



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DE LA VACUNACIÓN CON BCG $\Delta$ BCG1419c EN  
UN MODELO MURINO DE TUBERCULOSIS Y DIABETES  
MELLITUS TIPO 2**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**MONTSERRAT DE LA LUZ LÓPEZ ANGUIANO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. BRENDA NOEMÍ MARQUINA CASTILLO**

**Ciudad Universitaria , CD. MX., 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

1. Datos del alumno  
López  
Anguiano  
Montserrat de la Luz  
5591557849  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
No. de cuenta 312092168
2. Datos del tutor  
Dra.  
Brenda Noemí  
Marquina  
Castillo
3. Datos del sinodal 1  
Dra.  
María Teresa  
Herrera  
Barrios
4. Datos del sinodal 2  
Dra.  
Laura del Carmen  
Vargas  
Parada
5. Datos del sinodal 3  
Biól.  
Claudia Ivette  
Rivas  
Ortíz
6. Datos del sinodal 4  
Dra.  
Martha  
Torres Rojas
7. Datos del trabajo escrito  
Efecto de la vacunación con BCG $\Delta$ BCG1419c en un modelo murino de tuberculosis y diabetes mellitus tipo 2  
72 p  
2020

## **Agradecimientos académicos**

Agradezco a la UNAM, a la Facultad de Ciencias, al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y a la Unidad de Patología Experimental, por brindarme mi primera oportunidad en el área de la ciencia.

A mi directora de tesis, la Dra. Brenda Marquina Castillo por confiar en mi, por su comprensión y ayudarme a crecer tanto profesional como personalmente.

A los doctores Jorge Barrios Payan, a la Dra. Dulce Mata Espinoza y al Dr. Rogelio Hernández Pando, por la oportunidad, enseñanzas y tiempo dedicado.

A las doctoras Laura del Carmen Vargas Parada, Martha Torres Rojas, María Teresa Herrera Barrios y a la Biól. Claudia Ivette Rivas Ortiz que formaron parte de mi jurado. Por su ayuda, consejos y asesorías.

## **Agradecimientos personales**

A mi familia.

A mis padres Luz, Juan y mi hermana Nuri, a quienes amo y admiro tanto. Gracias por acompañarme en todos mis logros y tropiezos, por su invaluable apoyo en todo momento y el gran esfuerzo que han realizado por años. Por enseñarme dedicación y perseverancia, compartirme la pasión y amor a las cosas, su cariño incondicional y ser siempre un gran ejemplo.

A mis amigos Dario, Gabriel y Carlos por acompañarme en esta travesía; practicas de campo, trabajos en la madrugada, clases y café en la noche. A mi amigo Iván por estar conmigo desde la preparatoria, compartir tanto tiempo juntos y sobre todo ser siempre un gran amigo.

También a mis amigos y compañeros de laboratorio, Liliana e Israel por su amistad, ayuda y apoyo durante toda mi estancia en el instituto y trabajo.

A Kavik Rafael por haber formado parte de mi vida en estos años. Y aunque las palabras nunca fueron protagonistas entre nosotros, quiero agradecerle por motivarme a continuar aún cuando ni yo sabía que esperar. Por todas las clases en el posgrado, las comidas en Balderas y en general por haber compartido tantos momentos juntos buenos y malos.

Por último pero no menos importante, a los ratones que fueron parte de mi experimento y con los cuales compartí mucho tiempo. Sin ellos nada de esto sería posible.

Für meine Eltern, die mich immer wieder inspiriert, mehr zu lernen: meine Lieben

## Índice

### Abreviaturas

#### I. Introducción

A. Tuberculosis (TB) .....	1
1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	1
2. Epidemiología .....	3
3. Patogenia y respuesta inmune .....	4
4. Cepas 5186 y H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .....	6
B. Modelo murino de tuberculosis .....	7
C. Diabetes <i>mellitus</i> (DM).....	9
1. Diabetes en México .....	11
D. Modelo murino de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.....	12
E. Tuberculosis concomitante con diabetes.....	13
1. Inmunidad innata en individuos con TBDM .....	14
2. Inmunidad adquirida en individuos con TBDM .....	16
F. Vacunación y tratamientos en la tuberculosis: BCG actualmente.....	17
G. BCGΔBCG1419c como un candidato vacunal .....	18

#### II. Justificación

#### III. Hipótesis

#### IV. Objetivos

#### V. Materiales y método

A. Medidas de bioseguridad.....	24
B. Distribución de grupos y cinética.....	24
C. Dieta hipercalórica.....	26
D. Pesaje, sobrevida y determinación de glucosa en sangre.....	26
E. Vacunación.....	27
F. Aplicación de estreptozotocina (STZ) .....	29
G. Infección .....	29
H. Eutanasia .....	30
I. Unidades formadoras de colonia en pulmón .....	30
J. Análisis histológico .....	31
K. Análisis estadístico .....	31

#### VI. Resultados

A. Sobrevida.....	32
B. Glucosa.....	35
C. Peso .....	39
D. Determinación de carga bacilar en pulmón (UFC) .....	41
E. Análisis histológico .....	45

VII. **Discusión de resultados**

VIII. **Conclusiones**

IX. **Bibliografía**

## **Abreviaturas**

MDR	Multi-resistente a los fármacos
XDR	Extremadamente resistente a los fármacos
PPD	Prueba cutánea de derivado proteico purificado
VIH / SIDA	Virus de inmunodeficiencia humana causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TB	Tuberculosis
FC	Fracción constante de anticuerpos
UFC	Unidades formadoras de colonias
IgG	Inmunoglobulina G
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL-	Interleucina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TGF-B	Factor de crecimiento transformante beta
OMS	Organización Mundial de la Salud
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
BCG	Bacillus Calmette-Guerín
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
ABSLIII	Seguridad Biológica Animal nivel 3
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
TB-DM2	Tuberculosis y diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
SS	Solución salina
SSDM	Solución salina y diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
PST	BCG Pasteur
PSTDM	BCG Pasteur y diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
1419	Candidato vacunal <b><u>BCG<math>\Delta</math>BCG1419c</u></b>

1419DM	Candidato vacunal <b>BCGΔBCG1419c</b> y diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
STZ	Estreptozotocina
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
iNOS	Sintetasa inducible de óxido nítrico
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
NK	Células asesinas naturales
TLR	Receptores de tipo Toll
MBP	Proteínas de unión a manosa
MHC	Complejo de histocompatibilidad
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
RI	Resistencia a insulina
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
RD1	Región de diferencia 1

|



## I. INTRODUCCIÓN

### A. Tuberculosis

#### 1. *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica e infecciosa causada por bacterias de la familia Mycobacteriaceae. Estas micobacterias pertenecientes al llamado complejo *Mycobacterium tuberculosis* incluyen especies como *Mycobacterium africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. bovis* y *M. tuberculosis* con gran capacidad infectiva en diversas especies animales (1, 2).

*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) es una de las especies más conocidas del complejo y de gran importancia en la salud pública pues es el principal agente causante de TB humana en todo el mundo, infectando a más de una cuarta parte de la población (2). Esta bacteria afecta principalmente al sistema respiratorio causando la TB pulmonar, la forma más común de la enfermedad asociada a síntomas como fiebre, dolor en el pecho, tos, causando lesiones tisulares asociadas a inflamación en pulmón, pérdida de peso, formación de granulomas, alveolitis, entre otras. Aunque también puede diseminarse a otros órganos y sistemas constituyendo formas extrapulmonares cuyos casos más comunes incluyen infección en pleura y ganglios linfáticos (2, 3, 4).

Es un bacilo aerobio obligado con características ácido alcohol resistentes, sus componentes estructurales hacen a esta bacteria única entre los patógenos bacterianos por su amplia gama de lípidos y lipoglicanos en su pared, los cuales están involucrados en la inmunopatogénesis de la enfermedad participando directamente en la persistencia del bacilo (2).

*M. tuberculosis* está constituida en la parte más externa por glucanos, proteínas y lípidos, seguida de la denominada micomembrana compuesta por glicolípidos y fosfolípidos. A la micomembrana se encuentran unidas cadenas de ácidos micólicos y arabinogalactano a su vez enlazados covalentemente por peptidoglicanos (complejo mAGP) lo que le da su hidrofobicidad y resistencia por hidrólisis enzimática

característica (5, 6, 7). Los ácidos micólicos son componentes importantes de la envoltura celular, jugando roles cruciales en la arquitectura e impermeabilidad además de proveerla de propiedades como su hidrofobicidad, resistencia a gran número de antibióticos, así como afinidad a tinciones ácido-alcohol resistentes como es la de Ziehl Neelsen, una técnica de gran utilidad para el diagnóstico principalmente de TB pulmonar. Aunque esta técnica tiene baja sensibilidad (60- 80% comparado con otras técnicas de diagnóstico microbiológico como PCR) es una de las pruebas más utilizadas, rápidas y accesibles en el sector salud (5, 6, 8, 9).

El genoma de *M. tuberculosis* codifica genes relacionados con componentes del metabolismo de ácidos grasos, enzimas involucradas en lipogénesis, proteínas ricas en glicina relacionados a una fuente de variación antigénica, proteínas de superficie celular, así como sistemas de transducción de señales asociados a patogénesis y factores de virulencia (10, 11). Estos últimos están mayormente involucrados con la interacción entre el bacilo y las células del sistema inmune del hospedero, las cuales incluyen mecanismos de evasión del sistema inmune como bloqueo de la maduración de los fagosomas que contienen bacilos y su fusión con los lisosomas para la formación del fagolisosoma, excluyendo ATPasas evitando así la acidificación producto de la reducida acción de la bomba de protones dependiente de ATP y la incapacidad del fagosoma bacteriano para asociarse con la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS). Por esto, la patogenia de *M. tuberculosis* resulta un fenómeno multifactorial aún poco dilucidado (12, 13).

## 2. Epidemiología

Actualmente, la TB es una de las 10 primeras causas de mortalidad en el mundo y es considerada un enorme problema sanitario y económico de gran importancia, con prevalencia alta asociada al surgimiento de cepas multiresistentes a fármacos (MDR) y extremadamente resistente a fármacos (XDR), cuyos casos representan el 5 y 0.5%, respectivamente, de todos los casos de TB registrados y se ha asociado a enfermedades como la desnutrición (11.6% de casos PPD+), alcoholismo (6%), la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH/SIDA) (5-10%) y diabetes *mellitus* (DM) (18-36%) (14, 15).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2018 se reportaron 10 millones de pacientes enfermos de los cuales 1.2 murieron y a nivel mundial países como India, China, Indonesia, Filipinas, Pakistán, Nigeria y Sudáfrica encabezan la lista de defunciones con el 60% de mortalidad total. Además existen factores que contribuyen al desarrollo de la TB como pobreza, zonas geográficas marginadas, malas condiciones de vivienda y alimentación, poca o nula información, problemas en el acceso a servicios de salud y programas deficientes (1, 16, 17).

Ese mismo año se reportaron en México aproximadamente 20 mil casos de infección principalmente en entidades como Oaxaca, Veracruz, Chiapas e Hidalgo (3). Pero a pesar de existir programas nacionales e internacionales para combatir la TB, en México se enfrentan desafíos como la heterogeneidad de la población, es decir, la gran diversidad genética, cultural y social, brechas socioeconómicas, el acceso a los servicios de salud y escasa o pobre cultura en cuanto a la salud. Los estándares para la atención de la TB en México se encuentran indicados en la norma mexicana NOM-006-SSA2-1993 que incluyen la prevención y control de la enfermedad en la atención primaria a la salud, donde se incluyen normativas nacionales e internacionales describiendo funciones y responsabilidades de salud pública, así como datos de apoyo al diagnóstico y tratamientos (15).

### 3 Patogenia y respuesta inmune

Aproximadamente del 20% al 50% de los individuos que se exponen a *M. tuberculosis* se infectan, del 5-10% de estos tienden a desarrollar TB activa mientras que el 90-95% presentan la enfermedad latente con evidencias inmunológicas que la asocian con un resultado positivo de la prueba intradérmica a la tuberculina (PPD). Esta prueba cutánea de diagnóstico es comúnmente utilizada en el sector salud y evalúa un estado de hipersensibilidad del organismo basado en la inoculación intradérmica *in vivo* de un derivado proteico purificado proveniente de *M. tuberculosis* cultivada en medio sintético. A pesar de que los individuos con TB latente se encuentran infectados, estos no presentan síntomas ni pueden contagiar a otros pero deben recibir algún tratamiento contra la infección de acuerdo a las indicaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 Para la prevención y control de la TB en la atención primaria a la salud, que incluye fármacos como isoniacida, rifapentina o rifampina, pues existe la posibilidad de reactivación y desarrollo de la enfermedad latente, la cual es considerada contagiosa y puede propagarse fácilmente a otras personas (18, 19).

La reactivación de la enfermedad es frecuente en aproximadamente del 5 al 10% de los individuos con TB latente, pero en individuos inmunodeprimidos con VIH, desnutrición o DM, el riesgo de desarrollar la enfermedad activa se incrementa significativamente debido a un sistema inmune debilitado (12, 18). Los dos tipos de DM (I y II) representan uno de los mayores obstáculos para el control mundial de la TB y aunque se han establecido programas para el control y mejoramiento del diagnóstico, es la reactivación un riesgo latente (20).

*M. tuberculosis* es transmitida principalmente por aerosoles eliminados mediante tos o estornudo de pacientes con TB pulmonar. Los bacilos al entrar por vías respiratorias se encuentran en pulmón con macrófagos alveolares constituyendo una de las primeras interacciones entre la bacteria y las células del sistema inmune. Componentes de la pared de la bacteria como son los manosidos de fosfatidil-inositol, cadenas peptídicas y lipoproteínas funcionan como antígenos y son reconocidos por los receptores de tipo Toll (TLR) de macrófagos especialmente TLR2 y TLR9, importantes en el reconocimiento de

antígenos micobacterianos para la inducción de la producción y liberación de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-8 e IFN- $\gamma$ , receptores para la porción Fc de anticuerpos, receptor de factores del complemento como CR1 (CD35), CR3 (CD11b/ CD18) y CR4 (CD11c/CD18), proteínas surfactantes y dependiendo de estas interacciones se establece un tipo de respuesta celular con el reclutamiento de otros componentes del sistema inmune (12, 20, 21).

Los macrófagos ante dicho estímulo producen gran cantidad de quimiocinas como RANTES, MCP-1, MIP-1  $\alpha$  para el reclutamiento de otros componentes celulares al sitio de la infección como monocitos, células dendríticas y neutrófilos. Asimismo algunas micobacterias pueden ser opsonizadas por factores del complemento, inmunoglobulinas como IgG promoviendo la fagocitosis por macrófagos (afinidad por receptores Fc para los subtipos de IgG Fc $\gamma$ Rs), proteínas de unión a manosa (MBP) y factores surfactantes A (Sp-A) y D (Sp-D) (21, 22).

Por otra parte, gran cantidad de micobacterias ingresan a los macrófagos alveolares y epitelios bronquiales replicándose en vías aéreas como bronquiolos y alveolos, infectando directamente el epitelio alveolar para posteriormente ser distribuidos por macrófagos y células dendríticas a diferentes áreas pulmonares y ganglios linfáticos para la presentación de antígenos micobacterianos en el contexto del complejo de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) a las células TCD4+ de tipo Th1. Estas células juegan un papel importante en el control del crecimiento micobacteriano, pues son caracterizadas por la producción de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-12 involucradas en el control de bacterias intracelulares como es *M. tuberculosis* y su eliminación mediante la activación de macrófagos y células CD8+ activadas por medio de la presentación de antígenos micobacterianos acoplados al MHC-I (10,13). La respuesta del reconocimiento específico de antígenos junto con la participación de citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , ha demostrado ser esencial en la respuesta inmune de tipo celular para el control del crecimiento micobacteriano y su propagación. Se ha demostrado también que dentro de las funciones principales de TNF- $\alpha$ , está la formación y mantenimiento de una estructura denominada granuloma (20).

El granuloma es una estructura compacta y organizada distintiva en la TB; está conformado por un agregado de células del sistema inmune con el objetivo de aislar a las micobacterias y evitar propagación al resto del pulmón u otros órganos, concentrando la respuesta inmunitaria en el sitio de infección. El granuloma se encuentra organizado principalmente con un núcleo central de células infectadas, restos celulares y micobacterias. Asimismo macrófagos maduros participan activamente fusionándose en células gigantes multinucleadas, diferenciándose en células espumosas caracterizadas por acumulación de lípidos y algunos otros macrófagos conformando las denominadas células epitelioides con membranas estrechamente interdigitadas rodeando el sitio de infección.

Además de éstas, las células dendríticas, asesinas naturales (NK) y neutrófilos también participan en la formación del granuloma ubicándose en la parte más externa, mientras que en la periferia de la estructura se encuentran células T, B y más recientemente se ha reportado la presencia de células epiteliales constituyendo una pared fibrótica aislando así a las micobacterias (20, 23).

En muchos casos el granuloma puede persistir por décadas y contener la infección en un estado inactivo privando a las micobacterias de oxígeno y nutrientes, dejando evidentes lesiones en el pulmón detectadas por radiografías que en ocasiones son calcificadas o eliminadas sin causar repercusiones en la salud. Sin embargo, una falla en la contención de las micobacterias asociada a disminución en la eficiencia de la respuesta inmune del hospedero puede resultar en la reactivación y diseminación de micobacterias por vía linfática ingresando al torrente sanguíneo infectando así diferentes órganos como hígado, bazo, riñones, hueso o meninges, generando un huésped infeccioso y constituyendo la TB activa (8, 12).

#### **4 Cepas 5186 y H37Rv de *M. tuberculosis***

Debido a la emergencia de nuevas cepas de *M. tuberculosis* virulentas y resistentes, parte de la investigación biomédica se ha enfocado en el estudio de la distribución

geográfica de las diferentes variantes genéticas, así como en la respuesta inmune ante la infección con estas bacterias y la diversidad genética de estas cepas (24).

Se ha reportado una importante relación entre la severidad, manifestaciones clínicas, inmunogenicidad y patogenicidad de las diferentes cepas infecciosas. La cepa 5186 (9005186) de *M. tuberculosis* es una cepa de la familia Latinoamericana. Tiene un fenotipo hipervirulento caracterizado por crecimiento rápido en pulmón, producción significativa de gran número de áreas neumónicas así como inducción de expresión retardada de citocinas como IFN- $\gamma$  además de expresión alta pero transitoria de TNF- $\alpha$ , por lo cual se clasifica como una cepa que no induce respuesta inmune protectora y es de alta transmisibilidad (25).

