



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTANDARIZACIÓN DE UN METODO DE EXTRACCIÓN Y
PURIFICACION DE RNA DE PULMONES DE RATONES INFECTADOS
CON *Mycobacterium tuberculosis***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

AXEL CERVANTES SÁNCHEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: RUTH EDITH MARTIN FUENTES

VOCAL: Profesor: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA

SECRETARIO: Profesor: DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA

1er. SUPLENTE: Profesor: FRANCISCO JAVIER DIAZ GARCIA

2° SUPLENTE: Profesor: ALBERTO GARCIA LOZANO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE PATOLOGÍA
EXPERIMENTAL. INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA

SUSTENTANTE:

AXEL CERVANTES SÁNCHEZ

INDICE GENERAL

Abreviaturas	iii
1 Introducción	1
2 Antecedentes	2
2.1 Tuberculosis	2
2.2 Epidemiología	3
2.3 Patogénesis de la tuberculosis	5
2.4 Inmunología de la tuberculosis	8
2.4.1 Respuesta inmune innata	8
2.4.2 Respuesta inmune adaptativa	10
2.4.3 Evasión de la respuesta inmune	12
2.5 Agente etiológico	13
2.5.1 Características microscópicas	13
2.5.2 Características en cultivo	14
2.5.3 La pared celular de las micobacterias	14
2.6 Modelos animales para el estudio de la tuberculosis	16
2.7 Modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratón	18
2.8 Técnicas moleculares	20
2.8.1 Evaluación de la pureza de ácidos nucleicos	20
2.8.2 Electroforesis	21
2.8.3 La reacción en cadena de la polimerasa	23
2.8.4 Transcripción reversa	26
2.8.5 PCR en tiempo real	26
3. Justificación	29
4. Hipótesis	29
5. Objetivos	30
6. Procedimiento experimental	31

6.1 Preparación del inóculo	31
6.2 Infección intra-traqueal	33
6.3 Sacrificio	33
6.4 Extracción de RNA	33
6.5 Síntesis de cDNA	35
6.6 PCR	37
7. Resultados	41
7.1 Determinación de sobrevivencia	41
7.2 Pureza del RNA	42
7.3 Determinación de la calidad del RNA	43
7.4 Determinación de la pureza del RNA eucariote/RNA procarionte	44
7.5 Expresión de genes por PCR en tiempo real	46
8. Discusión de resultados	50
9. Conclusiones	53
10. Bibliografía	54

ABREVIATURAS

AG: arabinogalactano

BCG: Bacilo de Calmette y Guérin

cDNA: Acido desoxirribonucleico complementario

CMTB: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

DAF: Diacetato de Fluoresceína

DC's: Células Dendríticas

DNA: Acido desoxirribonucleico

dNTP's: Desoxinucleosidos trifosfato

dsDNA: Acido desoxirribonucleico de doble cadena

DTT: Dithiothreitol

EtBr: Bromuro de etidio

G3PDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleucina

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

mAGP: complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano

MMLV-RT: Enzima retro-transcriptasa de virus de leucoblastoma

M ϕ s: Macrófagos

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Buffer salino de fosfatos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PG: Peptidoglicano

RNA: Ácido ribonucleico

RPM: revoluciones por minuto

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SUIVE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica

TB: Tuberculosis

TBA: Tuberculosis activa

TBL: Tuberculosis latente

TDM: Trehalosa-6,6'-dimicolato

T_m: Temperatura de fusión

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

ZN: Zielh-Neelsen

1. INTRODUCCION.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Mediante análisis genéticos, se estima que la especie progenitora de MTB es tan antigua como 3 millones de años. Esto sugiere que nuestros ancestros homínidos como el *Homo sapiens* pudieron haber sufrido ya de tuberculosis (Gutierrez MC, 2005). La tuberculosis ha sido documentada en Egipto hace 5,000 años, en la India hace 3,300 años, en China hace 2,300 años y fue estudiada por Hipócrates en la antigua Grecia (Thomas M. Daniel, 2006). MTB es considerado como el patógeno más exitoso en la historia de la humanidad (Vieira, 2011) y continua siendo un importante problema de salud pública mundial.

La TB ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad reemergente dada la aparición de cepas multi-resistentes a fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la enfermedad y por la co-infección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). La TB es la infección oportunista más común en las personas infectadas por el VIH en todo el mundo. La co-infección por VIH predispone tanto a la infección por MTB, como a la reactivación de la TB y modifica la historia natural y la presentación clínica de la enfermedad. La TB es la novena causa mundial de muerte y la primera por un agente infeccioso, por encima del VIH/SIDA. Sin tratamiento, la mortalidad puede llegar a ser hasta del 70% (WHO, 2018).

A pesar de los avances en el diagnóstico, prevención y tratamiento; la probabilidad de desarrollar la enfermedad de la tuberculosis es mucho mayor en personas infectadas con el VIH y particularmente en aquellas que viven en áreas marginadas y grupos vulnerables donde predomina la pobreza, la desnutrición y el hacinamiento, principalmente en países en vías de desarrollo. La infección se adquiere principalmente por vía aérea, afectando al sistema respiratorio (85%), aunque cualquier sitio extra-pulmonar puede ser infectado

La ausencia de medidas de control efectivas para la TB, el mejor conocimiento de los factores que determinan la eficacia de la respuesta inmune en contra de MTB

es considerada una prioridad de investigación. Desafortunadamente, aún no se conocen con claridad los principales factores de virulencia de MTB involucrados en su patogenicidad debido a que carece de los factores clásicos que tienen otras bacterias. Por esta razón muchas investigaciones están encaminadas hacia la búsqueda de factores importantes en la progresión de la enfermedad (Smith, 2003).

2. ANTECEDENTES

2.1 Tuberculosis

El término tuberculosis (TB) deriva del latín *tuberculum* (nódulo pequeño o protuberancia) y fue utilizado hasta 1839 para referirse a una enfermedad crónica, granulomatosa e infecto-contagiosa. La TB es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) la cual, según estimaciones históricas, apareció hace 70,000 años y que se mantuvo esporádica hasta el siglo XVIII, cuando se convirtió en una epidemia durante la revolución industrial debido a una mayor densidad de población y a condiciones de vida desfavorables (Bañuls Anne-Laure, 2015).

Aunque la TB puede afectar a cualquier persona, independientemente de su condición social, existen múltiples factores de riesgo para desarrollar la enfermedad entre los que se encuentran: la desnutrición, la diabetes mellitus, la pobreza, el alcoholismo, el tabaquismo, la insuficiencia renal y la co-infección con el VIH/SIDA. La mayoría de las personas infectadas con MTB permanecen asintomáticas, lo cual se denomina TB latente (TBL). Un tercio de la población mundial se clasifica dentro de esta definición y se estima que el 10% de estos presentará la TB activa (TBA) en algún momento de su vida, contagiando a otras personas que a su vez permanecerán asintomáticos, perpetuando el reservorio de la enfermedad.

La manifestación clínica más frecuente es la TB pulmonar ya que está íntimamente ligada con el mecanismo más efectivo de transmisión, es decir, la vía

aérea mediante la inhalación de bacilos (y el subsecuente ingreso al parénquima pulmonar) provenientes de personas enfermas que tosen y/o estornudan (WHO, 2018). Sin embargo, otros tejidos y órganos, como el sistema linfático, el sistema nervioso central, la pleura, hígado, bazo, huesos y articulaciones también son susceptibles a la infección por MTB y a las manifestaciones de la enfermedad (Golden Marjorie P., 2005). En 2012 Barrios y cols, demostraron que las micobacterias pueden persistir en los tejidos extra-pulmonares casi tan frecuentemente como en los pulmones y que se encuentran dentro de células con capacidades limitadas de presentación de antígenos, como las células epiteliales. La presencia micobacterias en células endoteliales en diversos órganos sugiere que MTB puede diseminarse por vía hematológica durante el proceso de infección (Barrios-Payan, 2012)

2.2 Epidemiología

La TB es considerada uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial. La OMS ha publicado un reporte global de TB cada año desde 1997, cuyo objetivo es proporcionar una evaluación actualizada de la epidemia de TB, así como los avances en prevención, diagnóstico y tratamiento a nivel global, regional y nacional. Esto se hace en el contexto de las estrategias mundiales recomendadas sobre TB y sus metas, así como de los objetivos de desarrollo general y los Objetivos de Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas.

Durante los últimos 13 años ha disminuido lentamente (~1.5% por año), la morbilidad continúa siendo sustancial. A nivel mundial se estima que hubo 10.0 millones de nuevos casos de TB (5.8 millones de hombres, 3.2 millones de mujeres y 1.0 millones de niños) de los cuales el 9% estaban coinfectados con el VIH/SIDA. En este mismo año, la TB causó un estimado de 1.3 millones de muertes en personas VIH-negativas y un adicional de 300,000 en personas VIH-positivas.

Además, en México el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), reportó que en el periodo 2000-2010 se registraron 197,211 nuevos casos de TB y en 2011 hubo 2,414 muertes debido a esta

enfermedad. En México, la diabetes mellitus tipo 2 y la desnutrición son las enfermedades que más se relacionan con la TB. En nuestro país la incidencia de TB se encuentra en descenso, con una reducción del 28.8% entre los años 1997 hasta 2011 (SINAVE, 2012). Para la OMS, en 2017 la incidencia fue de 29,000 nuevos casos, de los cuales 11,000 son mujeres y 18,000 son hombres, mientras que hubo 2000 muertes según datos reportados hasta diciembre de 2018 (WHO, 2018).

El informe de la OMS sugiere que los países pobres y aquellos en vías de desarrollo están fuertemente afectados por esta enfermedad ya que ellos representan la mayor cantidad de nuevos casos y muertes en todo el mundo (Figura 1) (WHO, 2018).

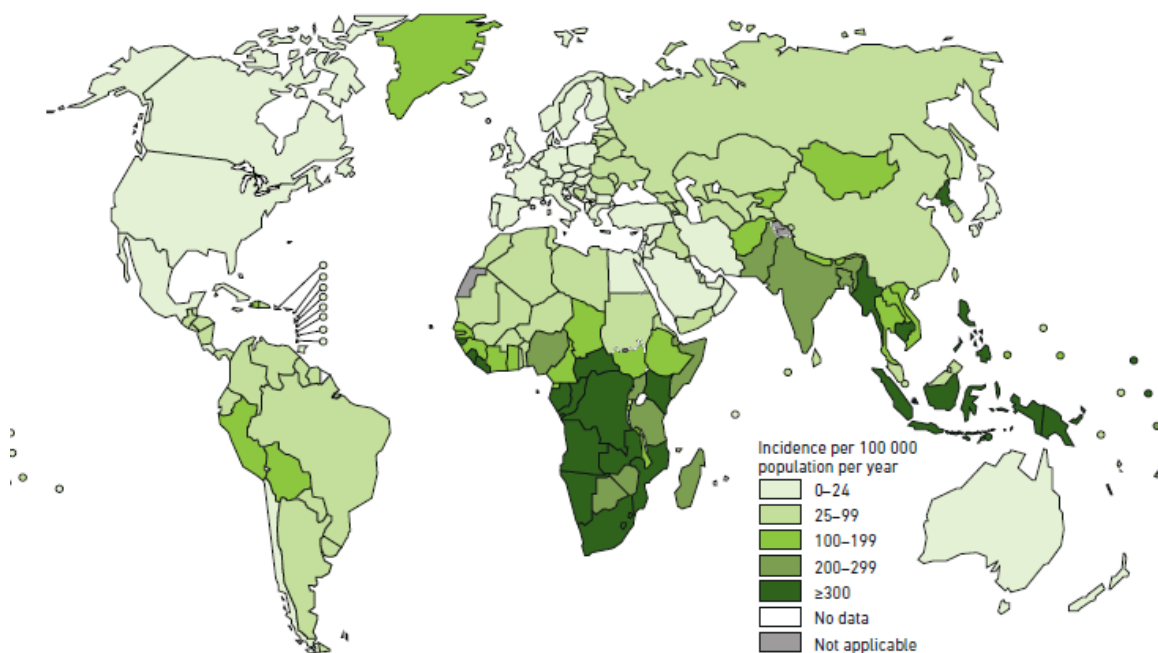


Figura 1. Rangos de incidencia de TB activa (pulmonar y extrapulmonar) en 2017, en términos del número anual de casos de TB relacionados con el tamaño de la población. Los países de ingresos altos, incluidos la mayoría de los países de Europa occidental, Canadá, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda, tienen las tasas más bajas de enfermedad activa de tuberculosis (TB). Por el contrario, los países de bajos ingresos tienen tasas más altas. Tomado y modificado de (World Health Organization, 2018)

La falta de conciencia y de acceso a laboratorios de diagnóstico en estos países es muy bajo y aunado a esto, existe la falta o escasa disponibilidad de un tratamiento accesible. La combinación de estos factores tiene como resultado la propagación del patógeno antes de ser diagnosticada la enfermedad. Son necesarios de manera urgente métodos de diagnóstico capaces de distinguir la TBA de la TBL para la elección del tratamiento adecuado, de lo contrario la TB no se podrá erradicar. Afortunadamente hay progreso en esta área de diagnóstico y nuevos métodos de diagnóstico de TBL están siendo desarrollados (Adom Agyeman Akosua, 2017). Es un hecho que la vacuna con el bacilo Calmette-Guérin (BCG) tiene casi 100 años y su eficacia es variada, lo que conlleva a la necesidad de nuevas vacunas antes y después de la exposición a MTB para prevenir la enfermedad.

2.3 Patogénesis de la tuberculosis.

Cuando un individuo sano, joven, bien nutrido se infecta con una micobacteria, se mantiene controlada la infección por MTB y se dice que la respuesta inmune es protectora, lo que lleva a la resolución de la enfermedad; en su defecto, si el individuo tiene un sistema inmune deficiente ya sea por la edad, por desnutrición o por algún inmunocompromiso, el sistema inmune al intentar controlar la infección puede dañar el tejido en el sitio de infección provocando la aparición de las características histopatológicas de la enfermedad (Davies, 2007).

La TB se puede adquirir por el consumo de productos lácteos no pasteurizados y la fuente de transmisión más importante es por micobacterias patógenas transportadas en el aire provenientes de personas con TB pulmonar que expectoran, tosen o estornudan pequeñas partículas líquidas de aproximadamente 1-5 μm que contienen al bacilo y que son inhaladas por individuos cercanos a ellos. Las partículas de mayor tamaño quedan atrapadas en la barrera mucosa de las vías respiratorias altas y son eliminadas, pero las de menor tamaño no son atrapadas y son capaces de llegar al pulmón, sitio adecuado para este organismo aeróbico (Chinta, 2016).

En los alveolos los bacilos de MTB son fagocitados por los macrófagos (Møs) alveolares, quienes invaden el epitelio subyacente provocando una respuesta inflamatoria local (Smith, 2003). Los granulomas (Figura 2) son el sello patológico característico de la TB, son agregados de células inmunes reclutadas al sitio de la infección en respuesta a estímulos persistentes, aunque su función no está completamente clara si son protectores para el hospedero, si promueven la infección o si contribuyen a la patología tisular de la TB, las investigaciones señalan que los granulomas contribuyen a todo esto, dependiendo de la etapa de la enfermedad, ya sea que los bacilos de MTB estén siendo controlados por la respuesta inmune innata y/o adaptativa, o si la enfermedad ha progresado a la TB activa.

