantes de *Streptomyces coelicolor*, una bacteria esporulante muy cercanamente relacionada a *Mycobacterium tuberculosis*. Las mutantes *WhiB* de *S. coelicolor* producen hifas aéreas anormalmente largas y firmemente enrolladas, que están completamente bloqueadas en la habilidad para formar septos de esporulación. Estudios en ortólogos de genes *WhiB* en micobacterias han mostrado que *WhiB2* es esencial en el proceso de división celular, *WhiB3* juega un papel importante en la virulencia y el producto de este gen puede interactuar con un factor sigma sobre la RNA polimerasa; *Whib7* está involucrado en la resistencia a los fármacos. Actualmente no hay información disponible sobre la función de *WhiB5* en la patogénesis de la tuberculosis pulmonar. Por lo cual es importante estudiar el nivel de virulencia e inmunopatología, inducida por un bacilo mutante con Knock-out para el gen *WhiB5* para observar el desarrollo de la enfermedad. De esta manera se puede determinar de qué manera esta involucrado *WhiB5* en el proceso de tuberculosis pulmonar activa.

Se produjo una cepa Knock-out mutante para el gen *WhiB5* y ratones Balb/c fueron infectados con una dosis alta de esta cepa intratraquealmente logrando inducir una enfermedad progresiva, así comparar con el grupo control de ratones los cuales se infectaron con la cepa complementada y uno más con la cepa parental H37Rv. Grupos de animales fueron sacrificados a diferentes tiempos, los pulmones fueron colectados y usados para determinar la carga bacilar, daño del tejido, así como expresión de citocinas.

La mutante WhiB5 resulta atenuada cuando se compara con la cepa parental y la complementada, permitiendo la mayor sobrevivencia de los animales infectados con esta mutante.

El experimento nos señala que en este ambiente se mostraron altas expresiones de IFN γ e iNOS, con una baja expresión de IL-4. Aunque de manera interesante el porcentaje de neumonía que presentan los pulmones, fue similar a la producida por la cepa parental o complementada.

Esto sugiere que el producto del gen WhiB5 en la infección pulmonar puede estar involucrado en la protección de la micobacteria contra radicales libres de oxígeno y óxido de nitrógeno, considerando que la máxima producción de este coincide con la máxima expresión de iNOS y TNF α . Por lo tanto WhiB5 se involucra en la virulencia, siendo esta la razón por la cual los bacilos que presentan la mutación permiten que los animales sobrevivan más tiempo y controlen mejor la respuesta inflamatoria, como lo sugiere la relativa disminución en la carga bacteriana.

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que suele afectar a los pulmones y es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* principalmente, ya que existen otras micobacterias oportunistas. Los síntomas de la tuberculosis pulmonar activa son; tos; a veces con esputo sanguinolento, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna. En este caso la tuberculosis se trata mediante la administración de antibióticos por un periodo no menor de seis meses para los casos de tuberculosis pulmonar no resistente a fármacos. Pacientes con enfermedad pulmonar activa transmiten el bacilo de una persona a otra por vía aérea, en lo que se denomina transmisión por gotitas, a través de las gotas generadas en estornudos y tos que permanecen en el aire. En algunas personas la infección por *M. tuberculosis* suele ser asintomática, dado que su sistema inmunitario actúa formando una barrera protectora alrededor del bacilo tuberculoso, misma que evitara la diseminación de la infección y su contagio (WHO, 2009).

El párrafo anterior describe puntos cruciales que tomaron años de historia para poder concretarse, y que involucran la intervención de muchas manos para la comprensión de este grave problema de salud. La identificación de *M. tuberculosis* como agente causal de tuberculosis, hecha por Robert Koch en 1882, marcó el primer estudio de esta enfermedad (Chacón *et al.*, 2004). Generando los primeros conocimientos sobre lo que se denominaba la peste blanca en los inicios del siglo diecisiete y que continuó hasta los siguientes 200 años en Europa (Portillo *et al.*, 2007). Poco después se pudieron obtener avances importantes, resultando en el refinamiento de las técnicas de coloración y cultivo realizadas por Franz Ziehl y Friedrich Carl Adolf Neelsen quienes proporcionaron las primeras herramientas para combatir racionalmente la tuberculosis (Chacón *et al.*, 2004).

Para 1908 y hasta 1919, Albert Calmette y Camille Guérin, residentes de Francia, lograron la atenuación de una cepa patógena de *M. bovis* que dio como resultado a una cepa atenuada llamada Bacilo Calmette-Guérin o BCG, la cual resultó avirulenta. La BCG fue administrada como vacuna en humanos en 1921 y hasta la fecha es considerada la mejor opción para el control epidemiológico de la tuberculosis (Portillo *et al.*, 2007). Posteriormente retomaremos el tema de la vacunación ya que es el punto central de la investigación.

El espíritu de optimismo se fortaleció con el descubrimiento de una serie de drogas antituberculosas. El ejemplo claro es el de la compañía “Lepetit”, que descubrió el hongo *Streptomyces mediterranei* que produce un metabolito denominado Rifampicina B, así la manipulación química de este compuesto resultó en la producción de Rifampicina. Este compuesto tiene una fuerte acción antimicrobiana contra *M. tuberculosis* (Portillo *et al.*, 2007). Desde 1956 se considera el antibiótico más efectivo en el tratamiento de la tuberculosis y no ha dejado de usarse hasta la fecha.

Estos eventos en la historia son cruciales para lo que ahora consideramos como las herramientas de prevención, diagnóstico y tratamiento en contra de la tuberculosis en el mundo. En la actualidad se han generado grandes avances en el conocimiento acerca de los mecanismos de evasión y tolerancia a la respuesta inmune en el humano, ya que el agente infeccioso tiene la capacidad de permanecer por toda una vida dentro del hospedero sin tener actividad; a lo que se le ha denominado estado de latencia. El bacilo tuberculoso continúa generando más muertes que cualquier otro único agente infeccioso en el mundo (Cole *et al.*, 1998).

De esta manera se establece que la prevención, que considera la vacunación, es el método más efectivo para erradicar la tuberculosis y por lo cual en este proyecto nos enfocaremos en la búsqueda de vacunas más eficientes que la actual BCG.

Epidemiología

En el Mundo

En todo el mundo una 1 de cada 3 personas está infectada con *M. tuberculosis*, siendo un total de 2000 millones de personas afectadas. Sin embargo el 90% de estas se mantiene clínicamente saludable debido a que el bacilo se mantiene en estado de latencia (Hernández-Pando *et al.*, 2007). Las consecuencias de la tuberculosis son inmensas, causa el 2.5% de la carga mundial de morbilidad y es la causa más común de muerte en mujeres jóvenes, matando a más mujeres que todas las causas de mortalidad materna combinadas (Hernández-Pando *et al.*, 2007). La tuberculosis hasta el 2007 ocupaba el séptimo lugar entre las causas de muertes a nivel mundial (Portillo *et al.*, 2007).

Desde 1997 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha evaluado cada año el estatus de la epidemia de tuberculosis y progreso en el control de la misma. Esta evaluación incluye: estimaciones en cuanto a la incidencia, prevalencia y mortandad causada por tuberculosis, análisis de notificaciones de casos, resultados obtenidos por los tratamientos y análisis de los progresos obtenidos en los objetivos globales que se establecieron para el tratamiento y detección en la asamblea de la salud mundial (WHA) en 1991. Los resultados de esta investigación abarcan cerca de doscientos países (WHO, 2009).

Basados en los datos de vigilancia y supervivencia, la Organización Mundial de la Salud estima que 8.8 millones de nuevos casos de tuberculosis ocurrieron en 2010 (Fig. 1), equivalente a 128 casos de tuberculosis por cada 100,000 habitantes. (WHO, 2011). De los

casos detectados en 2007, un 44% que equivale a 4.1 millones de personas, fueron casos diagnosticados por frotis positivos (WHO, 2009).

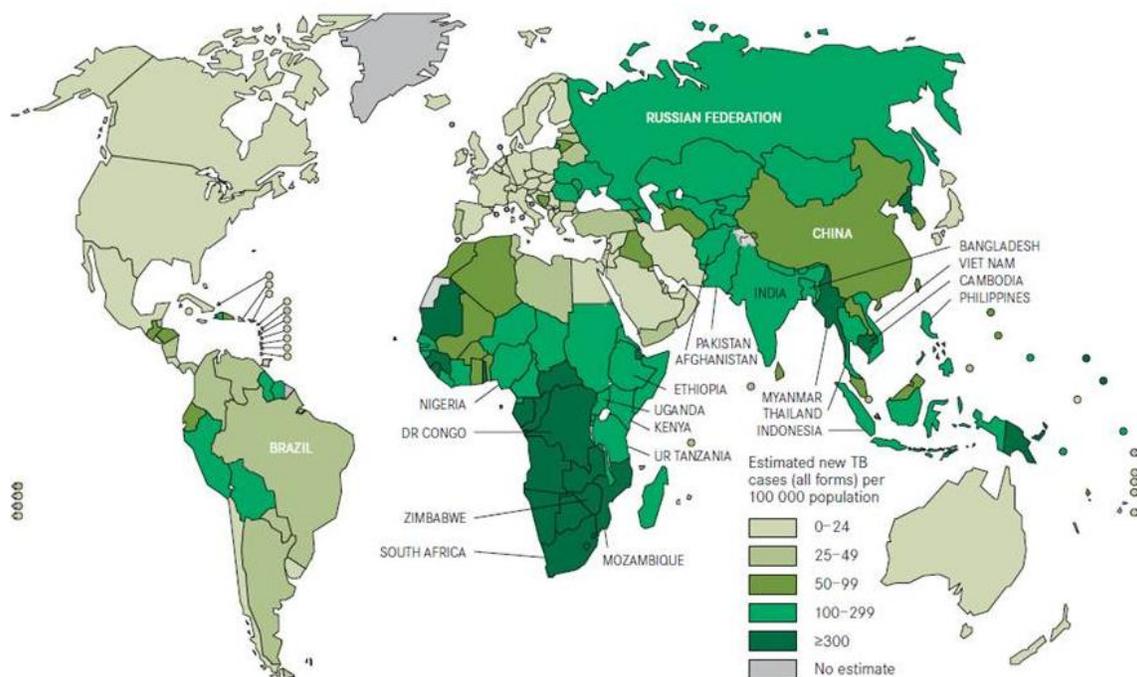


Fig. 1 Tasa de incidencia para tuberculosis por país hasta el 2010 (WHO, 2011).

La cifra inicial de infecciones en 2007 estimada por la OMS fue de 9.27 millones de episodios de tuberculosis y un adicional de 1.16 millones de episodios subsecuentes que presentaron tuberculosis y se les dio al menos un mes de tratamiento. El resultado es de 10.4 millones episodios de tuberculosis. Entre estos 10.4 millones un estimado de 4.9% equivalente a 511,000 personas eran casos de tuberculosis multifármaco resistente (MFR). De estos 289,000 eran casos nuevos de tuberculosis MFR y 221,000 son casos que habían sido tratados previamente con los medicamentos antituberculosos convencionales (isoniacida y la rifampicina) presentando la enfermedad después del tratamiento (WHO, 2009).

La OMS ha modificado los criterios para obtener estimados en casos de tuberculosis MFR, actualmente reporta el número de casos prevalentes (número de casos de tuberculosis en un punto de tiempo determinado) y no de casos de incidentes (número de casos nuevos y recaídas en un año) de tuberculosis MFR. En 2010 se ha estimado que hay 650,000 casos prevalentes de tuberculosis MFR, presentando un importante incremento con respecto a las cifras de 2007 (WHO, 2011).

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es un potente factor de riesgo cuando se habla de coinfecciones con tuberculosis. El VIH no solo incrementa el riesgo de reactivar el bacilo cuando este se encuentra en estado de latencia, también aumenta la progresión de la infección o reinfección. El VIH se ha asociado con brotes epidemiológicos de tuberculosis y tuberculosis MFR, los cuales no responden a los tratamientos terapéuticos convencionales. Los casos de tuberculosis en la última década, considerando a los países con epidemia generalizada de VIH, han aumentado rápidamente. Especialmente en los países de Este y Sur de África (Corbett *et al.*, 2003)

Entre los 8.8 millones de casos de tuberculosis, existe un estimado de 1.2 millones de individuos que presentan también VIH, equivalente al 13% de los casos mundiales de tuberculosis en 2010 (WHO, 2011). Este número aumenta casi al doble el estimado de 0.7 millones de casos en 2006 que la Organización Mundial de la Salud publicó en el volumen *Global Tuberculosis Control* en 2008. Esto ejemplifica que el riesgo de ser infectado por *M. tuberculosis* en personas con VIH, cuando se compara con personas VIH negativo, es mucho mayor que lo previamente estimado. Lo anterior comparando con estudios previos en seis países con una alta tasa de prevalencia de VIH (WHO, 2009).

En cuanto a la mortandad se puede decir que un estimado de 1.4 millones de los 8.8 millones de casos reportados en 2010 murieron a causa de tuberculosis, equivalente a 15

muerter por cada 100,000 habitantes. Adicionalmente se calcula que 0.35 millones de muerter son casos de tuberculosis asociados a VIH y aproximadamente 1.1 millones de muerter de casos de tuberculosis no asociada a VIH. De estos últimos se estimó que 0.32 millones son mujeres (WHO, 2011).

México

Durante 1999 en la región de las Américas se notificaron 238,082 casos de tuberculosis en todas sus formas con una morbilidad de 29 casos por cada 100,000 habitantes. Para el año 2000 la OMS consideró a México entre los países con tasas de morbilidad intermedia (mayor de 25 y menor de 49 casos por 100 000 habitantes), lo cual significa que las actividades de detección y diagnóstico deben realizarse de manera intensiva (SSA, 2001).

De acuerdo con la información disponible en el componente de tuberculosis del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en nuestro país se registran cada año cerca de 15,000 casos nuevos de tuberculosis pulmonar y cerca de 2,000 defunciones por esta causa. Representando un importante obstáculo para el desarrollo socioeconómico de México, ya que el promedio de edad en las defunciones por este padecimiento es de 54 años (SSA, 2008).

Entre 1998 y 2008 la morbilidad por tuberculosis pulmonar mantuvo una tendencia estacionaria durante la primera mitad de la década. A partir de 1994 las cifras ascienden alcanzando una máxima de 20.6 casos por cada 100,000 habitantes hasta 1998 y desciende hasta 15.6 casos por cada 100,000 habitantes en el año 2000 (SSA, 2001). La situación de la tuberculosis en las entidades federativas presenta patrones de concentración bien definidos, ubicándose tasas de incidencia elevadas en los estados de Occidente y Golfo de México y con menor incidencia en los estados del centro (SSA, 2008).

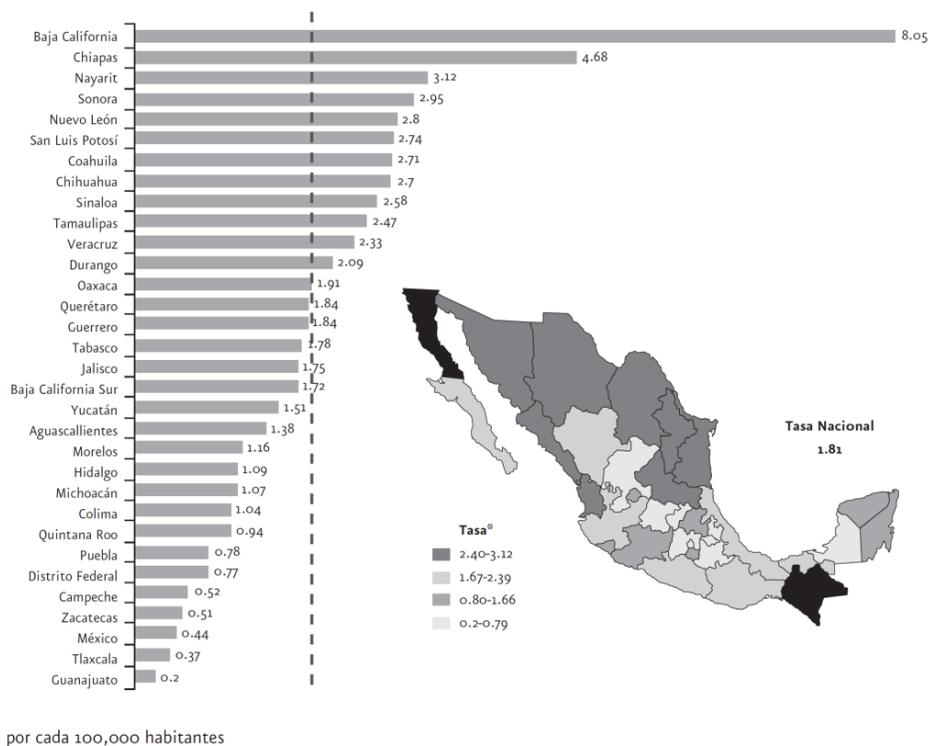


Fig. 2 Mortalidad por tuberculosis pulmonar en México al 2006 (SSA, 2008).

Solo uno de cada 10 casos se presenta en menores de 19 años y la tasa más alta se ubica en los grupos de 60 años y más. Del total de casos registrados en 2007, 85% corresponde a la forma pulmonar, 5% a la ganglionar, 1% a meníngea y el resto (9%) a otras formas (SSA, 2008).

La mortalidad ha descendido considerablemente en los últimos años, en 1999 ocupó el lugar 19 de causas de muerte, con 3.3 muertes por cada 100 000 habitantes. Así mismo la segunda causa de muerte ocasionada por un solo agente etológico y con la mayor ocurrencia en mayores de 15 años (SSA, 2001). Para 2006 la tasa de mortalidad por tuberculosis fue de 1.8 muertes por cada 100 000 habitantes. Las entidades federativas con el mayor número de defunciones por tuberculosis durante 2006 fueron: Veracruz (168), Chiapas (204), Baja California (234), Jalisco (120) y Nuevo León (120) que, en conjunto, concentran el 45% de las defunciones Fig.2 (SSA, 2008).

De esta manera la mitad de los casos no presentan ninguna enfermedad concomitante, no obstante las más frecuentemente asociadas a tuberculosis en México son: diabetes mellitus con 18% (35% en mayores de 40 años), desnutrición 11.6% (24% en niños), alcoholismo 6.8% y VIH/SIDA 4% (SSA; 2008).

En 2010, de acuerdo al Centro Nacional de Epidemiología y Control de Enfermedades (CENAVECE), se detectaron 18,848 casos nuevos de tuberculosis en todas sus formas. De estos casos se detectaron 2,214 defunciones lo que nos genera una tasa de mortalidad de 2.1 casos por cada 100,000 habitantes (CENAVECE, 2011).

Biología

Mycobacterium tuberculosis

El género *Mycobacterium* se compone de más de 100 especies que son cercanamente relacionadas a juzgar por las secuencias de su RNAr 16s, esto se descubrió hace 20 años con la aplicación de técnicas moleculares. Desde entonces, se ha encontrado que las micobacterias están ampliamente distribuidas geográficamente (Cook *et al.*, 2009).

M. tuberculosis es un bacilo Gram positivo, ácido -alcohol resistente. Aunque el ser humano puede ser infectado por otras especies diferentes a *M. tuberculosis* como *M. bovis*, *M. africanum*, *M. fortuitum*, etc. Estos son transmitidos a través de la vía respiratoria aunque pueden ser otras las vías de entrada. La interacción entre *M. tuberculosis* y las células de hospedero es extremadamente compleja, siendo determinada en parte por la virulencia de la cepa, pero también por la resistencia específica y no específica del hospedero (Madigan *et al.*, 2005).

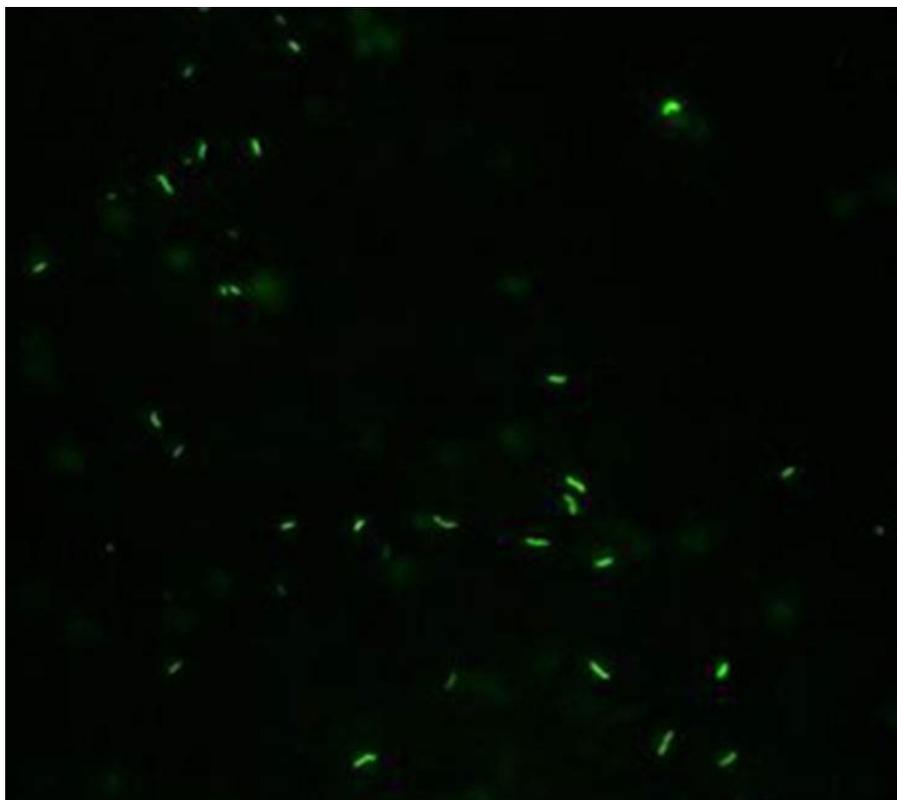


Fig.3 *M. tuberculosis* expresando la proteína verde fluorescente.

