



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Protección inducida por *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv doble mutante sigE y fadD26 en un modelo murino de tuberculosis pulmonar.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

Q.F.B. Martin Ignacio Becerril Zambrano

Dr. Rogelio Hernández Pando  
Instituto Nacional en Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dr. Eduardo García Zepeda  
Instituto de Ciencias Biomédicas, UNAM.

Dra. Clara Espitia Pinzón  
Instituto de Ciencias Biomédicas, UNAM.

MÉXICO, D. F. septiembre, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Índice:	2
Agradecimientos.	3
1. Abreviaturas.	4
2. Lista de figuras.	5
3. Lista de cuadros.	7
4. Resumen.	8
5. Introducción.	10
5.1. Historia.	10
5.2. Epidemiología.	11
5.2.1. Tuberculosis en México.	12
5.3. Vacunas.	13
5.4. Tratamiento.	15
5.5. Agente Causal.	16
5.6. Respuesta Inmune.	17
5.6.1. Inmunidad Innata frente a la infección por <i>M.tuberculosis</i> .	18
5.6.2. Granulomas.	20
5.6.3. Respuesta inmune adaptativa ante la infección por <i>M.tuberculosis</i> .	20
5.7. <i>M. tuberculosis</i> , estructura de la pared celular y respuesta del sistema inmune.	22
5.8. Regulación metabólica.	24
5.8.1. Factores sigma.	25
5.8.2. SigE.	28
5.9. Modelo murino.	33
5.10. Antecedentes.	33
5.11. Justificación.	34
6. Hipótesis.	35
7. Objetivos.	35
7.1. Objetivos específicos.	35
8. Materiales y métodos.	35
8.1. Cepas utilizadas para la inmunización.	35
8.2. Cepas para reto.	35
8.3. Preparación de cepa e inóculo.	36
8.4. Diagramas de flujo de la metodología de las pruebas.	37
8.5. Determinación de la carga bacilar por UFCs.	39
8.6. Morfometría e histopatología.	40
8.7. Análisis de expresión de citocinas por qPCR( PCR en tiempo real).	40
8.8. Análisis estadístico.	42
8.9. Prueba de virulencia en ratones “Nude” o desnudos.	42
8.10. Prueba de virulencia en animales SCID.	42
8.11. Prueba de virulencia en ratones BALB/c.	43
8.12. Prueba de protección.	43
9. Resultados.	44
10. Discusión de resultados.	72
11. Conclusiones.	79
12. Bibliografía.	80

## Agradecimientos.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo y hacerme participe de este proyecto de investigación, gracias por su apoyo y confianza depositados en mi.

Al Dr. Eduardo García Zepeda por los consejos, criticas y conocimientos compartidos, su objetividad siempre permitió la mejora de mi trabajo.

A la Dra. Clara Espitia Pinzón por compartir sus conocimientos y darme recomendaciones durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Brenda Marquina por apoyarme, ayudarme y tener paciencia para analizar mis resultados.

A la Dra. Dulce Mata por mostrarme el trabajo en el laboratorio y aconsejarme paso a paso en las técnicas del laboratorio.

A la técnico académico la M. en C. Cristina Parada Colín por facilitarnos información reactivos y materiales indispensables para continuar con el proyecto.

A todos mis compañeros que me acompañaron y apoyaron en el laboratorio del INCMNSZ, compartiendo sus conocimientos, resolviendo mis dudas o simplemente dándome una palabra de aliento.

Por ultimo a todas esas personas que siempre me han apoyado y alentado en mi camino, mis padres y mi novia, quien se dio un tiempo para leer esta tesis y ayudar a corregirla.

## 1. Abreviaturas.

BALB/c	Cepa de ratón de la especie <i>Mus musculus</i> utilizada para la investigación científica.
BCG	Bacilo Calmette-Guérin.
BCGph	Bacilo Calmette-Guérin phipps.
Bacteria Doble Mutante	Bacteria con la doble delección de $\Delta\text{sigE}$ $\Delta\text{fadD26}$ .
Bacteria Única Mutante	Bacteria con la delección de $\Delta\text{sigE}$ .
$\Delta\text{fadD26}$	Mutación del factor de transcripción <i>fadD26</i> .
$\Delta\text{sigE}$ , $\Delta\sigma^e$	Mutación del factor de transcripción sigma E.
IL	Interleucina.
INF $\gamma$	Interferón gama.
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LAM	Familia Latino-Americano Mediterráneo
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero.
NK	Células “ Natural Killer”.
NUDE	Cepa de ratones de uso de laboratorio deficientes del gen FoxN1.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
RNA	Ácido Ribonucleico.

RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SCID	Cepa de ratones con una mutación en los genes que codifican RAG-1 y RAG-2.
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante tipo beta.
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1
Th2	Linfocitos T cooperadores tipo 2
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral.
SS	Solución Salina.
WHO	“World Health Organization”.

## 2. Listas de figuras.

Figura 1. Distribución mundial de la tuberculosis.

Figura 2. Tipos de linfocitos.

Figura 3. Representación esquemática de la pared celular de la *M.tuberculosis*.

Figura 4. Representación del núcleo de la pared celular .

Figura 5. Correlación entre la actividad de factores sigma.

Figura 6. Regulación de sigE / Papel metabólico sigE.

Figura 7. Respuesta a estrés oxidativo mediada o con aportación de sigE.

Figura 8. Regulación de sigE de factores asociados al metabolismo de ácidos grasos en choque térmico y estrés oxidativo.

Figura 9. Genes regulados por sigE involucrados en la síntesis de ácidos grasos de pared celular.

Figura 10. Porcentaje de sobrevivencia de los ratones "NUDE".

Figura 11. Porcentaje de sobrevivencia de los ratones SCID.

Figura 12. Porcentaje de sobrevivencia en la prueba de virulencia usando ratones BALBc.

Figura 13. Carga bacilar en ratones BALB/c virulencia.

Figura 14. Cuantificación de la expresión de INF $\gamma$  por qPCR.

Figura 15. Cuantificación de la expresión de TNF $\alpha$  por qPCR.

Figura 16. Cuantificación de la expresión de TGF $\beta$  por qPCR.

Figura 17. Cuantificación de la expresión de NOS por qPCR.

Figura 18. Cuantificación de la expresión de IL-4 por qPCR.

Figura 19. Porcentaje de sobrevivencia de los individuos retados con la cepa 5186.

Figura 20. Carga bacilar en pulmón de los individuos retados con 5186 .

Figura 21. Porcentaje de neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 5186.

Figura 22. Tamaño de los granulomas presentes en pulmón de los individuos retados con la cepa 5186.

Figura 23. Imagen representativa de el área afectada por neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 5186 a los 2 meses.

Figura 24. Imagen representativa de el área afectada por neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 5186 a los 4 meses.

Figura 25. Carga bacilar en bazo de los individuos retados con la cepa 5186.

Figura 26. Porcentaje de sobrevivencia de los individuos inmunizados y retados 2 meses post inmunización con la cepa 583 familia Beijing.

Figura 27. Carga bacilar en pulmón de los individuos retados con la cepa 583.

Figura 28. Porcentaje de neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 583.

Figura 29. Imagen representativa de el área afectada por neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 583 2 meses.

Figura 30. Imagen representativa de el área afectada por neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 583 3 meses.

Figura 31. Tamaño de los granulomas en los individuos retados con la cepa 583.

Figura 32. Carga bacilar en bazo de individuos retados con la cepa 583.

### **3. Lista de cuadros.**

Tabla 1. Condiciones para la realización de los qPCR para cuantificación de citocinas.



#### 4. Resumen

La tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa, cuyo agente causal es la *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enfermedad presentó en 2013, aproximadamente 9 millones de casos nuevos y 1.5 millones de muertes, el 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países de ingresos bajos y medianos. De estos nuevos casos, 1.1 millones corresponden a una co-infección por VIH/SIDA, siendo esta una de las principales causas de muerte de este grupo. La vacunación con BCG es el mejor método profiláctico contra esta infección. Sin embargo la eficacia de dicha vacuna es muy variable, ya que confiere una buena protección en el caso de infección grave en niños mientras que su protección en adultos oscila entre 0% y 80%. Debido a esta variación en su eficacia se ha propuesto el diseño de nuevas vacunas, algunas de las cuales se basan en la modificación de cepas de tuberculosis (TB).

Este proyecto se basó en probar una cepa de *M. tuberculosis H37Rv* que presenta deleciones en su genoma, con el objetivo de demostrar su capacidad de inducir memoria y conferir protección. Para dichas deleciones se eligió el factor de transcripción sigE ( $\sigma E$ ), el cual es muy importante en el metabolismo de ácidos grasos y en la activación de otros factores de transcripción con distintas funciones. También está relacionado con la respuesta a diferentes tipos de estrés, por ejemplo a antibióticos, estrés oxidativo y choque térmico, al no estar presente, la bacteria pierde su capacidad de sobrevivir a estos tipos de estrés. Las bacterias sin este gen tienen baja virulencia y han demostrado tener utilidad como vacunas al proteger frente a la infección por *M. tuberculosis*. Por otro lado, al ser necesarias dos mutaciones en vacunas de bacterias vivas atenuadas y poder presentarlas como candidatos a vacuna en el comité europeo de vacunas, se le realizó al prospecto de vacuna también la mutación en el gen fadD26 responsable de la síntesis de ácidos micólicos, principal componente de la pared celular del bacilo. Se sabe que la respuesta celular es muy importante para el control de la infección, principalmente las relacionadas con la producción de citocinas pro inflamatorias, siendo de mayor protección un perfil TH1.

Se utilizaron distintos modelos murinos para este trabajo. Como ratones tipo SCID y NUDE para asegurar que la bacteria doble mutante no tenga una virulencia alta, ya que uno de los grupos más vulnerables a esta enfermedad son las personas inmunosuprimidas. Se comprobó utilizando ratones BALB/c (modelo murino de neumonía) que la bacteria con la doble mutación  $\Delta\text{sigE}\Delta\text{fadD26}$  tiene una menor virulencia que la vacuna BCG, ya que los animales inoculados con la bacteria doble mutante  $\Delta\text{sigE}\Delta\text{fadD26}$  tuvieron mejor supervivencia que los de BCG.

También se analizó la capacidad de protección de la bacteria doble mutante  $\Delta\text{sigE}\Delta\text{fadD26}$  para comprobar que puede tener función como vacuna inmunizando ratones BALB/c y observando su carga bacilar y neumonía en pulmón, comparándola contra la vacuna estándar BCGph. Los grupos inmunizados se retaron usando cepas de muy alta virulencia, la cepa de tuberculosis de la familia LAM 5186 y la cepa de tuberculosis de la familia Beijing 583. En ambas pruebas los animales inmunizados con la bacteria doble mutante  $\Delta\text{sigE}\Delta\text{fadD26}$  tuvieron una menor carga bacilar en pulmón y menor área afectada por neumonía en pulmón, comprobando que la bacteria doble mutante confiere una mayor protección que la vacuna estándar BCG. La bacteria doble mutante al tener una menor virulencia y conferir una mayor protección que la vacuna BCG es un buen candidato para convertirse en vacuna.

## 5. Introducción.

### 5.1. Historia de la Tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infectocontagiosas más importantes en el mundo, reportada desde la antigüedad. Se cree que el género *Mycobacterium* se originó hace más 150 millones de años, y la familia *M. tuberculosis* hace aproximadamente 15 mil o 35 mil años. Desde entonces es el patógeno microbiano que más personas ha matado a lo largo de la historia de la humanidad. Conocida con múltiples nombres como *Pitisis* (que significa consumirse) en Grecia en el 460 a.C., o como la “Peste Blanca” en Europa en el siglo XVII, está enfermedad cuenta con registros en múltiples culturas como la Egipcia y la Mesoamericana (Palomino et al. 2007).

El primero en describir el comportamiento infeccioso de la tuberculosis fue Girolamo Francastolo en 1546 en su libro de “*Morbus contagiosus*”, apuntando que existían pequeñas partículas que se transmitían de un individuo a otro mediante la ropa de cama. Posteriormente en 1720, Benjamin Marten postuló que la infección era causada por diminutos organismos vivientes, capaces de entrar al organismo por medio del contacto con la ropa de cama, con la bebida o por permanecer en un área cerrada con una persona infectada. Robert Koch en 1882 logró aislar por primera vez el bacilo de la tuberculosis, ya que desarrolló un medio selectivo a base de papa y agar. También desarrolló métodos para su tinción usando azul de metileno, un colorante diseñado por Paul Ehrlich y utilizando la vesuvina como contraste (también llamada marrón de Bismark). Para confirmar que el bacilo estaba presente en todas las infecciones de tuberculosis, Koch inoculó a conejillos de indias con material infectado con tuberculosis obtenido de intestinos, pulmones y cerebro de personas que murieron a causa de la tuberculosis; teniendo los conejillos una infección similar a la presentada por los humanos, de las muestras obtenidas de estos animales logro aislar el bacilo (Murray et al. 2007).

Los postulados de Robert Koch están basados en 4 criterios diseñados para establecer la relación organismo causal y la infección:

- El microorganismo debe estar presente en los animales infectados, pero no en animales sanos.
- El organismo debe ser aislado y crecido en medios selectivos.
- El organismo puede causar una infección al ser introducido en animales sanos.
- El organismo puede volver a ser inoculado de los animales infectados experimentalmente.

## **5.2. Epidemiología.**

La tuberculosis (TB) es un enfermedad infectocontagiosa que en 2013 presento aproximadamente 9 millones de casos nuevos, con 1.5 millones de muertes a nivel mundial. Las personas infectadas con VIH/SIDA son especialmente susceptibles a esta enfermedad, debido a que al estar inmunosuprimidos es más fácil que el bacilo proliferen en los pulmones; como muestra de esta vulnerabilidad en 2013 se presentaron 1.1 millones de nuevos casos de tuberculosis en personas con VIH/SIDA, de estos nuevos casos se presentaron 0.4 millones de muertes, la mayor concentración de estas muertes se presentó en el sur de África con 320 mil muertes (75% de las muertes) (WHO. 2014) Fig. [1].

Es de vital importancia el diseño de mejores tratamientos o medidas profilácticas como la vacunación, ya que en 2013 hubo 480 mil casos reportados de infecciones de tuberculosis multi droga resistente (WHO. 2014).



Figura. [1]. **Distribución mundial de la tuberculosis.** Marcados en verde los países con mayor incidencia. La mayoría de los casos se presentan en Asia con un 58% y África con el 27% de estos. Se cree que en algunos países los niveles pueden ser mayores, pero debido a que no se cuenta con buenos sistemas de diagnóstico, es posible que en algunas regiones la tuberculosis tenga una mayor presencia (WHO. Global tuberculosis report 2014).

### 5.2.1. Tuberculosis en México.

En México se presentaron 21,306 nuevos casos de tuberculosis con 2,560 muertes. Con respecto a la coinfección con VIH/SIDA se presentaron 2,300 casos con 360 muertes. Por esta razón en México hay una inversión para el control de la tuberculosis estimada en 20 millones de dólares en 2013 (WHO. 2014).

### 5.3. Vacunas.

La vacunación junto a las prácticas de higiene y antibióticos han jugado un rol esencial durante el último siglo en la erradicación y control de muchas enfermedades. Se puede tomar como ejemplo, la erradicación de la viruela en 1978 gracias a la vacunación (Rappuoli et al. 2014). La organización mundial de la salud reporta que los programas de vacunación han prevenido alrededor de 2.5 millones de muertes al año ( World Health Organization, WHO. 2013).

Según la OMS, se entiende por vacuna cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos.

Las vacunas fueron creadas como tratamiento profiláctico, consistiendo en la utilización de los organismos causantes de las enfermedades, ya sea atenuados, muertos o fragmentos de los mismo, para lograr inducir una respuesta inmune celular duradera y de memoria, capaz de proteger al individuo de futuras infecciones. El comienzo de la vacunología, puede remontarse a los tiempos de Edward Jenner, quien logro en 1796 una vacunación exitosa contra la viruela. Este es un ejemplo básico de la inmunización profiláctica, por medio de los programas mundiales se ha logrado la erradicación de esta y se busca conseguir la futura erradicación de otras enfermedades como la tuberculosis (Palomino et al. 2007, Abbas 2009).

De 1908 a 1919 Albert Calmette y Camille Guérin realizaron 230 pases de la bacteria *M. bovis*, consiguiendo así la atenuación de la misma, la cual mostró una baja virulencia en caballos y conejillos de indias, por lo cual en 1921 fue empleada como vacuna (vacuna BCG), y actualmente se sigue utilizando para la inmunización contra la tuberculosis (Palomino et al. 2007). Pero esta vacuna presenta una protección buena en el caso grave de tuberculosis en niños, pero una baja efectividad en adultos que va desde el 0% hasta el 80% (Fine et al. 1995) , haciendo indispensable el desarrollo de mejores vacunas para la prevención de la enfermedad.

Gracias al descubrimiento del genoma de la micobacterias (Cole et al. 1998), es posible desarrollar nuevas vacunas a través de la modificación del genoma de la

misma para conseguir su atenuación; también a través de mutaciones, deleciones o inserciones se puede modificar su virulencia o su regulación metabólica (Smith et al. 2001, Infante E. 2005).

Una de las estrategias más utilizadas para la producción de vacunas consiste en el uso de bacterias vivas atenuadas, las cuáles se generan por medio de la eliminación de genes relacionados con la virulencia de la bacteria (micobacterias atenuadas auxotróficas) (Goldman et al. 2007).

Otra de las estrategias, consiste en la creación de subcepas BCG que han sido genéticamente manipuladas para sobre expresar antígenos inmunodominantes (BCG recombinantes) (Bloom et al. 1994, Palomino et al. 2007, Abbas 2009).

La vacuna de BCG presenta una protección muy variable, como se mencionó con anterioridad, por lo que se han diseñado nuevas bacterias mutantes considerando la estrategia original de diseño de vacunas, que consiste en utilizar los agentes causales de las enfermedades para garantizar que la respuesta inmune que se diera fuese igual a la que se presentaría en una infección normal, por lo tanto la utilización de cepas mutantes de *M. tuberculosis* ofrece una buena alternativa para la generación de nuevas vacunas pues se trata del agente causal en humanos. Con esto se espera que se induzca una respuesta inmune igual o similar a la que se daría en una infección en condiciones normales, obteniendo antígenos que no presenta la familia *M. bovis* con la que se realiza la vacuna BCG.

Ya que en la actualidad la vacuna de BCG es la única vacuna de uso y debido a su protección tan variable, se han hecho estudios donde se analizan distintas subcepas de esta vacuna, buscando un mejor candidato para ser la vacuna de uso común. Cuando se dio la distribución de la cepa BCG para el resto del mundo las cepas sufrieron mutaciones espontaneas debido a múltiples países generando mutantes conocidas como cepas hijas. En un estudio realizado por el grupo del Dr. Hernández R. se analizaron 10 subcepas de BCG (Castillo-Rodal et al. 2006), de las cuales la cepa BCGhipps (Filadelfia) demostró conferir mayor protección que las otras cepas hijas utilizadas en este estudio, ya que el pulmón provoco una menor

área afectada por neumonía y una mayor inducción de la expresión de citocinas pro inflamatorias.

#### **5.4. Tratamiento.**

El tratamiento es muy prolongado y requiere de 4 antibióticos, lo cual puede llegar a provocar que no se siga de manera adecuada o se abandone, provocando el surgimiento de múltiples bacterias MDR (multi Drug Resistant) y XDR-TB (Extensively Drug Resistant).

Se utiliza como fármacos de primera línea Rifampicina, que inhibe la RNAPolimerasa de la bacteria impidiendo la transcripción del DNA bacteriano; Isoniazida, que interviene en la síntesis de ácidos micólicos de la pared celular; Etambutol, mecanismo desconocido con acción exclusiva sobre bacterias tuberculosas, bacteriostático y bactericida en altas concentraciones; y Pirazinamida, mecanismo desconocido, muy toxico para las micobacterías. Cuando los tratamientos de primera línea fallan, ya sea por descuidos en el régimen del tratamiento o que la cepa sea multi-drogo resistente (MDR) o extremadamente drogo resistente (XDR) se requiere recurrir a tratamientos de segunda línea (Miglioei et al. 2007), fármacos que se pueden dividir principalmente en 3 grupos:

Primero, en drogas con actividad bactericida: Aminoglucósidos (como la kanamicina o amikacina), tionamidas ( como etionamidas o protionamida) y en ocasiones también pirazinamida( de tratamiento de primera línea).

Segundo, en drogas con actividad bactericida baja: Fluoroquinolonas ( ciprofloxacina y ofloxacina).

Tercero, en drogas con actividad bacteriostática: Etambutol o cicloserina y Acido paraaminosalicílico (PAS).

Todos estos tienen una eficacia menor que los de primera línea y mayor cantidad de efectos secundarios como mareo, náuseas, convulsiones, cefaleas, insomnio entre otros (Pino et al.1998).



### 5.5. Agente causal.

El agente causal *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), es un bacilo alargado, no esporulado, inmóvil, alcohol ácido resistente, de lento crecimiento debido a la restricción en la captación de alimentos asociado al grosor de la pared celular, tiene un genoma rico en guaninas y cisteínas. Esta bacteria posee la pared celular de mayor grosor dentro del género *Mycobacterium*; siendo los ácidos micólicos los lípidos más comunes dentro de la pared celular, que pueden llegar a ser utilizados como fuente de carbono y ayudan a regular el funcionamiento de proteínas y ácidos grasos de la pared celular.

Es un microorganismo patógeno intracelular facultativo que puede producir tanto una enfermedad progresiva como una infección latente asintomática (Rook et al. 1996). El padecimiento es ocasionado por el complejo *Mycobacterium*, el cual incluye a las especies *M. tuberculosis* (también conocida como bacilo de Koch), *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. (Palomino et al. 2007).

Las micobacterias son de carácter aerobio estricto y obtienen su energía por medio de la oxidación de compuestos simples de carbono. Tienen un tiempo de división celular aproximado de 18 horas.

Sin embargo, es conveniente mencionar que otras especies del género *Mycobacterium*, conocidas comúnmente como “micobacterias no tuberculosas” (MNT), ocasionan numerosos cuadros patológicos que resultan clínicamente (con signos y síntomas) indiferenciables de la TB (Johnson et al. 2014).

Las cepas del género *Mycobacterium* tienen múltiples reservorios y distintos organismos para infectar. Las especies *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canettii* infectan principalmente humanos. Otras como *M. bovis* y *M. microti* normalmente infectan animales, pero pueden contagiarse a humanos.

## 5.6. Respuesta inmune.

### Respuesta inmune hacia la tuberculosis.

La función del sistema inmune es proteger al organismo de microorganismos infecciosos. En términos generales esta respuesta inmune está dividida en dos tipos, la inmunidad innata y adaptativa. La primera existente desde antes de la aparición del microorganismo y la segunda más especializada y producida a partir de la presencia del microorganismo (Ciraci et al. 2012, Abbas 2009). Ambas respuestas están íntimamente relacionadas pues la activación de la respuesta inmune adaptativa es dependiente de varios factores pertenecientes a la respuesta inmune innata y a su vez la inmunidad adaptativa genera elementos necesarios para la correcta función de los componentes del sistema inmune innato. (Ciraci et al. 2012, Yuk et al. 2014, Kleinnijenhuis et al. 2011, Vanden Driessche et al. 2013, Liu et al. 2013 ).

La infección por *M. tuberculosis* comienza al inhalar el bacilo presente en aerosoles infectados, el bacilo viaja al alvéolo pulmonar donde tiene su primer encuentro con los macrófagos alveolares y otras células fagocíticas, incluidas las células dendríticas, las cuales son las principales responsables de la presentación de antígenos a los linfocitos T (Yuk et al. 2014, Riley et al. 1962). Las bacterias que escapan a la destrucción celular pueden salir del fagosoma y multiplicarse dentro del macrófago. Estos bacilos destruyen al leucocito y proliferan en el pulmón, lo cual provoca la liberación de citocinas pro inflamatorias que atraen distintas estirpes celulares al lugar (Kleinnijenhuis et al. 2011, Yuk et al.2014). Si la infección no ha sido controlada dentro de 2 a 4 semanas, se presenta una respuesta por parte de los linfocitos T que trabajan en conjunto con los macrófagos para la eliminación del bacilo (van Crevel et al. 2002, Hernández P 1996).

Se considera que una respuesta dirigida hacia un perfil TH1 proinflamatorio es mejor para el control y eliminación del bacilo (van Crevel et al. 2002, Hernández P 1996, Hernández P 2010).

### 5.6.1. Inmunidad Innata frente a la infección por *M.tuberculosis*.

La habilidad de la respuesta inmune innata está dada por su capacidad de responder a una gran variedad de estímulos para la eliminación del patógeno y la reparación de tejidos (Ciraci et al.2012). El sistema de la inmunidad innata se regula por la segregación de citocinas proinflamatorias y moléculas que pueden activar al sistema inmune adaptativo(Ciraci et al. 2012, Yuk et al. 2014). La respuesta 21innata está dada por los Receptores de reconocimiento de patrones (PRR por sus siglas en ingles) los cuales reconocen patrones moleculares asociados a antígenos (PAMPs por sus siglas en ingles). Los PAMPS se dividen principalmente en: Receptores tipo toll (TLRs por sus siglas en ingles), lecitinas tipo C, receptores fagociticos y NLR (Ciraci et al. 2012, Vanden Driessche et al. 2013, Kleinnijenhuis et al. 2011). La activación de las células del sistema inmune innato a través de estos receptores dispara cascadas de señalización, que resultan en la producción de citocinas proinflamatorias, proteínas antibacterianas y la presentación de antígenos (Yuk et al. 2014, Brightbill et al. 1999), esto por medio de la activación de factores de transcripción de gran importancia como NF- $\kappa$ B, los factores de regulación de interferón (IRFs por sus siglas en ingles) y la proteína activadoras 1 (AP-1), relacionados con la expresión de genes de defensa contra distintos patógenos(Liu et al. 2013).

Los TLRs se expresan principalmente en la superficie de la membrana celular de células dentríticas y macrófagos (Kleinnijenhuis et al. 2011). Cabe resaltar que la activación de TLRs y NLRs es crítica en la producción de TNF, interleucina 1 y 12 (Vanden Driessche et al. 2013).

Como se menciona antes, las primeras células en entrar en contacto con el bacilo son los macrófagos alveolares, los cuales presentan poca eficacia para eliminar al bacilo y una muy pobre capacidad de presentar antígenos (Kleinnijenhuis et al. 2011, Lyons et al. 1986, Blumenthal et al.2001). Sin embargo su función de captura y arresto del bacilo es fundamental para desencadenar las reacciones del sistema inmune innato y adaptativo (Hayakawa et al. 2007, Perskyist et al. 2002).

Los macrófagos eliminan a la micobacteria a través de distintos mecanismos, tales como la producción de especies reactivas de oxígeno, acidificación del fagosoma o por unión del fagosoma con el lisosoma (Kleinnijenhuis et al. 2011). Pero en algunos casos el bacilo es capaz de evadir la eliminación por estos métodos, bloqueando la maduración del fagolisosoma o neutralizando las cargas de los radicales libres de oxígeno y nitrógeno (Hayakawa et al. 2007, Perskyist et al. 2002 ). El falló de estos mecanismos provoca entre otras cosas la autofagia, que es un proceso intracelular utilizado para mantener la homeostasis en condiciones de estrés, hambruna o estrés infeccioso y que consiste en que la célula forme un autofagosoma de doble membrana que envuelva todos los organelos de la célula y al patógeno, degradándolos a ambos (Seddon et al. 2012, Vanden Driessche et al. 2013 ,Yuk et al. 2014, Kuma et al. 2004). Este paso es muy importante para la activación de la respuesta inmune adaptativa, ya que las células dentríticas captan estos antígenos y se los presentan a los linfocitos T para activar la respuesta celular (Kleinnijenhuis et al. 2011).

