



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la vacunación sobre la virulencia de diversos genotipos de
Mycobacterium tuberculosis

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

ZYANYA LUCIA ZATARAIN BARRON

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Bertha González Pedrajo

Instituto de Fisiología Celular

UNAM

Dr. Enrique Ortega Soto

Instituto de Investigaciones Biomédicas

UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2022



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.

“It may be expected that the elucidation of the aetiology of tuberculosis will provide new viewpoints for the study of other infectious diseases”

- Robert Koch, 1882

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Patología Experimental del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la dirección del Dr. Rogelio Hernández Pando.

El Comité Tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por la Dra. Bertha González Pedrajo, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y el Dr. Enrique Ortega Soto, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Este proyecto fue apoyado por el National Institute of Public Health and the Environment, The Netherlands, con el número de convenio 037919, firmado entre la Comisión de la Comunidad Europea y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán como parte del proyecto “Effect of genetic variation in *Mycobacterium tuberculosis* on vaccine escape and the acquisition of drug resistance”.

La autora recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus estudios de Doctorado en el Programa de maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con el número de becario 261730.

DEDICATORIAS

A todas las niñas que sueñan con ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente al Dr. Rogelio Hernández Pando, quien siempre tiene para mí una nueva idea que explorar, un antecedente interesante para discutir y una palabra de aliento para seguir adelante. Gracias por estos años de apoyo, de formación y de amistad.

Gracias a mi comité tutor, la Dra. Bertha González Pedrajo y el Dr. Enrique Ortega Soto, quienes con sus conocimientos han guiado a lo largo de estos años el desarrollo de este proyecto.

Agradezco por último a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y a todas las personas detrás del programa de la Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Su apoyo en este proceso ha sido invaluable.

Contenido

PRESENTACIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
I. TUBERCULOSIS	3
1.1 Generalidades de la tuberculosis	3
1.2 Epidemiología	3
1.3 Distribución global de los casos de tuberculosis.....	6
1.4 Agente causal: Mycobacterium tuberculosis “MTB”	7
1.5 Patogénesis	8
1.6 Respuesta inmune a la tuberculosis	15
II. VACUNACIÓN CON BCG.....	20
2.1 Historia de la BCG	20
2.2 Subcepas de la BCG	22
2.3 Eficacia de la BCG.....	23
2.4 Recomendaciones del uso actual de la BCG	24
III. LINAJES DE MTB.....	24
3.1 Orígenes del cMTB.....	25
3.2 Clasificación en familias.....	26
3.3 Genotipo Beijing.....	27
IV. VACUNACIÓN Y VIRULENCIA	31
4.1 Impacto de las vacunas imperfectas en la virulencia del patógeno	32
4.2 Efectos de la cobertura poblacional de vacunación.....	32
4.3 La vacunación con BCG y Mycobacterium tuberculosis	36
ANTECEDENTES EXPERIMENTALES.....	37
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
JUSTIFICACIÓN.....	41
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	42
HIPÓTESIS	43
OBJETIVO GENERAL	44
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	46
Diagrama de Flujo.....	46
Esquema ilustrado.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
Modelo experimental	48

Selección de cepas de MTB y crecimiento en medio de cultivo.....	49
Extracción de DNA a partir de bacterias provenientes de cultivo líquido	50
Recuperación de pulmones provenientes de ratones infectados con las cepas 46, 46P, 48 y 48V al día 21 postinfección.....	51
Extracción diferencial de RNA huésped/hospedero.....	54
Elaboración de librerías de DNA y secuenciación	56
Tratamiento de RNA total para la preparación de librerías	58
Elaboración de librerías de RNA y secuenciación	60
Enriquecimiento de transcritos de MTB mediante sondas de captura y secuenciación	62
Genómica comparativa	65
Transcriptómica comparativa	65
Análisis estadístico.....	66
RESULTADOS	67
Perfil genómico	67
Perfil transcriptómico del hospedero	72
Análisis histopatológico	79
Perfil transcriptómico del huésped.....	83
DISCUSIÓN.....	91
RESUMEN DE RESULTADOS.....	102
CONCLUSIÓN.....	103
PERSPECTIVAS	104
REFERENCIAS	105
APÉNDICE	121

Índice de Figuras

Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis 2019. Fuente: Global Tuberculosis Report 2020 [1].

Figura 2. Proyección del impacto de la implementación de diversas estrategias en las tasas de incidencia anual de tuberculosis, destacando las necesidades para alcanzar las metas de la END-TB partnership. Fuente: Organización Mundial de la Salud [2].

Figura 3. Situación epidemiológica de tuberculosis en México. Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica [3].

Figura 4. (A) Tinción Ziehl-Neelsen de lisado de tejido pulmonar proveniente de ratones infectados con MTB y sacrificados al día 21 postinfección. (B) Colonias de MTB en crecimiento en agar 7H10. Imágenes de muestras preparadas y tomadas por la autora.

Figura 5. Fisiopatología de la tuberculosis pulmonar. Adaptado de [4-6].

Figura 6. El continuo dinámico de la tuberculosis a partir de la infección con MTB [6].

Figura 7. La virulencia de MTB puede medirse considerando la mortalidad de los hospederos infectados, la carga bacilar pulmonar y la morbilidad en términos del daño histopatológico generado por el proceso infeccioso.

Figura 8. Arquitectura de un granuloma pulmonar durante la infección por MTB. Fuente [7].

Figura 9. Esquema representativo de la hipótesis “salido de África”, surgida a partir de análisis filogenéticos del MTB. Cada línea de un color distinto representa los diversos linajes que componen el complejo. Fuente [8].

Figura 10. Aparición de patógenos resistentes a la vacunación.

Figura 11. (A) Sobrevida de animales vírgenes infectados con las cepas 46, 46P, 46V y 46S (N=200). (B) Sobrevida de animales vírgenes infectados con las cepas 48, 48P, 48V y 48S (N=200). (C) Carga bacilar en UFCs al día 21 post-infección en animales infectados con las cepas 46, 46P, 46V y 46S (N=4 ratones por grupo experimental). (D) Carga bacilar en UFCs al día 21 post-infección en animales infectados con las cepas 48, 48P, 48V y 48S46S (N=4 ratones por grupo experimental).

Figura 12. Imagen representativa de necrosis pulmonar en animales infectados con la cepa 46P al día 28 postinfección. La imagen muestra la pérdida completa de arquitectura pulmonar en áreas extensas, con la presencia de debris celular, núcleos picnóticos y fragmentados, así como material acidófilo ocupando el espacio extracelular. (B) Tinción de Ziehl-Neelsen mostrando las áreas necróticas con la presencia de abundantes bacterias ácido-alcohol resistentes dentro del tejido necrótico (*) y el espacio intersticial (flecha).

Figura 13. Diagrama de flujo que muestra el diseño experimental.

Figura 14. Diseño experimental esquemático.

Figura 15. Librería creada mediante la técnica PCR-free.

Figura 16. Electroferogramas obtenidos a partir del Bioanalyzer para la valoración del número de integridad ribosomal "RIN" en muestras de RNA total obtenidas a partir de pulmones de ratones infectados.

Figura 17. Librería de RNA del hospedero para la caracterización del transcriptoma pulmonar.

Figura 18. Procesos biológicos afectados detectados con base en la sobre expresión genética en animales infectados mediante la cepa 46 vs. 46P al día 21 postinfección. Análisis de enriquecimiento por Gene Ontology y KEGG, ambos evaluados a través de WebGestalt.

Figura 19. Procesos biológicos afectados detectados con base en la sobre expresión genética en animales infectados mediante la cepa 48 vs. 48v al día 21 postinfección. Análisis de enriquecimiento por Gene Ontology y KEGG, ambos evaluados a través de WebGestalt.

Figura 20. Imágenes representativas de daño histopatológico observado en los animales infectados con las cepas 46 y 46P durante la cinética de infección (N=3 sujetos experimentales por día de la cinética).

Figura 21. Histomorfometría de pulmones recuperados de animales infectados con la cepa 46 vs. 46P (N=3 sujetos experimentales por día de la cinética). Comparación realizada mediante ANOVA de dos colas.

Figura 22. Imágenes representativas de daño histopatológico observado en los animales infectados con las cepas 48 y 48V durante la cinética de infección. Los animales infectados con la cepa 48V murieron de forma espontánea previo al día 28 de la cinética, por lo cual no hay imagen representativa de este grupo

experimental para este día específico (N=3 sujetos experimentales por día de la cinética).

Figura 23. Histomorfometría de pulmones recuperados de animales infectados con la cepa 48 vs. 48V. (N=3 sujetos experimentales por día de la cinética). Comparación realizada mediante ANOVA de dos colas.

Figura 24. Muestra representativa de la evaluación de calidad del RNA extraído a partir de pulmones infectados con las cepas 46, 48, 46P y 48V antes (A) y después (B) de la estandarización de la metodología de extracción diferencial.

Figura 25. Muestra representativa del RNA total antes (A), y después (B) de la remoción del RNAr usando el kit RiboZero Epidemiology.

Figura 26. Perfil del material genético posterior al proceso de enriquecimiento por centrifugación y depleción de ribosomales y preparación de la librería de RNA.

Índice de Tablas

Tabla 1. Factores de virulencia del complejo *Mycobacterium tuberculosis* “MTB”.

Tabla 2. SNPs informativos para tipificar bacterias del complejo MTB, genotipo Beijing.

Tabla 3. Cepas de MTB seleccionadas para experimentación.

Tabla 4. Características de los distintos modelos experimentales de tuberculosis.

Tabla 5. Cepas de MTB seleccionadas para experimentos de genómica y transcriptómica.

Tabla 6. Cuantificación de muestras de DNA genómico para preparación de librerías mediante la técnica PCR-free.

Tabla 7. Ensamblajes del genoma de las cepas secuenciadas.

Tabla 8. Variantes identificadas en los genomas de las cepas 46 y 46P.

Tabla 9. Variantes identificadas en los genomas de las cepas 48 y 48V.

Tabla 10. Muestras del RNA total de hospedero utilizadas para la creación de librerías y RNA-seq.

Tabla 11. Lecturas obtenidas a partir de la secuenciación de las librerías de RNA obtenidas mediante la técnica de extracción diferencial, captura con sondas biotiniladas y limpieza de lecturas crudas.

Tabla 12. Proporción del RNA correspondiente al hospedero (ratón), a secuencias de ribosomales (RNAr) y correspondiente a lecturas de MTB.

Tabla 13. Diez genes con mayor cantidad de lecturas en las muestras de RNA de la cepa 46 durante la infección *in vivo* de ratones al día 21 postinfección.

Tabla 14. Diez genes con mayor cantidad de lecturas en las muestras de RNA de la cepa 46P durante la infección *in vivo* de ratones al día 21 postinfección.

Tabla 15. Diez genes con mayor cantidad de lecturas en las muestras de RNA de la cepa 48 durante la infección *in vivo* de ratones al día 21 postinfección.

Tabla 16. Diez genes con mayor cantidad de lecturas en las muestras de RNA de la cepa 48V durante la infección *in vivo* de ratones al día 21 postinfección.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATL: Mezcla de adenilación (A-Tailing mix)

BCG: Bacilo Calmette-Guérin

DCs: Células dendríticas (por sus siglas en inglés)

CLRs: Receptores de Leptina tipo C

cMTB: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

CLRs: Receptores de lectina tipo C

CPH: Complejo principal de histocompatibilidad

CTA: Control de adenilación de extremos (A-Tailing Control)

CTE: Control de reparación de extremos (End-repair control)

CTL: Control de ligación (Ligation control)

DC-SIGN: Molécula específica de células dendríticas [Dendritic Cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin]

DR: Región genómica de "Direct Repeat"

EDG: Expresión diferencial de genes

ERP: Mezcla de reparación de extremos (End-repair Mix)

GO: Ontología de genes (Gene ontology)

IFN- γ : Interferón gamma

LIG: Mezcla de ligación

MDR: Multidrogorresistentes

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

cMTB: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

NK: Células “natural killer” [asesinas naturales]

NLRs: Receptores tipo Nod

NOM: Norma Oficial Mexicana

NTF: Región cromosómica *Noise Transfer Funcion*

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONU: Organización de las Naciones Unidas

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PDIMs: Dimicoserosato tioceroI

PDP: Placa para secuenciar conjuntos de muestras (Pooled diluted cluster template plate)

PGLs: Glucolípidos fenólicos

PIMs: Manósidos de fosfatidilinositol hexamansilado

PNH: Primates no humanos

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones

RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

RPM: Revoluciones por minuto

RSB: Mezcla de re-suspensión (Resuspension buffer)

SNPs: Polimorfismos de nucleótido sencillo

SSE: Solución salina estéril

STL: Mezcla para parar la ligación (Stop ligation buffer)

TLRs: Receptores tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UFCs: Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

El control de la tuberculosis a nivel global continúa representando un gran reto a nivel biomédico, a pesar de la aplicación de la vacuna profiláctica Bacilo Calmette-Guérin (BCG) durante más de un siglo. Diversos autores han sugerido que la presencia de una población con una alta proporción de hospederos vacunados podría haber afectado la estructura poblacional de *Mycobacterium tuberculosis*, y a su vez, esto podría verse reflejado en un incremento en la prevalencia de cepas bacterianas con mayor capacidad para evadir la respuesta inmune inducida por la BCG, como es el caso del genotipo Beijing. El efecto de la vacunación sobre la prevalencia de variantes de patógenos que escapan a hospederos inmunizados ha sido bien documentado para diversos patógenos, sin embargo, esta interacción no ha sido descrita para el caso de la vacuna Bacilo Calmette-Guérin y *Mycobacterium tuberculosis*.

En este estudio, tomamos como base un estudio previo realizado en un modelo murino bien caracterizado de tuberculosis pulmonar progresiva. En este antecedente, se evaluó si la exposición de hospederos vacunados frente a la infección por MTB muestra un efecto sobre la virulencia de 3 cepas diferentes de *Mycobacterium tuberculosis*. Brevemente, se vacunaron con 2 subcepas de BCG (BCG Phipps y BCG Vietnam) a grupos experimentales constituidos por 5 ratones cada una pertenecientes a la cepa BALB/c, y un grupo control basado en el vehículo de solución salina estéril. Dos meses posteriores a la vacunación, los animales fueron infectados con una de las tres cepas que fueron seleccionadas con base en su linaje, incluyendo dos cepas de la familia Beijing (cepa 46 y cepa 48) y una cepa tipo de laboratorio de la familia Euroamericana (cepa 1, H37Rv). Dos meses posteriores a la infección, los animales fueron sacrificados, recuperando la población bacteriana a nivel pulmonar. Las cepas parentales y las cepas provenientes de ratones vacunados fueron usadas para infectar hospederos vírgenes y comparar el curso de la enfermedad. Dichos experimentos mostraron que los animales infectados con las cepas del genotipo Beijing provenientes de ratones vacunados tuvieron una diferencia significativa en mortalidad del hospedero, así como aumento de la carga bacilar y daño histopatológico pulmonar en comparación con los animales infectados con las cepas Beijing parentales.