M. tuberculosis tiene una membrana plasmática, pared celular y una cápsula externa. Su membrana plasmática al igual que la del resto de los actinomicetos posee lipopolisacáridos que le proveen de protección osmótica. La pared celular está compuesta de una capa interior de peptidoglicano a la cual se unen covalentemente polisacáridos de arabinogalactano a su vez esterificados por ácidos micólicos. La resistencia a fármacos y antibióticos se debe principalmente a la pared celular altamente hidrófoba, misma que actúa como una barrera permeable. La capsula externa tiene un arreglo de glicolípidos, polisacáridos y sulfolípidos libres, además de ser rica en lípidos inusuales (Portillo *et al.*, 2007). También esta estructurada con ácidos micólicos, ácido micoserosico, fenoltioseroles, lipoarabinomanano y arabinogalactano. La capsula externa contribuye a la resistencia

micobacteriana activando reacciones inflamatorias en el hospedero y con esto favoreciendo la patogénesis (Cole *et al.*, 1998).

Muchos determinantes potenciales de resistencia a fármacos también son codificados en el genoma. Estos incluyen enzimas hidrolíticas o modificantes de drogas como lo son las β -lactamasas y las acetil aminoglicosiltransferasas, y otros sistemas que favorecen que las drogas no actúen sobre sus receptores, como lo son los numerosos transportadores ABC (Cole *et al.*, 1998). Las familias de genes involucrados en la síntesis de PDIM, PGL y *p*-HBAD; que ocupan el 2% del genoma, se requiere para la síntesis de lípidos complejos y tienen tanto papeles estructurales como inmunomoduladores en *M. tuberculosis* (Kaufmann *et al.*, 2005). Es importante mencionar que la *M. tuberculosis* tiene la capacidad de expresar la proteína verde fluorescente (Fig.3) (Daniel, 1994) esta una herramienta importante para la visualización al microscopio de luz ultravioleta.

Inmunología

El bacilo se dispersa del pulmón a través de la vía linfática o sangre a otras partes del cuerpo, siendo el ápice del pulmón y los nódulos linfáticos las regiones preferidas del agente infeccioso. Los eventos que siguen a la entrada del bacilo constan de la fagocitosis de *M. tuberculosis* por los macrófagos alveolares, es el primer evento en la relación hospedero patógeno que decide las consecuencias de la infección. Dentro de las primeras 6 semanas de infección, la inmunidad mediada por células se desarrolla, y da entrada a los linfocitos y macrófagos activados hacia la lesión, resultando en la formación de granuloma (Raja, 2004).

El bacilo puede permanecer secuestrado o dormido para siempre dentro del granuloma, pero frente a una disminución en el sistema inmunológico puede ser reactivado, favoreciendo el incremento en el número de bacterias en el pulmón. Posteriormente por

acción de las secreciones de productos celulares y bacterianos se desarrolla el proceso de necrosis, para finalmente generar cavitaciones que llevan a la muerte del individuo (Fig. 4).

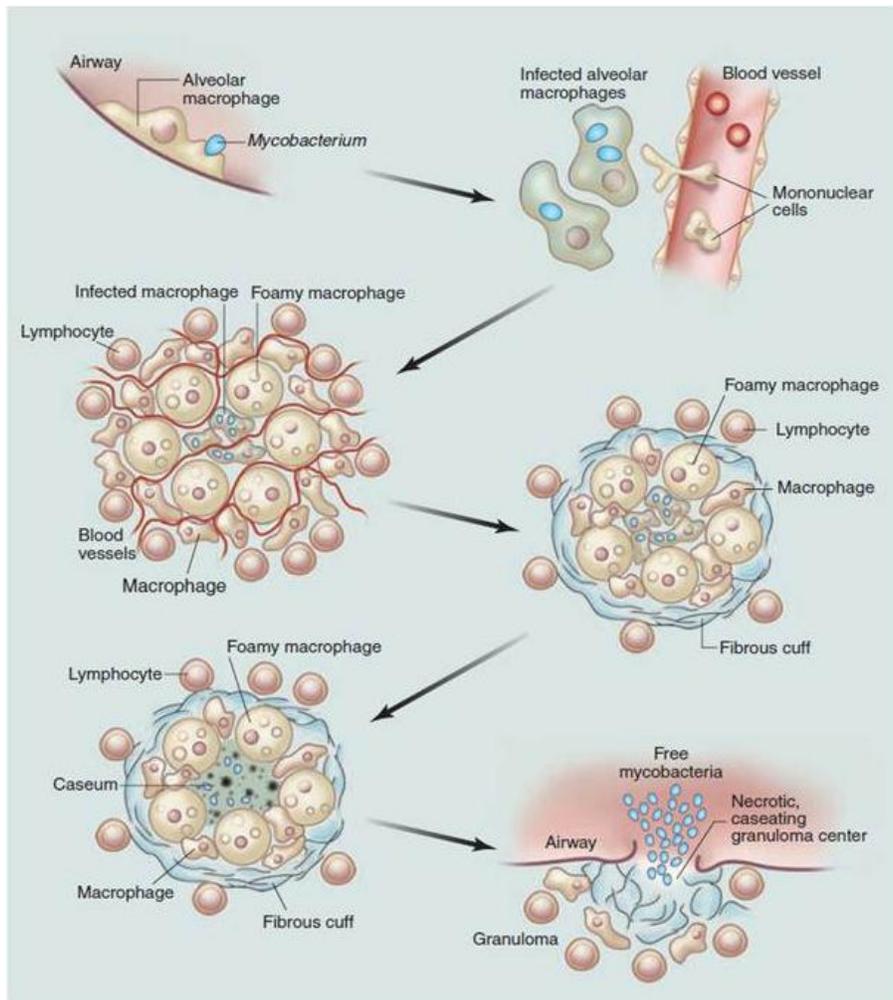


Fig.4. Ciclo de vida de *M. tuberculosis* (Russell *et al.*, 2010).

La unión de *M. tuberculosis* con el macrófago es por la interacción entre los receptores de manosa en la superficie del macrófago y la glicoproteína de superficie lipoarabinomano en la superficie del bacilo. La prostaglandina-E2 e IL-4, una citocina tipo Th2, regulan positivamente la expresión y función de receptores del complemento y de manosa, y el IFN- γ disminuye la expresión de estos receptores, resultando en la disminución de la habilidad para que el bacilo se adhiera al macrófago.

El siguiente paso es la fusión fago-lisosoma, en la cual se sabe que existen funciones efectoras antimicrobacteriales de los macrófagos como: la generación de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI), intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) y mecanismos mediados por citosinas, que se han descrito como métodos para eliminar al bacilo. Se ha reportado que los sulfatidos de las micobacterias derivados de la trealosa multiacetilada 2-sulfato tienen la habilidad de inhibir la fusión fagolisosomal. (Raja, 2004).

El análisis de transcriptoma revela que las marcas de regulación en los genes Rv0634 y Rv2581c, los cuales codifican glioxilasas putativas, pueden ayudar a defender a *M. tuberculosis* contra la metilglioxal derivada del hospedero impidiendo el entrecruzamiento de células T (Kaufmann *et al.*, 2005).

Los fagocitos, en activación por IFN γ y el TNF α , generan óxido nítrico e intermediarios reactivos de nitrógeno, vía la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS), usando L-arginina como sustrato. La significancia del oxido de nitrógeno tóxico en la defensa del hospedero, ha sido bien documentada, tanto *in vivo* como *in vitro* particularmente en el sistema inmune con modelos murinos.

El papel que tienen los intermediarios reactivos de nitrógeno en la infección humana es controversial y difiere su función en el ratón. 1,25 dihidroxi vitamina D3, se reporta que induce la expresión de iNOS e inhibe la actividad de *M. tuberculosis* en el humano (Raja, 2004).

La persistencia del bacilo principalmente en el pulmón; el papel principal de las células T CD4; el papel de soporte de las células T CD8; la falta de evidencia de la participación de las células γ/β y NTK; la importancia del IFN γ , iNOS y la dependencia de TNF α ; es lo que se ha aprendido del estudio en el modelo murino en la protección contra *M. tuberculosis* (Kaufmann *et al.*, 2005).

De esta manera se estaría hablando de la respuesta inmune humoral y celular (Lluís y Lluís, 2003), sin embargo la respuesta inmune celular tiene un papel protector contra *M. tuberculosis*, debido a que este es patógeno intracelular. Se establece que en el modelo murino, dentro de la primera semana de infección, el número de células T CD4 y T CD8 en el drenado de ganglios linfáticos de pulmón incrementa. Entre la semana 2 y 4 post infección, células T CD4 y T CD8 migran hacia los pulmones y demuestran un fenotipo efector/memoria.

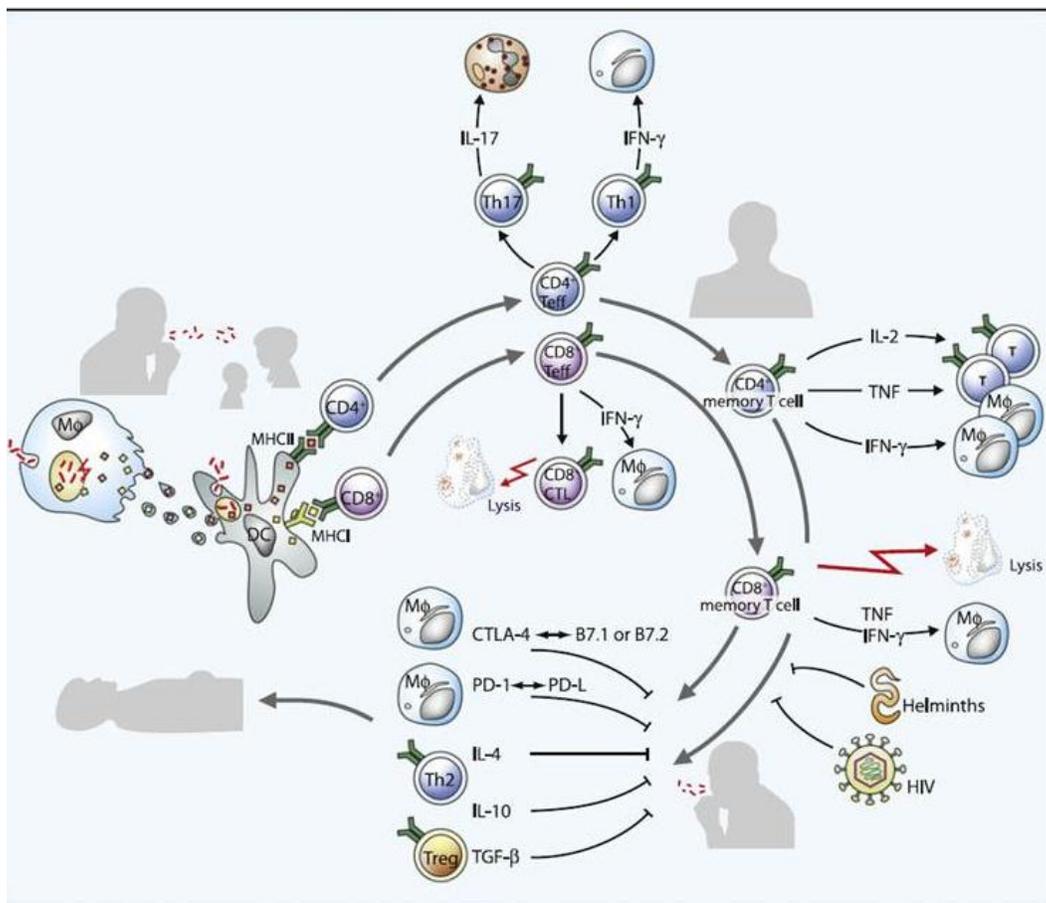


Fig. 5 Principales eventos durante la infección por *M. tuberculosis* (Kaufmann, 2010).

M. tuberculosis reside principalmente en la vacuola dentro del macrófago y por lo tanto, el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II), presenta los antígenos micobacterianos a las células T CD4 como un mecanismo obvio para eliminar la infección.

Así la primera función efectora de las células T CD4 es la producción de IFN- γ y posiblemente otras citocinas para activar los macrófagos.

Las células T CD8 son también capaces de secretar citocinas como IFN- γ e IL-4 y por lo tanto tienen un papel regulador en el balance de la respuesta celular Th1 y Th2 en los pulmones de pacientes con tuberculosis pulmonar. La presentación de antígenos micobacterianos por macrófagos infectados a células T CD8 puede ocurrir de manera temprana, inclusive antes de las 12 horas de infección (Fig.5) (Raja, 2004).

Genética

La combinación de genómica y bioinformática tiene el potencial de generar la información y el conocimiento que permitirá la concepción y desarrollo de nuevas terapias e intervenciones necesarias para tratar esta enfermedad transmitida por aire y a elucidar la inusual biología de este agente etiológico (Cole *et al.*, 1998).

Cabe destacar que hay una relación directa entre la tasa de crecimiento y el tiempo de replicación del ADN del bacilo, siendo que este presenta el 10% de actividad metabólica en comparación a *E. coli* (Cook *et al.*, 2009). Otro punto que resaltar es la inusual ubicación del operón *rrn*, este está situado cerca de 1,500 kilobases del *oriC*, muchas de las eubacterias tienen uno o más operones *rrn* cerca del *oriC* para explotar el efecto de dosis-gen obtenido durante la replicación. Este arreglo puede estar relacionado al lento crecimiento de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998).

El genoma de *M. tuberculosis* se compone de una secuencia de 4 millones 411 mil 529 pares de bases, con un contenido de G+C de 65.6%. Esto representa el segundo genoma bacteriano secuenciado más largo hasta la fecha disponible (Fig.6). 3,924 marcos de lectura abiertos se identificaron en el genoma, contando con cerca de 91% de la potencial capacidad de codificado. De estos se le atribuyen funciones precisas a cerca del 40% de las

proteínas y se encontró información u homología a otro 44% de estas, al 16% restante no se le atribuyen proteínas conocidas y pueden contar para funciones micobacterianas específicas (Cole *et al.*, 1998).

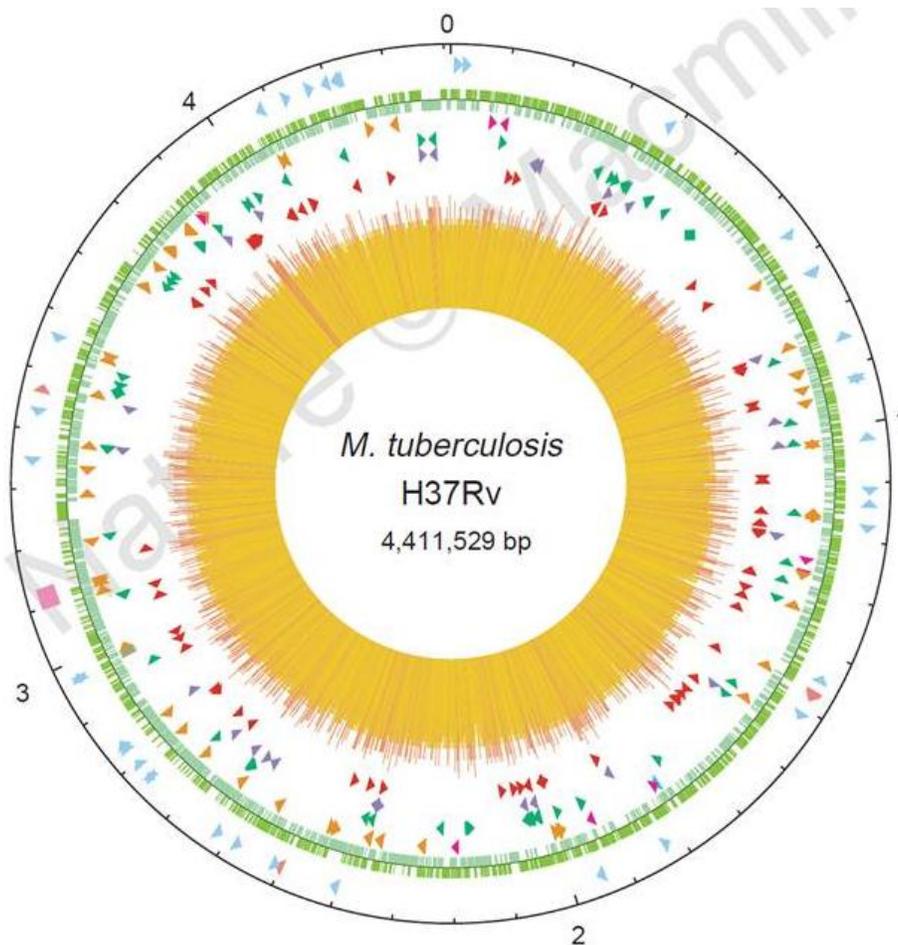


Fig. 6 Esquema mostrando en flechas, la dirección de codificación; al centro en amarillo histograma sobre el contenido de G+C (Cole *et al.*, 1998).

En la mayoría de las proteínas codificadas están presentes, Alanina, glicina, prolina, arginina y triptófano, que son aminoácidos codificados por codones ricos en G+C, y presentan una comparada reducción en el uso de aminoácidos codificados por codones ricos en A+T como lo son aspargina, isoleucina, lisina, fenilalanina y tirosina.

Antes de existir la secuenciación, solo tres factores de virulencia se habían descrito: la catalasa-peroxidasa; la cual protege contra especies reactivas de oxígeno producidas por el fagocito, MCE; el cual codifica el factor para la colonización del macrófago y un factor sigma; sig A (aka RpoV), mutación que lleva a la atenuación (Cole *et al.*, 1998).

El genoma secuenciado resuelve un misterio, pero conlleva a otro al mismo tiempo, este involucra que la secuenciación de una cepa de laboratorio dará resultados que deberán ser comparados con las cepas de aislado clínico. Estudios de este tipo mostraron notables diferencias. La cepa H37Rv contiene 37 inserciones en relación a la cepa clínica CDC1551. De estas 37 inserciones, 26 afectaron marcos de lectura abiertos y 11 fueron intergenéticos. 49 inserciones fueron identificadas en la cepa CDC1551 en relación a la cepa H37Rv. 35 inserciones afectaron marcos de lectura abiertos y 14 fueron intergenéticos (Fleischmann *et al.*, 2002).

Modelos experimentales de tuberculosis

La actual vacuna BCG confiere protección a ratones y cobayos, en términos de la reducción de carga bacilar en órdenes de magnitud de 1 a 2 y de 2 a 4 respectivamente, sin embargo la erradicación estéril nunca se consigue. Esto es generalmente aceptado como una buena protección, que implica que la prueba de nuevas vacunas se puede llevar a cabo en modelos donde la vacuna BCG funciona (Kaufmann, 2001).

Los modelos que parecen aproximarse a la tuberculosis pulmonar humana son el ratón, cobayos y conejos, expuestos a aerosoles de *M. tuberculosis* virulenta, bajo condiciones que resultan en la deposición de un pequeño número de organismos viables directamente en el espacio alveolar de los pulmones (McMurray, 2001).

La investigación de tuberculosis en ratones continua atractiva debido a nuestro completo conocimiento del sistema inmune de ratón, así como la disponibilidad de varias cepas de ratones Knock-out (Kaufmann, 2001). Diferentes estudios llevados a cabo en humanos y en modelos animales experimentales han mostrado que en tuberculosis, los balances de las citocinas Th1 y Th2 están relacionados a la inmunopatogénesis de la enfermedad (Hernández-Pando *et al*, 1996).

Sin embargo los métodos de inyección que inoculan la micobacteria de manera rápida en el torrente sanguíneo (intravenosa, intraperitoneal) resultaron en la diseminación hematogena del pulmón, proceso que no tiene semejanza con la infección respiratoria seguido de la diseminación extra pulmonar que ocurre (McMurray, 2001).

El modelo murino no se puede decir que este reflejando los efectos de la infección en humanos debido a que el grupo 1 CD1, moléculas presentadoras de antígeno relacionadas al MHC I que presentan antígenos lipídicos en especial el grupo I de moléculas CD1 que transporta componentes de la pared celular micobacteriana a las células T, esta ausente en el ratón. En esta especie, las células T γ/δ participan en la respuesta por infecciones de tuberculosis, pero las respuestas específicas relacionadas a ligandos no se observan.