Los neutrófilos cumplen dos funciones fundamentales durante la infección por *M. tuberculosis*. La primera es fagocitar al bacilo inmediatamente después de escapar del macrófago alveolar y la segunda promover la respuesta por parte de los linfocitos T al favorecer la toma de antígenos por parte de las células dentríticas (Vanden Driessche et al. 2013, Blomgran et al. 2012).

Las células dentríticas constituyen la tercer mayor población fagocítica en pulmón que fagocita al bacilo, estas están presentes en mayor cantidad durante la segunda semana de infección y en humanos se han encontrado grandes cantidades de estas formando parte de los granulomas (Uehira et al. 2002). Son productoras de IL-1 e IL-12, citocinas vitales para combatir la infección, la primera promueve la activación de macrófagos ( para la producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno) mientras que la segunda estimula la producción de INF $\gamma$  por parte de los linfocitos T y NK (Kleinnijenhuis et al. 2011, Vanden Driessche et al. 2013, Mayer-Barber et al. 2011) .

La función de los linfocitos NK es la lisis de células infectadas, también son responsables de la producción de defensinas e INF $\gamma$  necesaria para la activación de los macrófagos (Vanden Driessche et al. 2013, Palomino et al. 2007).

La producción de TNF por parte de los macrófagos y células dendríticas es de vital importancia para el control de la infección, ya que promueve producción del granuloma y el reclutamiento de células para la formación del mismo (van Crevel et al. 2002, Vanden Driessche et al. 2013).

La activación y regulación de estas células está dada por un complejo proceso de regulación que se media por una red de citocinas pro inflamatorias, que se asocian con un buen pronóstico de la enfermedad (Van Crevel et al. 2002).

La principal citocina pro inflamatoria y promotora de un perfil Th1 es el interferón gama (INF $\gamma$ ). Esta citocina es capaz de inducir la actividad fagocítica de los macrófagos y atraer otras estirpes fagocíticas. También aumenta la producción de iNOs en el macrófago (Van Crevel et al. 2002).

### **5.6.2. Granulomas**

Los granulomas son estructuras características de la respuesta inmune hacia la *M. tuberculosis*. Estos son estructuras dinámicas bien organizadas que consisten en agregados celulares compactos, principalmente constituidos por macrófagos no infectados e infectados, células polimorfonucleares, fibroblastos y que cuentan con un anillo de linfocitos en la capa externa. Su función es contener la infección de tuberculosis concentrando la respuesta inmune en un área delimitada.

La producción de los granulomas se da durante las primeras semanas de la infección. En el interior de estos se genera un ambiente de hipoxia, cuyo objetivo es ayudar a eliminar a la bacteria, pero este provoca necrosis celular llevando al colapso del granuloma permitiendo la liberación de los bacilos. (Guirado et al. 2013).

### **5.6.3. Respuesta inmune adaptativa ante la infección por *M. tuberculosis*.**

La respuesta inmune adaptativa, ofrece reconocimiento específico de diversas moléculas y la propiedad de recordar las exposiciones repetidas a un microorganismo; es necesario, a diferencia que en la inmunidad innata la presencia de un antígeno específico. Son potentes respuestas inmunes adquiridas

a través de la experiencia. Sus principales componentes son los linfocitos y sus productos de secreción.

La producción de citocinas proinflamatorias es un paso crítico para una respuesta inmune eficiente. Todos los miembros de la familia de la citocina IL-1 no solo son responsables de la activación de macrófagos y neutrófilos, sino que también en el mantenimiento y activación de linfocitos CD4 (Ciraci et al. 2012).

Los linfocitos T CD4 son una pieza clave de la inmunidad adaptativa para el control de la infección de *M.tuberculosis*. Las citocinas claves producidas por estos linfocitos en un perfil Th1 protector son INF $\gamma$  y TNF $\alpha$  . Y las citocinas generadas por las células Th2 incluyen IL-4 e IL-13, asociadas con una respuesta poco protectora (Van Crevel et al. 2002, Hernández et al. 1997, Vanden Driessche et al. 2013). Los linfocitos presentes en medios ricos en IL-18 o IL-33, pueden llevar a que estos resulten en un perfil Th1 o Th2 respectivamente (Ciraci et al. 2012) Fig. [2].

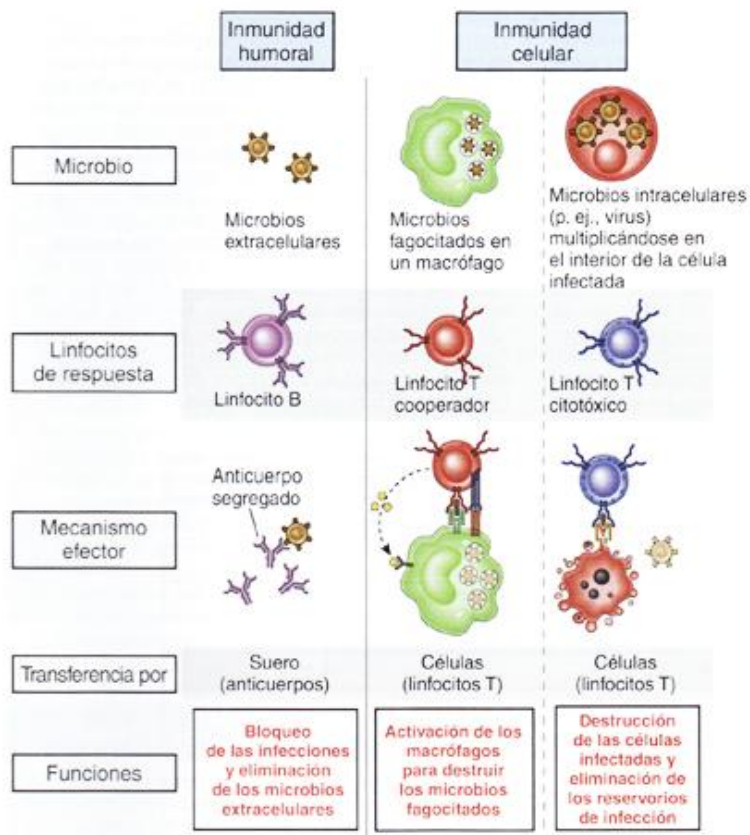


Figura. [2]. **Tipos de linfocitos.** Inmunidad celular y humoral. (Abbas A.K. 2009).

La presencia de linfocitos T CD4 es importante para la inducción óptima de linfocitos T CD8, los linfocitos T CD8 son activados por las células dendríticas pero sin la presencia de los linfocitos T CD4, estos pierden su actividad con el paso del tiempo (Vanden Driessche et al. 2013). Los linfocitos T CD8 tienen la función de eliminar a las células infectadas con el bacilo y aunque su función es muy similar a la de los linfocitos NK sus receptores son diferentes; la citólisis la llevan por medio de perforinas, lisando al macrófago y destruyendo al bacilo, también son importantes productores de INF $\gamma$  (Vanden Driessche et al. 2013).

### **5.7. *M. tuberculosis*, estructura de la pared celular y respuesta del sistema inmune.**

Las micobacterias han evolucionado con adaptaciones específicas para permitirle infectar y sobrevivir dentro de las células del huésped y estas modificaciones están asociadas al desarrollo de una pared celular única (Chatterjee et al. 1997). El lento crecimiento del bacilo está asociado con esta gruesa e hidrofóbica pared celular, al igual que la resistencia a diferentes tipos de estrés y a ciertos antibióticos (Barry et al. 2001). Esta pared celular está compuesta de una gran variedad de componentes hidrofóbicos, los cuales están divididos en dos grandes grupos: Los Ácidos micólicos, Arabinogalactano (AG) y Peptidoglicano, que constituyen el 50% del peso de la pared celular ya que forman una gruesa capa en la parte exterior de esta. Mientras que la otra familia está compuesta por fosfatidil - inositol manosido (PIM), Lipomanana (LM) y Lipoarabinomanana (LAM) (Mishra et al. 2011, Barry et al. 2001, Riley et al. 2006). Fig. [3].

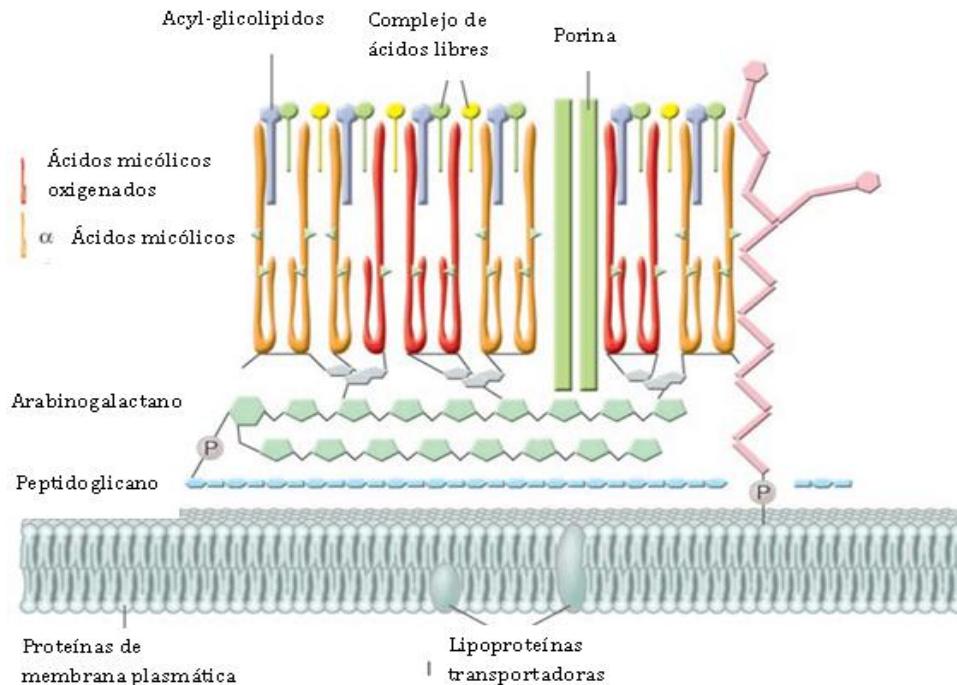


Figura. [3]. **Representación esquemática de la pared celular de la *M.tuberculosis*.** Los lípidos más abundantes son los ácidos micólicos que están unidos de manera covalente a la capa de arabinogalactano ( Lee et al. 2006).

Los Tiocesterol dimicoceratos (DIM) o ácidos micólicos forman una parte fundamental de la pared celular de la micobacteria y son parte fundamental de la patogenia de la bacteria, la mayoría están codificadas en una región llamada locus DIM+PGL, entre estos genes están codificados 4 genes para proteínas FadD ( FadD 22,23,24,26 y 29) (Simeone et al. 2010).

Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga (35 C) unidos a una Trehalosa y dos ácidos micosericos, y forman parte del complejo de lípidos del núcleo de la pared celular (Simeone et al. 2010).Fig.[4].



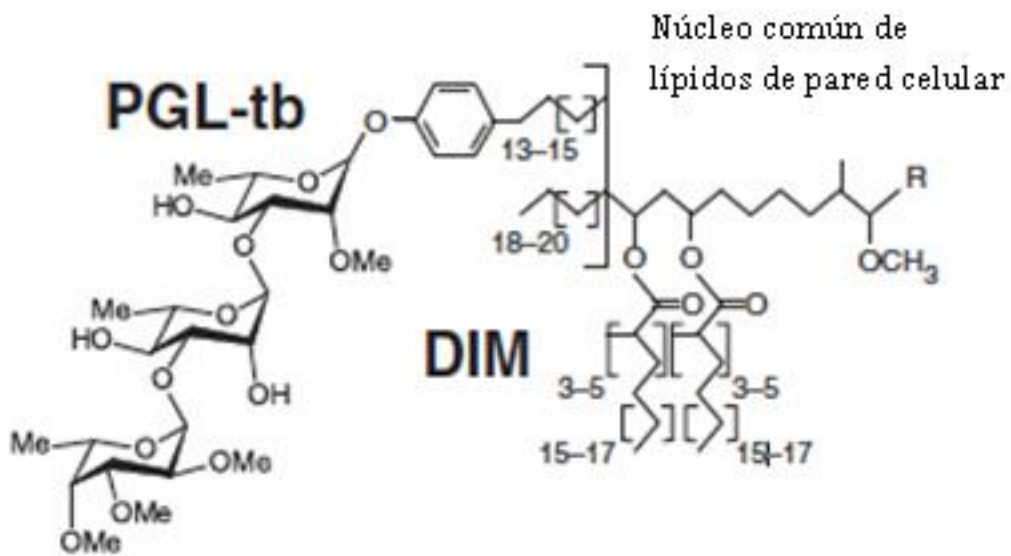


Figura. [4]. **Representación del núcleo de la pared celular.** donde se ejemplifica la forma del núcleo y la ubicación de los DIM.

El gen FadD26 codifica para una acil – coA sintasa. Relacionada con la elongación de ácidos grasos para formar tiocerol dimicoceratos (DIM). Ayuda a formar el tiocerol a partir de ácidos grasos (Infante et al. 2005, Simeone et al. 2010)

### 5.8. Regulación metabólica.

La infección y los mecanismos de adaptación de la *M.tuberculosis* son debido a una compleja regulación genética (Rodrigue et al. 2006, Manganelli et al. 2004). El inicio de la transcripción es la principal manera de regulación de la expresión de genes en procariontes (Rodrigue et al. 2006, Manganelli et al. 2004). La bacteria durante la infección está expuesta a agentes oxidantes presentes (derivados reactivos de oxígeno y nitrógeno) en el fagosoma del macrófago y el pH del mismo. También se enfrentan a péptidos y proteínas tóxicas liberadas por macrófagos y células NK. Además el bacilo debe enfrentar hipoxia dentro del granuloma y dentro del macrófago. Por último, la muerte por falta de nutrientes esenciales para el crecimiento del bacilo en el macrófago, ya que al estar en el interior de la célula fagocítica los nutrientes y elementos esenciales para su crecimiento están muy

limitados (Vergne et al. 2003, Gold et al. 2001). Por tanto el bacilo debe tener una transcripción muy específica para poder sobrevivir y llevar a cabo la infección con éxito.

El genoma de *M. tuberculosis* codifica para cerca de 190 reguladores transcripcionales: 13 factores sigma, 11 sistemas de 2 componentes, 11 proteincinasas y más de 140 posibles reguladores transcripcionales (Cole et al. 1998). Los sistemas de dos componentes son pares de proteínas (con actividad de fosforilasas, capaces de autofosforilarse) que tienen la capacidad de dirigir el perfil de expresión de proteínas durante estados de estrés, activándose por medio de los factores sigma o activándose a sí mismos (Pang et al. 2011). Los factores sigma se han visto con una alta expresión durante distintos tipos de estrés, mostrando un importante papel en la regulación del perfil transcripcional del bacilo (Rodrigue et al. 2006, Manganelli et al. 2001, Manganelli et al. 2004, Norvin et al. 1999, Dona et al. 2008).

### **5.8.1 Factores sigma.**

La transcripción del DNA se da por medio de la RNAPolimerasa, formada por 4 subunidades  $\beta, \beta', \omega$  y un dímero de  $\alpha$ . Los factores sigma son factores de transcripción que funcionan como una quinta unidad cuya función es acoplarse a la RNAPolimerasa y aumentar su afinidad a el DNA y ayuda al reconocimiento de determinados promotores ( Manganelli et al. 2004).

Los factores sigma pueden ser divididos principalmente en 2 grupos,  $\sigma_{54}$  y  $\sigma_{70}$ , identificados en *E.coli* por centrifugación diferencial (Wösten et al. 1998, Boeve et al. 1998). Los factores  $\sigma_{54}$  son muy raros y no están presentes en ninguna micobacteria. Mientras que los factores  $\sigma_{70}$  están presentes en muchas bacterias Gram negativas, estos están presentes en mayor o menor medida en todas las micobacterias (Manganelli et al. 2004).

Todos los factores sigma cuentan con cuatro regiones conservadas que tienen como función unirse a la RNAPolimerasa (Manganelli et al. 2004, Rodrigue et al. 2006). Los factores  $\sigma_{70}$  se pueden clasificar en 3 grupos dependiendo de su función: el grupo 1 son aquellos factores sigma primarios, presentes durante las etapas de

crecimiento exponencial de la bacteria. El grupo 2 consiste en los factores sigma no esenciales primarios (nonessential primary factor like sigma factor), cuya presencia no es esencial para el crecimiento de la bacteria, tienen un gran parentesco estructural con los del grupo 1 y su actividad puede ser muy variable, como la utilización de carbono y nitrógeno o la resistencia a antibióticos (Wösten et al. 1998, Manganelli et al. 2004). Los del grupo 3 son los factores sigma alternativos, es el grupo más heterogéneo y puede dividirse en varios subgrupos, siendo el más importante el subgrupo de los factores extracitoplasmáticos (ECF) (Manganelli et al. 2001, Manganelli et al. 2004). En este subgrupo están presentes los factores responsables de la respuesta a estrés ambiental. Estos se activan por la presencia de múltiples señales como proteínas desnaturalizadas, presencia de luz, cambios en la osmolaridad, presencia de toxinas ( Wösten et al. 1998, Manganelli et al. 2004). Los factores sigma que están presentes las micobacterias son  $\sigma^C$  ,  $\sigma^D$  ,  $\sigma^E$  ,  $\sigma^G$  ,  $\sigma^H$  ,  $\sigma^I$  ,  $\sigma^J$  ,  $\sigma^K$  ,  $\sigma^L$  y  $\sigma^M$  ( Manganelli et al. 2004, Rodrigue et al. 2006).

El genoma de la *M.tuberculosis* codifica para 13 factores sigma, 10 de los cuales pertenecen al grupo de los ECF (“Extra Cytoplasmic Function”) (Hernández P 2010, Browning et al. 2004, Manganelli et al. 2004). Muchos de los factores sigma que se expresan en la *M.tuberculosis* se expresan en muchas otras de las micobacterias, algunas cepas tienen en su genoma las secuencias para codificar determinados factores sigma, pero no siempre los expresan o expresan formas no funcionales (Manganelli et al. 2004, Rodrigue et al. 2006). El factor sigA se expresa de manera constante durante la fase de crecimiento logarítmico del bacilo, mientras que algunos otros factores sigma aumentan su expresión cuando la bacteria está en condiciones de estrés, por ejemplo sigE y sigB incrementan sus niveles cuando la bacteria está expuesta a SDS (duodecil sulfato de sodio) o el incremento de sigE y sigH durante condiciones de choque térmico (Rodrigue et al. 2006, Dutta et al. 2012, Fontan et al. 2009).

A pesar de que los niveles de mRNA de los factores sigma se incrementan principalmente durante situaciones de estrés, los factores sigma son regulados por proteínas específicas para cada factor sigma. Mientras éstas estén unidas a los factores sigma los inactivan por arresto, debido a que se unen de manera específica

a su sitio activo inhibiendo su actividad; por ello estas proteínas son denominadas “anti sigma” y en algunos casos existen proteínas que regulan a las anti-sigma, siendo denominadas “anti-anti-sigma” (caso observado únicamente en  $\sigma^F$ ) (Rodrigue et al. 2006, Manganelli et al. 2004, Hughes et al. 1998).Fig. [5].

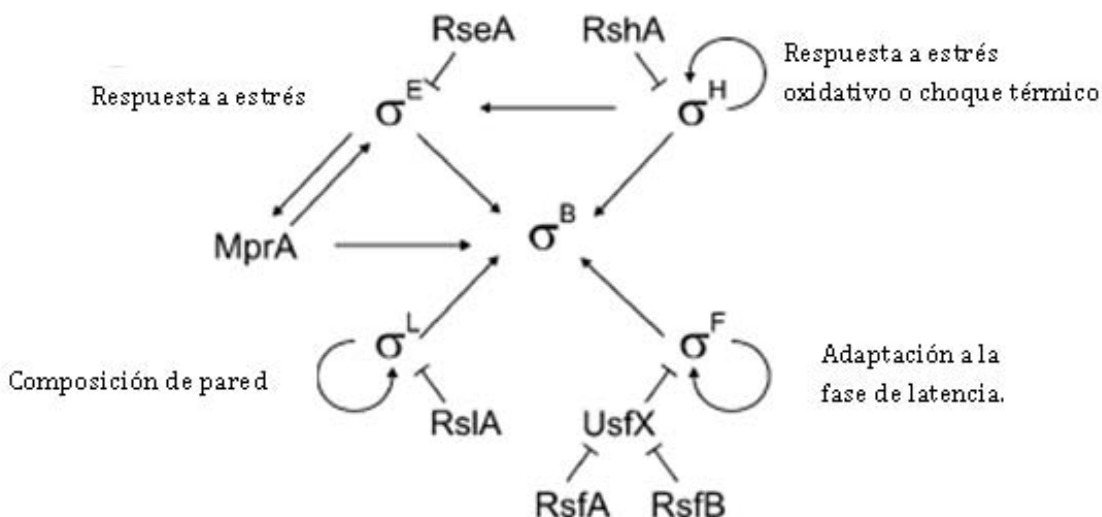


Figura. [5]. **Correlación entre la actividad de factores sigma.** Los factores sigma son regulados de manera específica por las proteínas antisigma ( RseA, RshA, RslA, UsfX); cuando hay condiciones de estrés, las proteínas anti-sigma liberan a los factores sigma. Muchos de los factores sigma tienen autorregulación y son capaces de regular otros factores sigma (Rodrigue et al. 2006). RsfA y RsfB son Anti-anti  $\sigma^F$ , ya que regulan la unión de UsfX a  $\sigma^F$  (Rodrigue et al. 2006).

## SigB

Sigma B es el único miembro del grupo 2 presente en la *M.tuberculosis*. Se ha observado que es indispensable para el crecimiento de la misma (Mukherjee et al. 2005). Las mutantes “knockout” sigB de *M.tuberculosis* tienen una mayor susceptibilidad a diferentes tipos de estrés como el choque térmico y el tratamiento con SDS. La expresión de sigB es completamente dependiente de sigE. Se ha visto que en estrés por choque térmico también es regulada su expresión por sigH ( Rodrigue et al. 2006, Manganelli et al. 2002).

## **SigH**

El gen que codifica para sigH se induce después del choque térmico ( Manganelli et al. 2002). Los genes regulados por sigH incluyen su propio gen estructural, sigE y sigB, proteínas reparadoras de DNA, proteínas de respuesta estrés, proteínas chaperonas (Manganelli et al. 2002).

### **5.8.2. SigE**

El factor sigE está asociado a la resistencia de la bacteria a estrés oxidativo. Este regula la expresión de enzimas asociadas a la degradación y síntesis de lípidos de membrana, principalmente ácidos micólicos. Fig. [6] Fig. [7]. También se ha observado una actividad de regulación de expresión de proteínas de choque térmico (como Htpx y Dnak) (Norvin D. 1999). También se ha descrito la actividad regulatoria en la expresión de genes asociados a la detoxificación de la célula en tratamientos por antibióticos (como los factores de transcripción fadE23 y fadE24) (Ramaswamy et al. 2002).

Cepas mutantes que no expresan este factor de transcripción, son muy susceptibles a la acción de agentes estresantes como detergentes (SDS) o antibióticos (vancomicina) y muestran gran daño en la membrana y ruptura de la misma al ser fagocitada por macrófagos o Células dendríticas, lo cual demuestra que la actividad de sigE es indispensable para controlar la estabilidad de la membrana de la bacteria y la composición de la misma durante la exposición a agentes estresantes.

Al utilizar estas mutantes para infectar ratones BALB/c se observó atenuación significativa del bacilo y mayor producción de TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  e iNOs, acompañados de bajos niveles de IL-4, lo que corresponde a un patrón de respuesta inmune pro-inflamatoria la cuál es protectora y ayuda al control del bacilo, por lo cual se utilizaron como vacuna en ratones BALB/c y demostraron conferir mejor protección y mayor atenuación que la vacuna BCG (Rodrigue et al. 2006).

# SigE

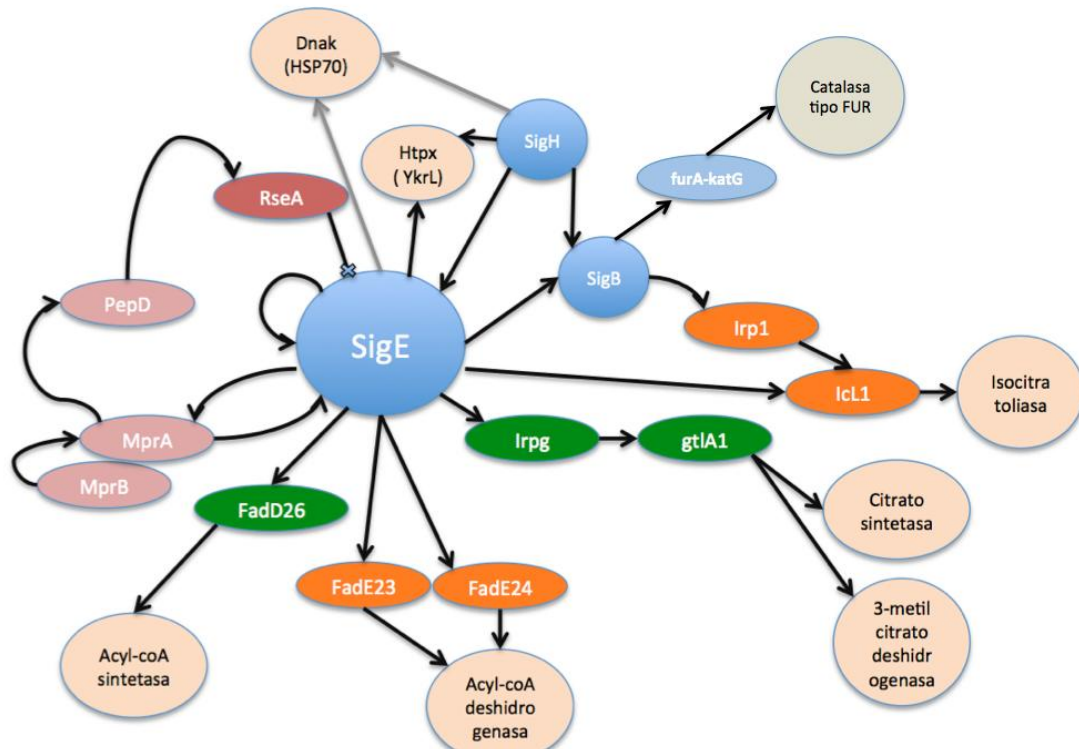


Figura. [6]. **Regulación de sigE / Papel metabólico sigE**. Factores de transcripción, proteínas y genes regulados por sigE durante diferentes condiciones de estrés. Presentando actividad en la regulación de la síntesis y eliminación de ácidos grasos, activación de otros factores de transcripción, eliminación y reparación de proteínas desnaturalizadas (Simeone R et al. 2006, Manganelli R et al. 2001 y 2002, Dona V et al. 2008, Dutta NK et al. 2012, Fernández et al. 1999, Fontan PA et al. 2009, Hughes KT et al. 1998, Mishra AK et al. 2011, White MJ et al. 2010 y 2011, Xiang Y et al. 2012).

SigE presenta gran importancia en el choque térmico, estrés de tipo RedOx o por antibióticos, síntesis de Ac. grasos. Fig. [6]. La presencia de radicales libres o un medio oxidante provoca la activación del sistema de regulación metabólico de dos componentes mprAB y de sigE, los cuales regulan la expresión de distintos factores de transcripción como sigB (Manganelli et al. 2001, Voskuil et al. 2011), que puede activar al factor de transcripción katG-furA para producir catalasas y eliminar así los radicales libres. MprA activa al factor de transcripción pepD que indirectamente disminuye los niveles de Rsea (antisigmaE) permitiendo el aumento en la expresión

de sigE (White et al. 2010). PepD también codifica para una proteasa que elimina proteínas de pared celular dañadas por el estrés oxidativo (White et al. 2010).Fig. [7].