Por otra parte la cepa H37Rv es una de las cepas más estudiadas y utilizadas en laboratorios. Fue aislada por primera vez en 1905 y a partir de allí se han generado varios derivados disponibles a través de diferentes colecciones como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Esta cepa se clasifica con un fenotipo de mediana virulencia y sensible a diferentes fármacos. Debido a esto es comúnmente utilizada como cepa de referencia en investigación (26).

## **B. Modelo murino de tuberculosis**

Como se ha mencionado, la TB representa un problema de salud pública a nivel mundial y los modelos animales han permitido el estudio y la investigación en las ciencias biomédicas para comprender las causas, diagnósticos y tratamientos de diferentes enfermedades transmisibles. El uso de ratones en el estudio de la respuesta inmune del huésped a *M. tuberculosis* tiene muchas ventajas debido a la facilidad en el manejo, disponibilidad de cepas caracterizadas y al ser susceptibles a la infección por *M. tuberculosis* además de desarrollar una infección crónica similar a la que ocurre en humanos, nos proporcionan información relevante sobre los aspectos de la enfermedad humana así como en la evaluación de fármacos, en estudios a detalle de las diferentes etapas de la enfermedad y en candidatos vacunales (7, 27, 28).

El modelo de TB pulmonar progresiva en ratón establecido y utilizado en la unidad de patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), consiste en la infección de ratones macho de la cepa singénica BALB/c de 3 semanas infectados por vía intratraqueal con una dosis alta (aproximadamente  $2.5 \times 10^5$  bacterias vivas) de *M. tuberculosis*. Esta forma de infección garantiza un mejor control de la dosis buscando que el mayor número de micobacterias se depositen en pulmón, además de ser la ruta usual de infección en humanos. Asimismo, se establece una cinética de eutanasia en experimentos de vacunación de 3 y 6 meses post infección.

En el modelo se pueden identificar dos fases en la progresión de la TB experimental, siendo éstas la fase temprana y progresiva. La fase temprana se desarrolla en el primer mes de infección y se define por la acción de eventos protectores caracterizados por la acción de citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  secretadas por linfocitos T CD4+ de clase 1 (Th1) así como células T CD8+, las cuales además de producir IFN- $\gamma$  contribuyen al control del crecimiento bacteriano mediante la eliminación de bacterias por actividad citolítica. Asimismo hay formación de granulomas y condiciones preferentemente pro-inflamatorias cuyo objetivo principal es el control de la infección.

La fase progresiva en el modelo de TB en ratones BALB/c se caracteriza por mecanismos inmunológicos que contribuyen de forma directa, a la progresión de la enfermedad. Hay un sesgo importante a la respuesta inmune mediada por actividad de linfocitos Th2 productores de moléculas inmunosupresoras como IL-4, IL5, IL6, IL10, IL13, TGF-B y prostaglandina E. Las cuales contribuyen en reducir la inmunoprotección con una acentuada reducción de células del sistema inmune que expresan IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, lo que disminuye la actividad protectora como respuesta a la inflamación excesiva, facilitando el crecimiento de la micobacteria lo cual favorece la progresión de la enfermedad al provocar fibrosis y daño tisular al pulmón (12).

Se ha reportado anteriormente que existen importantes factores de riesgo como la DM que facilita el desarrollo de la TB aumentando la prevalencia e incidencia en



comparación con la población en general. La asociación entre TB y DM ha cobrado gran importancia debido al incremento de casos de DM2 y aunque la relación entre ambos padecimientos aun no es completamente entendida, se ha demostrado que la DM agrava significativamente la TB incrementando la mortalidad y lesiones inflamatorias, además de tener un perfil desregulado de citocinas pro-inflamatorias desde etapas tempranas de la infección. Datos relacionados con mayor severidad de la enfermedad y recientemente discutido falla en los tratamientos antituberculosos (81).

### **C. Diabetes *mellitus***

La DM es un padecimiento metabólico crónico caracterizado por el aumento de glucosa en sangre como consecuencia de falla en la producción, secreción y /o resistencia a la insulina, hormona responsable de la regulación de los niveles de glucosa secretada por las células beta pancreáticas, indispensables para la homeostasis y liberada como respuesta al incremento de glucosa en sangre. Esta liberación es regulada directamente por la concentración de glucosa, con el objetivo de disminuir el nivel de glucosa en sangre ya sea por medio de la aceleración de la incorporación de glucosa a través de transportadores expresados en hígado, riñón y células epiteliales del intestino, convirtiendo glucosa en glucógeno (glucogénesis) que posteriormente será degradado en periodos de ayuno y liberado a circulación sistémica, así como disminución de glucogenólisis y gluconeogénesis, manteniendo la glucemia en niveles fisiológicos (16, 29, 30). Defectos en la regulación de los niveles de glucosa pueden ser causados por alteraciones en funciones endocrinas o en tejidos efectores ante la pérdida de sensibilidad a la insulina, favoreciendo las complicaciones en los pacientes como ceguera y amputación de miembros, por lo cual dicho padecimiento requiere de un estricto control glucémico y metabólico (31).

La DM puede ser clasificada principalmente en dos tipos de acuerdo con sus características, al origen que la desencadena y su etiología. La DM tipo 1 o insulino dependiente tiene prevalencia asociada preferentemente a jóvenes, pero puede ocurrir en todas las edades; incluye como causas autoinmunidad cruzada y predisposición genética y un tratamiento que incluye la aplicación constante de insulina.

Asimismo esta es una enfermedad inflamatoria crónica causada por la destrucción de las células beta pancreáticas cuyos mecanismos involucran respuestas autoinmunes y actividad de células T citotóxicas así como NK. La muerte de estas células se asocia principalmente a dos mecanismos apoptóticos: la secreción de perforinas, granzimas y citocinas pro-inflamatorias, así como la vía de Fas ligando, una proteína en membrana de células T que reconoce al receptor CD95 implicado en la muerte celular (30).

La DM tipo 2 o no insulino dependiente es el tipo de DM más frecuente (siendo el 90% de casos en el mundo) se encuentra asociada a la resistencia a insulina (RI), funciones de deterioro de las células beta pancreáticas y de forma casi directa a la obesidad (80). La obesidad se relaciona al desarrollo de enfermedades como hipertensión y DM; esta última como consecuencia de la continua y desregulada ingesta de alimentos con alto contenido energético que, por hábitos como el sedentarismo, mala actividad metabólica, así como factores hormonales, representa un factor de riesgo importante pues el páncreas presenta hiperactividad por la constante concentración de glucosa (30, 31). Un alto porcentaje de individuos puede cumplir con la alta demanda de la hormona mediante el incremento en su función secretora, pero otro porcentaje no lo logra por lo que se produce agotamiento celular y menor secreción de insulina alterando sus funciones. Asimismo en la obesidad ante la condición excesiva de triglicéridos, existe una desregulación por parte de la secreción de adipocinas, que son moléculas bioactivas con papel importante en la homeostasis de procesos fisiológicos como la acción de insulina y metabolismo de la glucosa, dando como resultado infiltración de células del sistema inmune como macrófagos al tejido adiposo, así como hipersecreción de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8, TNF-  $\alpha$ ) y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) (30, 32).

Ambos tipos de DM se caracterizan por inflamación de los islotes pancreáticos durante la progresión de la enfermedad, pero en la DM tipo 1 la causa directa es la autoinmunidad mientras que la DM tipo 2 se asocia a condiciones metabólicas como hiperglicemia y niveles altos de ácidos grasos libres (28). Además, durante la DM, los mecanismos como son la secreción de insulina, respuesta inmune, señalización de

receptores así como otros mecanismos relacionados con la integridad de las células beta pancreáticas se ven alterados (32).

Por otra parte, además de éstos, existen otros tipos de DM asociados a diferentes factores como mutaciones en genes que codifican a enzimas importantes en la fosforilación de glucosa, hiperplasia en células beta pancreáticas por causa del aumento de estrógenos y progesterona durante la gestación, el uso de fármacos o agentes químicos productores de hiperglucemia o bloqueo de receptores relevantes en el metabolismo de la glucosa, entre muchos más (31, 80).

## **1 Diabetes en México**

En México el número de casos anuales de DM se ha incrementando a causa de dieta poco saludable y sedentarismo. Las cifras reportadas por el Programa de Acción Específico para la Prevención y control de la DM 2013-2018, reportan a más de 400 000 casos nuevos cada año o quizás aun más porque una gran proporción de la población no conoce su condición, así como un incremento de más de 75 mil muertes al año. Por su parte, este reporte junto con lo publicado por la Federación Internacional de la Diabetes indican que los gastos totales en la salud relacionados con DM ascienden a 727 mil millones de dólares mundialmente calculando un costo de 700 dólares por persona al año y estimando que aproximadamente el 15% de los recursos totales del sistema mexicano de salud están destinados a DM. Asimismo del total de pacientes diagnosticados, un alto porcentaje no se encuentra en tratamiento ni acuden al médico para un control adecuado, aun cuando cuentan con protección de alguna institución de salud generando complicaciones (18, 34, 35).

Se han establecido Programas de Acción Específico (PAE 2007-2012) dentro de los cuales destacan el Programa de Acción para la Prevención y Control de la Diabetes *Mellitus* y el Programa Nacional de Salud 2001-2006, cuyos objetivos se fundamentan en prevenir, controlar, retardar la aparición de la enfermedad y complicaciones, además de elevar la calidad de vida de individuos con dicho padecimiento y buscar mayor cobertura de diagnóstico (36). También se crearon unidades de especialidades médicas con especial énfasis en educación y prevención, así como marcos regulatorios

aplicables en sector público y privado como la “Norma Oficial Mexicana para la prevención, tratamiento y control de la diabetes *mellitus*” NOM-015-SSA2-2010. Dentro de los retos a enfrentar se incluye el fortalecimiento de acciones de diferentes sectores como educación y economía, mediante la detección oportuna, promoción de un estilo de vida más saludable y asegurar el acceso a los servicios de salud. A pesar de contar con programas de prevención para la contención del padecimiento aun hacen falta intervenciones y acciones que incluyan acceso generalizado a insulina e hipoglucemiantes orales, mejores protocolos para el diagnóstico y tratamientos, así como especial énfasis en investigaciones para el tratamiento y prevención de la DM en presencia de comorbilidades (36).

#### **D. Modelo murino de diabetes *mellitus* tipo 2.**

De acuerdo a la clasificación de la DM, la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) corresponde al 90-95 % de todos los pacientes y se ha convertido en un problema serio de salud mundial con cifras alarmantes y aumento significativo de casos anuales, por lo cual este padecimiento se ha convertido en objeto de investigación para dilucidar incógnitas que buscan avances en la prevención y tratamientos. Por esto se han implementado modelos murinos experimentales que nos permiten estudiar la patogenia y aspectos clave mediante la inducción de la enfermedad.

En el modelo experimental del INCMNSZ de DM2 se inducen alteraciones metabólicas a ratones BALB/c mediante de la administración de una dieta hipercalórica o una dieta de mantenimiento control comercial *PicoLab Rodent Diet*®, formulada para ratones y compuesta por 57.9% de carbohidratos, 28.6% proteína y 13.3% grasas, incluyendo minerales, vitaminas y fibra (37). Al grupo alimentado con la dieta hipercalórica, después de 2 meses se les administra por vía intraperitoneal una dosis única de estreptozotocina (100 mg/kg), la cual, induce toxicidad a las células beta pancreáticas productoras de insulina alterando la producción de esta hormona y, en consecuencia, los niveles de glucosa plasmática (38). De esta forma se ha establecido el modelo murino de DM2, donde los ratones presentan obesidad y niveles elevados de glucosa en sangre.

## **E. Tuberculosis concomitante con diabetes**

La DM y TB son dos de las enfermedades más prevalentes y juntas representan un serio problema de salud mundial con un aumento significativo en el número anual de casos reportados principalmente en países de bajos y medianos ingresos (3).

Globalmente se estima que aproximadamente el 15% de todos los casos de TB reportados son atribuidos a DM. Se estima que comparado con pacientes no diabéticos, los individuos diabéticos tienen un riesgo de dos a cuatro veces mayor de desarrollar TB activa, además de existir una asociación estimada mas fuerte entre pacientes diabéticos sin control glucémico y mayor riesgo de TB activa, en comparación con aquellos con niveles de glucosa en sangre controlados (79). Por esto y el creciente número de casos de este padecimiento metabólico, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido a la DM como un importante factor de riesgo latente para el desarrollo de TB además de predecir que este padecimiento hará una contribución cada vez mayor a la epidemia de TB (39, 40, 41).

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) y diversos meta-análisis señalan que los pacientes diabéticos tienen un mayor riesgo frente a infecciones respiratorias como bronquitis, neumonía y algunas otras que pueden ser prevenidas mediante la vacunación como influenza y TB, resaltando la importancia del papel protector de las vacunas en individuos diabéticos (42, 43).

La relación entre ambos padecimientos ha sido atribuida directamente a alteraciones en los componentes del sistema inmune resultado de la DM como niveles alterados de citocinas, debido a frecuencias reducidas y funciones dañadas de células productoras principalmente de IFN- $\gamma$ , alta secreción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6), quimiocinas como CCR2 y funciones de diferentes poblaciones celulares como macrófagos, células dendríticas, NK, neutrófilos y subpoblaciones de células T promoviendo la susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* y severa patología pulmonar. Factores como hiperglucemia, resistencia a insulina y funciones retardadas de células inmunes sugieren una respuesta inmune comprometida, siendo ésta

potencialmente relevante para la TB. Por esta razón los mecanismos del sistema inmune afectados por la DM resultan sumamente importantes para comprender la susceptibilidad a la tuberculosis, no solo aumentando el riesgo de una infección activa sino también la gravedad de la enfermedad (39).

### **1 Inmunidad innata en individuos con TB-DM**

Con respecto a la inmunidad innata existen diversos reportes enfocados en el estudio de la respuesta celular en pacientes con DM, TB activa y ambas donde se señala que células del sistema inmune innato presentan variaciones en sus funciones como menor fagocitosis, desregulación en la producción de citocinas, expresión reducida de señales de reclutamiento y migración celular. Ésta última analizada en la expresión diferencial de marcadores de superficie de monocitos en pacientes con TB con y sin DM. Estudio en el cual un aumento en la expresión de CCR2 se asocia a la restricción en el tráfico de monocitos en pulmón, los cuales además han mostrado *in vitro* reducida diferenciación y menor habilidad quimiotáctica (39, 44).

Poblaciones como las células dendríticas consideradas células fagocíticas profesionales tienen un papel crucial en la respuesta inmune en presencia de *M. tuberculosis* por la captura, procesamiento y presentación antigénica para la activación de linfocitos T *naive*, desempeñando un papel importante en el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Estudios epidemiológicos en pacientes con TB-DM tienen significativa menor frecuencia de células dendríticas mieloides y plasmacitoides lo que provoca el retraso en el tráfico a ganglios linfáticos, en su reclutamiento hacia el espacio alveolar y la pérdida de su capacidad para la producción de citocinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , así como GM-CSF, un factor estimulante asociado a la modulación de la hematopoyesis para la proliferación y diferenciación de granulocitos y monocitos comparado con individuos únicamente con TB (44, 45).

En cuanto a los macrófagos alveolares, unas de las primeras células en entrar en contacto con la micobacteria en la infección inicial y que tienen un papel clave como células efectoras, estos muestran cambios funcionales afectando su activación,

capacidad fagocítica, quimiotáctica, muerte acelerada de macrófagos infectados, disminución en la adhesión celular, así como respuesta microbicida limitada. Asimismo se reporta en individuos únicamente diabéticos morfología celular alterada y una significativa menor frecuencia, además de un cambio de fenotipo asociado a la expansión de tejido adiposo e infiltración de macrófagos de perfil anti-inflamatorio M2 relacionado al mantenimiento de la homeostasis tisular con la secreción de IL-10 a pro-inflamatorio M1 productor de citocinas como IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 vinculadas a resistencia a insulina y representando un factor importante en la susceptibilidad y progresión de la enfermedad (33, 46, 47).

Los neutrófilos que también contribuyen a la protección temprana, juegan un papel importante en la protección contra TB contribuyendo por medio de muerte oxidativa de las bacterias al ser una de las primeras células en migrar al tejido, presentan un elevado número en el recuento absoluto en sangre periférica en individuos con ambas enfermedades, elevación asociada a daño tisular con deterioro en funciones de quimiotaxis, actividad microbicida y fagocitosis (39). Por otra parte, otra de las células cuyas funciones de fagocitosis y producción de citocinas como IFN- $\gamma$  contribuyen a la protección en etapas tempranas de la TB, son las células NK. Las cuales también presentan actividad celular alterada conduciendo a la persistencia del bacilo (39, 44, 48).

Debido a la respuesta inmune innata retrasada, deficiencias en las diferentes poblaciones celulares incluyendo células presentadoras de antígeno, además de disminución en sus funciones celulares que promueven un perfil alterado de citocinas y quimiocinas, la respuesta inmune se ve directamente comprometida retrasando la inmunidad adaptativa alterando la activación y diferenciación de los diferentes subpoblaciones de células T, afectando directamente la formación de granulomas contribuyendo a la progresión y gravedad de la enfermedad (49). Sugiriendo que la regulación negativa del sistema inmune es multifactorial y puede influenciar tratamientos así como eficacia de vacunas (50).

## 2 Inmunidad adquirida en individuos con TB-DM

Con respecto a la inmunidad adaptativa en individuos con TB-DM2 se sabe que en la inmunidad a *M. tuberculosis* la respuesta T cooperadora de tipo Th1 y Th17 juega un importante papel en la inducción y mantenimiento de una respuesta inmune protectora, pero en individuos con ambos padecimientos la respuesta inmune se caracteriza por ser hiperinflamatoria e hiperreactiva, en la cual la sobreexpresión de citocinas normalmente protectoras como IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  así como IL-17 e IL-23, contribuye a una mayor carga bacteriana y a la incapacidad para montar una respuesta inmune efectiva (45, 51, 52, 53).