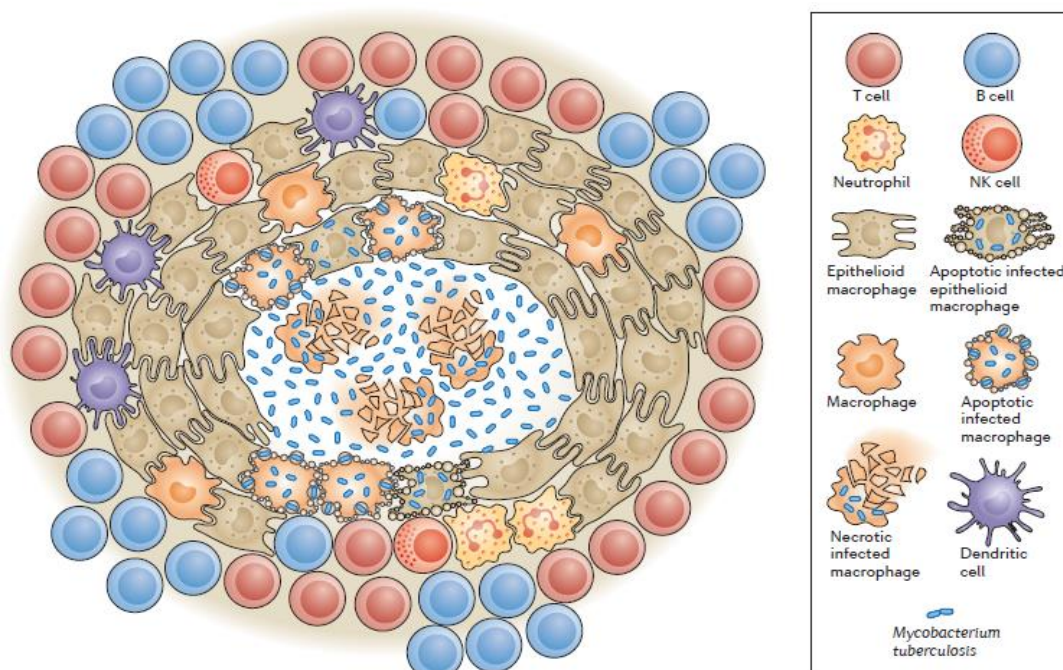


Figura 2. Granuloma tuberculoso clásico. Acumulación de células inmunes altamente organizadas que se agregan alrededor de un centro necrótico. Tomado y modificado de (Cadena, 2017).

Los granulomas se forman en el sitio de infección, donde ocurre un intercambio entre el hospedero y MTB, están compuestos por un núcleo central acelular, denominado caseum, rodeado por Møs infectados, Møs en distintas etapas de activación, células epitelioides y neutrófilos, que a su vez están circunscritos por

linfocitos T CD4+, linfocitos CD8+ y linfocitos B rodeados por fibroblastos, que crean una cápsula fibrótica periférica. Existe una amplia heterogeneidad entre los granulomas y cada uno representa un microambiente localizado que puede ser influenciado independientemente por la calidad de la respuesta inmune localizada; la patogenicidad, estado y número de bacterias. Se han descrito tres tipos principales de granulomas en la TB activa: 1) el granuloma caseoso clásico, con residuos de eosinófilos centrales rodeados de macrófagos y una capa de linfocitos, 2) el granuloma no necrotizante, con un núcleo interno compacto de macrófagos y algunos neutrófilos rodeados por una capa de linfocitos y 3) el granuloma supurativo, con un núcleo central de neutrófilos degenerativos rodeados de macrófagos y células gigantes multinucleadas y una envoltura externa de linfocitos (Cadena, 2017) (O'Garra, 2013).

La mayor parte de las personas infectadas por MTB, desarrollan una respuesta inmune efectiva entre 2-8 semanas posteriores a la infección, deteniendo la multiplicación del bacilo. El balance entre la inmunidad del hospedero y la multiplicación del bacilo será el determinante para alguno de los desenlaces de la infección (Figura 3): 1) la minoría de la población desarrollara rápidamente TBA con síntomas clínicos poco tiempo después del contagio, 2) la mayoría de las personas infectadas no muestran signos de la enfermedad, su inmunidad es efectiva y son considerados como TBL, 3) una proporción de individuos con TBL se reactivan años después y desarrollan TBA post-primaria (Torres-Gonzalez, 2016) (Furin, 2019)

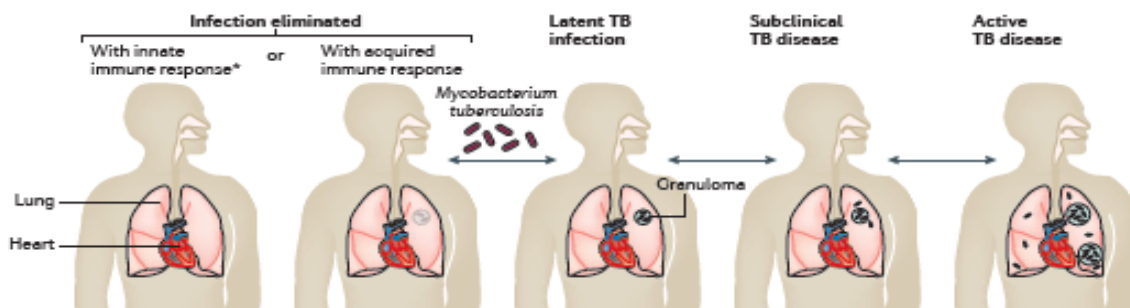


Figura 3. Espectro de infección y enfermedad de MTB. La dinámica entre la micobacteria y el hospedero hace que la patología de la TB caiga en un espectro amplio de formas latentes y activas de la enfermedad. (Furin, 2019)

2.4 Inmunología de la Tuberculosis

Los pulmones son el sitio principal de infección por MTB, aunque no el único. Diversos estudios en humanos y en modelos animales han demostrado la gama de componentes del sistema inmune involucrados en la respuesta efectiva contra MTB (Salgame, 2014). La respuesta primaria a la infección por *M. tuberculosis* se caracteriza por una afluencia de células como Møc alveolares residentes, neutrófilos y células dendríticas (DC's) reclutados quienes fagocitan a los bacilos y constituyen la primera línea de defensa. La activación apropiada de estas células para atrapar y / o matar al patógeno, está determinada por factores inmunes innatos y adaptativos extrínsecos críticos en el resultado de la respuesta inmune contra MTB.

2.4.1 Respuesta inmune innata

En los Møc, diversos receptores están involucrados en la fagocitosis de MTB, entre ellos los tipos scavenger, de complemento y de manosa. Una vez que *M. tuberculosis* se internaliza, se desencadena una secuencia de eventos que dan como resultado la creación del fagosoma alrededor del bacilo fagocitado. Sin embargo, MTB cuenta con mecanismos de evasión que le permiten adaptarse al entorno intracelular del macrófago y crear un nicho para su supervivencia. Los Møc pueden eliminar las micobacterias a través de diferentes mecanismos si se activan adecuadamente. La muerte necrótica, lisis celular, de los Møc infectados permite la salida de los bacilos y su propagación a las células adyacentes. De forma alternativa, puede ocurrir la muerte apoptótica en la cual la membrana citoplasmática se mantiene intacta disminuyendo la viabilidad de los bacilos y permite una mayor inmunidad (Figura 4).

Los neutrófilos tienen una acción bactericida moderada y forman parte de los granulomas. Además, los neutrófilos pulmonares facilitan la activación de los linfocitos T CD4+ antígeno específicos durante la infección por MTB y promueven una respuesta inmune adaptativa anti-MTB mediante el suministro de bacilos a las DC's, haciendo que estas sean más efectivas en la activación de los linfocitos T CD4+. Sin embargo diversos estudios sugieren que los neutrófilos juegan un papel

perjudicial en la patogénesis de la TB, ya que se ha encontrado que en pacientes con TB activa, la insuficiencia respiratoria y la mortalidad se asocia con un aumento de los niveles de neutrófilos en sangre (Figura 6). Como ocurren con los Møs, MTB tiene la capacidad de inhibir la apoptosis de los neutrófilos, retardando la activación de los linfocitos T CD4+ vírgenes en los ganglios linfáticos.

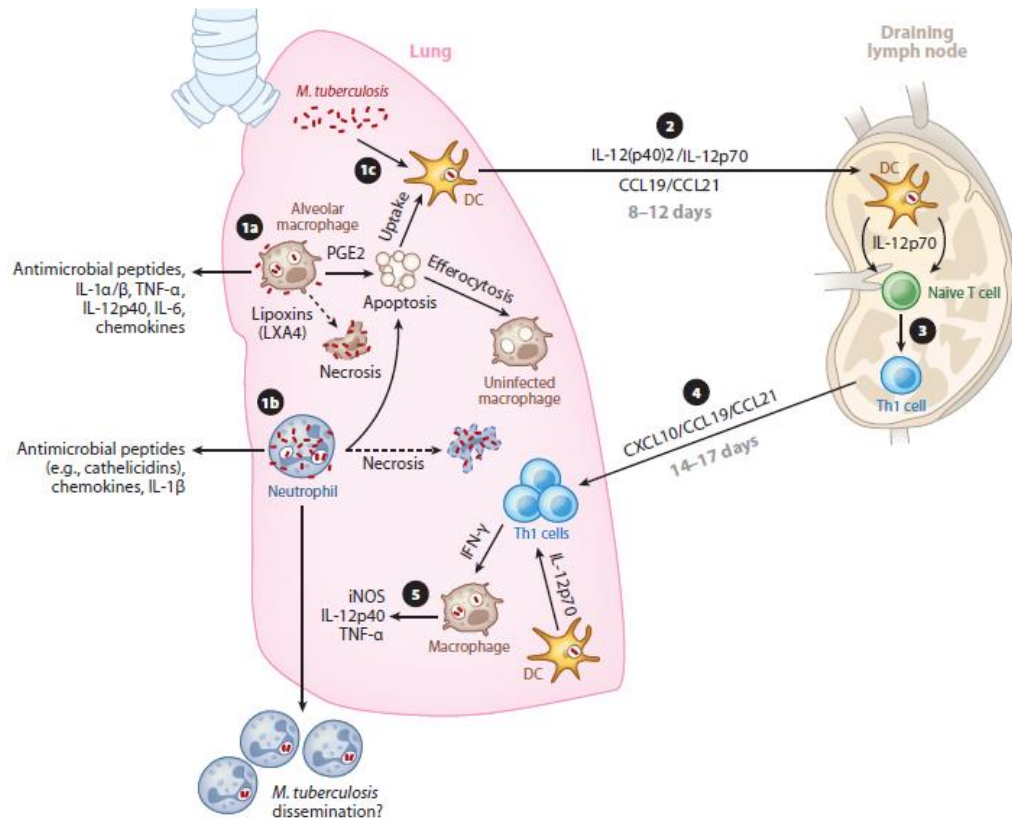


Figura 4. Respuesta inmune celular a MTB. Las micobacterias que logran llegar al alveolo pulmonar son fagocitadas por los macrófagos alveolares (1a), neutrófilos (1b) y células dendríticas (1c). Tomado y modificado de (O'Garra, 2013).

Las DC's son las células principales presentadoras de antígenos en el inicio de la respuesta de los linfocitos T y por lo tanto se espera que tengan un papel importante en el inicio de la respuesta inmune contra MTB. Sin embargo, el inicio de la respuesta inmune de las DC's depende de su interacción con los Møs y neutrófilos apoptóticos que contienen bacilos de MTB, esta interacción acelera la adquisición de bacterias por parte de las DC's, el tráfico más temprano de estas células hacia los ganglios linfáticos y el cebado más rápido de los linfocitos T. El

nivel y la forma de activación de la DC's determinarán la magnitud, el momento y la clase de la respuesta inmune resultante a la infección por *M. tuberculosis*, además de determinar si se logra el control de la infección o si se produce una infección crónica y la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, aunque las DC's son claramente fundamentales para iniciar la respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis*, están reguladas en varios puntos de control de la respuesta inmune del huésped (O'Garra, 2013).

2.4.2 Respuesta inmune adaptativa

La inmunidad protectora y el control del crecimiento bacteriano durante la infección por *M. tuberculosis* depende principalmente de los linfocitos T CD4 +. Aunque MTB es un patógeno intracelular, los linfocitos B desempeñan un papel importante en la respuesta inmune secretando IFN- γ para activar a los macrófagos y/o secretando anticuerpos que pueden matar directamente los bacilos.

La activación de los linfocitos T vírgenes ocurre aproximadamente entre 8-12 días después de la entrada de MTB a los pulmones, se produce en los ganglios linfáticos a donde los bacilos son llevados por las DC's. Posteriormente los linfocitos T CD4+ antígeno específicos migran hacia los pulmones donde junto a otras células inmunes empiezan a acumularse en un proceso inflamatorio que permitirá la formación de los granulomas y por lo general, detendrá la reproducción de los bacilos. Existen diferentes sub-poblaciones de linfocitos T CD4+ presentes en el sitio de infección. Sin embargo, las Th1 están más asociadas a la contención del crecimiento y a la diseminación de MTB (O'Garra, 2013):

- Linfocitos Th1: Generan citocinas pro-inflamatorias
- Linfocitos Th2: Generan citocinas anti-inflamatorias, ayudan a la activación de los linfocitos B y a la producción de anticuerpos
- Linfocitos Th17: Atraen y activan neutrófilos

- Linfocitos T reguladores: Frenan la defensa dada por los linfocitos Th1 provocando la reactivación de la enfermedad

Citocinas pro-inflamatorias

Cuando MTB es reconocido por las células fagocíticas, ocurre la activación de Mø_s y la producción de citocinas, estas citocinas tienen un papel crucial en la respuesta inflamatoria y en el desenlace de las infecciones por micobacterias mediante un proceso de regulación y contra-regulación. Entre estas citocinas se encuentran en el Interferón Gamma (IFN- γ), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 12 (IL-12) e Interleucina 2 (IL-2). Este conjunto de citocinas son cruciales en la respuesta inflamatoria y en el desenlace de la infección por MTB (O'Garra, 2013).

- Interferón Gamma. El IFN- γ es la principal citocina Th1, estimula la capacidad microbicida de los Mø_s activando vías de señalización como la óxido nítrico sintasa (iNOS) e induce la maduración-acidificación de los fagosomas y la autofagia. Los linfocitos T CD4⁺ son la principal fuente de IFN- γ y son consideradas las responsables del control de la infección por MTB, aunque otras células como los linfocitos T CD8⁺, los linfocitos NK, entre otros, son capaces de secretar IFN- γ , sin embargo ninguna de estas puede compensar la ausencia de los linfocitos T CD4⁺ (Gutierrez, 2004).
- Factor de Necrosis Tumoral alfa: El TNF- α es producido por Mø_s, células dendríticas y por linfocitos T. Esta citocina se une a receptores TNFR1 y TNFR2, generando una señalización pro-inflamatorias, contribuyendo a la respuesta inmune en contra de MTB a través de mecanismos como la inducción de apoptosis en Mø_s y a la secreción de quimiocinas que favorecen el reclutamiento de células inmunes al sitio de infección y a la formación y mantenimiento estructural del granuloma (Dutta, 2014)

Citocinas anti-inflamatorias

Los mecanismos pro-inflamatorios iniciados por la respuesta inmune ante la infección por MTB son antagonizados por la respuesta anti-inflamatoria. Entre

estos, tres citocinas anti-inflamatorias Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 19 (IL-19) y el Factor Transformante Beta (TGF- β) pueden inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias en TB (O'Garra, 2013)

- Interleucina-4. Esta citocina participa en la regulación del sistema inmunológico en diferentes niveles. Es un factor de crecimiento y supervivencia para los linfocitos. Después de la presentación antigénica, las células T se diferencian hacia las células Th1 o Th2. Los mecanismos involucrados en este proceso dependen de las citocinas. IL-4 desempeña un papel esencial al promover la diferenciación de las células Th2 al tiempo que inhibe la diferenciación de las células Th1 (Zamorano, 2003). En infecciones bacterianas intracelulares incluida MTB, IL-4 tiene una función deletérea hacia los macrófagos, lo que está relacionado con la supresión de la producción de IFN- γ (Hernández-Pando, 1996).

2.4.3 Evasión de la respuesta inmune

La sobrevivencia de MTB dentro del fagosoma, se debe a su capacidad de inhibir la maduración fagosomal mediante cuatro estrategias principales (Bobadilla-Lozoya, 2009) (Deretic, 2008)

1. Impide la unión del lisosoma al fagosoma por la acumulación de una proteína rica en triptófano y aspartato (TACO, por sus siglas en ingles)
2. Interfiere con la organización y función de Rab en organelos fagosomales, una ATPasa responsable de la acidificación fagosomal en casi todos los aspectos del tráfico intracelular de células de mamíferos.
3. Interfiere con la producción del fosfatidilinositol-3-fostato (PI3P) que es importante para la maduración del fagosoma
4. Productos micobacterianos que interfieren con la biogénesis del fagolisosoma. Entre ellos el fosfatidilinositol manosido (PIM) y el lipoarabinomanano (LAM), los cuales son similares al fosfatidilinositol presente en la membrana celular del hospedero y tienen la capacidad de bloquear la maduración del fagosoma.