Con base en estos antecedentes experimentales, este estudio tuvo como objetivo caracterizar el genoma y el transcriptoma de las bacterias antes y después de la exposición a los hospederos vacunados, adicionalmente se evaluó la respuesta inmune local posterior a la infección mediante la secuenciación masiva del transcriptoma pulmonar del huésped-hospedero en los animales infectados.

Los resultados muestran que las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* del genotipo Beijing acumulan variantes en su genoma asociadas a factores de virulencia, subrayando los posibles mecanismos de la presión selectiva ejercida por los hospederos vacunados. En cuanto a los genes expresados por parte de *Mycobacterium tuberculosis* en tejido pulmonar de los hospederos infectados, se observaron 1137, 1510, 1869 y 921 genes expresados de *Mycobacterium tuberculosis* en los pulmones de hospederos infectados con las cepas 46, 46P, 48 y 48V. De forma interesante, los genes con mayor expresión en el caso de las cepas obtenidas a partir de ratones vacunados incluyen tanto factores de virulencia, así como productos que han sido previamente asociados con el fallo de la respuesta inmune del hospedero. No obstante lo anterior, se requiere investigación a futuro para delimitar los efectos específicos de las variantes, así como de los genes expresados y su relación con la virulencia. Sin embargo, los resultados obtenidos a través de ensayos de secuenciación de transcritos provenientes de pulmones de ratones infectados, así como nuestro análisis histopatológico sugieren deficiencias en la capacidad de los hospederos para generar granulomas frente a la infección por las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* 46P y 48V. A su vez, esto podría ser el resultado de la presencia de variantes en regiones del genoma asociadas con el reconocimiento inmunológico de este importante patógeno, tal es el caso de los genes *PPE* y *PGRS*, incluyendo la variante identificada en PPE13, factor que induce la producción de IL-1 en modelos experimentales, así como a una mayor producción de lípidos bioactivos, como el glucolípidos fenólico, el cual ha sido documentado como un factor asociado al fallo en la respuesta inmune asociado al genotipo Beijing.

ABSTRACT

The global control of Tuberculosis remains elusive, and Bacillus Calmette-Guérin -the most widely used vaccine in history—has proven insufficient for reversing this epidemic. Several authors have suggested that the mass presence of vaccinated hosts might have affected the *Mycobacterium tuberculosis* population structure, and this could in turn be reflected in a prevalence of strains with higher ability to circumvent Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity, such as the Beijing genotype. The effect of vaccination on vaccine-escape variants has been well-documented in several pathogens; however, the effect of the interaction between *Mycobacterium tuberculosis* strains and vaccinated hosts has never been previously described. In this study we further explore the effects of Bacillus Calmette-Guérin vaccination on *Mycobacterium tuberculosis* virulence. The study builds on previous data arising from a well-characterized murine model of progressive pulmonary tuberculosis. Briefly, we vaccinated BALB/c mice with two different sub-strains of Bacillus Calmette-Guérin (BCG-Phipps and BCG-Vietnam). Following vaccination, the mice were infected with either one of three selected *Mycobacterium tuberculosis* strains. Strains were selected based on lineage and included two Beijing-family clinical isolates (strains 46 and 48) and a well-characterized laboratory strain (H37Rv). Two months after infection, mice were euthanized, and the bacteria extracted from their lungs. Results from this previous study showed that the interaction within the lungs of the vaccinated hosts results in the selection of higher-virulence bacteria, specifically for the Beijing genotype strains 46 and 48.

In this subsequent study, we characterized the genomic composite of the bacteria before and after exposure to vaccinated hosts and characterized the local response to the bacteria by sequencing the lung transcriptome in animals during the infection. After exposure to the Bacillus Calmette-Guérin-vaccinated mice, strains 46 and 48 acquire genomic variants associated with several virulence factors. As a result, the bacteria collected from these vaccinated hosts have an increased ability for immune evasion, as shown in both the host transcriptome and the histopathology studies, and it also replicates far more efficiently compared with bacteria collected from unvaccinated hosts or the original stock strain. Further, a total of 1137, 1510, 1869 and 921

Mycobacterium tuberculosis genes were identified in the lung transcriptome from mice infected with strains 46, 46P, 48 and 48V at day 21 post infection.

Further research is warranted to ascertain the pathways associated with the genomic variants. However, results obtained at this point using data from the transcriptome and histopathology seem to suggest an impairment for granuloma formation in the animal hosts when infected with the *Mycobacterium tuberculosis* 46P and 48V strains. Further, this could be the result of genetic variants present in genomic regions associated with the immune recognition of this pathogen, including PPE and PGRS-coding sequences, as well as a greater production of bioactive lipids, such as phenolic glycolipid.

PRESENTACIÓN

La tuberculosis actualmente representa un reto considerable a la salud pública global. En su reporte emitido en 2020, la OMS estimó 1.2 millones de muertes (rango 1.1-1.3 millones) causadas por tuberculosis en individuos negativos al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), así como 208,000 muertes adicionales (rango 177,000-242,000) entre personas que viven con VIH. La prevención de la tuberculosis se ha centrado en el uso adecuado de la vacuna BCG, constituida por microorganismos vivos atenuados de *Mycobacterium bovis*, que desde 1921 fue introducida como la primera, y hasta la fecha única, estrategia profiláctica avalada contra esta enfermedad.

Actualmente sabemos que la vacunación con BCG ha sido una estrategia extraordinaria en la prevención de las formas severas de tuberculosis en la infancia (particularmente, tuberculosis meníngea y tuberculosis miliar). Sin embargo, la vacuna presenta limitaciones importantes en términos de la prevención contra la enfermedad pulmonar, con una variabilidad considerable en eficacia, estimada entre el 0-75% en diferentes regiones del mundo. Entre las hipótesis que se han planteado para explicar dicha variabilidad, se ha considerado el hecho de que la protección conferida por la BCG puede diferir de acuerdo con el genotipo de MTB causante de la infección. Esto implicaría que aquellos genotipos contra los cuales la BCG no tenga una tasa de protección elevada podrían seleccionarse en el contexto de una población ampliamente vacunada. Sin embargo, esto no ha sido previamente estudiado en el caso de MTB.

El presente proyecto de doctorado se desarrolló en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El estudio fue realizado en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva, y tuvo como objetivo evaluar el efecto de la vacunación con BCG sobre el perfil fenotípico de virulencia de 3 cepas distintas de MTB, dos cepas del genotipo Beijing (46 y 48) y una cepa del genotipo Euro-Americano (H37Rv- cepa 1), así como el perfil genotípico y transcripcional de las cepas Beijing. Los resultados presentan evidencia de que las bacterias recolectadas a partir de hospederos vacunados tienen un nivel de virulencia mayor en comparación al que presentaban antes de ser expuestas al sistema inmune de ratones vacunados. Como resultado, las bacterias recolectadas de hospederos vacunados tienen

variantes relacionadas con la evasión del sistema inmune, cuyas consecuencias se observan tanto en el transcriptoma y el estudio histopatológico del tejido pulmonar de animales infectados. Adicionalmente, dichas bacterias recolectadas de hospederos vacunados se replican de manera mucho más eficiente en comparación con las cepas parentales. Con esta investigación se presenta evidencia con respecto a la interacción patógeno-hospedero en el contexto de hospederos vacunados, subrayando que existen variantes genómicas y genes con expresión diferencial relacionados a como el patógeno interactúa con el sistema inmune de su hospedero durante el proceso infeccioso.

MARCO TEÓRICO

I. TUBERCULOSIS

1.1 Generalidades de la tuberculosis

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad transmisible causada por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Actualmente, es considerada una de las enfermedades más letales a lo largo de la historia, con más de 1,000,000,000 de muertes estimadas en los últimos 200 años [9]. Existe evidencia de que la tuberculosis es una enfermedad ancestral, con datos alusivos a dicha infección encontrados en muestras de restos humanos de más de 9000 años de antigüedad [10], sin embargo actualmente desconocemos el momento exacto en el cual MTB se convirtió en un patógeno humano [11].

La enfermedad se caracteriza por un proceso crónico de inflamación granulomatosa causado por micobacterias del complejo MTB (cMTB), principalmente MTB y con menos frecuencia otras, incluyendo *Mycobacterium bovis* [12]. Las micobacterias son un tipo distintivo de patógenos en forma de bacilo que comparten la presencia de una pared celular rica en lípidos [13]. El estudio de la tuberculosis y su agente causal ha sido sin duda una de las disciplinas más emblemáticas en áreas como la microbiología y la inmunología, y muchos de los descubrimientos y avances más notables en las ciencias biológicas se han suscitado gracias al estudio de esta enfermedad. Dichos descubrimientos incluyen los postulados del origen microbiológico de las enfermedades descritos por Robert Koch en 1882 [11]. Sin embargo, la tuberculosis sigue representando un gran reto a la salud pública, constituyendo una enfermedad que ha probado difícil de controlarse a la fecha.

1.2 Epidemiología

La tuberculosis continúa siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel global [14]. Diversos esfuerzos se han desplegado para intentar frenar la mortalidad por tuberculosis a lo largo del último siglo, sin embargo, los avances hasta

el momento han sido insuficientes, y la tuberculosis se mantiene como una de las principales 10 causas de muerte en el mundo, así como la principal causa de muerte por un único agente infeccioso [13, 15]. Actualmente, la carga global de la enfermedad por tuberculosis es abrumadora. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que al 2019 se presentaron 10.0 millones de casos (rango 8.9-11.0 millones) incidentes (**Figura 1**), así como 1.2 millones (rango 1.1-1.3 millones) de muertes por tuberculosis, excluyendo a sujetos con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Otras 208,000 (rango 177,000-242,000) muertes se estiman entre sujetos con VIH.

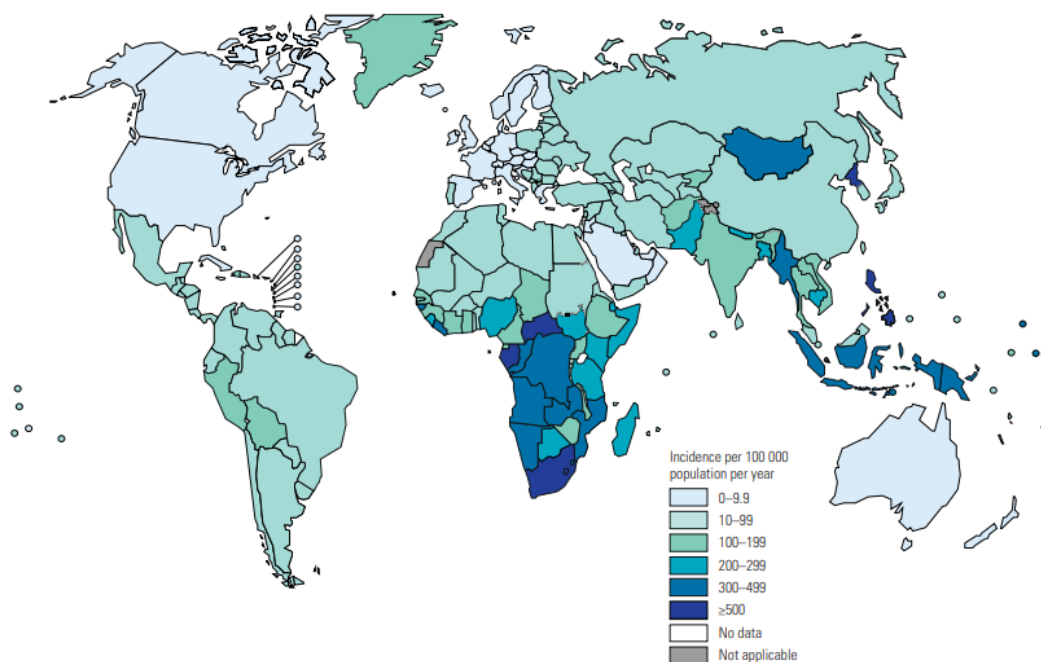


Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis 2019. Fuente: Global Tuberculosis Report 2020 [1].

A pesar de las cifras, es importante destacar que desde el 2014 y 2015 las naciones miembros de la OMS y de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) han destacado su compromiso por frenar la epidemia de tuberculosis, a través de la implementación del programa END-TB, estrategia que propone generar una disminución del 80% en la incidencia de tuberculosis para el año 2030, en comparación con los datos obtenidos en el 2015. Hasta el 2020, se había logrado un avance del decremento del 20% de la incidencia de tuberculosis. En cuestión a mortalidad, la estrategia END-TB plantea abatir el 90% de las muertes por

tuberculosis para el 2030, en comparación con las reportadas en el 2015. De manera similar, en el 2020 se reportó un avance del 30% en la disminución de la mortalidad por tuberculosis. Es importante destacar que los avances han sido significativos, sin embargo se requiere un resurgimiento de esfuerzos para lograr las metas planteadas en lo que queda de esta década [15] (**Figura 2**), particularmente considerando los posibles escenarios que podrían complicar el cumplimiento de la estrategia END-TB, incluyendo la tuberculosis multidrogorresistente (MDR), que en el 2019 representó el 3.3% de los casos incidentes y el 17.7% de los casos previamente tratados [16].

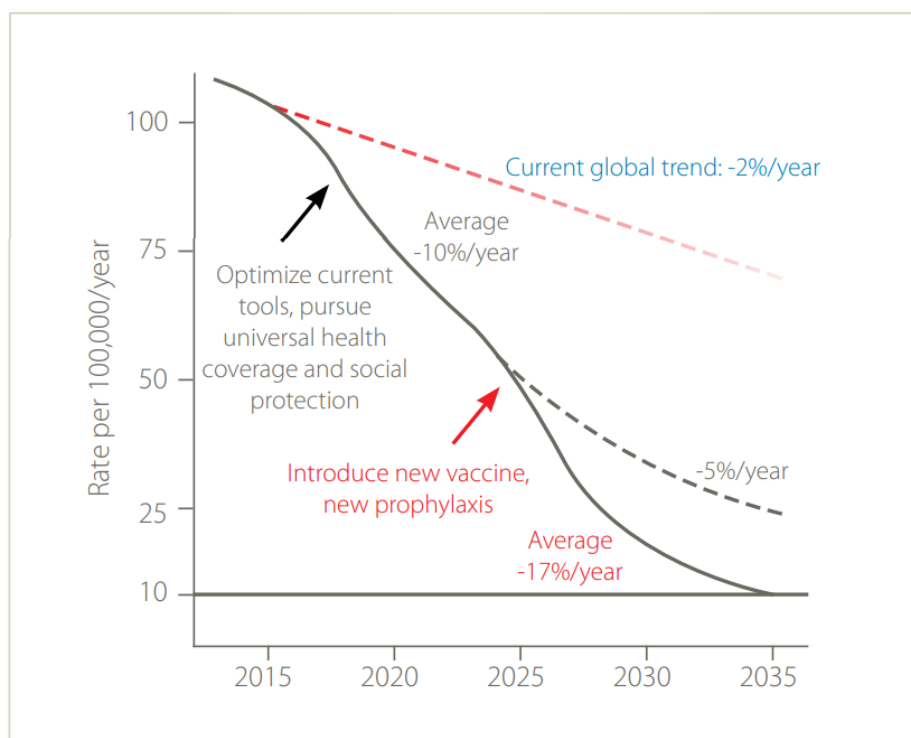


Figura 2. Proyección del impacto de la implementación de diversas estrategias en las tasas de incidencia anual de tuberculosis, destacando las necesidades para alcanzar las metas de la END-TB partnership.