Los primates no humanos son naturalmente susceptibles a la infección por *M. tuberculosis*, y tienen células T fosfoligando-especificas γ/δ y células T CD1 específico glicolipídicas, pero solo un limitado número de experimentos en primates no humanos se han llevado a cabo (Kaufmann, 2001).

La vacunación con BCG u otras vacunas efectivas, resultan en una protección significativa para todos estos modelos, así como lo hace la terapia oral con estándares de fármacos antimicobacterianos de primera línea o agentes quimioterapéuticos novedosos. Por lo tanto, estos modelos son apropiados y útiles para la búsqueda de nuevas vacunas y drogas

(McMurray, 2001). Por la fácil accesibilidad y manejo de especímenes se escogió el modelo murino como el mas apto para la realización de este proyecto.

Modelo murino

El sistema inmune murino es el mejor caracterizado hasta la fecha, además tiene ventajas comerciales, capacidad de almacenamiento y la existencia en el mercado de numerosos reactivos para medir las diferentes funciones inmunes frente a infecciones producidas por micobacterias (McMurray, 2001). En el modelo murino las células Th 1 son protectoras, debido a la secreción de INF- γ , mismo que activa macrófagos para contener y matar intracelularmente las micobacterias de una manera más efectiva. Las células Th 2 están asociadas con la enfermedad crónica y fase progresiva de la enfermedad, ya que estas secretan citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, que desvían la respuesta a la inmunidad humoral y suprimen la respuesta inmune mediada por células (Hernández-Pando *et al*, 1996).

De esta manera se observaron dos fases en el modelo murino de tuberculosis pulmonar. En la fase aguda el análisis citofluorométrico de lavados bronquiales mostro un alto número de macrófagos y linfocitos, con la predominancia de células CD4. Además, la inmunohistoquímica y la técnica de PCR, indicaron que hay una predominancia de células Th 1 debido a que las células inmuno reactivas IL-2 fueron numerosas en el infiltrado inflamatorio y granulomas. La expresión genética de INF- γ e IL-2 fue evidente desde los primeros días de infección y aumentando gradualmente de nivel.

En la fase crónica, comenzó posterior al primer mes de infección, se caracterizó por un evidente balance Th 0, como lo indicó la alta expresión genética de IFN- γ e IL-4. Durante el cuarto mes de infección el estudio de inmunohistoquímica mostró una proporción balanceada de células inmunoreactivas IL-2 e IL-4 en las áreas neumónicas y una clara predominancia de esto se observó en los granulomas. La predominancia de células CD8,

que se demostró por análisis citofluorométrico, fue otra característica de la fase crónica que se relaciona con lo observado en la tuberculosis humana. La secreción y balance de citocinas Th 1/Th 2 está asociado con la evolución de la enfermedad y puede tener un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad (Hernández-Pando *et al*, 1996).

Los modelos experimentales disponibles en el estudio de la tuberculosis, utilizan rutas no naturales de infección como la vía hematogena o bien el uso de micobacterias no virulentas. El modelo murino de tuberculosis experimental utilizada por el grupo del Dr. Hernández-Pando es uno de los modelos mas utilizados, ya que la bacteria utilizada es la cepa virulenta H37Rv y la vía de administración es directa en el pulmón (Intratraqueal).

Cambios histopatológicos

En este modelo se determinó que un día después de la infección intratraqueal de *M. tuberculosis*, se observa una pequeña cantidad de infiltrado inflamatorio principalmente constituido por linfocitos en el intersticio alveolo capilar que rodea los vasos y los bronquios. A los tres y siete días el infiltrado inflamatorio era mayor, se incrementa marcadamente el número de macrófagos observados en el intersticio y lumen alveolar. A las dos semanas postinfección, se observaron granulomas de pequeño a mediano tamaño, al mismo tiempo, la inflamación peri vascular y peri bronquial se encuentran más acentuadas. Al día 21 y 28 postinfección, los granulomas incrementaron de tamaño, mostrando un mayor número de macrófagos con grandes y distintos núcleos (Hernández-Pando *et al*, 2006).

Al mes postinfección la presencia de áreas neumónicas era evidente, consisten de abundantes macrófagos vacuolados en el lumen alveolar mezclado con linfocitos, pocos leucocitos polimorfonucleares y exudado protéico. A los 4 meses postinfección el 80-90%

de los ratones murieron debido a la infección y las secciones del pulmón mostraron extensas áreas neumónicas, ocupando del 75% al 80% del parénquima pulmonar.

Los granulomas fueron incorporados en áreas neumónicas, así que solo se pudieron observar granulomas de tamaño medio (Fig. 7) (Hernández-Pando *et al*, 2006).

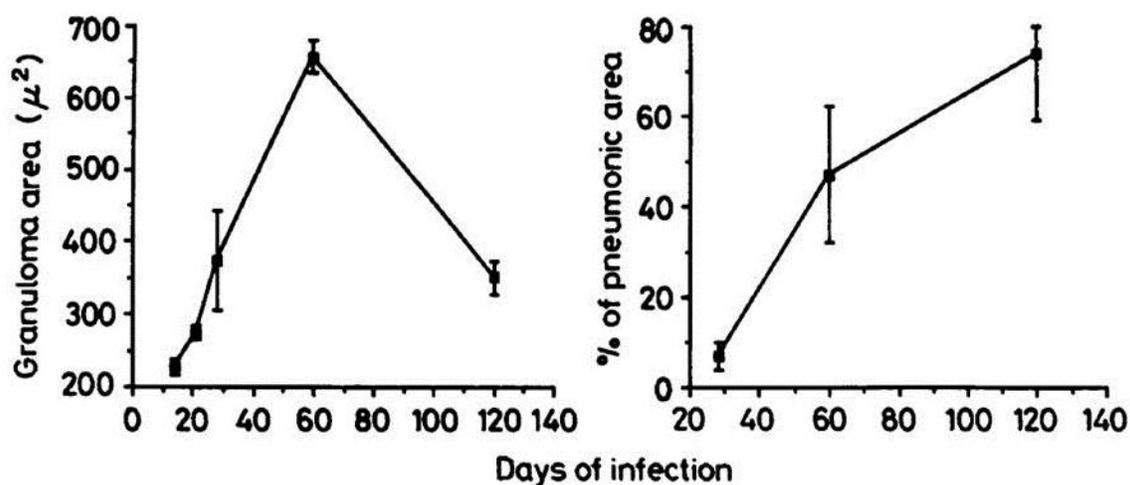


Fig. 7 Derecha, cinética de tamaño de granulomas. Izquierda cinética del porcentaje de área neumónica (Hernández-Pando *et al.*, 1996).

Localización histológica

En cuanto a los análisis de localización histológica, se obtuvo que de los días 1 a 28 postinfección, existe predominancia de células inmunoreactivas IL-2 en el intersticio e inflamación peri-vascular y peri-bronquial (Hernández-Pando *et al*, 2006).

Los granulomas a los 14 y 21 días postinfección también mostraron diferentes porcentajes de células inmunoreactivas IL-2/IL-4, con la predominancia de células inmunoreactivas IL-2, seguido de un número igual al primer y segundo mes postinfección. La predominancia de células inmunoreactivas IL-4 a los 4 meses de postinfección, es coherente con lo encontrado en el intersticio capilar de los alveolos, donde las células inmunoreactivas IL-4 fueron predominantes (Hernández-Pando *et al*, 2006).

Análisis de expresión genética

Se ha observado que IFN- γ , citocina de respuesta Th1, esta presente desde el primer día postinfección. Al realizar un seguimiento de la expresión se observa un aumento progresivo el cual alcanza su máximo a los 4 meses postinfección. En el caso de IL-4, citocina relacionada con favorecer la progresión de la enfermedad, se observa una baja expresión, misma que se mantiene hasta el día 28 postinfección. Después se observa un incremento en la expresión teniendo su máximo pico entre los días 60 y 120 postinfección (Hernández-Pando *et al*, 2006).

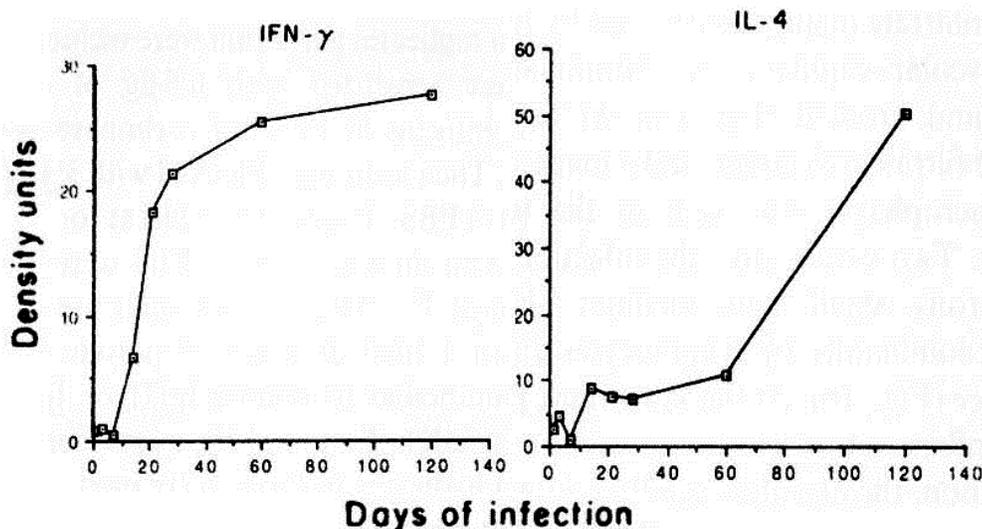


Fig. 8 Expresión genética de citocinas, eje Y, densidad óptica, eje x días post infección. Donde se observa el incremento de la expresión genética de citosinas Th1 (IFN γ) y Th2 (IL-4) durante el progreso de la infección pulmonar por *M. tuberculosis* (Hernández-Pando *et al.*, 1996).

Por lo anterior la evolución de la enfermedad en el ratón puede dividirse en dos fases:

La fase aguda, que es caracterizada por inflamación alveolar, intersticial y peri-bronquial; con abundantes macrófagos en el lumen alveolar y granulomas. Esta comienza con el aumento de citocinas protectoras como IFN- γ y TNF- α .

La segunda fase de la enfermedad corresponde a la fase crónica o avanzada, comenzando entre el día 28 o 30 postinfección llegando hasta los 4 meses. Se caracteriza por la

presencia de áreas neumónicas, fibrosis intersticial y necrosis, generando manifestaciones morfológicas de gran severidad y cronicidad (Fig. 8).

En un estudio del 2006 el Dr. Hernández-Pando muestra que cuando ratones Balb/c machos singénicos de 6 semanas de edad son infectados con la cepa H37Rv, hay una rápida y fuerte producción de TNF- α por parte los macrófagos activados, acompañado por un incremento progresivo de la expresión de IFN- γ e iNOS. Esta muestra un pico máximo de expresión a las tres semanas. A este tipo de respuesta se le atribuye una etapa de control temporal a la progresión de la enfermedad, disminuyendo el crecimiento bacteriano. Después, la enfermedad entra a una fase progresiva con incremento en la proliferación bacteriana, aumentando drásticamente la expresión de IL-4, IL-10 y TGF- β , acompañado de la disminución en la expresión de TNF- α , IFN- γ iNOS (Fig. 9) (Hernández-Pando *et al*, 2006).

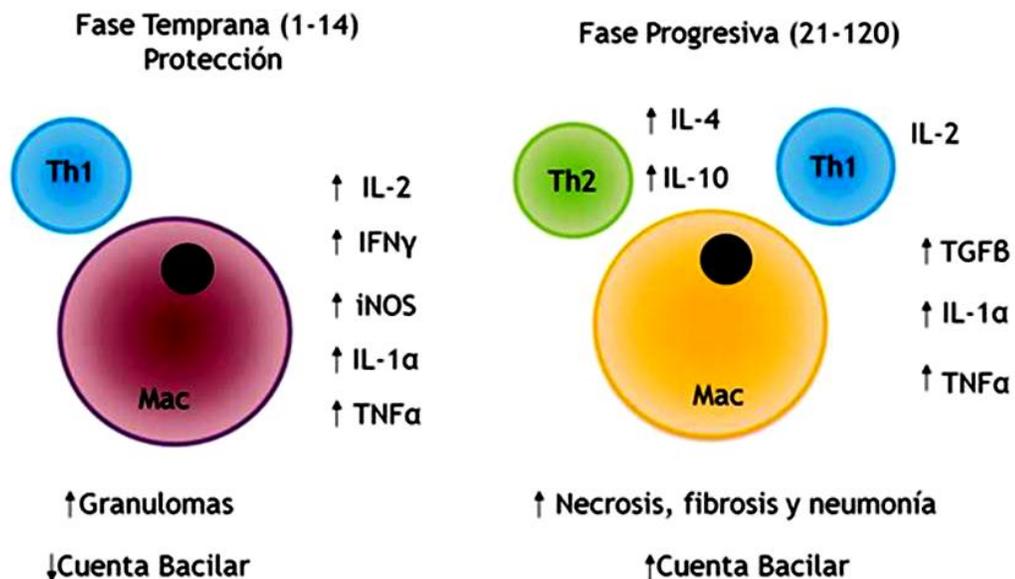


Fig. 9 Esquema que resume el modelo murino. Muestra la fase temprana de infección (Izquierda) y la fase progresiva de la infección (Derecha), Donde se ilustran las principales citosinas involucradas en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*. (Hernández-Pando *et al*, 1996).

Vacunación

La búsqueda de una vacuna contra tuberculosis comienza 110 años atrás con grandes expectativas. Solo ocho años después del descubrimiento del bacilo tuberculoso en 1882, Robert Koch obtuvo una vacuna por subunidad para el tratamiento de tuberculosis, una enfermedad que constituía la peor amenaza para la humanidad en ese tiempo.

El segundo intento se inicio diez años después por los científicos franceses Calmette y Guérin. Después de más de 200 cultivos, obtuvieron una cepa atenuada de *M. bovis*, el agente etiológico de la tuberculosis en el ganado, que puede causar tuberculosis en humanos, esta vacuna atenuada ahora llamada BCG (Bacilo Calmett-Guérin) probó mayor eficacia (Kaufmann, 2001) y se ha probado que esta vacuna es relativamente segura y protectora contra varias formas de tuberculosis en niños (Parida y Kaufmann, 2010).

Bacilo Calmett-Guérin

Mycobacterium bovis BCG no es la única vacuna usada a nivel mundial para la prevención de tuberculosis. De hecho, la atenuada y viva, vacuna de BCG originalmente derivada de una cepa virulenta de *M. bovis* se ha usado para prevenir tuberculosis desde 1921 (Hernández-Pando *et al.*, 2006) siendo más de 3,000 millones las personas que han recibido la vacuna BCG (Dietrich *et al.*, 2006).

Además de que BCG previene la diseminación de tuberculosis en recién nacidos, se ha encontrado que falla en proteger contra la forma más común de la enfermedad, la tuberculosis pulmonar en adultos (Kaufmann, 2001).

Por lo tanto, la vacuna BCG tiene efecto limitado en contra de la tuberculosis pulmonar en adultos y los estimados de protección van del 0% al 80%, basado en pruebas de campo bien controladas. Muchos estudios han reportado que la BCG es protectora solo por 10 a 20 años

(Dietrich *et al.*, 2006). Es por lo anterior que se requieren nuevos candidatos a vacunas (Hernández-Pando *et al.*, 2006).

En las regiones altamente endémicas BCG ha fallado en controlar la tuberculosis (Dietrich *et al.*, 2006). En un estudio comparativo de respuesta inmune, después de la vacunación con BCG en sujetos de Chengalpattu, India y Londres, la vacunación con *M. bovis* BCG no mejora la bacteriostasis en sujetos de la India pero sí lo hace en sujetos de Londres (Raja, 2004).

Otro hecho importante a escala global, se basa en que la fuente de sensibilización más pronunciada y ampliamente distribuida, es la infección latente de tuberculosis (Dietrich *et al.*, 2006). Esta puede ser curada con antibióticos, siendo esta infección un método de vacunación más eficiente. Sin embargo factores socio económicos, de áreas endémicas y el largo periodo de tratamiento, que requiere de la eliminación de la bacteria para el control global de la enfermedad no permiten de este un método viable para el control de la epidemia de tuberculosis (Dietrich *et al.*, 2006).

Sin embargo, la reinfección ocurre después de la exitosa erradicación de una infección primaria por tuberculosis con un agente quimioterapéutico. En estos individuos, la respuesta inmune que es inducida por una infección natural no logra inducir la adecuada memoria inmunológica para prevenir la infección secundaria (Kaufmann, 2001).

Hasta la fecha el mecanismo para la insuficiencia de protección dependiente de las células T en la respuesta de la vacuna BCG y latencia por infección de *M. tuberculosis* siguen sin tener respuesta (Kaufmann *et al.*, 2005). Todavía se encuentran enormes obstáculos que evitan la realización de un remplazo para la actual vacuna BCG. Uno de los mayores inconvenientes es la falta de comprensión sobre lo que constituye la inmunidad protectora en tuberculosis.

Notablemente los linfocitos T y fagocitos mononucleares son el centro de desarrollo para las vacunas contra tuberculosis. Este armamento de defensa puede controlar el brote de tuberculosis mediante la inhibición de la replicación de *M. tuberculosis*. Sin embargo, este mecanismo no solo falla en prevenir una infección estable, sino que también falla en erradicar al patógeno que persiste en una fase latente durante el tiempo que la inmunidad siga siendo competente (Parida y Kaufmann, 2010).

Bacteria Vivas

Se consideran dos principales estrategias para el desarrollo de vacunas: a partir de subunidades y bacterias viables. Las vacunas por subunidades no serán tratadas, por que no son consideradas en el desarrollo de este proyecto. Las vacunas en base a bacterias viables, intentan activar todas las subpoblaciones de células T para alcanzar una respuesta óptima. Las diferentes poblaciones de células T varían sutilmente en las funciones efectoras, y tienen diferentes requerimientos para su activación.

Como ejemplo, las moléculas del MHC I son mayormente distribuidas entre las células del hospedero que las moléculas del MHC II y las moléculas CD 1. Aunque los macrófagos sirven como un importante hábitat para *M. tuberculosis*, el patógeno también debe esconderse en alguna otra estirpe celular que no exprese constitutivamente moléculas del MHC II y moléculas CD 1, como lo son las células del parénquima pulmonar. Las células T γ/δ son activadas más eficientemente que las células T por lo tanto pueden realizar funciones de defensa temprana (Kaufmann, 2001).

La estrategia de este proyecto es crear una vacuna pre-exposición que sea capaz de inducir mayor respuesta inmune, que la producida por BCG, para efectivamente contener la infección y así prevenir la enfermedad (Parida y Kaufmann, 2010). De esta manera las estrategias para mejorar la vacuna BCG o para atenuar *M. tuberculosis* necesitan ser

explotadas y no deben de ser mutuamente excluyentes. Los constructos con vacunas viables pueden mejorarse con la sobreexpresión de antígenos definidos como protectores ó por la supresión de otras moléculas que pueden contribuir a la virulencia (Kaufmann, 2001).

Uno de los acercamientos para identificar los genes responsables para la patogenicidad es a partir de mutantes de *M. tuberculosis*, que son después probados para revisar la multiplicación bacteriana en pulmones de ratón o cobayos. Racionalmente, mutantes vivas y replicantes de *M. tuberculosis* son potentes candidatos a vacunas contra tuberculosis. Así, la vacunación con mutantes autótrofas de micobacteria pueden inducir una estimulación inmune fuerte y prolongada confiriendo mayor protección que BCG (Hernández-Pando *et al.*, 2006).

El genoma de *M. tuberculosis* provee una guía para la construcción de mutantes con genes suprimidos siendo que muchos factores de virulencia putativos en el genoma se han identificado.

Se ha presentado evidencia indicando que las micobacterias debilitan la presentación de moléculas del MHC II, el MHC I y CD 1, reduciendo la estimulación de células T. Por lo tanto, la atenuación de micobacterias no se puede restringir solo a la depleción de factores de virulencia clásicos, también incluye la eliminación de componentes que son inhibidores de la respuesta inmune y enzimas clave en las rutas metabólicas relacionadas a virulencia (Kaufmann, 2001).

Los atributos que la cepa mutante de micobacteria necesita tener para ser considerada un candidato potencial a vacuna deben de ser similares o incluso mejores que la protección por BCG y los parámetros esenciales a verificar son: sobrevivida, carga bacilar, histopatología del pulmón y respuesta prolongada Th 1. De esta manera, si el nivel de protección de la cepa mutante es el mismo que la BCG pero con mejoras en los aspectos antes mencionados

se considera un buen candidato, porque este puede ser particularmente eficiente en poblaciones humanas inmunodeficientes, como pacientes con VIH.

Ahora es claro que después de muchos años de crecimiento y de cultivo en diferentes laboratorios de diversas partes del mundo, han surgido cepas de vacuna BCG que han evolucionado, las cuales difieren genéticamente una de otra y de la BCG original. Siendo BCG subespecie Phipps la más eficiente para conferir protección.

En ratones y humanos la protección contra infecciones micobacterianas depende de $\text{INF-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$, producido por células Th 1 y macrófagos activados respectivamente. Las vacunas vivas atenuadas son construidas con el objetivo de presentar al sistema inmune un reto lo más posiblemente cercano a una infección natural, pero sin las alteraciones patológicas producidas por una bacteria virulenta.