2.5 Agente etiológico

El género *Mycobacterium* se localiza taxonómicamente en la familia *Mycobacteriaceae* (Tabla 1), está constituido por 150 especies (Hartmans, 2006), dentro de las cuales, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedi*, *Mycobacterium canetti* y *M. orygis* componen el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). La secuenciación del rRNA 16S, muestra una estrecha relación entre las especies del CMTB, pero difieren ampliamente en términos de tropismo hacia el hospedero, fenotipo y patogenicidad (Vieira, 2011) El nombre del genero *Mycobacterium*, proviene del griego “*Myces*” que significa hongo y de “*Bakterion*” denotando un bacilo pequeño; la traducción literal seria “bacteria con apariencia de hongo” (Sidders Ben, 2007).

Reino	Bacteria
Phylum	<i>Actinobacteria</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Actinomycetales</i>
Suborden	<i>Corynebacterianeae</i>
Familia	<i>Mycobacteriaceae</i>
Genero	<i>Mycobacterium</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica del genero *Mycobacterium*. Tomado y modificado de (Hartmans, 2006)

2.5.1 Características microscópicas.

La micobacterias son bacilos ligeramente curvos de aproximadamente 3-5 μm de largo, 0.2-0.6 μm de ancho, inmóviles, sin cápsula ni esporas (Pfyffer, 2015), con una envoltura celular compuesta por una membrana y por una pared celular; ésta última responsable del soporte mecánico a la bacteria y de las características acido-alcohol resistentes gracias a su alto contenido de lípidos (Ribón, 2012). La

presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) es indicativa de micobacterias. Además, el hallazgo de “cordones” en medios de cultivo líquidos, es presuntiva para el CMTB (Figura 5).

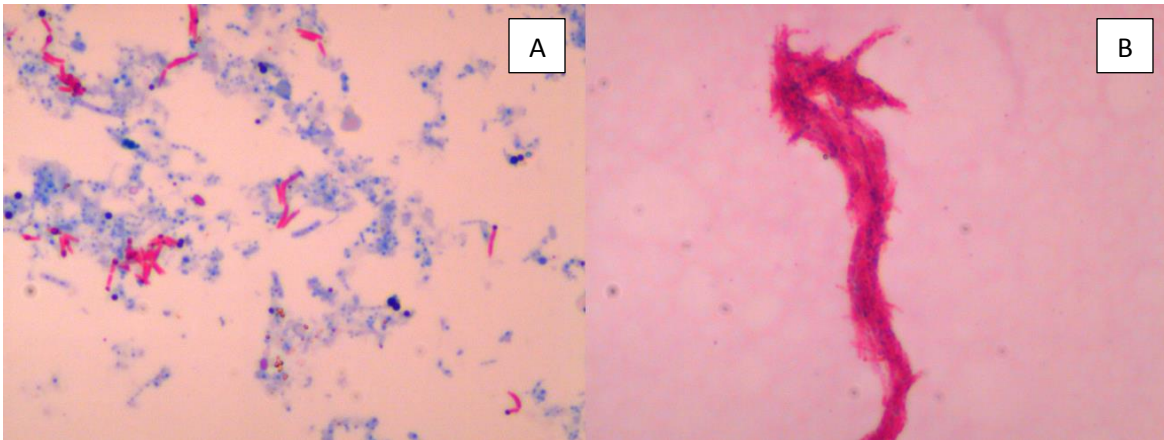


Figura 5. Tinción de ZN. A: Bacilos individuales aumento 100x. B: Agrupación en forma de cordón aumento 10x. Tomadas de la colección fotográfica del Laboratorio de Microbiología Clínica, INCMNSZ.

2.5.2 Características en cultivo.

MTB es una bacteria aerobia obligada, intracelular facultativa, inmóvil, y su temperatura óptima de crecimiento es de 33-39°C, su tiempo de generación es de 18 a 20 horas, lo cual está asociado a la permeabilidad de la pared celular, que limita la entrada de nutrientes (Martín, 2014). Actualmente las micobacterias son fácilmente cultivables en medios ricos en iones inorgánicos suplementados con albúmina para inhibir ácidos grasos tóxicos; catalasa para remover los peróxidos tóxicos; glicerol como fuente de carbono; y dextrosa como fuente de energía. A menudo, las colonias de MTB en medio sólido son ásperas, sin pigmento y secas (Pfyffer, 2015).

2.5.3 La pared celular de las micobacterias

La pared celular es la responsable de la capacidad de las micobacterias de persistir en ambientes desfavorables, resistir a la desecación, a los antifímicos y a los mecanismos inmunes del hospedero.

Las micobacterias están envueltas por una pared celular compleja que las hace diferentes a la mayoría de los procariontes. Es extremadamente gruesa, rica en lípidos e hidrofóbica (Figura 6). Su elevado contenido lipídico, constituye aproximadamente el 60% del peso seco de la micobacteria, aunque este porcentaje puede variar dependiendo de la especie y de las condiciones de crecimiento. La pared celular está dividida en dos partes. La parte interna está compuesta por peptidoglicano (PG) que es un polímero en forma de malla que proporciona una capa rígida manteniendo la forma celular y la fuerza necesaria para soportar la presión osmótica (Alderwick Luke J., 2015), a su vez el PG se encuentra unido covalentemente al arabinogalactano (AG) (Gorocica Patricia, 2005), el cual está unido a ácidos micólicos de cadena larga y desempeñan un papel importante en la impermeabilidad de la pared celular (Hedia Marrakchi, 2014). A este segmento se le denomina “core” o complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) de la pared celular. Mientras que la parte externa está compuesta por ácidos grasos libres intercalados dentro del medio lipídico (ácidos micólicos del complejo mAGP) La 6,6'-dimicoliltehalosa (TDM) es el glicolípido más abundante en MTB, es conocido también como factor cordón porque es el responsable de la disposición de los bacilos en paralelo y en cadenas dándoles la apariencia de filamentos en medio líquido y microscópicamente se observen estructuras de tipo cordón (Brennan, 2003). Además la TDM, es altamente toxica para los leucocitos pues le inhibe la acción de la succinato deshidrogenasa, provoca el hinchamiento de sus mitocondrias y es capaz de producir granulomas caseosos (Hunter Robert, 2006).

Los ácidos micólicos de cadena larga y los ácidos grasos libres evitan que las micobacterias se tiñan con colorantes anilínicos, por lo que la tinción de Gram es inefectiva y la identificación microscópica esté basada en su capacidad de resistir los efectos de la decoloración ácida, lo que da origen a la expresión “bacilos ácido-alcohol resistentes” en la tinción ZN (Pfyffer, 2015).

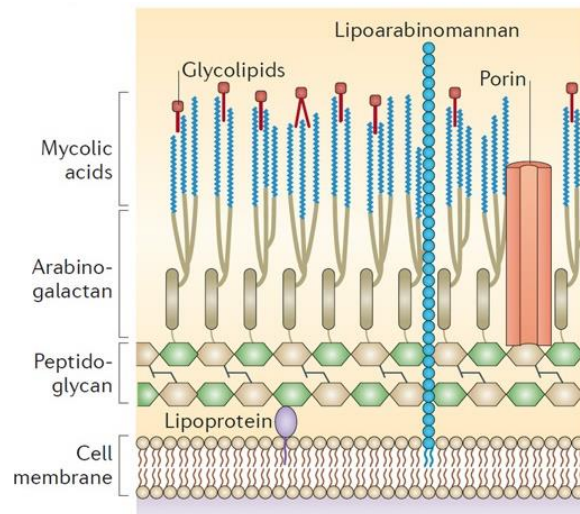


Figura 6. Representación de la estructura de la pared celular de las micobacterias. Tomado y modificado de (Brown Lisa, 2015).

2.6 Modelos animales para el estudio de la tuberculosis

El uso de modelos animales para estudiar diversas enfermedades ha sido extremadamente importante en el progreso de la medicina científica. Estos modelos han sido esenciales en la evaluación de nuevos fármacos y su toxicidad, así como en la evaluación de la eficacia de nuevas vacunas. La contribución de diferentes modelos animales en la investigación de la TB ha sido significativa. Robert Koch, además del descubrimiento del bacilo de la TB, fue el primer científico que usó el ratón como modelo experimental. Julius Cohnheim usó la cámara anterior del ojo del conejo para estudiar la inflamación inducida por micobacterias, describiendo los primeros eventos inflamatorios inducidos por MTB *in vivo*. Actualmente, diferentes modelos animales (ratones, conejos, cobayos, ratas, vacas, peces y monos) se han utilizado para estudiar la inmunopatología inducida por la MTB (Hernández-Pando Rogelio, 2014), entre ellos destacan:

- Conejillo de indias (Cobayo): Es utilizado para estudiar diversas enfermedades infecciosas, son extremadamente susceptibles a la infección por TB, desarrollan granulomas, permitiendo una rápida progresión de la enfermedad muy parecida a los humanos. Las desventajas más importantes de este modelo son altos costos en instalaciones de

bioseguridad y la poca disponibilidad de reactivos para evaluar la respuesta inmune.

- Conejo: Aunque tiene cierta resistencia innata a la TB, la patología pulmonar que desarrollan es muy parecida a la humana. Los conejos “outbred” son relativamente resistentes a la infección por MTB y generalmente se recuperan de la infección en cuatro a seis semanas, justo como ocurre en la mayoría de los humanos. Las limitaciones más importantes son la escasez de reactivos inmunológicos comerciales, la dificultad para obtener conejos “inbred” y la variación de resultados dentro de un mismo grupo (Susan E. Dorman, 2004).
- Primates: Su ventaja más importante es la gran similitud con la TB humana y la disponibilidad de reactivos para el estudio de la respuesta inmune, Además, los resultados obtenidos en este modelo son directamente aplicables a la situación humana. Sin embargo, sus desventajas más significativas, son el alto costo, las instalaciones de bioseguridad necesarias y la no disponibilidad de animales consanguíneos (Saverio V. Capuano III, 2003).
- Ratones: Este modelo es muy conveniente para reproducir experimentalmente la TB en protocolos definidos y de corta duración. Los roedores no son especies susceptibles para padecer tuberculosis de forma natural; sin embargo, se ha logrado la infección de ratones, a nivel de laboratorio, con diferentes especies de micobacterias. La facilidad de manejo de estos animales, su bajo costo y su respuesta inmune innata y adaptativa a las micobacterias similar a la de los humanos, son características que han permitido el desarrollo de estos modelos de experimentación (Orme, 2003). Estos modelos tienen la ventaja de contar con una fuente amplia de recursos genéticos, además de un alta disponibilidad de reactivos inmunológicos (Alexander Apt, 2009)

Con el uso de animales en modelos de experimentación en la investigación biomédica han surgido cambios con respecto a la forma en que los animales

deben ser tratados durante los procedimientos experimentales. Se debe considerar el bienestar de cualquier animal, de acuerdo a la bioética, la cual constituye el dialogo interdisciplinario entre la vida (bio) y los valores morales (ética), cuyos principios se basan en las tres R's propuestas por William Russell y Rex Burch: reemplazo, reducción y refinamiento (Balls M, 2002). En México, la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, ha establecido que en todas las instituciones donde se realice investigación con animales debe tener un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). Este comité, evalúa la pertinencia científica (conceptual y metodológica) de los proyectos de investigación y es responsable de monitorear la implementación de los principios bioéticos en el uso de los animales, la salud y el bienestar, la bioseguridad, la seguridad y los riesgos profesionales (SAGARPA, 1999).

2.7 El modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva

En el laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en el año 1996 Hernández-Pando *et al* describió un modelo que reproduce eficazmente la infección por TB. Utilizando ratones de la cepa BALB/c que se caracterizan por su uniformidad fenotípica y estabilidad genética, lo cual asegura que no exista variabilidad en los experimentos causados por factores genéticos (Guénet, 2003). Estos ratones son infectados con la micobacteria H37Rv para evaluar y caracterizar el curso de la infección pulmonar progresiva en función de la sobrevivencia de los ratones, la carga bacilar medida en unidades formadoras de colonias (UFC's). Además considera el daño histopatológico medido en porcentaje de superficie pulmonar dañada por neumonía y por último por la correlación entre la cinética de citocinas Th1/Th2 durante el curso de la enfermedad (Hernández-Pando, 1996). El modelo experimental de TB ha permitido el conocimiento de diferentes aspectos de la enfermedad activa, así como para evaluar el desarrollo de antibióticos y vacunas (Hernández-Pando R, 2011). En este modelo se instila intra-traquealmente un número específico de bacilos vivos de la cepa H37Rv y mediante una cinética de

sacrificio de los animales en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 post-infección se ha logrado dilucidar dos etapas de la enfermedad.

- **Fase temprana o protectora.** Corresponde al primer mes de infección, abarca del día 1 al día 21 post-infección, caracterizada por lesiones en el pulmón, como inflamación peri-vascular, inflamación peri-bronquial e infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y Møs en el intersticio alveolo-capilar y la formación de granulomas en la segunda semana de infección. En esta fase son de gran importancia los linfocitos T CD4+ productores de interferón gamma (IFN- γ), esta citocina activa a los Møs, células fagocíticas profesionales con capacidad de eliminar a las micobacterias, además, el IFN- γ los estimula a producir gran cantidad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) que en conjunto evitan que la micobacteria se disemine. La respuesta protectora máxima se alcanza en el día 21 post-infección, cuando los granulomas alcanzan su plena maduración con predominio de actividad de linfocitos Th1 y Møs activados que en su conjunto mantienen el control de la enfermedad (Hernández-Pando, 1996).
- **Fase tardía o no protectora.** Esta fase se caracteriza por el incremento de UFC en los pulmones, consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis intersticial. La presencia y actividad de los linfocitos cooperadores de tipo 2 (Th2) incrementa significativamente, que se caracterizan por producir IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Particularmente la IL-4 induce la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos, la IL-10 y la IL-13 en conjunto con la IL-4 son eficientes antagonistas a la respuesta Th1, desviando la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral, contribuyendo a la progresión de la enfermedad. Los Møs disminuyen la producción de TNF- α , IL-1 e iNOS, pero incrementan su capacidad productora de citocinas antiinflamatorias y supresoras de la inmunidad celular como el TGF- β y la IL-10. El TGF- β induce la desactivación de los Møs y los hace incapaces de eliminar a las micobacterias, además, es una

citocina inductora de proliferación fibroblástica y de síntesis de colágeno, lo que contribuye a la generación de fibrosis en los pulmones (Hernández-Pando, 1996).

La cepa de referencia H37Rv que se aisló originalmente en 1905 y llamó la atención por su notable virulencia en el modelo del conejillo de indias, una característica distintiva utilizada en la clasificación de "tuberculosis humana" a principios del siglo XX. En 1934, H37 se disoció en cepas "virulentas" (Rv) y "avirulentas" (Ra). El aislado original de 1905, H37 se discontinuó, y los aislamientos H37Rv y H37Ra se han mantenido en el Instituto Trudeau desde entonces. Durante los años se han generado varios derivados farmacorresistentes, que representan en parte las 18 variantes de H37 disponibles a través de la Trudeau Mycobacterial Collection (TMC) y la American Type Culture Collection (ATCC). Por lo tanto, hay 15 progenies H37Rv y 3 H37Ra mantenidas en el Instituto Trudeau y la ATCC (P. Bifani, 2000).