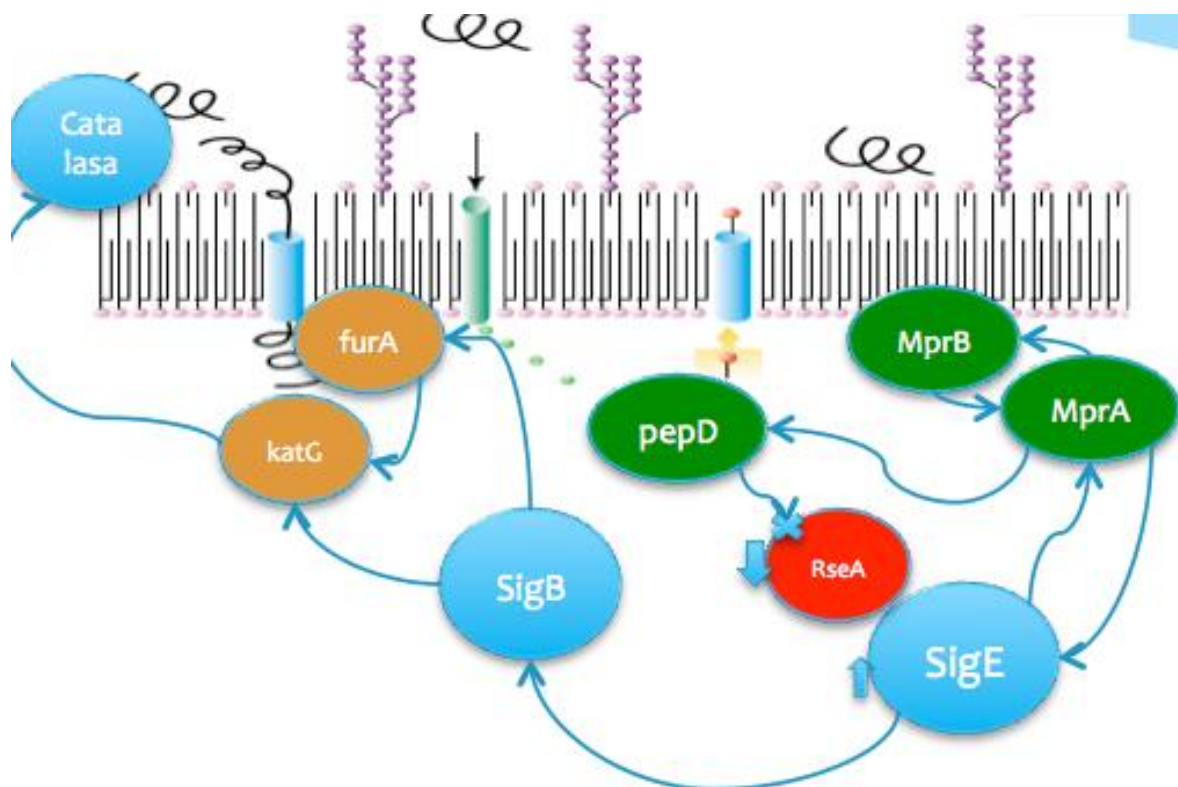


Figura. [7]. **Respuesta a estrés oxidativo mediada o con aportación de sigE.** Se representa la actividad de sigE durante un estrés producido por un medio oxidativo. Por un lado el factor  $\sigma^E$  activa a MprAB, factor de dos componentes que regula un perfil expresión de proteínas para regular el estrés oxidativo en la célula, a su vez incrementa la expresión de pepD que inactiva el anti  $\sigma^E$  (RseA); por otro lado  $\sigma^E$  activa a  $\sigma^B$  que activa la producción de catalasas para la eliminación de radicales libres (Simeone R et al. 2006, Manganelli R et al. 2001, Dona V et al. 2008, Fernández ND et al. 1999, Fontan PA et al. 2009, White MJ et al. 2010).

En presencia de radicales libres sigE puede activar a fadD23 y 24 para eliminar estos ácidos grasos dañados, también eliminan ácidos grasos acumulados dentro de la célula debido a la acción de antibióticos (Ramaswamy et al. 2003). La acumulación de proteínas desnaturalizadas por el choque térmico resultan tóxicas para la célula, por lo tanto la activación de sigH por sigE para producir proteínas chaperonas o con actividad de proteasas es fundamental para recuperar la

estructura cuaternaria de la proteína o hidrolizarlas (Xiang et al. 2012, Norvin et al. 1999). Fig. [7].

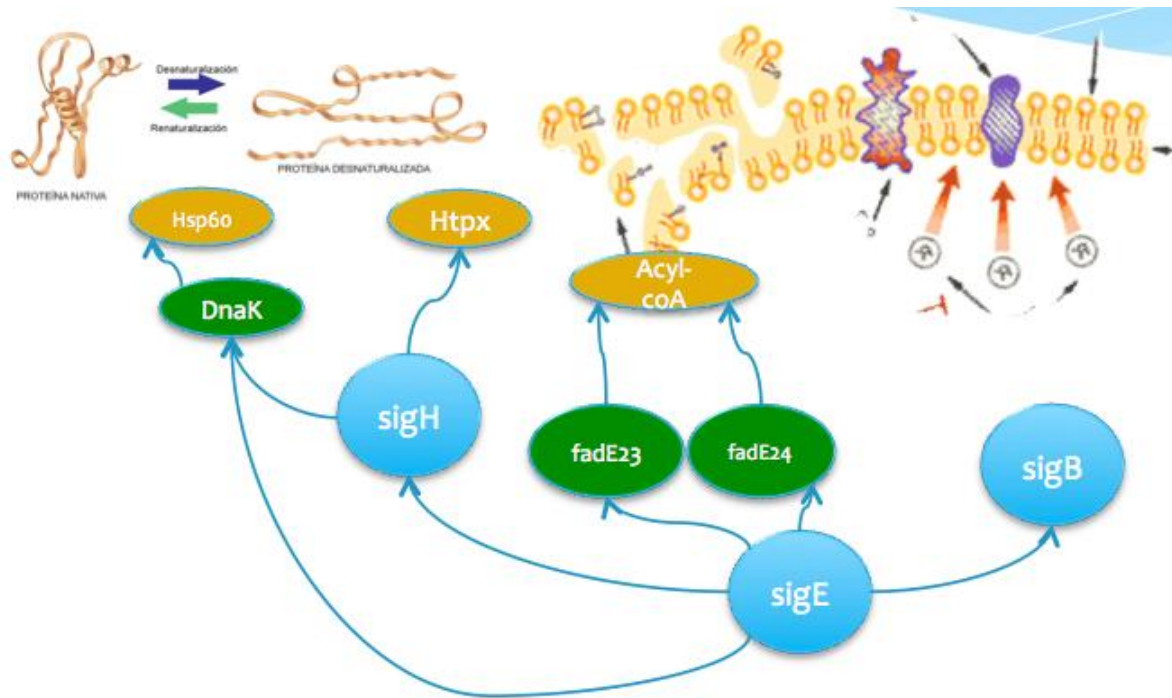


Figura. [8]. **Regulación de sigE de factores asociados al metabolismo de ácidos grasos en choque térmico y estrés oxidativo.** Respuesta a daño en los ácidos grasos de membrana y proteínas, desnaturalizados o dañados por estrés oxidativo y choque térmico. La activación de  $\sigma^E$  Puede activar fadE23 y 24 para producir una Acyl-coA que sintetizara nuevos ácidos grasos para reparar el daño en membrana; mientras que la activación de  $\sigma^H$  promoverá la producción de proteínas chaperonas para reparar las proteínas dañadas durante el choque térmico (Manganelli R et al. 2001 y 2002, Simeone R et al. 2006, Fernández ND et al. 1999, Mishra AK et al. 2011).

SigE tiene una actividad tanto de eliminación de ácidos grasos como de síntesis, regulando directamente genes relacionados con proteínas que son parte del ciclo del propano o en la producción de ácidos micólicos (Datta et al. 2011, Manganelli et al. 2004, Voskuil et al. 2011). Fig. [8] y [9].



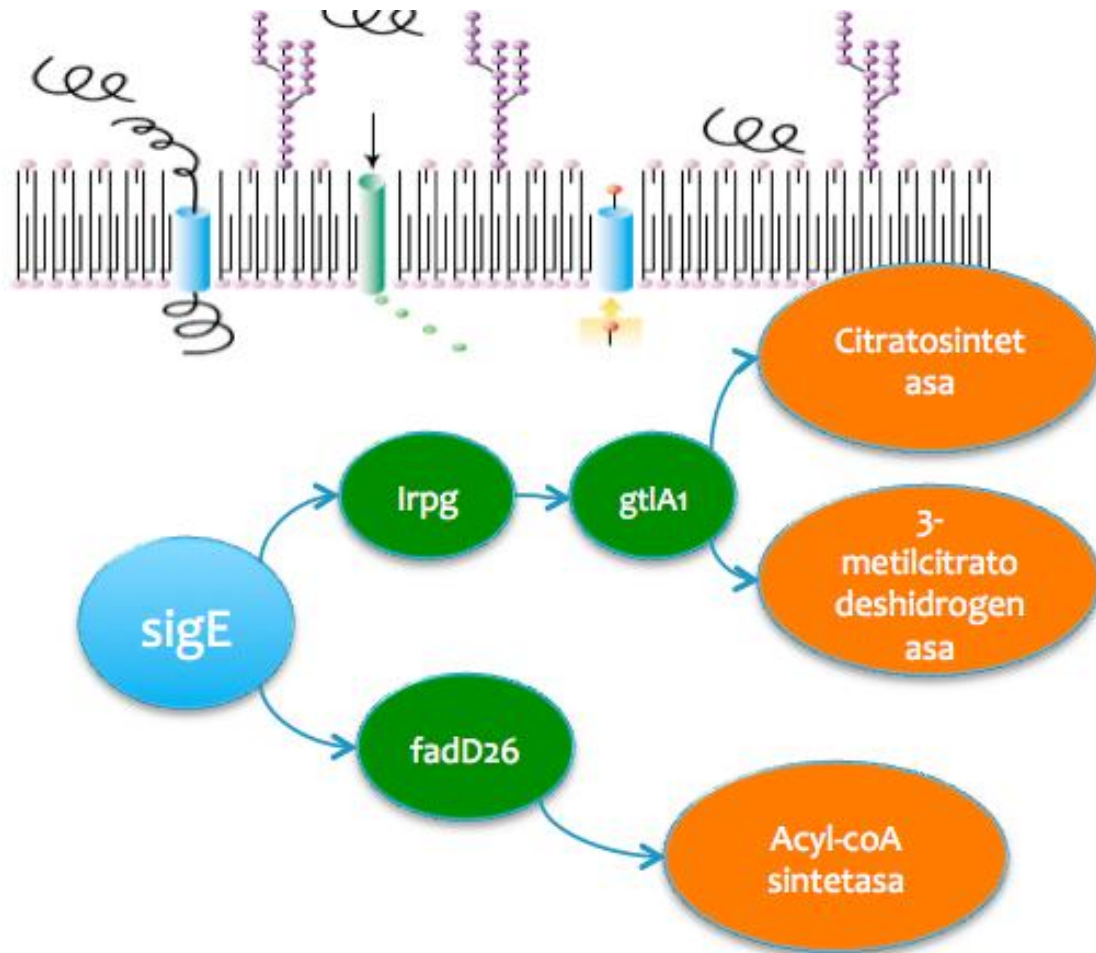


Figura. [9]. **Genes regulados por  $\sigma^E$  involucrados en la síntesis de ácidos grasos de pared celular.**  $\sigma^E$  promueve la producción de *gtlA1* responsable de la síntesis de dos enzimas indispensables en el ciclo de propano, responsable de la síntesis \*\*\*; también al activar *fadD26* promueve la elongación de ácidos grasos para la síntesis de ácidos micólicos para la reparación de la pared celular (Simeone R et al. 2006, Manganelli R et al. 2001 y 2002, Fernández ND 1999, White MJ et al. 2011, Xiang Y et al. 2012)

### **5.9. Modelo murino.**

El modelo murino de tuberculosis pulmonar (Hernández P 1996), consiste en infectar ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad con una dosis alta de bacilos ( $2.5 \times 10^3$  UFCs) para inducir la infección. El modelo se caracteriza por 2 fases, la fase aguda o temprana, durante el primer mes de infección, caracterizada por una producción de citocinas de una respuesta Th1, en la cual se observa alta producción de INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  e NOS, con infiltrado celular en pulmón y la aparición de granulomas, esto aproximadamente durante la 2<sup>o</sup> semana de infección (Hernández P 1996, 1997, Guirado et al. 2013). La segunda fase, conocida como etapa avanzada o progresiva, se caracteriza por una gran carga bacilar y una respuesta Th2, con alta producción de citocinas como interleucina 4, 5, 6, 10 (Schroder et al. 2004).

### **5.10. Antecedentes.**

Previamente se han diseñado vacunas a partir de bacterias vivas atenuadas; las más importantes para mi trabajo son aquellas con mutaciones en el gen sigE y el gen fadD26.

La bacteria mutante  $\Delta$ sigE diseñada por el grupo del Dr. Ricardo Manganelli presentó una virulencia menor y una mejor protección que BCG; esta mutante fue generada a partir de una cepa H37Rv a la cual se le suprimió la expresión de sigE por medio de un vector "suicida" que codifica para sigE y su anti-sigma, Rsea (Manganelli et al. 2001). Esta bacteria mutada  $\Delta$ sigE presentó una pobre capacidad a sobrevivir en medios hostiles y se le realizaron pruebas de estrés utilizando peróxidos y superóxidos. También demostró tener una pobre capacidad de supervivencia dentro de los macrófagos, tanto de humanos como de ratones. Para confirmar su capacidad inmunogénica se infectaron ratones por vía intratrqueal y se realizó la cuantificación de citocinas, la bacteria mutada presentó altos niveles de citocinas proinflamatorias. Por estas razones se consideró como un candidato a vacuna. Posteriormente el grupo del Dr. Hernández P en colaboración el grupo del

Dr. R. Manganeli, probaron la eficiencia de ésta como candidato a vacuna al someter a reto animales inmunizados con la bacteria única mutante  $\Delta\sigma^E$  y la infección se hizo con una cepa hipervirulenta (Hernández P 2010). Este estudio demostró que la bacteria mutante  $\Delta\sigma^E$  ofrece una mayor protección que la vacuna estándar BCG, al presentar niveles más bajos de carga bacilar en pulmón y una menor área dañada por neumonía en comparación con BCG.

Por otro lado, en un estudio realizado por el grupo del Dr. E. Infante en colaboración con el grupo del Dr. Hernández se creó una mutante del gen *fadD26* utilizando un aislado clínico Mt103, probando que esta cepa era menos virulenta que su cepa parental y que podía conferir una protección mayor a la conferida por la vacuna BCG en un experimento de protección en un modelo murino, donde retaban a los animales con una cepa hipervirulenta Beijing (Infante et al. 2005). Los ratones del grupo vacunado con la mutante de *fadD26* tenían menor carga bacilar en pulmón y una menor área afectada por neumonía.

### **5.11. Justificaciones.**

El comité de vacunas europeo exige que para el registro de nuevos candidatos a vacunas de bacterias vivas atenuadas, las cepas tengan al menos 2 mutaciones. Ya que las mutantes de  $\sigma^E$  y *fadD26* han mostrado una virulencia menor a BCGph y una protección mayor que esta, son buenos candidatos a vacunas. Por estas razones se decidió diseñar una cepa de H37Rv mutante de  $\Delta\sigma^E\Delta fadD26$ , ya que se espera que está tenga una mayor atenuación que BCGph y las bacterias con una sola mutación. Se espera que presente una mejor protección que la vacuna estándar BCGph. Es muy importante diseñar una vacuna más eficiente que BCGph ya que está tiene una eficacia muy variable como se ha mencionado antes de alrededor de 0% a 80% de eficacia en proteger de la infección a adultos.

Esta nueva vacuna debe ser inocua para su uso en niños y personas inmunocomprometidas, puesto que son los individuos más propensos a contraer la infección. Por esta razón es indispensable trabajar en un modelo murino de

animales inmunosuprimidos, para asegurar la atenuación de la bacteria doble mutante  $\Delta\sigma^E \Delta fadD26$ .

## 6. Hipótesis.

Si la cepa H37Rv a la cual se le deleteo el gen sigE presento mejor protección que BCGph, al igual que el aislado clínico *M. tuberculosis* MT103 con la deleción del gen fadD26, entonces se espera que la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv doble mutante  $\Delta\sigma^E \Delta fadD26$  presente una mejor protección y una mayor atenuación que la vacuna estándar BCG en el modelo de ratón.

## 7. Objetivo.

Evaluar la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv con los genes de fadD26 y  $\sigma^E$  deletados para conocer su atenuación y evaluar si confiere protección contra una infección utilizando una cepa hipóvirulenta.

### 7.1. Objetivos específicos.

1. Determinar el nivel de virulencia de la bacteria H37Rv  $\Delta\sigma^E \Delta fadD26$ .
2. Estudiar el nivel de protección conferido por la bacteria doble mutante bacteria H37Rv  $\Delta\sigma^E \Delta fadD26$  en un modelo de ratón BALB/c retados con dos cepas hipóvirulentas.

## 8. Materiales y métodos.

### 8.1. Cepas utilizadas para la inmunización:

Las bacterias mutante  $\Delta\sigma^E$  y doble mutante  $\Delta\sigma^E \Delta fadD26$  fueron donadas por el grupo del Dr. Ricardo Manganelli.

### 8.2. Cepas para reto:

Para los distintos retos que se realizaron a animales inmunizados y sin inmunizar se utilizó la cepa estándar H37Rv, las cepas hipóvirulentas 5186 (cepa miembro de la

familia LAM, aislado clínico de Orizaba México), la cepa hipóvirulenta 583 (cepa miembro de la familia Beijing, aislado clínico del Sudáfrica).

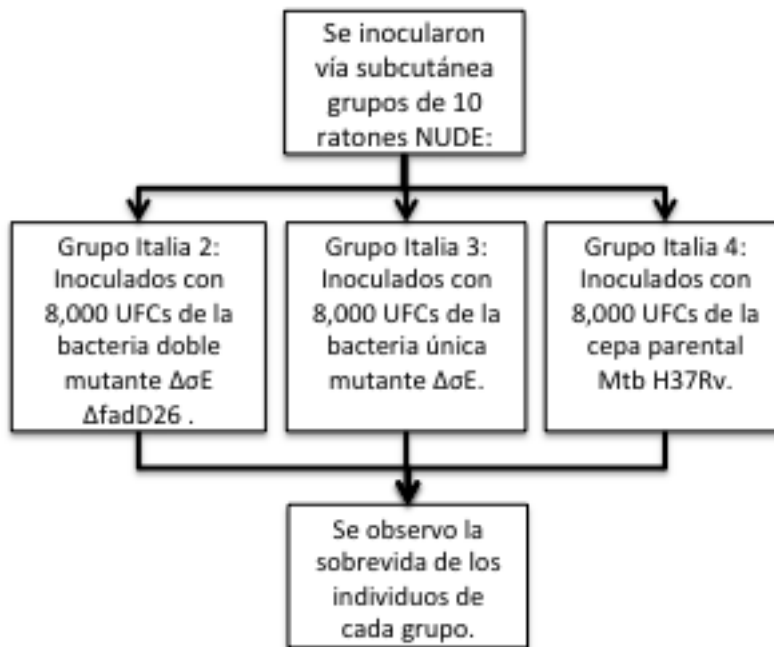
Para la prueba de virulencia también se utilizó la cepa mutante delta sigE (st28, mutante de H37Rv,  $\Delta\sigma E$ ).

### 8.3. Preparación de cepa e inóculos.

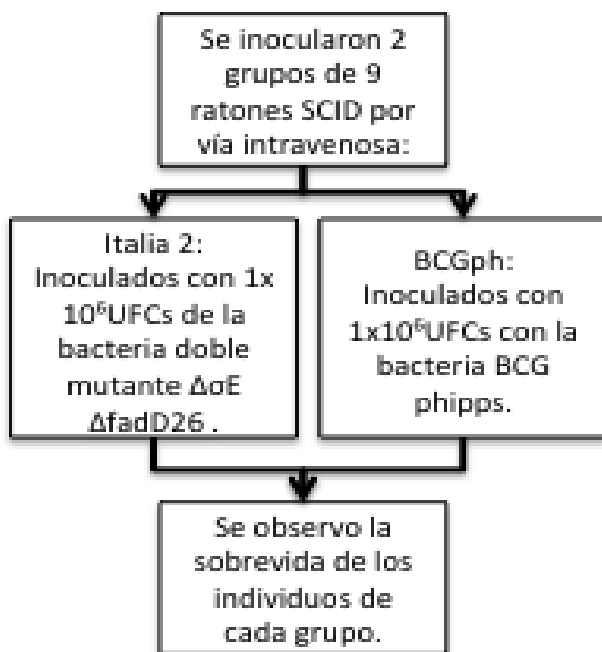
Las cepas doble mutante y única mutante se recibieron en agar sólido Middlebrock 7H10 congeladas. Después siguieron el procedimiento estándar para su crecimiento. Se dejan descongelar lentamente, se toma una asada de una colonia y se transfiere a agar líquido Middlebrock 7H9 enriquecido con ADC (Albumina, Dextrosa y Catalasa), se dejan en una incubadora a una temperatura de 37°C en constante agitación por aproximadamente 21 días, se cuantifica su densidad óptica en una espectrofotómetro registrando la densidad óptica, cuando la densidad óptica es de 600 nm, se utiliza esta medida como estándar para recuperarlas (fase de crecimiento bacteriano), se aíslan las bacterias. Se realiza siguiendo el protocolo del laboratorio, realizando centrifugaciones a 2,000rpm por 5 minutos utilizando perlas de cristal. Se recupera el sedimento y se reconstituye con agua o glicerol. De este concentrado se realizan aproximadamente 15 alícuotas y se congelan inmediatamente utilizando nitrógeno líquido y se guardan a -70°C, siendo almacenadas a esta misma temperatura en ultra congeladores hasta su uso (Hernández R et al. 2012).

#### 8.4. Diagramas de flujo de la metodología de las pruebas.

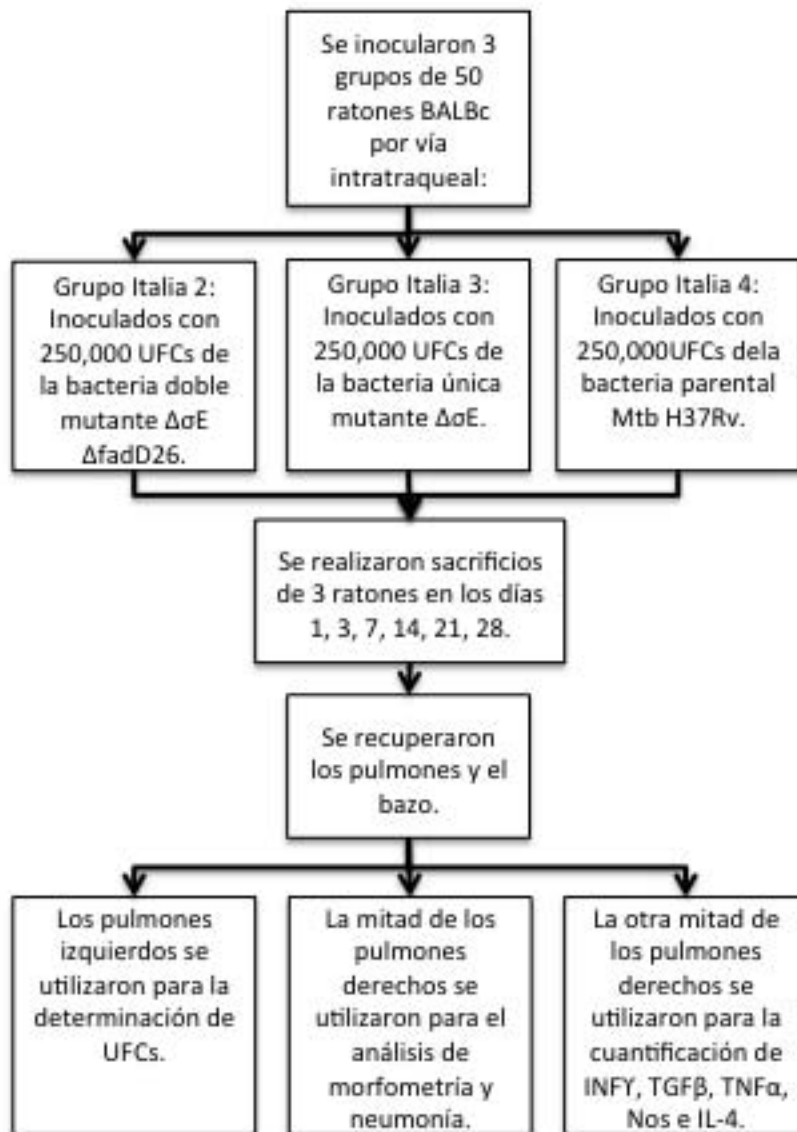
- Prueba de virulencia en ratones NUDE:



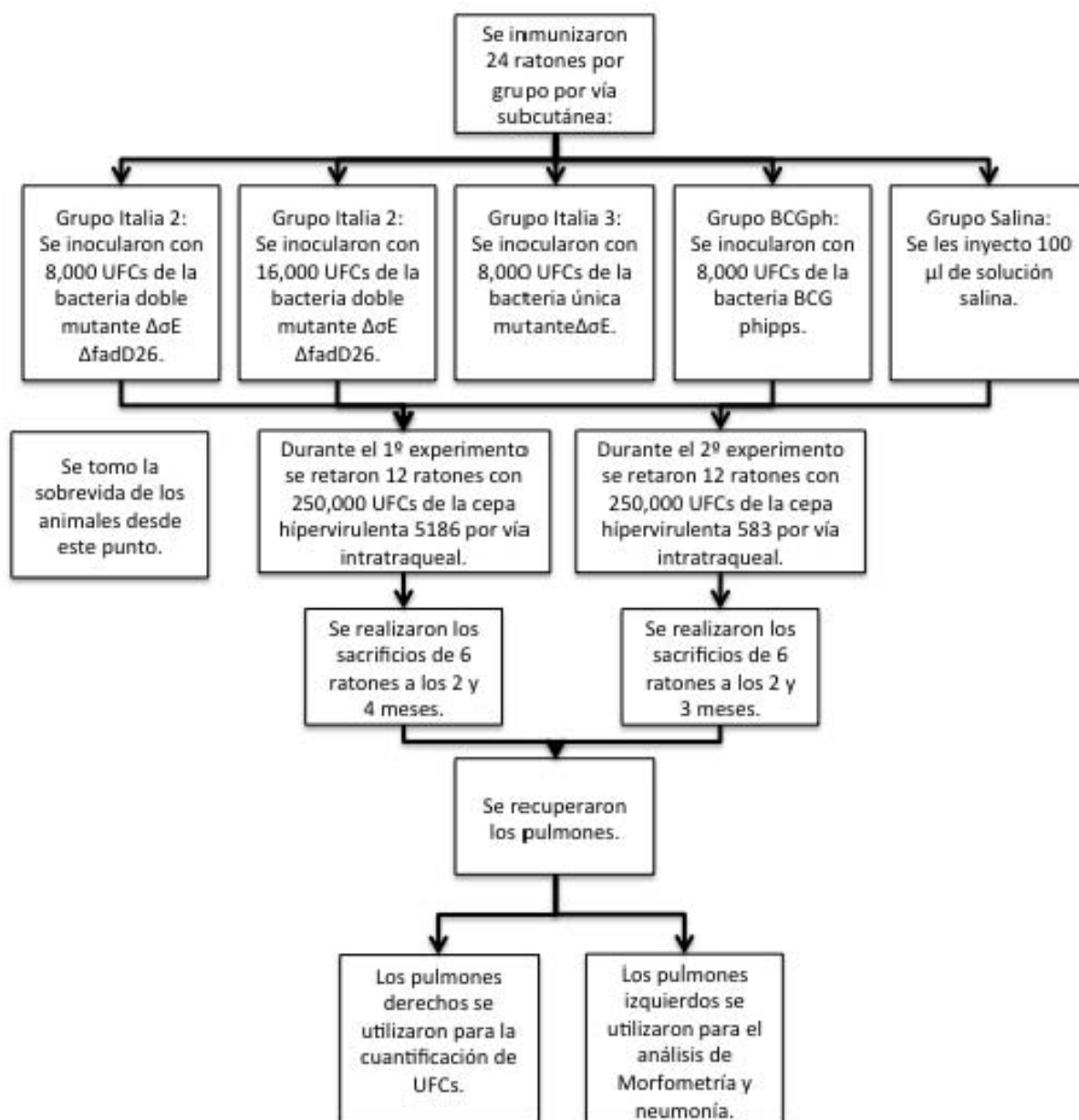
-Prueba de virulencia en ratones SCID:



-Prueba de virulencia en ratones BALBc:



-Prueba de protección en ratones BALBc:



### 8.5. Determinación de carga bacilar por UFCs.

Se recuperan los pulmones en cada tiempo de sacrificio (indicados en cada experimento). El pulmón derecho del ratón se utilizó para la prueba de



cuantificación de UFCs y el izquierdo para morfometría e histopatología. Los pulmones para cuantificación de UFCs son homogeneizados utilizando un politron (kinematica, Luzem) en criotubos estériles de 1ml con solución estéril PBS-tween al 0.05%. Se siembran 4 diluciones del homogeneizado en medio agar solido 7H10 Middlebrock enriquecido con OADC (Ácido Oleico, Albumina, Dextrosa y Catalasa, Becton Dickinson). Posteriormente se colocan en una incubadora a 37°C durante 21 días, utilizando un microscopio invertido se cuentan el número de colonias en los días 14 y 21 (Hernández R et al. 2010).