Experimentos *in vitro* demuestran frecuencias significativamente elevadas en los niveles de linfocitos T CD4+ Th1 y Th17 productores de IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-17A así como IL-1B, IL-6 e IL-18 en presencia de ambas enfermedades comparado únicamente con TB. Asimismo se ha propuesto que la excesiva respuesta de la mayoría de los subconjuntos de células T CD4+, esta asociado con niveles de hemoglobina glicada A1C y deficiente control de la DM, causando inflamación excesiva y severa patología pulmonar contribuyendo al incremento en la mortalidad.

Se ha sugerido como mecanismo potencial para explicar esta respuesta la disminución de células productoras de IL-10 y diferencias en las frecuencias de células T reguladoras importantes en la modulación y control de la respuesta inmune, indicando presencia de un medio pro-inflamatorio desequilibrado, además de una estrecha relación entre perfiles de células T alteradas y pacientes con resistencia a insulina, indicando una relación con la sensibilidad a la insulina y trastornos metabólicos (52).

Los linfocitos CD8+ citotóxicos, de igual forma que las células CD4+, tienen un papel relevante en la respuesta inmune adaptativa a *M. tuberculosis* con la capacidad de activar otras poblaciones celulares como macrófagos por la secreción de citocinas como IFN- $\gamma$ , así como la capacidad de eliminar bacterias por medio de exocitosis de gránulos con actividad citotóxica (54).



Sobre las poblaciones de linfocitos CD8+ en presencia de TB-DM, aun se desconoce sobre su regulación y papel en dicha comorbilidad, pero se sabe que de igual forma que otras poblaciones celulares, contribuyen al aumento de la patología por medio de la elevada producción de citocinas pro-inflamatorias, además de la frecuencia disminuida de marcadores de citotoxicidad como CD107a alterando su potencial citotóxico, asociado a efectos en la patogénesis de la TB activa (39, 51, 54). Alteraciones en la frecuencia de células T CD8+ y CD4+ caracterizan esta comorbilidad, presentando alta frecuencia de células de memoria central, pero considerable disminución de células *naïve* y memoria efectora. Esto aún se encuentra en discusión pero podría reflejar patrones de migración al sitio de infección, donde una mayor abundancia de células efectoras podría resultar en una distribución aumentada de células T de memoria central, impactando directamente en la severidad de la TB y en la respuesta a los tratamientos (44, 55).

#### **F. Vacunación y tratamientos en la tuberculosis: BCG actualmente**

Actualmente, la TB es una enfermedad curable cuando se detecta a tiempo y los tratamientos incluyen fármacos de primera línea (isoniazida, rifampicina, etambutol y estreptomina) y de segunda línea (capreomicina, amikacina y kanamicina), dependiendo de la susceptibilidad del organismo infectante por periodos de tiempo de 6-9 meses. Sin embargo, los tratamientos incompletos e inadecuados tienen como consecuencias importantes la selección de cepas resistentes y repercusiones económicas importantes para los sistemas de salud y economías nacionales (8, 10). Actualmente la vacunación es una de las estrategias de prevención de la enfermedades mas utilizada y con gran importancia en el sector salud; dicha estrategia se fundamenta en la inducción de inmunidad específica eficiente y de largo plazo mediante la estimulación de la respuesta inmune adaptativa generando células de memoria (57).

*M. bovis* BCG (Bacillus de Calmette-Guérin) fue la vacuna aplicada por primera vez en 1921 vía oral y hoy en día es la única profilaxis disponible y provee efectividad en la protección de TB meníngea, miliar y formas diseminadas, pero no evita la reactivación

que es la principal fuente de propagación (57, 58). Se le atribuye entre el 0 al 80% de protección efectiva contra la infección pulmonar variando significativamente en diferentes regiones geográficas, poblaciones y edades. Dicha variación está asociada a que BCG causa nivel alto de la inmunidad de células T posterior a su administración, pero niveles disminuidos de células T de memoria central en pulmón que inducen una fuerte respuesta inmune pero no protectora, por lo que no se produce un efecto favorable significativo para la protección a largo plazo de la TB (60).

La vacuna BCG fue creada a partir de bacilos vivos atenuados de *M. bovis* proveniente de la cepa original del bacilo de Calmette-Guérin. Fue obtenida después de trece años mediante su siembra y constantes pases en un medio con altas concentraciones de bilis, logrando así su atenuación (57). BCG *M. bovis* cuenta con una estructura similar a *M. tuberculosis* (ácidos micólicos, glicolípidos, etc.) estimulando receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de tipo TOLL y NOD, pero difieren en aproximadamente 14 regiones genómicas donde se incluye la región de diferencia 1 (RD1), región que codifica al sistema ESX-1 con un papel clave en la virulencia de las micobacterias implicado en escape fagosomal, citolisis e inducción de apoptosis en macrófagos, afectando directamente su inmunogenicidad y otorgándole cierto potencial eficaz como vacuna (23, 60).

Ante la gran variabilidad en la protección conferida por la vacuna BCG, así como la prevalencia elevada a nivel mundial de la TB concomitante con enfermedades metabólicas como la DM, es necesaria la búsqueda de vacunas alternativas que sean eficaces, pues el desarrollo de fármacos podría no ser la principal herramienta para la erradicación de la enfermedad, de ahí que es relevante y casi imperativo la búsqueda de nuevas formas de tratamiento y énfasis en la prevención mediante la evaluación y desarrollo de nuevos candidatos vacunales (57).

### **G. BCGΔBCG1419c como un candidato vacunal**

Debido a la variable eficacia y falta de una adecuada protección contra la TB conferida por la vacuna *M. bovis* BCG, se han desarrollado y evaluado más de 10 candidatos a

vacuna (MVA85A, H1, H4, H56, M72, VPM1002, MTBVAC) que actualmente se encuentran en diferentes grados de avance en investigación clínica y preclínica (61).

Entre ellos, estudios en BCG modificadas, las cuales, están basadas en la sobre-expresión principalmente del antígeno Ag85kDa, una proteína con gran actividad inmunogénica; la reintroducción de regiones con antígenos protectores (rBCG30, rBCG-Aeras403 y BCG::RDI); la delección de genes asociados a virulencia como *PhoP*, *panCD* y *RD-1* (*M. tuberculosis PhoP*, *M. tuberculosis mc2 6030*); recombinantes con fusión de proteínas adyuvantes como Ag85 y ESAT-6, algunos enfocados en la prevención de la TB latente (H56:IC31 y MVA), además de vacunas como inmunoterapia cuyo fin es la administración junto con medicamentos antituberculosos (18, 65, 66).

El candidato a vacuna denominado **BCGΔBCG1419c** es una cepa desarrollada por el Dr. M. Alberto Flores del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ) en Guadalajara Jalisco, México. Esta cepa es derivada de *M. bovis* BCG Pasteur, mutante en el gen *BCG1419c*, que codifica para una fosfodiesterasa que cataboliza al segundo mensajero c-di-GMP. Esta cepa carece de los nucleótidos 222 a 924 del marco de lectura abierto (ORF), por medio de disección genética que comprende estrategias de recombinación reportadas anteriormente y confirmadas mediante PCR (67).

El fenotipo de esta cepa es sobre-expresar *in vitro* la producción de biopelícula, aumentando su permanencia en pulmón y bazo en modelos murinos, así como diferencias a nivel proteómico, lipidómico y transcriptómico en relación a la cepa parental. Además, el crecimiento en forma de biopelícula mimetiza aspectos de la infección crónica. Esta cepa se ha probado como candidata a vacuna contra TB y ha mostrado ser más inmunogénica que la cepa parental *in vitro* e *in vivo* mediante la evaluación de la respuesta inmune celular y expresión de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  en ratones BALB/c y C57BL/6 posterior a la vacunación con BCGΔBCG1419c, así como la determinación del porcentaje de células activadas como macrófagos y linfocitos T en pulmón a los 4 y 6 meses posteriores a la infección en ratones vacunados e infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (64, 65, 66, 67).

Las biopelículas son estructuras cubiertas por una matriz extracelular conformadas por bacterias que viven dentro de estas, y que son diversas tanto metabólicamente como fenotípicamente; estas estructuras exhiben resistencia a antibióticos y estrés ambiental. Su papel en la patogénesis aun es discutido pero ya existen antecedentes del uso de biopelículas o componentes de éstos con mayor producción de anticuerpos específicos y reducción de replicación bacteriana en bazo contra algunas enfermedades infecciosas en modelos murinos, causadas por *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii* (68).

Recientemente se ha sugerido que la formación de biopelícula constituye un factor importante en la respuesta inmune, esto asociado a la identificación de moléculas antigénicas producidas únicamente cuando la bacteria crece en forma de biopelícula, y aunque sus funciones aun no han sido descritas completamente, se sabe que promueven la producción de anticuerpos específicos no inducidos por *M. bovis* BCG, así como niveles aumentados del segundo mensajero c-di-GMP con propiedades adyuvantes en modelos murinos siendo mas inmunogénica que la bacteria por si sola (59).

Estas observaciones han sido respaldadas con el establecimiento de modelos *in vitro* hipoprodutores de biopelícula de *M. tuberculosis*, los cuales resultan en menor presencia de células inmunes adaptativas y capacidad reducida de producción de citocinas como IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD8<sup>+</sup> en comparación con la cepa parental (69).

La cepa mutante BCG $\Delta$ BCG1419c tiene diferencias proteómicas y transcriptómicas en comparación con la cepa parental, teniendo 32 genes diferentes asociados a metabolismo, respiración y virulencia. Seis de los genes están asociados con un incremento en su expresión de los cuales dos son reguladores transcripcionales (*BCG1420*, *BCG11421*) y cuatro tienen una menor expresión relativa (*FabD*, *acpM*, *KasA*, *KasB*) identificados por su relación en la síntesis de ácidos micólicos (65).

La cepa **BCGΔBCG1419c** ha demostrado tener un efecto significativo en experimentos *in vivo* en diferentes modelos de infección, incluyendo ensayos de inmunogenicidad, modelos de infección crónica en ratones similar a TB latente y de TB progresiva.

En el modelo de TB latente, en ratones BALB/c se observó un aumento en la frecuencia de células T secretoras de IFN- $\gamma$  en bazo mediante análisis por citometría de flujo. De igual modo mediante una cinética de pesaje semanal de ratones BALB/c, se estableció que los ratones vacunados con esta cepa no disminuyeron tanto en peso comparado con el grupo control, el cual registro pérdidas de al menos 2g con respecto a pesos basales.

Experimentos en el modelo de TB progresiva con la cepa H37Rv en ratones BALB/c han evidenciado disminución estadísticamente significativa de unidades formadoras de colonias (UFCs) del pulmón a los 6 meses post infección entre BCGΔBCG1419c y un grupo de solución salina como control ( $p=0.001$ ), así como entre BCG Pasteur y BCGΔBCG1419c. En este mismo modelo a los 4 meses post infección se observó disminución del 5% de neumonía en ratones vacunados con BCG, mientras que en ratones inmunizados con BCGΔBCG1419c la neumonía disminuyó hasta el 20% (66).

También se ha observado reducción del daño tisular asociado a inflamación en pulmón, exhibiendo menores lesiones, así como en formación de granulomas, alveolitis y perivascularitis (65). Además de franca reducción de UFCs tanto al mes como a los 2 meses posteriores a inmunosupresión ( $p= 0.032$  al mes y  $p= 0.015$  a los dos meses) teniendo reducción de hasta el 30% de neumonía (BCGΔBCG1419c vs SS,  $p= 0.027$ ) en el modelo murino de reactivación con corticosterona similar al latente (66).

Asimismo, en la evaluación de sobrevida de ratones BALB/c posterior a la vacunación con BCGΔBCG1419c y retos con cepas de diferente virulencia de *M. tuberculosis* como 5186, estos exhiben un aumento significativo del tiempo medio de supervivencia comparado con ratones no vacunados ( $p=0.001$ ), además de significativa reducción en la carga bacilar 2 meses post infección comparado con los inmunizados con el grupo control (BCGΔBCG1419c vs SS  $p<0.0001$ ) (68).

La cepa BCG $\Delta$ BCG1419c induce una mayor protección en el modelo murino comparada con la cepa parental *M. bovis* BCG Pasteur en modelos de TB progresiva y ante la reactivación en un modelo similar a la latencia, con resultados positivos a los 2 y hasta 6 meses posterior a la infección. Así como datos preliminares que apoyan la idea de la eficacia de la protección no solo con la cepa de referencia H37Rv si no también en presencia de una cepa hipervirulenta como 5186 al entrar en la fase crónica de la infección.

Debido a que como se mencionó antes, la DM es uno de los principales factores que incrementan del riesgo de desarrollar TB activa, además del continuo aumento en las cifras de casos de TB concomitante con DM, se enfatiza la importancia de la vacunación. Contar con una vacuna que proporcione protección efectiva ante la infección con *M. tuberculosis* en presencia de DM, una enfermedad metabólica tan prevalente actualmente y con tantas repercusiones, es sumamente importante.

El hecho de que la vacunación con la cepa BCG $\Delta$ BCG1419c tenga antecedentes positivos en diferentes modelos murinos, sugiere que también podría tener resultados alentadores en presencia de DM y TB.

## II. Justificación

En los últimos años se ha identificado que la TB está estrechamente relacionada a la DM2. Debido a la alta prevalencia de ambas enfermedades, aunado con la variabilidad de respuesta protectora individual de *M. bovis* BCG, resulta necesaria la investigación y evaluación de nuevos candidatos vacunales.

El presente proyecto plantea evaluar el efecto del candidato vacunal BCG $\Delta$ BCG1419c en la TB asociada a DM2, determinando así una alternativa de vacuna que proporcione mejor protección inmunológica.

## III. Hipótesis

La vacuna BCG $\Delta$ BCG1419c brindará mayor protección ante la infección con *M. tuberculosis* en ratones BALB/c con diabetes *mellitus* tipo 2.

## IV. Objetivos

Establecer un modelo de vacunación en ratones diabéticos.

Evaluar la vacuna BCG $\Delta$ BCG1419c en un modelo de TB y DM2 (cepas 5186 y H37Rv ATCC de *M. tuberculosis*) determinando supervivencia, carga bacteriana en pulmón y daño pulmonar.

## V. Materiales y métodos

### A. Medidas de bioseguridad

Todos los procedimientos fueron realizados en el INCMNSZ, en la unidad de patología experimental en las instalaciones de bioseguridad nivel 3 (ABSLIII) REF: CINVA-1825 PAT-1825-16/18-1. Para la manipulación de micobacterias se utilizaron campanas de bioseguridad y en todo momento se utilizaron guantes, pijama quirúrgica, respiradores N95 o N100 y cubre zapatos. Además de filtración de aire autónomo por medio del sistema HEPA acondicionado dentro de las instalaciones. Los métodos mencionados son descritos en anteriores publicaciones por nuestro grupo de trabajo (12, 25, 65, 66, 67).

### B. Distribución de grupos y cinética

Los procedimientos se llevaron a cabo según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que procura el manejo humanitario de animales de laboratorio (57). Para este experimento se requirieron ratones macho de la cepa BALB/c de 3 semanas de edad que fueron proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del propio instituto.

Los ratones se alojaron en microaisladores con filtración constante de aire para garantizar nulo intercambio de aire con el medio exterior en grupos de 5 ratones por caja, con distractores previamente esterilizados, agua purificada *ad libitum*, alimento *PicoLab Rodent Diet*® o dieta hipercalórica dependiendo del grupo.

Del total de 150 ratones, 60 fueron infectados con la cepa 5186 y 90 con H37Rv ATCC de *M.tuberculosis*. De los infectados con 5186, a la mitad se les administró alimento *PicoLab Rodent Diet*® (n=30) y a la otra mitad dieta hipercalórica (n=30). De cada uno de estos grupos se inmunizaron con BCG Pasteur (n=10), BCGΔBCG1419c (n=10) y solución salina (n=10) (**Tabla 1**). Con respecto a los infectados con la cepa H37Rv ATCC, la mitad recibió alimento *PicoLab Rodent Diet*® (n=45) y la otra mitad dieta hipercalórica (n=45). Se inmunizaron con BCG Pasteur (n=15), BCGΔBCG1419c (n=15)



o solución salina como control (n=15). Asimismo se plantearon dos tiempos de eutanasia, 3 y 6 meses post infección para la adecuada evaluación de la vacunación (Tabla 2).

El tamaño de cada grupo fue calculado tomando en cuenta el mínimo de animales y muestras necesarias para obtener datos estadísticamente significativos. De 5 a 6 pulmones izquierdos para el análisis de carga bacilar y de 4 a 5 pulmones derechos para la parte de histología. Teniendo 5 ratones para cada tiempo de eutanasia planeado (3 y 6 meses) por grupo, así como 5 mas para preservación de muestras en congelación como control y para estudios posteriores.

**Tabla 1.** Distribución de grupos de ratones BALB/C infectados con la cepa 5186 de *M. tuberculosis*.

<b>5186 (n=60)</b>	<b>Dieta control (n=30)</b>	Vacunados con BCG Pasteur (n=10)	Eutanasia 3 meses post infección (n=10)
		Vacunados con BCGΔBCG1419c (n=10)	Eutanasia 3 meses post infección (n=10)
		Vacunados con solución salina (n=10)	Eutanasia 3 meses post infección (n=10)
	<b>Dieta hipercalórica (n=30)</b>	Vacunados con BCG Pasteur (n=10)	Eutanasia 3 meses post infección (n=10)
		Vacunados con BCGΔBCG1419c (n=10)	Eutanasia 3 meses post infección (n=10)
		Vacunados con solución salina (n=10)	Eutanasia 3 meses post infección (n=10)

**Tabla 2.** Distribución de grupos de ratones BALB/C infectados con la cepa H37Rv ATCC *M. tuberculosis*.

<b>H37Rv ATCC (n=90)</b>	<b>Dieta control (n=45)</b>	Vacunados con BCG Pasteur (n=15)	Eutanasia 3 y 6 meses post infección (n=7 y n=8)
		Vacunados con BCG $\Delta$ BCG1419c (n=15)	3 y 6 meses post infección (n=7 y n=8)
		Vacunados con solución salina (n=15)	3 y 6 meses post infección (n=7 y n=8)
	<b>Dieta hipercalórica (n=45)</b>	Vacunados con BCG Pasteur (n=15)	3 y 6 meses post infección (n=7 y n=8)
		Vacunados con BCG $\Delta$ BCG1419c (n=15)	3 y 6 meses post infección (n=7 y n=8)
		Vacunados con solución salina (n=15)	3 y 6 meses post infección (n=7 y n=8)

### C. Dieta hipercalórica

Las alteraciones metabólicas se indujeron en los animales por medio de la administración de una dieta hipercalórica (Cistina, colina, vitaminas AIN-93-XV, celulosa, minerales, inulina, aceite de soya, maltodextrina, sacarosa, manteca y caseína) 45% grasa, 34% carbohidratos y 21% compuesto por minerales proteína, fibra y vitaminas, elaborada por la división de nutrición del INCMNSZ. Para el grupo control se utilizó una dieta de mantenimiento control *PicoLab Rodent Diet*®. La dieta hipercalórica fue preparada en proporciones de 5 kilos aproximadamente cada 3 semanas en las instalaciones de la planta de nutrición del mismo instituto en mezcladoras Hobart N50. Posterior a su preparación se dejó reposar y refrigeró hasta su uso.