2.8 Técnicas moleculares

2.8.1 Evaluación de la pureza de ácidos nucleicos

La determinación de la pureza de ácidos nucleicos, generalmente se realiza determinando la proporción de absorbancia 260/280 descrita por Warburg y Chistian en 1942 y aunque fue descrito para medir la contaminación de proteínas con ácidos nucleicos, en la actualidad se usa para medir la pureza del DNA o RNA. Se basa en la ecuación de Lambert-Beer modificada:

$$C = \frac{(A * e)}{b}$$

Donde la concentración de la muestra (C) es igual al producto de la absorbancia (A) y el coeficiente de extinción molar (e) dividido entre la longitud del campo óptico (b) (BioTek, 2006). Los coeficientes de extinción molar generalmente aceptados son:

- DNAds: 50 ng-cm/ μ L
- DNAss: : 33 ng-cm/ μ L
- RNA: : 40 ng-cm/ μ L

Los ácidos nucleicos y las proteínas tienen máximos de absorbancia a 260 nm y 280 nm, respectivamente. Un ratio de absorbancia 260/280 es utilizado para calcular la pureza del DNA y RNA. Una proporción ≥ 1.8 es generalmente aceptada como puro para DNA, mientras que una proporción ≥ 2 , es aceptada como puro para RNA. Cuando existe una relación ≤ 1.8 , generalmente indica la contaminación con fenol o compuestos aromáticos residuales asociados al proceso de extracción que tienen una fuerte absorbancia a 280 nm. El ratio 260/230 es una medida secundaria de pureza de ácidos nucleicos, los valores de 260/230 para un ácido nucleico "puro" a menudo son más altos que los valores de 260/280 respectivos y están comúnmente en el rango de 1.8-2.2. Si la relación es apreciablemente más baja, esto puede indicar la presencia de contaminantes. Aunque la relación de absorbancia 260/280 es un importante indicador de pureza y calidad de los ácidos nucleicos, el mejor indicador es la funcionalidad del DNA o el RNA en su aplicación posterior, que es la PCR (Scientific, Assessment of Nucleic Acid Purity, 2015).

2.8.2 Electroforesis

Es una metodología con la cual se pueden separar fragmentos de DNA o RNA en función de su tamaño, carga y visualizarlos mediante una tinción sencilla. Se basa en el principio de someter a los ácidos nucleicos a un campo eléctrico, su carga neta negativa hará que estos migren en dirección al ánodo (Figura 7). Si los ácidos nucleicos son forzados a moverse a través de un gel de agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren más lentamente que las de menor tamaño.

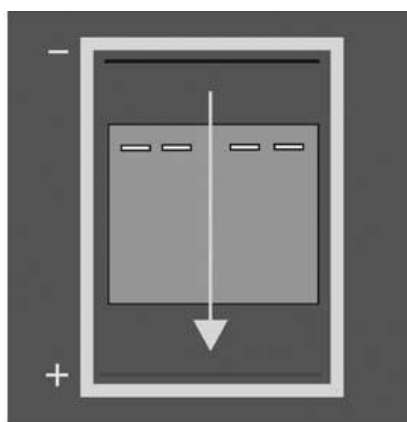


Figura7. Esquema de electroforesis en gel de agarosa. Los ácidos nucleicos son colocados cerca del cátodo, al aplicar una corriente eléctrica, la carga neta negativa de estos hará que migren hacia el ánodo.

La agarosa es un polímero lineal que al solidificar crea una malla tridimensional con canales con diámetros entre 50 nm y 200 nm. La concentración p/v de la agarosa es de gran importancia, pues determina el rango de tamaño de los canales con los que se obtendrá una buena separación de los fragmentos de ácidos nucleicos (Tabla 2) (Fierro, 2004).

Agarosa (%)	Estándar	Agarosa de Alta Fuerza	Agarosa de baja temperatura de fusión	Gel de baja temperatura de fusión y baja viscosidad
0.3	1 kb-40 kb			
0.5	700 pb-25 kb			
0.8	500 pb-15 kb	800 pb-10 kb	800 pb-10 kb	
1.0	250 pb-12 kb	400 pb-8 kb	400 pb-8 kb	
1.2	150 pb-6 kb	300 pb-7 kb	300 pb-7 kb	
1.5	80 pb-4 kb	200 pb-4 kb	200 pb-4 kb	
2.0	60 pb-2.5kb	100 pb-3 kb	100 pb-3 kb	
3.0			50 pb-1 kb	50 pb-1 kb
4.0				100 pb-500 pb
6.0				10 pb-100 kb

Tabla 2. Rango de separación de ácidos nucleicos en función de su tamaño, tipo y porcentaje de agarosa.

La evaluación de la integridad del RNA es un primer paso crítico para obtener datos de expresión génica significativos mediante el análisis de RT-PCR o microarreglos. Actualmente existen nuevas metodologías para evaluar la calidad e

integridad de los ácidos nucleicos, una de ellas el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent). Este equipo contiene chips con microcanales fluidicos interconectados que se rellenan con una matriz fluorescente. El DNA o RNA se separa mediante electroforesis en función de su tamaño y se visualiza por la emisión de fluorescencia y los resultados los muestra como un electroferograma de fluorescencia. Los perfiles generados en el sistema de Bioanalyzer Agilent 2100 (Figura 8), proporcionan información que permite una inspección visual y numérica de la integridad del RNA mediante un RIN (RNA Integrity Number). El algoritmo del RIN permite la clasificación del RNA total basado en un sistema numérico del 1 al 10, donde el 1 corresponde al perfil del RNA mas degradado y el 10 corresponde al RNA intacto (Mueller, 2016).

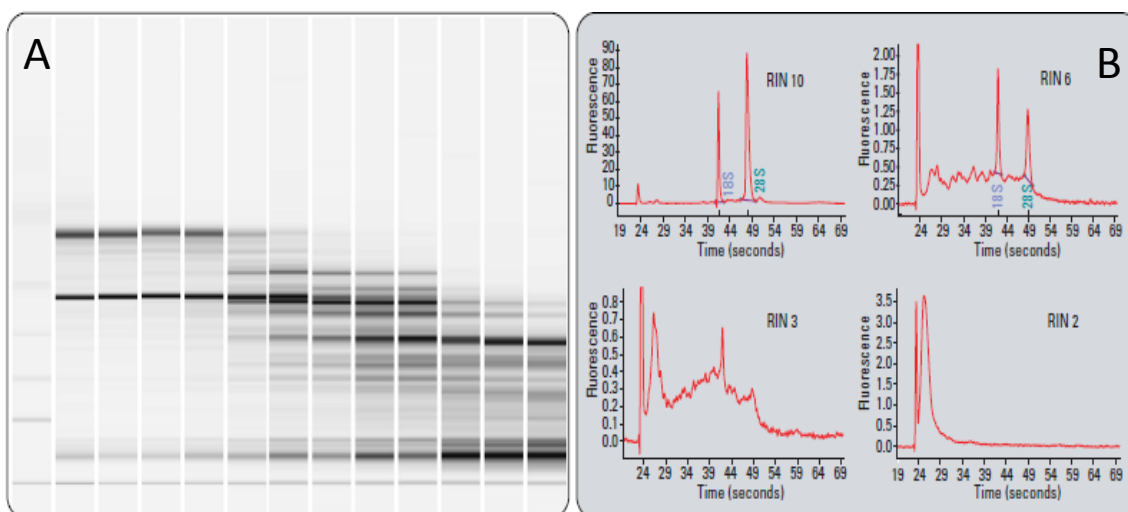


Figura 8. A: Electroforesis.- Muestras de RNA total con diferentes grados de degradación. B: Electrofenograma: Muestra de RNA intacto (RIN 10) hasta RNA degradado (RIN2). Tomado y modificado de (Mueller, 2016).

2.8.3 La reacción en cadena de la polimerasa

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reacción) en 1990 por Mullis, transformó la ciencia biológica permitiendo la detección específica y la producción de un número exponencial de copias de un fragmento de DNA a partir, en teoría, de una sola copia del fragmento original. Los fragmentos amplificados pueden ser utilizados

por los investigadores para diagnosticar enfermedades, clonar y secuenciar genes, realizar estudios genómicos, etc., de manera rápida y muy sensible (Avashia, 2013). Cada ensayo de PCR requiere la presencia de:

- Templado de DNA. Es al menos una cadena de DNA que abarque la región que va a ser amplificada.
- Iniciadores o cebadores (En inglés, primers). Son fragmentos cortos de 20 a 25 nucleótidos complementarios para la región que se desea amplificar, que permiten que la polimerasa inicie la reacción. Definen los extremos de la región que se desea amplificar. Requieren de un contenido de G-C entre 40-60% y que no sean auto-complementarios para evitar los dímeros de primer.
- DNA polimerasa. Es la enzima clave que une los nucleótidos individuales para formar el producto de la PCR.
- Los nucleótidos. Son las cuatro bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina y citosina) que se encuentran en el DNA y que sirven como sustrato para polimerizar el producto de la PCR.
- Buffer. Proporciona un ambiente químico de pH e iones para que la DNA polimerasa pueda funcionar.

El proceso de la PCR se resume de la siguiente forma: los cebadores se unirán por complementariedad al DNA molde o templado, esto permitirá que la DNA polimerasa reconozca esta doble cadena e incorpore nucleótidos complementarios (Figura 9). Para que ocurran todos los pasos de la PCR es necesario que ocurran cambios de temperatura, en tres fases que constituyen un ciclo de la PCR y cada ciclo se repite entre 25 y 35 veces (Tamay, 2013):

- Desnaturalización: Es la primer fase de la PCR en la cual el DNA se desnaturaliza, es decir, las dos cadenas de DNA se separen, se lleve a cabo a una temperatura alta, generalmente alrededor de 94°C.

- Hibridación: consiste en un descenso de la temperatura después de la desnaturalización, que permitirá que los cebadores se unan complementariamente al DNA molde. Ocurre habitualmente a temperaturas entre 35°C y 60°C.
- Extensión: la DNA polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región donde se han unido los cebadores. La temperatura de esta fase depende la enzima polimerasa que se utilice

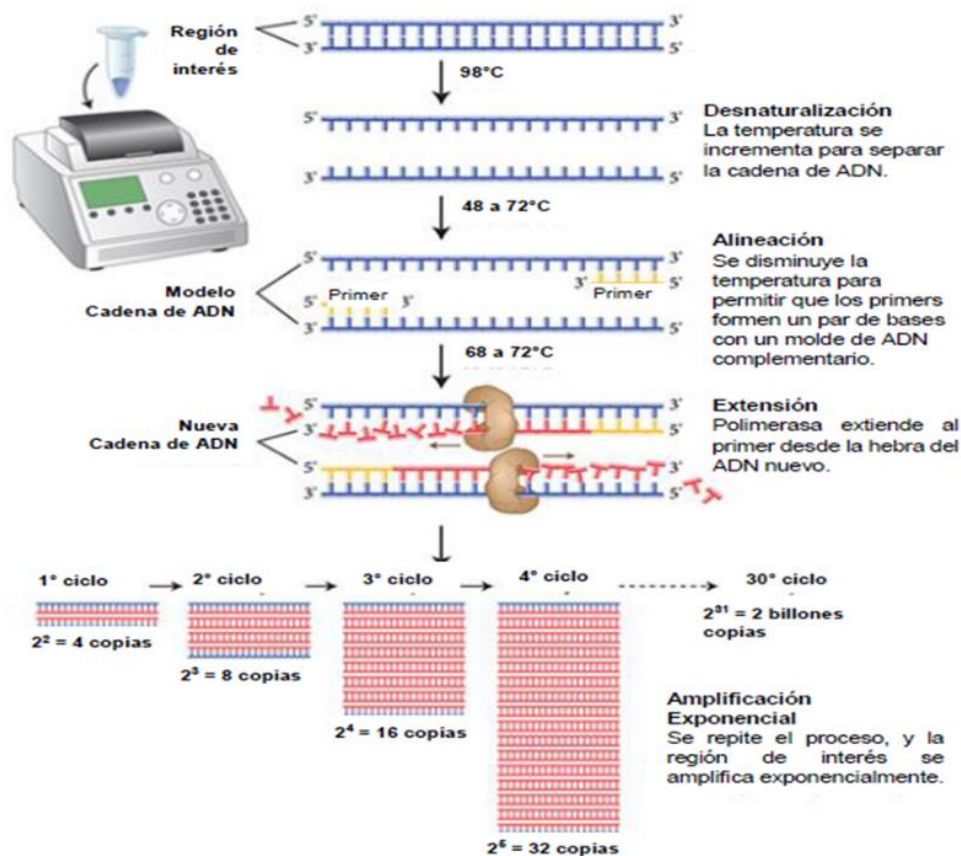


Figura 9. Proceso de amplificación de un fragmento de DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Se describen las tres fases de la PCR: Desnaturalización, alineación y extensión.

Uno de los métodos más utilizados para visualizar los productos de la PCR consiste en la detección de colorantes químicos como el EtBr o el SYBER Green que fluorescen solamente al intercalarse al DNA de doble cadena (Bustin, 2000). Posteriormente el producto de la PCR es analizado separándolo mediante una electroforesis en gel de agarosa en base a su tamaño y carga, lo que permite la

visualización del amplificado y la determinación de su tamaño al compararlo con un patrón de marcadores moleculares de tamaño conocido (Rahman, 2013).

2.8.4 Transcripción reversa

La mayor limitación de las DNA polimerasas y por lo tanto de la PCR, es que se necesita un templado de DNA, por lo tanto el RNA no puede servir como molde, por esta razón, es necesario hacer una transcripción reversa (RT), es decir, convertir el RNA en DNA complementario (cDNA), el cual es resistente al calor y puede ser utilizado en la PCR. Se utilizan polimerasas dependientes de RNA y hexámeros u oligos-dT. Existen diferentes tipos de transcriptasas inversas, como la AMV-RT, la MMLV-RT o enzimas modificadas por ingeniería que mejoran su actividad como la Omniscrip, PowerScript, StrataScript, etc. La cantidad relativa de cDNA generado por la RT es proporcional a la cantidad relativa del RNA molde y puede ser utilizado como materia prima para la PCR en tiempo real para determinar cambios en la expresión génica (niveles de mRNA) (Valasek, 2005)

2.8.5 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, mediante la correlación del producto de la PCR en cada uno de los ciclos con una señal de fluorescencia. Además de los reactivos que se utilizan en la PCR convencional, es necesario emplear un fluoróforo y un termociclador acoplado a un sistema óptico que monitoree la señal de los fluoróforos que aumenta conforme el producto se amplifica (Aguilera, 2014).

Los fluoróforos pueden ser de dos tipos:

- a) Con afinidad por el DNA. Estos emiten fluorescencia cuando se unen al DNA, la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de dsDNA. Inicialmente se utilizaba el EtBr pero tiene la limitante de no discriminar entre el ssDNA y el dsDNA. El fluoróforo más utilizado es el SYBR Green, el cual se une al dsDNA (Fig. 7), absorbiendo luz a una longitud de onda de 480 nm y emitiendo a 520 nm, fluoresciendo 1,000 veces más que cuando está en libre en solución. Por lo tanto, cuanto

más dsDNA haya presente, mayor será la fluorescencia. Una de las limitantes del SYBR Green I, es su inespecificidad ya que se une al dsDNA independientemente de su secuencia. Para esto se realiza una curva de fusión o T_m del producto amplificado, si hay dos o más picos significa que existe más de una secuencia amplificada y por lo tanto, la amplificación no fue específica para una secuencia de DNA (Valasek, 2005). Este punto de fusión o T_m es una propiedad dependiente de la longitud del producto y de la composición de nucleótidos

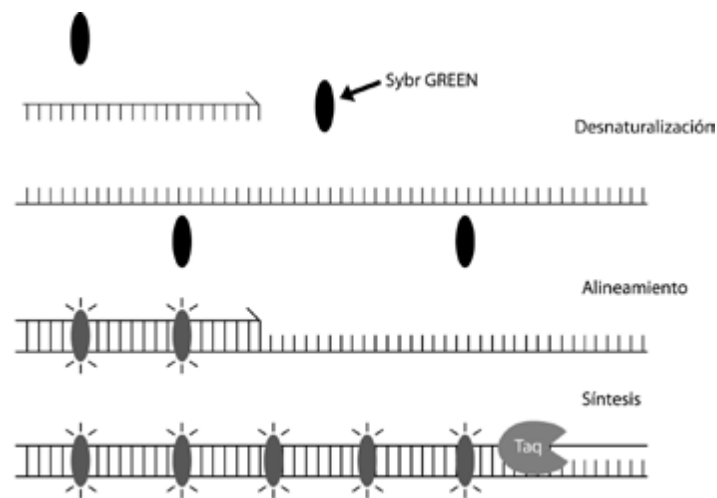


Figura 10. Mecanismo de incorporación del SYBR Green. Cuando las cadenas de DNA están separadas el SYBR Green esta libre en solución, mientras que en el dsDNA se intercala y emite fluorescencia.