#### 8.6. Morfometría e histopatología.

Para realizar el análisis histopatológico, los pulmones recuperados deben ser perfundidos utilizando alcohol absoluto y guardados tubos falcón con alcohol absoluto, deberán permanecer así por 48 horas. Posterior a este tiempo los pulmones son divididos sagitalmente con una navaja a través del hilo pulmonar, estos se deshidratan pasando por alcohol y xylol a distintas concentraciones de pureza y embebidos en parafina para su posterior corte. Utilizando un micrótopo se realizan cortes de 4 micras de grosor que serán teñidos con hematoxilina-eosina. A continuación utilizando un analizador de imágenes (Leica Q500/w) y una computadora, se realizara la cuantificación del porcentaje de neumonía o necrosis (según el caso) que esté presente en el pulmón, considerando al menos la mitad de los pulmones recuperados por sacrificio, tomando como área neumónica las áreas consolidadas en el pulmón.

#### 8.7. Análisis de expresión de citocinas por qPCR ( PCR en tiempo real).

De tres ratones sacrificados por tiempo de sacrificio se utiliza el pulmón izquierdo para recuperar RNA, 3 ratones por tiempo. Se coloco 1ml de RPMI (gibco) adicionado con 0.5mg/ml de colagenasa (sigma) con el pulmón y se les dejo reposar de 1 hora a 90 minutos a 37°C. Después el pulmón fue macerado con ayuda de un embolo de jeringa y un filtro celular de 70 micras (BD bio). Las células recuperadas son centrifugadas a 3000 rpm (1620 gravedades) a 4°C. Se descarta

el sobrenadante y se adicionan 1.5 ml de buffer de lisis ( cloruro de amonio 0.34M y EDTA 0.12mM, pH 7.2) para romper las células rojas. Se continua con un lavado con 1ml de medio RPMI y se centrifuga bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Se vuelve a descartar el sobrenadante y se realiza la extracción del RNA conforme las especificaciones del kit Mini RNeasy (Qiagen). El ARN obtenido se cuantifico por espectrofotometría (A260/280) y se analizo su calidad mediante geles de agarosa. Se utilizaron 100ng de RNA para la producción de cDNA mediante una reacción de retro transcripción (RT-PCR) siguiendo las indicaciones del kit Omniscript (Qiagen). El producto obtenido se utilizo para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final para amplificar un gen constitutivo, en este caso el de la Deshidrogenasa Gliceraldehído 3-fosfato (GADPH), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos u extensión final a 72°C por 10 minutos (Hernández R et al. 2012).

Para la cuantificación por qPCR se utilizó el sistema de PCR-TR 7500 (Applied Biosystems), y el kit Quantitect SYBR Green Mastermix (Qiagen), incluyendo siempre en cada corrida una curva estándar, generada a partir de diluciones seriadas de productos de PCR cuantificados de cada una de las citocinas, así como un control negativo. Cebadores específicos (invitrogen) se diseñaron con el programa BLAST (Pubmed) para los blancos mostrados en la tabla 1. El número de copias de RNAm de cada citocina fue normalizado con un millón de copias de RNAm de RPLP y GADPH. La reacción se efectuó con un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 35 segundos para GADPH. Tab. [1].

Citocina	Parte 1 1 repetición	Parte 2	40 repeticiones		Parte 3
INF $\gamma$	95°C/10min	95°C/0:20s	60°C/0:20s	72°C/0:35s	Fase de disociación
TNF $\alpha$	95°C/10min	95°C/0:20s	60°C/0:20s	72°C/0:35s	95°C/0:15s

TGF $\beta$	95°C/10min	95°C/0:20s	60°C/0:20s	72°C/0:35s	60°C/ 1:00s 95°C/0:15s
iNOs	95°C/10min	95°C/0:20s	60°C/0:20s	72°C/0:35s	
IL-4	95°C/10min	95°C/0:20s	60°C/0:20s	72°C/0:35s	
RPLP	95°C/10min	95°C/0:20s	60°C/0:20s	72°C/0:35s	
GADPH	95°C/10min	95°C/0:20s	60°C/0:20s	72°C/0:35s	

Tab. [1]. **Condiciones para la realización de los qPCR para cuantificación de expresión de citocinas.**

### 8.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism versión 5.0. Para las curvas de supervivencia se utilizó la prueba de Log Rank y Kaplan-Meier. Entre cepas del mismo género, el análisis de varianza de medias del número de UFCs, porcentaje de necrosis y expresión de citocinas por PCR-TR e IHQ fue realizado mediante la prueba t de "Student". Las diferencias se consideraron significativas cuando \*  $p < 0.05$ .

### 8.9. Prueba de Virulencia en ratones "NUDE" o desnudos.

Se utilizaron 3 grupos de 10 ratones NUDE ( ratones deficientes del gen FoxN1). Cada grupo fue inoculado de manera subcutánea en la base de cola con la misma dosis estándar de vacunación 8,000 UFCs, se utilizaron la cepa doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ), la cepa única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) y el estándar BCGph. Se observó la supervivencia de los ratones a partir de la semana de inoculación.

### 8.10. Prueba de Virulencia en Animales SCID.

Se infectaron 2 grupos de 9 ratones SCID ( ratones con una mutación en RAG-1 y RAG-2, doblemente inmunosuprimidos) con la bacteria doble mutante y la bacteria BCGph, por vía intravenosa en la vena de la cola. Se observó la supervivencia de los animales.

#### 8.11. Prueba de virulencia en ratones BALB/c.

Se utilizaron 3 grupos de 50 ratones BALB/c, los cuales se infectaron por vía intratraqueal con  $2.5 \times 10^5$  UFCs. Se realizó una serie de sacrificios de 6 animales en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120, para realizar una cinética de carga bacilar en pulmón. En cada sacrificio se recuperaron ambos pulmones. Los pulmones derechos se utilizaron para el cálculo de UFCs. Mientras que de los 6 pulmones izquierdos se perfundieron con alcohol absoluto, 3 de ellos para su uso en morfometría e histopatología. Los otros 3 pulmones se congelaron con nitrógeno líquido y guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para ser utilizados para biología molecular, cuantificación de expresión de citocinas por qPCR.

#### 8.12. Prueba de protección.

Se inmunizaron 5 grupos de 12 ratones BALBc cada uno con dosis de 8,000 UFCs en el caso de BCGph, la cepa única mutante ( $\Delta\sigma\text{E}$ ), la cepa doble mutante ( $\Delta\sigma\text{E} \Delta\text{fadD26}$ ), esta cepa también se utilizó a una concentración de 16,000 UFCs. Como control negativo se utilizó un grupo al cual solo se le inyectó solución salina. A los dos meses se realizó el reto de los animales con  $2.5 \times 10^5$  UFCs de la cepa hipóvirulenta 5186 (LAM). Se realizaron los sacrificios de 6 animales a los 2 y 4 meses post reto. Se recupero el bazo y los pulmones de los ratones. Los bazos y pulmones derechos se utilizaron para cuantificación de UFCs. Los pulmones izquierdos fueron perfundidos para cuantificación de área dañada por neumonía y presencia de granulomas. Posteriormente se repitió el experimento siguiendo el mismo procedimiento del primero, pero en esta ocasión para él reto se utilizó una cepa hipóvirulenta 583 (Beijing). Se siguió la misma cinética de sacrificios de 2 y 4 meses y se destino de la misma manera los órganos recuperados.

## 9. Resultados.

### 9.1. Evaluación de la virulencia de la bacteria doble mutante $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ .

Para comenzar el análisis de la virulencia de la bacteria doble mutante  $\Delta\sigma E \Delta fadD26$  se realizó la inoculación de ratones SCID y NUDE. Esto con el objetivo de analizar la virulencia de la bacteria en dos modelos de ratones inmunosuprimidos, ya que es importante que la bacteria sea segura para su uso como vacuna en personas inmunosuprimidas debido a la alta incidencia de casos de tuberculosis en personas infectadas con VIH/SIDA.

#### 9.1.1. Prueba con animales inmunosuprimidos.

Los animales que se infectaron fueron ratones desnudos "Nude" (ratones deficientes del gen FoxN1) y ratones SCID. los ratones vacunados con BCGph En ambos casos los ratones infectados con BCGph presentaron una menor sobrevida con respecto a la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ).

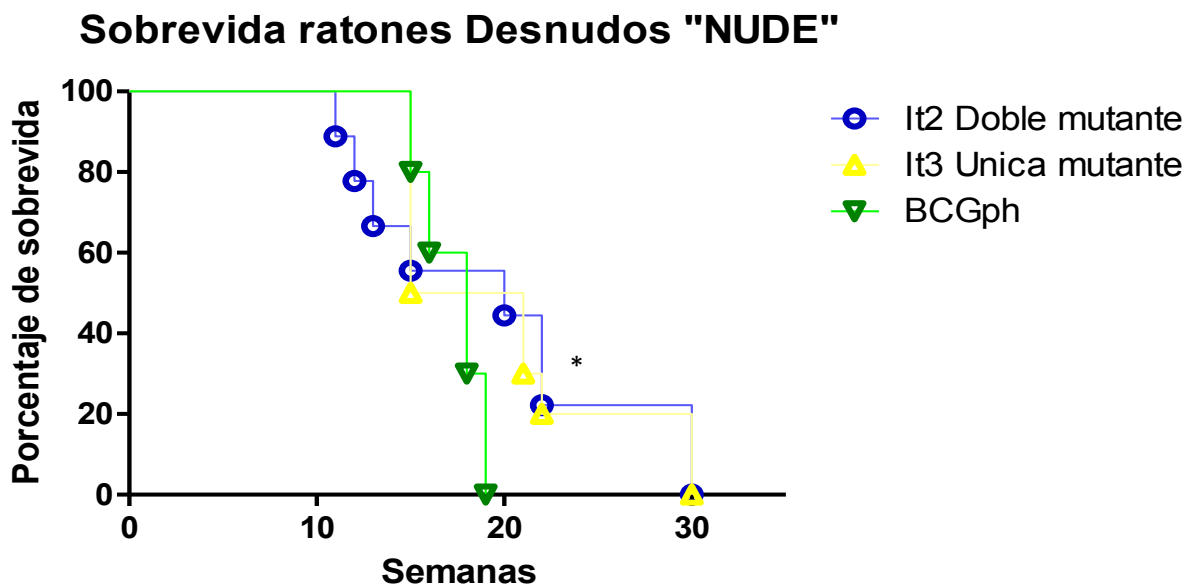


Figura [10]. **Porcentaje de sobrevida de los ratones "NUDE"**. Se inocularon ratones NUDE con 8,000UFCs por medio de una inyección subcutánea. Los ratones vacunados con BCGph ( triángulos verdes) llegaron hasta la semana 19 mientras que los grupos de ratones inmunizados con la bacteria doble mutante ( círculos azules) y la bacteria mutante única mutante ( cuadros amarillos) llegaron hasta la semana 30 post- infección.

El primer modelo que se utilizó fue el de ratones NUDE. Se utilizaron 3 grupos de 10 animales. Para los grupos control, uno fue inoculado con 8,000 UFCs de la bacteria BCGph y otro grupo con la misma dosis usando la bacteria única mutante  $\Delta\sigma E$ . Los restantes animales se inocularon con 8,000UFCs de la bacteria doble mutante  $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ . La vía de inoculación fue por medio de una inyección subcutánea, para simular la vía natural de administración de la vacuna. También en este caso se observó la sobrevida a partir del día de inoculación hasta la muerte de todos los animales. Fig. [10].

Para la segunda parte de este estudio se utilizaron 20 animales SCID( ratones carentes de los genes RAG-1 y RAG-2 lo que provoca una doble inmunosupresión llevándolos a carecer de linfocitos B y linfocitos T). Durante el primer experimento no se observó una diferencia significativa entre los grupos infectados con las bacterias mutantes y la dificultad para conseguir ratones SCID, se redujeron los grupos solo a dos grupos usando la bacteria doble mutante y la vacuna BCGph. Como grupo control se inmunizaron 10 ratones con  $1 \times 10^6$  UFCs de la bacteria BCGph. Los restantes animales se inocularon con la bacteria  $\Delta\sigma E \Delta fadD26$  utilizando la misma dosis que para el grupo de BCGph. La inyección se realizó por vía intravenosa en la base de la cola. A partir del día de inoculación se revisó la sobrevida hasta la muerte de todos los individuos del grupo. Fig.[11].

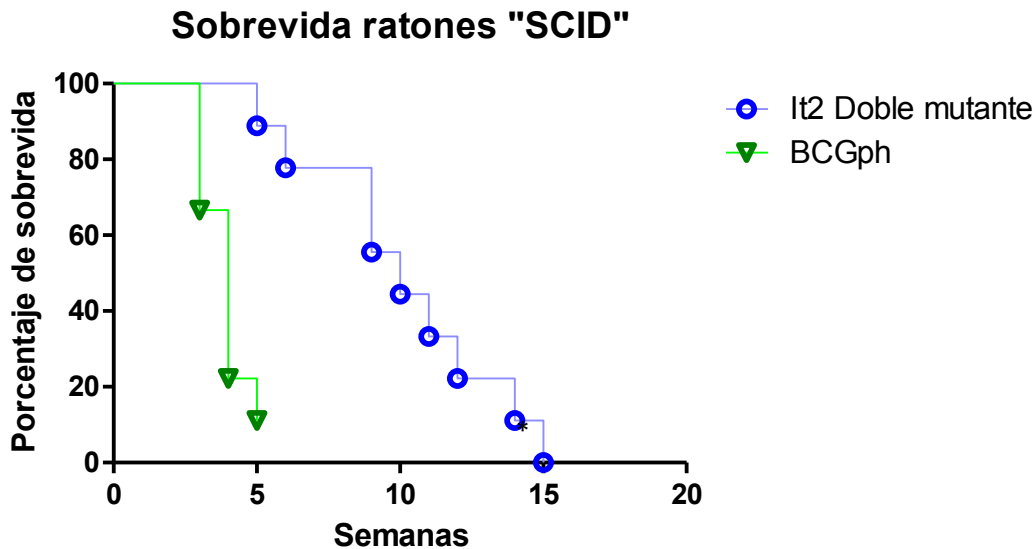


Figura [11]. **Porcentaje de sobrevida de los ratones SCID.** Ratones SCID fueron inoculados con  $1 \times 10^6$  UFCs en la base de la cola. Los ratones del grupo de BCGph (triángulos) tuvieron una menor sobrevida ya que los animales murieron rápidamente entre la semana 3 y 5, mientras que los ratones infectados con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) llegaron hasta la semana 15.

Los ratones SCID utilizados para esta prueba tenían un bajo peso y por tanto estaban muy delgados, complicando considerablemente la inyección intravenosa en la base de la cola, se siguió de igual manera el protocolo. De este grupo se observó que los ratones que se inocularon con la bacteria doble mutante  $\Delta\sigma E \Delta fadD26$  sobrevivieron hasta la semana 15 post-inoculación, mientras que el control BCGph solo llegaron ratones vivos hasta la semana 5. Fig. [11].

### 9.1.2. Evaluación de la virulencia utilizando ratones BALBc

A continuación para seguir con el análisis de la virulencia de la bacteria doble mutante  $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ , se siguió el modelo de tuberculosis pulmonar del Dr. Hernández Pando, el cual consiste en inocular ratones BALB/c con  $2.5 \times 10^5$  UFCs por vía intratraqueal, modelo estandarizado en el laboratorio (Hernández et al. 1997, 2010), de las bacterias a estudiar, en este caso H37Rv (cepa estándar de *M.tuberculosis*) como control, la bacteria doble mutante  $\Delta\sigma E \Delta fadD26$  y la cepa única mutante  $\Delta\sigma E$  (ST28).

Se realizó una cinética de la carga bacteriana en pulmón, se hicieron los sacrificios a los tiempos 7, 14, 21, 28 60 y 120 para recuperar los pulmones de los animales. También se llevó un registro de la sobrevivencia de los animales a lo largo de la cinética.

Los grupos llegaron completos hasta el día 60, a partir del cual comenzaron a morir, principalmente comenzaron a morir los animales del grupo de la bacteria parental H37Rv (control) de manera rápida a partir del día 100, teniendo al final de la cinética el 10% de sobrevivencia, en comparación con el grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) que mantuvo al 80% de su población al final de la prueba. El grupo de ratones inoculados con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) mantuvo el 30% de su población al final de experimento. Fig. [12].

Los órganos obtenidos de estos animales fueron procesados para realizar el cálculo de UFCs y análisis de citocinas por qPCR. En cada tiempo de sacrificio, se sacrificaron 6 ratones de los cuales se recuperaron los pulmones. Los pulmones izquierdos se utilizaron para cuantificar la carga bacilar. Esto por medio de la cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFCs). Durante los primeros tiempos de sacrificio de la prueba no hubo diferencias significativas entre los grupos, teniendo una carga bacilar muy baja hasta el día 60, donde el grupo inoculado con H37Rv (verde) tuvo un incremento significativo de UFCs, presentando cerca  $2.7 \times 10^4$  UFCs, mientras que el grupo inoculado con bacterias doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) y el grupo inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) no superaron las  $2 \times 10^3$  UFCs.

Para el día 120 no se tenían suficientes animales del grupo de H37Rv para tener un análisis significativo, pero las muestras del único ratón que se recuperaron eran de más de  $4 \times 10^4$  UFCs (datos no mostrados).

En el día 120 los animales del grupo inoculado con la cepa única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) presentaron niveles de carga bacilar mucho mayores a los del grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ). El grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) tuvo diferencia significativa en la carga bacilar con respecto



al grupo inoculado con H37Rv en el día 60 y con respecto al grupo inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) en el día 120. Fig.[13].

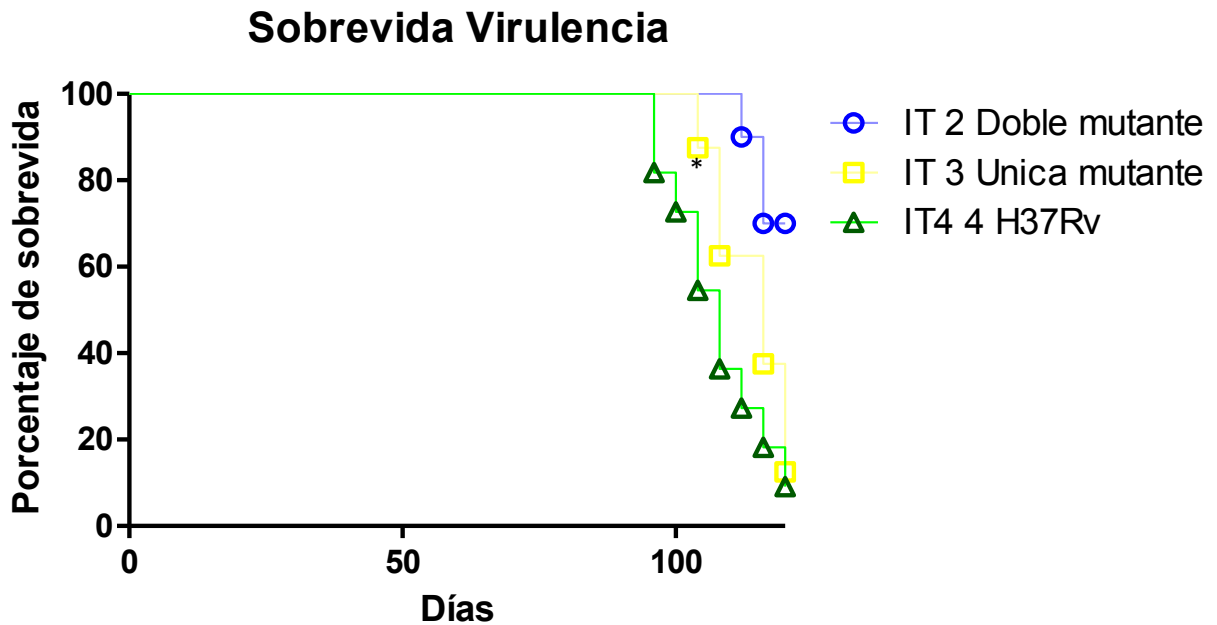


Figura [12]. **Porcentaje de sobrevida en la prueba de virulencia usando ratones BALBc.** Ratones inoculados con  $2.5 \times 10^5$  UFCs por vía intratraqueal. El experimento se dio por terminado al día 120. El grupo inoculado con H37Rv (triángulos verdes) llegó con solo el 10% de su población al final del experimento mientras que el control inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) tuvo el 30% de su población y el grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) mantuvo el 80% de su población al final del estudio.

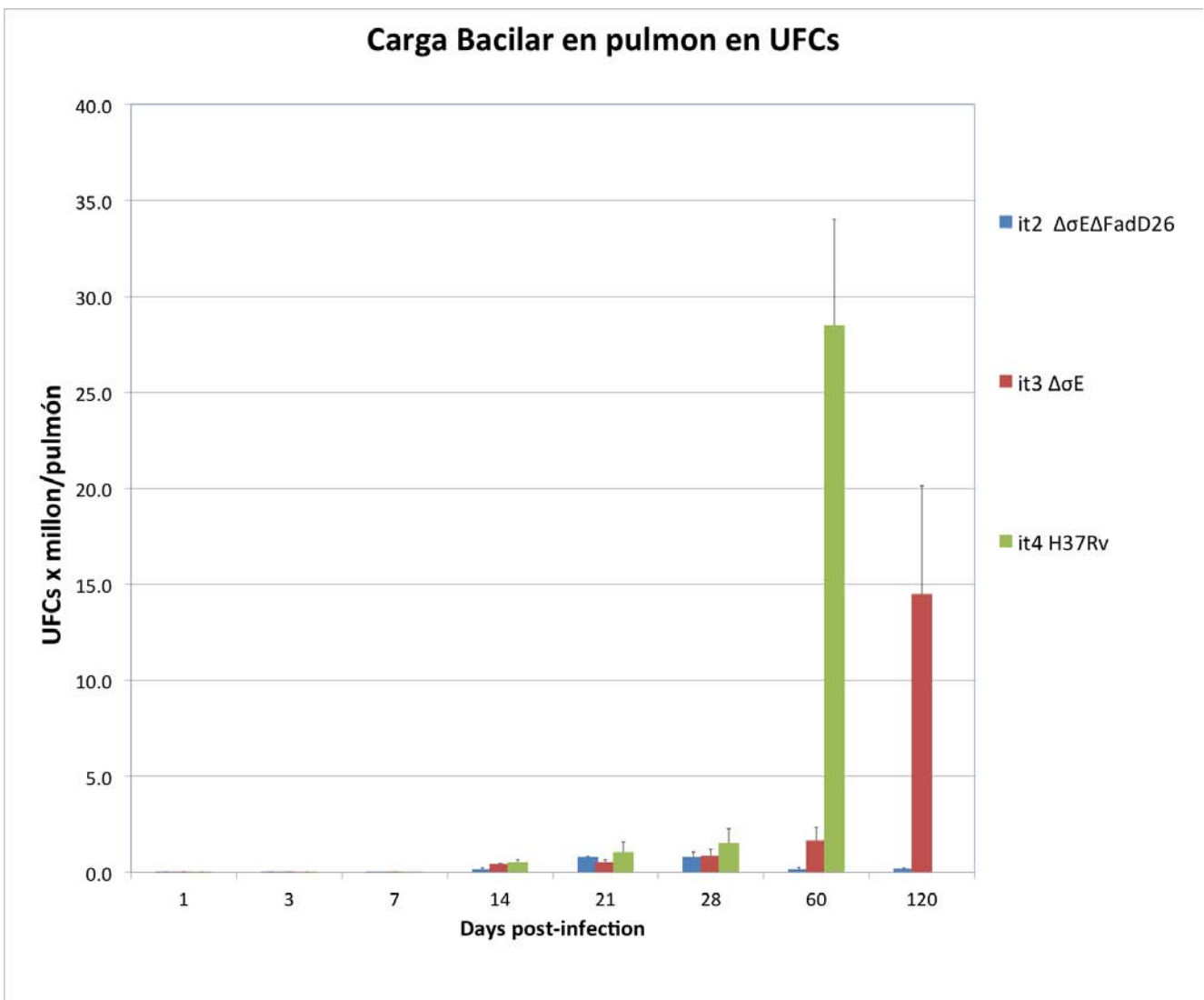


Figura [13]. **Carga bacilar en ratones BALB/c virulencia.** Los grupos no presenta diferencia significativa en la primera parte de la cinética, pero a partir del día 60 hay un incremento significativo en la carga bacilar de H37Rv (verde), con diferencia significativa respecto al grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ), este grupo también tuvo una diferencia significativa con respecto al grupo inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) en el día 120 de la cinética.

Como es sabido para un mejor control de la enfermedad el organismo debe presentar un respuesta pro inflamatoria en pulmón; importante presencia de células fagocíticas, linfocitos T efectores , citotóxicos y alta expresión de citocinas pro inflamatorias. Por esta razón es importante que el grupo inoculado con la bacteria doble mutante  $\Delta\sigma E \Delta fadD26$  presenté una respuesta pro-TH1 para garantizar una mejor protección por parte del organismo, así que evaluamos la expresión de

citocinas en pulmón en los distintos tiempos de sacrificio, utilizando como referencia para una respuesta pro-TH1 las citocinas  $TNF\alpha$ ,  $INF\gamma$ , iNOs y de un perfil anti inflamatorio a  $TGF\beta$  e IL-4.

#### **9.1.2.A.** Cuantificación de citocinas en la prueba de virulencia.

Para ello se realizó la cuantificación de citocinas por PCR en tiempo real. Donde se encontró que el grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) tiene unos niveles muy altos y constantes de producción de citocinas pro inflamatorias  $INF\gamma$  y de  $TNF\alpha$  Fig. [14] y Fig. [15], en el caso de  $INF\gamma$  hubo diferencia significativa comparado con el grupo inoculado con la cepa parental H37Rv Fig. [14], asociado con la mejor protección y menor carga bacilar en este grupo, el grupo inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) presenta niveles mayores a H37Rv y menores a los del grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) excepto al día 3 Fig. [14]. Los niveles de iNOs producidos por el grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) fueron bajos en comparación de H37Rv pero se mantuvieron constantes durante todo el experimento, los niveles de esta citocina en el caso del grupo inoculado con la bacteria única mutante se incrementaron al paso del tiempo teniendo dos picos de expresión el día 21 y día 60 Fig. [16].