### D. Pesaje, sobrevida y determinación de glucosa en sangre

Los animales se mantuvieron en vigilancia y con la misma dieta, se evaluaron los niveles de glucosa para el establecimiento de DM2 crónica, los datos de peso individual

una vez a la semana, así como mediciones de concentración de glucosa en sangre basales al inicio del experimento, después de la aplicación de la estreptozotocina (STZ) y cada mes con el objetivo de observar el aumento de glucosa, así como a los tres y cuatro meses posterior a la infección para ver la repercusión de la enfermedad en las mediciones.

Los ratones se pesaron individualmente con una balanza Ohaus SE602F una vez a la semana a partir del inicio del experimento hasta la eutanasia. Para este procedimiento se colocó al ratón en la balanza previamente calibrada y cuando este se quedó quieto, se tomó el peso correspondiente.

En cuanto a las mediciones de concentración de glucosa en sangre se utilizó el equipo Accu-chek Active (Roche) con sus respectivas tiras reactivas. Para estas mediciones los animales fueron puestos en ayuno 4 horas antes, como ya se establece en otras publicaciones, y para cada medición se tomó una gota de sangre obtenida por punción en la región distal de la cola (38).

La sobrevida fue evaluada durante todo el experimento registrando el número de defunciones causadas por agentes externos al experimento, eutanasia humanitaria definida como el acto que provoca la muerte de un animal sin sufrimiento o estrés previo en este caso a causa de un estado avanzado de enfermedad para aliviar el sufrimiento del animal y eutanasia correspondiente a los 3 y 6 meses post infección por dislocación cervical (25).

### **E. Vacunación**

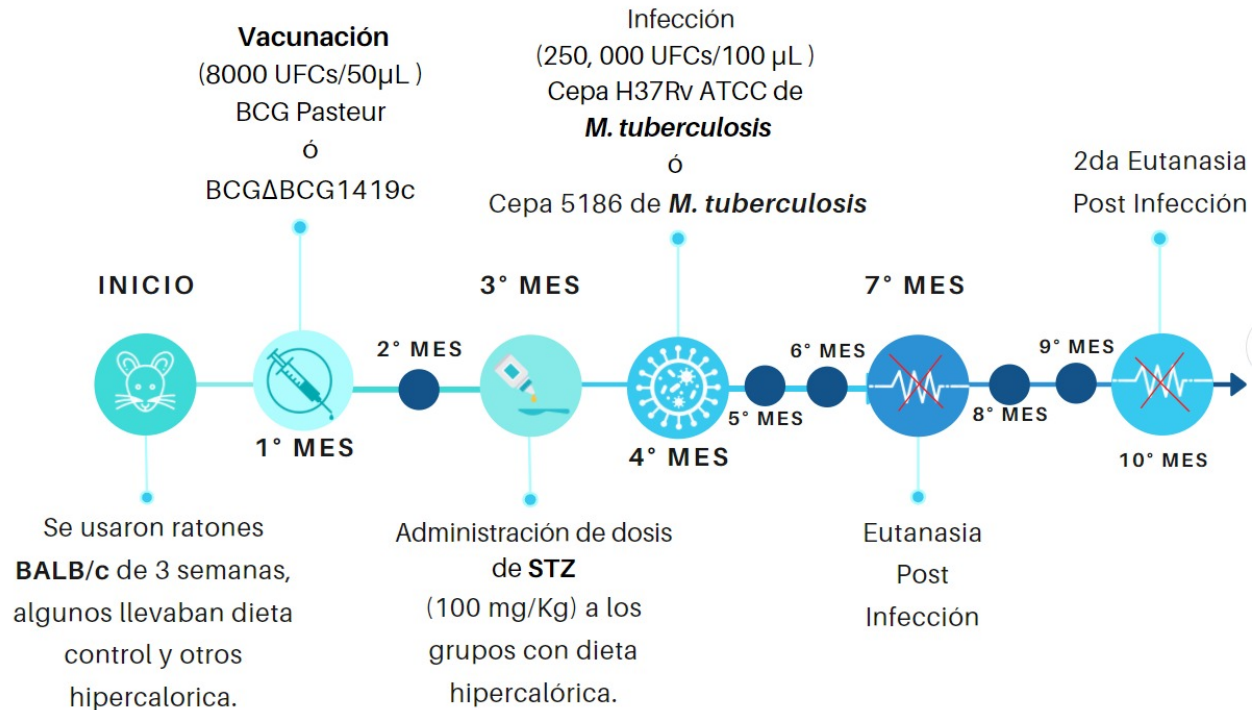
Para la disposición de las cepas y vacunas primero ambas se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 suplementado con glicerol al 2%, OADC al 10% y tween 80 0.05% (Sigma-Aldrich, USA) previamente esterilizado en autoclave a 115° C y 11 lb de presión e incubado con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37° por 24 horas. Los cultivos fueron incubados durante 48 horas en agitación constante a 37° 100 rpm y posteriormente se tomaron lecturas de

absorbancia en un espectofotómetro a 600 nm hasta obtener una densidad óptica de 0.6, llegando a una fase logarítmica de crecimiento.

Para la recuperación de las bacterias, el contenido de las botellas de cultivo se colectó en tubos estériles y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a 4°. Se resuspendió el botón bacteriano adicionando 45 mL de PBS 1x (solución amortiguadora de fosfatos) o solución salina. Se centrifugó nuevamente, se tiró el sobrenadante y se lavó 3 veces para resuspenderlo nuevamente en solución salina o PBS. Finalmente se hicieron alícuotas en criotubos estériles de 200 µL y se congelaron a -70° para su posterior uso.

Para la titulación de cepas y vacunas previo a su aplicación, alícuotas en criotubos estériles de 200 µL a -70°C se descongelaron de forma gradual y homogenizaron. Se realizaron diluciones seriadas sembrando 100 µL en cajas Petri con medio Middlebroock 7H10, incubándolas durante 14 días y obteniendo un conteo preliminar de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL.

Los animales fueron inmunizados vía subcutánea en la base de la cola (8000 bacterias/ 50 µL de PBS) con una aguja-jeringa de insulina en condiciones de esterilidad con BCG Pasteur, BCGΔBCG1419c donada por el Dr. M. Alberto Flores del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ) en Guadalajara Jalisco, México o solución salina como control respectivamente, inyectando 50 µL por dosis a cada ratón un mes posterior al inicio del experimento de acuerdo al esquema de trabajo establecido (**Imagen 1**).



**Imagen 1.** Esquema general del plan de trabajo especificado cada mes.

## F. Aplicación de estreptozotocina (STZ)

De acuerdo con los últimos pesos registrados de los animales previo a la aplicación del fármaco, se estimó un promedio por cada caja de 5 ratones al no existir grandes variaciones entre los pesos de estos y de acuerdo con la dosis establecida en anteriores reportes (100 mg/Kg) se calcularon dosis específicas (71). Debido al corto periodo de actividad del fármaco (15 minutos), se preparó en el momento utilizando una solución amortiguadora de citratos 0.1 M pH 4-5 para la dilución y activación de la molécula. La aplicación fue vía intraperitoneal en dirección ventral con una aguja-jeringa de insulina, inyectando 100µl por dosis a cada ratón tres meses posterior al inicio del experimento de acuerdo al esquema de trabajo establecido (**Imagen 1**)

## G. Infección

La infección fue a los 4 meses del inicio del experimento; un mes posterior a la aplicación de estreptozotocina y 3 desde la vacunación, buscando replicar el orden en que normalmente se da este ciclo en las personas. Pues éstas generalmente

desarrollan DM2 a causa de mala alimentación entre otros factores, son vacunadas y posterior a esto pueden ser expuestas a *M. tuberculosis* y enfermar (**Imagen 1**).

Previo a la infección con las cepas 5186 y H37Rv de *M.tuberculosis*, un criotubo a  $-70^{\circ}$  C por cada cepa fue descongelado gradualmente dentro de la campana de bioseguridad. Se realizaron diluciones y en base al cálculo de UFCs por mL y se determinó una concentración final de  $2.5 \times 10^5$  bacterias vivas suspendidas en 100  $\mu$ L de PBS.

Para la infección los animales fueron anestesiados con vapor de sevoflurano (100 $\mu$ l por ratón) en una cámara de acrílico y posteriormente fueron inoculados vía intratraqueal mediante la sujeción de los incisivos y la introducción de una cánula.

#### **H. Eutanasia**

Se realizó eutanasia a los 3 y 6 meses post infección (**Tabla 1 y 2**). Los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico aplicado por vía intraperitoneal (30 mg/Kg) y fueron sacrificados por dislocación cervical disminuyendo al mínimo el dolor o estrés, por medio de una rápida inconsciencia y muerte siguiendo las normas establecidas en la NOM-062-ZOO-1999 en la sección de lo referente a eutanasia (57, 59). Se obtuvo por disección ambos pulmones, el pulmón izquierdo fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido y guardado a  $-70^{\circ}$ C en un ultra-congelador hasta su procesamiento para análisis de determinación de UFCs. El pulmón derecho se perfundió vía intratraqueal con etanol absoluto para una adecuada expansión alveolar y conservación para el análisis histológico.

#### **I. Unidades formadoras de colonias en el pulmón**

Las muestras de tejido pulmonar izquierdo fueron descongeladas y posteriormente homogenizadas en frío con una perla de zirconio en el homogenizador de tejidos FastPrep-24 por 40 segundos. El ciclo se repitió tres veces adicionando 1mL de PBS-tween 80 al 0.05%. Las muestras fueron tratadas por 45 segundos en el sonicador (UltrasonicCleaner Cole Palmer) para disgregar las bacterias y el tejido para obtener

una muestra homogénea. Se realizaron diluciones seriadas con 30  $\mu\text{L}$  de cada muestra en una placa de 96 pozos con PBS- tween 80 al 0.05% y se sembraron 10  $\mu\text{L}$  de cada dilución por duplicado en cajas Petri con medio sólido Middlebroock 7H10 enriquecido con ácido oleico, albumina, catalasa y dextrosa (OADC, Becton Dickinson y Compañía). Las cajas se incubaron a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 3 semanas y se obtuvo un conteo del número total de UFCs observadas para así determinar la cuenta total de UFCs por mL reportando millones de UFCs totales en pulmón.

#### **J. Histología y análisis morfométrico**

Los pulmones derechos previamente fijados con etanol absoluto, fueron cortados de forma longitudinal a través del hilio pulmonar para la observación del árbol bronquial, alveolos e infiltrado inflamatorio. Al tejido se le dio un tratamiento de deshidratación con diferentes pasajes de alcohol y xilol para ser embebido en parafina. Posteriormente fueron incluidos en bloques rectangulares de parafina y cortados en un microtomo (LeicaMicrotome) obteniendo cortes con un grosor de 4 micras. Estos se colocaron en portaobjetos esmerilados y se tiñeron con hematoxilina-eosina, un colorante utilizado para la observación de células y matrices extracelulares en tejido.

El análisis morfométrico para la determinación de área total del pulmón, porcentaje de neumonía y presencia de granulomas, se realizó con el analizador de imágenes automatizado Q-WIN Leica, reportando porcentaje de neumonía de acuerdo al área total del tejido pulmonar y posteriormente los datos fueron revisado con el Dr. Rogelio Hernández Pando, jefe de la Sección de Patología Experimental del departamento de Patología.

#### **K. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó mediante el software Prism versión 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Para la curva de sobrevivencia se utilizó la prueba no paramétrica Log Rank y Kaplan-Meier. Las UFCs, el análisis morfométrico y pesos se analizaron por ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple Sidak (comparación de cada grupo contra el control). Las mediciones de glucosa se analizaron mediante la prueba t

student para muestras no pareadas así como por ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple Sidak. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **VI. Resultados**

### **A. Sobrevida**

La sobrevida se evaluó durante todo el experimento registrando el número total de bajas diariamente, así como eutanasia realizada. A partir del inicio del experimento hasta el día de infección planeado, se registró el 100% de sobrevida en todos los grupos infectados con ambas cepas.

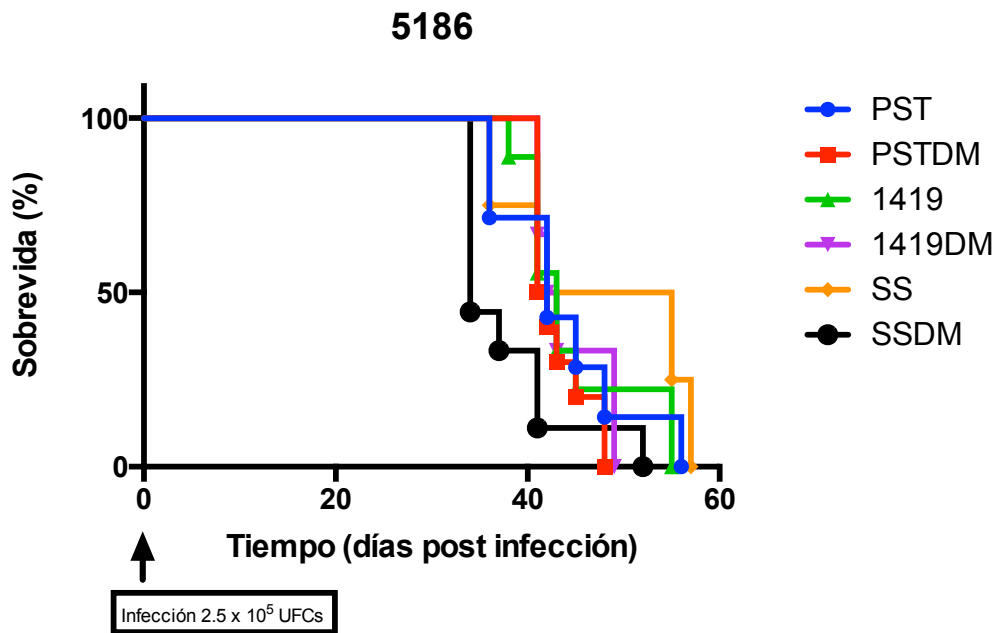
#### **a) Infección con la cepa 5186 de *M. tuberculosis*.**

Para los ratones con DM infectados con la cepa 5186 de *M. tuberculosis*, se observa que el grupo de ratones vacunados con dieta hipercalórica y solución salina (**SSDM línea negra**), tienen un descenso drástico del porcentaje de sobrevida del 50% en el día 34 continuando así hasta el día 52 post infección en comparación con el grupo de ratones vacunados con solución salina y dieta control, los cuales al día 36 muestra reducción únicamente del 29% de sobrevida (**SS, línea amarilla**). En adición a esto, se observó reducción en el porcentaje de sobrevida final en los grupos de estudio diabéticos (**PSTDM línea roja, 1419DM línea morada y SSDM línea negra**) comparado con los control (**PST línea azul, 1419 línea verde y SS línea amarilla**), concluyendo que ante la infección con una cepa hipervirulenta como 5186 de *M. tuberculosis*, la DM tiene importantes repercusiones en el mantenimiento de la sobrevida (**Figura 1**).

Grupos inmunizados con BCG Pasteur y solución salina (**PST línea azul y SS línea amarilla**), tuvieron una disminución del 30% de sobrevida en el día 36, mientras que en grupos vacunados con BCG $\Delta$ BCG1419c (**1419 línea verde y 1419DM línea morada**) al día 41 post infección se observa 45 y 34% de sobrevida respectivamente. Teniendo aparente mayor sobrevida en grupos vacunados con BCG $\Delta$ BCG1419c, pero no se



observan diferencias significativas entre estos y los demás grupos (**Figura 1**). Como se mencionó en el esquema de trabajo, el primer tiempo de eutanasia se planteó a los 3 meses post infección, con el objetivo de evaluar el efecto de la vacunación en el tiempo, pero como se observa en la Figura 1, para el día 56 el porcentaje de sobrevida en todos los grupos se redujo a 0%, siendo imposible realizar los análisis previamente establecidos pero brindando nueva información para futuros experimentos y lograr establecer una cinética de infección en animales diabéticos, vacunados e infectados con la cepa hipervirulenta 5186 de *M. tuberculosis*.

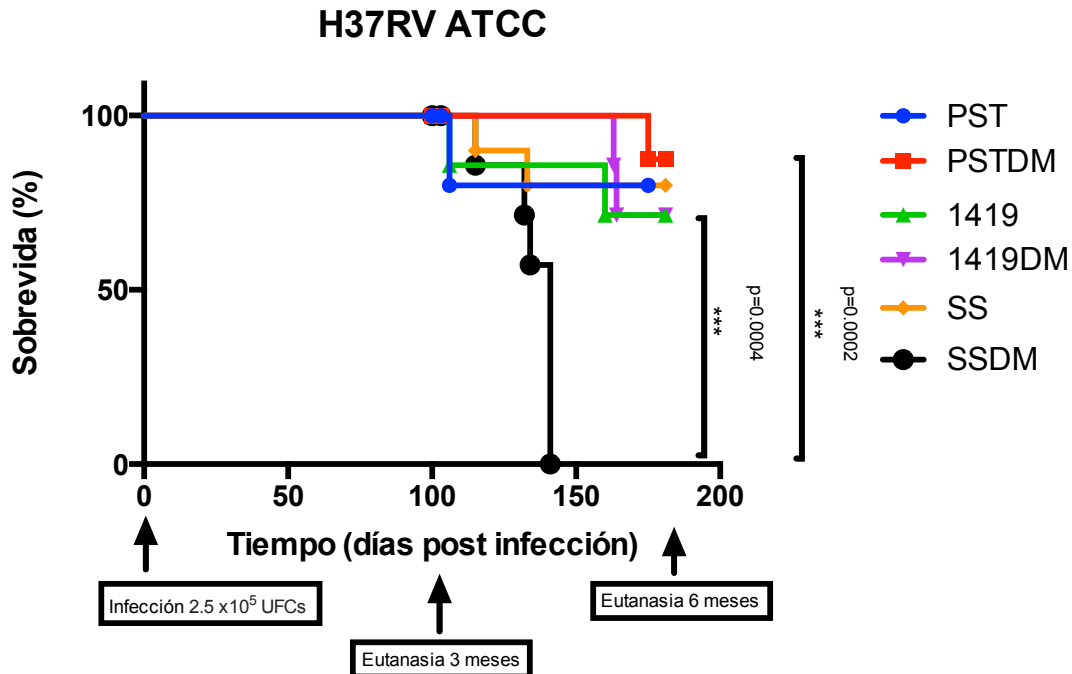


**Figura 1.** Sobrevida de ratones BALB/C infectados con la cepa 5186 de *M. tuberculosis* (n= 60) PST: Ratones vacunados con BCG Pasteur (n= 10), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=10), 1419: Ratones vacunados con BCGΔBCG1419c (n=10), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=10), SS: Ratones vacunados con solución salina (n=10), SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=10).