Es mejor evaluar la respuesta inmune mediada por células antes de la vacunación y después se efectúa el modelo de vacunación retando con micobacterias virulentas, comparando ratones vacunados con la cepa mutante y BCG.

Por lo tanto las cepas mutantes atenuadas necesitan mantener una limitada capacidad para crecer y diseminarse dentro de hospedero, logrando inducir una respuesta protectora. Se ha demostrado que solo las cepas atenuadas de *M. tuberculosis* que se pueden multiplicar durante un periodo de inmunización, confieren protección a los animales vacunados. Esto es porque, para los patógenos intracelulares, vacunas hechas con subunidades o patógenos muertos suelen ser menos efectivos que las vacunas vivas (Hernández-Pando *et al.*, 2006).

De esta manera se ha probado seguridad en estudios preclínicos para las bacterias vivas recombinantes de *M. tuberculosis* con mutaciones deletéreas en genes como *phoP* y *fadD26*, la bacteria no replicante autótrofa para lisina y pantotenato con atenuación para *secA2n* entre otras (Fig. 10) (Parida y Kaufmann, 2010).

Metodología	Tipo de vacuna	Producto	Patrocinador	Fase (2010)	Descripción
Sensibilización y Refuerzo	Vector viral	MVA-85A Aeras-485	Oxford/Aeras	I, II	Vector Ankara que expresa antígeno 85A
		Aeras-402 Crucell Ad35	Crucell/Aeras	I, II	Adenovirus 35 que expresa antígenos 85 ^a , 85B, TB10.4
	Proteína recombinante	Mtb72f	GSK/Aeras	I, II	Fusión de antígenos Rv1196 y Rv0125 con adyuvante
		Hybrid +IC-311	SSI/Intercell/TBVI	I, II	Compuesto de antígeno 85B y ESAT-6 con adyuvante
BCG Recombinante	BCG Viva Recombinante	rBCG 30	UCLA/TNH/Aeras	I	Expresa antígeno 85B de 30 Kda
		VPM 1002	Max Planck TBVI	I	Expresa listeriolisina y tiene una mutación deletérea para el gen de la ureasa.
Vivas	Recombinante Viva	<i>MTBVAC01</i>	Universidad de Zaragoza	GMP	Atenuación de <i>M. tuberculosis</i> por inactivación de los genes <i>phoP</i> y <i>fadD26</i>
		$\Delta phoP$	Instituto Pasteur		
		$\Delta fad26$ (DIM)	BIOFABRI TBVI		
		<i>MTB</i> ($\Delta lysA$, $\Delta panCD$, $\Delta secA2$)	Colegio de Medicina Albert Einstein	Estudios Preclínicos	<i>M. tuberculosis</i> no replicante auxotrófico para lisina y pantotenato, atenuada para <i>secA</i>

Fig. 10 Principales candidatos a vacunas (Martín y Gicquel, 2011).

Factores de Virulencia

M. tuberculosis se encuentra con numerosos ambientes durante el curso de una infección exitosa. La adaptación a estas condiciones debe de requerir una compleja regulación de expresión genética (Manganelli *et al.*, 2004). La expresión genética y coordinada es un mecanismo adaptativo novedoso y es claro que numerosas respuestas de regulones están involucradas en *M. tuberculosis*.

En procariontes los genes están frecuentemente regulados a nivel de transcripción, y los factores sigma frecuentemente regulan condicionalmente las respuestas expresadas, como respuestas al shock térmico, esporulación, movilidad y funciones extracitoplasmáticas.

Estas son consideradas factores de estrés dentro de las cuales se incluyen el transporte, modificaciones a la pared celular y la secreción de proteínas (Agarwal *et al.*, 2007).

La necesidad de adaptarse a diferentes ambientes y la posibilidad de entrar a estado de latencia sugiere un mayor papel de regulación genética en la patogenicidad de *M. tuberculosis* (Manganelli *et al.*, 1999).

La primera exposición a estrés son los agentes oxidantes, en segundo lugar es la exposición a pH bajo, en tercero es el daño a las estructuras de la superficie, en cuarto es hipoxia; especialmente en los granulomas y en quinto lugar es la escasez de nutrientes y elementos esenciales (escasez de hierro), todos estos factores están relacionados con la respuesta inmune del hospedero (Manganelli *et al.*, 2004).

El genoma de *M. tuberculosis* codifica cerca de 190 reguladores transcripcionales: 13 factores σ , 11 sistemas de dos componentes, 5 reguladores de respuesta no pareados, 11 proteínas cinasa y más de 140 reguladores transcripcionales putativos. Muchos de estos reguladores han sido caracterizados y responden a estrés ambiental, sin embargo la respuesta ambiental de otros sigue siendo desconocida.

La secuencia del genoma de *M. tuberculosis* revela la presencia de 13 genes codificantes de factores sigma (Fig.11), incluyendo 10 que ya se han clasificado como pertenecientes a la subfamilia con función extracitoplasmática (Agarwal *et al.*, 2007).

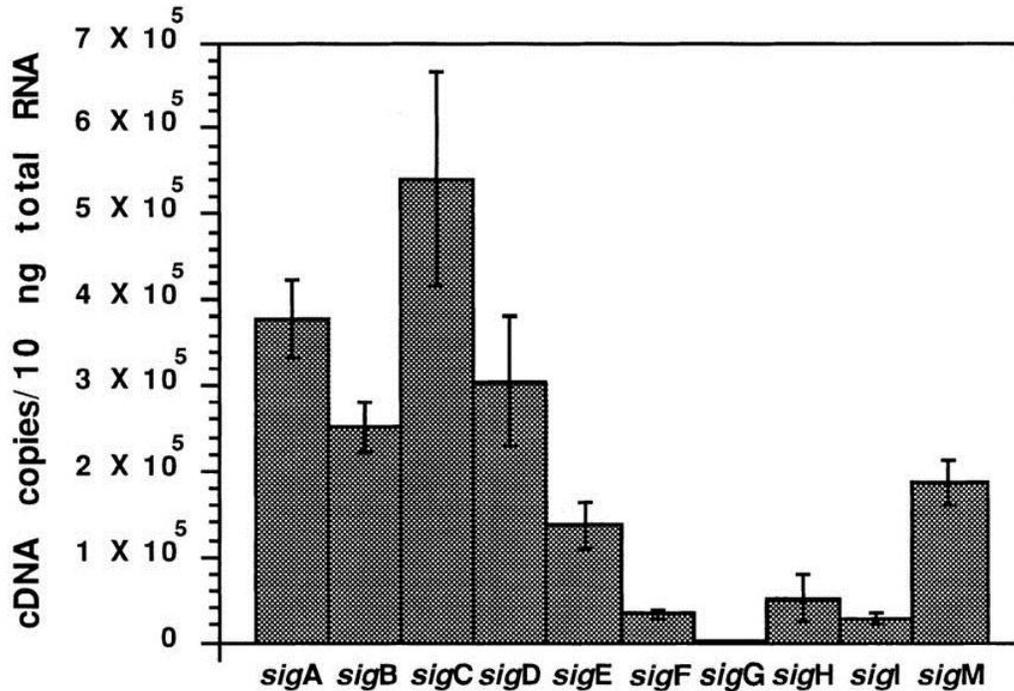


Fig. 11 Niveles de RNA mensajero de varios factores sigma en cultivos durante crecimiento exponencial (Manganelli *et al.*, 1999).

El núcleo de la RNA polimerasa de procariontes esta compuesta de cuatro subunidades β , β' , ω y un dímero de α . Una quinta subunidad, el factor σ , reversiblemente se asocia con la RNA polimerasa, formando una holoenzima, y provee de una función promotora de reconocimiento.

Es generalmente observado que todo factor σ tiene su propia especificidad, permitiendo la iniciación de la transcripción de diferentes genes. La variación temporal de las poblaciones de factores σ puede representar un camino poderoso para *M. tuberculosis* en la modulación de la expresión génica en correlación con los requerimientos fisiológicos y así lograr una infección exitosa.

De esta manera los factores sigma pueden ser divididos en dos grupos que son filogenéticamente distintos: aquellos relacionados con σ^{70} y los relacionados con σ^{54} . Mientras todas las eubacterias codifican al menos un factor σ perteneciente a la clase σ^{70} , no todas codifican uno perteneciente a la clase σ^{54} . Y como esta ultima familia no esta

presente en las micobacterias, no será discutida. De esta manera la familia σ^{70} puede ser dividida en tres grupos, dependiendo en su estructura y función: los factores sigma primarios, factores primarios parecidos a los factores sigma no esenciales, y factores sigma alternativos.

Todos los genomas en las eubacterias codifican un factor sigma primario. Este es esencial y permite la transcripción de genes constitutivos, en *M. tuberculosis* este grupo esta representado por σ^A .

Los factores sigma que pertenecen al segundo grupo no son esenciales bajo condiciones de crecimiento fisiológicas y son muy similares a los factores sigma primarios. Pueden estar involucrados en la fase de supervivencia-estacionaria en cianobacterias y se involucran en los ritmos circadianos y la utilización de nitrógeno y carbón en *Sybechococcus sp.* En *M. tuberculosis* se representa con los σ^B .

El tercer grupo es el más heterogéneo y puede dividirse en numerosos subgrupos. En *M. tuberculosis*, se representan por σ^F , perteneciendo al subgrupo que también controla las respuestas a estrés y esporulación en *Streptomyces* (Manganelli *et al.*, 2004).

Los factores sigma alternantes de bacterias se sabe que proveen un medio para la regulación de la expresión génica en respuesta al ambiente, con estímulos siempre cambiantes ya que se puede combinar con el núcleo de la RNA polimerasa para dirigir la transcripción hacia nuevos genes. Hay muchos casos de determinación de la virulencia bacteriana en los cuales la expresión es regulada por un factor sigma alternativo (Manganelli *et al.*, 1999).

El locus de las micobacterias que contiene los genes codificantes de los principales factores sigma y los factores parecidos a factores sigma, están conservados en el genoma. En contraste, todos los factores sigma extracelulares de *M. tuberculosis* tienen un ortólogo en

M. bovis sumando que *M. bovis* BCG Pasteur tiene duplicados los Factores sigma sigH y sigM.

SigA codifica el mayor factor sigma micobacteriano, su homólogo se ha demostrado que es indispensable en *Mycobacterium smegmatis*. Una mutación sin sentido en la región que codifica este dominio, que se propone que interactúe con otras proteínas reguladoras, mostro ser responsable de la atenuación de virulencia en *M. bovis* (Manganelli *et al.*, 1999).

La inactivación de sigA no ha sido posible en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, fue el primero en ser asociado a la virulencia debido a que la sustitución de aminoácidos en *M. bovis* causo la atenuación de infección en el modelo de cobayos (Manganelli *et al.*, 2004).

Por lo cual se considera el factor sigma constitutivo esencial (Manganelli *et al.*, 1999). Se ha mostrado recientemente que sigA interactúa con el regulador transcripcional putativo WhiB3. La familia WhiB en *M. tuberculosis* incluye siete miembros. Relacionados con proteínas presentes en *Streptomyces coelicolor* y que participan en la esporulación, septación y deposición de la pared celular (Manganelli *et al.*, 2004). Posteriormente se entrara en detalles respecto a esta familia de genes.

La cantidad expresada de SigA es prácticamente igual en diferentes condiciones de estrés, con la excepción del aumento en condiciones de escasez de nutrientes, crecimiento en la fase estacionaria y crecimiento en ausencia de agitación. Lo que se relaciona con la hipótesis en la cual sigA codifica el mayor factor sigma vegetativo de *M. tuberculosis* (Manganelli *et al.*, 1999).

La mutante de *M. tuberculosis* para sigB es más sensible a estrés ambiental, cultivos con detergente SDS, shock térmico y estrés oxidativo (Manganelli *et al.*, 2004). Después de la exposición a SDS los niveles de sigB y sigE aumentaron de 11 y 6 veces respectivamente con respecto a los niveles de sigA (Manganelli *et al.*, 1999). Pero es posible que esta crezca

en macrófagos humanos de manera normal y no se atenúa en ratón. SigB puede funcionar como mecanismo alternativo para mantener la transcripción de genes constitutivos durante exposiciones a estrés, cuando SigA esta inactivo o sus niveles de expresión son bajos.

El gen codificante de SigF es inducido en *M. smegmatis* y *M. bovis* BCG después de la exposición a varios antibióticos, hipoxia, bajas temperaturas, estrés oxidativo y entrada a la fase estacionaria. Sin embargo en *M. tuberculosis* no se induce después de la exposición a bajas temperaturas, hipoxia, estrés oxidativo o entrada a la fase estacionaria. Esto sugiere que sigF es regulada de diferente forma en *M. tuberculosis*, aun cuando existe mucho parecido entre estos organismos. Sin embargo la mutante para sigF es más sensible a rifampicina que el tipo silvestre (Manganelli *et al.*, 2004). Además esta presente solo en especies con crecimiento lento (Manganelli *et al.*, 1999).

La mutación de sigC es más susceptible a la presencia de peróxido de hidrógeno. Estudios de genómica funcional con arreglos de ADN, mostro que al menos 38 genes son reprimidos en la mutante para el gen de sigC en los diferentes estadios de la curva de crecimiento. Estos genes codifican proteínas envueltas en un alto rango de procesos celulares como lo es la biosíntesis de ácidos grasos, fosfolípidos, síntesis de la pared celular, metabolismo energético y respuesta general a estrés (Manganelli *et al.*, 2004). De manera sorprendente el RNA mensajero de sigC es el mas abundante, y de acuerdo con datos anteriores, la RNA polimerasa de *M. tuberculosis* esta asociadas con sigA o sigB. Por lo cual es posible que el transcrito de sigC es traducido con baja eficiencia, es inestable o tiene poca afinidad a la RNA polimerasa (Manganelli *et al.*, 1999).

El gen codificante de SigE se induce después de la exposición a un gran número de factores de estrés ambiental, como lo es el shock térmico, estrés inducido por detergentes en la superficie, así como en el crecimiento dentro de los macrófagos.

Treinta y ocho genes requieren de sigE para su completa expresión durante el crecimiento exponencial, de estas, 13 son unidades transcripcionales putativas que regulan 23 genes que requieren del factor sigE para su inducción después de ser expuestas a concentraciones inhibitorias de SDS. Incluye genes involucrados en la traducción, control transcripcional, biosíntesis de ácido micólico, transporte de electrones y respuesta a estrés oxidativo. Muchos de estos genes son constitutivos, soportando la hipótesis de que sigA y sigB tiene regulones sobrelapados.

SigH responde a la formación intracelular de uniones disulfuro debido a la oxidación de los grupos tiol de la cisteína. Este gen es inducido después del shock térmico. Regula 26 unidades regulatorias y 39 genes después de la inducción a condiciones inhibitorias con diamida.

SigD es inducida después de la completa ausencia de nutrientes. SigJ es inducido en la fase estacionaria en cultivo. SigL es el homologo mas cercano en *S. coelicolor*, su actividad es regulada postraduccionalmente por dos sistemas de dos componentes codificados por un operón inmediatamente rio abajo del gen estructural. En este organismo controla la estructura de la pared celular (Manganelli *et al.*, 2004).

WhiB5

S. coelicolor es una bacteria Gram positiva productora de esporas y que esta cercanamente y filogenéticamente relacionada a *M. tuberculosis* al poseer un contenido similar de GC (65 a 70%), por lo cual se han encontrado proteínas homologas entre estas dos especies (Raghunand y Bishai, 2006). En *S. coelicolor*, el gen WhiB se mostro estar asociado con la esporulación. *M. tuberculosis* no esporula pero tiene siete marcos de lectura abiertos que son ortólogos de WhiB en *S. coelicolor*. La presencia de múltiples genes WhiB en *M.*

leprae y la creciente evidencia de que estos genes están involucrados en la división celular, estrés oxidativo, resistencia a antibióticos, patogénesis sugiere que estos genes deben de tener significativa funcionalidad en las micobacterias (Garg *et al.*, 2009).

La base de datos del orden *Actinomycetales* mostro una lista de 121 proteínas bacterianas exclusivas del genero *Actinomyces*, que contiene alto contenido de GC incluyendo *Streptomyces ssp*, *Rhodococcus ssp* y *Mycobacteria ssp* (Raghunand y Bishai, 2006). WhiB pertenece al grupo de genes únicos de los actinomicetos, que codifican para un pequeño grupo de proteínas altamente cargadas de cisteína, y aun de función desconocida (Flärdh *et al.*, 1999). WhiB fue identificado en *S. coelicolor*, un gen esencial para la esporulación temprana de hifas aéreas. Los genes de esporulación temprana se identificaron mediante estudios morfológicos de una colección de mutantes que perdieron la capacidad de formar esporas maduras (Geiman *et al.*, 2006). Muchas de las mutantes llamadas Whi (white) se han aislado, estas forman una hifa aérea que no puede formar las esporas de color gris en *S. coelicolor*, estas mutantes bloquean el desarrollo en etapas tempranas de esporulación y septación (Flärdh *et al.*, 1999).

Estas mutantes están relacionadas a 8 loci diferentes, la primera mutante demostrada es deficiente en WhiB (Raghunand y Bishai, 2006). *S. coelicolor* codifica un polipéptido de 87 aminoácidos con una secuencia consenso putativa hélice-vuelta-hélice (Raghunand y Bishai, 2006) al cual se le atribuyen propiedades de unión a DNA (Geiman *et al.*, 2006). Gracias a los análisis de mutación se sugiere que whiB es una proteína de unión a DNA, sumando el hecho de que estas mutantes muestran reducida expresión del conjunto de genes WhiE que codifica los pigmentos de las esporas, indicando que este gen es un factor de transcripción (Raghunand y Bishai, 2006). Se ha demostrado que *M. tuberculosis*

responde transcripcionalmente y se adapta a las condiciones *in vivo* como lo son la hipoxia y deficiencia de hierro (Banaiee *et al.*, 2006).

M. tuberculosis tiene siete genes parecidos a WhiB, basado en la secuencia se identificaron como genes relacionados a *S. coelicolor* (Raghunand y Bishai, 2006; Alam y Agrawal, 2007), estos genes se encuentran en todos los actinomicetos secuenciados hasta ahora, pero ausentes en otros organismos. La presencia de ortólogos de genes WhiB en *M. tuberculosis* y otros actinomicetos no esporulantes es intrigante, este agente etiológico no produce esporas pero claramente cuenta con componentes homólogos que codifican proteínas relacionadas a esporas en otros organismos (Alam y Agrawal, 2007).

Los homólogos de WhiB en *M. smegmatis* (whmD) y *S. coelicolor* muestran mucha identidad a nivel proteico, puede sustituirse el gen codificante de un organismo a otro organismo conservando funcionalidad. Estos tres presentan también gran homología en la regiones no transcritas 5' y 3'. Además la alineación de secuencias de las regiones 5' no transcritas de los tres organismo muestran que el promotor putativo esta altamente conservado (Raghunand y Bishai, 2006). Las proteínas WhiB de *M. tuberculosis* están involucradas en diferentes procesos celulares, como la división, patogénesis y resistencia a antibióticos. Recientemente se ha demostrado que miembros de la familia de genes WhiB de *M. tuberculosis* presentan una respuesta alta a una gran variedad de condiciones de estrés y se predice que juegan un papel importante en las respuestas generalizadas de estrés (Alam y Agrawal, 2007).

También se observa identidad del 22-67% entre las proteínas WhiB de *S. coelicolor* y *M. tuberculosis*. Análisis de secuencia de estas proteínas muestran la presencia de cuatro dominios conservados de cisteína (Alam y Agrawal, 2007) residuos invariantes arreglados Cys-X₁₄₋₂₄-Cys-X₂-Cys-X₅-Cys y un dominio conservado parecido al HTH (dominio que se

sabe se asocia a ADN). El ultimo dominio es caracterizado por 7-residuos (F y G)-G-(VI)-W-G-G-(LVIM) en la vuelta alfa hélice y es relativamente corta en longitud (Raghunand y Bishai, 2006). Las secuencias Cys-X₂-Cys, notando que WhiB5 reemplaza esta secuencia por Cys-L-R-R-Cys, se ha implicado en proteínas de diversas funciones, como lo es la actividad de oxidoreductasa, detectando cambios de oxido reducción y en la coordinación de muchos cofactores metálicos. Entre los metales el hierro es el cofactor mas común para las proteínas, mismo que se involucra en una amplia variedad de procesos celulares que son vitales para la función normal de los organismos. Esta coordinación de iones, lleva a la formación grupos hierro-sulfuro, siendo estos los más versátiles estructuralmente y funcionalmente en la biología (Alam y Agrawal, 2007).