- b) Sondas específicas que solo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado el fragmento de interés. Se pueden dividir en tres tipos: i) sondas de hidrólisis, ii) sondas de hibridación y iii) sondas de horquilla. Se basan en el principio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, por sus siglas en ingles) que consiste en la transferencia d energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un receptor (apagador o quencher), los cuales emiten fluorescencia a diferente longitud de onda, Cuando el reportero y el apagador se encuentran cercanos, el apagador absorbe toda la florescencia del reportero, cuando se separan, la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y puede ser detectada por el fotodetector (Aguilera, 2014) (Valasek, 2005).

La cuantificación puede ser utilizada en ensayos de expresión génica partiendo de los niveles del transcrito o mRNA. También se necesita contar con una muestra con un número conocido de copias de la secuencia de interés para generar una curva estándar que permita interpolar los valores de las muestras problema y obtener su concentración.

Cuando la PCR en tiempo real es utilizada para medir la expresión génica, es necesario corregir o normalizar los resultados de expresión obtenidos. Esto se realiza comparando la cantidad de mRNA de interés en relación a la expresión del mRNA de un gen constitutivo. Generalmente los genes constitutivos se expresan constante e independientemente de las condiciones experimentales, del tratamiento de las muestras, así como de los tejidos o tipos celulares de los cuales provenga el RNA (Aguilera, 2014). Algunos genes constitutivos son: GAPDH, β -actina, rRNA (18S o 16S), etc.

3. JUSTIFICACION

El Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán cuenta con un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratón que permite evaluar la respuesta inmune en función de un perfil de citocinas mediante estudios inmunológicos e histológicos. Sin embargo los avances en el análisis del material genético mediante las técnicas de biología molecular y su combinación con la infección de animales de experimentación han ayudado a dilucidar la expresión de aquellos genes que desempeñan un papel importante en la respuesta inmune del hospedero y en la patogenicidad de los microorganismos. Es por esta razón que es necesario un método de extracción y purificación de RNA procarionte y eucarionte a partir de pulmones de ratón infectados con micobacterias que nos permita evaluar y analizar la expresión de la respuesta inmune y la expresión la expresión de genes de MTB en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratón.

4. HIPOTESIS

El método de extracción de RNA evaluado en este trabajo, proporcionará resultados confiables de calidad y pureza y permitirá evaluar cuantitativamente la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune del hospedero

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar un método de extracción y purificación RNA eucarionte y procarionte a partir de pulmones de ratón infectados con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* en el modelo de tuberculosis pulmonar en ratón, para evaluar la expresión de genes de la respuesta inmune del hospedero.

Objetivos particulares:

1. Extraer y purificar el RNA procarionte y eucarionte de los pulmones infectados con la cepa *H37Rv*, durante la cinética del modelo murino de TB progresiva.
2. Determinar la calidad y pureza del RNA obtenido mediante espectrofotometría A260/A280.
3. Evaluar la calidad del RNA obtenido mediante la amplificación de fragmentos de genes constitutivos por PCR.
4. Evaluar la expresión de iNOS, IFN- γ , TNF- α e IL-4 con el RNA eucarionte

6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.1 Preparación del inóculo

6.1.1 Cultivo de la micobacteria

El cultivo de la cepa de micobacteria H37Rv ATCC 27294, se realizó en caldo BBL Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) con 0.5% de glicerol y 0.05% de Tween 80, el cual se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se dejó enfriar y dentro de una campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase II (Forma Class, A2 Biological Safety Cabinet modelo 128c) se le adicionó ADC (Albumina, Dextrosa y Catalasa) (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla final se fraccionó en botellas (Corning) con cuello angulado y tapa con filtro y se colocaron en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas para realizar la prueba de esterilidad.

Una vez confirmada la esterilidad del medio, las botellas fueron inoculadas con la cepa de la H37Rv, incubándose durante 21 días a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se colocó en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min. El sobrenadante (medio de cultivo) se eliminó y se agregaron al tubo 20 mL de buffer salino de fosfatos (PBS) con Tween 80 al 0.05% para re-suspender el pellet o botón celular (micobacterias), se le colocaron el equivalente a 5 mL de perlas de vidrio estériles de 3 mm de diámetro, el tubo se cerró y se incubó en agitación a 120 rpm a 37 °C durante toda la noche.

6.1.2 Preparación de la micobacteria.

Al día siguiente, el tubo se agitó en un vortex (agitador de remolino) durante 10 periodos de 1 min de agitación y 1 min de reposo. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min. Nuevamente se repitió el proceso de agitación y se centrifugó a 1500 rpm, 15 min. Al concluir la centrifugación, en la superficie del sobrenadante se formó una capa, la cual se transfirió a un tubo cónico nuevo de 50 mL. Para eliminar el tween 80 se le agregaron 20 mL de PBS, se agitó con vortex hasta homogenizar, se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min, se eliminó el

sobrenadante y al pellet formado, nuevamente se le agregaron 20 mL de PBS, se agitó con vortex hasta homogenizar y se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet formado se re-suspendió en un volumen final de 5 mL de PBS y se procedió a realizar la cuenta de UFC de micobacterias de la siguiente manera:

- El conteo de UFC se realizó preparando una solución stock de diacetato de fluoresceína (DAF), disolviendo 5 mg de DAF en 1 mL de acetona fría; a continuación, se preparó la solución de trabajo tomando una alícuota de 12.5µL de la solución stock y llevándola a 1 mL con PBS. Posteriormente se realizó la mezcla como se indica en la tabla 3 y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y protegido de la luz:

Suspensión de micobacterias	1µL
solución de trabajo de DAF	49µL
PBS	50µL
Volumen total	100µL

Tabla 3. Volumen de las soluciones necesarias para el conteo de UFC

- Se tomaron 10 µL de la mezcla final se colocaron en una cámara Neubauer, se observó con un microscopio de fluorescencia se realizó el conteo de bacterias verdes fluorescentes y se calculó el número de micobacterias viables utilizando la siguiente fórmula:

$$No. \frac{bacterias}{mL} = \frac{No. de UFC contadas}{No. de cuadrantes contados} \times 0.01 \times dilución$$

Justo antes de la infección intratraqueal se hizo un ajuste para obtener una concentración de 2.5×10^5 UFC/100µL. Para corroborar que el inóculo de 100 µL contiene 2.5×10^5 bacterias, se realizó una titulación de micobacterias (control de calidad), el cual consiste en tomar 100µL y hacer diluciones seriadas en medio

líquido 7H9 hasta la dilución 10^{-4} , a partir de cada una de ellas se sembraron 10 μL en medio sólido 7H10 (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) y se incubaron durante 14 a 21 días a 37°C y 5% de CO_2 para contar las UFC con la ayuda de una lupa, el resultado esperado es de 25 UFC en la dilución 10^{-3} .

6.2 Infección intratraqueal.

Un grupo de 30 ratones machos de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad, proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ, fueron anestesiados con 10 unidades de sevoflurano (sevoflurano, Abbott) por ratón utilizando cámara de gases, se les introdujo una cánula intratraqueal calibre 22G x 1" con punta de bola de 1.25 mm para evitar lesionar la tráquea de los ratones (Cadence Science, Cat. 7901) y se inyectaron 100 μL de la suspensión de micobacterias (2.5×10^5 micobacterias). Los ratones infectados se almacenaron en cajas con 10 ratones cada una, con microaisladores conectados a un sistema de presión negativa (Allenton, USA), se les administró agua y comida *ad libitum*.

6.3 Sacrificio

Siguiendo la cinética del modelo murino, en una campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase II, tres ratones al azar fueron anestesiados con pentobarbital sódico intraperitoneal a una dosis de 210 mg/Kg y sacrificados por exsanguinación a los 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días después de la infección. De cada ratón se obtuvieron por separado los pulmones izquierdo, derecho y bazo, se colocaron individualmente en crio-tubos, se cerraron y se sumergieron en N_2 líquido hasta su uso.

6.4 Extracción de RNA

Se tomaron los tres pulmones izquierdos obtenidos en cada día de sacrificio y que fueron guardados en nitrógeno líquido. Cada pulmón se trituró en un mortero y N_2 líquido, aproximadamente 5 mg de este tejido se colocaron en un tubo de polipropileno de 1.5 mL y se les agregó 1 mL de TRIzol (Qiagen, Valencia, CA). Se homogenizaron en un sonicador Multi-Gen (Pro Scientific) durante tres ciclos de

30 segundos cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante fue transferido a otro tubo e inmediatamente colocado en hielo. Este sobrenadante contiene el RNA eucarionte, mientras que el pellet contiene a los bacilos.

6.4.1 Aislamiento de RNA eucarionte

Para aislar el RNA eucarionte, los sobrenadantes obtenidos en el punto 6.4, se les agrego 250 µL de EtOH absoluto, se homogenizaron y se transfirieron a columnas de extracción (RNeasy Mini Kit, Qiagen), estas columnas combinan las propiedades selectivas de unión del RNA a membranas de silica, siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Centrifugar las columnas durante 1min a 14,000 rpm.
- Agregar a las columnas 700 µL de buffer RW1. Este buffer contiene tiocianato de guanidina y sirve para remover biomoleculas como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos, etc., mientras que el RNA permanece unido a la membrana de silica. Posteriormente, centrifugar 1 min a 14,000 rpm.
- Agregar a las columnas 500 µL de buffer RPE. La función de este buffer es remover los restos sales que están en la columna debido al buffer RW1. Posteriormente, centrifugar 1 min a 14,000 rpm.
- Transferir la membrana a un tubo de colección nuevo y centrifugar bajo las mismas condiciones para eliminar los excesos de buffer de RPE y secar completamente la membrana.
- Transferir la columna a un tubo de polipropileno de 1.5 mL nuevo, adicionar 50 µL de agua libre de RNAsas, centrifugar 1 min a 14,000 rpm.
- Nuevamente adicionar 34 µL de agua, para obtener un volumen total de 84 µL en los cuales está contenido el RNA.

6.4.2 Aislamiento de RNA procarionte.

Para aislar el RNA procarionte, los pellet obtenidos en el punto 6.4 se les agrego 1 mL de TRIzol (Qiagen) y transfirieron a tubos de polipropileno de 2 mL con tapa de rosca a los que previamente se les agregaron el equivalente a 0.1 mL de perlas de

zirconio y sílice (1 y 0.1 mm de diámetro, respectivamente). Las micobacterias fueron destruidas colocando los tubos en el aparato Mini-Bead Beater (Biospec Products Inc.), usando tres ciclos de 30 segundos a 4350 oscilaciones/min. Posteriormente los tubos se centrifugaron durante 1 min a 14,000 rpm, y el sobrenadante fue transferido a un tubo de 2 mL con tapa de rosca conteniendo 300 µL de cloroformo. Después de agitar vigorosamente con el vortex y centrifugar durante 10 minutos 14,000 rpm, la fase acuosa, se transfirió a un tubo nuevo y para precipitar RNA, se le agregaron 10 µL de glicógeno que es un acarreador de ácidos nucleicos y que permite visualizarlos, ½ volumen de acetato de sodio 5 M y 1 volumen de isopropanol, la mezcla se incubó durante 20 min a -20°C. Finalmente, el RNA de la micobacteria fue purificado utilizando cuatro ciclos de purificación con columnas (RNeasy Mini Kit, Qiagen), seguidas de una incubación con DNasa para eliminar la posible contaminación con DNA.

6.5 Síntesis de cDNA.

6.5.1 A partir de RNA eucarionte.

El cDNA eucarionte se obtuvo mediante la transcripción reversa utilizando con el kit omniscrypt RT (Qiagen, Hilden, Alemania), 500 ng de RNA eucarionte y oligo dT₁₂₋₁₈ (Promega Corporation Madison WI) utilizando la mezcla de reactivos de la tabla 4, Se realizó un control negativo de reacción, empleando todos los reactivos excepto la enzima omniscrypt RT, para descartar la presencia de DNA.

Buffer RT 10x	2 µL
dNTP's (5mM c/u)	2 µL
Oligo dT(10 µM) 1:10	2 µL
RNase inhibitor (10 U/ µl)	1 µL
Omniscrypt RT	1 µL
RNA (500 ng)	Variable
H2O free RNase	Variable
Volumen total	20µL

Tabla 4. Mezcla de reactivos para la síntesis de cDNA eucarionte.

La mezcla de reacción se colocó en tubos de polipropileno de 0.2 mL y se incubó en un termociclador marca Biorad durante 60 minutos a 37°C. Finalmente los tubos se almacenaron a -20°C hasta su uso. La concentración del cDNA fue medido por espectrofotometría, leyéndose cada muestra a una longitud de onda de 260 nm.

6.5.2 A partir de RNA procarionte

Con el RNA procarionte obtenido, se sintetizó cDNA usando random primers y la enzima MULV-RT (Applied Biosystem), utilizando los volúmenes descritos para cada muestra, en dos fases:

Fase 1:

Random primer (100 mM)	1 µL
dNTP's (10mM c/u)	2 µL
Muestra	500 ng

En esta primera fase se agregó agua libre de RNasas para completar un volumen de reacción de 20 µL. Los tubos con la mezcla se colocaron en un termociclador marca Biorad y se sometieron a un ciclo de desnaturalización a 65°C durante 5 min, posteriormente se colocaron en hielo y se les agregó lo siguiente:

Fase 2.

Buffer 5x	4 µL
DTT 0.1M	2 µL
MULV-RT (200 U/µL)	1 µL
RNase out (10U)	2 µL

Esta mezcla final se sometió a un ciclo de síntesis de cDNA durante 60 min a 37°C y a un ciclo final de desnaturalización de la enzima durante 15 min a 70°C en un termociclador. Finalmente el cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración y pureza del cDNA fue medido por espectrofotometría, leyéndose cada muestra a una longitud de onda de 260.

6.6 PCR

6.6.1 Integridad del cDNA

La calidad e integridad del cDNA se verificó mediante la PCR de genes constitutivos. Se utilizó el kit HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, USA) y los primers específicos para cada gen, siguiendo los volúmenes indicados en la tabla 5, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguidas por 35 ciclos a 95°C por 20 s, 60°C o 58°C por 20 s, 72°C por 34 s y una extensión final a 72°C por 10 min. Para el cDNA de RNA eucarionte se utilizaron primers para amplificar el fragmento del gen G3PDH y para el cDNA de RNA procarionte primers para amplificar el fragmento del gen 16S rRNA.

Mix HotStarTaq	12.5 µL
Primer F 50 pmol/µL	0.5 µL
Primer R 50 pmol/µL	0.5 µL
cDNA	1 µL (100ng/µL)
Agua libre de RNAsas	10.5 µL
Volumen total	25 µL

Tabla 5. Volumen de reactivos para la PCR punto final

La formación de un solo producto de PCR y el tamaño esperado del amplicon, 236 pb para G3PDH y 120 pb para 16S rRNA, se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1.8 %, revelados con SYBR Green (Invitrogen) y analizados por densitometría con el equipo Alpha-Innotech Chemilmager 5500 Gel Imaging (Cambridge Scientific, Watertown, Massachusetts, United States) y 2 µL marcador de masa de DNA (Invitrogen).

6.6.2 Generación de curvas estándar

Para cada gen de interés y de manera individual se realizó una PCR. Con el cDNA de RNA eucarionte se utilizaron pares de primers para amplificar fragmentos de los genes G3PDH, IFN- γ , TNF- α , iNOS e IL-4. De igual forma, para cada producto de PCR y un marcador de masa molecular de DNA (Invitrogen) se corrió una

electroforesis, los productos fueron revelados con SYBR Green (Invitrogen) y analizados por densitometría con el equipo Alpha-Innotech Chemilmager 5500 Gel Imaging (Cambridge Scientific, Watertown, Massachusetts, United States) y 2 μL del marcador de masa de DNA (Invitrogen). La concentración fue determinada mediante la comparación de las intensidades de fluorescencia entre los fragmentos y el marcador de masa molecular de concentración conocida. Posteriormente con el número de bases del producto y su concentración en copias por microlitro se elaboró una curva estándar mediante diluciones seriadas para cada uno de los productos de la PCR. Todos los primers fueron diseñados utilizando el programa Primer Express, el cual fue proporcionado por Applied Biosystem y sintetizados por Invitrogen.