### **b) Infección con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis***

En la **Figura 2** se muestra la sobrevida observada ante la infección con la cepa H37Rv ATCC de *M. tuberculosis*. En esta resalta la muerte de todos los ratones pertenecientes al grupo con solución salina y dieta hipercalórica (**SSDM línea negra**) en el día 141 post infección. También, al comparar éste dato con el obtenido en el mismo grupo infectado con la cepa 5186, se observó un porcentaje de sobrevida mucho menor (0% en el día 51 post infección), resultado esperado relacionado directamente a la virulencia y características de cada cepa así como a la susceptibilidad y complicaciones al conjuntar la TB y la presencia de DM.

Por otra parte, los grupos inmunizados con BCG Pasteur e infectados con H37Rv, tuvieron un porcentaje final de sobrevida del 79% y 87% respectivamente (**PST línea azul y PSTDM línea roja**), mientras que los ratones con y sin DM vacunados con BCG $\Delta$ BCG1419c (**1419DM línea morada y 1419 línea verde**) mostraron 71% de sobrevida en ambos casos. Particularmente al hacer comparaciones entre los grupos diabéticos, estos muestran significancia (**1419DM línea morada vs SSDM línea negra p=0.0004**) (**PSTDM línea roja vs SSDM línea negra p=0.0002**). Asumiendo posible mejor protección reflejado en el incremento de los porcentajes de sobrevida significativamente más prolongados en ratones diabéticos ante la infección con H37Rv ATCC de *M. tuberculosis* con ambas vacunas, comparado con ratones inmunizados con solución salina como control.

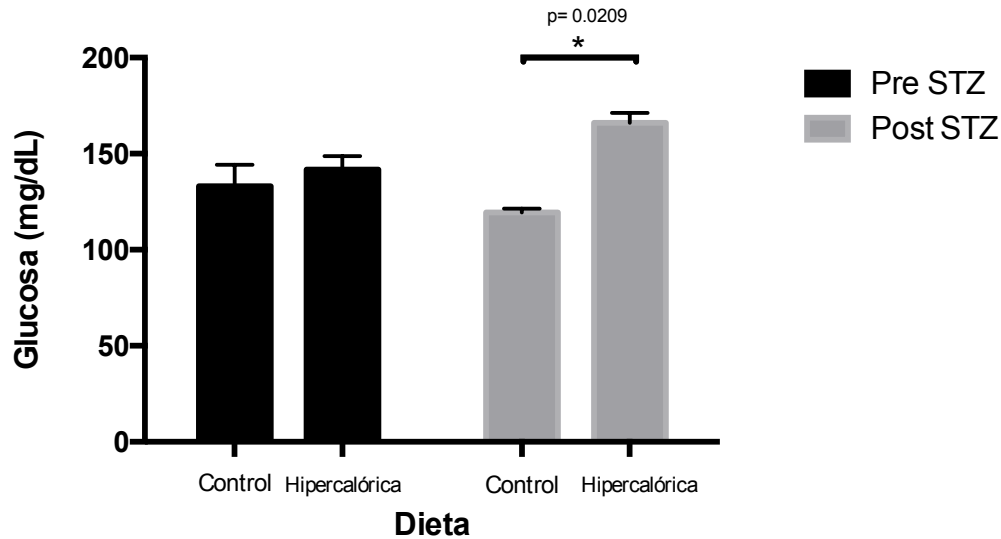


**Figura 2.** Sobrevida de ratones BALB/C infectados con H37Rv ATCC de *M. tuberculosis* (n=90) PST: Ratones vacunados con BCG Pasteur (n=15), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=15), 1419: Ratones vacunados con BCGΔBCG1419c (n=15), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=15), SS: Ratones vacunados con solución salina (n=15), SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=15).

## B. Glucosa

Con el objetivo de identificar un cambio en estos niveles de glucosa en presencia de la dieta establecida y la aplicación de STZ, se tomaron niveles de glucosa en sangre al inicio del experimento y 3 meses posterior cuando se administró la STZ.

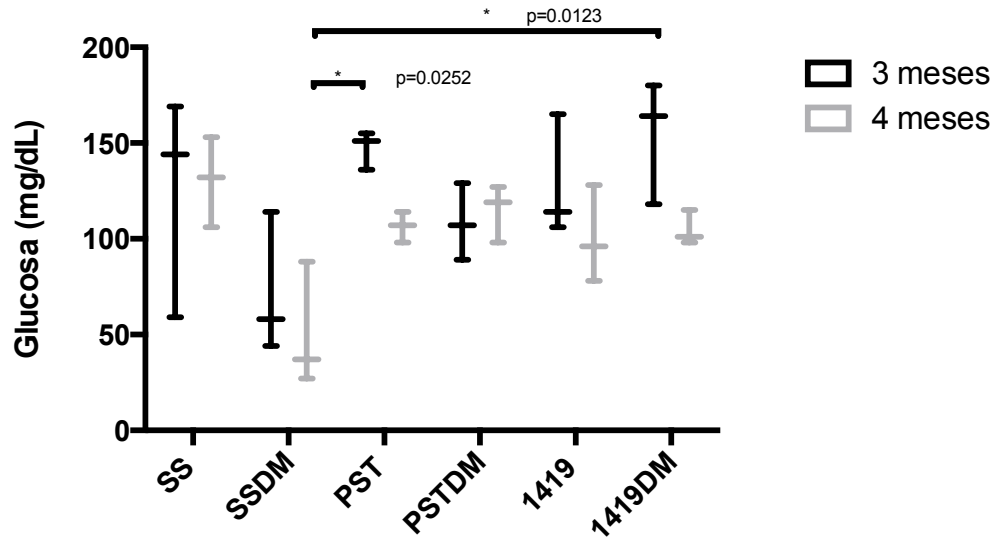
Estas mediciones de glucosa oscilaron entre 100 y 150 mg/dL sin diferencias significativas entre los dos grupos (barras negras en la **figura 3**), cuyos valores están dentro de los normales con respecto a la cepa BALB/c. Asimismo posterior a la aplicación de la STZ se nota una diferencia significativa en el grupo con dieta hipercalórica cuyos valores (160 mg/dL) son superiores al control (140 mg/dL) (barras gris p= 0.0209) (**Figura 3**). Lo cual indica un cambio significativo en los niveles de glucosa en conjunto con la dieta hipercalórica y la estreptozotocina posterior a 4 meses del inicio del experimento, datos que reflejan características de la DM2 humana y que apoyan el establecimiento del modelo murino de DM2.



**Figura 3.** Efecto de la estreptozotocina sobre los niveles de glucosa (n=12)

Mediciones de glucosa basales (Pre STZ) y después de la aplicación de estreptozotocina (Post STZ) en ratones BALB/c con dieta hipercalórica o control *PicoLab Rodent Diet*® .

Se tomaron mediciones a los 3 y 4 meses post infección para evaluar los niveles de glucosa en presencia de TB-DM en los diferentes grupos infectados con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Obteniendo niveles más bajos que los registrados inicialmente en todos los grupos a los 3 meses post infección (120-150 mg/dL), especialmente en el grupo inmunizado con solución salina y dieta hipercalórica (SSDM) cuyos valores fueron más bajos que los normales (75 mg/dL). Con respecto a las mediciones realizadas a los 4 meses post infección, se observaron valores de glucosa aún más bajos que los anteriores (100-120 mg/dL) y de nuevo el grupo SSDM presentó los niveles más bajos (50 mg/dL). Estos resultados pueden interpretarse como un avance en la progresión de la TB, la consecuente pérdida de apetito y por lo tanto niveles cada vez más bajos de glucosa y peso. En adición a esto, se observan diferencias significativas entre este último grupo mencionado con los otros dos diabéticos y vacunados (PSTDm y 1419DM), aunque este efecto no se observa posteriormente (**Figura 4**).



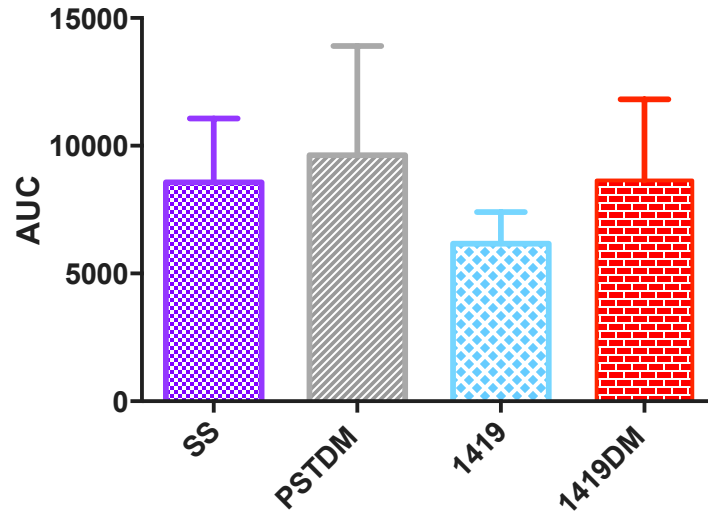
**Figura 4.** Niveles de glucosa a los 3 y 4 meses post infección con H37Rv de *M. tuberculosis* en cada uno de los diferentes grupos (n=36).

PST: Ratones vacunados con BCG Pasteur (n=6), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=6), 1419: Ratones vacunados con BCGΔBCG1419c (n=6), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=6), SS: Ratones vacunados con solución salina (n=6), SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=6).

Asimismo a los 6 meses post infección antes de la última fecha de eutanasia programada, en cada uno de los grupos se realizó una curva de tolerancia a la glucosa para la observación del metabolismo de la glucosa en el transcurso de un tiempo determinado (15, 30 y 60 minutos) en presencia de una solución de glucosa al 50% *Pisa Minioval*®.

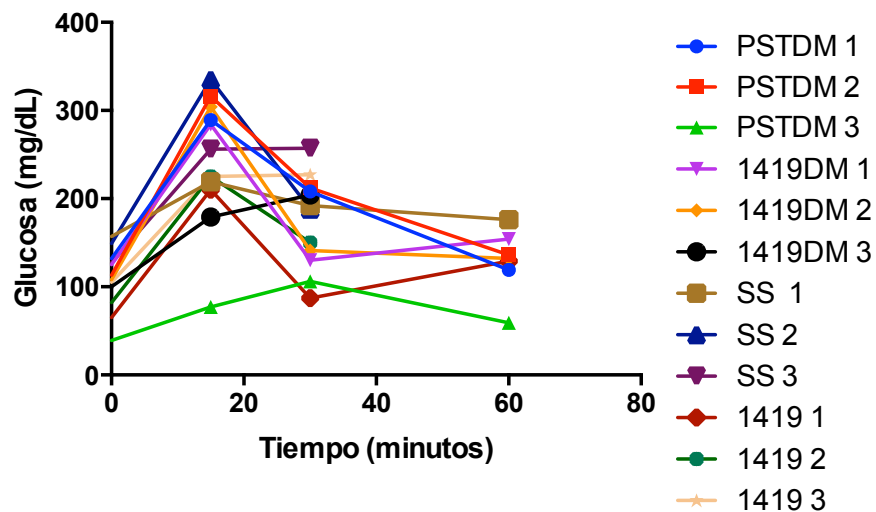
Se obtuvieron valores muy similares del área bajo la curva sin diferencias significativas entre los grupos de estudio (**Figura 5**) y de forma individual las gráficas fueron bastante parecidas con ligeras variaciones y niveles basales al tiempo 0 de 100 y 125 mg/dL alcanzando en la mayoría un pico máximo de entre 150 y 300 mg/dL, con la única excepción de 2 ratones (1419DM3 y PSTDM3). El primero con un valor máximo de 200 mg/dL el cual no disminuyó al paso del tiempo como se observa en las otras gráficas individuales y que representa una alteración significativa en el metabolismo. El segundo ratón (PSTDM3) presentó niveles bajos de glucosa que no aumentaron de 100 mg/dL y cuya área bajo la curva tuvo valores muy por debajo del promedio del grupo, lo cual se

explica por la avanzada enfermedad mostrando signos de pérdida de peso y disminución de consumo de alimento (**Figura 6**).



**Figura 5.** Curva de tolerancia a la glucosa por grupo (n=12)

PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=3), 1419: Ratones vacunados con BCGΔBCG1419c (n=3), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=3), SS: Ratones vacunados con solución salina (n=3), SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=3).



**Figura 6.** Curva de tolerancia a la glucosa individual (n=12).

PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=3), 1419: Ratones vacunados con BCGΔBCG1419c (n=3), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=3), SS:

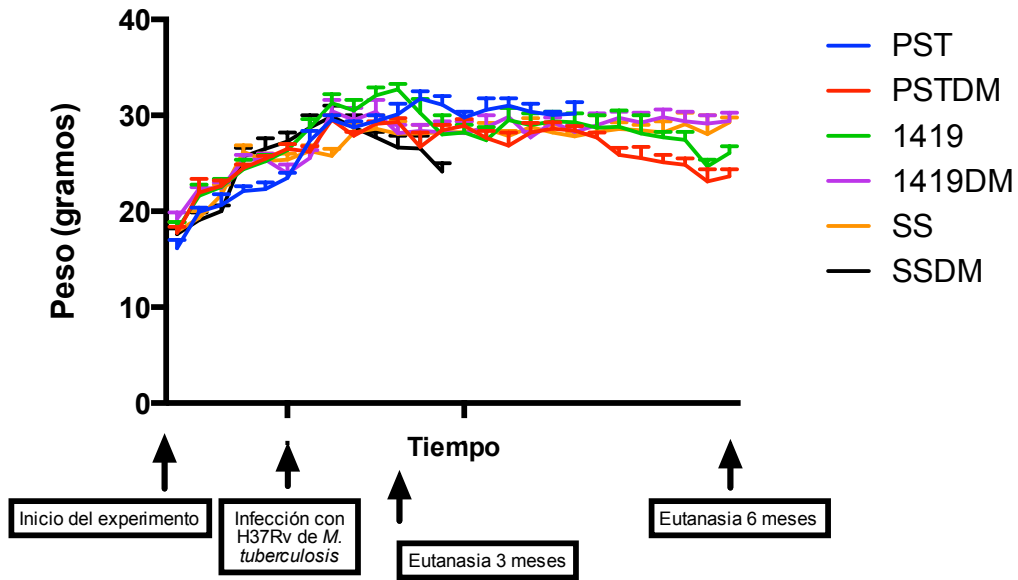
Ratones vacunados con solución salina (n=3), SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=3).

### **C. Ratones diabéticos vacunados con BCG $\Delta$ BCG1419c registran menor pérdida de peso comparado con los inmunizados con la cepa parental**

Otro de los parámetros evaluados fue el peso semanal de los ratones para identificar el efecto de las diferentes vacunas en el grupo de ratones diabéticos, pues como se mencionó anteriormente, una de las principales características de la vacunación con BCG $\Delta$ BCG1419c es la reducción en la pérdida del peso.

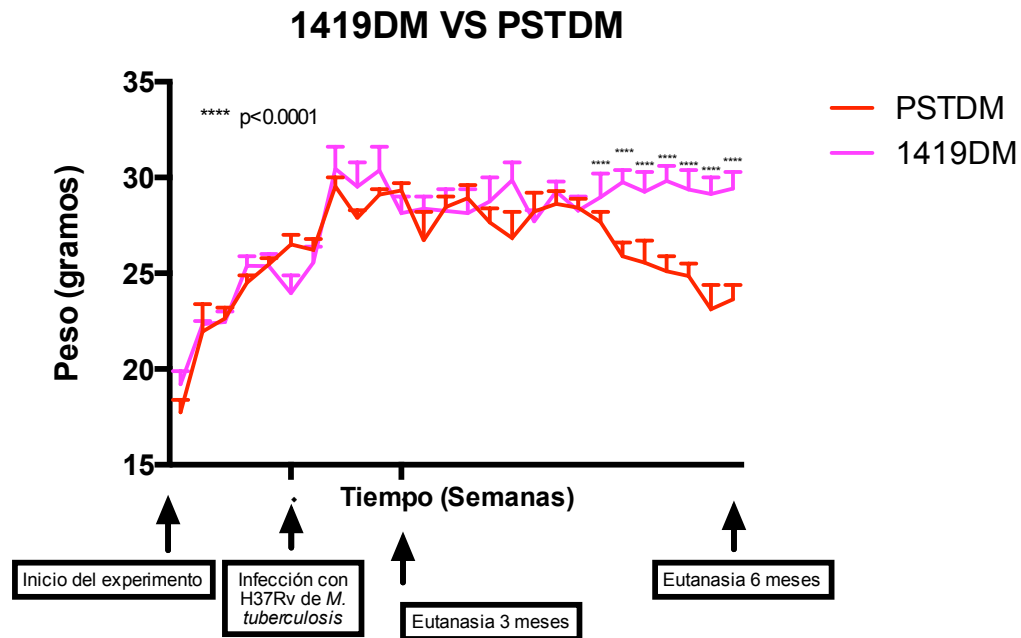
Los pesos basales al inicio del experimento estuvieron en un rango de entre 15 y 20 gramos, valores considerados normales de acuerdo a la edad y cepa BALB/c registrados en publicaciones anteriores, mientras que los más altos registraron pesos de hasta 33.1g. Asimismo, se observan valores finales de 24.1g en el grupo diabético control (SSDM) en el día 141 post infección al momento de realizar eutanasia humanitaria (**Figura 7a**).