La estructura de las proteínas WhiB es sensible a los tratamientos con agentes reductores, debido a que en presencia de Beta-Mercaptoetanol provoca corrimiento diferencial en gel de poliacrilamida, lo que implica el hecho de que los residuos de cisteína se coordinan con iones metálicos. Posteriormente se confirma la coordinación de iones metálicos por la tinción específica para hierro, sugiriendo la formación de oligómeros de proteínas WhiB (Raghunand y Bishai, 2006). Este grupo de uniones hierro-sulfuro participan en la transferencia de electrones, unión o activación de sustratos, almacén de hierro o sulfuro, regulación de la expresión génica y actividad enzimática. El principio estructural básico de los grupos hierro-sulfuro es la formación de rombos de Fe₂-S₂. De esta manera una proteína puede unirse a un gran numero de grupos en un arreglo espacial definido, permitiendo a los electrones circular largas distancias dentro de la cadena proteica (Alam y Agrawal, 2007).

Estos dominios de cisteína son comunes en las proteínas de unión a DNA coordinadas por iones de Hierro, como lo son las de unión de Zn, GAL4, SoxR o de unión a Hg. La estructura secundaria muestra la potencial unión a DNA de los residuos 64 a 84.

Todas estas proteínas poseen una hidrofiliidad alta en promedio, lo que sugiere que están en citoplasma. Estas proteínas tienen una región cargada positivamente, además de la carga negativa, cerca del carboxilo terminal y se predice que contienen extensas regiones alfa hélice con una beta plegada en la región central entre la primera y la segunda alfa hélice.

La extensión N-terminal presente en la familia WhiB que comprende los primeros 67 aminoácidos, incluyendo el primero de los cuatro dominios de cisteína conservados (C67), no es esencial para su actividad. En ninguna de las mutantes obtenidas se comprometió la funcionalidad de la proteína al ser introducida al organismo. Sin embargo la modificación del dominio HTH ubicado en el carboxilo terminal afectó la funcionalidad de la proteína. De ésta manera se determinó que son necesarios los dominios C90, C93 y C99 para la actividad de la proteína (Raghunand y Bishai, 2006).

Encontramos que algunas de estas proteínas que ya se han caracterizado como: WhiB1, que codifica una reductasa disulfuro, WhiB3, que al ser eliminada se observa la atenuación del bacilo. Logrando menores lesiones en términos de histopatología y tiempo de muerte de los ratones, pero no ha logrado reducir la carga bacilar. Se ha demostrado que WhiB3 se une a ADN (Geiman *et al.*, 2006), interactúa con SigA para participar en la causa de las lesiones registradas en pulmón (Banaiee *et al.*, 2006). Y WhiB4, que se sobreexpresa en macrófagos activados y por lo tanto puede tener un papel importante en la supervivencia in vivo de *M. tuberculosis* (Alam y Agrawal, 2007).

De particular interés es el hecho de que WhiB5, que se encuentra ubicada a 27,000 pb del origen (Fig. 12) (Tuberculist, 2011), se aumenta en la fase tardía exponencial con una

disminución a niveles muy bajos en la fase estacionaria tardía de la curva de crecimiento. Adicionando Cicloserina, un agente que actúa sobre la pared celular, en el medio de cultivo se observa la reducción de los niveles de WhiB5 por lo tanto en presencia de antibióticos se reprime la respuesta de este gen. El mismo caso cuando la cepa fue sometida a especies reactivas de oxígeno (Diamida) ya que se observó una baja en los niveles de transcrito. En condiciones de cultivo con poco nutrientes (PBS) se encontró que éste es inducido cerca de tres veces en comparación a los cultivos control que cuentan con nutrientes, además de ser inducido cerca de 14 veces en condiciones de estrés por calor (Geiman *et al.*, 2006).

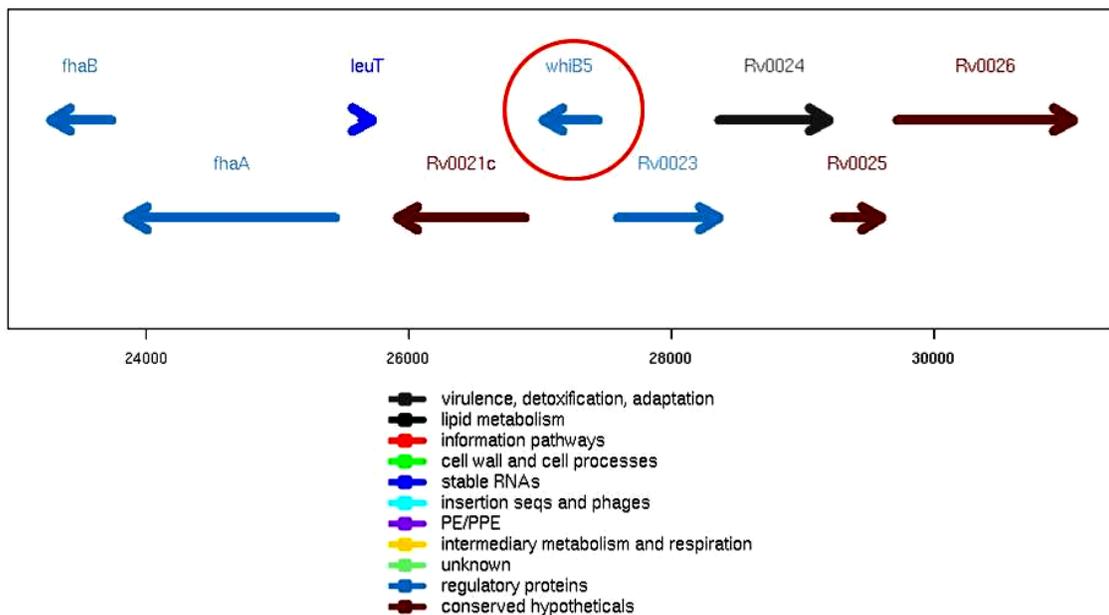


Fig. 12 Ubicación del factor transcripcional putativo WhiB5 en el genoma de *M. tuberculosis* (Tuberculist, 2011).

Mediante técnicas de sobreexpresión y el análisis de micro arreglos, WhiB5 en H37Rv puede inducir la expresión de 27 genes (Fig. 13). Subrayando que WhiB5 logra inducir la expresión del factor sigma sigM que a su vez inducen la expresión dos sistemas de secreción tipo siete, ESX-4 y ESX-2, como se muestra (Fig. 13) (Casonato *et al.*, 2010).

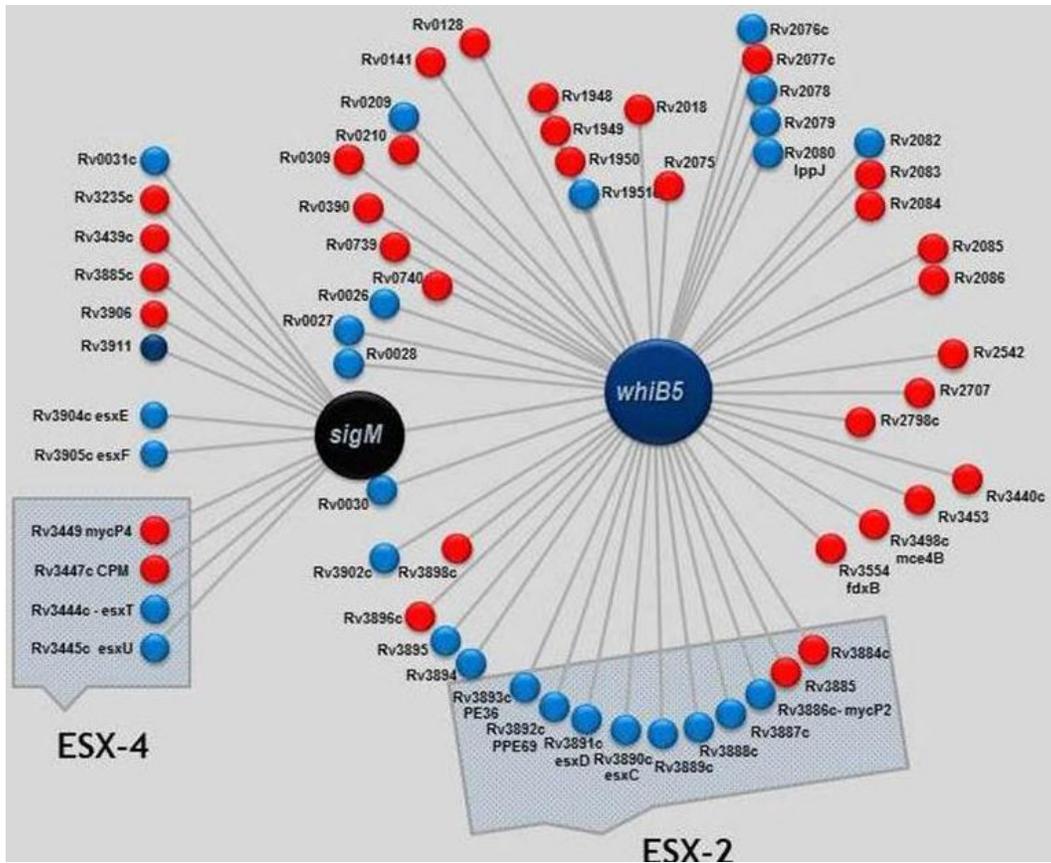


Fig. 13 Representación esquemática de los genes regulados por WhiB5, En círculos azules se muestra genes expresados tras 15 minutos, en círculos rojos se muestran genes expresados después de 3 horas (Casonato *et al.*, 2010).

Como se ha mostrado en trabajos previos, la inducción de WhiB5 se origina en presencia de S-nitrosoglutathione (GSNO), y en ausencia de ésta proteína el crecimiento es detenido. Por lo cual se puede decir que la presencia de WhiB5 es indispensable para poder tolerar las condiciones de un donador de oxido nitroso (Fig. 14) (Casonato *et al.*, 2010).

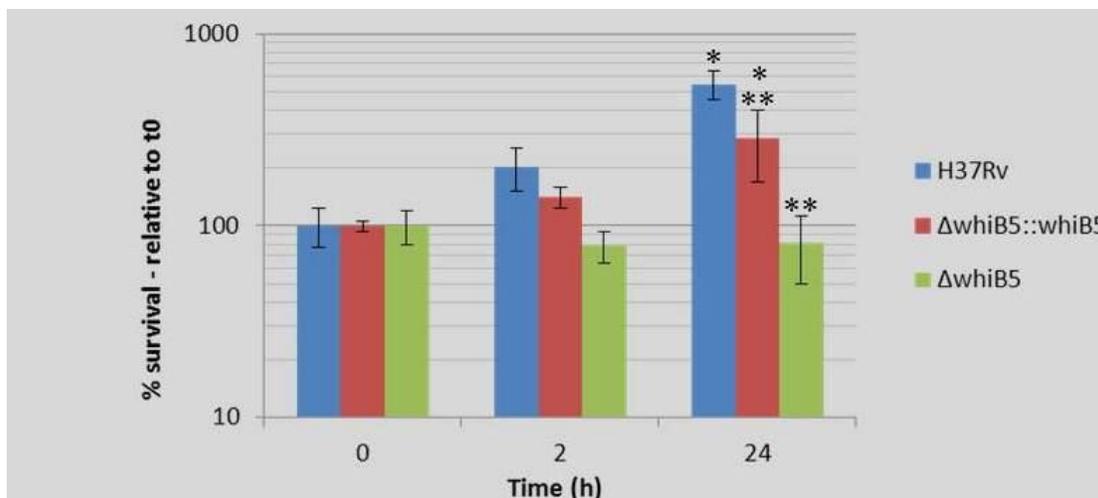


Fig. 14 Sensibilidad de la mutante a GSNO un donador de oxido nitroso (Casonato *et al.*, 2010).

SigM

El regulón de *M. tuberculosis*, en particular el factor *sigM*, proporciona la regulación negativa de los lípidos asociados a virulencia y la regulación positiva de proteínas de secreción pertenecientes a la familia ESX y genes relacionados con sintetasas de péptidos no ribosomales. Por lo cual se sugiere que la actividad de *sigM* puede tener un papel en la adaptación *in vivo* a largo plazo para ambientes específicos del hospedero, más que en cuanto a la virulencia temprana en el curso de una infección (Raman *et al.*, 2006).

Como otros ejemplos, el gen *sigE* codifica un miembro de la familia de factores sigma extracitoplasmáticos y la mutante para el gen *sigE* en *M. tuberculosis* caracterizada por Manganelli *et al.* demostró una gran susceptibilidad al choque térmico, sulfato dodecil sódico y varios tipos de estrés oxidativo que el genotipo silvestre. Esta mutante también fue defectuosa en la habilidad para crecer dentro de macrófagos humanos y modelo murino, siendo así más susceptible a la actividad antimicobacteriana de los macrófagos activados. En los estudios de ratón, la mutante Knock-out para el gen *sigE* en *M. tuberculosis*

proliferó y sobrevivió en los tejidos de ratón pero era menos letal de acuerdo al análisis de sobrevivencia.

Otro ejemplo es *sigH*, esencial en la producción de inmunopatología y letalidad en ratón. La mutante Knock out en *M. tuberculosis* también exhibió una gran susceptibilidad a cambios de temperatura y estrés oxidativo *in vitro*. Estos estudios sugirieron que el factor sigma extracitoplasmático *sigH* juega un papel central en la red reguladora involucrada en las respuestas a estrés (Agarwal *et al.*, 2007).

El factor *sigM* regula muchos genes que se cree están involucrados en la producción de moléculas que se localizan en la superficie bacteriana o que son secretados, entre estos están genes que codifican proteínas de secreción parecidas a ESAT-6 (*esxU* y *esxT*). Son parte de una proteína de secreción putativa en el locus *Esx-4*, un operón de dos genes separados de función desconocida, y otras proteínas pertenecientes a la familia *Esx* que son codificadas en diferentes regiones del cromosoma. Tomando en cuenta que ESAT-6 es una proteína de secreción que se ha postulado como moduladora de una respuesta celular en el hospedero durante la infección (Agarwal *et al.*, 2007). También regula un gen de función desconocida denominado *PPE19*, un operón que porta el gen *PPE1* y un gen involucrado en la biosíntesis de ácidos grasos (Raman *et al.*, 2006).

El regulón de *sigM* puede estar asociado con la producción y exportación de productos, regula muchos genes envueltos en el metabolismo de lípidos, incluyendo el operón *kasA-kasB* (Agarwal *et al.*, 2007). En contraste con ESAT-6 y *Cfp-10*, que son importantes en la patogénesis de la infección aguda, se hipotetizó que las proteínas *Esx* reguladas por *sigM* pueden funcionar en la adaptación bacteriana y en la modulación del hospedero en etapas posteriores de infección (Raman *et al.*, 2006).

En la cepa mutante para este factor sigma existe la depresión de los lípidos de superficie PDIM de *M. tuberculosis*. PDIMs se ha demostrado que son importantes determinantes de la virulencia requeridos por la eficiente replicación en el pulmón durante periodos cortos de la infección (Raman *et al.*, 2006).

Tratando de simular los eventos que una micobacteria pudiera encontrar durante su ciclo de vida y observando los niveles de expresión durante condiciones de estrés *in vitro* de *sigM*, aumenta la expresión bajo condiciones de altas temperaturas y en la fase estacionaria. En esta fase se produjo un aumento aproximado de 30 pliegues en el transcrito de *sigM* comparado con la fase estacionaria. Sin embargo el transcrito de *sigM* continuó bajo, con niveles aproximados a 30 pliegues por debajo de *sigA*, aún al parecer abundante.

Así la expresión se mantuvo uniforme bajo muchas de las condiciones a las que fue sometido. A excepción de las condiciones de 42⁰C, donde se encontró una inducción de 9 pliegues comparada con la expresión basal (Agarwal *et al.*, 2007).

La baja expresión de este regulón *in vitro* durante el crecimiento vegetativo sugiere que la expresión de SigM es inducida en respuesta a estímulos específicos durante la infección (Raman *et al.*, 2006).

El genotipo silvestre, mutante y complementado de las cepas, tuvo un crecimiento idéntico en medio Middlebrook 7H9, suplementado con ácido oleico, acido-albumina-dextrosa-catalasa, glicerol y Tween 80, y no se observaron diferencias claras en la morfología de las colonias en medio sólido.

Los macrófagos, por un periodo de 8 días, indicaron que la pérdida de *sigM* no debilita la habilidad de *M. tuberculosis* para sobrevivir, abarcando macrófagos activados e inactivados de la línea celular J774A.1 (Agarwal *et al.*, 2007).

Así se puede concluir que sigM gobierna la expresión de un pequeño grupo de genes, incluyendo 4 homólogos de Esat-6, la ausencia de sigM no resulta en la pérdida de virulencia en el modelo de ratón o macrófago. Por lo cual sigue siendo posible que sigM se requiera para la supervivencia, patogenicidad, persistencia, supervivencia en granulomas necróticos y transmisión entre los hospederos, misma que no es posible medir en estos modelos experimentales (Agarwal *et al.*, 2007). De esta manera la función de estas proteínas es para modular inmunidad u otros aspectos de las interacciones patógeno-hospedero, demostrando que la regulación por sigM en estos genes es la de modular las interacciones hospedero-patógeno. Cambios en la actividad de sigM proveen de mecanismos por los cuáles puede ser alterada durante la infección, la producción de moléculas asociadas a la superficie y de secreción (Raman *et al.*, 2006).

ESX 2 y 4

Los miembros de la familia de ESX son proteínas altamente inmunogénicas que son secretadas por la ruta secretora definida como ESX o tipo VII. Hay 29 genes ESX en *M. marinum* y 23 en *M. tuberculosis*. Cerca de un tercio de estos genes ESX están localizados en los grupos de genes ESX-1-5 (Bottai, 2009). La atenuación de BCG es principalmente debido a la pérdida del locus ESX-1, el cual codifica dos miembros de la familia, CFP-10 y ESAT-6 (Kaufmann *et al.*, 2005). Análisis filogenéticos y genómico comparativo han revelado que 5 diferentes sistemas ESX en el género *Mycobacterium*, probablemente evolucionaron por duplicación génica, en orden ESX-4, ESX-1, ESX-3, ESX-2 y más recientemente ESX-5 (Abdallah *et al.*, 2007).

Los patógenos Gram negativos usan una gran variedad de sistemas de secreción, que funcionan mediante la entrega de proteínas bacterianas dentro de las células del hospedero y así manipular la respuesta del hospedero a la infección (Di Giuseppe y Cox, 2007). Este

nuevo sistema de secreción llamado tipo VII, que está ligado directamente a la patogenicidad y escape del fagosoma, contiene antígenos de células T denominados ESAT-6 y CFP-10 que se exportan a la pared celular (Smit, 2010).

Aunque la identificación de un sistema de secreción en *M. tuberculosis* se esperaba por la naturaleza de la pared celular, es inesperado que *M. tuberculosis* codifique cinco de estos sistemas de secreción. El genoma de *M. tuberculosis* tiene 11 o 12 locus que comprenden genes en tándem, que codifican miembros de la familia ESAT-6. Cuatro de estos grupos son parte de un locus más largo denominado ESX-2-5, que contiene más homólogos del grupo ESX-1.

Algunos de estos genes son compartidos por la mayoría, pero no en todos, los sistemas ESX como lo son los genes PE y PPE. Estos son dos familias de genes únicos en las micobacterias y son significativamente expandidos en las micobacterias patogénicas con crecimiento lento. Casi el 9% de la capacidad de codificación de *M. tuberculosis* es dedicada a esta familia de genes.

El sistema ESX-4 es el más antiguo T7SS en las micobacterias. También es el más pequeño (9,870 pares de bases en *M. tuberculosis* comparado con 14-22Kb de otros locus ESX) y el que tiene el menor número de genes (siete genes en *M. tuberculosis* comparado con once-18 genes de otros loci ESX).

Por lo cual la presencia de cinco T7SS origina las preguntas ¿porqué existen tantos factores de secreción? y ¿porqué no se pueden complementar entre cada uno? Esto está remarcado por la inhabilidad de cuatro sistemas ESX para complementar la pérdida de virulencia que es causada por la delección de ESX-1. Este hecho puede ser a causa de la evolución divergente de sus señales de secreción y también su regulación diferencial.

Estudios de mutagénesis de transposones de alta densidad ha demostrado que mientras los genes ESX-1, ESX-2 y ESX-4 pueden ser bloqueados, la mayoría de los genes de ESX-3 y algunos de ESX-5 no pueden ser bloqueados. Esto sugiere que estos sistemas son esenciales para el crecimiento en cultivo.

Las T7SS's en bacterias Gram positivas ricas en G+C se relacionan más con los sistemas antiguos ESX-4, esto puede indicar que ESX-4 no estaba diseñado para transportar proteínas a través de la membrana micobacteriana y que esta función solo se introdujo sobre la evolución de ESX-1.

Mientras ESX-4 y ESX-2 es regulado por el factor alternativo SigM. ESX-4 parece representar el más antiguo sistema, explicando el pequeño número de genes a comparación de otros locus ESX. Representa el único sistema micobacteriano ESX que comparte similitud con otros sistemas ESX en otras actinobacterias y/o bacterias Gram positivas con alto contenido de GC. Sin embargo, el papel biológico de este sistema sigue sin ser comprendido por completo. Nada está completamente comprendido acerca de la función del sistema ESX-2. En *M. tuberculosis*, ESX-2 está localizado justo corriente abajo del locus ESX-1. De manera interesante ESX-2 está perdido de *M. marinum* (Bottai y Brosch, 2009, Abdallah *et al.*, 2007).