6.6.3 Expresión de genes por PCR en tiempo real

La PCR en tipo real se llevó a cabo para cuantificar la expresión de los genes eucariontes G3PDH, IFN- γ , TNF- α , iNOS e IL-4 en el modelo murino de TB. Se utilizó el equipo 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystem) y el kit Quantitec SYBR Green (Qiagen, USA) que contiene Tris-Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM MgCl_2 , pH 8.7, la mezcla de dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP/dUTP), SYBR Green I y la enzima HotStarTaq DNA polimerasa. En la tabla 6 se describen los volúmenes de reacción utilizados para cada muestra.

cDNA 100 ng/ μL	1.5 μL
SYBR Green Mastermix	12.5 μL
Primer F 50 pmol/ μL	0.5 μL
Primer R 50 pmol/ μL	0.5 μL
Volumen total	15 μL

Tabla 6. Volumen de reactivos necesarios para la mezcla de reacción en la PCR-RT

Siguiendo el diseño de la figura 8 se preparó una placa de 96 pozos, para los primers con la misma T_m , fue posible analizar dos en la misma placa. La cuantificación de la expresión de los genes se realizó con el cDNA obtenido de

cada uno de los tres pulmones de tres ratones diferentes de la cinética del modelo de TB, se incluyó un control negativo y cinco puntos de la curva estándar.

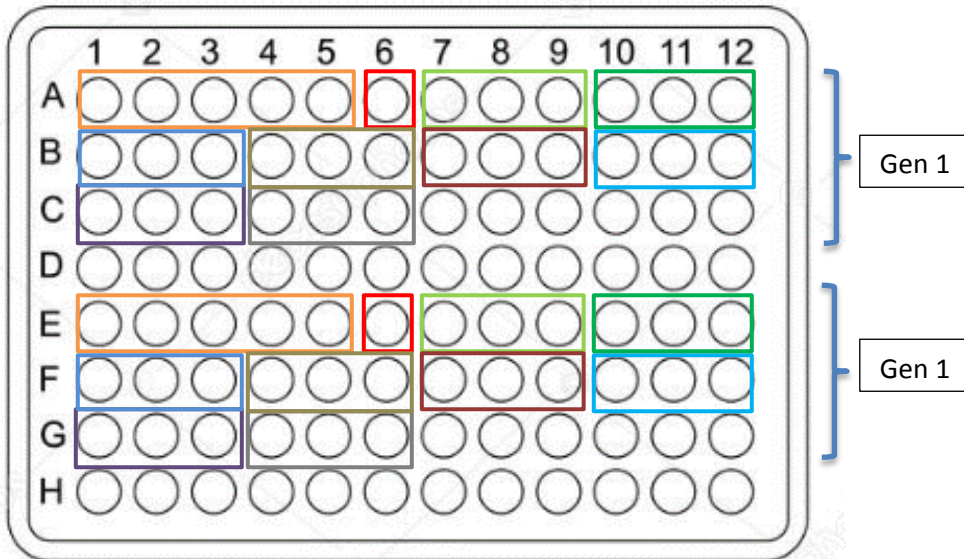


Figura 11. Diseño de la placa de trabajo para la PCR en tiempo real. Posiciones A1-A5, E1-E5: diluciones 1×10^7 hasta 1×10^3 de la curva estándar; A6, E6: control negativo; A7-A9, E7-E9: cDNA día 1; A10-A12, E10-E12: cDNA día 3; B1-B3, F1-F3: cDNA día 7; B4-B6, F4-F6: cDNA día 14; B7-B9, F7-F9: cDNA día 21; B10-B12, F10-F12: cDNA día 28; C1-C3, G1-G3: cDNA día 60; C4-C6, G4-G6: cDNA día 120.

La placa fue colocada dentro del termociclador y el equipo se programó de la siguiente manera: un ciclo desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, 35 ciclos a 95°C por 20 s para desnaturalización, el alineamiento se realizó dependiendo de la T_m de cada gen por 20 s, 72°C por 34 s para la elongación.

La T_m de un primer es un valor de importancia crítica, la ecuación más simple para calcularla está dada por la Regla de Wallace, donde A, G, C y T corresponde al número de nucleótidos presentes en la secuencia del primer:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Ejemplo:

- Para el primer para el gen G3PDH la secuencia es la siguiente

CAT TGT GGA AGG GCT CAT GA

- Aplicando la fórmula:

$$T_m = 2(5 + 5) + 4(7 + 3)$$

$$T_m = 60^{\circ}C$$

Con el software 7500 System Sequence Detection (Applied Biosystem), se analizaron los resultados obtenidos en la PCR en tiempo real. Se obtuvieron los valores del número de copias para cada fragmento de gen estudiado con respecto a la curva estándar de concentraciones conocidas que se incluyó en cada experimento. Los resultados de la PCR en tiempo real de los genes de la respuesta inmune del hospedero analizados se normalizaron con respecto a los resultados obtenidos para el gen constitutivo, dividiendo 1×10^6 entre el número de copias del gen constitutivo y multiplicando el resultado por el número de copias del gen de interés para cada punto de la cinética del modelo de Tb pulmonar progresiva, expresando el resultado de la siguiente manera:

$$\text{No. Copias de gen}/10^6 \text{ copias de G3PDH}$$

6.6.4 Análisis estadístico

La prueba de Kaplan-Meyer fue utilizada para el análisis de la curva de supervivencia. Para las curvas de expresión de mRNA se realizó un análisis estadístico tipo ANOVA y una t de Student con los cuales se comparó la expresión entre cada uno de los puntos de la cinética del modelo murino de TB. Las diferencias se consideran significativas cuando $p < 0.05$. Los resultados en las gráficas de resultados se presentan como las medias, +/- la desviación estándar. Los asteriscos indican que existe diferencia significativa entre cada uno de los puntos de la cinética del modelo de TB progresiva.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de sobrevida

Como se describió previamente, se tomó como referencia el modelo de TB pulmonar progresiva en ratones descrito por el Dr. Hernández-Pando y estandarizado en el laboratorio (Hernández-Pando, 1996) (Hernández-Pando R, 2011), en cual consiste en inocular ratones BALB/c con un número de conocido de bacterias vivas a estudiar, en este caso la cepa H37RV (Cepa prototipo de *M. tuberculosis*). Los ratones infectados se monitorearon diariamente durante la cinética del experimento para llevar el registro de sobrevida (Figura 9).

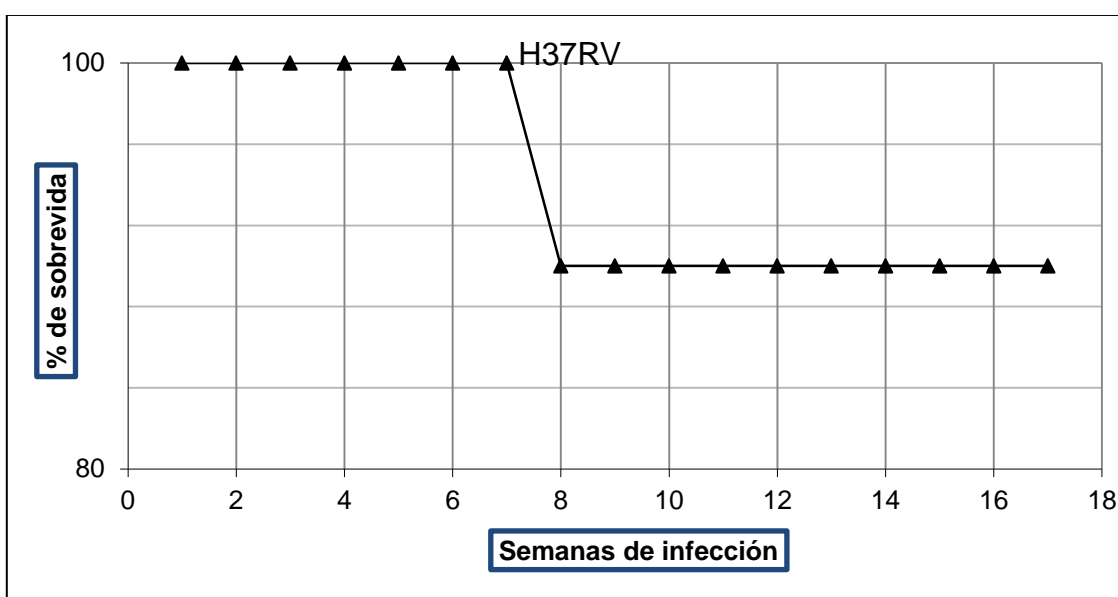


Figura 12. Porcentaje de sobrevida producido por la cepa H37RV en ratones BALB/c después de la infección con 2.5×10^5 micobacterias vía intra-traqueal a lo largo del experimento. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kaplan-Meier ($n= 30$ ratones).

El grupo llegó completo hasta la semana 7, cuando ocurrió la muerte de tres ratones entre los días 49 y 56, sin que hubiera diferencia estadística significativa, posterior a esto todos los ratones sobrevivieron teniendo al final de la cinética del modelo una sobrevida del 90%. A lo largo del experimento, los ratones presentaron de forma progresiva pérdida de peso, adinamia, pilo-erección, cianosis y dificultad para respirar, manifestaciones de la enfermedad que también han sido observadas y descritas en el modelo utilizado. El experimento se dio por

terminado en la semana 17 post-infección (día 120), todos los ratones que sobrevivieron hasta este punto fueron sacrificados.

7.2 Pureza del RNA.

Después del proceso de extracción del RNA, se analizó su pureza a través de la correlación de absorbancias A260/A280 en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) (Tabla 7). Se muestran los resultados de 24 RNA eucarionte y 24 RNA procarionte que corresponden a los tres pulmones de ratón obtenidos en cada uno de los puntos de sacrificio de la cinética del modelo de TB pulmonar (1, 3,7, 14, 21, 60 y 120 días post-infección) y que cumplieron con el criterio de aceptación al tener una relación $A260/280 \geq 1.8$. Las muestras de RNA que tuvieron una relación $A260/280 < 1.8$, fueron desechadas y el proceso de extracción se repitió.

Muestra	A260/280 RNA eucarionte	A260/280 RNA procarionte	Muestra	A260/280 RNA eucarionte	A260/280 RNA procarionte
D1.R1	1.965	1.909	D21.R1	2.004	2.172
D1.R2	1.823	1.826	D21.R2	2.185	2.122
D1.R3	2.058	1.914	D21.R3	1.987	2.108
D3.R1	2.260	1.950	D28.R1	2.056	1.905
D3.R2	2.158	1.958	D28.R2	1.973	1.967
D3.R3	2.179	1.934	D28.R3	2.375	1.998
D7.R1	2.249	1.923	D60.R1	2.025	1.947
D7.R2	2.167	1.965	D60.R2	2.189	2.381
D7.R3	2.179	1.975	D60.R3	2.062	2.254
D14.R1	2.039	2.364	D120.R1	2.001	2.397
D14.R2	2.121	2.008	D120.R2	2.013	1.978
D14.R3	2.278	2.031	D120.R3	2.128	2.004

Tabla 7. Resultados de lecturas de absorbancia 260/280 de 24 muestras de RNA eucarionte y 24 muestras de RNA procarionte. D: día de sacrificio post-infección, R: número de ratón.

7.3 Determinación de la calidad del RNA

Para evaluar la calidad del RNA obtenido en el proceso de extracción, con las muestras de RNA eucarionte y RNA procarionte que cumplieron con los criterios de pureza óptima o aceptable (Tabla 7) se realizó la respectiva síntesis de cDNA,

A partir del RNA eucarionte se obtuvo 24 muestras de cDNA correspondientes a cada ratón en cada punto de la cinética de sacrificio. De forma aleatoria se tomaron 8 muestras de cDNA y se realizó una PCR punto final utilizando cebadores para la amplificación de un fragmento del gen G3PDH y posteriormente una electroforesis con un marcador de peso molecular de 100 pb (Figura 13). En la figura se pueden observar que en los carriles 2 al 9, solo existe una banda intensa de amplificación que de acuerdo al marcador de peso molecular del carril 1 corresponde a un peso molecular aproximado de 200 pb, esto concuerda con el fragmento del gen G3PDH que es de 236 pb.

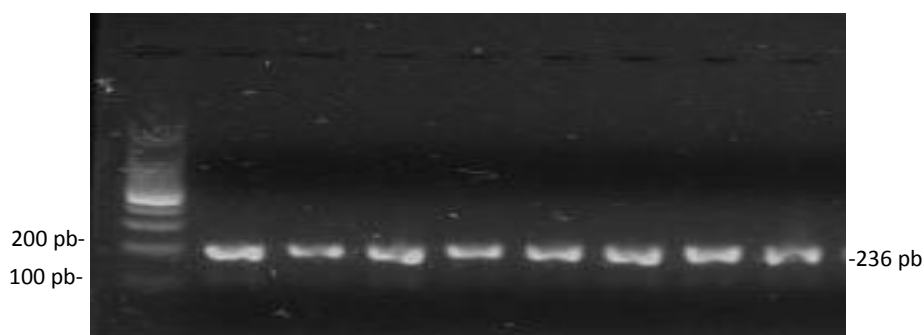


Figura 13. Electroforesis de los productos de PCR para del fragmento del gen G3PDH. En el carril 1: se observa el marcador de peso molecular de 100 pb. Los carriles 2 al 9 corresponden a los amplificados de 8 muestras aleatorias de cDNA proveniente de RNA eucarionte

De forma similar con el RNA procarionte se obtuvo 24 muestras de cDNA correspondientes a cada ratón en cada punto de la cinética de sacrificio. Con 8 muestras aleatorias de cDNA se realizó una PCR punto final utilizando cebadores para la amplificación de un fragmento del gen 16S, posteriormente una electroforesis con un marcador de peso molecular de 50 pb (Figura 14), donde se observa que en los carriles 2 al 9, solo existe una banda intensa de amplificación

que de acuerdo al marcador de peso molecular del carril 1 corresponde a un peso molecular aproximado de 100 pb, esto concuerda con el fragmento del gen 16S que es de 120 pb.

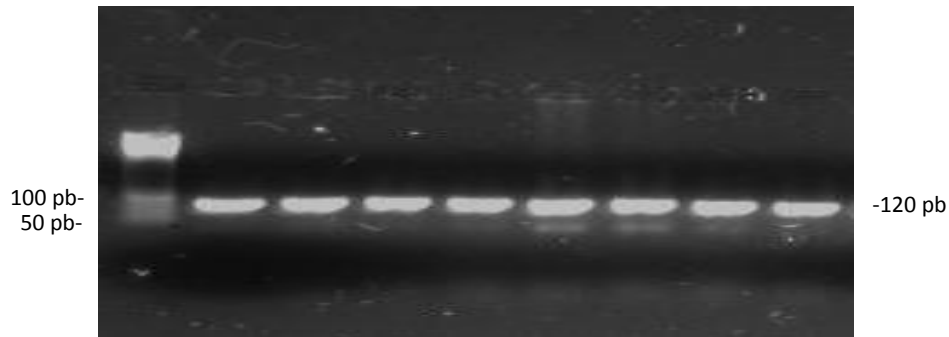


Figura 14. Electroforesis de los productos de PCR para del fragmento del gen 16S. En el carril 1: se observa el marcador de peso molecular de 100 pb. Los carriles 2 al 9 corresponden a los amplificados de 8 muestras aleatorias de cDNA proveniente de RNA procarionte

Uno de los mejores indicadores de la calidad del RNA es su funcionalidad en técnicas moleculares posteriores a la extracción, como la síntesis de cDNA y la amplificación de genes de interés mediante la PCR. Los resultados observados en las figuras 13 y 14, indican que tanto el RNA eucarionte como el RNA procarionte obtenidos durante el proceso de extracción, es de buena calidad, ya que es funcional y en ambas fotos se observan bandas de amplificado para genes constitutivos, G3PDH para cDNA eucarionte y 16S para cDNA procarionte.