Observando a los ratones diabéticos y vacunados, el grupo inmunizado con BCG $\Delta$ BCG1419c (1419DM) registra pesos significativamente mayores comparados con BCG Pasteur (PSTDM) a partir del quinto mes post infección aproximadamente hasta el final del experimento. Además de registrar diferencia significativa en pesos finales promedio de 29.4 y 26.03g respectivamente (**Figura 7b**).



**Figura 7a.** Registro de pesos semanal asociados a la aplicación de la vacuna BCG y BCGΔBCG1419c (n=90).

PST: Ratones vacunados con BCG Pasteur (n=15), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=15), 1419: Ratones vacunados con BCGΔBCG1419c (n=15), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=15), SS: Ratones vacunados con solución salina (n=15), SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=15).



**Figura 7b.** Comparación del registro de pesos semanal en grupos diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c y BCG Pasteur (n=30)

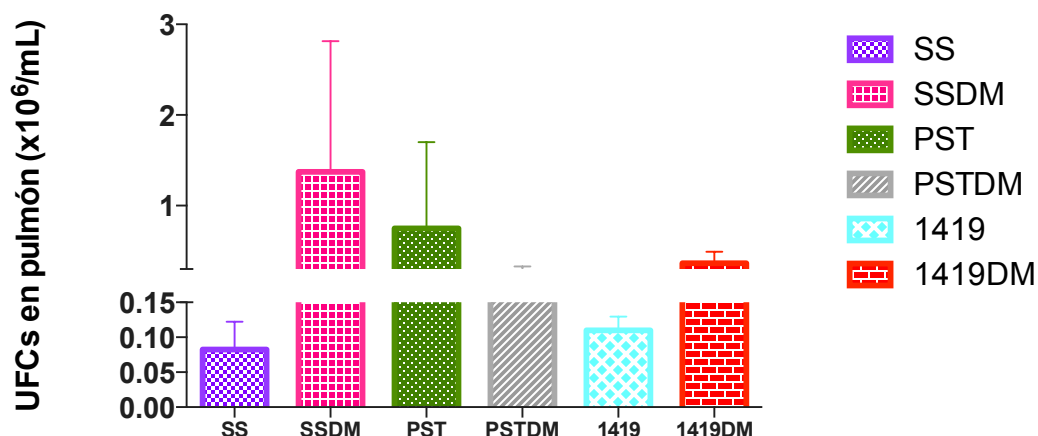


PSTDM: ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=15), 1419DM: ratones diabéticos vacunados con BCG $\Delta$ BCG1419c (n=15).

#### **D. Ratones diabéticos inmunizados con BCG $\Delta$ BCG1419c exhiben significativamente menores UFCs 6 meses post infección**

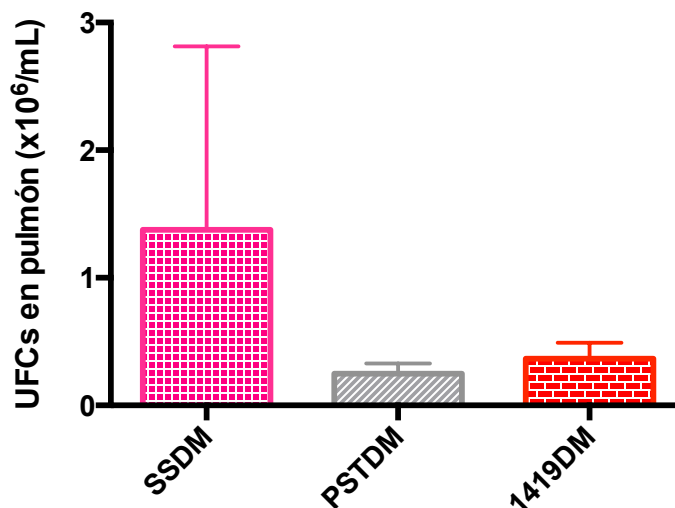
El análisis de carga bacilar a los 3 meses post infección muestra menor número de UFCs en los grupos con dieta control (PST, 1419 y SS con 0.75, 0.11 y 0.08 X10<sup>6</sup> UFCs respectivamente) comparado con los grupos diabéticos (SSDM, 1419DM y PSTDM con 1.3, 0.36 y 0.24 X10<sup>6</sup> UFCs en pulmón respectivamente). Como se observa en las figuras, el grupo vacunado con solución salina (SS), presentó el menor número de carga bacilar, dato que fue corroborado al realizar el análisis dos veces y que se podría explicar por algún error en la infección u homogenización del inóculo previo a su aplicación. Consideraciones que deberán ser tomadas en cuenta para posteriores experimentos (**Figura 8**).

Comparando la carga bacilar de los ratones vacunados y con dieta hipercalórica (SSDM, PSTDM y 1419DM), a pesar de no existir diferencias significativas entre los grupos, se observa aparente reducción de UFCs en ratones vacunados con el candidato (1419DM) comparado con el control inmunizado con solución salina (SSDM) (**Figura 9**).



**Figura 8.** Unidades Formadoras de Colonia a los 3 meses post infección con H37Rv de *M. tuberculosis* (n=42)

PST: Ratones vacunados con BCG Pasteur (n=7), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=7), 1419: Ratones vacunados con BCGΔBCG1419c (n=7), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=7), SS: Ratones vacunados con solución salina (n=7), SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=7).



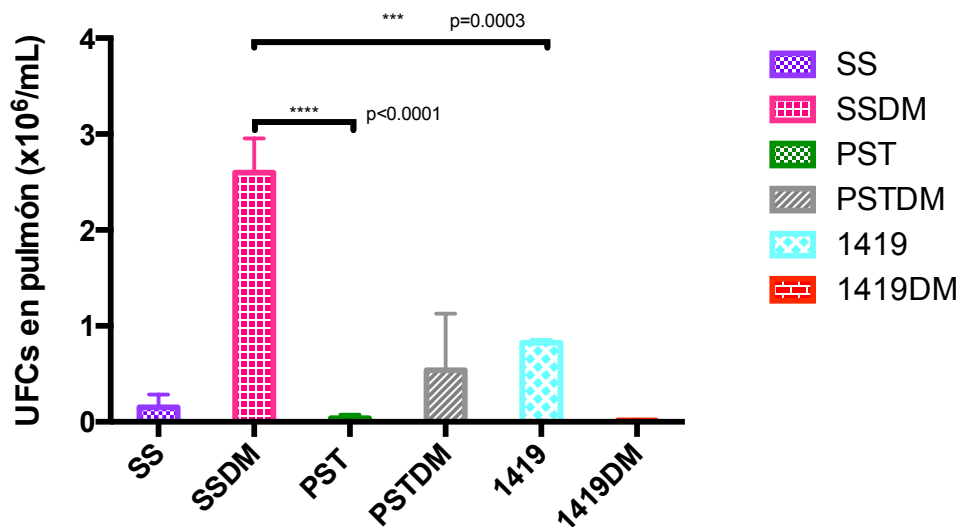
**Figura 9.** Unidades Formadoras de Colonias a los 3 meses post infección con H37Rv de *M. tuberculosis*. Ratones vacunados BALB/C diabéticos (n=21)

SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=7), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=7), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=7).

En cuanto al análisis de carga bacilar a los 6 meses post infección, la Figura 10 muestra un aumento considerable de UFCs de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, donde el valor más alto corresponde al grupo diabético control (SSDM) con  $2.6 \times 10^6$  UFCs, el cual fue sacrificado a los 4 meses post infección de forma humanitaria pero se incluye en estas figuras para su comparación. Además, se observan diferencias significativas entre éste y los grupos vacunados control (SSDM vs PST  $p < 0.0001$ ) (SSDM vs 1419  $p = 0.0003$ ), haciendo evidente el posible efecto de la DM en la carga bacilar pulmonar comparado con los ratones inmunizados con las vacunas BCG Pasteur y BCGΔBCG1419c (**Figura 10**).

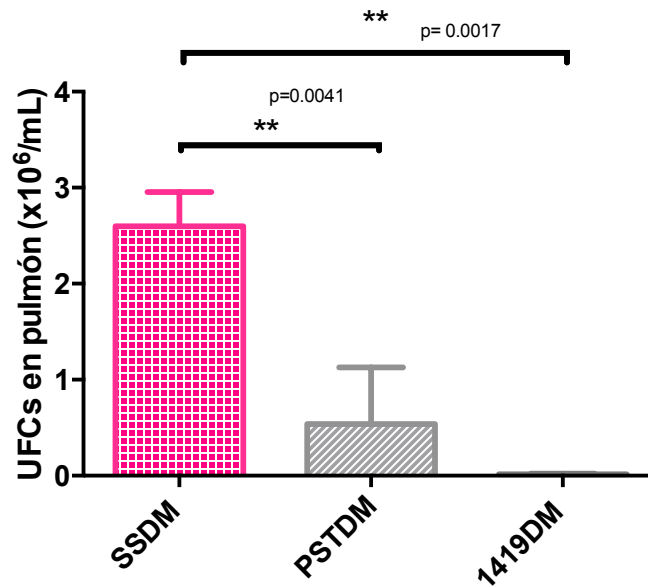
Con respecto a los ratones diabéticos, al comparar el grupo control con los otros dos inmunizados, se puede ver diferencia significativa entre ambos (SSDM vs PSTDM  $p=0.0041$ ) (SSDM vs 1419DM  $p=0.0017$ ). Lo cual nos habla del efecto de la hiperglucemia en la carga bacilar, pues niveles altos de glucosa y obesidad a consecuencia de la dieta hipercalórica, están relacionados con posibles implicaciones en el control de la carga bacilar en pulmón. A diferencia del grupo inmunizado con BCG Pasteur, el contabilizó  $0.57 \times 10^6$  UFCs mientras que el grupo vacunado con el candidato BCG $\Delta$ BCG1419c tuvo  $0.014 \times 10^6$  UFCs, siendo este el valor más bajo de todos. Datos que hacen referencia a posible mejor protección ante la infección con H37Rv de *M. tuberculosis* (**Figura 11**).

Comparando los resultados obtenidos a los 3 y 6 meses post infección en ratones diabéticos, como ya se había mencionado en gráficas anteriores, a los 3 meses ambos grupos vacunados (1419DM y PSTDM) tienen valores similares sin ninguna diferencia significativa, pero al observar los resultados de 6 meses el grupo inmunizado con BCG Pasteur tiende incluso a aumentar un poco las UFCs de  $0.28$  a  $0.56 \times 10^6$  pero en los ratones vacunados con BCG $\Delta$ BCG1419c las UFCs disminuyen tanto que incluso la barra se aprecia muy poco bajando de  $0.36$  a  $0.014 \times 10^6$  en el pulmón (**Figura 12**).



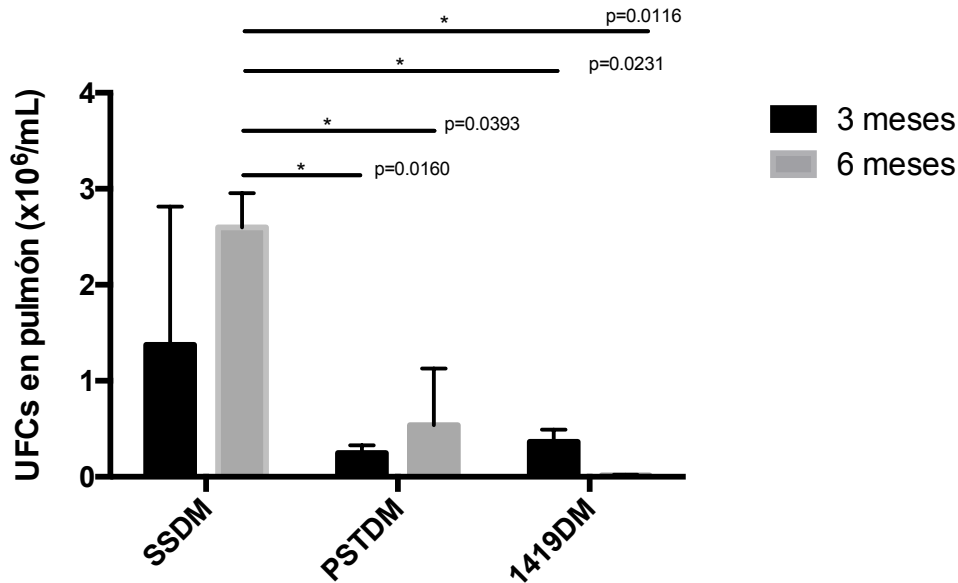
**Figura 10.** Unidades Formadoras de Colonias a los 6 meses post infección con H37Rv de *M. tuberculosis*. \*Grupo de ratones BALB/C diabéticos inmunizados con solución salina (SSDM) sacrificado a los 4 meses post infección por medio de sacrificio humanitario (n=42)

PST: ratones vacunados con BCG Pasteur (n=7), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=7), 1419: Ratones vacunados con BCGΔBCG1419c (n=7), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=7), SS: Ratones vacunados con solución salina (n=7), SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=7).



**Figura 11.** Unidades Formadoras de Colonias a los 6 meses post infección con H37Rv de *M. tuberculosis*. Ratones vacunados diabéticos (n=21).

SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=7), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=7), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=7).

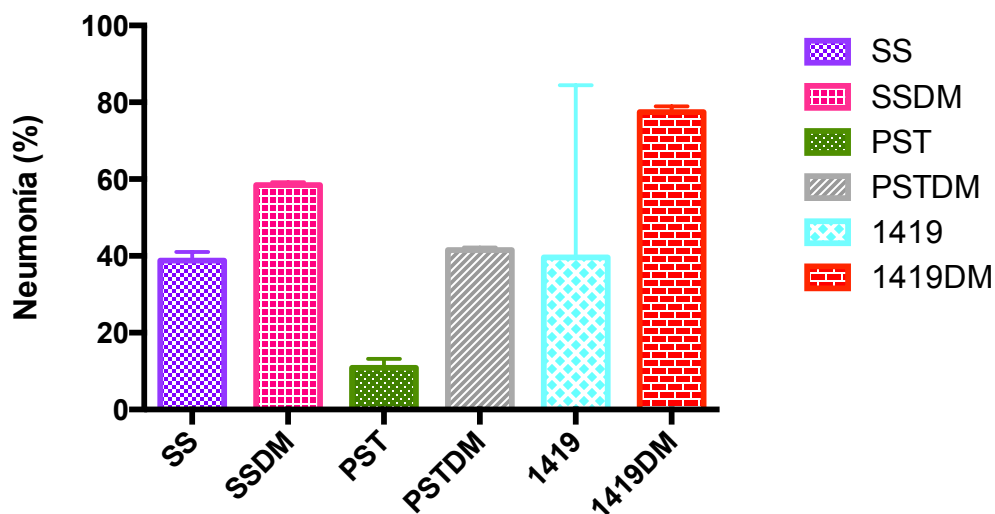


**Figura 12.** Unidades Formadoras de Colonias. Comparación de 3 y 6 meses post infección con H37Rv de *M. tuberculosis* en ratones BALB/c vacunados diabéticos (n=42).

SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=14), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=14), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=14).

### **E. Reducción de daño en pulmón de ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c a los 6 meses post infección**

En cuanto al análisis histológico de muestras obtenidas a los 3 meses post infección, se observa mayor daño histológico en los grupos diabéticos vacunados (SSDM y 1419DM) con el 58.4% y 77.4 % respectivamente, mientras que el grupo inmunizado con BCG Pasteur (PSTDM) exhibe valores similares con 41.5% de daño. Por otra parte los valores más bajos pertenecen a los ratones vacunados con BCG Pasteur (PST 10.8%), siendo este el grupo con menor daño histológico a los 3 meses post infección. Asimismo comparando únicamente los grupos diabéticos, aunque no existen diferencias significativas observamos aparente menor porcentaje de neumonía en los ratones inmunizados con BCG Pasteur comparado con el candidato vacunal (1419), (**Figura 13**).



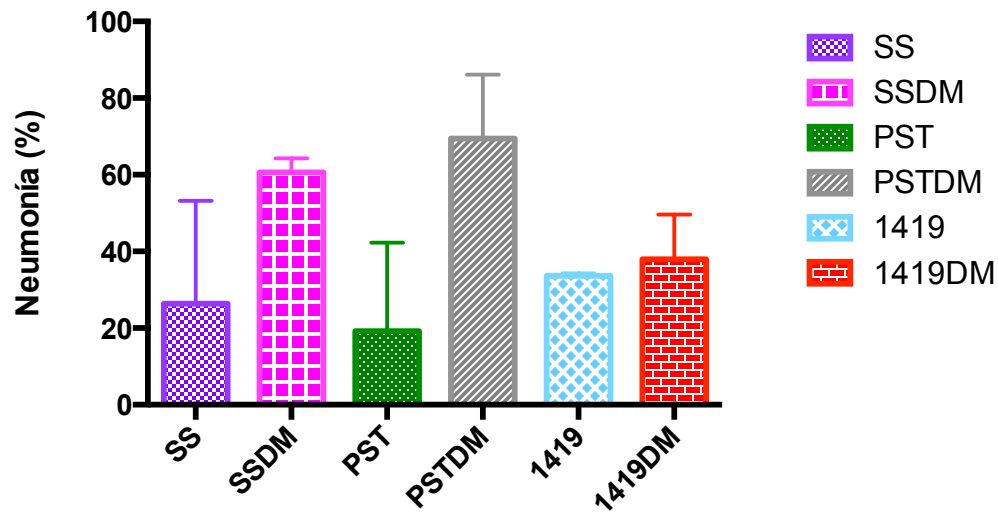
**Figura 13.** Porcentaje de neumonía a los 3 meses post infección con H37Rv de *M. tuberculosis* (n=24). PST: Ratones vacunados con BCG Pasteur (n=4), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=4), 1419: Ratones vacunados con BCGΔBCG1419c (n=4), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=4), SS: Ratones vacunados con solución salina (n=4), SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=4).

Los datos referentes al porcentaje de neumonía a los 6 meses post infección, reflejan gran daño histológico en ratones diabéticos vacunados con solución salina (SSDM 60.6%) y BCG Pasteur (PSTDM 69.4%). Mientras que el dato con el menor porcentaje entre los diabéticos pertenece a la vacuna BCGΔBCG1419c reportando únicamente el 37.9% de daño histológico observando aparente disminución de daño pulmonar en el grupo vacunado con el candidato comparado con los otros dos (**Figura 14**).