Tipos de Mutantes

La secuenciación y anotado del genoma de *M. tuberculosis*, ha permitido muchos acercamientos nuevos al estudio de la fisiología y patogénesis del organismo en cuestión. Los genes a usar o inactivar generalmente son seleccionados de acuerdo a la capacidad que tienen de disminuir la virulencia. Predicciones de cuales genes son importantes en cuanto a

la virulencia o patogénesis, se infieren de estudios de otros patógenos bacterianos, como factores sigma y reguladores de hierro.

Los primeros intentos para desactivar genes de *M. tuberculosis* por intercambio alélico resultaron ser recombinaciones ilegítimas, sin embargo se comprendió que el gen RecA de *M. tuberculosis* puede sustituirse en *M. smegmatis*. Por lo cual se reconoció el primer método de recombinación homóloga.

En la actualidad las técnicas de desactivación genética en *M. tuberculosis* se pueden dividir en métodos directos y globales. Se necesita un fenotipo seleccionable, siendo estos los antibióticos, los más comúnmente usados en micobacterias son aquellos que proveen de resistencia a kanamicina, higromicina y estreptomicina.

La inactivación directa de genes se lleva a cabo mediante la inserción de resistencia a antibiótico en la porción media del gen de interés, para después hacer la transformación en la micobacteria. Una molécula linear o circular de DNA se introduce usando electroporación, el resultado deseado es el remplazamiento alélico del cromosoma genómico por aquella mutada. El uso de un fragmento linear de una sola hebra incrementa el remplazo alélico por recombinación homóloga en *Streptomyces spp.* y este efecto también se observa en la inactivación genética de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*. Otro método que ha sido utilizado para evadir las desventajas del método anterior es el uso de sistemas de transposones que funcionan en *E. coli* para desactivar genes de gran tamaño en *M. tuberculosis*.

Las mutaciones que se llevan a cabo de manera más directa en micobacterias se hacen con vectores bi-funcionales o lanzadera. Usando aquellos vectores que no se pueden replicar en la célula receptora o que tienen sensibilidad a temperatura. Este método resulta ser

necesario para obtener cepas vacúnales de *M. tuberculosis*. Una manera más simple y rápida es mediante una única recombinación con DNA circular.

La inactivación global se basa en el principio de la inserción de DNA foráneo, usualmente un elemento transponible, en varios sitios en el genoma bacteriano, de manera aleatoria. Este método requiere un fenotipo seleccionable que usualmente es resistencia a antibiótico.

La complementación también es una metodología llevada a cabo con la finalidad de identificar genes de virulencia en cepas de *M. tuberculosis*. Una cepa no virulenta o no patogénica se usa como recipiente para genes conocidos como factores de virulencia, esto se puede llevar a cabo *in vivo* usando vectores de integración proeficiente, que promueve la propagación estable de genes individuales en bacterias durante infecciones animales (Smith, 2003).

Hipótesis

Obtener un bacilo atenuado de *M. tuberculosis* Knock-out para el factor de virulencia (WhiB5) con la capacidad de generar una respuesta protectora positiva.

Objetivos generales

Describir la virulencia e inmunopatología producida por una cepa mutante de *M. tuberculosis* Knock-out para el factor de virulencia WhiB5 utilizando un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

Objetivos particulares

- Evaluar el daño histológico provocado por la cepa Knock-out del gen WhiB5 en los pulmones de ratones Balb/c y comparar contra la cepa que reincorpora este gen y la cepa parental H37Rv.
- Analizar la carga bacilar en los diferentes grupos de ratones Balb/c infectados con las cepas Knock-out del gen WhiB5, la cepa que reincorpora el gen WhiB5 y la cepa parental H37Rv.
- Cuantificar la expresión de citocinas involucradas en la respuesta Th 1 (INF γ , TNF α e iNOs), así como en la respuesta Th 2 (IL-4) en los diferentes grupos de estudio.

Metodología

Preparación de las cepas H37Rv, WhiB5 KO y WhiB5 complementada

La cepa de referencia H37Rv así como la mutante WhiB5 y la cepa complementada WhiB5 se crecieron en Medio Middlebrook 7H9 Broth (BD USA, DIFCO, Cat. 271310), el cual se preparó pesando 4.7g de polvo en 900ml de agua destilada adicionando 5ml de glicerol. Se esterilizo en autoclave a 121 °C por 15 min y pasado el tiempo de esterilización se dejó enfriar a 40 °C.

En una campana de bioseguridad (Forma Class II A2, Thermo Electro Corp.), limpia y esterilizada con luz UV, por 10 minutos, se adicionaron 100 ml de enriquecimiento ADC (glucosa, albumina y catalasa, Middlebrook, BD), por cada 900ml de medio. Se homogenizó y vertió en botellas de cultivo de 275cm² de poliestireno con cuello angulado y tapa con filtro (Corning, 75cm²). Estas, se colocaron en incubación con 5% de CO₂ a 37 °C por 3 días para realizar prueba de esterilidad.

Pasado ese tiempo y en campana de bioseguridad, con asa bacteriológica se tomaron 20 ul de bacteria del medio Lowestein-Jensen y se colocaron en botellas con el medio 7H9. Posteriormente estas botellas se colocaron en una incubadora de CO₂. En la primera semana, se mantuvo el medio estático y a partir de la segunda semana, se empezó a tomar lecturas de absorbancia a 600nm para detener el crecimiento en la fase estacionaria temprana.

La micobacteria se recupera en la campana de bioseguridad colectando dentro de un tubo cónico de 50ml (Falcon, BD, Cat. 352970) estéril y nuevo. El medio de cultivo entonces se centrifugó a 2000 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 5ml de buffer PBS (Solución amortiguadora de fosfatos) – Tween 80% al .05%. Posteriormente se le adicionan perlas de vidrio estériles no

mayores a 3mm de diámetro (Sigma, Cat. Z143928-1EA), el tubo se cerró y se dejó en agitación toda la noche.

A continuación se procedió al lavado de la bacteria, el cual consta de ciclos de 1 minuto de agitación en vórtex seguido de 1 minuto de reposo, este paso se repitió al menos 10 veces para tener la certeza de que no se formen grumos o agregados bacterianos. Este se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto durante 15 minutos. Posterior a esto se volvió a hacer el ciclo con la excepción de ser centrifugado a 1500 revoluciones por minuto. El sobrenadante se colectó a un tubo cónico de 50ml estéril y nuevo. Se centrifugó a 2000 revoluciones por minuto por 10 minutos. El sobrenadante se eliminó y el botón micobacteriano se lavó con PBS – 20% de glicerol (Sigma, Cat. 49779-1L), esta suspensión se guarda a – 70 °C hasta su utilización.

Previo a la inoculación, el tubo se descongeló gradualmente de -70 °C hasta – 20 °C y finalmente hasta los 4 °C, una vez descongelado, dentro de la campana la bacteria se lavó con PBS – Tween 80 por 5 minutos en agitación, para eliminar el Tween y células muertas. Enseguida se lavó 2 veces más con PBS para realizar la cuenta bacteriana.

Cuenta Bacteriana

Esta se realizó utilizando diacetato de fluoresceína (DAF, Sigma, Cat. MFCD1866182). Se preparó una solución Stock disolviendo 5mg de DAF en 1 ml de acetona a -20 °C. A partir de esta se prepara la solución de trabajo, de la cual se toman 12.5 ul de la solución stock y se diluyen en 1ml de PBS. Se hizo una dilución 1:100 de la bacteria (1µl de muestra, 49 µl de solución de trabajo y 50 ul de PBS. Esta dilución se incubó durante 20 minutos en oscuridad. Se colocó la muestra en una cámara de Newbauer y se realizó la cuenta en un microscopio de fluorescencia. Se consideraron bacterias vivas aquellas que presentaron fluorescencia, y se obtuvo el número total de bacterias de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ de Bacterias}}{\text{Mililitro}} = \left(\frac{\# \text{ de Bacterias contadas}}{\# \text{ de Cuadrantes contados}} \right) \times \text{Dilucion} \times 104$$

Se ajustó a una concentración de 250 000 bacterias en 100 *ul* de PBS.

Inoculación

Se consideró 50 Ratones Balb/c machos singénicos de 6-8 semanas de edad por cepa, para ser anestesiados con sevoflurano (Abbott, USA) e inoculados vía intratraqueal con tres cepas de *M. tuberculosis*; La cepa de H37RV como control, la cepa con reinserto del gen WhiB5 y la cepa con Knock-out para el gen WhiB5, estos son infectados con 250,000 bacterias vivas en 100 *ul*. En grupos de 10 ratones por caja, se almacenan en microaisladores en un sistema de presión negativa.

Los animales fueron sacrificados de acuerdo al modelo murino propuesto por el doctor Rogelio Hernández Pando (1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 120 días). Durante el sacrificio se extraen pulmones, bazo y sangre. Los animales fueron anestesiados con éter, una vez dormidos se corta la porción distal del brazo y se colecta entre 1 y 1.5 ml de sangre que fue centrifugada a 2500 revoluciones por minuto para obtener suero. Los bazos son extraídos para ser conservados a -70 °C. De los dos primeros ratones se extrae el pulmón derecho para ser conservados a -70 °C y se perfunden con etanol los dos pulmones izquierdos para conservarse en etanol; para el tercer ratón se extrae el pulmón izquierdo para ser conservado a -70 °C y se perfunde con etanol el pulmón derecho para conservarse en etanol; a otros dos ratones se les extraen los pulmones para ser conservados a -70 °C. El procedimiento de sacrificio fue efectuado en campanas de flujo laminar con bioseguridad nivel III.

Estudio histológico y morfométrico.

Posteriormente los pulmones que se colocaron en etanol se procesan e incluyen para el análisis morfométrico, 3 Etanol 100 % durante 40 minutos por cada etanol, 3 xilenos durante 40 minutos para cada xileno y 3 parafinas durante 40 minutos por cada parafina se incluye y se cortan secciones de 5 um de ancho se colocan en laminilla de vidrio (portaobjeto) se realiza la tinción de Hematoxilina eosina (H-E) y se hace el análisis morfométrico de cada tiempo de sacrificio.

Medio para análisis de unidades formadoras de colonia.

Se utilizaron 19g de medio deshidratado Middlebrook 7H10 (Difco Laboratorios, Detroit, MI. USA) en 900 ml de agua destilada adicionada con 5 ml de glicerol, y se colocó en una placa de calentamiento con agitación hasta disolver, se esterilizó y se enriqueció añadiendo 100ml de OADC (Enriquecimiento oxálico, albumina, catalasa, dextrosa) (Difco Laboratorio, Detroit, MI. USA) por cada 900ml de medio en condiciones asépticas. Posteriormente se vertió en cajas Petri estériles en un volumen aproximadamente de 16ml. Se dejó enfriar y se coloca en incubación a 37 °C a 5% de CO² por 48 horas, pasado este tiempo se revisó posible contaminación en las cajas y se marcan los números de las diluciones.

Homogeneizado y sembrado del medio

Se tomaron tres de las muestras que fueron conservadas a -70 °C por cepa, se colocó a 4 °C (en hielo), mientras se esterilizó la campana y el material a utilizar con luz ultravioleta. A la muestra se adicionó 500 ul de PBS-tween 80 0.05% estéril. Y se homogenizaron con Polytron (Polytron, USA) a 4000 revoluciones por minuto, una vez homogenizados se adicionan 500 ul de PBS-tween 80 0.05% estéril para tener un volumen de 1 ml. De los homogenizados se toman 30 ul, diluyendo 1:10 en forma seriada en una placa de cultivo. Se

sembró 10 ul de muestra perteneciente al homogenizado, la primera dilución, la segunda dilución y la tercera dilución, y se hizo el duplicado de este procedimiento.

Se dejó que se absorba la muestra en el medio de cultivo totalmente, posteriormente se voltearon las cajas, se incubó a 37 °C, 10% de CO₂ y se checo los días 15 y 21 para eliminar cajas con contaminación. Y finalmente se cuentan el número de colonias en cada dilución.

Análisis para la expresión de citosinas PCR tiempo real (RT-PCR)

Aislamiento de mRNA

El primer paso es la extracción de RNA mensajero de las células eucariontes, por cada 10⁶-10⁸ células se utilizaron 350 ul de buffer RLT, el cual rompe la membranas celulares, (QuiagenRNeasy Kit, Quiagen, CA, USA) y se hizo el homogeneizado con vórtex, se adicionaron 350 ul de etanol al 70% se homogenizó con pipeta y se pasa a la columna de purificación, se centrifugó a 14000 revoluciones por minuto durante cinco minutos a 4 °C y se elimina el sobrenadante.

El segundo paso es adicionaron 700 ul de buffer RW1, el cual separa los restos de proteínas del ARN, y centrifugar a 14000 revoluciones por minuto durante 5 minutos a 4 °C se eliminó el sobrenadante y se repite este paso, en el tercer paso se adicionó 500 ul de buffer RPE, el cual elimina restos de sustancias del ARN, y centrifugar a 14000 revoluciones por minuto durante 5 minutos a 4 °C y se repite este paso.

Se transfiere la columna de purificación a un tubo de colección y se centrifuga un minuto a 14000 revoluciones por minuto a 4 °C, se coloca un nuevo tubo de colección y se adiciona a la columna 30 ul de agua libre de RNAsa y se centrifuga a 14000 revoluciones por minuto durante 5 minutos a 4 °C se repite el paso anterior con 20 ul de agua libre de RNAsa sin

cambiar el tubo de colección siendo este el RNA total de las células eucariontes y se almacena a -70 °C.

Obtención de cADN

Una vez obtenido el ARN total es necesario sintetizar la cadena complementaria o cADN, Utilizando 2 ul de buffer RT 10X, 1 ul de Oligo dT, 2 ul de dNTP's 10 mM, 1 ul de RNAsaInhibitor, 1 ul de Enzima Omniscript (Omniscript, Quiagen, CA, USA), 6 ul de agua libre de RNAsa y 12 ul de muestra. Esta reacción se incuba a 37 °C durante sesenta minutos y 93 °C durante 15 minutos.

Posteriormente se deben de hacer fragmentos de ADN de doble cadena para poder obtener el índice de densidad óptica y hacer con este las curvas patrón para el análisis con PCR-tiempo real.

Diseño de Oligonucleótidos

Las secuencias específicas se diseñaron con el programa Primer Express (Applied Biosystems, CA, USA), para los genes: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GA3PDH), Oxido nitroso sintasa (iNOS), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 4 (IL-4) e Interferón gama (INF- γ) (Apéndice).

PCR-punto final.

Para obtener datos respecto a la secuencia constitutiva de G3PDH y así ver la expresión de citocinas se utilizó 12.5 ul de mix Hot Star (QuiagenHotStarTaq, Quiagen, CA, USA), 10.5 ul de agua libre de RNAsa, 0.5 ul de Oligo sentido, 0.5 ul de Oligo antisentido y 1 ul de muestra. Obtenida esta mezcla se procede a la incubación a 95 °C durante 15 minutos para desnaturalizar las dobles cadenas, se introduce una secuencia de pasos que van de 95 °C 30 segundos, 60 °C 30 segundos y 72 °C 45 segundos durante 30 ciclos, este paso permite la desnaturalización, unión de los oligos y elongación del cADN, para formar ADN de doble

cadena, se deja a 72 °C por 5 minutos para la elongación final y se detiene a 4 °C la reacción. Se hace un gel de agarosa al 1,8% y se observa en transluminador, este aparato tiene herramientas para poder observar el índice de densidad óptica.

Análisis de citocinas por PCR-tiempo real

Una vez elaboradas las curvas (Apéndice), se prepara la reacción con 12.5 ul de Mix Hot StarSybr (QuiagenQuantitect SYBR Green PCR), 10.5 ul de agua libre de RNAsa, 0.5 ul de Oligo sentido, 0.5 ul de Oligo antisentido, 1 ul de muestra. Obtenida esta mezcla se procede a la incubación a 95 °C durante 15 minutos para desnaturalizar las dobles cadenas, se introduce una secuencia de pasos que van de 95 °C 30 segundos, 60 °C 30 segundos y 72 °C 45 segundos durante 30 ciclos, este paso permite la desnaturalización, unión de los oligos y elongación del cADN. El PCR en tiempo real se hizo en un termociclador 7500 real time PCR system (AppliedBiosystem, USA). La curva elaborada se utiliza de referencia siendo que esta curva tiene una cantidad conocida de copias por microlitro, también es importante mencionar que el análisis por Sybr Green en tiempo real necesita de una curva de Melting, en esta es posible verificar que el producto que se está amplificando sea siempre el mismo y no se amplifiquen productos inespecíficos.

Análisis estadístico

Los resultados reportados cuentan con desviación estándar ($\pm SD$) de las medias. La significancia considerada entre la cepa mutante, parental y complementada fue calculada utilizando la prueba *t* de Student para muestras no pareadas, en todos los experimentos. De tal manera que la significancia se aceptó como $p \leq 0.05$ o 0.01 , como se indica.

Sobrevidas

Utilizando el análisis estadístico de Kaplan-Meier para sobrevida, en el cual se parte una población a la cual se le pone un factor de riesgo y el cual se observará a intervalos de

tiempo definidos. Para el caso del estudio cada cepa fue estudiada con cincuenta ratones Balb/c y se reviso cada grupo experimental semanalmente, se anotó el número de muertes por semana y el número de individuos vivos. De acuerdo a estos datos se aplico la siguiente ecuación (Korosteleva *et al.*, 2009).

$$\hat{S}(\tau) = \prod_{i:t_i \leq \tau} \left(1 - \frac{d_i}{n_i}\right)$$

Esta ecuación nos dará como resultado una curva en la cual se reflejan los porcentajes de individuos vivos al factor de riesgo.

Resultados

Esta parte comprende dos experimentos llevados a cabo en diferente tiempo, bajo la misma metodología, con el motivo de verificar que el experimento sea reproducible, de esta manera se pueden observar graficas que pertenecen a los resultados del primer experimento y graficas que pertenecen a los resultados del segundo experimento.

Sobrevida

Los ratones fueron observados durante las primeras cuatro semanas diariamente y después semanalmente, contando el número de ratones que murieron a lo largo de los cuatro meses de infección. No se consideran dentro de la sobrevida los animales que murieron por anestesia o después del tiempo establecido. Los grupos de trabajo fueron marcados como H37Rv (cepa parental), cepa B5KO (mutante con Knock-out del gen WhiB5) y B5 COMPL (cepa knock-out a la que se le inserto nuevamente el gen WhiB5).

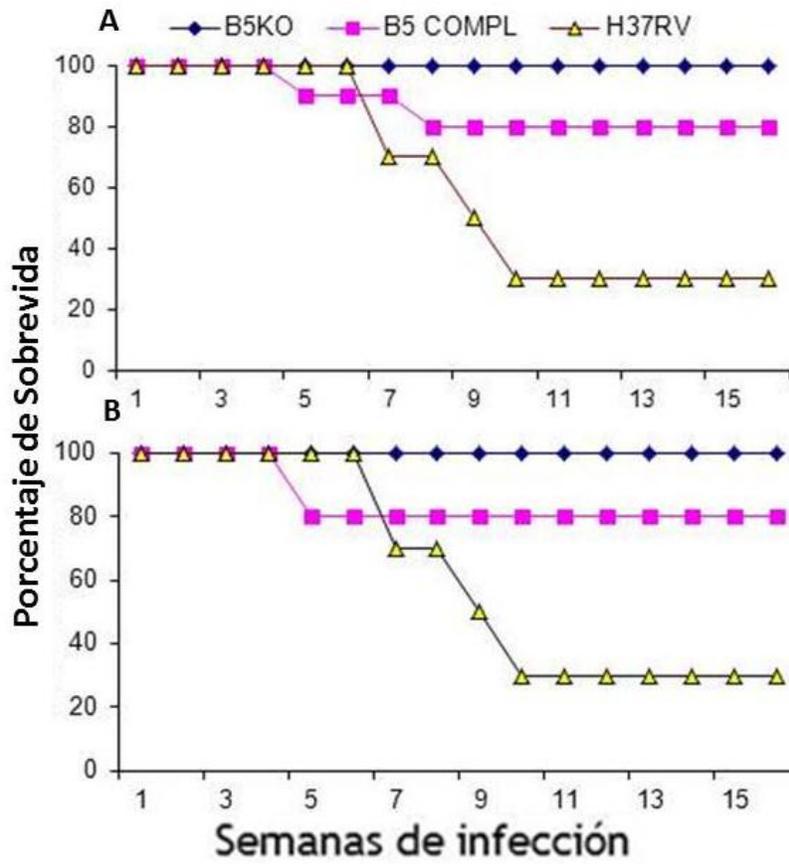


Fig.15 Gráfico de sobrevivida, Amarillo (Cepa de referencia H37Rv), Rosa (Cepa complementada) y Azul (Cepa Knock-out WhiB5). A experimento 1 y B experimento 2.