En el caso de  $TGF\beta$  el grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) tuvo una expresión baja durante la primera parte de la cinética, con niveles más altos en la fase avanzada de la cinética, en comparación con el grupo inoculado con H37Rv que presento niveles más altos durante toda la cinética. El grupo inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) mantiene niveles de expresión baja de manera constante con dos picos significativos a los días 21 y 60 Fig. [17].

La producción de citocina IL-4 por parte del grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) fue muy baja, al grado de ser indetectable en la prueba, la expresión de esta citocina por parte de los miembros del grupo inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) estuvo debajo del límite de detección durante los días 1 y 3, teniendo un incremento gradual conforme avanza el tiempo con picos en los días 21 y 28, el grupo control inoculado con H37Rv tiene altos niveles de

producción en la primera parte de la cinética y tiende a disminuir con el paso del tiempo, siendo el pico más alto el del día 1. Fig. [18].

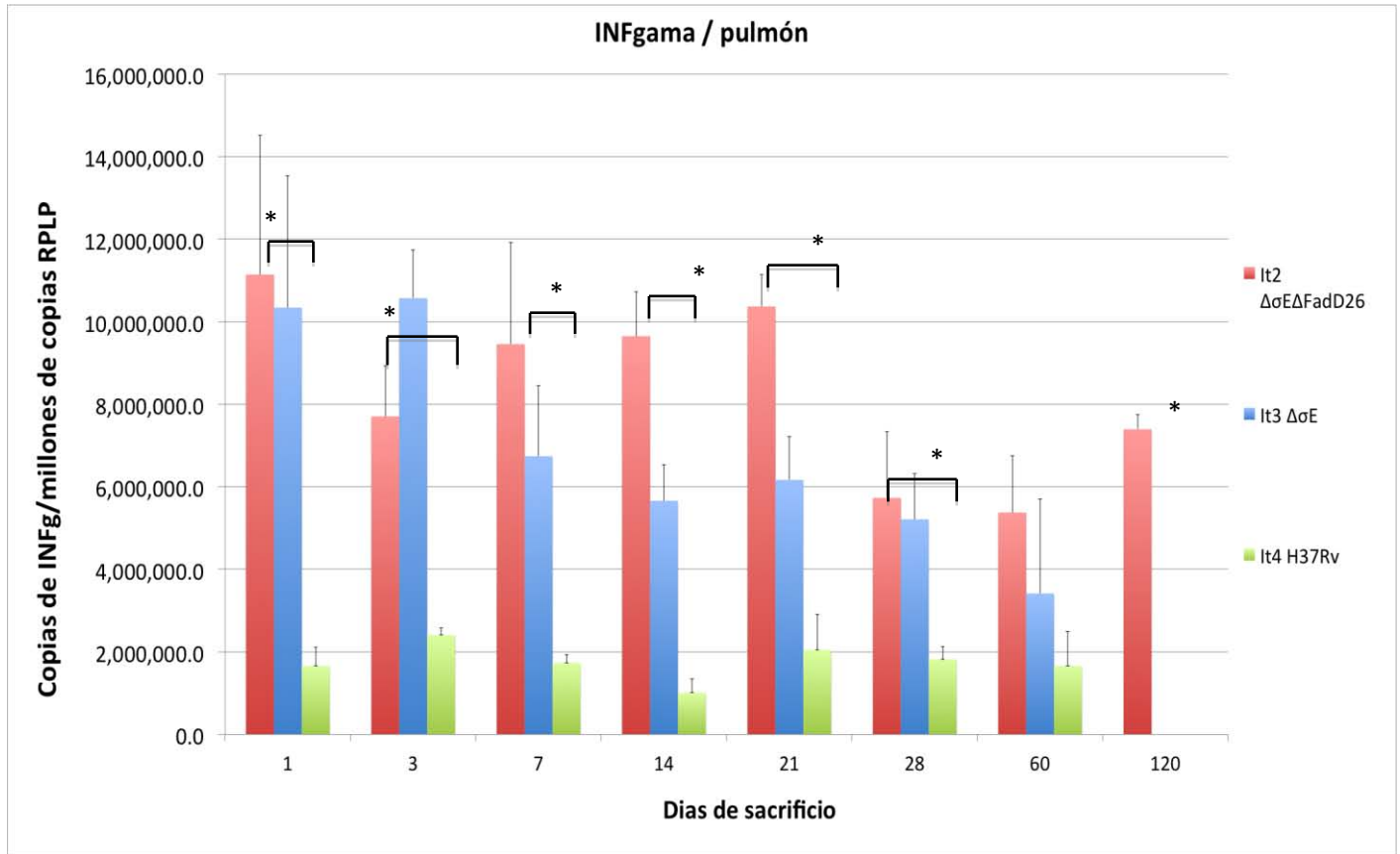


Figura [14]. **Cuantificación de la expresión de INF $\gamma$  por qPCR.** El grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) y el grupo inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) presentaron niveles más altos de expresión respecto al grupo control H37Rv durante toda la cinética. Hubo diferencia significativa de los niveles de expresión en los grupos inoculados con ambas bacterias mutantes con respecto al grupo control inoculado con H37Rv, excepto al tiempo 60 del grupo inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) con respecto al grupo inoculado con H37Rv.

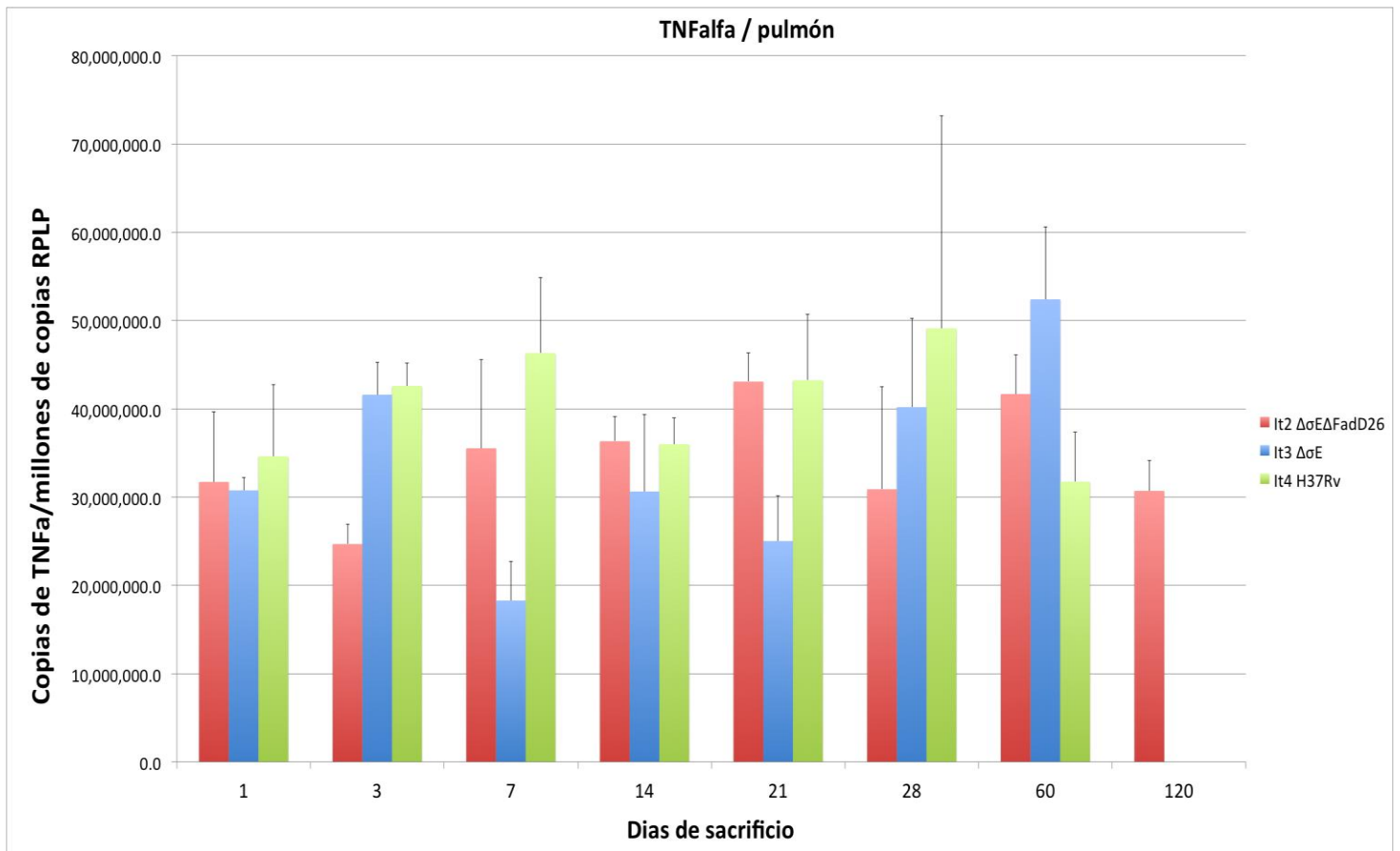


Figura [15]. **Cuantificación de la expresión de TNFα por qPCR.** No hubo diferencia significativa entre ninguno de los tres grupos, todos mantuvieron una expresión constante a lo largo de la cinética.

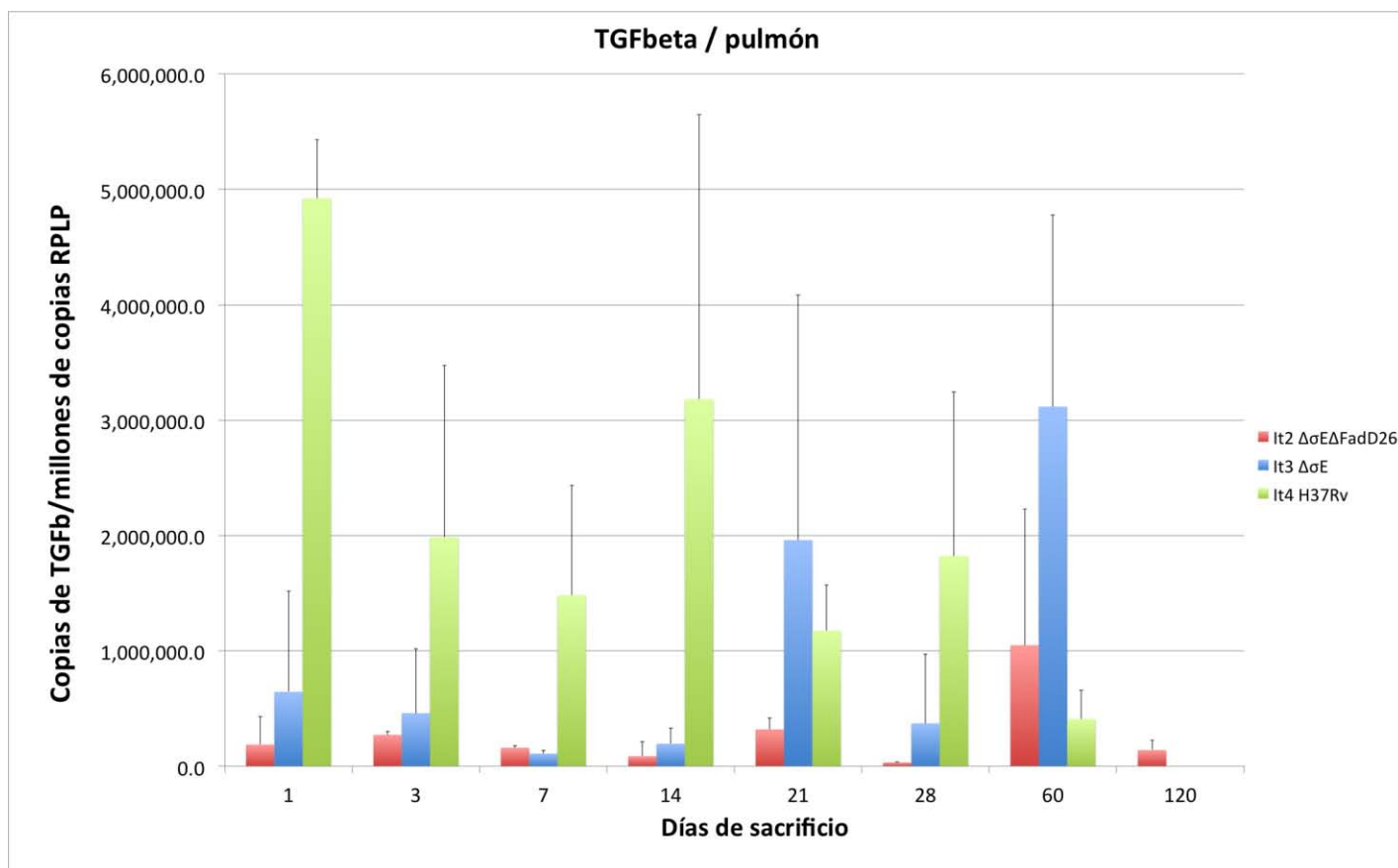


Figura [16]. **Cuantificación de la expresión de TGFβ por qPCR.** Expresión de TGFβ. El grupo inoculado con la bacteria doble ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) mutante tuvo niveles bajos de expresión los primeros días de la cinética con un ligero incremento hacia la fase avanzada de la cinética. El grupo inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) presentó niveles bajos al comienzo de la cinética con un incremento significativo en los días 21 y 60. El grupo inoculado con la cepa control H37Rv mantuvo niveles altos y constantes de expresión a lo largo de la cinética con una disminución significativa al día 60.

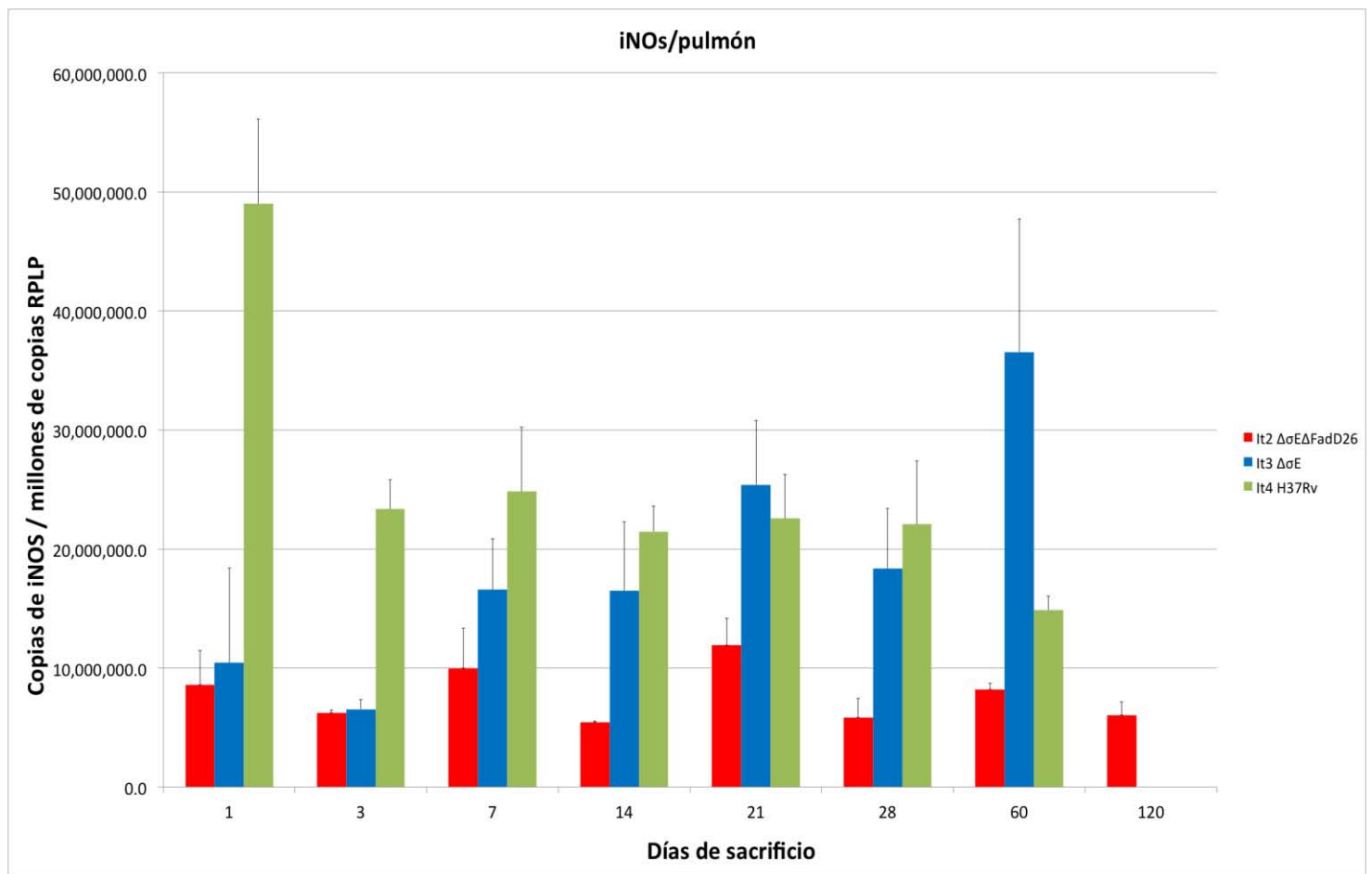


Figura [17]. **Cuantificación de la expresión de NOS por qPCR.** El grupo inoculado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) tuvo niveles bajos en comparación con los controles pero los mantuvo de manera constante a lo largo de la infección. El grupo inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) tuvo niveles menores al inoculado con H37Rv en los primeros días de la cinética, la expresión se fue incrementando a través de la cinética con picos a los días 21 y 60, con una diferencia significativa en su expresión al día 60. El grupo control H37Rv tuvo altos niveles de expresión los primeros días de la cinética, al paso del tiempo fue disminuyendo esta expresión, con el pico más alto de expresión al día 1.

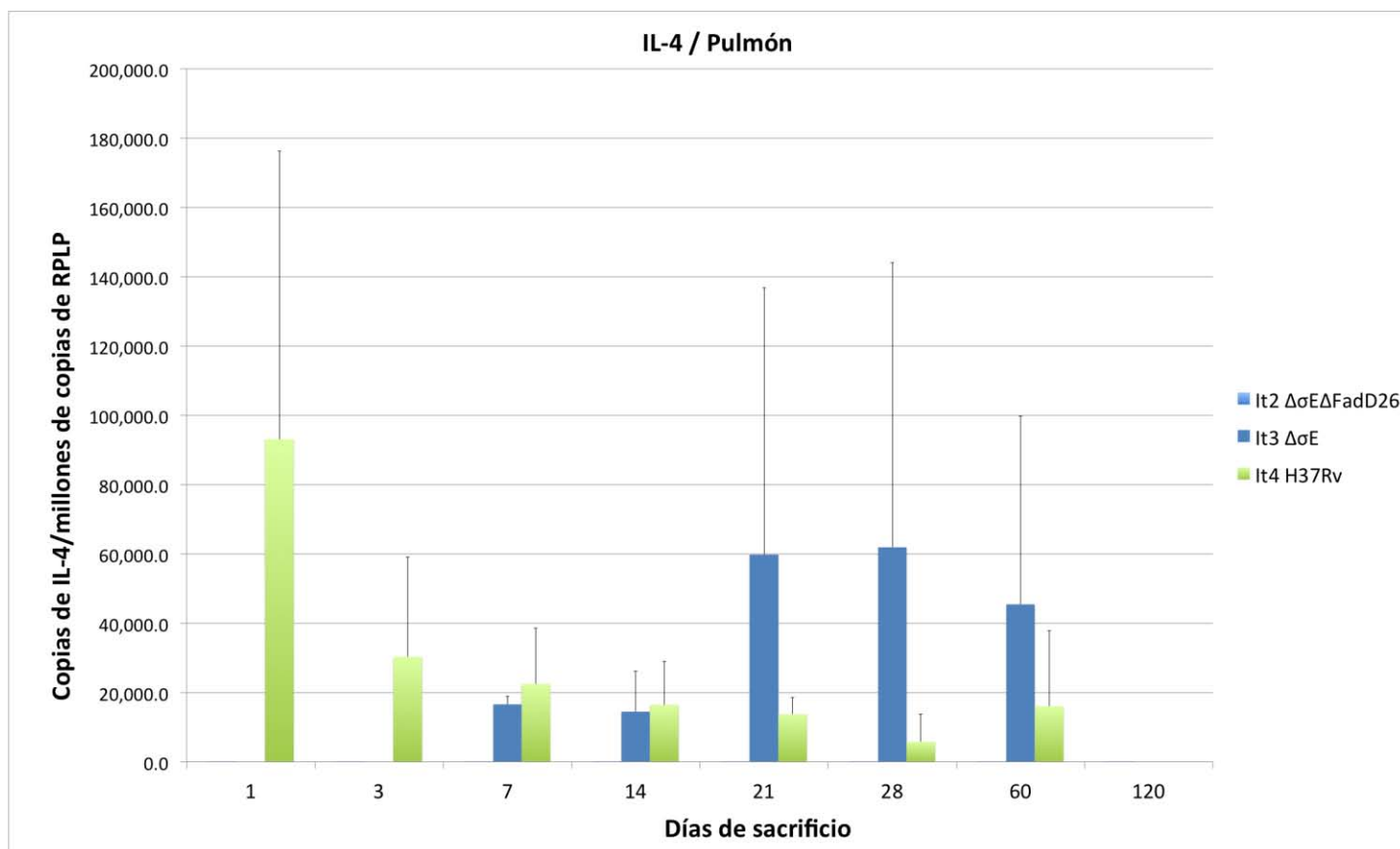


Figura [18]. **Cuantificación de la expresión de IL-4 por qPCR.** Los niveles de expresión por parte del grupo inoculado con la cepa doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) fueron muy por debajo del marco de lectura durante toda la cinética. La expresión esta citocina por parte del grupo inoculado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) fue muy por debajo del marco de lectura el día 1 y 3, para el día 7 aumento el nivel de expresión y tuvo un incremento en los días 21 y 28. El grupo inoculado con la cepa control H37Rv presentó un pico de expresión al día 1 que disminuyó al paso del tiempo en la cinética.

## 9.2. Evaluación de la protección conferida por la bacteria doble mutante $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ .

Como se espera poder proponer a la bacteria doble mutante  $\Delta\sigma E \Delta fadD26$  como vacuna, realizamos a continuación la inmunización de ratones BALB/c, los cuales fueron retados con cepas de bacterias hipóvirulentas (LAM 5186 y Beijing 583) y se sacrificaron a los 2 y 4 meses, recuperando bazo y pulmón.



### 9.2.A. Inmunización con las bacterias mutantes y retadas utilizando la cepa hipóvirulenta 5186 (LAM)

En la prueba de protección se utilizaron 5 grupos inmunizados con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ), la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ), la vacuna estándar BCGph y un control negativo con solución salina. En el caso de la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) se manejaron dos dosis para analizar la posibilidad de modificar la dosis de vacunación, un grupo se vacuno a la dosis de 8,000 UFCs y el otro con una dosis de 16,000 UFCs. A los dos meses se dio en reto con la cepa hipóvirulenta 5186 (LAM), con sacrificios a los 2 y 4 meses. Los animales del grupo de solución salina comenzaron a morir alrededor de la semana 5 post-reto y muriendo todos a la semana 8 post-reto. Los grupos inmunizados con la cepa doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ), tuvieron mejor sobrevivencia respecto a los otros, llegando el grupo vacunado con 16,000 UFCs al final del experimento con el 60% de los individuos vivos y el grupo vacunado con 8,000 UFCs con el 40% de los animales vivos. Los grupos de la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) y BCGph concluyeron el experimento con el 20% de sus grupos vivos. Fig. [19]. Al realizar la cuantificación de UFCs para conocer la carga bacilar en pulmón, a los 2 meses ningún grupo presentó diferencias significativas en la carga bacilar Fig. [20]. Pero a los 4 meses se tiene una diferencia significativa en la carga bacilar entre la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a una dosis de 8,000 UFCs con respecto a los otros grupos. El grupo con mayor carga bacilar fue el grupo de la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a una dosis de 16,000 UFCs Fig.[20].

Para ver la cantidad de daño presentada en los pulmones a causa de la neumonía, los pulmones se perfundieron con alcohol absoluto y se guardaron suspendidos en alcohol absoluto, posteriormente se fijaron en parafina para ser cortados en laminas de 0.4 micras y teñidos con hematoxilina-eosina. En el analizador de imágenes se midió el área consolidada en pulmón considerada como neumonía (áreas con abundante infiltrado celular). Considerando el área total del pulmón como el 100% se calculó el porcentaje de neumonía.

Al analizar el área afectada por neumonía en los pulmones del sacrificio de 2 meses encontramos que el grupo inmunizados con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a la dosis de 8,000 UFCs tuvo el menor porcentaje de neumonía, presentó (12% de neumonía), con diferencia significativa con respecto a los grupos de solución salina, BCGph y la otra dosis de la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ), el grupo de la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a la dosis de 16,000 UFCs tuvo 55% de neumonía, el grupo inmunizado con la cepa única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) tuvo alrededor del 25% de neumonía, el grupo vacunado con la vacuna BCGph tuvo alrededor de 30% de neumonía y el control negativo inyectado con solución salina tuvo cerca del 55% de neumonía.

A los 4 meses el grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a la dosis de 8,000 UFCs tuvo alrededor de 40% de neumonía, el grupo vacunado con BCGph tuvo cerca de 70% de neumonía, el grupo inmunizado con la cepa única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) tuvo cerca del 50% de neumonía, el grupo inoculado con la otra dosis de la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a la dosis de 16,000 UFCs tuvo alrededor de 45% de neumonía, con una desviación estándar muy alta debido a un miembro del grupo que estuvo muy afectado por neumonía con respecto a los demás Fig.[21], Fig.[24], Fig.[25]. La formación de granulomas durante la primera fase de la enfermedad es muy importante, por eso se midió el tamaño de los granulomas formados en pulmón a los 2 meses. Se midió el área de los granulomas, estructuras dinámicas de linfocitos y macrófagos, a 20x. Se sacó un promedio por cada pulmón y por cada grupo. El grupo inmunizado con la cepa doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) con la dosis de 8,000 UFCs tuvo gran cantidad de granulomas de gran tamaño con bordes bien definidos, en promedio de 4,500 micras de diámetro.

El grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) con la dosis de 106,000 UFCs tuvo menor cantidad de granulomas, grandes y de bordes bien definidos, con un diámetro promedio de 3,000 micras. El grupo inmunizado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) presentó pocos granulomas, de bordes bien definidos, de un diámetro promedio de 2,200 micras. El grupo vacunado con BCGph

presento muchos granulomas pequeños con bordes muy poco definidos, con un diámetro promedio de 1,900 micras. Fig.[22] y [23].