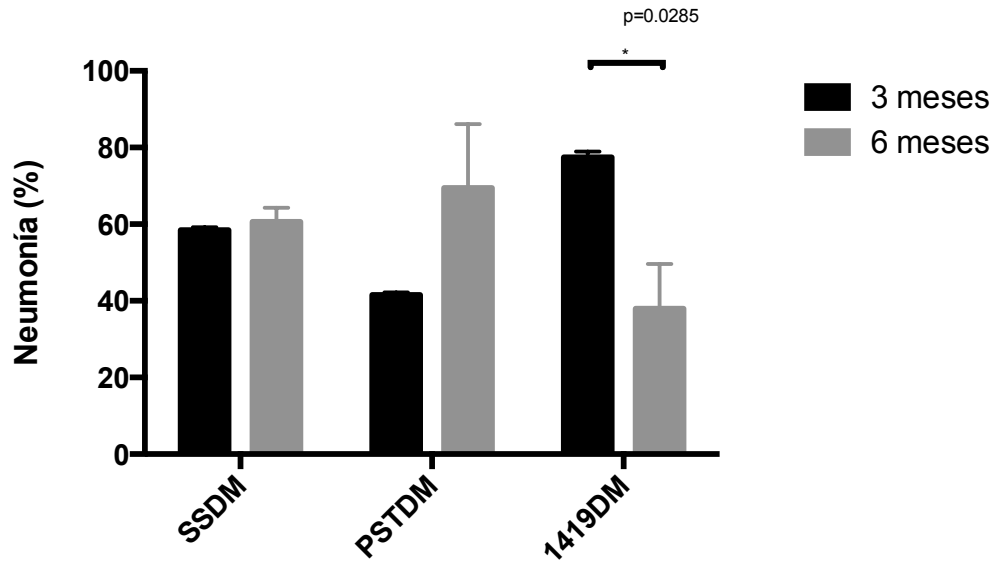
En adición, se aprecia reducción significativa del porcentaje de neumonía al comparar los valores de 3 y 6 meses post infección en los ratones vacunados con BCGΔBCG1419c (1419DM 3 meses vs 1419DM 6 meses  $p=0.0285$ ) (**Figura 15**).

Apoyando estos datos con cortes histológicos, los grupos inmunizados con solución salina y DM2 (SSDM) presentan mayores áreas neumónicas a los tres y cuatro meses post infección, ésta última como la fecha en que fue realizada eutanasia humanitaria por la gravedad de la enfermedad. Asimismo comparando los demás grupos, en las imágenes tomadas se aprecian menos parches de áreas neumónicas en ratones

vacunados con BCG $\Delta$ BCG1419c (1419DM) a los 6 meses post infección comparado con el control como es observado en la figura anterior (**Imagen 2**). Datos que concuerdan con lo visto en el análisis de UFCs a los 6 meses post infección sugiriendo posible menor daño y carga bacteriana en el tejido pulmonar.

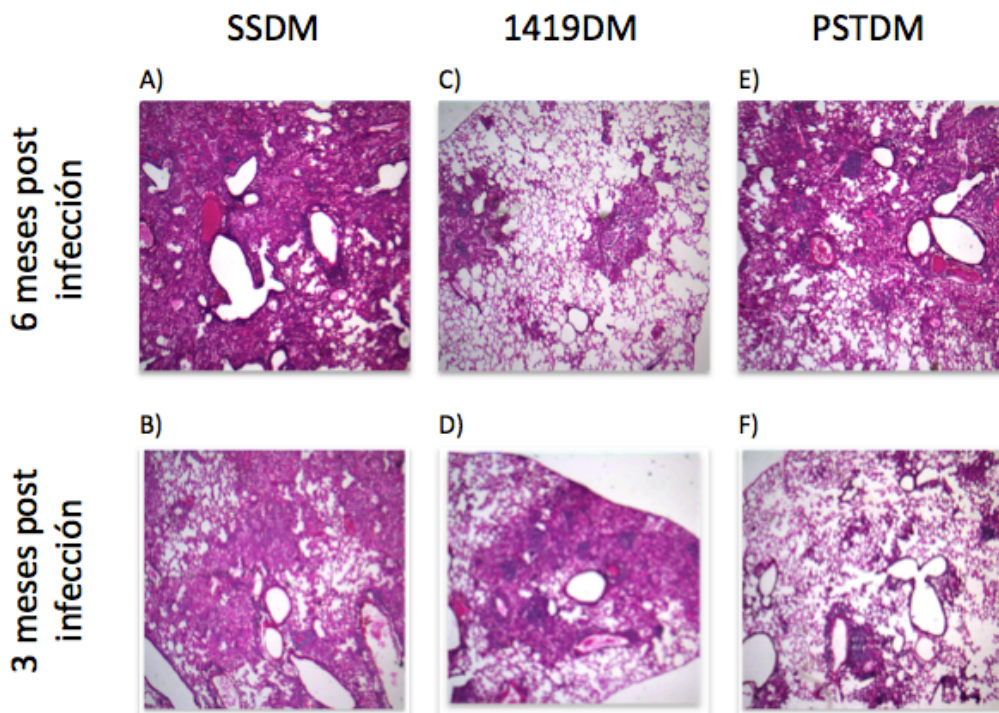


**Figura 14.** Porcentaje de neumonía a los 6 meses post infección con H37Rv de *M. tuberculosis*. (n=24)  
PST: Ratones vacunados con BCG Pasteur (n=4), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=4), 1419: Ratones vacunados con BCG $\Delta$ BCG1419c (n=4), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCG $\Delta$ BCG1419c (n=4), SS: Ratones vacunados con solución salina (n=4), SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=4).



**Figura 15.** Comparación de porcentaje de neumonía a los 3 y 6 meses post infección con H37Rv de *M. tuberculosis* en ratones BALB/C diabéticos vacunados. (n=24)

SSDM: Ratones diabéticos vacunados con solución salina (n=4), PSTDM: Ratones diabéticos vacunados con BCG Pasteur (n=4), 1419DM: Ratones diabéticos vacunados con BCGΔBCG1419c (n=4).



**Imagen 2.** Cortes histológicos representativos de pulmones de ratones BALB/C vacunados diabéticos 6 y 3 meses post infección. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina. A) SSDM 4 meses post infección, B) SSDM 3 meses, C) 1419DM 6 meses, D) 1419DM 3 meses, E) PSTDM 6 meses, F) PSTDM 3 meses



## VII. Discusión

En este trabajo se evaluó la utilidad de la vacuna BCG $\Delta$ BCG1419c en términos de sobrevida, desarrollo de inmunidad que permita el control del crecimiento de *M. tuberculosis* mediante UFCs y daño histológico en un modelo murino de TB-DM2.

Uno de los primeros parámetros a evaluar fue la concentración de glucosa en sangre en niveles basales y posteriores a la administración de una dieta hipercalórica en los ratones, así como la aplicación de estreptozotocina para determinar el establecimiento del modelo murino de DM.

Los valores basales registrados de acuerdo a nuestro grupo de trabajo y anteriores publicaciones, oscilan alrededor de 100 y 130 mg/dL que son datos referenciales tomados como glucemias normales, así como valores posterior a la aplicación de estreptozotocina y dieta hipercalórica, los cuales fueron monitoreados y declarados hiperglucémicos (alrededor de 200mg/dL) de acuerdo a anteriores publicaciones en estudios realizados en ratones macho de la cepa BALB/c con una dosis de 100mg/Kg de STZ (71, 73, 74).

Teniendo en cuenta que la determinación de glucemia plasmática en ayunas y el aumento significativo de peso son dos de los principales parámetros de confirmación de diagnóstico de la DM2, además de la aplicación de una dosis específica de estreptozotocina para causar únicamente una deficiencia mas no ausencia total en la producción de insulina (38), podemos considerar que el modelo murino presenta una condición similar a la DM2 (**Figuras 3 y 7**).

En este experimento se utilizaron dos cepas en diferentes grupos, la cepa prototipo H37Rv de *M. tuberculosis* una cepa patógena de mediana virulencia utilizada ampliamente como cepa de referencia, permitiendo el mantenimiento de la enfermedad

por periodos largos de tiempo y la cepa 5186 un aislado clínico (cepa 9005186 Latinoamericana), ambas previamente utilizadas en experimentos con estas vacunas (25, 68).

En la determinación de sobrevivencia de todos los grupos infectados con la cepa 5186 de *M. tuberculosis*, se observó un deceso temprano en el porcentaje de sobrevivencia a partir del día 34 post infección, similar a estudios realizados con el mismo modelo murino, los cuales registran decesos a partir de las 3 semanas post infección y a partir de la quinta, cero por ciento total de sobrevivencia (25). Efecto directamente asociado a las características de la cepa, pues al tener crecimiento rápido en pulmón se ha registrado hasta el doble de carga bacilar así como significativamente mayor daño pulmonar en etapas tempranas de la enfermedad (28 días post infección), así como alta transmisibilidad comparado con H37Rv. Esto correlacionado con la rápida y alta inducción de la expresión de citocinas como IL-4 y TNF- $\alpha$ , esta última importante en el control de la infección pero que en altas cantidades se ha vinculado con severa inflamación.

A pesar de que se sugieren ciertas tendencias entre los grupos infectados con la cepa 5186 de *M. tuberculosis*, donde los animales inmunizados y tratados con dieta control exhiben mayor porcentaje de sobrevivencia (SS, PST y 1419), las diferencias entre éstos y los demás grupos no son significativas. Los resultados obtenidos tampoco pueden corroborarse ya que los animales de los diferentes grupos no lograron sobrevivir hasta los tiempos de sacrificio planeados. Esto quizás debido a problemas en el diseño experimental, pues a pesar de que existen estudios reportados de la cinética de sobrevivencia de ratones BALB/c con la cepa 5186 (25), no existen suficientes antecedentes en el contexto de enfermedades metabólicas como DM2 lo cual dificultó la planeación de la sobrevivencia del modelo de infección. Asimismo, como se observa en las gráficas referentes a sobrevivencia (**Figura 1**), en lapsos muy cortos de tiempo había pérdidas de grupos completos lo cual hacía imposible realizar análisis que fueran estadísticamente significativos y comparaciones entre estos, pues a pesar de obtener tejido por medio de necropsias, las muestras obtenidas no son aptas para determinar

UFCs y la morfología del tejido no logra apreciarse adecuadamente. Datos y consideraciones que deberán ser tomados en cuenta para futuros experimentos en este y otros modelos murinos.

Únicamente se observa que los principales grupos afectados en este estudio registrando menor porcentaje de sobrevida en menor tiempo, fueron los animales diabéticos (SSDM con 50% de sobrevida al día 34 post infección, PSTDM y 1419DM).

De acuerdo a los resultados con la cepa H37Rv, en el gráfico de sobrevida los grupos más afectados fueron los ratones diabéticos control (SSDM), existiendo diferencias significativas entre éste y los otros dos grupos diabéticos pero no entre ellos (1419DM y PSTDM). Mientras que los demás grupos exhibieron porcentajes parecidos sin diferencias entre éstos al término del experimento (**Figuras 1 y 2**).

El hecho de que los animales diabéticos control infectados con ambas cepas presentaran menor porcentaje de sobrevida, nos habla de acuerdo a la literatura de posible mayor susceptibilidad como consecuencia de la DM y falta de protección. Por otra parte en los resultados obtenidos con los animales infectados con H37Rv, se observan diferencias comparando los grupos diabéticos vacunados, datos que permiten concluir que la eficacia de la protección después de la vacunación con BCG Pasteur y BCG $\Delta$ BCG1419c depende del conjunto de muchos factores como la inmunogenicidad y patogenicidad de las cepas infectantes, así como de factores del hospedero como enfermedades asociadas. Asimismo, la protección conferida por la vacunación con BCG $\Delta$ BCG1419c ante la infección con H37Rv de *M. tuberculosis* en presencia de DM2 puede contribuir a prolongar la sobrevida.

Otro de los parámetros a evaluar a lo largo de todo el experimento fue el peso de los animales, pues la pérdida de peso está relacionada con la caquexia, una de las principales características de la TB. Además existen antecedentes donde se ha observado que al tratar modelos murinos de TB con el candidato vacunal BCG $\Delta$ BCG1419c, éstos no exhiben pérdidas de peso significativas. Datos que concuerdan parcialmente con los resultados obtenidos, donde los ratones vacunados

con BCG $\Delta$ BCG1419c muestran menor pérdida de peso en comparación con los vacunados con BCG Pasteur (64).

En los resultados de este trabajo se observa aumento de peso en todos los grupos, como indicador de crecimiento, desarrollo y en algunos casos por acción de la administración de la dieta hipercalórica registrando pesos máximos de 33 g. Posterior a esto y de forma esperada se ve disminución de peso en la mayoría de los grupos por acción de una fase ya avanzada de TB, excepto en el grupo diabético vacunado con BCG $\Delta$ BCG1419c el cual mantiene un peso constante con ligeras variaciones además de observar diferencias significativas a partir del quinto mes post infección hasta la última medición en comparación con el grupo diabético vacunado con BCG Pasteur (**Figura 7**).

Para explicar esto hay que tener presente que la respuesta del huésped frente a una enfermedad como la TB lleva a una serie de alteraciones, desequilibrios y desbalances no solo de tipo inmunológico, sino también metabólicos, endócrinos y conductuales relacionados a la activación de ejes hipotalámicos, producción de inmunosupresores como los glucocorticoides, secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  con efectos de lipólisis y pérdida de apetito, entre otros, que en conjunto repercuten directamente en la pérdida de peso y evidentemente en la gravedad de la enfermedad (75, 76).

La observación de que los animales inmunizados con BCG $\Delta$ BCG1419c no muestran una disminución tan marcada de pérdida de peso comparado con el grupo con BCG Pasteur, sugiere una probable protección y menor grado de enfermedad. Relacionado directamente a esto, las mediciones de glucosa a los 3 y 4 meses post infección muestran valores bajos con respecto a los iniciales hiperglucémicos y bastante parecidos entre ellos, denotando cambios severos en el metabolismo, además de la notable pérdida de apetito como consecuencia directa de la progresión de la enfermedad, efecto que se observa claramente en los animales diabéticos control cuyos niveles de glucosa se encuentran muy por debajo de los normales (60-90 mg/dL)

(Figura 3). Hecho corroborado con curvas de tolerancia a la glucosa individuales, las cuales evidencian un desbalance en el metabolismo de la glucosa al mostrar curvas prolongadas y valores con dificultad para regresar a niveles basales reflejado en áreas bajo la curva parecidas (Figura 5 y 6).

Otro aspecto relevante a estudiar fue la determinación de UFCs en la infección en los pulmones a los 3 y 6 meses post infección. De forma esperada el grupo con mayor repercusión y carga bacilar a los 3 meses post infección fue el control (SSDM) seguido del vacunado con el candidato (1419DM) y finalmente BCG Pasteur (PSTDM) entre los diabéticos (Figura 8).

Observando únicamente a los ratones con dieta de mantenimiento, el grupo control (SS) tiene menor conteo de UFCs comparado con todos los demás grupos. El análisis fue repetido en dos ocasiones y el grupo exhibe poca o nula pérdida de peso, alto porcentaje de sobrevivencia (80%), niveles de glucosa dentro de los rangos normales para la cepa y valores de carga bacilar por debajo de los observados en otras publicaciones (66). Esto posiblemente explicado por algún problema en la homogenización o preparación del inóculo al momento de la infección de este grupo en particular, dato que deberá ser tomado en cuenta en futuras repeticiones. Además de rectificar métodos y controles previo a la preparación del inóculo para garantizar el control de la infección reduciendo al mínimo el error.

Si bien no se observan diferencias significativas entre la vacuna experimental y la vacuna BCG Pasteur a los 3 meses post infección, es posible observar que el grupo vacunado con BCG $\Delta$ BCG1419c (1419) presenta aparente menor número de UFCs en comparación con el grupo inmunizado con BCG Pasteur (PST). Además de que dentro de los diabéticos, ambas vacunas (PSTDM Y 1419DM) parecen tener menor carga bacilar comparado con el control (SSDM) (Figuras 8 y 9).

De forma contrastante los resultados obtenidos a los 6 meses post infección revelan una disminución significativa de UFCs H37Rv de *M. tuberculosis* del grupo diabético y

vacunado con BCG $\Delta$ BCG1419c (1419DM), dato que no se observa a los 3 meses post infección además de que este valor es muy bajo comparado con los otros grupos (**Figuras 10, 11 y 12**).

Este efecto se ha observado con anterioridad en experimentos de reactivación e infección crónica usando la misma vacuna experimental de este modelo, resaltando su efecto protector especialmente a los 6 meses post infección. Este efecto ha sido vinculado a diferentes factores que tienen que ver directamente con la mutación en el gen *BCG1419c*, involucrado en el control de la transición de crecimiento plantónico a biopelícula.

Se sabe que debido a este tipo de crecimiento y por su composición, la mutación está vinculada a la expresión de moléculas inmunogénicas producidas únicamente en este tipo de crecimiento, así como a permanecer mas tiempo en pulmón y bazo teniendo mayor oportunidad de expresar antígenos específicos relevantes en diferentes etapas de la infección que no son inducidos por BCG (68). Además de esto, dicha mutación se encuentra relacionada con el segundo mensajero c-di-GMP, molécula vinculada a la formación de biopelícula, señalización celular, virulencia y cuya variación desempeña un papel importante en la modificación de la respuesta por su relación al estimulador de genes de interferón (STING) que se ha demostrado tener un papel importante en la señalización del sistema inmune innato (77, 78). De acuerdo a los resultados obtenidos, la vacunación con BCG $\Delta$ BCG1419c en ratones con *DM2* podría contribuir al control de carga bacilar especialmente en una etapa progresiva de la TB.