En ambos experimentos se observa que durante las primeras cuatro semanas postinfección no existe modificación en ninguna de las tres cepas analizadas, debido a que la sobrevivida se mantiene al 100%. Después de la quinta semana postinfección en ambos experimentos se observa que la cepa parental tiene una caída drástica, observándose la disminución en el cual se mantiene el 70% de la población. Para la decima semana la sobrevivida llega al 30%, este porcentaje se mantiene hasta la semana 16. La cepa que cuenta con la supresión del gen WhiB5 se observa perdida de la virulencia de la bacteria, lo que se manifiesta en ambos experimentos manteniendo el total de los animales a lo largo de las 16 semanas del experimento. Al analizar la cepa complementada (aquella cepa a la cual se le incorpora

nuevamente el gen *WhiB5*) se observa que la población decrece para mantenerse el 80% de la población (Fig. 15).

Al analizar la sobrevivencia con Kaplan-Meier se observa que existe una diferencia significativa entre la cepa parental y la cepa Knock-out a partir de la novena semana. En cuanto a la cepa complementada y la Knock-out se manifiesta una diferencia aunque no es significativa.

Carga bacilar e histopatología

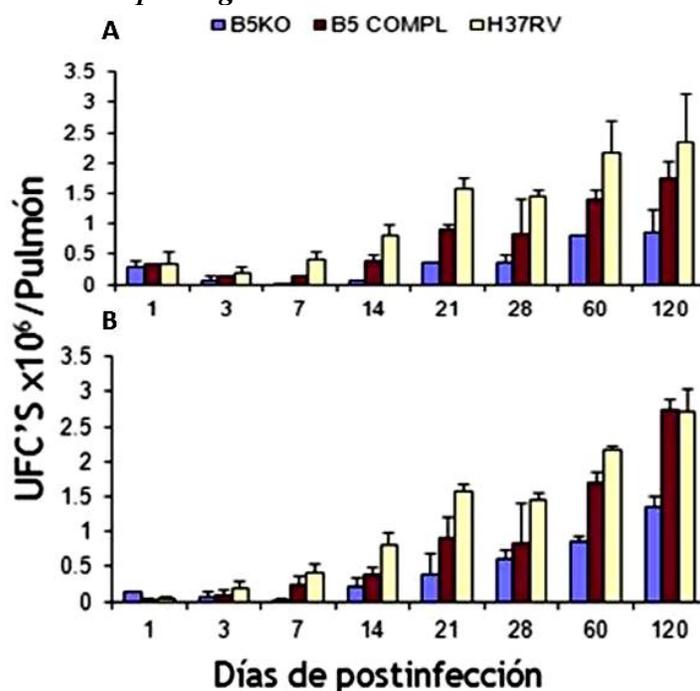


Fig. 16 Gráfico de carga bacilar, amarilla (Cepa de referencia H37Rv), Magenta (Cepa complementada), Violeta (Cepa Knock-out *WhiB5*). A experimento 1 y B experimento 2.

Al observar la carga bacilar en ambos experimentos se observa que durante los primeros 14 días el crecimiento bacteriano se mantiene de forma similar entre las tres cepas analizadas, pero en el día 21 la cepa parental muestra un incremento abrupto en el crecimiento de bacterias. Cuando observamos la carga bacteriana de la cepa knock-out para el gen *WhiB5*, y correlacionamos con el 100% de sobrevivencia, se observa que el número de

bacterias tiene un aumento gradual respecto al tiempo en mucha menor proporción respecto a las otras cepas a lo largo de la infección. Este hecho refuerza que la hipótesis en la cual WhiB5 está involucrado con la virulencia de la cepa de *M tuberculosis*. Al evaluar la carga de la cepa complementada se observa que el número de bacterias es menor a la cepa parental pero mayor a la cepa Knock-out para el gen WhiB5, observando que adquiere virulencia pero no igual que la cepa parental (Fig. 16).

Al hacer un análisis de t de student para las unidades formadoras de colonias se observa que existe diferencia significativa entre el grupo parental y WhiB5 con una significancia de 0.001 a partir del día 21 post-infección y entre la complementada y WhiB5 fue de 0.09.

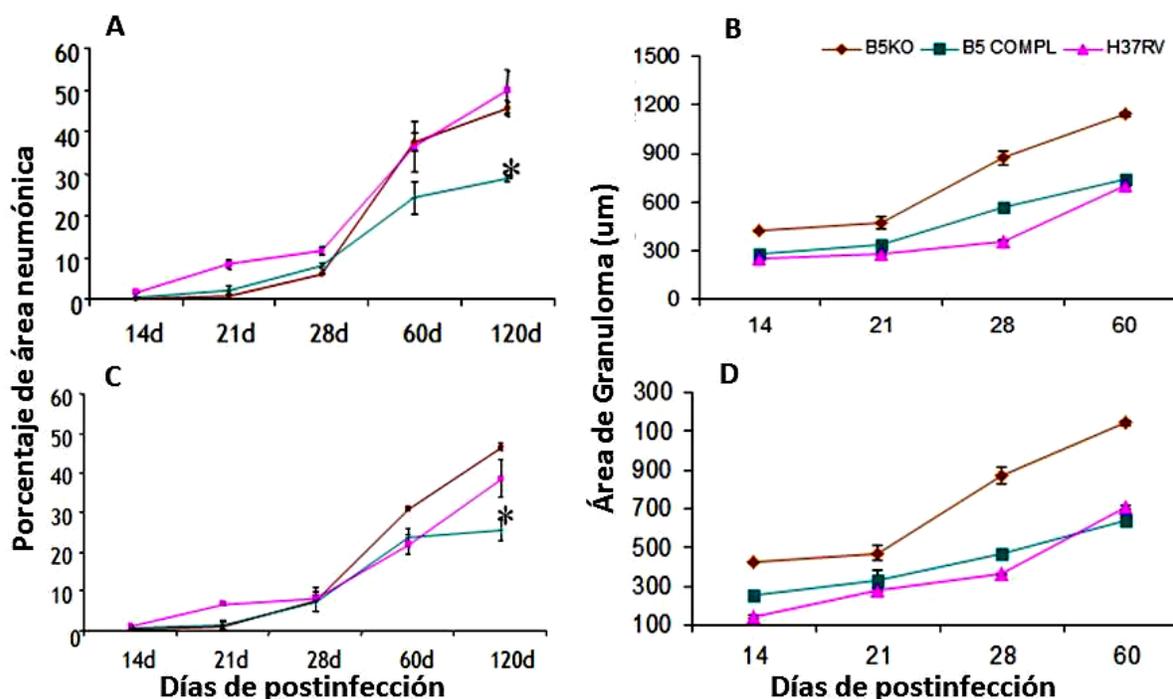


Fig. 17 Gráficos A y C representan el porcentaje de neumonía y B y D el área de granulomas.

Al analizar la histopatología, se toman las mediciones de 3 pulmones tanto del porcentaje de área neumónica así como el área de los granulomas en cada tejido. Características importantes que nos proveen de información, para evaluar el daño generado por estas

bacterias en el pulmón. En el modelo murino de tuberculosis se considera que durante la fase temprana, que abarca del día 1 al 21 de la infección, se presenta un área de pequeña neumonía y con ausencia de granulomas. Aunque con mayor frecuencia se manifiesta infiltración e inflamación peri-vascular en esta etapa (Hernández-Pando *et al.*, 1996); aumentando abruptamente la presencia de neumonías y pequeños granulomas durante la fase progresiva.

Al analizar los datos obtenidos en ambos experimentos observamos que los animales infectados con la cepa parental muestran una gran cantidad de daño. En tanto que la cepa knock-out tiene una gran cantidad de granulomas y de gran tamaño, lo que se ve relacionado con una mayor sobrevivencia y menor cantidad de bacterias; ya que estas están contenidas por los granulomas lo que impide la diseminación controlando efectivamente la enfermedad. En tanto que la cepa complementada se comporta con una pequeña cantidad de neumonía así como granulomas de tamaño intermedio y baja pérdida de sobrevivencia así como una moderada cantidad de bacterias (Fig. 17).

Análisis para la expresión de citocinas

Al obtener resultados histopatológicos y de sobrevivencia tan particulares, se procedió a hacer un estudio de expresión de citocinas, con la finalidad de explicar los resultados obtenidos. Estudiando el perfil de citocinas de respuesta tipo Th 1 y Th 2 se puede saber que tipo de respuesta es la que predomina durante la cinética de infección. Se utilizaron cuatro citocinas IFN γ , TNF α e iNOS así como IL-4. De manera interesante, INF- γ se mantiene con una mayor expresión en la cepa mutante a diferencia de la cepa parental y la complementada, lo cual nos indica que la cepa knock-out para el gen WhiB5 puede mantener la respuesta Th1 por un periodo prolongado de tiempo; favoreciendo un mayor

tiempo de vida con respecto a la cepa parental y la complementada. Mientras que TNF- α se observa que mantiene una expresión constante durante toda la cinética de infección, esto apoya la idea de que en ausencia del gen *WhiB5* la micobacteria disminuye la virulencia, permitiendo que el sistema inmune genere protección. Por lo tanto se cuenta con una respuesta Th 1 durante la fase temprana y la fase progresiva de la infección (Fig. 18).

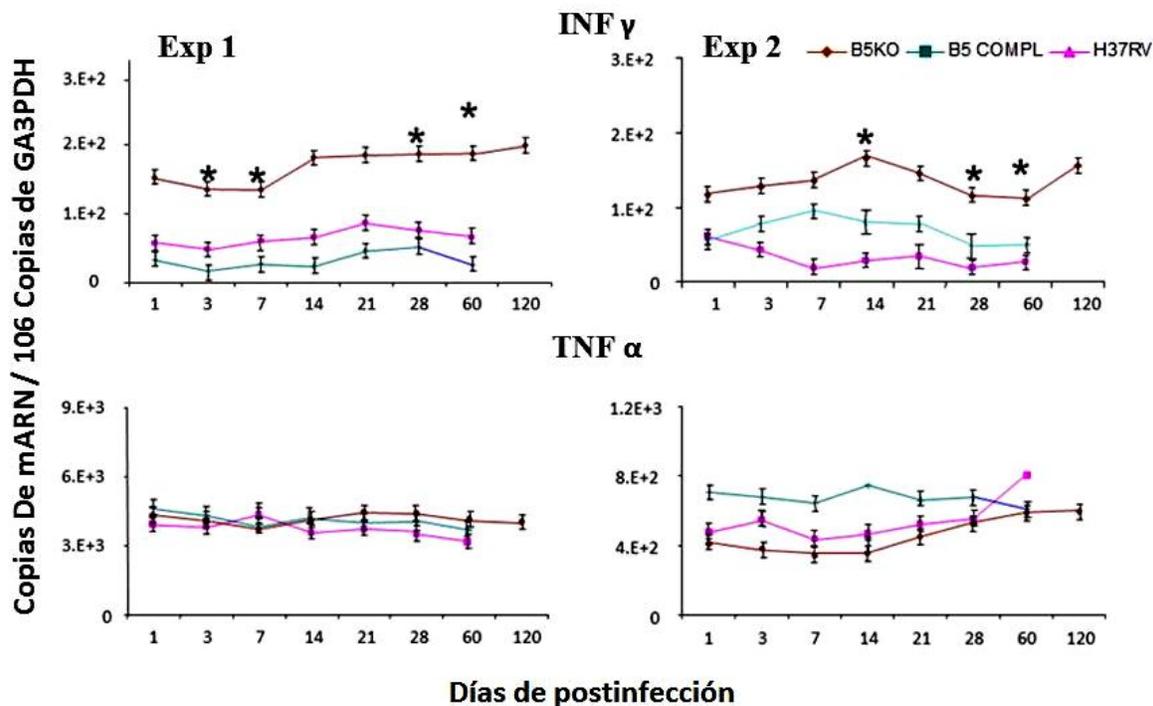


Fig. 18 Cinética de expresión para INF γ y TNF α .

Es interesante la expresión de IL-4, mientras la cepa parental y la complementada incrementan su expresión como lo ha demostrado el modelo de tuberculosis murino, los animales infectados con la cepa mutada muestran bajos niveles de IL-4. Con estos datos se observa que efectivamente el balance en estos animales es de tipo Th 1. Mientras que los inoculados con la cepa parental y complementada se comportan con un incremento de esta citosina, generando la respuesta Th2. Otra citocina importante para favorecer la respuesta protectora es la presencia de iNOS, la cual se presenta en altas cantidades mostrando un

incremento gradual, superior al de las otras cepas. Esto se observa que es reproducible cuando observamos los datos del segundo experimento (Fig. 19).

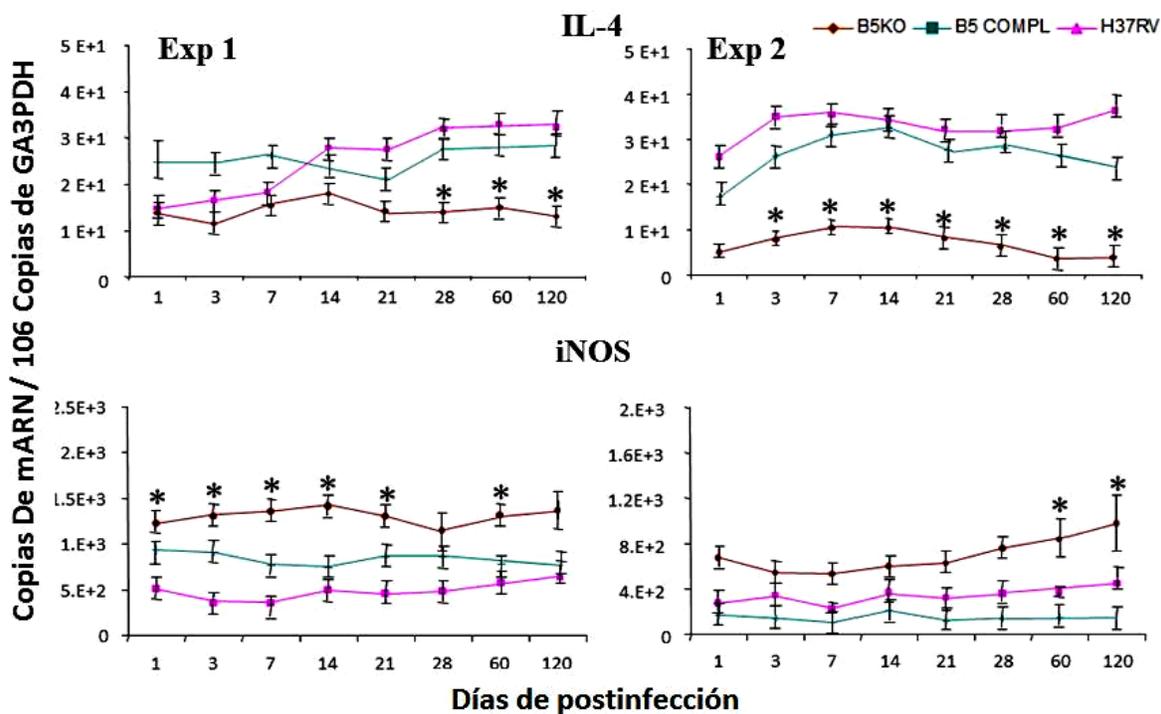


Figura. 19 Cinética de expresión para interleucina 4 y óxido nítrico sintasa inducible.

Análisis de resultados

Al analizar la sobrevivencia y comparar los tres grupos de estudio se observa que el grupo inoculado con la cepa parental (H37Rv) mostró una pérdida del 80% de animales, el grupo que fue retado con la cepa Knock-out del gen WhiB5 muestra 100% de sobrevivencia después de 4 meses de infección, comparando estos resultados con la cepa complementada se observa que esta no reconstituye al 100% la virulencia efecto que se observa en la pérdida de 20% de animales. Con esto se da un indicio de que WhiB5 tiene efecto en la virulencia de la bacteria H37Rv.

Desde la semana 10 postinfección se manifiestan diferencias significativas estadísticamente, comparando la cepa parental con la complementada y la Knock-out, manteniéndose esta diferencia hasta terminar el experimento.

En cuanto a la carga bacteriana observamos comportamientos similares para las tres cepas hasta el séptimo día de infección. Posteriormente se observa el incremento en el crecimiento de la cepa parental, alcanzando un máximo al final del experimento de cerca de 3×10^6 unidades formadoras de colonias. Comparando estos resultados con la cepa complementada observamos que el comportamiento es similar a la cepa parental, alcanzando un número similar después de los 4 meses postinfección. Mientras que la cepa mutada apenas sobrepasa el millón de bacterias a los 4 meses postinfección, lo que concuerda con un menor número de bacterias y mayor sobrevida. Con esto se observa que la bacteria con ausencia del gen *WhiB5* no es eficiente para generar daño en el huésped.

Al analizar la presencia de neumonía y granuloma en los grupos de estudio se observó que los animales inoculados con la cepa parental alcanzan un 55% de neumonía, considerando el promedio de ambos experimentos, los granulomas de estos animales apenas se manifiestan. Efectos similares ocurren en los animales inoculados con la cepa complementada.

Pero aquellos pulmones de animales inoculados con la cepa mutada muestran granulomas de gran tamaño respondiendo el porque los animales inoculados con la cepa ausente del gen *whiB5* tienen mayor sobrevida y menor carga bacteriana. Debido a que el sistema inmune genera una mejor respuesta protectora controlando la diseminación del bacilo con granulomas de gran tamaño. Mientras que aquellos que fueron inoculados con la cepa complementada o la parental muestran granulomas discretos con grandes áreas neumónicas,

lo que favorece el crecimiento bacteriano, por lo tanto una gran carga bacteriana y menor sobrevida.

Para evaluar la respuesta protectora del sistema inmune, y así determinar si se induce protección o se induce virulencia, se analizó la presencia de citocinas de respuesta tipo Th1 como IFN γ , iNOS, TNF α , así como IL-4 de tipo Th2 comparando con la expresión del gen G3DPH, un gen constitutivo de expresión constante. Cuando se analiza la presencia de estas citocinas partimos de la misma cantidad de cADN para que sea evaluable la cantidad de mensajero obtenido.

En las graficas se observa claramente que en ambos experimentos la cepa mutante muestra una gran cantidad de IFN γ , lo que favorece la proliferación de linfocitos y la activación de macrófagos, siendo esta una citosina proinflamatoria. La cepa complementada y la cepa de parental muestra una marcada diferencia a lo largo de la infección pero en especial en los días 28 y 60, mostrando significancia estadística. La expresión de TNF α es similar en los tres grupos, aunque al final la cepa mutante muestra un pequeño incremento en la producción de esta citocina.

La presencia de IL-4 es baja en la cepa mutante, comparada con la parental y complementada, lo que nuevamente explicaría que la cepa es poco virulenta. La expresión de iNOS apoya el estado protector de los animales que fueron retados con la cepa mutada (Fig. 20), se observa que existe una amplia diferencia a lo largo del experimento.

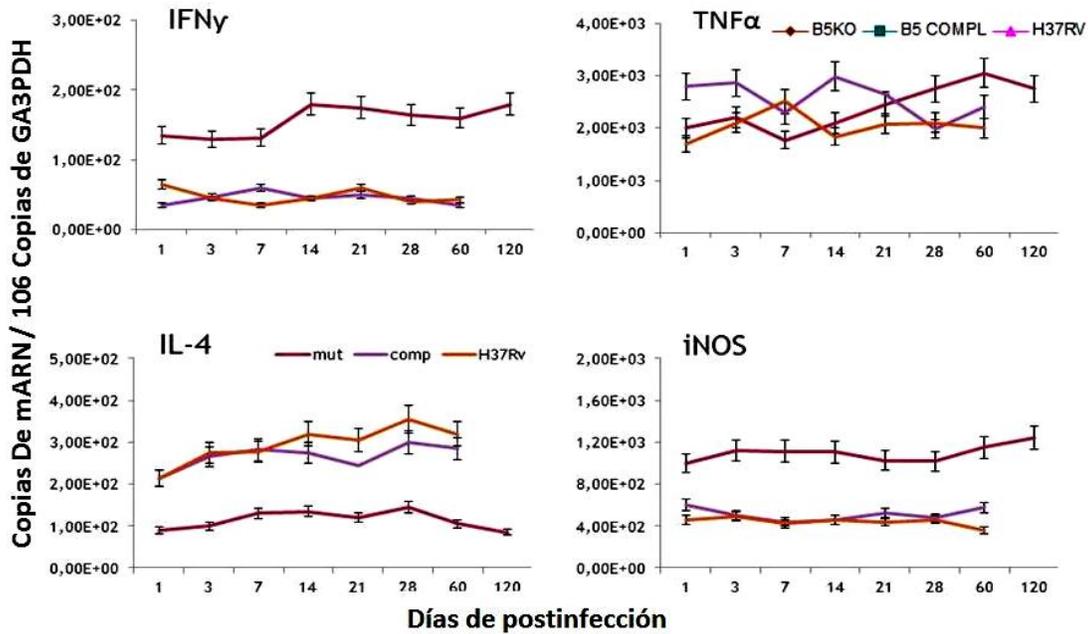


Figura. 20 Gráficos de citocinas Th1 y Th2 obtenidas por el promedio de ambos experimentos.