Fuente: Organización Mundial de la Salud [2].

En México la tuberculosis sigue representando un problema de salud prioritario. El Centro Nacional de Programas Preventivos y Control Epidemiológico (CENAPRECE) anualmente registra $\approx 16,727$ casos de tuberculosis pulmonar y ≈ 1600 defunciones por esta causa. La tasa anual se estima en 16.8 casos/100,000 habitantes, sin embargo, diversos estados tienen una carga considerablemente mayor, incluyendo Sinaloa, Sonora y Baja California, donde la tasa supera los 24 casos/100,000 habitantes [3]. Es importante recalcar que en México, a diferencia de la tendencia global, se ha

observado un aumento leve pero constante de casos desde el 2006, con el riesgo concomitante de que el país no cumpla con la meta de los Objetivos de Desarrollo del Milenio referida a la incidencia de tuberculosis (**Figura 3**) [3]. Entre los retos que enfrenta el país se encuentran el surgimiento de cepas MDR, comorbilidades como la desnutrición, diabetes y la infección por VIH, dificultades en el acceso a salud y vulnerabilidad en ciertas poblaciones [16].

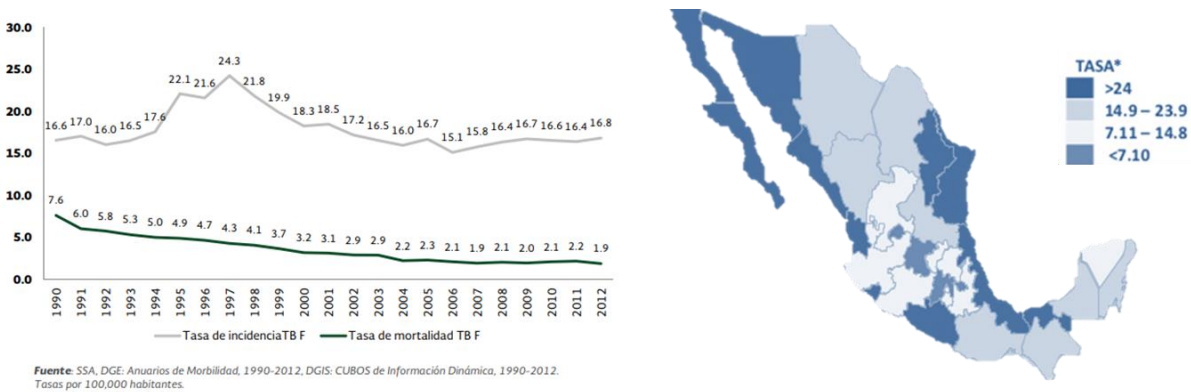


Figura 3. Situación epidemiológica de tuberculosis en México. Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica [3].

1.3 Distribución global de los casos de tuberculosis

A pesar de ser un problema global, existen diferencias considerables en la distribución de los casos incidentes y la mortalidad por tuberculosis entre las diversas regiones geográficas. En el 2019, la mayor proporción de casos nuevos de tuberculosis fueron identificados en las regiones del Sureste de Asia (44%) y el Pacífico Oeste (18%), mientras que otras regiones como el Mediterráneo Este, las Américas y Europa contribuyen con una menor proporción de casos (8.2%, 2.9% y 2.5%, respectivamente). Es importante también hacer notar que 2/3 de los casos globales de tuberculosis se identifican en solamente 8 países: India, Indonesia, China, Las Filipinas, Pakistán, Nigeria, Bangladesh y Sudáfrica. Mientras que la OMS reporta que el 80% de los casos incidentes se agrupan en 22 países considerados de “carga alta” [15].

1.4 Agente causal: *Mycobacterium tuberculosis* “MTB”

La tuberculosis es causada por bacterias del complejo MTB, principalmente *Mycobacterium tuberculosis*. Las micobacterias pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae*, de la suborden *Corynebacterineae*, orden Actinomycetales, filo Actinobacterias del reino monera [11, 17]. Las bacterias del género *Mycobacterium* se caracterizan por ser bacilos aerobios, inmóviles y no esporulados con una longitud aproximada de 2-4 μm [11, 13]. Estos microorganismos son ampliamente reconocidos por presentar una pared celular rica en ácidos micólicos, similar a bacterias de otros géneros como *Gordonia*, *Nocardia* y *Rhodococcus* [18]. Esta característica les permite a estos microorganismos retener tinciones con carbol-fucsina incluso en la presencia de alcohol ácido, lo cual les confiere su nombramiento como bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) (**Figura 4A**) [13]. En comparación con otras bacterias, las micobacterias son de crecimiento lento, con un tiempo de duplicación de 14-24 horas, y requieren un mínimo de 5-7 días de incubación antes de observarse un crecimiento visible en diversos medios sólidos [18]. Una vez observables, las colonias de MTB aparecen con un aspecto rugoso, blanco-amarillentas, similares a “migajas de pan” (**Figura 4B**) [13].

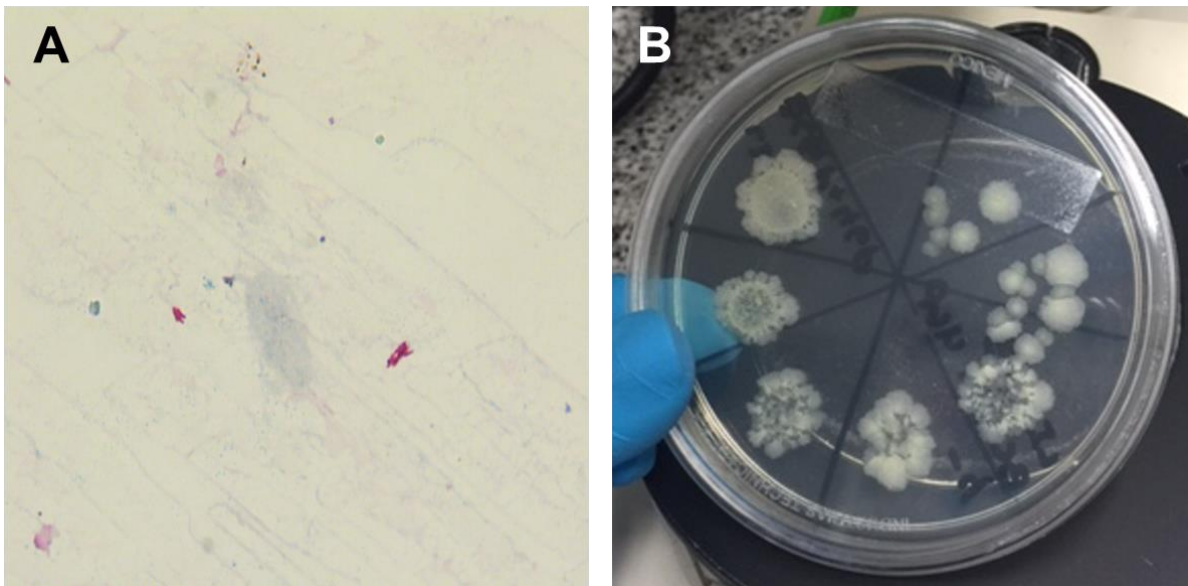


Figura 4. (A) Tinción Ziehl-Neelsen de lisado de tejido pulmonar proveniente de ratones infectados con MTB y sacrificados al día 21 postinfección. (B) Colonias de MTB en crecimiento en agar 7H10. Imágenes de muestras preparadas y tomadas por la autora.

1.5 Patogénesis

Para poder comprender adecuadamente la patogénesis de MTB a nivel molecular, es importante destacar la historia natural de la enfermedad en el hospedero mejor conocido para este patógeno: el ser humano [13]. La transmisión de esta enfermedad ocurre mediante la inhalación de aerosoles entre persona-persona, que son producidos al hablar, toser o estornudar. Dichos aerosoles contienen cantidades variables de bacilos viables, los cuales ingresan a la vía aérea de un nuevo hospedero, atravesando la porción conductora del árbol respiratorio hasta llegar al espacio alveolar [11]. Una vez en el parénquima pulmonar, MTB puede tener contacto con los macrófagos alveolares, residentes de este tejido, o con los neumocitos tipo II del epitelio alveolar [19]. Incluso, las células dendríticas pueden también participar en las etapas tempranas de la infección, funcionando como presentadoras de antígenos para la activación de los linfocitos T [19]. Entre estas, la interacción entre MTB y los macrófagos alveolares es quizá la mejor estudiada a la fecha. MTB interactúa con receptores de superficie de estas células, incluyendo receptores de manosa, receptores del complemento y receptores de tipo Fc. Una vez fagocitada, la bacteria tiende a establecerse dentro de un fagosoma, evitando su maduración a través de la exclusión de ATPasas vacuolares, lo cual impide su acidificación y la retención de proteínas como TACO, perpetuando así su supervivencia [13, 20]. Una vez establecida la infección, los bacilos pueden replicarse en el interior de los macrófagos, o pueden iniciar un proceso de latencia si las condiciones no son favorables, cambiando su metabolismo de un rápido crecimiento aerobio a un perfil anaerobio que permita su supervivencia [17] (**Figura 5**).

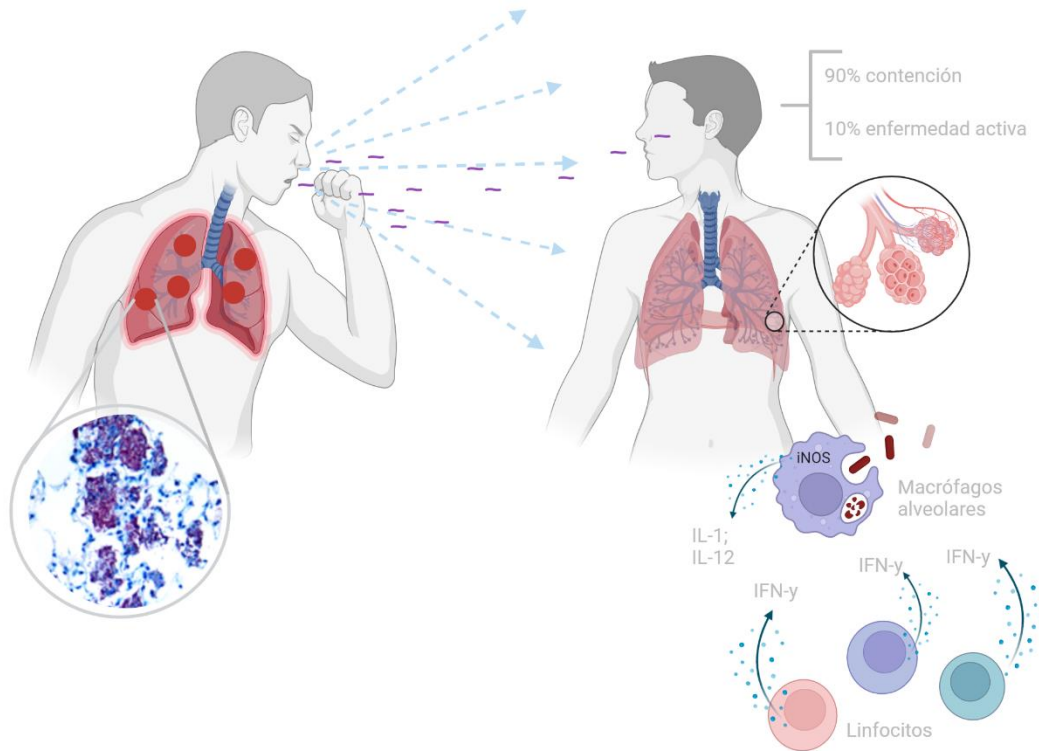


Figura 5. Fisiopatología de la tuberculosis pulmonar. Adaptado de [4-6].

Es interesante reconocer que a pesar de esta infección inicial la cual es sumamente exitosa en establecer al microorganismo en el tejido pulmonar, la mayoría de los sujetos que sufren primoinfección permanecerán asintomáticos. La respuesta inmune suscitada en la mayoría de estos sujetos permitirá controlar la replicación bacteriana activa y su diseminación, sin embargo, en la mayoría la bacteria nunca es completamente erradicada [13]. Como resultado, existen un número de condiciones que pueden posteriormente contribuir a un proceso de reactivación de la infección y la progresión a una enfermedad activa, incluyendo defectos en la inmunidad mediada por células, administración de esteroides, la desnutrición o la administración de quimioterapia [21]. En aquellas personas que sufren una reactivación, los síntomas característicos incluyen fiebre, pérdida de peso, tos productiva crónica de más de dos semanas de duración, sudoración nocturna y hemoptisis [22]. A pesar de que este panorama clásico que establece una dicotomización de desenlaces (TB latente vs. TB activa) ha sido aceptado durante muchos años a nivel clínico, ahora sabemos que los desenlaces de la infección por MTB realmente se expresan mejor a manera de un

espectro continuo, en el cual se incluyen aquellos sujetos que eliminan la infección mediante estrategias de la respuesta inmune innata o adaptativa, aquellos que presentan infección latente pero también pacientes con infección subclínica, que pueden carecer de síntomas pero tener cultivos positivos. Por último, los pacientes con infección activa citados previamente. Todos estos estados pueden representarse mediante un continuo en el cual las progresiones y regresiones entre un estado y el adyacente son posibles (**Figura 6**) [6].