7.4 Determinación de la pureza del RNA eucarionte/RNA procarionte

Para determinar si el RNA eucarionte estaba puro y no contaminado con RNA procarionte se realizó la búsqueda intencionada de amplificados del gen 16S en el cDNA eucarionte. Para esto se tomaron aleatoriamente 5 muestras de RNA eucarionte y 5 muestras de RNA procarionte como control positivo, con ellas se realizó la síntesis de cDNA mediante random primers como cebadores y posteriormente una PCR utilizando cebadores para el fragmento del gen

constitutivo 16S y una electroforesis para visualizar los productos de amplificación (Figura 15). En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 50 pb, en los carriles 2-6 donde se colocaron los productos de la PCR donde se utilizó RNA eucarionte y no se observa ninguna banda de amplificado, mientras que en los carriles 7-11 donde se utilizó el RNA procarionte se observan bandas intensas de ≈ 100 pb que concuerdan con los 120 pb del fragmento del gen 16S. Los resultados observados en la figura nos indican que el RNA eucarionte esta puro ya que aunque se hizo la síntesis intencionada para cDNA procarionte y la posterior amplificación del gen 16S, no se observan bandas de amplificación.

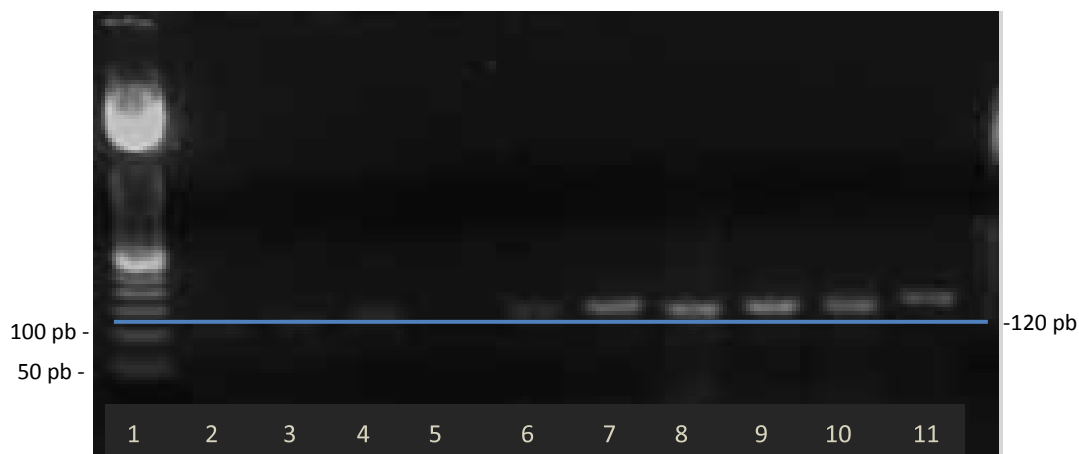


Figura 15. Electroforesis de los productos de PCR para del fragmento del gen 16S. En el carril 1: se observa el marcador de peso molecular de 50 pb. En los carriles 2 al 6 se utilizó RNA eucarionte. En los carriles 7- 11 se utilizó RNA procarionte como control positivo.

Por otro lado, para determinar si el RNA procarionte estaba puro y no contaminado con RNA eucarionte se realizó la búsqueda intencionada de amplificados del gen G3PDH en el cDNA procarionte. Se tomaron de forma aleatoria 5 muestras aleatorias de RNA procarionte y 5 muestras de RNA eucarionte como control positivo, la síntesis de cDNA se realizó mediante oligos dT como cebadores y posteriormente una PCR utilizando cebadores para el fragmento del gen constitutivo G3PDH, posteriormente una electroforesis para visualizar los productos de amplificación (Figura 16). En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 100 pb, en los carriles 3-7 se colocaron los productos de la

PCR donde se utilizó RNA eucarionte y se observan bandas intensas de ≈ 200 pb que concuerdan con los 236 pb del fragmento del gen G3PDH, mientras que en los carriles 8-12 se colocó el producto de la PCR donde se utilizó RNA procarionte no se observan bandas de amplificado. A pesar de la síntesis intencionada de para cDNA eucarionte y la PCR para el gen G3PDH, en el RNA procarionte los resultados observados en la figura nos indican que el RNA procarionte ya que no se observan bandas de amplificación.

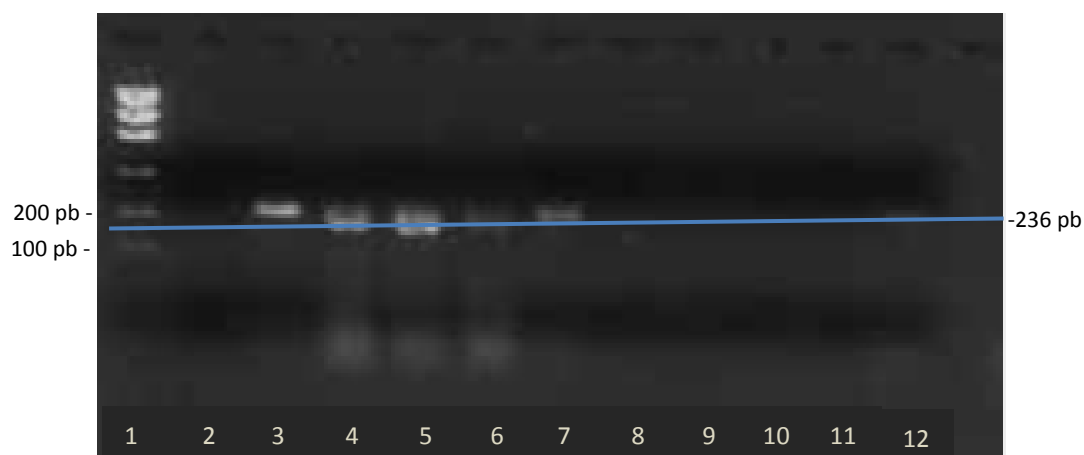


Figura 16. Electroforesis de los productos de PCR para del fragmento del gen G3PDH. En el carril 1: se observa el marcador de peso molecular de 100 pb. En los carriles 2 al 6 se utilizó RNA eucarionte como control positivo. En los carriles 7- 11 se utilizó RNA procarionte.

7.5 Cuantificación de la expresión de citocinas por PCR en tiempo real.

Se realizó el análisis de la respuesta inmune en los pulmones mediante la cuantificación de la expresión de los perfiles Th1 y Th2 para saber qué tipo de respuesta predomina durante la cinética del modelo de Tb pulmonar progresiva. Se analizó la enzima iNOS (Figura 17), las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ (Figura 18), TNF- α (Figura 19) y de la citocina anti-inflamatoria IL-4 (Figura 20), cuyo comportamiento en el modelo de TB pulmonar progresiva, se ha descrito en nuestro grupo de trabajo. Este conjunto de citocinas son cruciales en la respuesta inflamatoria y en el desenlace de la infección por MTB en el modelo de TB pulmonar progresiva en ratones.

La enzima iNOS favorece al respuesta inmune protectora, la cual tuvo altos niveles de expresión con un pico máximo desde el día 1 manteniéndose estable hasta el día 21, teniendo solo una disminución significativa en el día 28 post-infección posterior a este día la expresión continuo en descenso hasta el día 120 sin que hubiera diferencia estadística. Del mismo modo el IFN- γ tiene su expresión pico más alto de expresión en el día 1, es decir existe una fuerte respuesta pro-inflamatoria desde el inicio del experimento, sin embargo hay una disminución estadísticamente significativa que se mantiene del día 1 al día 14, después de esto y hasta el final del experimento la expresión se mantiene con una tendencia estaba a la baja. En el caso del TNF- α , aunque su expresión es alta, a lo largo del experimento hay una ligera tendencia a la baja, sin que exista diferencia significativa entre los días post-infección.

La expresión de la IL-4, se observa que es baja al inicio de experimento con un aumento gradual durante el transcurso de la cinética y que tuvo un aumento con diferencia significativa a partir del día 14 manteniéndose con esa tendencia hasta el día 120.

Los resultados obtenidos permiten observar el balance de citocinas que existe durante la TB progresiva en los ratones. La citocinas pro-inflamatorias tiene una alta expresión desde el primer día posterior a la infección con MTB, favoreciendo la respuesta tipo Th1. Sin embargo, la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-4 tiene un incremento gradual y significativo favoreciendo una respuesta tipo Th2 a partir del día 14 y hasta el final del experimento.

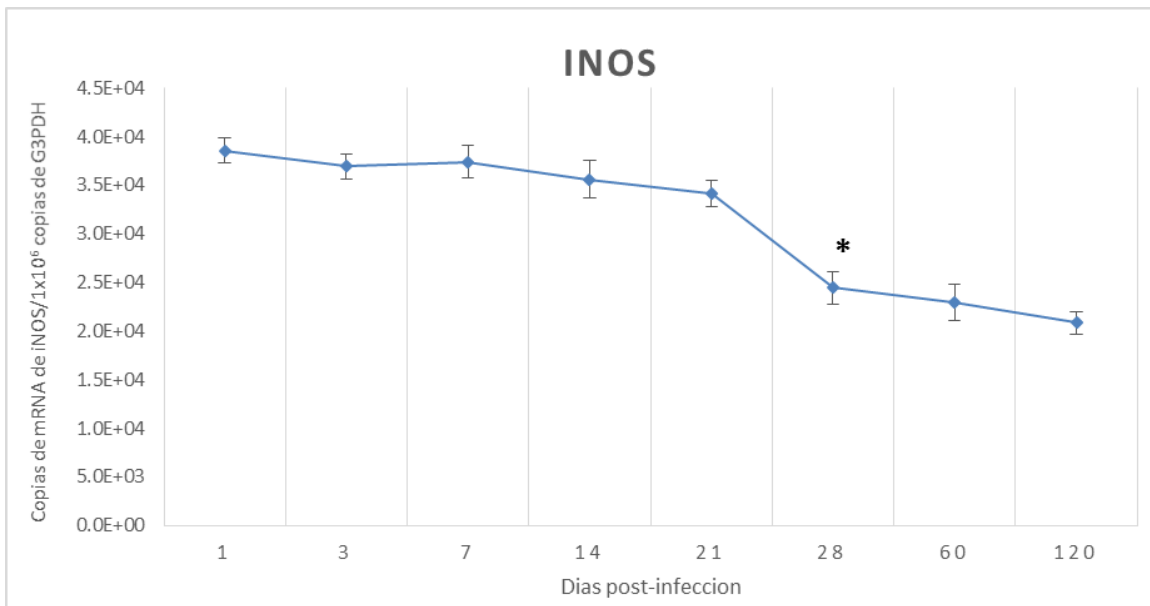


Figura 17. Cuantificación de la expresión de iNOS por PCR en tiempo real. Los valores representan la media y la desviación estándar de los pulmones de ratón (n=3) obtenidos en cada punto de la cinética del modelo de TB progresiva. Los asteriscos representan la diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) al comparar la expresión génica entre los días de sacrificio post-infección.

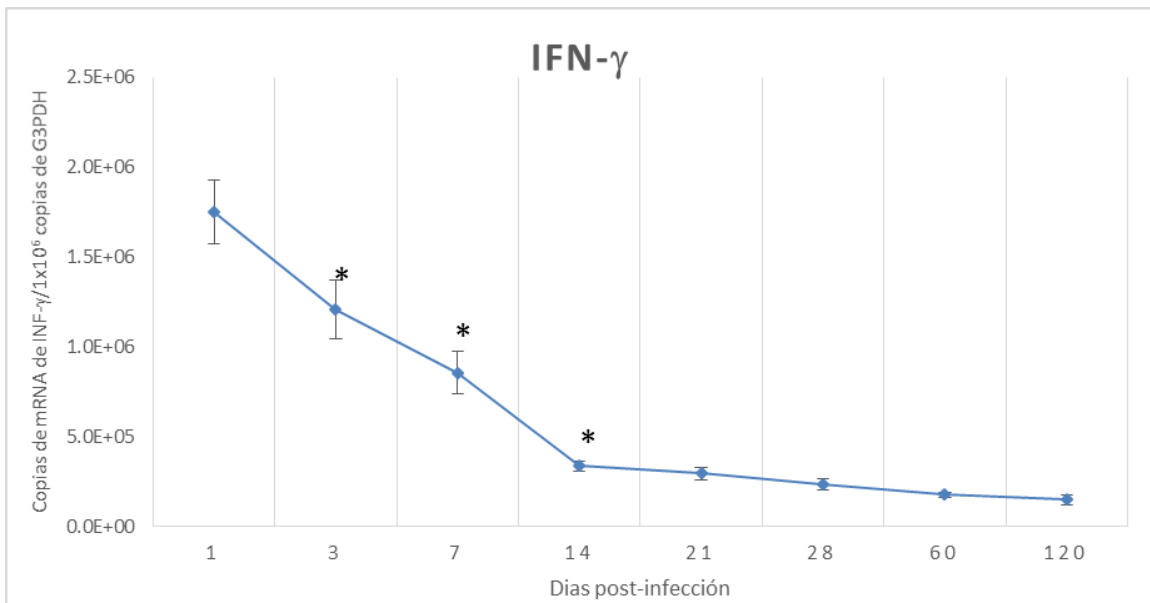


Figura 18. Cuantificación de la expresión de IFN- γ por PCR en tiempo real. Los valores representan la media y la desviación estándar de los pulmones de ratón (n=3) obtenidos en cada punto de la cinética del modelo de TB progresiva. Los asteriscos representan la diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) al comparar la expresión génica entre los días de sacrificio post-infección.

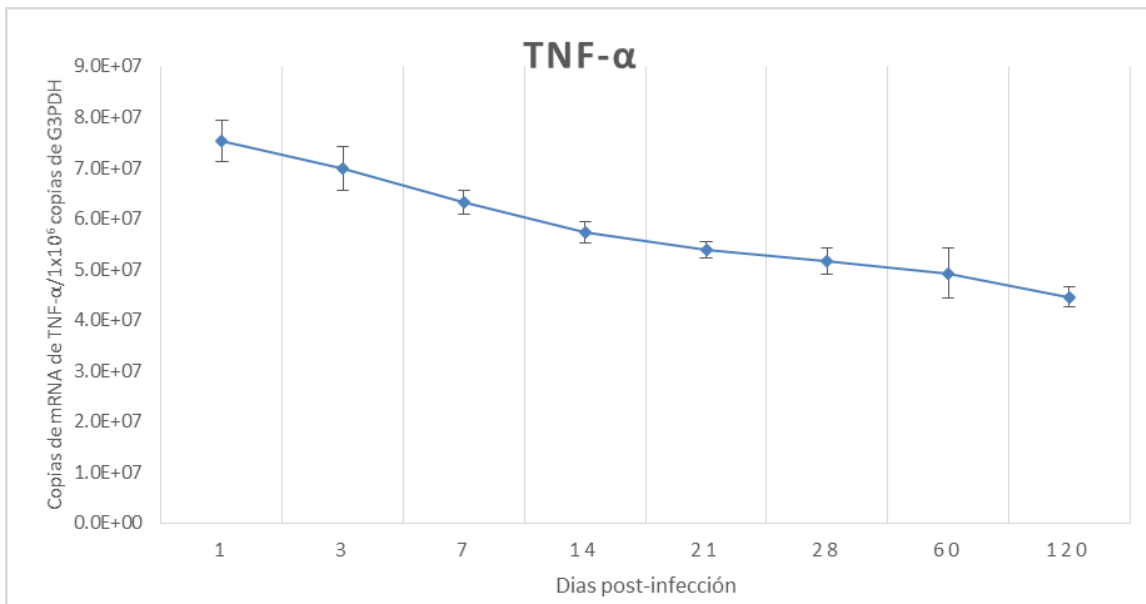


Figura 19. Cuantificación de la expresión de TNF- α por PCR en tiempo real. Los valores representan la media y la desviación estándar de los pulmones de ratón ($n=3$) obtenidos en cada punto de la cinética del modelo de TB progresiva. Los asteriscos representan la diferencia estadística significativa ($p<0.05$) al comparar la expresión génica entre los días de sacrificio post-infección.