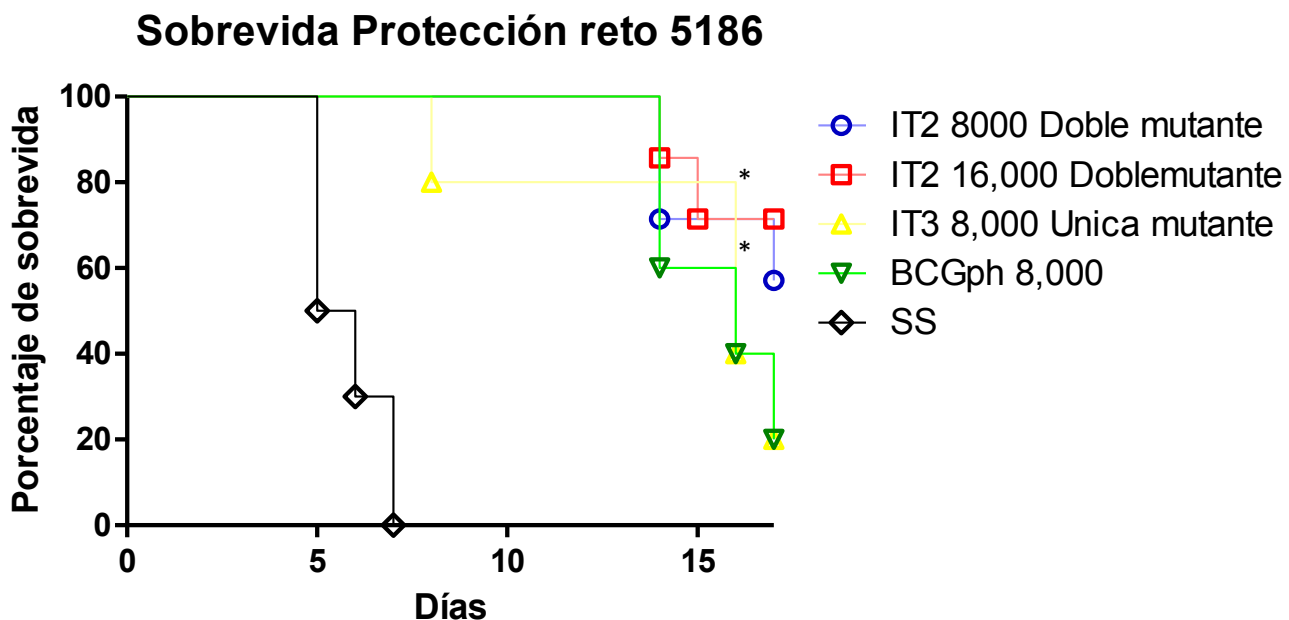


Figura [19]. **Porcentaje de sobrevida de los individuos retados con la cepa 5186.** Animales inmunizados con las bacterias mutante  $\Delta\sigma E$ , doble mutante  $\Delta\sigma E \Delta fadD26$  y BCGph; retados a los 2 meses con la cepa h pervirulenta 5186 de la familia LAM. El grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a 8,000 UFCs llego con el 40% de individuos al final del experimento. El grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a 16,000 UFCs tuvo el 60% de individuos. El grupo inmunizado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) al igual que el grupo BCGph tuvo el 20% de individuos. El grupo control de solución salina solo llego hasta la semana 8.

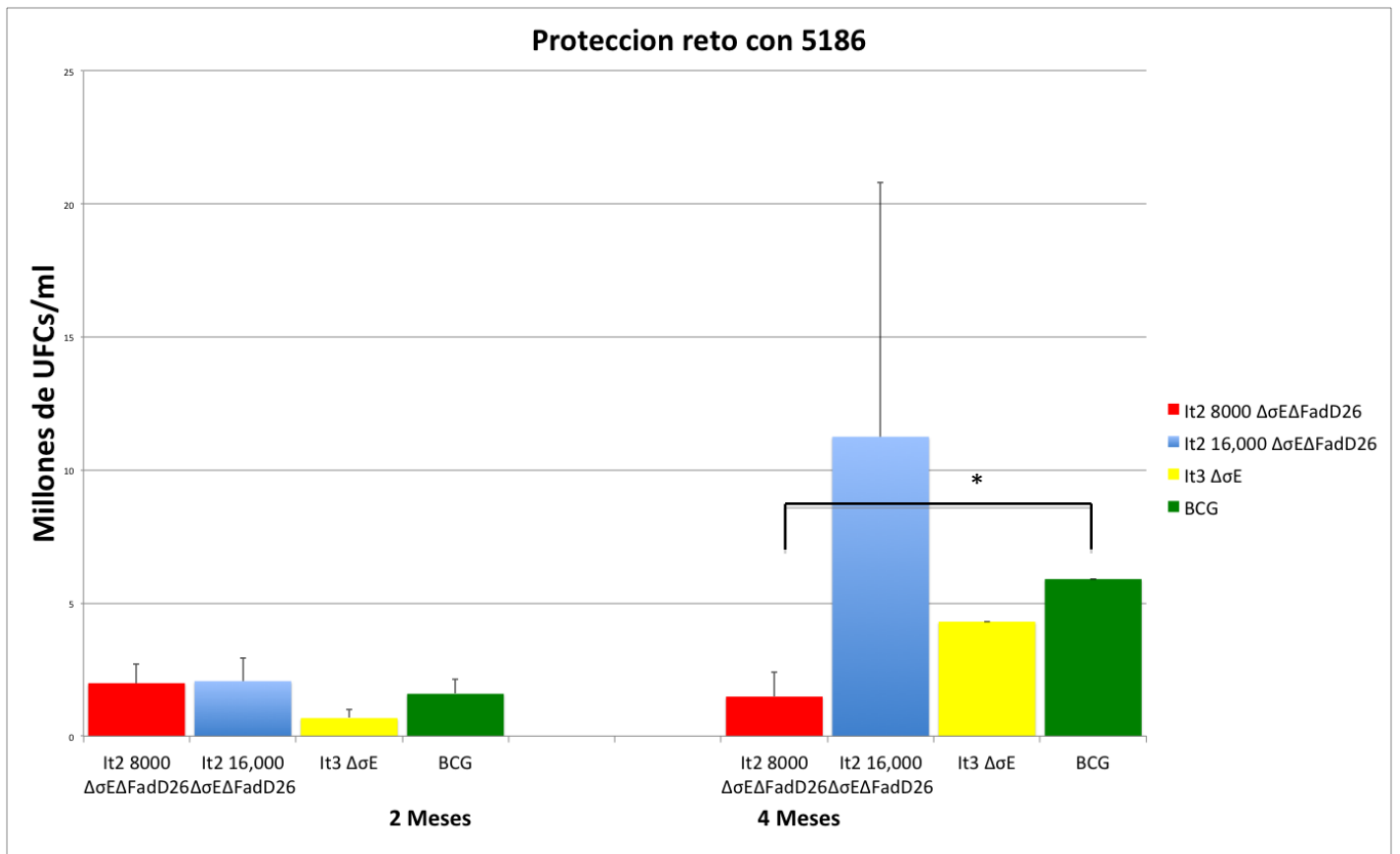


Figura [20]. **Carga bacilar en pulmón de los individuos retados con 5186.** A los 2 meses no hay diferencia significativa entre ninguno de los grupos a excepción de solución salina (negro) que tuvo una carga bacilar muy alta respecto a las otras. A los 4 meses no se tuvieron muestras de solución salina. El grupo inmunizado con la doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a la dosis de 8,000 UFCs (azul) presento baja carga bacilar con diferencia significativa respecto a BCGph (verde) y el grupo inmunizado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) (amarillo).

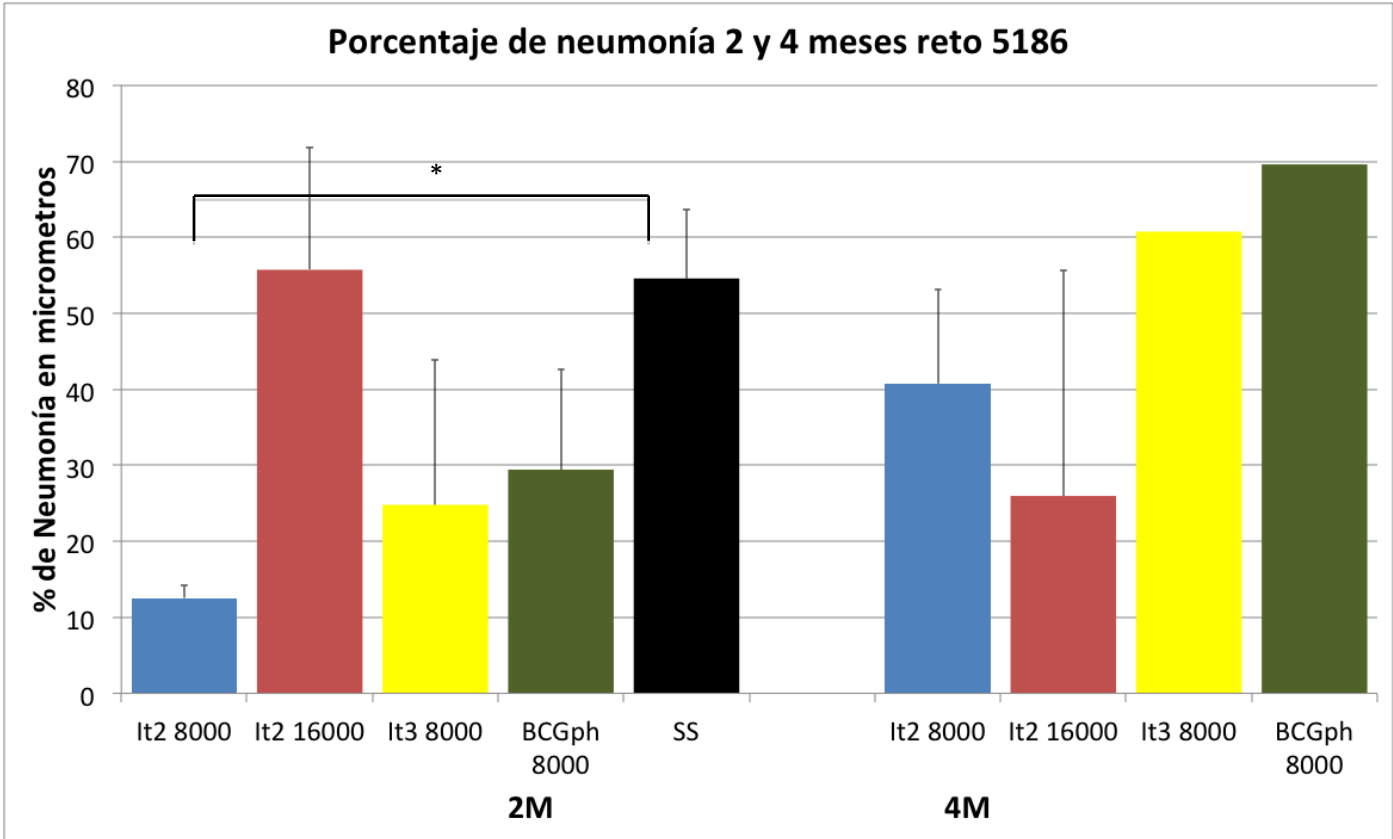


Figura [21]. **Porcentaje de neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 5186.** A los 2 meses el grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a la dosis de 8,000 UFCs (azul) presenta el menor porcentaje de área dañada por neumonía con cerca de 10%, con una diferencia significativa con respecto al el grupo de solución salina (negro). A los 4 meses se mantuvo como el grupo con menor porcentaje de área afectada por neumonía con alrededor del 40%, teniendo una diferencia significativa respecto al grupo inmunizado con la única mutante (amarillo) y el grupo vacunado con BCGph (verde).

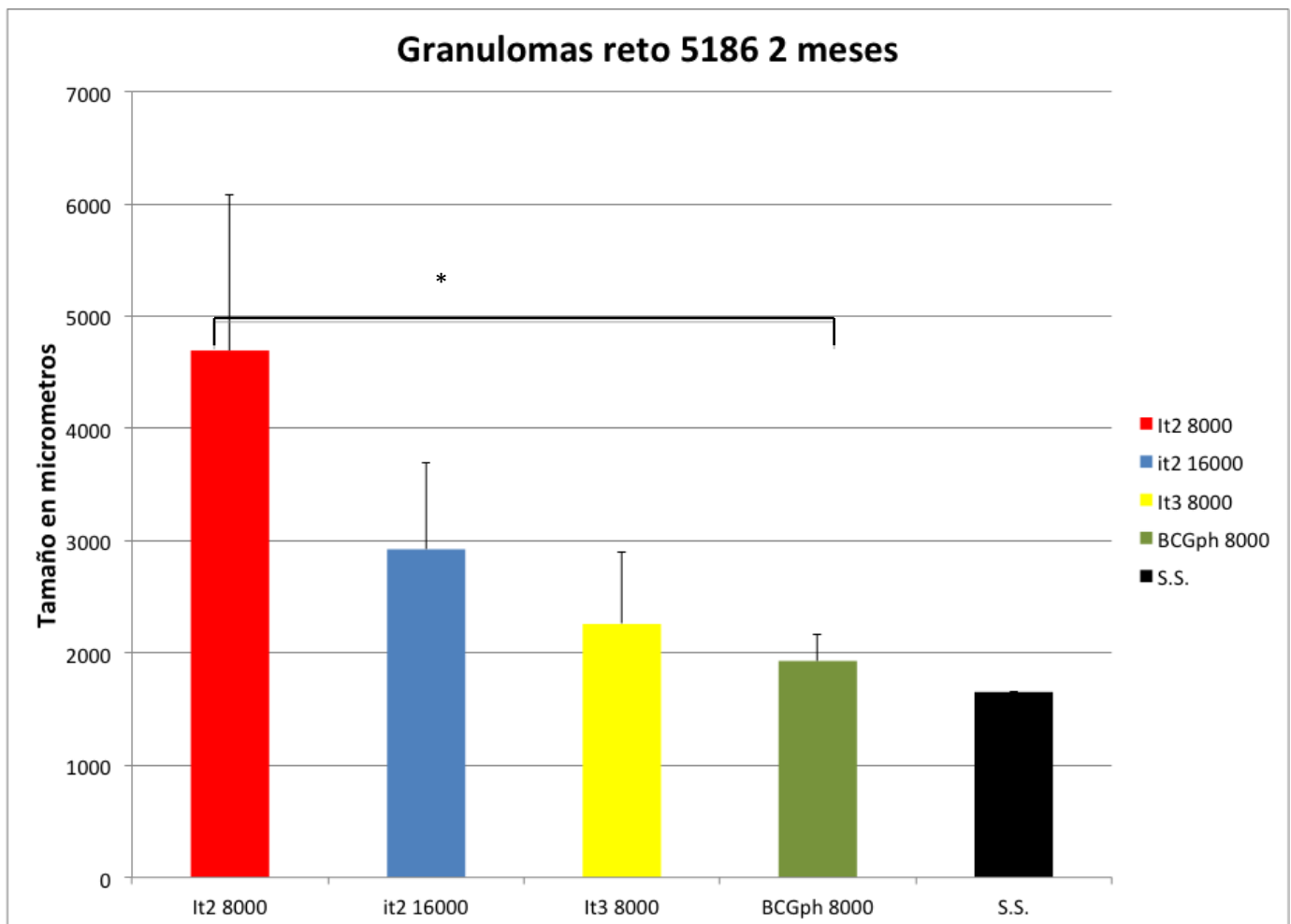


Figura [22]. **Tamaño de los granulomas presentes en pulmón de los individuos retados con la cepa 5186.** El grupo de animales inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) con la dosis de 8,000 UFCs (rojo) presentan los granulomas con el diámetro más grande con bordes bien definidos, hay diferencia significativa con respecto a los granulomas de los animales vacunados con BCGph (verde) y el grupo control negativo de solución salina (negro).

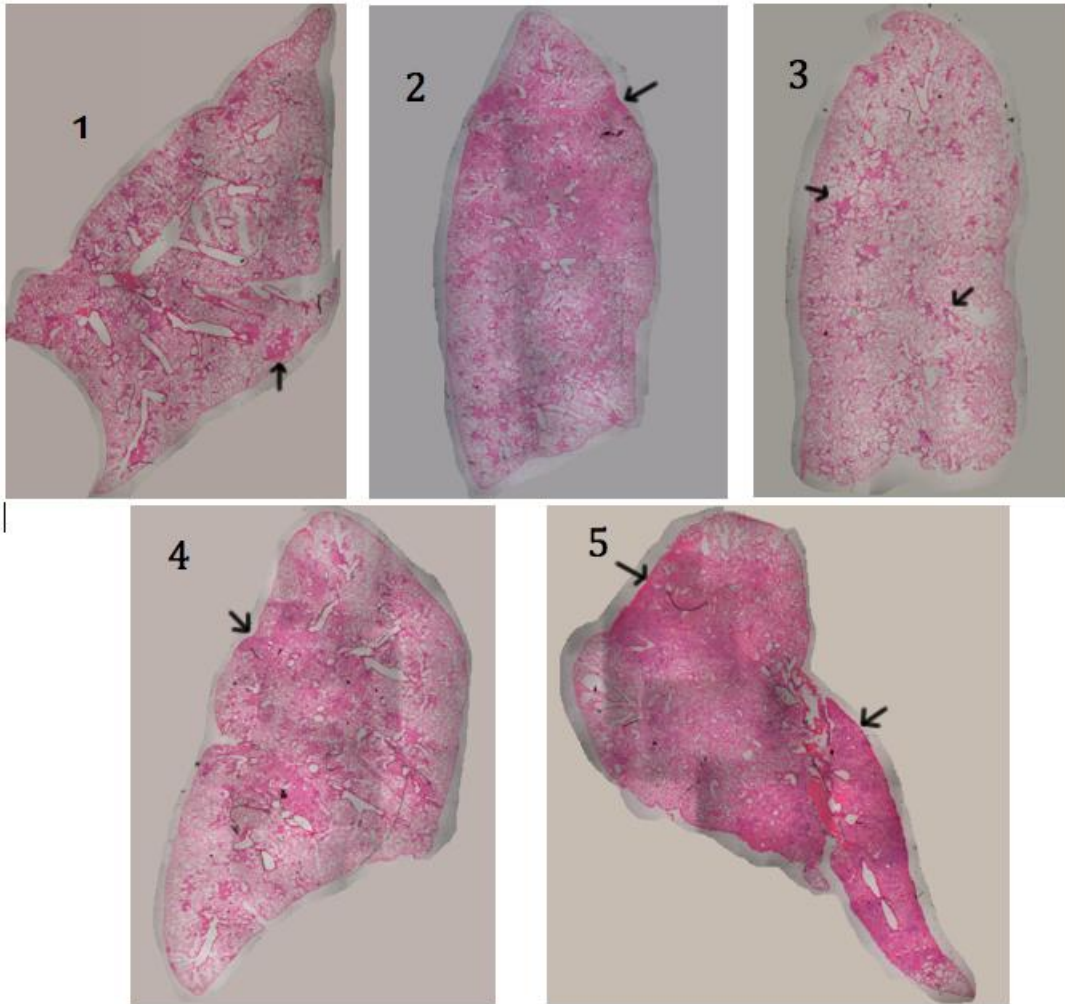


Figura [23]. **Imagen representativa de el área afectada por neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 5186 a los 2 meses.** Fotos representativas porcentaje de neumonía en pulmón (área consolidada en pulmón, regiones oscuras) de la prueba de protección a los 2 meses. No.1 grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a la dosis de 8,000 UFCs. No.2 Grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a la dosis de 16,000 UFCs. No.3 Grupo inmunizado con la bacteria única mutante. No.4 Grupo vacunado con la vacuna BCGph. No.5 Grupo control negativo solución salina.

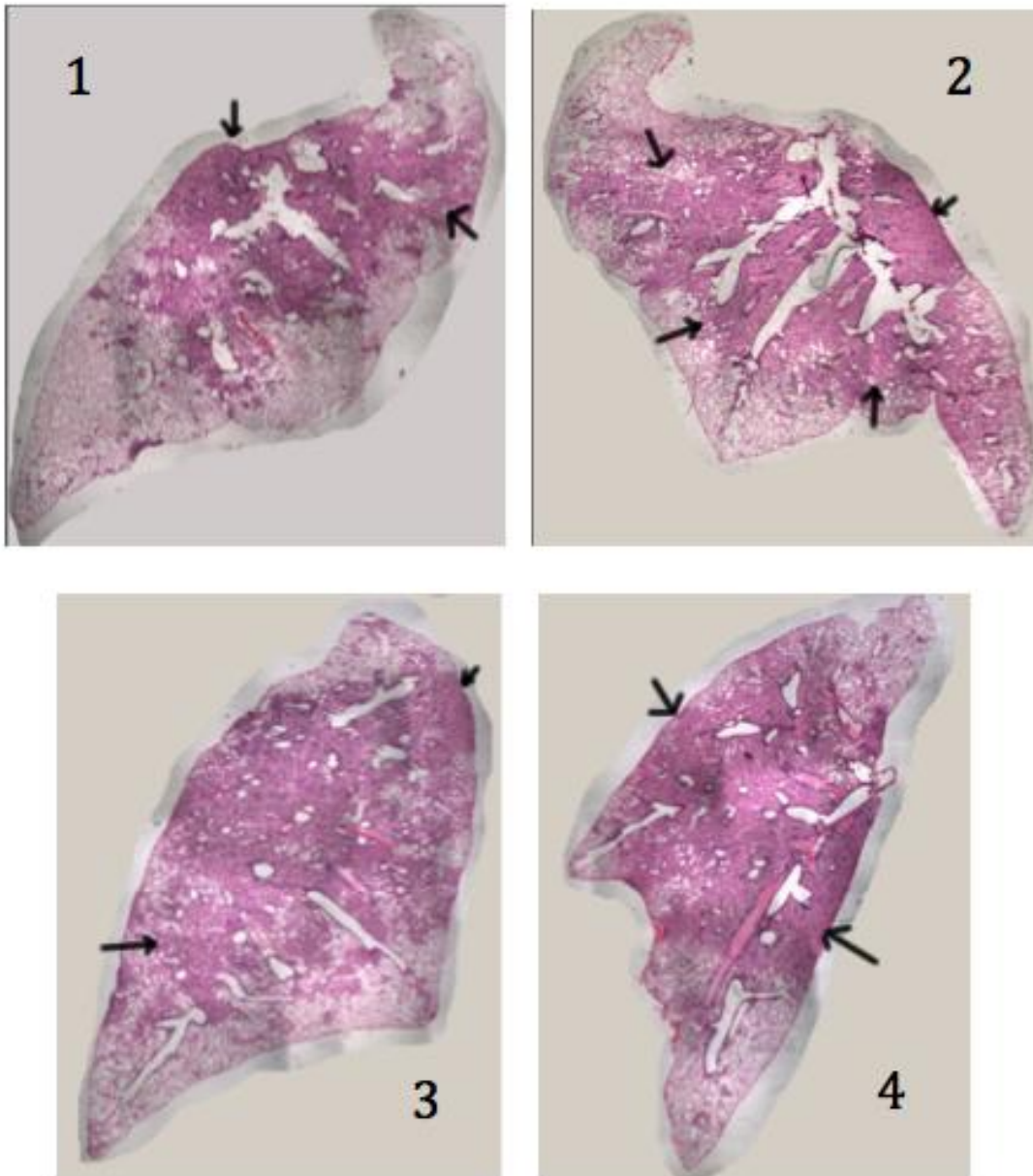


Figura [24]. **Imagen representativa de el área afectada por neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 5186 a los 4 meses.** Fotos representativas porcentaje de neumonía en pulmón (área consolidada en pulmón, regiones oscuras) de la prueba de protección a los 4 meses. No.1 grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a la dosis de 8,000 UFCs. No.2 Grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a la dosis de 16,000 UFCs. No.3 Grupo inmunizado con la bacteria única mutante. No.4 Grupo vacunado con la vacuna BCGph. No se cuentan con muestras de el grupo de solución salina, como se observa en lo sobrevida no hubo animales vivos a los 4 meses.



De los bazos recuperados se realizaron UFCs para observar si había diseminación hacia este órgano. Entre los grupos inmunizados con las diferentes bacterias en el tiempo de dos meses no hay diferencia significativa en la carga bacilar, que está por debajo de  $6 \times 10^3$  UFCs.

A los 4 meses los grupos inmunizados con las dos dosis de la bacteria doble mutante presentaron menor carga bacilar con respecto a los grupos vacunados con BCGph y la bacteria única mutante con  $3 \times 10^4$  UFCs. El grupo inmunizado con la bacteria única mutante tuvo poco más de  $2 \times 10^5$  UFC y el grupo vacunado con BCGph tuvo  $1.5 \times 10^5$  UFCs. Fig. [25].

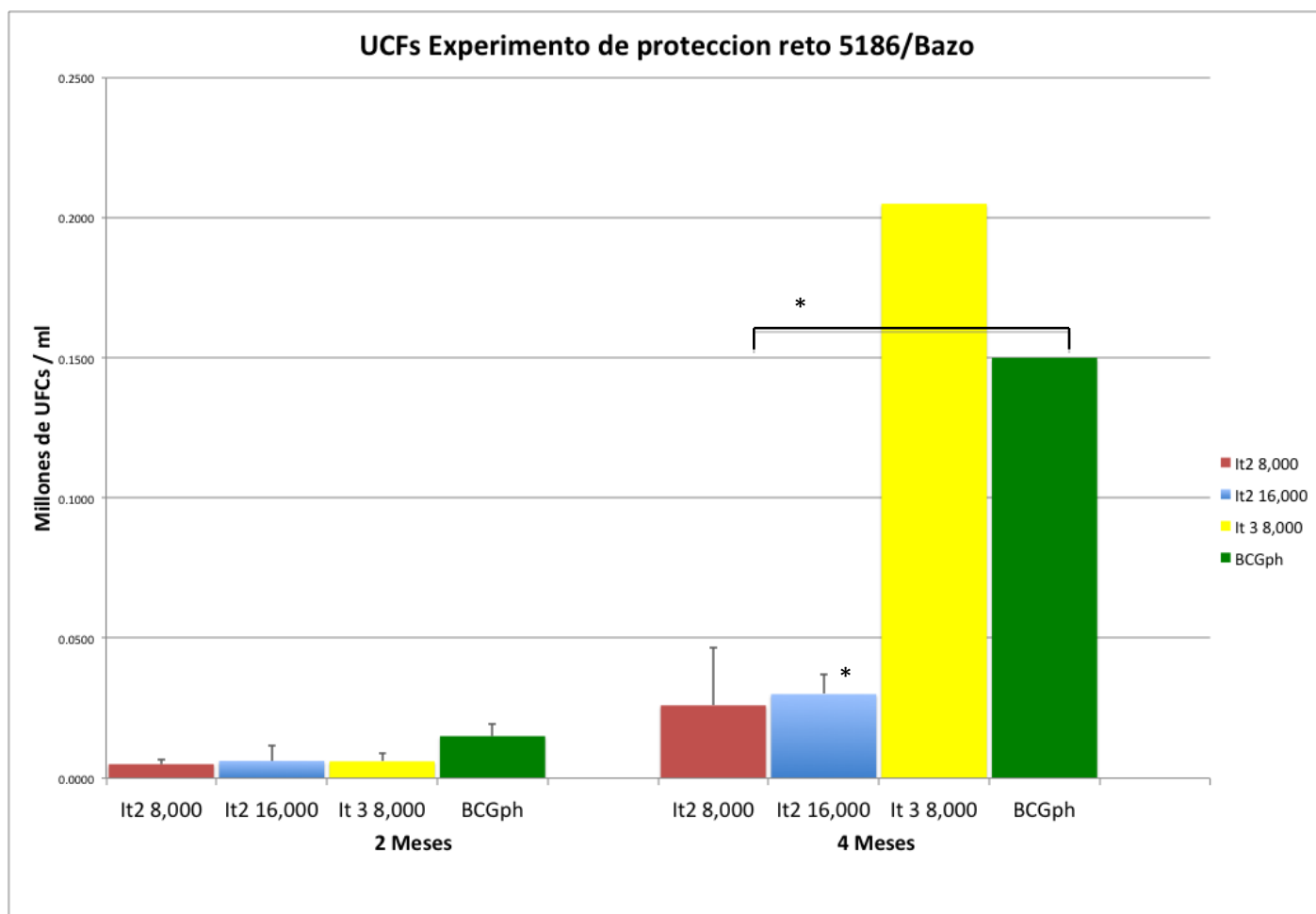


Figura [25]. **Carga bacilar en bazo de los individuos retados con la cepa 5186.** Los animales inmunizados con la bacteria doble mutante  $\Delta\sigma E \Delta fadD26$  a las dosis de 8,000UFCs y 16,000UFCs

presentaron menor carga bacilar en bazo que los controles. Los animales inmunizados con la bacteria doble mutante  $\Delta\sigma E \Delta fadD26$  presentó menos diseminación que los controles.