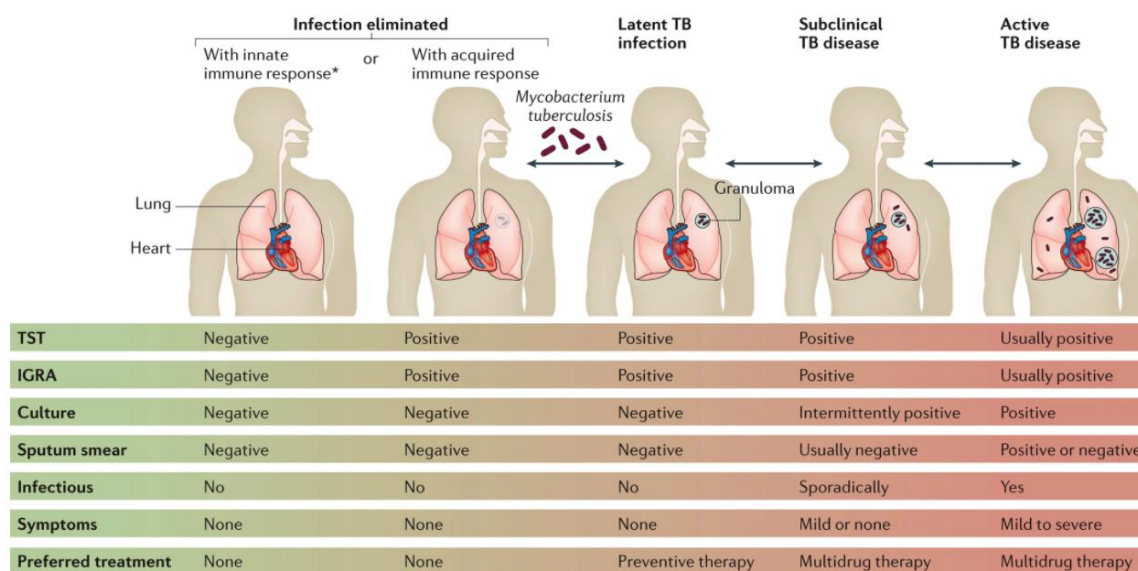


Figura 6. El continuo dinámico de la tuberculosis a partir de la infección con MTB [6].

1.5.1 Virulencia de MTB

Definir la virulencia de MTB ha sido un tema complejo y ampliamente debatido desde hace varias décadas. A diferencia de otros microorganismos, MTB no posee factores de virulencia “clásicos” como las toxinas producidas por otras bacterias que son la principal causa de su habilidad para producir una enfermedad. En el caso de MTB al no existir un solo factor asociado con la habilidad de este patógeno para producir tuberculosis, es importante primero establecer que definimos como *virulencia* y como esta puede ser medida en modelos experimentales. El término *virulencia* hace referencia a la capacidad que tiene un patógeno de causar daño en un hospedero [23]. En el caso de MTB, la virulencia puede ser medida y esta representación cuantitativa puede ser utilizada para valorar los efectos de diversas modificaciones sobre el proceso de enfermedad, particularmente cuando se utilizan modelos

animales para la determinación de la virulencia. La virulencia en estos casos se expresa a través de la *mortalidad* (expresada como el porcentaje de animales infectados que mueren; o el tiempo que transcurre entre que un animal es infectado y su muerte espontánea); *la carga bacilar* (el número de bacterias encontradas en el hospedero infectado posterior a la fecha de infección); *la morbilidad* (medida a través de análisis histopatológicos, la cual es importante para caracterizar variantes bacterianas que generan daño sin afectar la carga bacilar) [19] (**Figura 7**).

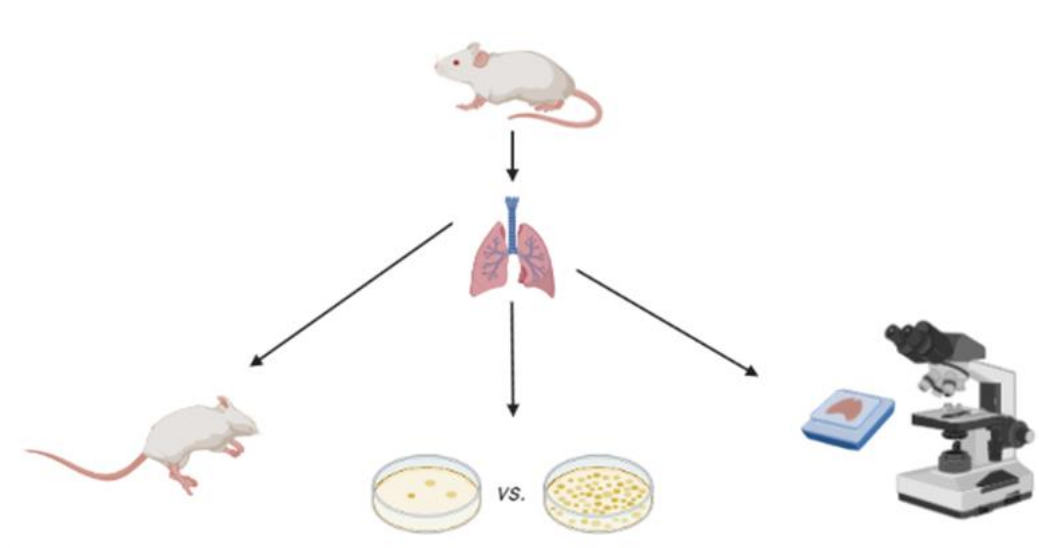


Figura 7. La virulencia de MTB puede medirse considerando la mortalidad de los hospederos infectados, la carga bacilar pulmonar y la morbilidad en términos del daño histopatológico generado por el proceso infeccioso.

En estos casos es importante subrayar que la virulencia se mide a través de parámetros que mimeticen el proceso de crecimiento y enfermedad en el hospedero humano, que implican un daño pulmonar extenso que en última instancia lleva a un proceso de hipoxemia y resulta en la muerte por la destrucción del parénquima pulmonar y el compromiso de la hematosis. El proceso inflamatorio que se desencadena para controlar la infección a su vez produce un daño tisular considerable, producto de diversas proteasas, como la catepsina D, y citocinas, incluyendo a TNF- α , que pueden, en ciertas cantidades, generar inflamación pulmonar severa que conlleve a la muerte [19].

1.5.2 Patogénesis microbiana: Factores de virulencia

La diversidad del complejo MTB en términos de su capacidad de virulencia entre cepas ha sido ampliamente descritas [24]. Un ejemplo angular es la diferencia de virulencia entre MTB y la cepa vacunal de *Mycobacterium bovis*, es decir basado en el Bacilo Calmette-Guérin (BCG) [6]. Considerando los conceptos planteados anteriormente con respecto a la virulencia de MTB y como esta es valorada en modelos experimentales, se pueden describir una serie de genes (y sus productos) cuya inactivación en el genoma bacteriano conlleva pérdida cuantificable en el nivel de virulencia del microorganismo [25]. La variabilidad en los desenlaces a partir de la infección con MTB implican una relación cercana que se ha desarrollado a lo largo de miles de años entre el huésped y hospedero, reflejando mecanismos coordinados de evasión inmune que conllevan a la enfermedad [26].

Las diversas moléculas involucradas en la virulencia de MTB pueden dividirse entre los siguientes subgrupos: i) Lípidos de la micobacteria, ii) sistemas de secreción, iii) proteínas con dominio PE, iv) lipoproteínas, entre otras [26].

En la siguiente **Tabla 1** se resumen algunos de los numerosos factores que han sido asociados con la virulencia de MTB a través de modelos experimentales que incluyen ensayos de infección en líneas celulares (principalmente macrófagos y neumocitos), y ensayos de infección en modelos *in vivo* empleando ratón, cuyo, conejo, pez cebra y primates no-humanos (PNH) [24-26][21-38].

Tabla 1. Factores de virulencia reportados para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Molécula	Relación con virulencia	Evidencia experimental
Lipoarabinomanan (LAM)	Inhibe la maduración del fagosoma caracterizada por la presencia del marcador rab5, permitiendo la supervivencia intracelular.	Cepas deficientes en la correcta translocación de LAM a la pared celular presentan disminución de virulencia [27].
Lipomanan (LM)	Es considerado un antígeno importante para la respuesta inmune innata. Adicionalmente, se ha observado que el LM tiene actividad importante en la activación de macrófagos, la regulación de producción de óxido nítrico y la liberación de citocinas clave en la respuesta inmune (incluyendo TNF- α e IL-12).	Los cambios estructurales en LM pueden generar una mayor capacidad microbicida por parte de los macrófagos (<i>M. smegmatis</i>), así como una atenuación importante en modelos de infección murina con MTB [28].
Fosfatidil-inositol manosidos (PIMs)	Contribuye a la interacción con el receptor de manosa de los macrófagos para la fagocitosis de MTB. Inhiben la activación de células T CD4+ e inhiben la respuesta inflamatoria mediada por TNF e IL-12p40.	Alteraciones en el gen Rv2869c generan afectaciones en la composición de PIM, generando una cepa defectuosa en términos de su capacidad para replicarse en los pulmones de ratones C57BL/6 [29].
Trehalosa-6,6'-dimicolato (TDM)	Conocido coloquialmente como el factor cordón. Sus funciones incluyen promover la angiogénesis, inhibir la acidificación del fagolisosoma y previene la fusión fago-lisosomal. Adicionalmente, induce la liberación de diversas moléculas relevantes para la respuesta inmune, incluyendo IFN- γ , TNF- α , IL-6, entre otras.	La delección del gen <i>treS</i> , involucrado en la síntesis de trehalosa, en MTB resulta en un defecto en el crecimiento <i>in vivo</i> , alterando la patogénesis de MTB en el modelo murino [30].
Glucolípidos Fenólicos (PGL)	Molécula producida por micobacterias de crecimiento rápido y solo algunas cepas de crecimiento lento incluyendo a MTB. Su producción se ha asociado al fenotipo hipervirulento de algunas cepas de la familia W-Beijing.	La producción de PGL por parte de las cepas de la familia W-Beijing se asoció con un fenotipo "hiperletal" en modelos murinos, pero la disrupción del gen <i>pks1/15</i> generó una cepa atenuada en cuestión a la mortalidad que generó en un modelo animal [31].
Transportador de arginina (TAT)	Sistema de transporte ubicado en la membrana citoplasmática que transporta proteínas plegadas.	Mutantes de <i>M. smegmatis</i> con delecciones en genes que codifican para dos de las tres proteínas que componen al TAT (<i>tatC</i> y <i>tatA</i>) presentaron defectos en su crecimiento en medio de cultivo [32].

Transportadores ESX	Ubicado en la membrana citoplasmática, exporta y secreta proteínas a lo largo de la envoltura celular. Se nombran ESX-1 a ESX-5 dependiendo de sus componentes. Están involucrados en múltiples funciones, incluyendo ruptura vacuolar (ESX-1), captación de Zn y Fe (ESX-3), secreción de proteínas PE y PPE (ESX-5).	La pérdida de la región de diferenciación 1 (RD1), con la pérdida parcial de la región codificante para ESX-1, en la cepa BCG se relacionan con la atenuación de dicha cepa [33]. En MTB, la disrupción de ESX-5 generó una cepa atenuada, con alteraciones en la integridad de la pared celular y la pérdida de la proteína de secreción PPE [34].
Proteínas PE-PPE y PE-PGRS	El dominio PE permite el transporte de las proteínas que comparten este dominio, las cuales interactúan con el receptor TLR-2 en células dendríticas y macrófagos. Como resultado, se induce la secreción de citocinas, necrosis y apoptosis, mejorando la supervivencia de las micobacterias.	Mutaciones en el gen que codifica para PE-PGRS30 generan cepas con un fenotipo atenuado, con menor carga bacilar y lesión tisular [35]. La interrupción de PE-PGRS47 generó una atenuación del crecimiento <i>in vivo</i> [36]. PPE38 es requerida para la secreción de proteínas PE_PGRS, alteraciones en el gen que codifica para esta proteína aumentan la virulencia de MTB, como en el caso del genotipo Beijing [37].
LpqH (proteína de 19 kDa)	Lipoproteína glucosilada, representa un antígeno principal de la pared celular. Entre sus efectos al ser reconocida por el sistema inmune se incluyen la inducción de la proliferación de células T <i>in vitro</i> , estimulación de la autofagia y activación de TLR-2.	Cepas de MTB 12646 y SI, las cuales no expresan la proteína LpqH <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> tienen un menor nivel de virulencia en comparación con cepas que producen LpqH [38, 39].
LprG (lipoproteína de 27 kDa)	Al igual que LpqH, LprG es una lipoproteína ampliamente estudiada, representa un antígeno importante para <i>M. bovis</i> y <i>M. tuberculosis</i> . Es un ligando de TLR-2, e inhibe el procesamiento antigénico por parte del MHC II en los macrófagos.	Mutantes que carecen del gen que codifica para LprG han mostrado una disminución en LAM presente en la superficie de MTB, lo cual afecta la interacción con células del hospedero y resulta en menor carga bacilar pulmonar [40]. Adicionalmente, bacterias con una mutación que afecta el operón p27-p55 presentan una disminución del crecimiento en líneas celulares y supervivencia en modelos murinos [41, 42].
Familia Acr (α -cristalina)	La familia α -cristalina incluye dos miembros, Acr1 (que forma parte del regulón DosR), cuya expresión se induce por exposición a condiciones de hipoxia o altos niveles de óxido nítrico.	Datos de mutantes para el gen <i>acr</i> han sido inconclusos. En algunos estudios se ha mostrado que Δ acr mutantes de MTB presentan una disminución en el crecimiento en líneas celulares murinas [43], mientras que otros estudios muestran que dichas mutantes exhiben un crecimiento incrementado en modelos de ratones BALB/c [44].

1.6 Respuesta inmune a la tuberculosis

La comprensión de la respuesta inmune frente al proceso de infección por MTB representa una excelente oportunidad para elevar los esfuerzos en búsqueda de erradicar la tuberculosis a través de novedosos planteamientos profilácticos y terapéuticos; siendo cada vez más evidente que dicha respuesta representa un alto grado de complejidad multifactorial [45], involucrando una amplia variedad de células tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa. De manera general, las células del sistema inmune innato en pulmón que incluyen a macrófagos, células dendríticas y neutrófilos desempeñan un papel importante como elementos celulares de primera línea de defensa en contra de este microorganismo [45, 46]. Mientras que, las células del sistema inmune adaptativo incluyen a linfocitos T CD4 y CD8, los cuales logran activar las capacidades microbicidas de las células mieloides y epiteliales pulmonares infectadas. A través de la intersección de estos ejes de la respuesta inmune se logra una respuesta coordinada que deriva en última instancia en la formación de estructuras tisulares en pulmón llamados granulomas, que representan lesiones características por la infección de MTB en donde las bacterias son contenidas a lo largo de periodos considerables de tiempo. Dichas estructuras logran prevenir la replicación activa y la diseminación de esta bacteria intracelular, sin embargo, de manera paradójica también representan el nicho en el cual MTB logra persistir, manteniendo la posibilidad de una reactivación en ciertas circunstancias [46].

1.6.1 Respuesta inmune innata

El sistema inmune innato incluye la participación de aquellas células y mecanismos que actúan como primera línea de defensa en contra de estímulos foráneos infecciosos potencialmente nocivos. A pesar de que previamente eran consideradas respuestas simples, ahora sabemos que la inmunidad innata representa un sistema complejo que permite una respuesta rápida ante una posible invasión. Entre sus componentes se encuentran las barreras físicas, barreras químicas, células fagocíticas, receptores y el sistema del complemento [47]. La respuesta inmune innata se caracteriza por la ausencia de memoria contra microorganismos específicos a largo plazo, sus funciones incluyen el reclutamiento de células al sitio de infección, acciones microbicidas contra organismos patógenos, producción de citocinas, presentación de antígenos y la cooperación con el sistema inmune adaptativo para en conjunto formar una respuesta inmune orquestada [47].