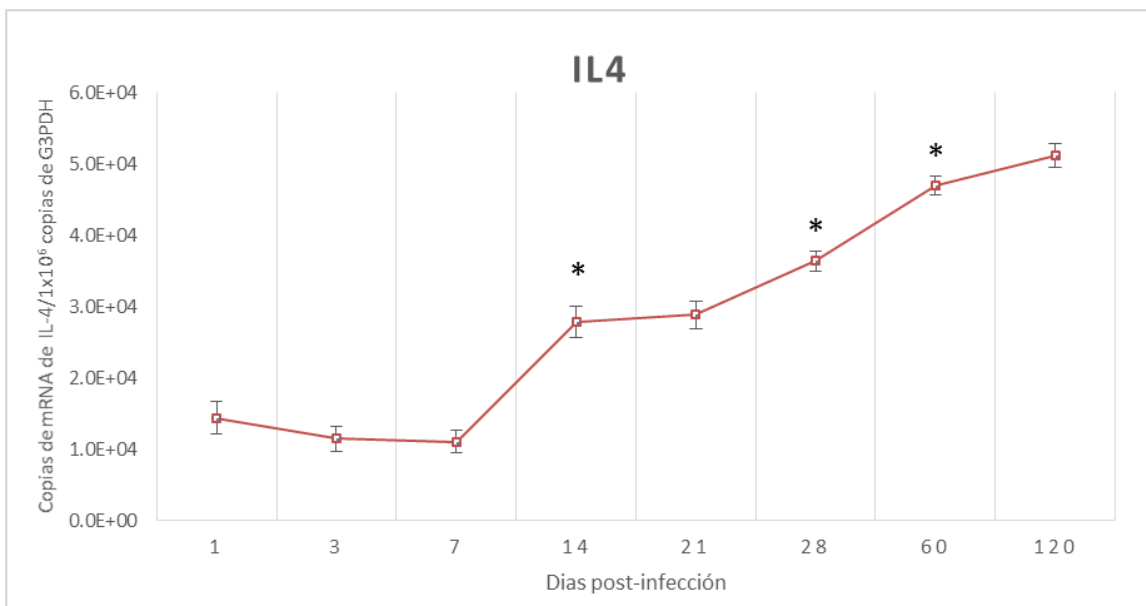


Figura 20. Cuantificación de la expresión de IL-4 por PCR en tiempo real. Los valores representan la media y la desviación estándar de los pulmones de ratón ($n=3$) obtenidos en cada punto de la cinética del modelo de TB progresiva. Los asteriscos representan la diferencia estadística significativa ($p<0.05$) al comparar la expresión génica entre los días de sacrificio post-infección.

8. DISCUSIÓN

Los resultados indican que durante la tuberculosis progresiva en el modelo murino se observa un 90% de supervivencia hasta el final del experimento, lo que concuerda con los resultados observados en nuestro grupo de trabajo y que fueron publicados por (J. Dormans, 2004), en el cual evalúan diferentes cepas de MTB en el modelo de TB pulmonar y reportan un rango de muerte de 0 a 10% para la cepa H37Rv clasificándola como de baja virulencia.

Para la extracción de RNA, de forma aleatoria se utilizaron tres pulmones de ratón para cada punto de la cinética descrita. El RNA eucarionte y RNA procarionte que tuvieron una relación de A260/280 con un valor mayor a 2.0 fueron utilizadas para la síntesis de cDNA, ese valor se relaciona con una pureza óptima. Para aquellos RNA que no cumplieron con este valor, se les aplicó el segundo criterio de inclusión, el cual es que tuvieran una relación de absorbancia mayor a 1.7 que es indicativo de pureza aceptable. Para las muestras con valores < 1.7, el RNA fue desechado y se repitió el proceso de extracción, debido a que estos valores indicarían la contaminación con compuestos aromáticos que tienen absorbancias cercanas a 280nm. Al final de este punto de la metodología, se obtuvieron 48 muestras analizadas (24 de RNA eucarionte y 24 de RNA procarionte) con RNA de pureza óptima o aceptable (Tabla 7), los resultados nos indican que el proceso de extracción de ambos tipos de RNA fue exitoso y confiable.

En cuanto a la calidad del RNA obtenido, los resultados nos indican que durante los procesos de extracción y purificación el RNA no sufrió degradación ya que en los geles de los fragmentos de genes constitutivos, solo se observan amplificadores de un solo tamaño, el cual corresponde con lo esperado, 236 pb para el fragmento de G3PDH para ratón y 120 pb para el fragmento de 16S RNA para la micobacteria.

La relación de absorbancia 260/280 evalúa la pureza de los ácidos nucleicos en relación a la probable contaminación con proteínas de restos celulares o con compuestos aromáticos residuales de los reactivos utilizados durante el proceso de extracción. Sin embargo, necesitábamos saber el RNA eucarionte está

realmente purificado del RNA procarionte y viceversa. Los resultados nos indican que la metodología utilizada fue adecuada, ya que al utilizar primers para G3PDH como constitutivo específico para ratón, solo hay amplificados cuando se utilizó cDNA de RNA eucarionte, mientras que cuando se utilizó el cDNA de RNA procarionte no hay amplificación, esto nos asegura que en el primer paso de nuestra metodología donde agregamos TRIzol (Qiagen, Valencia, CA) y homogenizamos en un sonicador Multi-Gen (Pro Scientific), estamos obteniendo RNA del hospedero. De manera similar, al utilizar primers para 16S RNA, constitutivo para ratón, solo hay bandas de amplificado cuando se utilizó el cDNA de RNA procarionte, mientras que cuando se utilizó el cDNA de RNA eucarionte no hay amplificado, indicándonos que el RNA procarionte no está contaminado con RNA eucarionte.

Después de haber evaluado la calidad y la pureza del RNA eucarionte, se realizó la PCR en tiempo real para medir la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune del hospedero durante la TB progresiva y poder corroborarlos con los resultados obtenidos con otras metodologías como la densitometría, ELISA o inmunohistoquímica realizados y publicados en el modelo murino de TB progresiva utilizado (Arriaga A., 2002) (Hernández-Pando R., 1997) (Hernández-Pando, 1996).

Los resultados muestran que la metodología para la extracción y purificación de RNA eucarionte y procarionte es efectiva, ya que es posible observar, dos etapas bien definidas de la infección con MTB en ratones Balb/c machos. Los resultados obtenidos tienen la misma tendencia que en los reportados por primera vez en nuestro grupo de trabajo descrito en el año 1996 por Dr. Hernández Pando y cols., en el cual se caracterizó por primera vez la infección murina por la cepa H37Rv en función de la sobrevivencia de los ratones, el daño histopatológico, el número de UFC presente en los pulmones y por la correlación de la cinética de citocina TH1/TH2. Es conocido que durante la infección primaria, la encargada de eliminar la infección por MTB, está dada principalmente una respuesta del tipo Th1, dominada por altos niveles de producción de citocinas pro-inflamatorias, las cuales junto a altos niveles de la enzima iNOS, controlan temporalmente la infección.

Para la expresión de los 4 genes estudiados, es posible observar una primera etapa con un predominio de respuesta Th1 con una alta producción de las citocinas IFN- γ , TNF- α e y de la enzima iNOS desde el primer día de infección y cuya producción favorece la activación de diversas estirpes celulares que ayudan a la muerte de las micobacterias y por lo tanto al control de la enfermedad. También se puede observar una segunda etapa, donde las citocinas pro-inflamatorias disminuyen y dan lugar al aumento de la citocina anti-inflamatoria IL-4, provocando un cambio hacia una respuesta Th2 lo que provocan la desactivación de las células que eliminan a las micobacterias y propician la progresión de la enfermedad donde las áreas neumónicas prevalecen sobre los granulomas, la carga bacilar y a neumonía aumentan, lo que provoca la muerte de los ratones.

9. CONCLUSIONES

- La metodología de extracción y purificación evaluada fue efectiva, se logró obtener RNA, tanto eucarionte como procarionte, de calidad y pureza suficiente para la síntesis de cDNA y la posterior evaluación de la expresión de genes mediante PCR en tiempo real.
- Los resultados de la expresión de la respuesta inmune es comparable con lo reportado previamente para este modelo murino de TB.
- La metodología evaluada puede ser utilizada en experimentos posteriores en el modelo de TB pulmonar progresiva, en el cual se evalúan vacunas o tratamientos anti-tuberculosos, además de evaluar la respuesta inmune ante cepas mutantes de TB.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilera P, Ruiz M, Rocha M, Pineda B, Chanes ME. PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. ResearchGate. 2014.
2. Agyeman AA, Ofori-Asenso R. Tuberculosis-an overview. J Public Health Emerg. 2017; 1(7): 1-11.
3. Alderwick LJ, Harrison J, Lloyd GS, Birch HL. The Mycobacterial Cell Wall—Peptidoglycan and Arabinogalactan. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015; 5: 1-15.
4. Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Vázquez Meza H. (eds). Mensaje Bioquímico, Vol. XXXV, 2011, 1-16. Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, México. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
5. Apt A, Kramnik I. Man and mouse TB: contradictions and solutions. Tuberculosis. 2009; 89(3): 195–198.
6. Arriaga K, Orozco H, Aguilar D, Rook GA, Hernández-Pando R. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. Clin Exp Immunol. 2002; 128:229–237
7. Bañuls AL, Sanou A, Thi Van Anh N and Godreuil S. Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. Journal of Medical Microbiology. 2015; 64: 1261–1269.
8. Barrios-Payán Jorge, Saqui-Salces M, Jeyanathan M, Alcántara-Vazquez A, Castañon-Arreola M, Rook G, Hernandez-Pando R. Extrapulmonary Locations of *Mycobacterium tuberculosis* DNA During Latent Infection. The Journal of Infectious Diseases. 2012; 206:1194–205.
9. Benavides FJ, Guénet JL. Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. Universidad de Alcalá de Henares, 2003
10. Bifani P, Moghazeh S, Shopsisin B, Driscoll J, Ravikovitch A, Kreiswirth BN. Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra

- Variants: Distinguishing the Mycobacterial Laboratory Strain. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 9(38): 3200–3204.
11. Bobadilla K, Rivas B, Sada E, Torres M. Biogénesis del fagolisosoma micobacteriano y su papel en el procesamiento y presentación del antígeno. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2009; 22(1):56-62
 12. Brennan PJ. Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2003; 83: 91–97.
 13. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*. 2015.
 14. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000; 25(2):169-93.
 15. Cadena A, Fortune S, Flynn J. Heterogeneity in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*. 2017; 17: 691-702
 16. Capuano S, Croix D, Pawar S, Zinovik A, Myers A, Lin P, Bissel S, Fuhrman C, Klein E, Flynn JA. Experimental *Mycobacterium tuberculosis* Infection of *Cynomolgus* Macaques Closely Resembles the Various Manifestations of Human *M. tuberculosis* Infection. *Infection and Immunity*. 2003; 71(10): 5831–5844
 17. Chinta KC, Saini V, Glasgow JN, Mazorodze JH, Rahman A, Reddy D, Lancaster JR, Steyn A. The emerging role of gasotransmitters in the pathogenesis of Tuberculosis. *Nitric Oxide*. 2016; 59: 28-41.
 18. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*. 2006; 100: 1862–1870.
 19. Davies P. Tuberculosis. *Encyclopedia of life sciences*. 2007.
 20. Delogu G, Sali M, Fadda G. The Biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013; 5.
 21. Deretic V. Autophagy, an immunologic magic bullet: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation block and how to bypass it. *Future Microbiol*. 2008; 3(5): 517–524.

22. Dorman S, Hatem C, Tyagi S, Aird K, Lopez-Molina J, Pitt ML, Zook B, Dannenberg A, Bishai W, Manabe Y. Susceptibility to Tuberculosis: Clues from Studies with Inbred and Outbred New Zealand White Rabbits. *Infection and Immunity*. 2004; 72(3): 1700–1705
23. Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P, Arend SM, Van Soolingen D. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different Mycobacterium genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol* 2004; 137:460–468
24. Dutta N, Karakousis P. Latent Tuberculosis Infection: Myths, Models, and Molecular Mechanisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2014; 78(3); 343-371
25. Fierro FF. Electroforesis de DNA. Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa
26. Furin J, Pai M. Tuberculosis. *The Lancet*. Publicado en línea: <http://dx.doi.org/10.1016/>. 2019: 1-15
27. S0140-6736(19)30308-32019:
28. Garibyan L, Avasshia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol*. 2013; 133(3)
29. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
30. Golden MP, Vikram HR. Extrapulmonary Tuberculosis: An Overview. *American Family Physician*. 2005; 72(9): 1761-1768.
31. González-Martin J. Microbiología de la tuberculosis. *Semin Fund Esp Reumatol*. 2014; 15(1):25–33
32. Gorocica P. Jimenez MC. Garfias Y. Sada I. Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2005; 18(2): 142-153.

33. Gutiérrez M, Master S, Singh S, Taylor G, Colombo M, Deretic V. Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis Survival in Infected Macrophages. *Cell*. 2004; 119: 753–766
34. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathogens*. 2005; 1(1): 55-61.
35. Hartmans S, De Bont J, Stackebrand E. The Genus Mycobacterium—Nonmedical. *Prokaryotes*. 2006; 3:889–918.
36. Held P. Nucleic Acid Purity Assessment using A260/A280 Ratios. *BioTek*. 2006
37. Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid-Marina V. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1996; 89: 26-33
38. Hernández-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 α , tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β , during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1997; 90: 607-617
39. Houben R, Dodd P. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLOS Medicine*. 2016; 13(10): 1-13
40. Huard R, Fabre M, Haas P, Lazzarini L, Soolingen D, Cousins d, Ho JL. Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the Mycobacterium tuberculosis Complex. *Journal of Bacteriology*. 2006; 188(12): 4271-4287.
41. Hunter RL, Olsen MR, Jagannath C, Actor JK. Review: Multiple Roles of Cord Factor in the Pathogenesis of Primary, Secondary, and Cavitory Tuberculosis, Including a Revised Description of the Pathology of Secondary Disease. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2006; 36(4): 371-386.

42. Jordao L, Vieira O. Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease. International Journal of Cell Biology. 2011
43. Koltai T. Manual de biología molecular: técnicas de laboratorio. ResearchGate. 2011. <https://www.researchgate.net/publication/317038957>
44. Marrakchi H, Lanéelle MA, Daffé M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. Chemistry & Biology. 2014; 21: 67-85
45. Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity. Thermo Fisher Scientific. 2015
46. Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control. Agilent Technologies, Waldbronn, Germany. 2016.
47. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
48. O'Garra A, Redford P, McNab F, Bloom C, Wilkinson R, Berry M. The Immune Response in Tuberculosis. Annu. Rev. Immunol. 2013; 31:475–527
49. Olson E, Graham D. Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine: Animal Models in Pharmacogenomics. ScienceDirect. 2014.
50. Orme IM. The mouse as a useful model of tuberculosis. Tuberculosis. 2003; 83: 112–115
51. Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. AKMMC J. 2013; 4(1): 30-36
52. Ribon W. Biochemical Isolation and Identification of Mycobacteria. IntechOpen. www.intechopen.com
53. Salgame P, Geadas C, Collins L, Jones-López E, Ellner JJ. Latent tuberculosis infection e Revisiting and revising concepts. Tuberculosis. 2015; 95: 373-384
54. Schluger N. The Pathogenesis of Tuberculosis. The First One Hundred (and Twenty-Three) Years. Am J Respir Cell Mol Biol. 2005; 32: 251–256
55. Sidders B, Stroker N. Mycobacteria: Biology. Encyclopedia of life sciences. 2007. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020389.
56. Silver L. Encyclopedia of Immunology: Inbred Strain. 2 Ed. ScienceDirect. 2001

57. Smith I. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003; 16(3): 463–496
58. Stewart G, Robertson B, Young D. Tuberculosis: a problem with persistence. *Microbiology, Nature Reviews*. 2003; 1: 97-105
59. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. 2013; 2(2): 70-78. <http://www.medigraphic.com/rid>
60. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005; 29: 151–159
61. WHO. Global Tuberculosis Report: Executive Summary 2018.
62. Zamorano J, Rivas M, Perez-G M. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. *Inmunología*. 2003; 22(2): 215-224