Se repitió el experimento de protección utilizando el mismo procedimiento, el mismo número de animales por grupo y los mismos 5 grupos, con la diferencia de que a los 2 meses post-vacunación se retó con una cepa hipervirulenta 583 (Beijing). Los tiempos de sacrificio se llevaron a 2 y 4 meses post-reto. Los animales del grupo vacunado con la cepa BCGph presentaron la mejor sobrevida, teniendo cerca del 50% al final del experimento, mientras que el grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) se tuvo que adelantar el sacrificio a la semana 15, quedando solo el 20% de los animales. El grupo inmunizado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) tuvo una sobrevida hasta la semana 8 post-reto con el 30% de sus individuos, los cuales se sacrificaron para utilizarlos para cuantificación de UFCs y porcentaje de neumonía, marcando la muerte de todos los individuos en la semana 15. Fig.[26].

El grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a la dosis de 16,000 UFCs presento una sobrevida del 100% hasta la semana 10, donde murieron todos los miembros del grupo, después de la fecha de sacrificio (semana 9). En el grupo de solución salina murieron todos los individuos de este grupo a la semana 7. Fig. [26].

Al hacer la cuantificación de UFCs se observo que el grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) presento alrededor de  $5 \times 10^5$  UFCs, con una diferencia significativa respecto al grupo vacunado con BCGph con poco más de  $1.3 \times 10^5$  UFCs. Los grupos inmunizados con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a la dosis de 16,000 UFCs y el grupo inmunizado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) con aproximadamente  $8 \times 10^5$  UFCs. Fig.[27].

La neumonía de los animales del grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a la dosis de 8,000 UFCs y el grupo vacunados con BCGph tuvieron una carga bacilar similar, de a aproximadamente 33% y 40% respectivamente.

El grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a la dosis de 16,000 UFCs presento cerca de 85% de neumonía y el grupo inmunizado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) tuvo cerca de 65% de área dañada por neumonía. Fig. [28], Fig.[29], Fig.[30].

En el grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a la dosis de 8,000UFCs se identificaron granulomas de gran tamaño y forma bien definida, con un diámetro promedio de 2,500 micras.

El grupo inmunizado con la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) a 16,000 UFCs tuvo pocos granulomas de gran tamaño y limites bien definidos de un diámetro promedio de 2,000 micras. El grupo inmunizado con la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) presentó granulomas con bordes bien definidos de aproximadamente 1,400 micras. El grupo vacunado con BCGph tuvo una gran cantidad de granulomas de un tamaño más pequeño que los presentes en los otros grupos y con bordes bien definidos con un diámetro promedio de 1,200 micras. Fig.[31].

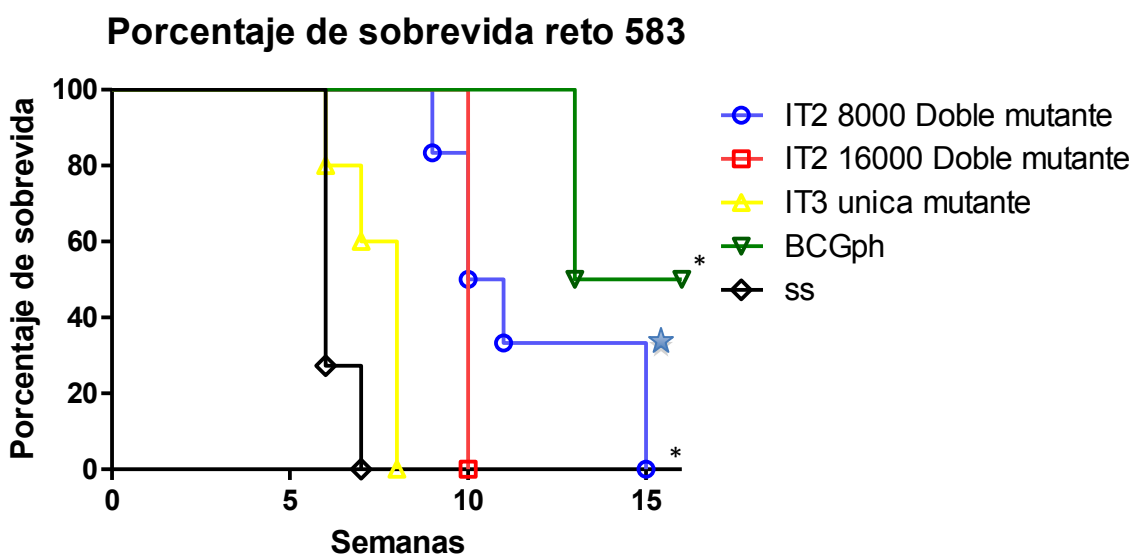


Figura [26]. **Porcentaje de sobrevivida de los individuos inmunizados y retados 2 meses post inmunización con la cepa 583 familia Beijing.** El grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a 8,000 UFCs llegó solo hasta la semana 15 cuando se sacrificaron los animales restantes. El grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a 16,000 UFCs llego hasta la semana 10. El grupo inmunizado con la bacteria única mutante llego a la semana 8 cuando se sacrificaron los animales restantes. El grupo control vacunado con BCGph tuvo una sobrevivida del 50% al terminarse el

experimento en la semana 16. El grupo control de solución salina llegó hasta la semana 7. La estrella indica la fecha en que se tuvo que sacrificar el 30% restante de los ratones del grupo inmunizado con la bacteria doble mutante en la semana 15.

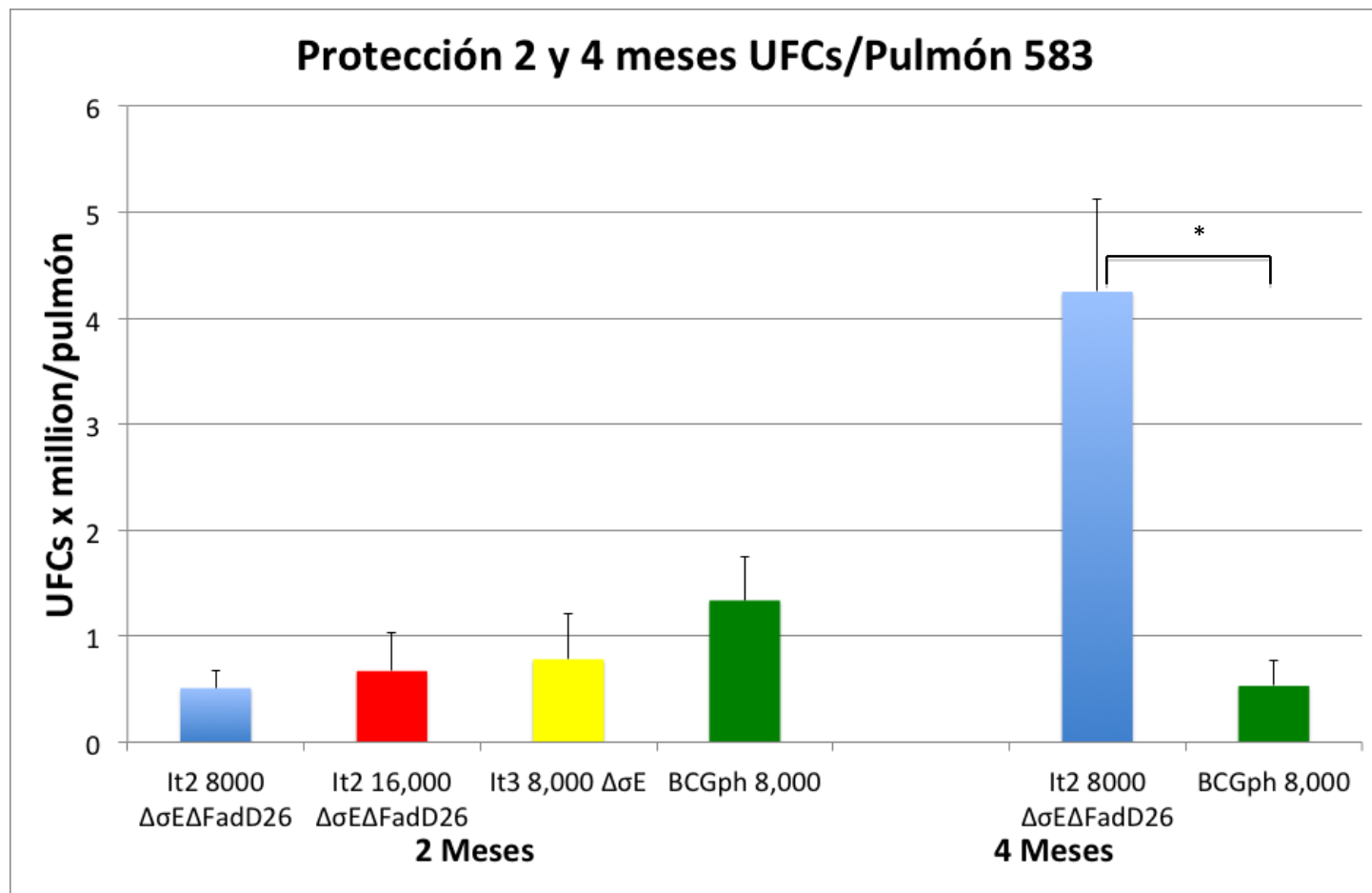


Figura [27]. **Carga bacilar en pulmón de los individuos retados con la cepa 583.** Experimento de protección 2 meses reto con cepa hipóvirulenta 583. Hubo diferencia significativa entre el grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a 8,000 UFCs (azul) con respecto al grupo vacunado con BCGph (verde). La carga bacilar de los animales del grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a 8,000 UFCs (azul) presentaron un incremento significativo en la carga bacilar en pulmón, con una diferencia significativa con respecto a la carga bacilar de los animales vacunados con BCGph (verde).

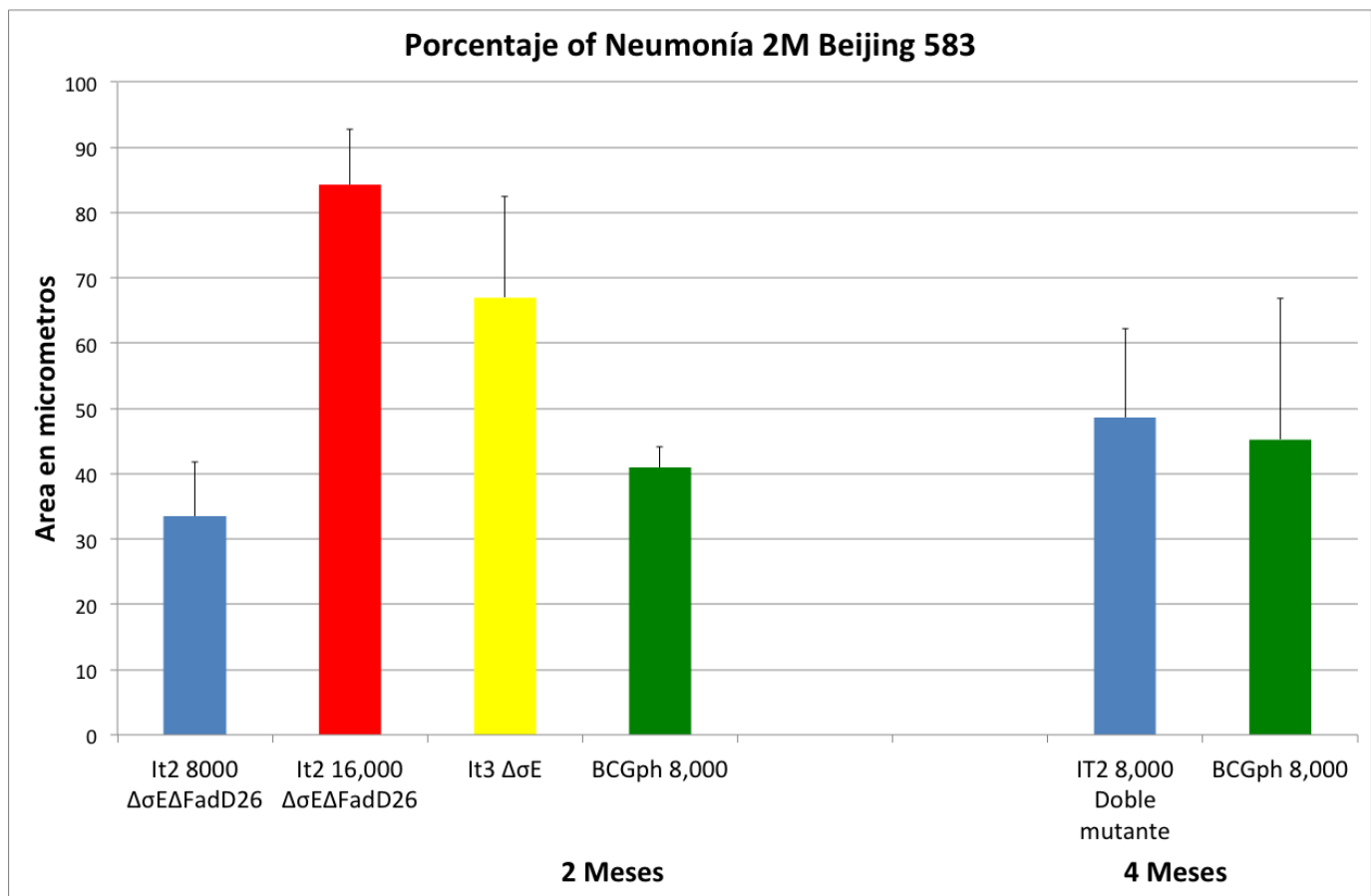


Figura [28]. **Porcentaje de neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 583.** Experimento de protección 2 meses se retó con cepa 583. El grupo inoculado con bacteria doble mutante a 8,000 UFCs (azul) presentó un porcentaje de neumonía similar al grupo vacunado con BCGph (verde) con alrededor de 33% y 40% respectivamente. Hubo diferencia significativa entre el grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a 8,000 UFCs (azul) y los grupos inmunizados con las bacterias doble mutante a 16,000 UFCs (rojo) y la bacteria única mutante (amarillo). A los 3 meses los animales inoculados con la bacteria doble mutante (azul) a 8,000 UFCs presentaron un área de daño en el pulmón de alrededor del 45% sin diferencia significativa con respecto al grupo vacunado con BCGph (verde) que tuvo también cerca del 45% de neumonía.

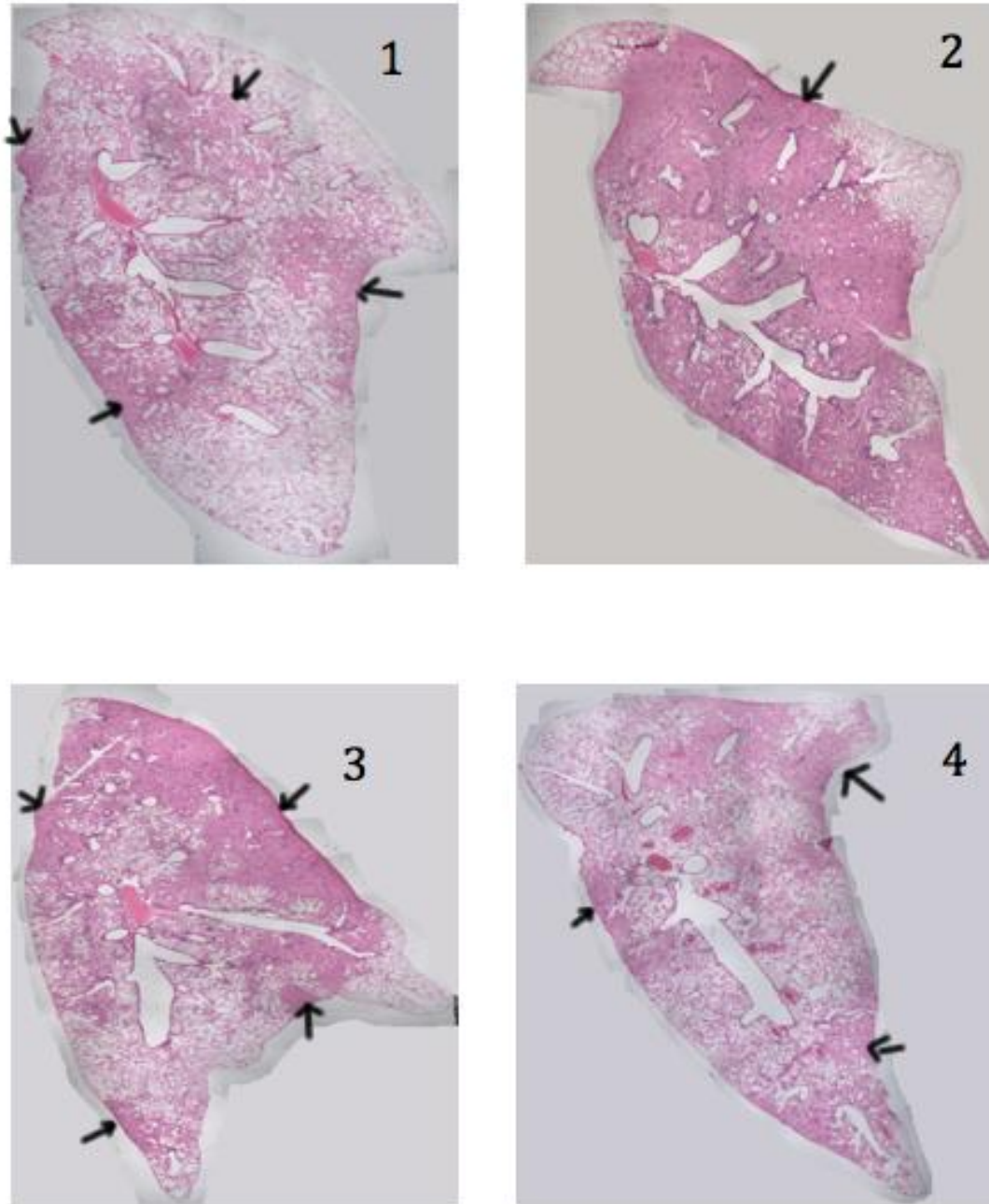


Figura [29]. **Imagen representativa de el área afectada por neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 583 2 meses.** Fotos representativas de porcentajes de neumonía en pulmón (área consolidada en pulmón, regiones oscuras) de la prueba de protección a los 2 meses. No.1 grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a la dosis de 8,000 UFCs. No.2 Grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a la dosis de 16,000 UFCs. No.3 Grupo inmunizado con la bacteria única mutante. No.4 Grupo vacunado con la vacuna BCGph.

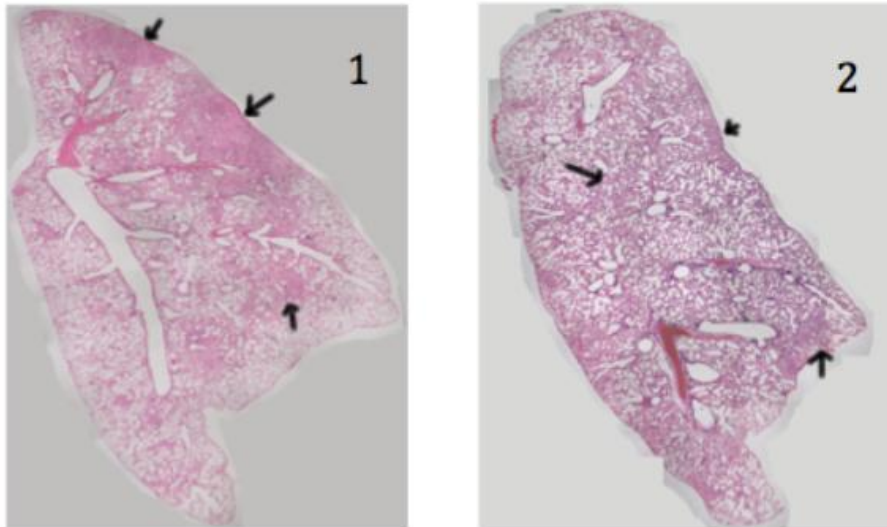


Figura [30]. Imagen representativa de el área afectada por neumonía en pulmón de los individuos retados con la cepa 583 3 meses. Fotos representativas del porcentaje de neumonía (área consolidada en pulmón, regiones oscuras) de la prueba de protección del reto con 583 a los 3 meses. No.1 grupo vacunado con BCGph con un porcentaje de neumonía cercano al 45%. No. 2 grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a 8,000 UFCs con una neumonía aproximada de 50%.

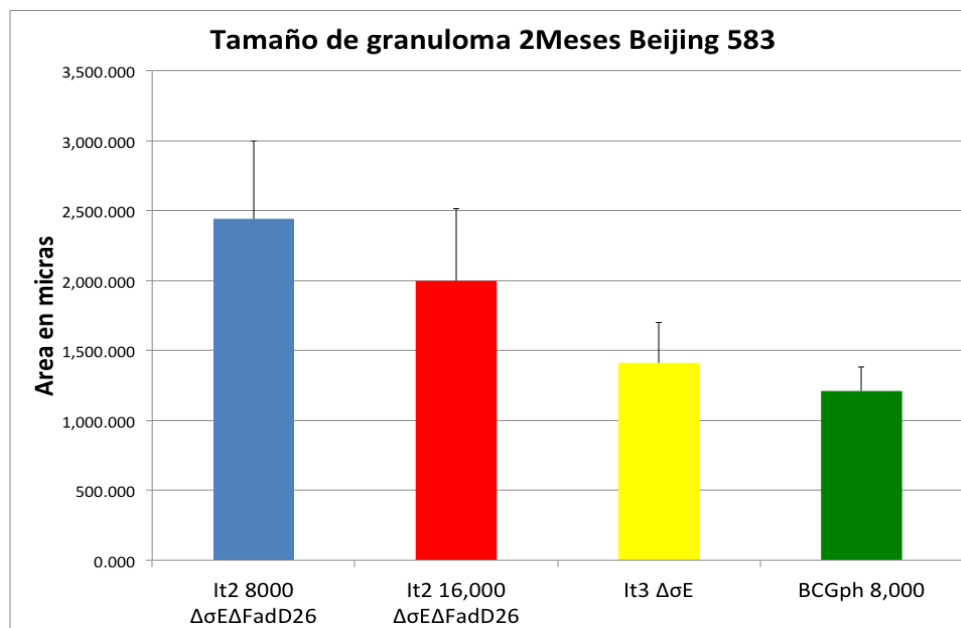


Figura [31]. Tamaño de los granulomas en los individuos retados con la cepa 583. 2 meses post-reto con 583. Los granulomas del grupo de animales inmunizados con la bacteria doble mutante a 8,000 UFCs (azul) tuvieron un tamaño, más grandes que los granulomas observados en los otros grupos de animales. Hay diferencia significativa entre este grupo, el grupo vacunado con BCGph y el grupo inmunizado con la bacteria única mutante (amarillo).

Para conocer la posible diseminación de la bacteria a otros órganos se realizaron las UFCs de los bazos, ya que en esta área hay un gran flujo de sangre y gran presencia de celular del sistema inmune. No se presentaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos, ni a los 2 ni a los 3 meses post infección, todos los grupos presentando carga bacilar baja en bazo. Fig.[32].

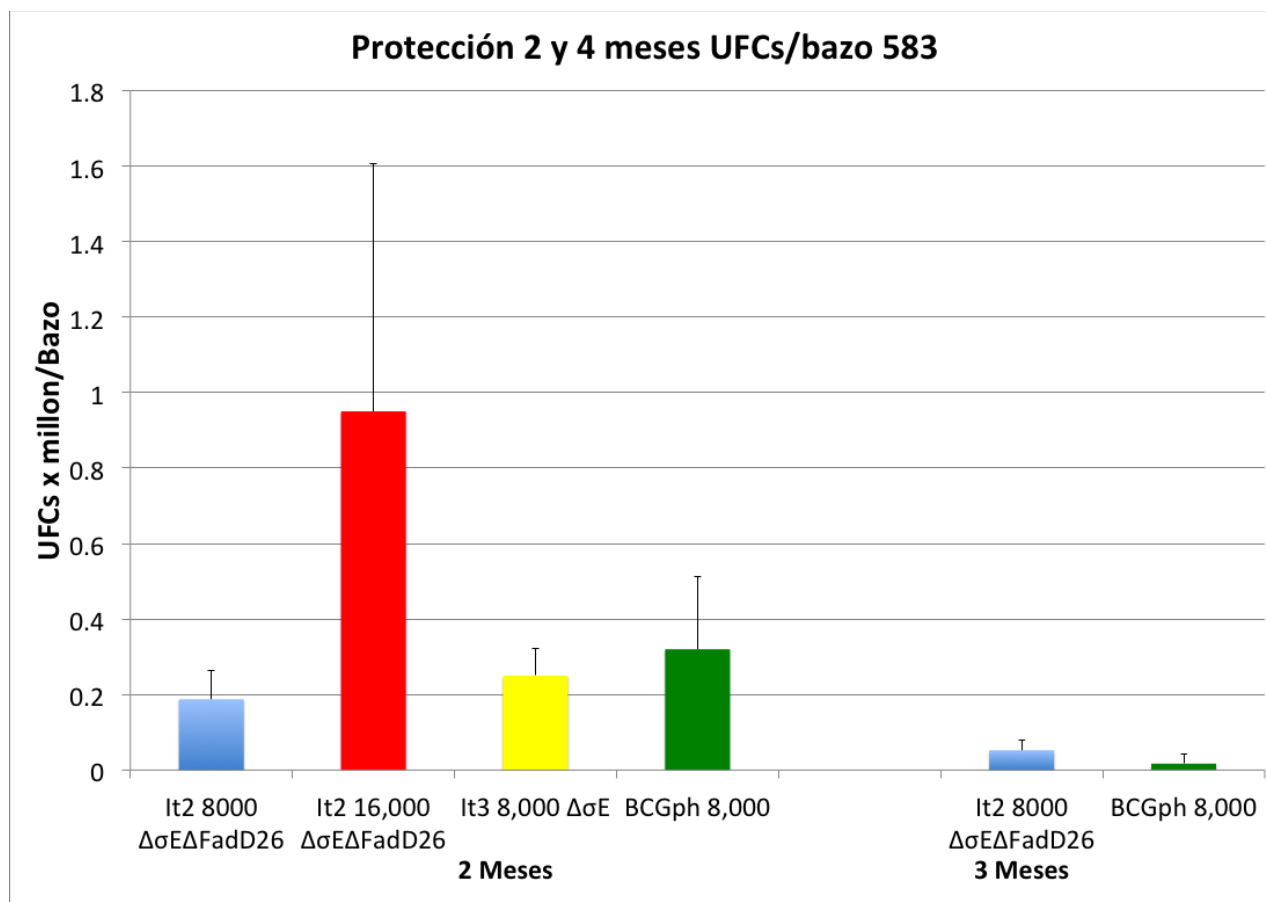


Figura [32]. **Carga bacilar en bazo de individuos retados con la cepa 583.** Hubo diferencia significativa entre el grupo inmunizado con la cepa doble mutante a 8,000 UFCs (azul) y el grupo inmunizado con la bacteria doble mutante a 16,000 UFCs (rojo). A los 3 meses que se termino el experimento los animales inmunizados con la bacteria doble mutante a 8,000 UFCs (azul) y los animales del grupo vacunado con BCGph (verde) presentaron niveles muy similares de carga bacilar en bazo.



## 10. Discusión de resultados.

Durante la infección de *M. tuberculosis* al organismo, la bacteria, tiene que enfrentar distintos ambientes que ofrecen diferentes tipos de estrés, estos están determinados por el área en la que se ubica y el tipo de respuesta inmune que desencadena. Por ende es muy importante que la bacteria tenga la capacidad de adaptarse a estos diferentes cambios y presente un sistema de regulación de expresión de genes muy específico, lo que juega un papel fundamental en la patogenicidad de la bacteria.