En el caso de la tuberculosis, la inmunidad innata juega un papel relevante tanto en la respuesta inicial, en la cual su participación es crítica, pero también en la progresión de la infección y el control a largo plazo, generando un enlace continuo que educa las respuestas adaptativas [46]. Las células principalmente involucradas en la respuesta inmune innata son los macrófagos, las células dendríticas, los neutrófilos y las células Natural Killer (NK). El establecimiento exitoso de la infección por parte de MTB depende considerablemente de interacciones tempranas con los grupos de células del sistema inmune previamente mencionadas. Dichas células poseen una amplia variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), incluyendo receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo Nod (NLRs) y receptores de lectina tipo C (CLRs) [48]. Dichos receptores pueden posteriormente iniciar cascadas de señalización que conllevan a funciones de la inmunidad innata, incluyendo la fagocitosis, autofagia y apoptosis.

Los macrófagos alveolares son probablemente las células mejor estudiadas en términos de su capacidad de inducción de inmunidad innata contra MTB, y juegan un papel central en la patogénesis de la enfermedad al representar tanto una primera línea de defensa, como también el reservorio celular de MTB. Los macrófagos poseen una amplia variedad de PRR, los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en MTB, incluyendo glucolípidos, proteínas y carbohidratos. A partir de este reconocimiento sucede una activación de vías de señalización específicas que conlleva a la expresión de diversos genes cuyo propósito final es la eliminación del patógeno a través de mecanismos como la producción de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno, la acidificación de fagosomas y la autofagia de bacterias presentes en el compartimento intracelular [48].

Los neutrófilos también tienen un papel relevante en la infección por MTB, al ser de las primeras células atraídas al sitio de infección gracias a citocinas y quimiocinas secretadas por parte de macrófagos alveolares y células del epitelio bronquial. Una vez en el intersticio pulmonar, estas células colaboran mediante la secreción de moléculas antimicrobianas y mediadores inflamatorios [46]. Sin embargo, cabe destacar que los neutrófilos secretan factores que pueden dañar de manera indiscriminada a las células bacterianas y células propias (incluyendo la catelicidina y lipocalina-2, así como colagenasas y mieloperoxidasas), por lo cual constituyen una

población efectora tanto en el proceso micobactericida como en la inmunopatología de la enfermedad [48].

En el caso de las células dendríticas, estas son importantes en procesos de presentación antigénica, cerrando la brecha entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. De esta manera, las células dendríticas inician procesos de inmunidad adaptativa presentando antígenos de MTB en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (CPH), así como a través de moléculas coestimuladoras y citocinas. Las células dendríticas derivadas de monocitos humanos expresan receptores de manosa y la molécula específica de células dendríticas DC-SIGN (por sus siglas en inglés DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin). Ambas reconocen ligandos de MTB, incluyendo la lipoproteína lprG y manósidos de fosfatidilinositol hexamanosilado (PIMs). Existe evidencia de la capacidad de MTB de infectar y persistir en el interior de células dendríticas, tanto murinas como humanas. Una vez fagocitada la bacteria, estas células migran a ganglios linfáticos torácicos donde logran iniciar respuestas antígeno-específicas por parte de la población de linfocitos T [46, 48]. De no haber este transporte de antígenos hacia los ganglios linfáticos por parte de esta población celular, difícilmente se lograría iniciar una respuesta inmune adaptativa.

1.6.2 Respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por el reconocimiento y eliminación de células específicas, entre sus atributos esta respuesta es inducible, específica, transferible y posee memoria. El control de la infección por MTB requiere de manera determinante de la existencia y buen funcionamiento de células que trabajan en el contexto de la inmunidad adaptativa, particularmente los linfocitos T, cuya deficiencia es catastrófica para los desenlaces posteriores a una infección por MTB [46], como puede observarse en individuos que presentan deficiencias en dicha población de células, incluyendo aquellos pacientes con infección avanzada por el VIH.

El papel de la inmunidad adaptativa en el control de MTB inicia a partir del cebado que realiza la inmunidad innata. En este caso, las DCs presentan antígenos de MTB a través del CPH, movilizandando de esta manera las respuestas inmune adaptativas que ayudarán en el control de la replicación bacteriana. Para lograr activar esta respuesta, las DCs migran hacia los ganglios linfáticos donde drena el pulmón y liberan antígenos para que las células residentes de estos órganos los fagociten. Es

importante recalcar que la interacción entre las DCs y los linfocitos T depende de la integridad de la maquinaria de presentación antigénica, incluyendo la expresión adecuada de CPH, moléculas coestimuladoras y citocinas, y uno de los principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte de MTB radica sobre la alteración de este proceso, incluyendo una deficiencia en la presentación de antígenos por parte de macrófagos en el contexto del CPH clase II, y otros procesos previamente descritos.

Una vez que la respuesta inmune adaptativa ha sido estimulada por parte de las DCs inicia un proceso que se caracteriza por la secreción de citocinas y acciones antimicrobianas directas por parte de diversos linfocitos. Se debe considerar imperativo mantener siempre un estricto balance en términos del proceso inflamatorio que busca eliminar a MTB, evitando al mismo tiempo producir daño colateral por inflamación excesiva. En los diversos modelos murinos de tuberculosis, es claro que el papel de las células T CD4+ es estelar para el control de esta enfermedad [46, 49]. Diversos modelos experimentales han mostrado que existe un retraso importante en la iniciación de la respuesta de células T CD4+ posterior a la infección por MTB [46, 50], el cual oscila entre 2 y 4 semanas en modelos murinos y de primates. Sin embargo, una vez que el proceso de “priming” de células T se ha llevado a cabo, diversos mecanismos trabajan en conjunto para lograr el control de la infección. Entre estos, uno de los mejores estudiados es el papel del IFN- γ . Desde hace varias décadas se conoce que sujetos con defectos en la expresión de IFN- γ son extremadamente susceptibles a infecciones por MTB. Otros factores que condicionan el desenlace posterior a una infección son la citocina IL-12, la cual tiene un papel importante para polarizar la respuesta hacia un fenotipo Th1, y el factor de transcripción Tbet, el cual delimita el linaje a Th1. La evidencia muestra por lo tanto que el eje IL-12/IFN- γ es crítico para el control de la tuberculosis, y por lo tanto la polarización de la respuesta inmune hacia un fenotipo Th1 parece ser de suma importancia para los mecanismos efectores exitosos contra este patógeno. En este caso, el IFN- γ producido por los linfocitos T CD4+ tiene un potente efecto activador sobre los macrófagos, posteriormente estos producen IL-1, la cual tiene un efecto paracrino sobre linfocitos cercanos, estimulando la producción de IL-2 y de esa manera generando un eje autocrino que deriva en la proliferación linfocitaria [51].

Existen otros mecanismos de protección por parte de la respuesta inmune adaptativa, incluyendo la producción de IL-17, una citocina inflamatoria que puede ser producida por subgrupos específicos de células T CD4+. Las respuestas de tipo Th17 son generalmente observadas posterior a un proceso de inmunización, sin embargo, están prácticamente ausentes en individuos con tuberculosis activa. A pesar de tener un rol menos protagónico, diversos estudios han identificado que las células con un fenotipo Th17 pueden contribuir a la protección contra MTB mediante la expresión de quimiocinas reclutadoras de células Th1, incluyendo CXCL9, CXCL10 y CXCL11 [52]. Ultimadamente, los diversos eventos de señalización en la mayoría de los casos siguientes a una primoinfección derivaran en la formación de un granuloma, una estructura histopatológica característica de la infección por MTB [53]. Los granulomas representan lesiones crónicas inflamatorias de agregados celulares que son clásicos en la tuberculosis (**Figura 8**) [54]. En estos sitios, las bacterias son contenidas, pero al mismo tiempo pueden sobrevivir disminuyendo su tasa metabólica y replicativa, entrando en el periodo conocido como latencia, en el cual puede perdurar durante décadas [53]. La formación de un granuloma es un evento que requiere un balance de citocinas específico, en este caso IFN- γ y TNF- α son de gran relevancia para suscitar la formación y el mantenimiento de la estructura, mientras que otros factores, como IL-10 tienen un efecto contrario [53]. En la mayoría de los individuos infectados por MTB, el sistema inmune coordina exitosamente el balance entre células y citocinas para contener la enfermedad, tal como se describió previamente. Sin embargo, el fallo para montar inicialmente esta respuesta, o su deterioro por condiciones que generen inmunosupresión pueden conllevar a los procesos inmunopatológicos que derivan en la progresión de la enfermedad.

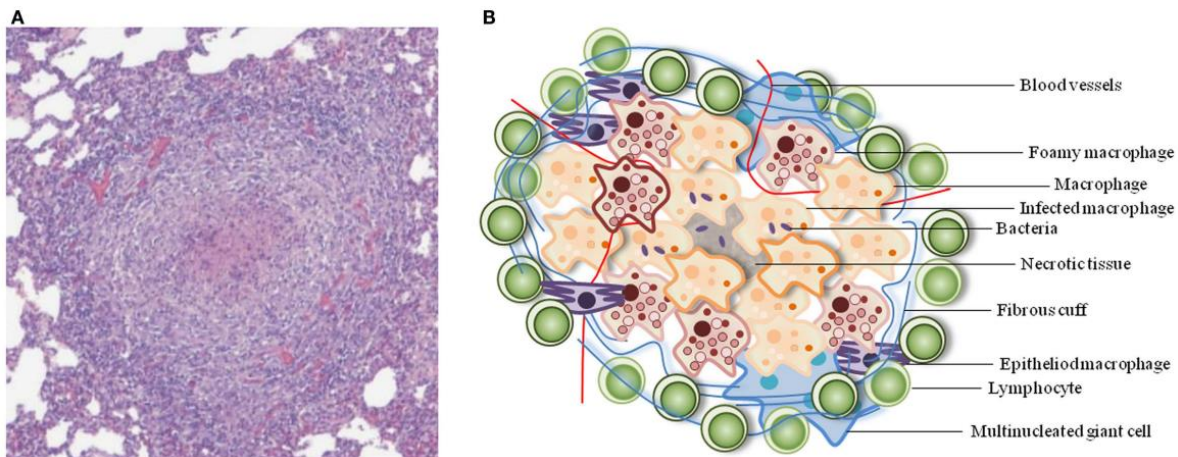


Figura 8. Arquitectura de un granuloma pulmonar durante la infección por MTB. Fuente [7].

La regulación negativa también tiene un papel importante en la homeostasis inmunológica limitando el daño tisular ocasionado por la inflamación, pero ciertas vías inhibitorias pueden también jugar un papel crucial en la persistencia del patógeno [46]. Por ejemplo, la IL-10 es una citocina que tiene la capacidad de suprimir la producción de IL-1 e IL-2, sin embargo, su papel en la supresión de las respuestas Th1 durante la infección por MTB parece ser limitado. Es claro que la regulación estricta de todas estas poblaciones celulares y citocinas tiene implicaciones relevantes en el fenotipo de la respuesta inmune y el control de la bacteria, con el objetivo de lograr un aclaramiento al mismo tiempo que se preserva la arquitectura y funcionamiento de los tejidos del hospedero.

II. VACUNACIÓN CON BCG

2.1 Historia de la BCG

Durante 100 años (1921-2021) la vacuna BCG ha sido la única vacuna profiláctica aceptada por las instancias internacionales para el control de la tuberculosis. Inicialmente fue desarrollada por Albert Calmette y Camille Guérin (Bacillus Calmette-Guérin) en el Instituto Pasteur de Francia, mediante el pase por medio de cultivo 230 veces de una cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* en un periodo comprendido entre 1908-1921 [55]. El descubrimiento de la BCG fue resultado de una observación fortuita, cuando Calmette y Guérin intentaban cultivar bacilos de tuberculosis usando un medio a base de papas y glicerina, al cual posteriormente añadieron bilis para intentar obtener una suspensión homogénea de las bacterias. Como resultado de

dicho subcultivo surge una cepa atenuada del microorganismo, el cual posterior a muchos países es ahora conocido como la BCG, la vacuna más ampliamente utilizada en la historia de la humanidad [56]. Existen diferencias marcadas entre la BCG y cepas virulentas de *Mycobacterium bovis*, incluyendo diferencias genómicas como la delección en la BCG de la RD1, con lo cual se eliminan 9 genes, incluyendo PPE-68, PE35, ESAT-6 y CFP-10, muchos considerados factores de virulencia importantes del microorganismo [57].

La eficacia y seguridad de la BCG fue inicialmente probada en 1919, mediante su aplicación a conejos, cobayos, ganado y caballos. En todos estos casos, la cepa fue segura y no se observó tuberculosis progresiva en los hospederos. Para 1921 los investigadores decidieron utilizar la cepa en el primer ensayo clínico en humanos, mediante su aplicación por vía oral a un infante cuya madre había muerto de tuberculosis horas posterior al parto, al no observarse eventos adversos su uso continuo y para 1924 surgen los primeros reportes de la aplicación de la BCG en 664 infantes nuevamente citando un perfil seguro.

En 1928 aproximadamente 114,000 infantes habían sido vacunados con la BCG, mostrando una disminución en la mortalidad por tuberculosis en análisis iniciales reportados por Calmette y Guérin. En 1934 la ruta de administración cambia gracias al trabajo de Wallgreen y Heimbeck en los países Escandinavos, y la BCG se administra en diversas regiones incluyendo España, Estados Unidos y Gran Bretaña [56].

El uso de la BCG continuó de manera acelerada, sin embargo, para la década de 1950 era claro que los protocolos de administración tenían variaciones importantes entre diversas regiones, lo cual podía impactar la eficacia de la vacuna de manera importante. Al ser un microorganismo vivo atenuado, los procedimientos para su mantenimiento dependían del laboratorio que manejara el microorganismo, conllevando al surgimiento de diversas subcepas de la BCG, de igual manera la edad y características de la población vacunada presentaban variabilidad entre regiones [56]. En 1966 surgen los resultados a largo plazo del ensayo de vacunación en el sur de Estados Unidos. Dicho estudio incluyó a 64,136 individuos de Georgia y Alabama de diversos grupos etarios quienes recibieron la cepa Tice de BCG. Los resultados mostraron una disminución en la incidencia de tuberculosis de solamente 5% en el grupo vacunado con BCG, concluyendo que dicho beneficio no justifica la aplicación masiva de BCG [58]. Por otra parte, un estudio realizado en la Gran Bretaña que

incluyó a 54,239 participantes entre 14-15 años de edad identificó una eficacia de la BCG de 84% en los primeros 5 años posteriores a la aplicación [59]. Dichos resultados conllevaron a la administración masiva de la BCG en la mayor parte del mundo, siguiendo la recomendación de la OMS.