De acuerdo al análisis histológico en concordancia con los datos anteriores, el grupo diabético inmunizado con solución salina (SSDM) presenta mayor daño histológico reflejado en alto porcentaje de neumonía y grandes áreas de daño en el tejido pulmonar en ambos tiempos observados (**Figura 14 e imagen 2**). Además de esto, aunque a los 6 meses post infección parece que los ratones inmunizados con BCG Pasteur (PSTDM) tienen valores mas altos entre los diabéticos, los datos de este estudio no muestran diferencias en el porcentaje de neumonía entre éste y los demás grupos. Asimismo, al analizar únicamente al grupo diabético vacunado con BCG $\Delta$ BCG1419c (1419DM), los

datos revelan menor daño histológico al comparar ambos tiempos de eutanasia (**Figura 15**). Esto provee información relevante para futuros estudios que podría apoyar a los antecedentes sobre la eficacia de la vacunación con BCG $\Delta$ BCG1419c.

## CONCLUSIONES

Se estableció un modelo de vacunación en ratones diabéticos para la evaluación del candidato vacunal BCG $\Delta$ BCG1419c con un fenotipo hiperproductor de biopelícula, en el contexto de TB-DM2.

En ratones diabéticos se observó menor porcentaje de sobrevida, mayor carga bacilar y daño histológico, así como desbalance en el metabolismo de la glucosa reflejado en valores disminuidos de glucosa en sangre y disminución de peso en una etapa progresiva de TB.

Los animales diabéticos inmunizados con la cepa BCG $\Delta$ BCG1419c registraron menor pérdida de peso y significativamente menor recuento de carga bacilar especialmente a los 6 meses post infección comparado con la cepa parental BCG Pasteur. Además de diferencias en el daño pulmonar entre los 3 y 6 meses posterior a la infección con H37Rv ATCC de *M. tuberculosis*. Datos relacionados directamente a menor grado de enfermedad, es decir, alteraciones no tan marcadas no solo de tipo inmunológico, si no también metabólico y endócrino, que sugieren protección especialmente en la fase crónica de la TB comparado con la cepa parental BCG Pasteur.

La vacunación con BCG $\Delta$ BCG1419c en un modelo murino de TB-DM2, muestra resultados positivos especialmente en la fase crónica de la infección (6 meses), de forma parecida a otros modelos de infección crónica y reactivación. Los resultados sugieren que podría ser una alternativa eficaz, capaz de conferir protección en presencia de DM2 y TB pulmonar experimental cepa H37Rv ATCC.

Estos datos podrían ayudar a definir la base para estudios adicionales centrados en la evaluación de medidas profilácticas como la vacunación con BCG $\Delta$ BCG1419c en el contexto de TB-DM2 en este y otros modelos murinos. Sin embargo, también es necesario incluir estudios enfocados en la respuesta inmune para poder corroborar y complementar las observaciones realizadas en este trabajo, con el fin de seguir estudiando a la cepa BCG $\Delta$ BCG1419c en presencia de enfermedades metabólicas.



## VIII. Referencias

1. Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, et al. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm infecc Microbiol Clin*. 2009;27(9): 496- 502.
2. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013;4(1):3-66. doi:10.4161/viru.22329
3. Global tuberculosis report. World Health Organization. [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). Published 2019. Accessed August 28, 2020.
4. Ketata W, Rekik WK, Ayadi H, Kammoun S. Les tuberculoses extrapulmonaires [Extrapulmonary tuberculosis]. *Rev Pneumol Clin*. 2015;71(2-3):83-92. doi:10.1016/j.pneumo.2014.04.001
5. Garocica P, Jimenez-Martinez M, et al. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2005; 8(2): 142-153.
6. Marrakchi H, Lanéelle MA, Daffé M. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem Biol*. 2014;21(1):67-85. doi:10.1016/j.chembiol.2013.11.011
7. Borrero R, Álvarez N, Reyes F. *Mycobacterium tuberculosis*: factores de virulencia. Finlay ediciones. 2011;20 (1): 34-38
8. Tuberculosis. Departamento de Microbiología y Parasitología UNAM. [http://microypara.facmed.unam.mx/?page\\_id=2867](http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=2867). Published 2020. Accessed August 28, 2020.
9. Flores-Ibarra AA, Ochoa-Vázquez MD, Sánchez-Tec GA. Estrategias diagnósticas aplicadas en la Clínica de Tuberculosis del Hospital General Centro Médico Nacional la Raza [Diagnostic strategies in the Tuberculosis Clinic of the Hospital General La Raza National Medical Center]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2016;54(1):122-127.

10. Maulén NP. Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* [Virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*]. *Rev Med Chil*. 2011;139(12):1605-1610.
11. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence [published correction appears in *Nature* 1998 Nov 12;396(6707):190]. *Nature*. 1998;393(6685):537-544. doi:10.1038/31159
12. Hernández-Pando R, D Mata. FACTORES INMUNOLÓGICOS QUE PARTICIPAN EN LA PROGRESIÓN DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR. *Mensaje Bioquímico UNAM*. 2011; XXXV: 1-16.
13. Yamagami H, Matsumoto T, Fujiwara N, et al. Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect Immun*. 2001;69(2):810-815. doi:10.1128/IAI.69.2.810-815.2001
14. Jagielski T, Minias A, van Ingen J, et al. Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other *Mycobacteria*. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(2):239-290. doi:10.1128/CMR.00055-15
15. Estandares para la atención de la tuberculosis en México. Cndh.org.mx. <http://www.cndh.org.mx/sites/all/doc/Programas/VIH/OtrasPublicacionesdeinteresrelacionadosconelVIH/CENSIDA/Estandares%20para%20la%20atencion%20en%20TB.pdf>. Published 2020. Accessed August 28, 2020.
16. Tortora G, Anagnostakos N. Principios de anatomía y fisiología. México versión en español: Harla; 1993.
17. Sulis G, Roggi A, Matteelli A, Raviglione MC. Tuberculosis: epidemiology and control. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6(1):e2014070. Published 2014 Nov 1. doi:10.4084/MJHID.2014.070
18. Skeiky YA, Sadoff JC. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(6):469-476. doi:10.1038/nrmicro1419
19. Yang H, Kruh-Garcia NA, Dobos KM. Purified protein derivatives of tuberculin--past, present, and future. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;66(3):273-280. doi:10.1111/j.1574-695X.2012.01002.x

20. Juárez E, Sarabia M, Escobedo D, Sada E, Torres M. Reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis* por TLR2 y TLR9 en macrófagos alveolares y monocitos humanos. *Neumol Cir Torax*. 2010;69(2):84-90.
21. Herrera M, Torres M, Juárez E, Sada E. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2005;18(4):327-336
22. Pai M, Behr MA, Dowdy D, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16076. Published 2016 Oct 27. doi:10.1038/nrdp.2016.76
23. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(5):352-366. Published 2012 Apr 20. doi:10.1038/nri3211
24. Mancilla E M, Martínez H A, Palavecino B C, et al. Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la X Región de Chile [Genetic variants of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients of the Xth Region of Chile]. *Rev Chilena Infectol*. 2006;23(3):220-225. doi:10.4067/s0716-10182006000300004
25. Marquina-Castillo B, García-García L, Ponce-de-León A, et al. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology*. 2009;128(1):123-133. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03004.x
26. Bifani P, Moghazeh S, Shopsin B, Driscoll J, Ravikovitch A, Kreiswirth BN. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants: distinguishing the mycobacterial laboratory strain. *J Clin Microbiol*. 2000;38(9):3200-3204. doi:10.1128/JCM.38.9.3200-3204.2000
27. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*. 2006;2(3): 252-256.
28. Sia JK, Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. *Microbiol Spectr*. 2019;7(4):10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018
29. Programa de Acción Diabetes Mellitus. Secretaría de Salud. [http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/diabetes\\_mellitus.pdf](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/diabetes_mellitus.pdf). Published 2016. Accessed August 28, 2020.

30. Cervantes-Villagrana R, Presno-Bernal J. Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células  $\beta$  pancreáticas. *Revista de endocrinología y nutrición*. 2013; 21(3): 98-106.
31. Guzmán-Flores JM, López-Briones S. Células de la inmunidad innata y adaptativa en la diabetes mellitus tipo 2 y obesidad [Cells of innate and adaptive immunity in type 2 diabetes and obesity]. *Gac Med Mex*. 2012;148(4):381-389.
32. Sanchez-Muñoz F, García-Macedo R, Alarcón- Aguilar F, Cruz M. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con las células del sistema inmune. *Gac Med Mex*. 2005;141(6): 505-512.
33. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):98-107. doi:10.1038/nri2925
34. Informe mundial sobre la diabetes. Organización Mundial de la Salud. [Apps.who.int](https://apps.who.int).  
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254649/9789243565255-spa.pdf?sequence=1>. Published 2016. Accessed August 28, 2020.
35. Plan de acción para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles en las Américas 2013-2019. Paho.org.  
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/plan-accion-prevencion-control-ent-americas.pdf>. Published 2014. Accessed August 28, 2020.
36. Programa de Acción Específico. Prevención y Control de la Diabetes Mellitus 2013-2018. Programa Sectorial de Salud.  
[http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE\\_PrevencionControlDiabetesMellitus2013\\_2018.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PrevencionControlDiabetesMellitus2013_2018.pdf). Published 2012. Accessed August 28, 2020.
37. Laboratory Rodent Diet. Di.facmed.unam.mx.  
<http://di.facmed.unam.mx/images/files/Composici%C3%B3n%20del%20alimento%20Laboratory%20Rodent%20Diet%205001.pdf>. Published 2020. Accessed October 20, 2020.
38. De la Garza-Rodea AS, Knaän-Shanzer S, den Hartigh JD, Verhaegen AP, van Bakkum DW. Anomer-equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010;49(1):40-44.

39. Kumar Nathella P, Babu S. Influence of diabetes mellitus on immunity to human tuberculosis. *Immunology*. 2017;152(1):13-24. doi:10.1111/imm.12762
40. Lönnroth K, Roglic G, Harries AD. Improving tuberculosis prevention and care through addressing the global diabetes epidemic: from evidence to policy and practice. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(9):730-739. doi:10.1016/S2213-8587(14)70109-3
41. Riza AL, Pearson F, Ugarte-Gil C, et al. Clinical management of concurrent diabetes and tuberculosis and the implications for patient services. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(9):740-753. doi:10.1016/S2213-8587(14)70110-X
42. CDC's Vaccine Information for Adults with Diabetes. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/vaccines/adults/rec-vac/health-conditions/diabetes.html>. Published 2016. Accessed August 28, 2020.
43. Klekotka RB, Mizgała E, Król W. The etiology of lower respiratory tract infections in people with diabetes. *Pneumonol Alergol Pol*. 2015;83(5):401-408. doi:10.5603/PiAP.2015.0065
44. Kumar NP, Moideen K, Dhakshinraj SD, et al. Profiling leucocyte subsets in tuberculosis-diabetes co-morbidity. *Immunology*. 2015;146(2):243-250. doi:10.1111/imm.12496
45. Martinez N, Kornfeld H. Diabetes and immunity to tuberculosis. *Eur J Immunol*. 2014;44(3):617-626. doi:10.1002/eji.201344301
46. Liu HF, Zhang HJ, Hu QX, et al. Altered polarization, morphology, and impaired innate immunity germane to resident peritoneal macrophages in mice with long-term type 2 diabetes. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:867023. doi:10.1155/2012/867023
47. Chylikova J, Dvorackova J, Tauber Z, Kamarad V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2018;162(2):79-82. doi:10.5507/bp.2018.015
48. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. *Kuby of immunology*. EUA: Mc Graw Hill; 2007.
49. Ayelign B, Negash M, Genetu M, Wondmagegn T, Shibabaw T. Immunological Impacts of Diabetes on the Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. *J*

*Immunol Res.* 2019;2019:6196532. Published 2019 Sep 9.  
doi:10.1155/2019/6196532

50. Restrepo BI, Schlesinger LS. Host-pathogen interactions in tuberculosis patients with type 2 diabetes mellitus. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013;93 Suppl(0):S10-S14. doi:10.1016/S1472-9792(13)70004-0
51. Kumar NP, Sridhar R, Banurekha VV, et al. Type 2 diabetes mellitus coincident with pulmonary tuberculosis is associated with heightened systemic type 1, type 17, and other proinflammatory cytokines. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10(5):441-449. doi:10.1513/AnnalsATS.201305-112OC
52. Kumar NP, Sridhar R, Banurekha VV, Jawahar MS, Nutman TB, Babu S. Expansion of pathogen-specific T-helper 1 and T-helper 17 cells in pulmonary tuberculosis with coincident type 2 diabetes mellitus. *J Infect Dis*. 2013;208(5):739-748. doi:10.1093/infdis/jit241
53. Stew SS, Martinez PJ, Schlesinger LS, Restrepo BI. Differential expression of monocyte surface markers among TB patients with diabetes co-morbidity. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013;93 Suppl(0):S78-S82. doi:10.1016/S1472-9792(13)70015-5
54. Kumar NP, Sridhar R, Nair D, Banurekha VV, Nutman TB, Babu S. Type 2 diabetes mellitus is associated with altered CD8(+) T and natural killer cell function in pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 2015;144(4):677-686. doi:10.1111/imm.12421
55. Kumar NP, Moideen K, Viswanathan V, Kornfeld H, Babu S. Effect of standard tuberculosis treatment on naive, memory and regulatory T-cell homeostasis in tuberculosis-diabetes co-morbidity. *Immunology*. 2016;149(1):87-97. doi:10.1111/imm.12632
56. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. España: Elsevier; 2012.
57. Moliva JI, Turner J, Torrelles JB. Prospects in *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette et Guérin (BCG) vaccine diversity and delivery: why does BCG fail to protect against tuberculosis?. *Vaccine*. 2015;33(39):5035-5041. doi:10.1016/j.vaccine.2015.08.033

58. Abdallah AM, Behr MA. Evolution and Strain Variation in BCG. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1019:155-169. doi:10.1007/978-3-319-64371-7\_8
59. Brewer TF. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guérin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis.* 2000;31 Suppl 3:S64-S67. doi:10.1086/314072
60. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol.* 2002;46(3):709-717. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03237.x
61. Kaufmann SH, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int J Infect Dis.* 2017;56:263-267. doi:10.1016/j.ijid.2016.10.018
62. Aagaard C, Hoang T, Dietrich J, et al. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat Med.* 2011;17(2):189-194. doi:10.1038/nm.2285
63. Leung-Theung-Long S, Gouanvic M, Coupet CA, et al. A Novel MVA-Based Multiphasic Vaccine for Prevention or Treatment of Tuberculosis Induces Broad and Multifunctional Cell-Mediated Immunity in Mice and Primates. *PLoS One.* 2015;10(11):e0143552. Published 2015 Nov 24. doi:10.1371/journal.pone.0143552
64. Flores-Valdez MA, Aceves-Sánchez Mde J, Pedroza-Roldán C, et al. The Cyclic Di-GMP Phosphodiesterase Gene Rv1357c/BCG1419c Affects BCG Pellicle Production and In Vivo Maintenance. *IUBMB Life.* 2015;67(2):129-138. doi:10.1002/iub.1353
65. Flores-Valdez MA, Pedroza-Roldán C, Aceves-Sánchez MJ, et al. The BCG $\Delta$ BCG1419c Vaccine Candidate Reduces Lung Pathology, IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-10 During Chronic TB Infection. *Front Microbiol.* 2018;9:1281. Published 2018 Jun 12. doi:10.3389/fmicb.2018.01281
66. Pedroza-Roldán C, Guapillo C, Barrios-Payán J, et al. The BCG $\Delta$ BCG1419c strain, which produces more pellicle in vitro, improves control of chronic tuberculosis in vivo. *Vaccine.* 2016;34(40):4763-4770. doi:10.1016/j.vaccine.2016.08.035

67. Segura-Cerda CA, Aceves-Sánchez MJ, Marquina-Castillo B, et al. Immune response elicited by two rBCG strains devoid of genes involved in c-di-GMP metabolism affect protection versus challenge with *M. tuberculosis* strains of different virulence. *Vaccine*. 2018;36(16):2069-2078. doi:10.1016/j.vaccine.2018.03.014
68. Flores-Valdez MA. Vaccines Directed Against Microorganisms or Their Products Present During Biofilm Lifestyle: Can We Make a Translation as a Broad Biological Model to Tuberculosis?. *Front Microbiol*. 2016;7:14. Published 2016 Jan 21. doi:10.3389/fmicb.2016.00014
69. Kerns PW, Ackhart DF, Basaraba RJ, Leid JG, Shirliff ME. Mycobacterium tuberculosis pellicles express unique proteins recognized by the host humoral response. *Pathog Dis*. 2014;70(3):347-358. doi:10.1111/2049-632X.12142
70. Wright CC, Hsu FF, Arnett E, et al. The Mycobacterium tuberculosis MmpL11 Cell Wall Lipid Transporter Is Important for Biofilm Formation, Intracellular Growth, and Nonreplicating Persistence. *Infect Immun*. 2017;85(8):e00131-17. Published 2017 Jul 19. doi:10.1128/IAI.00131-17
71. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim*. 2011;45(3):131-140. doi:10.1258/la.2010.010090
72. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado y Uso De Los Animales De Laboratorio.
73. Wu CZ, Ou SH, Chang LC, Lin YF, Pei D, Chen JS. Deficiency of Urokinase Plasminogen Activator May Impair  $\beta$  Cells Regeneration and Insulin Secretion in Type 2 Diabetes Mellitus. *Molecules*. 2019;24(23):4208. Published 2019 Nov 20. doi:10.3390/molecules24234208
74. Hayashi K, Kojima R, Ito M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(6):1110-1119. doi:10.1248/bpb.29.1110
75. Tortora G, Anagnostakos N. Principles of anatomy and physiology. EUA: Harper & Row Publishers, Inc; 1981.
76. Carlson N. Fisiología de la conducta. España: Pearson; 2006.



77. Shaw N, Ouyang S, Liu ZJ. Binding of bacterial secondary messenger molecule c-di-GMP is a STING operation. *Protein Cell*. 2013;4(2):117-129. doi:10.1007/s13238-012-2071-0
78. Tamayo R, Pratt JT, Camilli A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61:131-148. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093426
79. Al-Rifai RH, Pearson F, Critchley JA, Abu-Raddad LJ. Association between diabetes mellitus and active tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(11):e0187967. Published 2017 Nov 21. doi:10.1371/journal.pone.0187967
80. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35 Suppl 1(Suppl 1):S64-S71. doi:10.2337/dc12-s064
81. Alim MA, Kupz A, Sikder S, Rush C, Govan B, Ketheesan N. Increased susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection in a diet-induced murine model of type 2 diabetes. *Microbes Infect*. 2020;22(8):303-311. doi:10.1016/j.micinf.2020.03.004