Por lo anterior podemos decir que el gen *WhiB5* es un factor que está involucrado en la virulencia de la bacteria *H37Rv*, ya que se demuestra que animales que son retados con la cepa mutante Knock-out *WhiB5*, generan grandes cantidades de *iNOS*, así como de *IFN* γ con bajas cantidades de *IL-4*; y cuando estos niveles se comparan con la parental o complementada se observa lo ya demostrado en el modelo del Dr. Hernández-Pando. Siendo así que los animales al principio muestran una respuesta protectora escasa que no alcanza a generar protección y que después de cierto tiempo el balance de la respuesta Th 1/Th 2 se desplaza hacia Th 2, una respuesta agresiva para el sistema inmune del ratón, lo que se observa con la disminución de sobrevivida, un aumento en la carga bacteriana, gran cantidad de *IL-4* y bajos niveles de *IFN- γ* e *iNOS*.

En cuanto al daño tisular podemos decir que este es mayor en la cepa complementada y *H37Rv* mostrando gran cantidad de neumonía y pocos o discretos granulomas que junto con bajos niveles de citocinas protectoras no pueden contener la infección; mientras que los animales retados con la cepa mutada muestra granulomas de gran tamaño, que pueden

ser un obstáculo para que la bacteria pueda crecer y reproducirse en el pulmón, debido a la gran cantidad de INF- γ que ayuda a generar protección inmune.

Discusión

Las vacunas profilácticas son las herramientas más útiles y de bajo costo para reducir la morbilidad y mortandad asociada a enfermedades infecciosas. La vacuna BCG es usada mundialmente, sin embargo, es controversial en términos de eficiencia. Los estudios realizados sobre los efectos protectores han dado resultados inconclusos en los cuales se mencionan casos de protección efectiva y casos donde no se consigue ningún nivel de protección (Montañés y Gicquel, 2011).

La infección por *M. tuberculosis* esta presente en un tercio de la población mundial, por lo cual se necesitan nuevas estrategias que puedan evadir la progresión de una enfermedad latente misma que puede derivar a una enfermedad activa. Vacunas inmunoterapéuticas diseñadas para el uso en adultos que ya han tenido la infección por *M. tuberculosis* activa generarían gran impacto en el control de la tuberculosis (Montañés y Gicquel, 2011). Se han obtenido en total once candidatos a vacunas, que ya se encuentran en pruebas clínicas, para tuberculosis (Kaufmann, 2010).

Uno de estos candidatos a vacunas resulto de la obtención del aislado clínico de la cepa MT103 en el cual el factor de transcripción *phoP* demostró que es un importante participante en la virulencia del bacilo y la causa de la resistencia a fármacos. Los resultados mostraron que *phoP* es altamente regulado y que se expresa constitutivamente en las cepas MT103 y BCG. La manipulación mediante técnicas moleculares derivó en una cepa mutante (SO2), en la cual se elimina la expresión de *phoP* (Martin *et al.*, 2006).

Del mismo modo encontramos que WhiB5 es un importante factor de virulencia el cual podemos observar que regula la expresión genética y no solo regula genes de expresión constitutiva. Este gen regula otros factores transcripcionales, como Sig M, asociados a proteínas altamente inmunogénicas relacionados evolutivamente a ESAT-6 y CFP-10 que no se han considerado en otros candidatos a vacunas. Se obtuvo una cepa mutante con Knock-out para el gen WhiB5 mediante técnicas moleculares, en la cual se elimina la expresión del gen WhiB5, permitiendo la expresión de proteínas inmunogénicas y reduciendo la virulencia del bacilo. En el caso de la cepa Knock-out WhiB5 no se ha establecido la comparación con la actual BCG.

Se ha reportado que la cepa SO2 induce un aumento en la proporción de células CD4⁺/INF γ ⁺ y CD8⁺/INF γ ⁺ después de 45 días y 14 días correspondientemente. Este efecto no se observa al comparar con BCG. La protección del sistema inmune contra *M. tuberculosis* depende de una respuesta tipo Th1 que se caracteriza por la secreción de INF- γ , por lo cual se especula que el incremento en los niveles de INF- γ lleva a una mejor respuesta protectora (Martin *et al.*, 2006).

Hemos encontrado que la cepa mutante para el gen WhiB5 produce una fuerte respuesta inmunológica tipo Th1 que se ve reflejado por la alta expresión de INF- γ y no solo por la expresión de INF- γ . Además se encontró la alta expresión de iNOS y la baja expresión de IL-4 (citocina de respuesta tipo Th2) durante toda la cinética de infección lo cual se relaciona con la dependencia de la respuesta Th1 para respuestas protectoras más eficientes y la ausencia de citocinas que podrían cambiar el equilibrio de la respuesta. La cantidad de neumonía asociada a la respuesta inmunológica producida por la mutante WhiB5 es similar a la ocasionada por la cepa parental, sin embargo, la cepa parental lleva esta respuesta a un balance Th2 hecho que no sucede para la mutante.

La eficacia de la protección se observa mediante la comparación del número de bacterias viables obtenidas de los órganos, en este caso pulmón. La reducción de unidades formadoras de colonias es un indicador de la resistencia del bacilo a los mecanismos inmunológicos para disminuir la diseminación (Martin *et al.*, 2006). Para la cepa mutante WhiB5 se encuentra reducida carga bacteriana comprobando que el bacilo pierde la capacidad de diseminarse al encontrar menos de un millón de bacilos viables a los cuatro meses de infección, lo cual es comparable al observar un 100% de sobrevida al finalizar el experimento.

En el caso de la cepa SO2 se reportó 100% de sobrevida durante el experimento, a comparación de controles con solución salina (Martin *et al.*, 2006). La virulencia del bacilo mutante WhiB5 se ve afectada produciendo una respuesta inmune suficientemente fuerte para mantener el balance Th1 pasados cuatro meses de infección y permitiendo a los individuos sobrevivir encontrando el mismo caso que en la cepa SO2.

La capacidad de la cepa mutante para generar una buena respuesta Th1 es debido a que la ausencia del gen WhiB5 elimina la posibilidad de que el bacilo pueda salir del estado de latencia. Este efecto se puede visualizar debido a que experimentos en los cuales se provee al bacilo mutante con GSNO (Casonato *et al.*, 2010), el cual induce la expresión de este gen, no logra un desarrollo significativo en el medio de cultivo impidiendo el crecimiento y reproducción del mismo. La deficiencia en el crecimiento del bacilo y la nula capacidad para salir de estado de latencia se relaciona con la histopatología en la cual encontramos granulomas de mayor tamaño los cuales sugieren que la infección está siendo mejor contenida por los granulomas. Al observar la cepa SO2 se reportaron granulomas de menor tamaño, inclusive menores que en la vacuna BCG.

La cepa WhiB5 ha de demostrar su efectividad al establecerse una dosis de vacunación que produzca los niveles más altos de protección, mediante experimentos en los cuales se administren diferentes cantidades de bacilo. Posterior a este experimento se debe de tomar en cuenta las diferencias con la actual vacuna BCG. La comparación debe de establecerse frente a la cepa de referencia H37Rv y frente a otras cepas de *M. tuberculosis* hipervirulentas como Beijín. Además de probar frente a una reactivación del bacilo.

Conclusiones

Con todo lo anterior se puede inferir que el gen WhiB5 esta involucrado en la virulencia, al obtener 100% de sobrevivencia, granulomas de gran tamaño y un alto porcentaje de citocinas proinflamatorias, se puede decir que las bacterias con ausencia del gen WhiB5 podrían ser buenas candidatas para el desarrollo de vacunas.

Perspectivas

Se propone evaluar la efectividad de estas bacterias como probables vacunas utilizando un modelo murino y trabajar en conjunto con bacterias ausentes de WhiB5 y otros factores de virulencia ya reportados por la efectividad de protección.

Bibliografía

- Abdallah M.A., Pittius N.C.G., DiGiuseppe P.A., Cox J, Luirink J., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Appelmelk B.J., Bitter W., 2007, *Type VII secretion — mycobacteria show the way*, Nature Reviews Microbiology, Vol.5, pp. 883-891.
- Agarwal N., Woolwine S.C., Tyagi S., Bishai W.R., 2007; *Characterization of the Mycobacterium tuberculosis Sigma Factor SigM by Assessment of Virulence and Identification of SigM-Dependent Genes*; Infection And Immunity; p. 452–461.
- Alam S., Garg S.K., Agrawal P, 2007, *Molecular function of WhiB4/Rv3681c of Mycobacterium tuberculosis H37Rv: a [4Fe-4S] cluster co-ordinating protein disulphide reductase*, Molecular microbiology, Vol.63 No. 5, pp. 1414-1431.
- Banaiee N., Jacobs W.R., Ernst J.D., 2006, *Regulation of Mycobacterium tuberculosis whiB3 in the MouseLung and Macrophages*, Infection and Immunity, Vol. 74 No.11, pp. 6449-6457.
- Bottai D., Brosch R., 2009, *Mycobacterial PE, PPE and ESX clusters: novel insights into the secretion of these most unusual protein families*, Molecular Microbiology, Vol.73 No.3, pp. 325-328.
- Casonato S., Jaouen T., Hernandez-Pando R., Aguilar D., Dainese E., Ghisotti D., Manganeli R. , 2011, *WhiB5 is essential for M. tuberculosis pathogenicity and regulates the expression of two type VII secretion systems*, in Vancouver congress, Canada.
- CENA VECE., *Cifras oficiales de tuberculosis* (en línea), Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades., http://cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html, consulta: 10 de Mayo del 2012.

- Chacón, O., Realpe, T., Barletta, G. R., Robledo, J., 2004, *Inactivación de genes de Mycobacterium tuberculosis y su potencial utilidad en la prevención y el control de latuberculosis* , Biomédica vol.24 suppl.1.
- Cole S. T., Brosch R., Parkhil J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S. V., Eiglmeier K., Gas S., Barry III C. E., Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M. A., Rajandream M.-A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J. E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B. G., 1998, *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*, Nature, Vol. 36, pp.537-544.
- Cole S., 2011, *Mycobacterium tuberculosis H37Rv Tuberculist* (en línea), Global Health Institute at the Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne and Swiss Institute of Bioinformatics, <http://tuberculist.epfl.ch/quicksearch.php?gene+name=Rv0022c>, consulta: 12 de Marzo del 2012.
- Cook G. M., Berney M., Gebhard1S., Heinemann M., Cox R. A., Danilchanka O., Niederweis M., 2009, *Physiology of Mycobacteria*, Advances in microbial physiology, Vol. 55, pp.82-182.
- Corbett E. L., Corbett L. E., Watt C. J., Walker N., Maher D., 2003, *The Growing Burden of Tuberculosis: Global Trends and Interactions With the HIV Epidemic*, Archives of Internal Medicine, Vol. 163, pp. 1009-1021.

- Daniel T., 1994, Tuberculosis, En Isselbacher K., Braunwald E., Wilson J., Fauci A., Kasper D., *Harrison`s principles of internal medicine*, 13a ed, McGraw-Hill, New York.
- Dietrich J., Lundberg C. V., Andersen P., 2006, *TB vaccine strategies—What is needed to solve a complex problem?*, Tuberculosis, Vol.86, pp.163-168.
- DiGiuseppe P.A., Cox J.S., 2007, *Protein secretion systems in Mycobacteria*, Cellular Microbiology, Vol.9 No.6, pp. 1376-1384.
- Flårdh K., Findlay K.C., Chater K.F., 1999, *Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in Streptomyces coelicolor A3(2)*, Microbiology, Vol.145, pp. 2229-2243.
- Fleischmann R.D., Alland D., Eisen J.A., Carpenter L., White O., Peterson J., DeBoy R., Dodson R., Gwinn M., Haft D., Hickey E., Kolonay J.F., Nelson W.C., Umayam L.A., Ermolaeva M., Salzberg S.L., Delcher A., Utterback T., Weidman J., Khouri H., Gill J., Mikula A., Bishai W., Jacobs W.R., Venter J.C.,C. Fraser M., 2002, *Whole-Genome Comparison of Mycobacterium tuberculosis Clinical and Laboratory Strains*, Journal of bacteriology, Vol.184 No.19, pp.5479-5490.
- Garg S., Alam S., Bajpai R., Kishan K.V.R., Agrawal P., 2009, *Redox biology of Mycobacterium tuberculosis H37Rv: protein-protein interaction between GlgB and WhiB1 involves exchange of thiol-disulfide*, BMC Biochemistry, Vol.10 No.1, pp. 1-12.
- Geiman D.E., Raghunand T.R., Agarwal N., Bishai W.R., *Differential Gene Expression in Response to Exposure to Antimycobacterial Agents and Other Stress Conditions among Seven Mycobacterium tuberculosis whiB-Like Genes*, Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol.50 No.8, pp 2836-2841.

- Hernández-Pando R., Aguilar L.D., Infante E., Cataldi A., Bigi F., Martin C., Gicquel B., 2006, *The use of mutant mycobacteria as new vaccines to prevent tuberculosis*, Tuberculosis, Vol.86, pp.203-210.
- Hernández-Pando R., Chacón S. R., Serafín L. J., Estrada I.; 2007, Immunology, Pathogenesis, Virulence; En Palomino JC, Cardoso Leão S, Ritacco V; *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care*. P.129; Ed. BourcillerKamps.com.
- Hernandez-Pando, R, Orozco, H, Sampieri A, Pavon, L Velasquillo, C, Larriva-Sahd J, Alcocer J. M, Madrid M. V; 1996; *Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis*; Immunology Vol.89 pp.26-33.
- Kaufmann S.H.E., 2001, *How can immunology contribute to the control of tuberculosis?*, Nature Reviews immunology, Vol.1, pp.20-30.
- Kaufmann S.H.E., 2010, *Future Vaccination Strategies against Tuberculosis: Thinking outside the Box*, Cell Press Immunity, Vol.33, pp.567-577.
- Kaufmann S.H.E., Cole S.T., Mizrahi V., Rubin E., Nathan C., 2005, *Mycobacterium tuberculosis and the host response*, Journal of Experimental Medicine, Vol. 201 No. 11, pp.1693-1697.
- Korosteleva, Olga; 2009; *Clinical statistics: introducing clinical trials, survival analysis, and longitudinal data analysis*; Jones and Bartlett Publishers series in mathematics: Advanced mathematics; pp.120.
- Lluís Salleras S. M; L Salleras, J. A; 2003. Vacunas preventivas: Principios y aplicaciones. Elsevier España. 1064pp.

- Madigan T.M., Martinko M.J., Parker J., 2005, La diversidad Procariotica: Bacteria, en Madigan T.M., Martinko M.J., Parker J., *Biología de los Microorganismos*, México, Ed. Pearson Prentice Hall, p.412.
- Manganelli R., Dubnau E., Tyagi S., Kramer F.R., Smith I., 1999, *Differential expression of 10 sigma factor genes in Mycobacterium tuberculosis*, Molecular Microbiology, Vol.31, pp.715-724.
- Manganelli, R, Proveddi, R, Rodrigue, S, Beaucher J, Gaudreau L, Smith I, 2004, *σ Factors and Global Gene Regulation in Mycobacterium tuberculosis*, Journal Of Bacteriology, p. 895–902.
- Martin C., Williams A., Hernandez-Pando R., Cardona P., Gormley E., Bordat Y., Soto C., Clark S., Hatch G., Aguilar D., Ausina V., Gicquel B., 2006, *The live Mycobacterium tuberculosis phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs*, Vaccine, Vol.24, pp. 3408–3419.
- McMurray D.N., 2001, *Disease model: pulmonary tuberculosis*, Trends in Molecular Medicine, Vol.7 No.3, pp.135-137.
- Montañés Carlos M., Gicquel B., 2011, *New tuberculosis vaccines*, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Vol. 29 pp.57-62.
- Parida S.K., Kaufmann S.H.E, 2010, *Novel tuberculosis vaccines on the horizon*, Current Opinion in Immunology, Vol.22, pp.374-384.
- Portillo Patricia; Reyes Alejandro; Salazar Leiria; Menéndez María, C; García María, J; 2007, Genomics and Proteomics; En Palomino JC, Cardoso Leão S, Ritacco V; *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care*. P.129; Ed. BourcillerKamps.com.

- Raghunand T.R., Bishai W.R., 2006, *Mapping Essential Domains of Mycobacterium smegmatis WhmD: Insights into WhiB Structure and Function*, Journal of bacteriology, Vol.188 No.19, pp 6966-6976.
- Raja A., 2004, Immunology of tuberculosis, Indian journal of medical research, Vol.120, pp. 213-232.
- Raman S., Puyang X., Cheng T.Y., Young D.C., Moody D.B., Husson R.N., 2006, *Mycobacterium tuberculosis SigM Positively Regulates Esx Secreted Protein and Nonribosomal Peptide Synthetase Genes and Down Regulates Virulence-Associated Surface Lipid Synthesi*, Journal of bacteriology, Vol.188 No.24, pp. 8460-8468.
- Russell D.G., Barry C.E., Flynn J.L., 2010, Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us, Science, Vol.328, pp. 852-855.
- Secretaría de Salud, 2001, Diagnóstico, en Secretaria de Salud *Programa de acción: Tuberculosis*, México, pp.16-19.
- Secretaría de Salud, 2008, Diagnóstico de salud, en Secretaria de Salud *Programa de acción específico 2007-2012 Tuberculosis*, México, pp.17-19.
- Smit M., 2010, *Investigation of the ESX-4 secretion system interactome of Mycobacterium tuberculosis*, Stellenbosch, South Africa, University of Stellenbosch, Thesis for the degree Master of Science in Medical Sciences (Medical Biochemistry), pp. 1-84.
- Smith I., 2003, *Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence*, Clinical microbiology reviews, Vol.16 No. 3, pp.463-496.

- World Health Organization, 2009; Epidemiology. *In World Health Organization Global Tuberculosis control: Epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009*; Switzerland, Geneva, pp.6-13.
- World Health Organization, 2011; The burden of disease caused by TB. *In Global tuberculosis control: WHO report 2011*; Switzerland, Geneva, pp.9-27.

Apéndice

Secuencias de Oligonucleótidos específicas para citosinas

Nombre	Secuencia	Temperatura
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)	5'-CATTGTGGAAGGGCTCATGA-3' 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3'	60 ⁰ C
Oxido Nítrico sintasa (iNOS)	5'-AGCGAGGAGCAGGTGGAAG-3' 5'-CATTTCGCTGTCTCCCCAA-3'	58 ⁰ C
Factor de necrosis tumoral (TNF α)	5'-TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3' 5'-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3'	58 ⁰ C
Interleucina 4 (IL-4)	5'-CAGGAGAAGGGAACACCAC-3' 5'-CGTGTTTAGGCTTCCAGGAAG-3'	60 ⁰ C
Interferón gama (IFN-)	5'-GGTGACATGAAAATCCTGCAG-3'	58 ⁰ C

y)	5'-CCTCAAACCTGGCAATACTCATGA-3'	
----	--------------------------------	--

Curva Estándar Para PCR-tiempo real.

Ejemplo aplicado para el ribosoma 16S bacteriano, y utilizando el marcador Low DNA Mass Ladder (Cat. 10068-013, Invitrogen). Previo a el análisis se hace un amplificado por PCR punto final de una muestra para el ribosoma 16S, esta muestra se corre en un gel de agarosa el 1.8% con un marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Cat. 15628-019, Invitrogen). Se observa en transluminador y se obtiene los índices de densidad para la muestra y para el marcador de masa molecular. En el ejemplo se obtuvo un ID (Índice de densidad) para la muestra del ribosoma 16S de 217261 y para el marcador de masa molecular ase obtuvo 20876.

El marcador de masa molecular sabemos que tiene 40 ng de DNA por banda, y se procede a la siguiente operación.

$$217261 \text{ ID de muestra} \left(\frac{40 \text{ ng}}{20876 \text{ ID del marcador de masa}} \right) = 41.62 \text{ ng} / 5 \mu\text{l}$$

Lo que es igual a

$$8.32 \text{ ng} / \mu\text{l} = 8.32 \times 10^{-3} \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

Obteniendo cuantos microgramos por microlitro hay en nuestra muestra. Ahora obtenemos la cantidad de pares de bases en el gen de del ribosoma 16S.

$$101\text{pb} \times 660 = 66,660$$

Donde 101pb es el número de pares de bases que codifican para el ribosoma 16S y 660 el número de pares de bases promedio de cualquier gen

Para aplicarlo a la ecuación:

$$\frac{8.32 \times 10^{-3} \mu g / \mu l}{66,660} \times 6.021237 \times 10^{23} = 7.5204 \times 10^{16} cp / Lt = 7.52 \times 10^{10} cp / \mu l$$

Donde:

$8.32 \times 10^{-3} \mu g / \mu l$: es el resultado de la primera operación.

66,660: es el resultado de la segunda operación.

6.021237×10^{23} : es el número de Avogadro.

De esto se obtiene el número de copias de DNA por microlitro de solución, conociendo esto podemos realizar la siguiente operación.

$$1 \times 10^{10} \left(\frac{1 \mu l}{7.5204 \times 10^{10}} \right) = .1329 \mu l$$

Ahora tomando 1.329 microlitros de muestra y agregando 8.64 microlitros de agua DEPC, obtenemos una solución con 1×10^{10} copias por microlitro, a esta solución se le agregan 90 microlitros de agua DEPC y se obtiene una solución 1×10^9 , y se continúan haciendo soluciones seriadas.