En México la BCG fue introducida en 1925, y para 1931 su producción se estableció en el Instituto de la Higiene para su aplicación a niños de madres con tuberculosis. Desde ese año, hasta 1970 la BCG-México fue producida en el país para su uso aquí y en algunos otros países de Latinoamérica, sin embargo, en 1970 la cepa fue cambiada a BCG-Danesea debido a cambios en la metodología de producción e implementación de la liofilización. Dicha producción continuó hasta 1998, a partir de entonces la BCG que se utiliza en México es importada de otras fuentes dependiendo de su disponibilidad [57].

2.2 Subcepas de la BCG

El término BCG en realidad no hace ya referencia a un único *Bacillus*, más bien comprende un número de subcepas que difieren en cuestión a su genotipo y fenotipo, con un impacto sobre las propiedades de la vacuna que hasta esta fecha no se encuentra completamente elucidado [60]. En 1924 la BCG comenzó a ser distribuida a partir del Instituto Pasteur a diversos laboratorios alrededor del mundo. La primera cepa fue enviada a Rusia, conllevando al surgimiento de la BCG-Moscow. De esta manera, diversas subcepas se originaron a partir de los diferentes laboratorios a donde inicialmente fueron distribuidas, llevando el nombre del lugar donde inicialmente surgieron (BCG Japón, BCG Phipps [Philadelphia], BCG Danesea) [57]. La distribución avanzó aceleradamente, llegando a 50 países en 1927. Durante este tiempo, y hasta 1960, la BCG fue preservada mediante subcultivos cuyas condiciones eran estandarizadas en cada laboratorio particular. Como consecuencia surgió una gran heterogeneidad en el cuidado y crecimiento de la cepa parental, conllevando a diferencias entre las cepas de BCG mantenidas en cada laboratorio [60]. Dichas diferencias incluyen diferencias morfológicas en el tamaño, forma y textura de las colonias en medio, diferencias genómicas, diferencias en producción de antígenos (MPB64, MPB70) y diferencias en la producción de ácidos micólicos (ácidos micólicos alfa, metoxi y ceto).

Las diferencias fenotípicas y bioquímicas entre las subcepas de la BCG son también acompañadas por diferencias en los niveles residuales de virulencia, con lo cual se sospecha un impacto en la eficacia de la cepa vacunal consecuente a dichos mecanismos de atenuación adicionales a los generados entre 1908-1921 [60]. Esta primera atenuación tuvo como consecuencia principal la pérdida de la RD-1, como se describe previamente, una región de diferenciación que está ausente en todas las cepas de BCG, pero presente en cepas virulentas de MTB. Posteriormente, otros mecanismos de atenuación observados después de 1924 incluyen la pérdida de expresión de proteínas antigénicas (por ejemplo, las cepas “tardías” [>1927] no expresan MPB64 y tienen una producción deficiente de metoximicolato, un ácido micólico de la pared celular). Otra diferencia importante radica en la producción de Dimicoserosato tiocerol (PDIMs) y glucolípidos fenólicos (PGs), los cuales no son producidos por la BCG Japón, BCG Moreau y BCG Glaxo.

En la década de 1970 las diferencias entre las subcepas de la BCG y las implicaciones que estas diferencias podrían tener respecto a la eficacia de la vacuna eran un tópico de discusión en la OMS, que llevó a cabo diversos ensayos para comparar algunas características entre 12 subcepas de la BCG, identificando que algunas subcepas tenían mayores niveles de atenuación y por lo tanto podrían no suscitar una adecuada estimulación del sistema inmunológico [60].

2.3 Eficacia de la BCG

La vacunación con BCG ha estado incluida en el Programa Expandido de Inmunización de la OMS desde 1974, con una población de más de 4000 millones de individuos vacunados a la fecha [56]. Sin embargo, su aplicación masiva es controversial debido a la gran heterogeneidad entre los resultados de eficacia publicados en diferentes ensayos, incluyendo el ensayo en el sur de Estados Unidos que identificó que no había protección usando BCG-Tice y el ensayo en Gran Bretaña que alcanzó un gran nivel de eficacia utilizando BCG-Copenhague en adolescentes con una prueba negativa de tuberculina. En 1979 se publicaron los resultados del ensayo Chingleput realizado en el sur de la India. Este estudio incluyó a 260,000 individuos vacunados con las cepas Pasteur y Danesa de BCG, y concluyó que la BCG no proveía protección contra la tuberculosis pulmonar [61, 62]. Dichos resultados divergentes conllevan a una tasa de protección por parte de la BCG contra la

tuberculosis pulmonar que oscila entre el 0-75% [21, 60], con una tasa global del 50% estimada por un meta-análisis publicado en 1994 y que incluyó 16 estudios [57, 63]. Diversas hipótesis que han sido planteadas para tratar de explicar la diferencia entre tasas de protección reportadas en los estudios realizados, incluyendo diferencias entre las subcepas de vacunas utilizadas, la falta de protección por exposición a micobacterias ambientales, diferencias en las características demográficas de las poblaciones estudiadas y la metodología de cada ensayo respecto al seguimiento de los sujetos incluidos. Otra hipótesis propone que la BCG confiere protección contra algunas, pero no todas, las cepas de MTB [64].

Más recientemente, una nueva revisión sistemática y meta-análisis fue publicada, la cual incluyó 18 ensayos clínicos aleatorizados para tuberculosis pulmonar y 6 ensayos clínicos para tuberculosis miliar o meníngea. Los resultados de este estudio mostraron que el nivel de protección de la BCG es mayor en infantes quienes son sometidos a pruebas de tuberculina previas a la vacunación, así como en ensayos conducidos lejos del ecuador, donde las micobacterias ambientales se encuentran en menor cantidad. No se encontró evidencia de que la eficacia estuviera asociada con la subcepa de vacuna utilizada [65].

2.4 Recomendaciones del uso actual de la BCG

Actualmente la BCG continúa siendo la única vacuna aprobada por la OMS como vacuna profiláctica contra la tuberculosis, y se recomienda que “se aplique la vacunación universal con BCG al nacimiento en todos los países o escenarios con una alta incidencia de tuberculosis o lepra. Se deberá administrar una sola dosis de BCG a todos los neonatos sanos en el momento posterior al nacimiento” [66]. Esto debido principalmente a la protección elevada otorgada por la BCG contra formas graves de tuberculosis en niños, así como la observación de que una respuesta inmune previa específica contra MTB puede lograr una contención más pronta y menor carga bacteriana en individuos vacunados [67, 68]. Actualmente, la Norma Oficial Mexicana (NOM)-036-2002-SSA2 estipula que la BCG debe ser aplicada a todos los niños durante el primer año de vida mediante la vía intradérmica [57].

III. LINAJES DE MTB

3.1 Orígenes del cMTB

Sabemos que la tuberculosis es una enfermedad ancestral que ha afligido al ser humano a lo largo de su historia en mayor y menor proporción. En 1882, por ejemplo, la tuberculosis causaba el 20-25% de las muertes en adultos [69]. Actualmente y a pesar de todos los avances de los últimos 200 años, la tuberculosis representa el 25% de las muertes prevenibles de los adultos que viven en países en vías de desarrollo, así como un tercio de las muertes relacionadas al VIH/sida [70].

El cMTB hace referencia a un grupo de diversos linajes micobacterianos patogénicos para una amplia gama de hospederos; es un grupo de bacterias altamente relacionadas, el cual incluye a los patógenos obligados en humanos: *Mycobacterium tuberculosis* (*sensu stricto*; linajes 1-4, 7) y a *Mycobacterium africanum* (linajes 5,6). La evolución de este complejo se subdivide en macroevolución, la cual incluye diferencias entre linajes y diferencias en términos de distribución geográfica, y por otra parte la microevolución, que impacta sobre tasas de mutaciones y gobierna el surgimiento de nuevas mutaciones en el contexto de bacterias infectando un paciente recibiendo tratamiento clínico farmacológico.

Es probable que un organismo similar a *M. canettii*, patógeno facultativo altamente restringido al área de África sea el ancestro directo de MTB, esto con base en estudios comparativos que han identificado aproximadamente 50 genes presentes en MTB, pero ausentes en *M. canettii*. Esto a su vez conlleva a la hipótesis de “salido de África” que plantea que el ancestro común de MTB existió hace 40,000-70,000 años, y este emerge de África acompañando las ondas migratorias provenientes del continente [8]. **(Figura 9)**

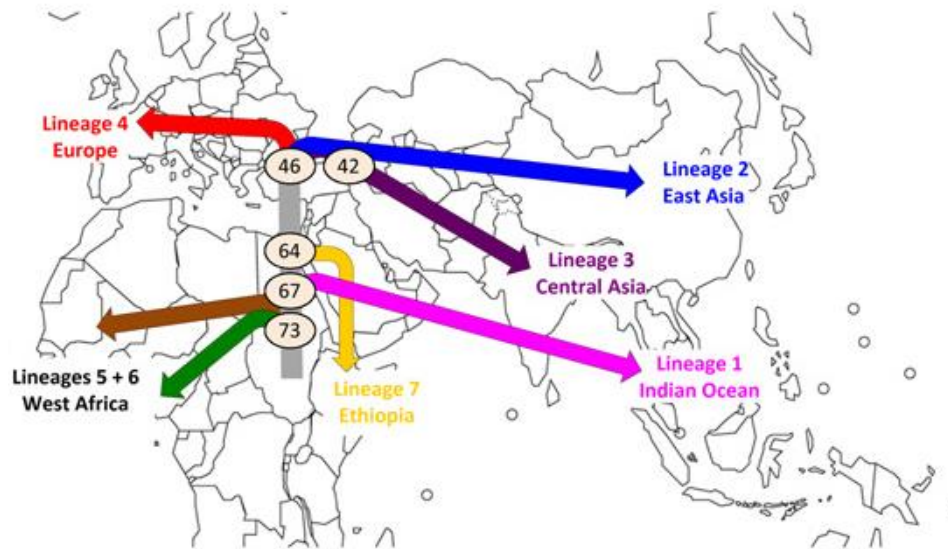


Figura 9. Esquema representativo de la hipótesis “salido de África”, surgida a partir de análisis filogenéticos del MTB. Cada línea de un color distinto representa los diversos linajes que componen el complejo. Fuente [8].

3.2 Clasificación en familias

Los mecanismos implicados en la virulencia así como los diversos factores asociados al hospedero y su medio ambiente que pueden impactar la variabilidad de la enfermedad por MTB aún no son completamente conocidos. Se ha sugerido que factores del hospedero, así como ambientales pueden tener un efecto importante sobre el curso de la enfermedad. Sin embargo, existe evidencia contundente respecto a los factores intrínsecos de la bacteria y como estos contribuyen a la variabilidad de la presentación clínica, la transmisibilidad e incluso el desenlace al tratamiento [70].

El género *Mycobacterium* incluye una gran cantidad de especies (>170), la mayoría siendo considerados organismos ambientales, pero incluyendo diversos patógenos. Posterior a su establecimiento como un patógeno profesional, el cMTB evolucionó en linajes adaptados a diversos hospederos. Dentro del cMTB se encuentran siete linajes adaptados a hospederos humanos, y algunos otros linajes adaptados a animales domésticos y salvajes. Los linajes 2, 3 y 4 comparten una delección (TBD1). Otras delecciones presentes entre los diversos linajes incluyen la RD7, RD8, RD9 y RD10. Los miembros del cMTB adaptados a hospederos humanos presentan una estructura poblacional filogeográfica, es decir, muchos de los linajes exhiben restricciones geográficas importantes, a pesar de que otros pueden mostrar distribución global. Los linajes más ampliamente distribuidos son el linaje 2 y el linaje 4. Los linajes 1 y 3

ocurren principalmente alrededor del océano Índico y los linajes 5 y 6 están restringidos al este de África, mientras que el 7 es casi exclusivo de Etiopia [71].

3.3 Genotipo Beijing

3.3.1 Características y clasificación

El genotipo Beijing representa actualmente la cepa que con mayor frecuencia causa tuberculosis a nivel global [70]. Este grupo de cepas tiene características genotípicas definitivas las cuales las diferencian de otros genotipos de MTB, incluyendo el hecho de que forman parte del linaje del Este de Asia, tienen diversos SNPs únicos a este genotipo (**Tabla 2**), y tienen un elemento de inserción IS6110 integrado entre los genes que codifican para proteínas de replicación del DNA *dnaA* y *dnaN* [72]. Adicionalmente, todas hibridan en mínimo 3 de los espaciadores 35-43 en la región genómica DR. El genotipo Beijing a su vez se subdivide en dos grupos principales. El primero son las cepas típicas, las cuales tienen una inserción de dos copias de IS6110 en la región cromosómica NTF (noise transfer function). Estas cepas son observadas con mayor frecuencia en diferentes regiones geográficas y tienen un patrón de RFLP similar, junto con mutaciones en genes que codifican para enzimas de reparación del DNA (mutadores putativos incluyendo *mutT2* y *mutT4*). Por otra parte, el segundo grupo incluye a las cepas atípicas, las cuales poseen solo una copia de IS6110 en la región NTF y tienen un patrón de RFLP más diverso en comparación con las cepas típicas [73].

De manera general se considera que las cepas Beijing típicas son cepas modernas, las cuales comenzaron un proceso de expansión en la década de 1980 del siglo pasado, convirtiéndose en las mayormente prevalentes. Por otra parte, las cepas Beijing atípicas son las cepas más antiguas, con menor virulencia y transmisibilidad. A pesar de ser meramente una hipótesis, se ha planteado que las cepas típicas pudieron haber surgido a partir de las cepas atípicas por fuerzas de presión selectiva, incluyendo la vacunación masiva con BCG [70, 74].

Tabla 2. SNPs informativos para tipificar bacterias del complejo MTB, genotipo Beijing

<i>Linaje</i>	<i>Posición</i>	<i>Cambio de alelo</i>	<i>Nombre del gen</i>
2	497491	G/A	<i>glnH</i>
2	1881090	C/T	<i>pks7</i>
2	2505085	G/A	<i>cobC</i>
2	4248115	C/T	<i>embB</i>
2	3836274	G/A	<i>groEL1</i>
2	346693	G/T	<i>eccC3</i>

3.3.2 Origen

El primer reporte del genotipo Beijing se atribuye a van Soolingen y cols., 1995, donde este grupo de investigadores reportó los resultados de un análisis de la estructura poblacional de cepas de MTB recolectadas de pacientes con tuberculosis residentes de China entre 1992-1994, concluyendo que la mayoría de los aislados pertenecían a un grupo estrechamente relacionado y con un patrón compartido de fragmentos de restricción. Al haber sido aisladas la mayoría de estas cepas en la provincia de Beijing, el grupo recibió el nombre de “familia Beijing” de MTB. De manera interesante las cepas de la familia Beijing también dominaban el panorama epidemiológico en países vecinos a China, incluyendo Mongolia, Korea del Sur y Tailandia, pero no en otros continentes, lo cual sugeriría que dichas cepas se expandieron a partir de un ancestro común que poseía alguna ventaja adaptativa. Los autores notaron que un factor común en los países del Sureste de Asia donde observaron esta dominancia por parte de la familia Beijing es la vacunación masiva con BCG, sugiriendo que la vacunación a largo plazo podría haber actuado como fuerza de selección implicada en la diseminación exitosa de las cepas de esta familia [75].