Los factores de transcripción son proteínas que se asocian de manera específica a la RNA polimerasa para promover la unión a el DNA de la bacteria para regular el perfil de expresión génica. Algunos de los principales factores de transcripción son los factores de dos componentes como mprAB o PhoPQ (Zahrt et al. 2003)(Pang et al. 2011)(White et al. 2010) y los factores sigma (Rodrigue et al. 2006).

De los factores sigma el factor sigma E, del grupo EFC (Manganelli et al. 2004), tiene una gran actividad sobre la regulación del metabolismo de la bacteria cuando esta bajo distintos tipos de estrés de superficie (Manganelli et al. 2004). Su regulon incluye la expresión múltiples genes asociados a la respuesta a estrés, como la síntesis y degradación de ácidos grasos, síntesis de proteínas chaperonas, activación de regulación de dos componentes, síntesis de ácidos micólicos (Rodrigue et al. 2006).

En estudios previos, el grupo de investigación del Dr. Ricardo Manganelli desarrolló una bacteria mutante a la cual se le deleteo el gen que codifica para sigma E y se reconoció el indispensable papel de este factor de transcripción en la respuesta distintos tipos de estrés, demostrando que la mutante tenia menor capacidad de crecimiento en distintos ambientes estresantes, como el interior de macrófagos o medios ricos en agentes oxidantes (Rodrigue et al. 2006).

Posteriormente al realizar pruebas con la misma bacteria mutante se evaluó su capacidad como vacuna, analizando su virulencia y la protección que confería. Esta demostró conferir mejor protección que la vacuna estándar BCGph, por lo cual se

decidió utilizar como candidato a vacuna. Puesto que el comité de vacunas europeo exige al menos dos mutaciones en vacunas de bacterias vivas atenuadas se decidió generar también una mutación en el gen que codifica para el factor de transcripción fadD26, responsable de la síntesis de una Acyl-coA responsable de la producción de ácidos micólicos de pared celular (Siméone et al. 2010). La bacteria con esta mutación fue un buen candidato ya que previamente se había estudiado una bacteria mutante del gen que codifica para fadD26 como vacuna (Infante et al. 1996), y esta confería un buen grado de protección. Por estas razones se decidió utilizar una bacteria que tuviera mutación en ambos genes (sigma E y fadD26) para analizar su grado de atenuación y su capacidad protectora como vacuna.

En 2013 la tuberculosis fue la causa número uno de muerte en personas infectadas con VIH/SIDA (WHO. Global tuberculosis report 2014). Por esta razón es de suma importancia el desarrollo de una vacuna segura y de baja virulencia. En este estudio utilizamos dos tipos de ratones inmunosuprimidos, para evaluar la bacteria doble mutante en un individuo que presente una condición similar a la de una persona inmunosuprimida. Para evaluar la virulencia de la bacteria doble mutante se utilizaron los ratones desnudos o “NUDE”, que son ratones con una mutación en FoxN1 que provoca que no desarrollen un timo funcional, lo que impide la correcta maduración de linfocitos T; y también se utilizaron ratones SICD, que tienen una doble inmunosupresión, ya que al tener los genes RAG-1 y RAG-2 mutados, no tienen maduración ni de linfocitos T ni de linfocitos B.

Al comparar la virulencia de la bacteria doble mutante contra el estándar vacunal BCG se decidió utilizar la cepa de BCGph (Filadelfia por sus siglas en inglés), que previamente fue seleccionada de un estudio donde se analizaron 10 subcepas de BCG y está demostró conferir la mejor protección (Castillo-Rodal et al. 2006).

En este estudio se comprobó que la bacteria doble mutante tenía un mayor grado de atenuación que la cepa BCGph, ya que en ambos casos los grupos vacunados con la bacteria doble mutante tuvieron mejor supervivencia que los del grupo vacunado con BCGph. Aunque estos animales estuviesen inmunosuprimidos aún contaban con macrófagos y monocitos, siendo posiblemente estos los responsables del control de la infección.

Se reconoce la relevancia del factor sigma E como regulador de la expresión de enzimas relacionadas con la producción de ácidos grasos de pared celular y ácidos micólicos, este en conjunto con el fadD26 se ha demostrado, que al ser eliminados dichos genes disminuye la capacidad de crecimiento en macrófagos, ya que no pueden reemplazar los ácidos grasos dañados de la pared celular, gracias a que la bacteria doble mutante no tiene la capacidad de regenerar estos ácidos grasos o sintetizar nuevos para estabilizar la carga de los dañados por mecanismos como el de *gtlA* o *icl1*, precursores de enzimas indispensables para la síntesis de la pared celular (Datta et al. 2011). Tampoco es capaz de eliminar las cargas negativas de los radicales libres encontrados en el fagolisosoma del macrófago, que normalmente podrían ser estabilizados por ácidos micólicos (Siméone et al. 2010, Infante et al. 1996).

Continuando con el estudio de la atenuación de la bacteria doble mutante se probó en ratones BALB/c inmunológicamente competentes, con los cuales se siguió el modelo de tuberculosis pulmonar (Hernández P 1997). Comparando la bacteria doble mutante contra su predecesora la cepa única mutante  $\Delta\sigma E$  y su cepa parental H37Rv y se comprobó que la bacteria doble mutante tiene una mayor atenuación ya que los animales infectados con la bacteria doble mutante tuvieron mejor supervivencia correlacionada con una menor carga bacilar en pulmón con respecto a las otras bacterias control utilizadas.

Para que el organismo pueda controlar y combatir una infección provocada por microorganismos intracelulares como *M. tuberculosis* es importante tener la participación de linfocitos T y citocinas de perfil Th1, proinflamatorias (Hernández P 1996). Por esta razón es importante comprobar que la bacteria doble mutante genere una respuesta inmune enfocada hacia un perfil Th1.

Esto fue evaluado a través del análisis de los perfiles de expresión de citocinas durante la cinética de virulencia del modelo experimental murino de tuberculosis pulmonar (Hernández P 1997). El grupo infectado con la bacteria doble mutante tuvo una alta expresión de citocinas pro-inflamatorias sobre todo INF $\gamma$  que ayuda a la activación de los macrófagos para la eliminación del bacilo, por la alta expresión de esta citocina en la primera parte de la enfermedad se tiene un mejor control de la

misma, por ende estos ratones pudieron vivir más y estar en mejor condición, también mantuvo niveles altos y constantes de TNF $\alpha$ , citocina que está asociada a la formación de granulomas, estructuras características de la infección, y la producción de INF $\gamma$ . La respuesta producida por la bacteria doble mutante fue muy enfocada hacia un perfil Th1, por su alta producción de INF $\gamma$  y TNF $\alpha$ , citocinas características de este perfil, en el caso de la iNOs, citocina necesaria para promover la producción de radicales libres en el macrófago necesarios para eliminación del bacilo, no se vieron niveles de expresión muy altos en el grupo de la bacteria doble mutante, pero estos se mantienen constantes a lo largo de la infección, lo cual indica que se mantiene una constante eliminación del bacilo para el control de la infección. La conjunción de los niveles de estas citocinas correlaciona con los bajos niveles de carga bacilar y la mejor supervivencia del grupo de ratones infectados con la bacteria doble mutante.

Para corroborar estos resultados también se midió una citocina característica de un perfil de citocinas Th2, la IL 4, y el grupo infectado por la bacteria doble mutante mantuvo niveles de expresión muy bajos durante todo el experimento, lo que nos confirma que despierta principalmente una respuesta hacia un perfil Th1.

Ya que la actual vacuna de BCG no es muy eficiente y presenta una protección muy variable, es necesario diseñar una vacuna más efectiva, la cual pueda conferir una mejor protección a la enfermedad, por esta razón se realizó un experimento de protección, el cual consistió en vacunar grupos de animales con las diferentes bacterias mutantes y BCGph, para analizar la posibilidad de que la respuesta inmune contra la bacteria doble mutante pueda ser menor debido a las dos mutaciones que presenta. Se contempló la idea de utilizar dos dosis diferentes de esta bacteria doble mutante, una concentración estándar de 8,000 UFCs y otra de 16,000 UFCs, esperando que la segunda confiriera mejor protección.

A los animales se les dio 2 meses para permitir que estos formaran una inmunidad duradera, a los 2 meses se les dio un reto con una cepa hipervirulenta de la familia Latino Americana Mediterránea (LAM) 5186, aislado clínico de Orizaba (Marquina-Castillo 2009). El objetivo de utilizar una cepa hipervirulenta fue esperar que al forzar al organismo a responder ante una cepa tan agresiva pudiéramos observar

de manera más clara las diferencias entre la protección brindada por las distintas bacterias mutantes y BCGph. Se realizaron los sacrificios a los 2 y 4 meses con la expectativa de confirmar si la protección que conferían las bacterias mutantes era duradera o si está se perdía con el paso del tiempo como es el caso de BCG (Castillo-Rodal et al. 2006).

Los animales vacunados con la bacteria doble mutante presentaron una mejor sobrevida en ambos casos con respecto a la bacteria única mutante y BCGph. Sin embargo la bacteria doble mutante a la dosis de 8,000 UFCs presentó niveles más bajos de carga bacilar y daño en pulmón por neumonía, mientras que la protección en el grupo de animales vacunados con la dosis de 16,000 UFCs es muy variable y poco efectiva, ya que algunos integrantes de este grupo presentaron niveles muy altos de carga bacilar en pulmón y gran cantidad de área del pulmón afectada por neumonía, confirmando que la dosis estándar de 8,000 UFCs es la mejor opción para utilizar la cepa doble mutante.

Uno de los primeros mecanismos de defensa del individuo es la formación de granulomas, que están presentes durante la primera fase de la infección, estos son estructuras dinámicas formadas por un centro caseoso (tipo de necrosis de apariencia similar al queso, en humanos), un anillo formado por macrófagos con poca capacidad de fagocitación y una corona de linfocitos T, por lo general son de alrededor de 2,000 micras de diámetro. El objetivo de esta estructura es contener al bacilo y eliminarlo generando un ambiente de hipoxia. Una de las citocinas asociadas a su formación es el TNF $\alpha$ , este suele desaparecer al ir avanzando la infección.

Un buen control de infección está asociado a una presencia de muchos granulomas de buen tamaño y con bordes bien definidos durante los inicios de la infección. Al analizar la presencia de granulomas pudimos ver que los animales vacunados con la bacteria doble mutante tenían una mayor cantidad de granulomas en comparación con los otros grupos y puesto que dichos granulomas tenían un tamaño de alrededor de 4,000 micras con bordes bien definidos se habla de un mejor control de la infección y por lo tanto una buena sobrevida. Al eliminarse eficientemente el bacilo se observaron cargas bacilares en pulmón más bajas.

Comparando la bacteria doble mutante contra el estándar de vacunación BCG, en este caso la sub-cepa BCGph, podemos observar que la bacteria doble mutante a la dosis de 8,000 UFCs confiere una protección mayor que BCGph. Los animales del grupo vacunado con la bacteria BCGph tuvieron niveles de carga bacilar más altos que los animales del grupo de la bacteria doble mutante, estos altos niveles de carga bacilar estuvieron acompañados de una gran área de pulmón afectada por neumonía, teniendo los miembros de este grupo aproximadamente el 70% del área afectada, con granulomas de unas 2,000 micras con bordes poco definidos, mientras que los animales del grupo de la doble mutante tenían cerca del 40% del área del pulmón afectada por neumonía. Razones por las cuales solo el 20% de los individuos de este grupo llegaron al final de la prueba.

En el segundo experimento de protección cuando se realizó el reto con la cepa hipervirulenta de la familia Beijing 583, la bacteria doble mutante a 8,000 UFCs ofreció una protección similar a la de BCGph, pues tuvo una carga bacilar menor a la que presentó el grupo vacunado con BCGph, aunque tuvo un área de pulmón dañada por neumonía muy parecida a BCGph, con 33% de neumonía para el grupo vacunado con la bacteria doble mutante y alrededor del 40% para el grupo vacunado con BCGph. La bacteria doble mutante confirió mejor protección que la bacteria única mutante, pues en el grupo vacunado con la bacteria única mutante hubo mayor carga bacilar en pulmón y una mayor área afectada por neumonía que en los animales del grupo vacunado con la bacteria doble mutante a 8,000 UFCs. Ninguno de los grupos fue capaz de llegar a los 4 meses, por lo que se requirió realizar un sacrificio de los animales restantes a los 3 meses. Previo a esta fecha de sacrificio se perdieron todos los animales del grupo vacunado con la bacteria doble mutante a 16,000 UFCs. Los animales pertenecientes a este grupo murieron rápidamente, debido a que a los 2 meses ya tenían una carga bacilar muy alta y una gran cantidad de neumonía. Solo se tuvo el 40% de los animales del grupo de la bacteria doble mutante a 8,000 UFCs al día de sacrificio, el cual como se observa en la gráfica de supervivencia fue una semana antes del de BCGph. Estos animales murieron rápidamente posiblemente por la pérdida de la protección, ya que la cepa hipervirulenta 583 ha demostrado ser muy agresiva. Ya que es sabido que la vacuna BCGph tiene una gran variabilidad en cuestión de la protección que

confiere, aun entre las subcepas de BCG, algunas confiriendo mejor protección que otras ( Castillo-Rodal et al. 2006).

## 11. Conclusión.

En el presente estudio probamos que la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) presenta una mayor atenuación que la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) y que la vacuna estándar BCG (Phipps). Se comprobó que la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) ofrece un mayor grado de protección frente a una cepa hipervirulenta de la familia Latino Americana-Mediterránea (LAM) 5186, que la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ) y la vacuna BCG (Phipps).

Mientras que en el caso del reto con la cepa hipervirulenta de la familia Beijing 583, la protección conferida por la bacteria doble mutante ( $\Delta\sigma E \Delta fadD26$ ) fue similar a la conferida por BCG (Phipps) y mayor que la conferida por la bacteria única mutante ( $\Delta\sigma E$ ).



## 12. Bibliografía.

1. **Abbas A.K.** Inmunología celular y molecular 6ª edición. Ed. Elseiver Saunders.2009.
2. **Barry CE** 3rd. Interpreting cell wall 'virulence factors' of *Mycobacterium tuberculosis*. Trends in Microbiology, 9:237-241, 2001.
3. **Blomgran R**, Desvignes L, Briken V, Ernst JD. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. Cell Host Microbe, 11:81-90, 2012.
4. **Bloom BR**, Fine PEM. The BCG experience; implications for future vaccines against tuberculosis. En Bloom BE, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington (DC). American Society for Microbiology. pp. 531-557, 1994.
5. **Blumenthal R.L.**, D. E. Campbell, P. Hwang, R. H. DeKruyff, L. R. Frankel, and D. T. Umetsu, "Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells," Journal of Allergy and Clinical Immunology 107:258–264, 2001.
6. **Brightbill HD**, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisic JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science 285:732-736, 1999.
7. **Browning D.F.**, Busby S.J. The regulation of bacterial transcription initiation. Nature Reviews. Microbiology 2:57-65, 2004.
8. **Castillo-Rodal A**, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R, Calva JJ, Sada-Díaz E, López-Vidal Y. *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. Infection and Immunity 74:1718–1724, 2006.
9. **Castillo-Rodal A**, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R, Calva JJ, Sada DE, López-Vidal Y, BCG sub strains confers different protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. Infection and Immunology 74: 1718–1724. doi: 10.1128/iai.74.3.1718-1724.2006.
10. **Cervantes AR**, Hernández-Pando R, Biragyn A, Castañeda-Delgado J, Bodogai M, Martínez-Fierro M, Sada E, Trujillo V, Enciso-Moreno A, Rivas-Santiago B. Prime- boost BCG vaccination with DNA vaccines based in  $\beta$ -defensin-2 and mycobacterial antigens ESAT6 or Ag85B improve protection in a tuberculosis experimental model. Vaccine 31:676-684, 2013.
11. **Chatterjee D.**, Khoo KH. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. Glycobiology. 8:113-127, 1997
12. **Ciraci C**, Janczy JR, Sutterwala FS, Cassel SL. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. Microbes Infection / Institute Pasteur 14:1263–1270, 2012.
13. **Cole S.T.**, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M.-A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead & B. G. Barrell. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 393:537-544, 1998.

14. **Dahl, K. E.**, H. Shiratsuchi, B. D. Hamilton, J. J. Ellner, and Z. Toossi. Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 64:399–405, 1996.
15. **Datta P**, Shi L, Bibi N, Balázs G, Gennaro M.L. Regulation of central metabolism genes of *Mycobacterium tuberculosis* by parallel feed-forward loops controlled by sigma factor E ( $\sigma(E)$ ). *Journal of Bacteriology*. 193:1154–1160, 2011.
16. **Doná V.**, Rodrigue S., Dainese E., Palù G., Gaudreau L., Manganelli R., Provvedi R. Evidence of complex transcriptional, translational, and posttranslational regulation of the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 190:5963–5971, 2008.
17. **Dutta NK**, Mehra S, Martínez AN, Álvarez X, Renner NA, Morici LA, Pahar B, MacLean AG, Lackner AA, Kaushal D. The Stress-Response Factor SigH Modulates the Interaction between *Mycobacterium tuberculosis* and Host Phagocytes. *Plos One*7(1):e28958, 2012.
18. **Fernandez ND**, Qi-Long Wu, Dequan Kong, Xiaoling Puyang, Sumeet Garg, and Robert N. Husson. A Mycobacterial Extracytoplasmic Sigma Factor Involved in Survival following Heat Shock and Oxidative Stress. *Journal of Bacteriology* 181:4266 – 4274, 1999.
19. **Fine P. E.** Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 346:1339–1345, 1995.
20. **Fontan PA**, Voskuil MI, Gomez M, Tan D, Pardini M, Manganelli R, Fattorini L, Schoolnik GK, Smith I. The *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor sigmaB is required for full response to cell envelope stress and hypoxia in vitro, but it is dispensable for in vivo growth. *Journal of Bacteriology* 191:5628-5633, 2009.
21. **Gold B**, Rodriguez GM, Marras SA, Pentecost M, Smith I. The *Mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Molecular Microbiol* 42:851-865, 2001.
22. **Goldman RC**, Plumley KV, Laughon BE. The evolution of extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB): history, status and issues for global control. *Infectious Disorders Drug Targets* 7:73-91, 2007.
23. **Guirado E.**, Schlesinger LS. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma – the critical battlefield in host immunity and disease. *Frontiers in Immunology* 4:98, 2013.
24. **Hayakawa E**, Tokumasu F, Nardone GA, Jin AJ, Hackley VA, Dvorak JA. A mycobacterium tuberculosis derived lipid inhibits membrane fusion by modulating lipid membrane domains. *Biophysical Journal* 93:4018-4030, 2007.
25. **Hernández R**, Orozco H, Sampieri A, Pavon L, Velasquillo C, Larriva Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89:26–33, 1996.
26. **Hernández R**, Pavon L, Arriaga K, Orozco EH, Madrid MV, Rook GAW. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacteria saprophyte before infection. *Infection and Immunity* 65:3317–3327, 1997.

27. **Hernández R**, Aguilar LD, Smith I, Manganelli R Immunogenicity and protection induced by a *Mycobacterium tuberculosis sigE* mutant in a BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity* 78:3168–3176, 2010.
28. **Hernández R**, Marquina-Castillo B, Barrios-Payán J, Mata-Espinosa D. Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution* 12: 725–731. 2012.
29. **Hughes KT**, Mathee K. The anti-sigma factors. *Annual Reviews of Microbiology* 51: 231-286, 1998.
30. **Infante E.**, L. D. Aguilar, B. Gicquel and R. Hernández Pando. Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium tuberculosis fadD26* mutant. *Clinical and Experimental Immunology* 141:21-28, 2005.
31. **Kleinnijenhuis J**, Oosting M, Joosten LA, Netea MG, Van Crevel R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Developmental Immunology* 2011:405310, 2011.
32. **Kuma A**, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432:1032-6, 2004.
33. **Johnson M.M.**, John A. Odell. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease* 6:210-220, 2014.
34. **Liu X**, Wang Q, Chen W, Wang C.. Dynamic regulation of innate immunity by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Cytokine Growth Factor Review* 24:559–570, 2013
35. **Lucey, D. R.**, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiology Review* 9:532–562, 1996.
36. **Lyons C.R.** , E. J. Ball, G. B. Toews, J. C. Weissler, P. Stastny, and M. F. Lipscomb, “Inability of human alveolar macrophages to stimulate resting T cells correlates with decreased antigen-specific T cell-macrophage binding,” *Journal of Immunology* 137: 1173–1180, 1986.
37. **Manganelli R**, Voskuil MI, Schoolnik GK, Smith I. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor SigE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Molecular Microbiology* 41:423–437, 2001.
38. **Manganelli R**, Voskuil MI, Schoolnik GK, Dubnau E, Gomez M, Smith I. Role of the extracytoplasmic-function sigma factor  $\sigma_H$  in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Molecular Microbiology* 45:365–374, 2002.
39. **Manganelli R**, Proveddi R, Rodrigue S, Beaucher J, Gaudreau L, Smith I. Sigma factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 186:895–902, 2004.
40. **Marquina-Castillo B**, Garcia-Garcia L, Ponce de León A, Jiménez-Corona ME, Bobadilla Del Valle M, Cano-Arellano B, Canizales-Quintero S, Martínez-Gamboa A, Kato Maeda M, Robertson B, Young D, Small P, Schoolnik G, Sifuentes-Osornio J, Hernández-Pando R. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology* 128:123-133, 2009.

41. **Mayer-Barber D**, Andrade BB, Barber DL. Innate and adaptative interferons suppress IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production by distinct pulmonary myeloid subsets during Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunity* 35:1023-1034, 2011.
42. **Miglioei GB**, Loddenkemper R, Blasi F, Raviglione MC. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic?. *European Respiratory Journal* 29:423-427, 2007.
43. **Mishra AK**, Driessen NN, Appelmelk BJ, Besra GS. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: Structure, biogenesis and role in mycobacterium tuberculosis physiology and host-pathogen interaction. *FEMS Microbiology Reviews* 35:1126-1157, 2011.
44. **Murray J.F.** Historical development of tuberculosis since Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus in 1882. *Pneumonologie* 61:764-770, 2007.
45. **Mukherjee R**, Chatterji D. Evaluation of the role of sigma B in Mycobacterium smegmatis. *Biochemical Biophysical Research Communications* 338:964-72, 2005.
46. **Murray, P. J.**, L. Wang L, Onufryk C, Tepper RI, Young RA. T cell-derived IL 10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *Journal of Immunology* 158:315–321, 1997.
47. **O'Neill, L. A., and C. Greene.** Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *Journal of Leukocyte Biology* 63:650–657, 1998.
48. **Palomino JC**, Leao SC, Ritacco V. "Tuberculosis 2007" From basic science to patient care. BourcilliereKamps. 2007.
49. **Pang X**, Cao G, Neuenschwander PF, Haydel SE, Houa G, and Howardb ST. The  $\beta$ -propeller gene Rv1057 of Mycobacterium tuberculosis has a complex promoter directly regulated by both the MprAB and TrcRS two-component systems. *National institute of Health Tuberculosis, Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* . Vol.91 S142-s149, 2011.
50. **Perskyist N**, Roberg F, Kulyt'e A, Stendahl O. Rab5a GTPase regulates fusion between pathogen –containing phagosomes and cytoplasmic organelles in human neutrophils. *Journal of Cell Science* 115:1321-1330, 2002.
51. **Pino P.P.**, Carlos Gassiot Nuño. Tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples drogas. *Acta Medica* 8:110-117, 1998.
52. **Ramaswamy SV**, Reich R, Dou SJ, Jasperse L , Pan X, Wanger A, Quitugua T, Graviss EA. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1241-1250, 2003.
53. **Rappuoli R**, Pizza M, Del Giudice G, De Gregorio E. Vaccines, new opportunities for a new society. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:12288-12293, 2014.
54. **Riley L.W.** Of mice, men's and elephants: Mycobacterium tuberculosis cell envelop lipids and pathogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 116:1475 – 1478, 2006.
55. **Riley R.L.**, Mills CC, O'Grady F, Sultan LU, Wittstadt F and Shiypuri DN. Infectiousness of air from a tuberculosis ward, Ultraviolet irradiation of infected air: comparative infectiousness of different patients. *The American Review of Respiratory Disease* 85:511-525, 1962.

56. **Rook GAW**, Hernández Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Review of Microbiology* 50:259-284, 1996.
57. **Rodrigue S.**, Provvedi R, Pierre-Etienne Jacques, Gaudreau L, Manganelli R. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews* 30:926-941, 2006.
58. **Schroder K**, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 75:163-189, 2004.
59. **Seddon JA**, Visser DH, Bartens M. Impact of drug resistance on clinical outcome in children with tuberculous meningitis. *Pediatric Infectious Disease Journal* 31:711-716, 2012.
60. **Siméone R**, Léger M, Constant P, Malaga W, Marrakchi H, Daffe M, Guilhot C, Chalut C. Delineation of the roles of FadD22, FadD26 and FadD29 in the biosynthesis of phthiocerol dimycocerosates and related compounds in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Journal* 277:2715–2725, 2010.
61. **Smith DA**, Parish T, Stoker NG, Bancroft GJ. Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infection and Immunity* 69:1142–1150, 2001.
62. **Sugawara I**, Yamada H, Mizuno S, Iwakura Y. IL-4 is required for defense against mycobacterial infection. *Microbiology Immunology* 44:971– 979, 2000.
63. **Toossi, Z.**, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *Journal of Immunology* 154:465–473, 1995.
64. **Uehira K**, Amakawa R, Ito T. Dendritic cells are decreased in blood and accumulated in granuloma in tuberculosis. *Clinical Immunology* 105:296-303, 2002.
65. **Van Crevel R**, Ottenhoff TH, van der Meer JW Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Review* 15:294–309, 2002.
66. **Vanden Driessche K**, Persson A, Marais BJ, Fink PJ, Urdahl KB. Immune vulnerability of infants to tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology* 2013:781320, 2013.
67. **Vergne I**, Chua J., Deretic V. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel CA2+/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *The Journal of Experimental Medicine* 198:653-659, 2003.
68. **Voskuil M.I.**, Bartek I.L., Visconyi K., Schoolnik G.K. The response of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. *Frontiers in Microbiology* 2:105, 2011.
69. **White MJ**, He H, Penoske RM, Twining SS, Zahrt TC. PepD participates in the mycobacterial stress response mediated through MprAB and SigE. *Journal of Bacteriology* 192:1498–1510, 2010.
70. **White MJ**, Savaryn JP, Bretl DJ, He H, Penoske RM, Terhune SS, Zahrt TC. The HtrA-like serine protease PepD interacts with and modulates the *Mycobacterium tuberculosis* 35-kDa antigen outer envelope protein. *PLoS One* 6:e18175, 2011.
71. **WHO. Global tuberculosis report.** World Health Organization, Geneva; 2014.
72. **WHO. World Health Organization.** Global Vaccine Action Plan 2011-2020. Available at [www.who.int/immunization/](http://www.who.int/immunization/). 2013.

73. **Wösten MM**. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiology Review* 22:127-150, 1998.
74. **Wösten MM, Boeve M**, Gaastra W, van der Zeijst BA. Cloning and characterization of the gene encoding the primary sigma-factor of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiology Letters* 162:97-103, 1998.
75. **Xiang Y**, Koomen JM. Evaluation of direct infusion-multiple reaction monitoring mass spectrometry for quantification of heat shock proteins. *Analytic Chemistry* 84:1981- 1986, 2012.
76. **Yuk JM**, Jo EK Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis. *Clinical and Experimental Vaccine Research* 3:155–167, 2014.
77. **Zahrt TC**, Deretic V. Mycobacterium tuberculosis signal transduction system required for persistent infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:12706–12711, 2001.