Por otra parte, Mokrousov ha sugerido que este genotipo tuvo origen en el Norte-Centro de China hace más de 1000 años, y que su diseminación al resto del mundo pudo haber sido causada por movimientos poblacionales. Esto con base en un estudio en el cual se utilizó el genotipo Beijing como modelo y fue comparado respecto a su filogeografía con demográficas poblacionales en humanos y filogeografía del cromosoma Y. A partir de dos hipótesis (el surgimiento del genotipo Beijing en Asia Central y su diseminación por parte de granjeros tibetanos al este de Asia), los autores sugieren que la introducción del genotipo Beijing a Euro-Asia y Sudáfrica y su

diseminación posterior fueron eventos históricamente recientes e influenciados por parte de factores demográficos y climáticos [73].

3.3.3 *Virulencia*

Las bacterias del genotipo Beijing poseen características fenotípicas particulares, y diversos estudios han mostrado que podrían de manera general ser más virulentas en comparación con otros genotipos del cMTB, y esto en parte puede explicarse debido a diferencias entre la interacción que sucede entre bacterias del genotipo Beijing y las células del sistema inmunológico de su hospedero. En este contexto, virulencia se define por la habilidad de las bacterias para infectar, sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos del hospedero, su habilidad para inducir una respuesta inflamatoria y su habilidad para persistir a pesar de las defensas del hospedero, y puede ser cuantificada como el tiempo o tamaño del inóculo requerido para producir la muerte del hospedero, el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) obtenidas de homogenizados de pulmón y la histopatología pulmonar. Diversos estudios se han enfocado en la identificación de los mecanismos por los cuales estas cepas suprimen la respuesta del sistema inmune, pero aún no está bien esclarecido como los llamados factores de virulencia permiten a estas bacterias el crecimiento, supervivencia y la diseminación hacia nuevos hospederos.

Entre los factores que han sido estudiados, se ha identificado que las bacterias del genotipo Beijing inducen una mayor mortalidad en comparación con cepas de otros genotipos, y esto parece ser el resultado de una disminución en la capacidad de las células del bazo y ganglios linfáticos del hospedero para proliferar y producir IFN- γ como respuesta a antígenos micobacterianos [70, 76]. De hecho, las características de la respuesta inmune asociada a infecciones por cepas del genotipo Beijing han sido ampliamente estudiadas. Por ejemplo, en modelos murinos, la infección por cepas Beijing produce un decremento en la producción de IL-12 e IFN- γ , así como un aumento de IFN- α . Otros estudios han identificado que las cepas Beijing en ocasiones pueden estimular una respuesta de tipo Th1, sin embargo, esta es efímera y decae rápidamente a las dos semanas postinfección [77].

Se ha postulado que dichas observaciones podrían tener como fundamento el hecho de que MTB ha logrado evolucionar un número importante de mecanismos para evitar el reconocimiento por parte del sistema inmune del hospedero, incluyendo la

producción de PGL por parte de una poliketido sintasa, el cual disminuye la producción de citocinas Th1 de manera dependiente de dosis. De manera interesante, las cepas de genotipos no-Beijing poseen una delección de 7 pares de bases (pb) en el gen que codifica para la poliketido sintasa, lo cual se ha asociado con una incapacidad para producir PGL. Sin embargo, cabe recalcar que cuando a cepas no-Beijing se les restituye la función de esta proteína, la virulencia se asemeja a la de las cepas Beijing, sin embargo, la respuesta inmune varía. Esto conlleva a estipular que la habilidad para inmunomodular el sistema del hospedero por parte del PGL depende también del contexto genético de la cepa que lo produce [70]. Otro mecanismo por el cual las cepas del genotipo Beijing parecen evitar el reconocimiento inmune es la expresión de antígenos como la α -cristalina, y la menor expresión de estimulantes de células B y T (como la proteína de transporte de fosfatos PstS1), de esta manera minimizando el reconocimiento inmunológico de la bacteria. Por último, se ha estipulado que las bacterias del genotipo Beijing tienen la capacidad de expresar genes PPE de manera diferencial, influenciando la respuesta inmune del hospedero, como es el caso de PPE44, una proteína producto de un gen conservado entre cepas de MTB, pero con variaciones importantes en términos de la expresión por parte de cepas Beijing [78].

Otros factores importantes que impactan en la virulencia de las cepas del genotipo Beijing incluyen una mayor expresión de factores como SigA, mayor expresión basal de genes asociados a regulones de latencia (dosR, Rv3130c, hspX, fdxA), copias adicionales del regulon dosR, y un mayor nivel de transcripción del gen que codifica para la triacilglicerol sintasa, cuya actividad se induce en condiciones de hipoxia [70].

3.3.4 Ventajas adaptativas

La capacidad de las cepas del genotipo Beijing para diseminarse a lo largo de una población es resaltada por diversos estudios que documentan dichos patrones en poblaciones en las cuales ha sido introducida recientemente [70]. Por ejemplo, un brote importante de tuberculosis causada por una cepa MDR del genotipo Beijing (cepa "W") ocurrió en la década de los 90s en la ciudad de Nueva York, ubicada en un país que no considera a la tuberculosis como un problema de salud pública. Adicionalmente, otros brotes a nivel mundial también han sido causados por el genotipo Beijing, y la base de datos spolDB4 muestra que las cepas del genotipo

Beijing se encuentran presentes en el mayor número de países a nivel mundial, con el 13% de los aislados clínicos globales perteneciendo a este grupo, y el 50% de los aislados clínicos obtenidos en la región del sureste de Asia [78].

Los factores que han contribuido a la diseminación exitosa de estas cepas aún no se encuentran del todo elucidados, sin embargo, una hipótesis importante menciona que estas cepas podrían tener ventajas intrínsecas sobre otros genotipos de MTB en cuestión a la evasión de la respuesta inmune suscitada por la BCG [79]. En algunos estudios *in vivo* se ha observado que la vacunación con BCG no protege adecuadamente contra cepas del genotipo Beijing [24]. Estudios epidemiológicos han mostrado una mayor proporción de aislados clínicos del genotipo Beijing típico a partir de individuos vacunados previamente con BCG, en comparación con individuos no vacunados [79], lo cual apoya la hipótesis que estipula que la vacunación con BCG podría haber favorecido la diseminación de estas cepas ampliamente distribuidas de manera más reciente.

IV. VACUNACIÓN Y VIRULENCIA

La mayoría de los programas de vacunación tienen como propósito reducir la prevalencia de una enfermedad de origen infeccioso y, en algunos casos, lograr su erradicación. Sin embargo, los efectos a largo plazo de la vacunación sobre los microorganismos contra los cuales son diseñadas las vacunas han sido ampliamente estudiados [80]. Dichos estudios consideran que las vacunas raramente proveen una protección completa contra la enfermedad, pero aun así son utilizadas para proteger tanto a nivel individual como poblacional [81]. El fenómeno de la diseminación de “variantes de escape” a través del cual se cimienta el concepto de resistencia a la vacunación implica la presentación de epítomos distintos a los encontrados en la vacuna por parte de ciertos microorganismos, escapando de esta manera el reconocimiento inmune. Existen estudios que se enfocan en el impacto potencial de diversos tipos de vacunas sobre la evolución de la virulencia de un patógeno y las consecuencias que tendría en términos de salud pública. Esto ha sido ya observado en el caso de microorganismos contra los cuales existen estrategias de vacunación masiva como la polio, la hepatitis B [81], H. influenzae [82], virus del sarampión [83, 84], el virus de las paperas [85] y *Bordetella pertussis* [86].

4.1 Impacto de las vacunas imperfectas en la virulencia del patógeno

Desde un punto de vista teórico, las vacunas pueden dividirse en dos subtipos: aquellas que previenen la infección de todos los individuos expuestos a un patógeno (vacunas *perfectas*,) y aquellas que no necesariamente previenen la infección de un hospedero, pero pueden disminuir la severidad de la infección o la transmisibilidad del patógeno (vacunas *imperfectas*) [87]. Estas últimas tienen como consecuencia en dichos ensayos de modelaje matemático un aumento en los niveles intrínsecos de virulencia del patógeno, y por lo tanto una mayor severidad del curso de la enfermedad, particularmente para individuos no vacunados [81]. De manera similar a la resistencia farmacológica, este efecto indeseado puede ocurrir como consecuencia de la vacunación masiva, sin embargo se estipula que sería en escalas de tiempo mayores a las de la duración de un ensayo clínico estándar, por lo cual es difícil predecir/observar el fenómeno en este contexto [87].

Previamente, Ganusov & Antia examinaron a manera de modelaje matemático si las vacunas imperfectas pueden conllevar a la evolución de formas más o menos virulentas de un patógeno de forma general. Utilizando modelos de dinámica intrahospedero y de las respuestas inmunes los autores identifican que el uso de vacunas imperfectas conlleva a la evolución de patógenos con una mayor tasa de crecimiento intra-hospedero. Adicionalmente, concluyen que cuando un patógeno prevalente en el contexto de una población con alta cobertura de vacunación infecta a un hospedero no vacunado tiene como resultado una mayor mortalidad, pero menor transmisión del patógeno. Dichos resultados sugieren que los mecanismos de acción de las vacunas y su eficacia son de gran importancia para predecir las consecuencias evolutivas a largo plazo en el uso de vacunas imperfectas [87].

4.2 Efectos de la cobertura poblacional de vacunación

Mientras que una baja cobertura de una vacuna imperfecta conlleva a la disminución en la virulencia del patógeno, diversos modelos matemáticos han mostrado que las coberturas medias-altas tienen consecuencias distintas. En estos casos, la presión selectiva conlleva a la dominancia de cepas que tengan un mayor nivel de virulencia, y que tengan la capacidad de infectar tanto a hospederos vírgenes como a hospederos vacunados [88]. Esto implica una verdadera desventaja para los hospederos vírgenes, ya que pueden ser infectados tanto por las cepas de baja

virulencia inicialmente prevalentes en la población, así como por las cepas seleccionadas como producto de la vacunación. Dichos tipos de poblaciones conllevan a una elevación de la virulencia general de los microorganismos, debido a que la cepa proveniente de hospederos vacunados aparece con mayor frecuencia como producto de la elevada cobertura [88] (**Figura 10**).

Dichas observaciones teóricas pueden ser contrastadas con las observaciones sobre las consecuencias epidemiológicas de la introducción de la vacuna celular completa contra *Bordetella pertussis*. Esta vacuna fue introducida en diversos países en la década de 1950, con lo cual hubo una rápida disminución en la incidencia de tos ferina, ocasionada por este microorganismo. Como consecuencia de la vacunación masiva se observó una disminución importante en la incidencia de la enfermedad para la década de 1970, sin embargo, para 1996 diversos países se encontraban experimentando un incremento en la incidencia de tos ferina, esto a pesar de mantener altas tasas de cobertura de vacunación [86]. Entre las diversas hipótesis que fueron planteadas para explicar el resurgimiento de la enfermedad se incluye la posibilidad de una expansión de cepas antigénicamente distintas de aquellas utilizadas para generar la vacuna. Para evaluar esta hipótesis, investigadores en Holanda recolectaron aislados de *Bordetella pertussis* provenientes de pacientes infectados entre el periodo de 1949-1996 (pre y post vacunación masiva) para estudiar si existían variaciones en los genes que codifican para dos factores de virulencia de este microorganismo como P.69 y la toxina pertussis S1. Los resultados indicaron la presencia de tres variantes derivadas de P.69 y tres variantes de S1, las cuales conllevaron a diferentes aminoácidos en las secuencias proteicas. Una observación interesante fue que las variantes de P.69 y S1 encontradas en el periodo de tiempo de 1950 fueron idénticas en el 100% de los casos a las variantes de las cepas con las que fue preparada la vacuna celular completa. Sin embargo, variantes diferentes a las presentes en la vacuna fueron identificadas en años posteriores, y fueron encontradas en el 90% de las cepas recolectadas en el periodo 1990-1996. Los resultados sugieren una selección de cepas que son antigénicamente distintas a las encontradas en la vacuna, y se sugiere que dicha selección podría derivar de la vacunación. Por último, es importante recalcar que la vacuna protege mejor contra aquellas cepas que tienen variantes de P.69 y S1 idénticas a las encontradas en la vacuna, en comparación a cepas con variantes distintas ($p=0.024$). Este es el primer

estudio en evaluar el efecto a largo plazo (>44 años) de la vacunación masiva en términos de cambios antigénicos en la población de microorganismos. Los argumentos moleculares e inmunológicos derivados de dicho estudio sugieren que estas variaciones son la consecuencia de un proceso de selección inmunológica [88], particularmente a través de nuevas variantes presentes en factores de virulencia de dicho microorganismo, las cuales difieren de las que se encuentran en las cepas vacunales. Este desplazamiento entre cepas con factores de virulencia idénticos a los encontrados en la vacuna, por cepas con factores de virulencia distintos a los encontrados en la vacuna y su relación con la cobertura de vacunación es evidenciado en la relación inversa que existe entre el porcentaje de cepas aisladas a partir de individuos vacunados, las cuales de forma significativa son mayormente cepas con antígenos distintos a los encontrados en la vacuna. El efecto de selección a partir de la inmunidad del hospedero se ha identificado en otros patógenos, incluyendo virus (virus de la enfermedad de Marek y virus de enfermedad infecciosa de la bursa) y parásitos (*Plasmodium chabaudi*) en modelos animales. Por último, se ha estipulado que los mecanismos de los patógenos para manipular o escapar la inmunidad de su hospedero son de alta relevancia para el *fitness* del patógeno, y por lo tanto representan mecanismos predominantemente asociados a virulencia [89].

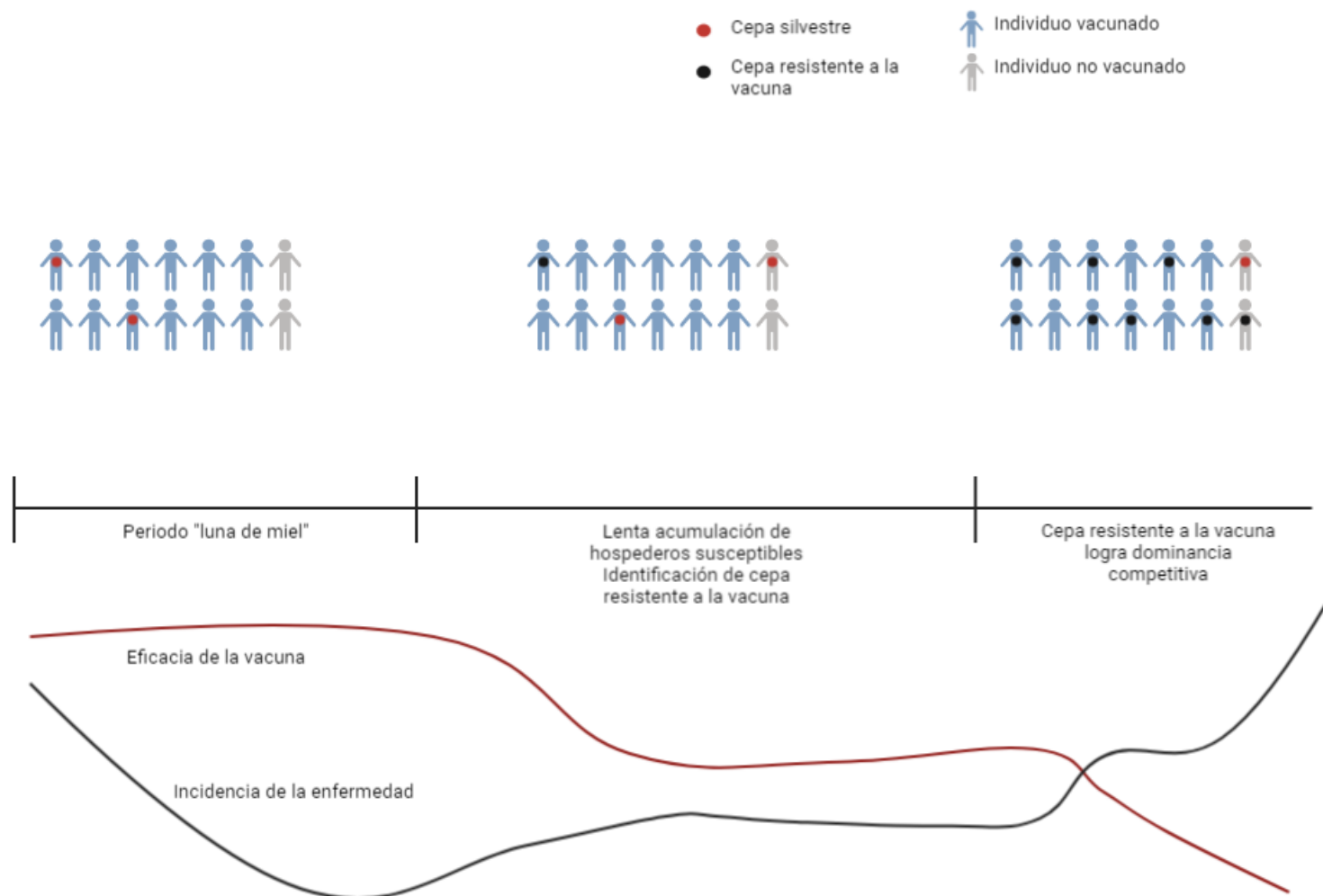


Figura 10. Aparición de patógenos resistentes frente al proceso de vacunación (Adaptado de: [90]). Figura creada en BioRender.com

4.3 La vacunación con BCG y Mycobacterium tuberculosis

Los efectos de la vacunación con BCG sobre las características genóticas y fenotípicas de MTB nunca se han estudiado previamente. Sin embargo, estudios anteriores dan evidencia respecto a la posible participación de la vacunación sobre la estructura poblacional de este microorganismo. Por ejemplo, un estudio realizado previamente evaluó la estructura poblacional de MTB en Etiopia, Túnez y Holanda, identificando una mayor cantidad de polimorfismos de DNA en Etiopia vs. Túnez. De manera interesante, Etiopia no utiliza la BCG de manera generalizada, mientras que Túnez aplica masivamente la BCG. Es posible, por lo tanto, que la vacunación en Túnez consecuentemente favoreció la selección de cepas de MTB que son resistentes a la inmunidad inducida por la BCG. Los autores extrapolan que un efecto similar pudo haber favorecido la diseminación del genotipo Beijing en el Sureste de Asia, cuya región de Asia utiliza la BCG de forma masiva desde hace varias décadas [75]. En este contexto, la BCG pudo haber actuado como una fuerza selectiva, favoreciendo cambios genéticos y fenotípicos que contribuyeron a la diseminación exitosa de las cepas del genotipo Beijing [64].

ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

El presente proyecto representa la continuación de un estudio realizado por el grupo de investigación del laboratorio de patología experimental a cargo del Dr. Rogelio Hernández-Pando, llevado a cabo en ese entonces por la estudiante de maestría Zyanya Lucia Zatarain Barrón [91]. Brevemente, se seleccionaron tres cepas a partir de una colección que incluye cepas “tipo” de laboratorio y aislados clínicos provenientes de diversas regiones del mundo. Diversos factores fueron tomados en cuenta para la selección de dichas cepas, la cepa 1 es una cepa tipo de laboratorio altamente caracterizada (H37Rv), mientras que las cepas 46 y 48 se seleccionaron por ser del genotipo Beijing (*46: Beijing típica; 48: Beijing atípica*), altamente prevalente en zonas geográficas que utilizan la vacunación global con BCG, como el Sureste de Asia. Aunado a esto, la virulencia de ambas cepas había sido previamente determinada siguiendo el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva. Al final del proceso las cepas fueron asignadas los códigos que se listan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Cepas de MTB seleccionadas para experimentación.

Código	Especie	Genotipo	Linaje*	País de origen	Individuos infectados
1	<i>M. tuberculosis</i>	Euro Americano	4	Estados Unidos	n/a
46	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	2	Vietnam	4
48	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	2	Sudáfrica	1

*Información sobre linajes obtenida a partir del trabajo de Sarkar y cols., 2012 [92].

Las cepas fueron crecidas en medio líquido 7H9 y posteriormente sembradas, contadas y colocadas en alícuotas para su almacenamiento a -80°C. Cada cepa fue utilizada para infectar un lote de 15 ratones, de los cuales 5 habían sido vacunados con 8,000 UFCs de la vacuna BCG-Phipps, 5 habían sido vacunados con 8,000 UFCs de la vacuna BCG-Vietnam y 5 habían recibido el vehículo SSE. Los animales se sacrificaron 2 meses posterior a la inoculación con las cepas 1, 46 y 48. Los pulmones fueron recuperados y posteriormente homogenizados y sembrados en agar 7H10. Las placas de agar fueron incubadas durante 2 semanas hasta observar crecimiento de

colonias, y una vez visibles, se tomaron 3 colonias de características similares a partir de los pulmones de los animales vacunados con BCG-Phipps, BCG-Vietnam y SSE. Las colonias se colocaron en medio líquido 7H9 para su expansión, y fueron recolectadas al alcanzar la fase mid-log, posteriormente fueron sembradas, contadas y almacenadas a -80°C para su uso posterior.

Las cepas parentales (1, 46 y 48) y las cepas obtenidas a partir de hospederos vacunados (1P, 1V, 1S; 46P, 46V, 46S; 48P, 48V, 48S) fueron utilizadas para infectar un nuevo lote de ratones (n=50 ratones por cepa), para así comparar la virulencia entre la cepa parental y las cepas obtenidas de los ratones vacunados, denominadas mediante el sufijo "P" (expuestas a animales vacunados con BCG-Phipps), "V" (expuestas a animales vacunados con BCG-Vietnam) y "S" (expuestas a animales sham-vacunados con SSE), dependiendo de su condición experimental previa. La virulencia en este caso fue valorada siguiendo el modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva que establece la medición de los siguientes parámetros: mortalidad de los hospederos post-infección, UFCs en homogenizados de pulmón y daño histopatológico cuantificado mediante histomorfometría. Cada experimento consideró la caracterización de la virulencia de los siguientes juegos de cepas: 46 vs. 46P, 46V, 46S; 48 vs. 48P, 48V, 48S; 1 vs. 1P, 1V, 1S.

Los resultados obtenidos a partir de estos ensayos mostraron que las cepas del genotipo Beijing (46 y 48) mostraban un incremento de virulencia al ser expuestas a ratones vacunados con BCG-Phipps y BCG-Vietnam, respectivamente (cepas 46P y 48V). En ambos casos se observó una elevada mortalidad post-infección en los hospederos infectados con las cepas provenientes de ratones vacunados, así como una cantidad significativamente mayor de UFCs presentes en los pulmones de dichos animales al día 21 post-infección (**Figura 11A-D**) y un tejido pulmonar caracterizado por la presencia de necrosis pulmonar masiva asociada a una gran cantidad de bacterias Ziehl-Neelsen positivas (**Figura 12A, 11B**).

Con base en estos resultados, se seleccionaron las cepas 46, 46P, 48 y 48V para realizar experimentos subsecuentes con el objetivo de identificar cambios genotípicos y transcripcionales que provean información relacionada al cambio de virulencia de dichas cepas posterior a la exposición al sistema inmune de los ratones vacunados con BCG (**Figura 13 y Figura 14**).

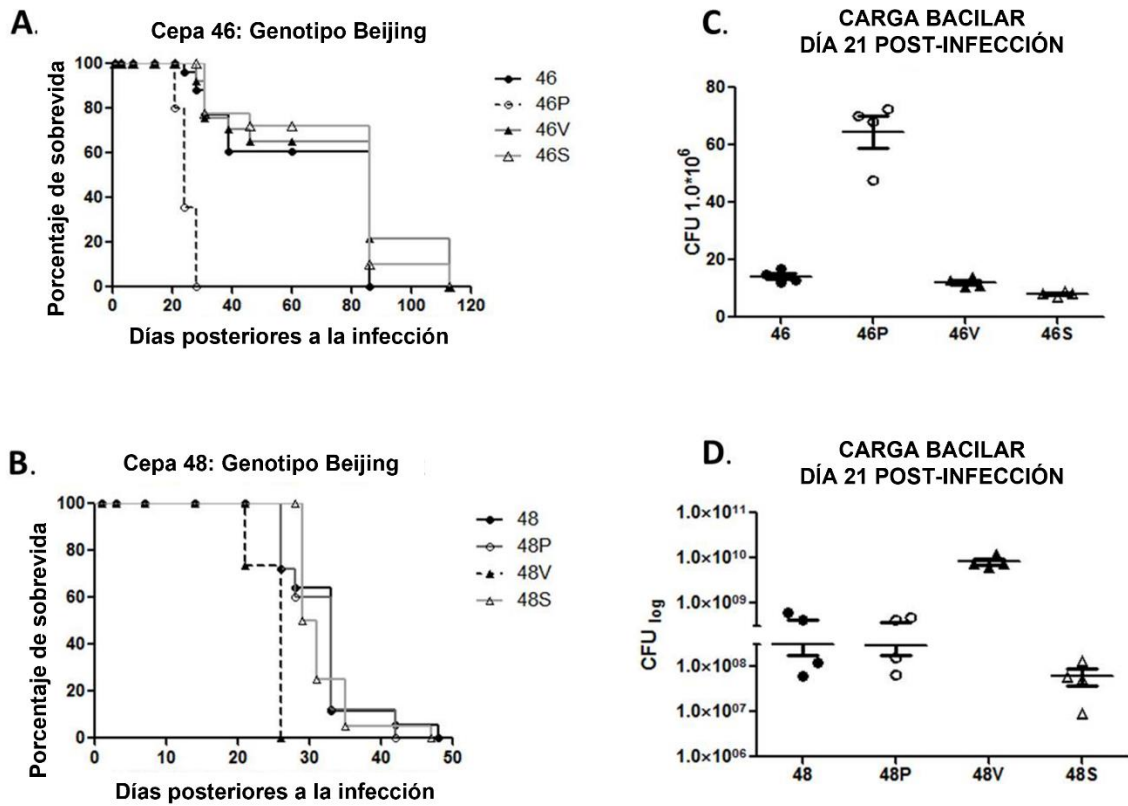


Figura 11. (A) Sobrevida de animales vírgenes infectados con las cepas 46, 46P, 46V y 46S (N=200). (B) Sobrevida de animales vírgenes infectados con las cepas 48, 48P, 48V y 48S (N=200). (C) Carga bacilar en UFCs al día 21 post-infección en animales infectados con las cepas 46, 46P, 46V y 46S (N=4 ratones por grupo experimental). (D) Carga bacilar en UFCs al día 21 post-infección en animales infectados con las cepas 48, 48P, 48V y 48S (N=4 ratones por grupo experimental).

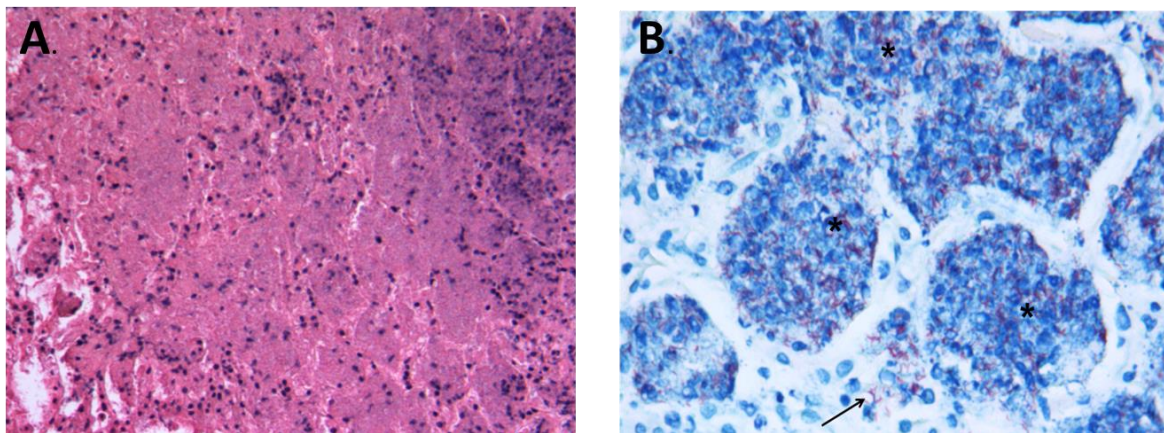


Figura 12. Imagen representativa de necrosis pulmonar en animales infectados con la cepa 46P al día 28 postinfección. La imagen muestra la pérdida completa de arquitectura pulmonar en áreas extensas, con la presencia de debris celular, núcleos picnóticos y fragmentados, así como material acidófilo ocupando el espacio extracelular. (B) Tinción de Ziehl-Neelsen mostrando las áreas necróticas con la presencia de abundantes bacterias ácido-alcohol resistentes dentro del tejido necrótico (*) pero también libres en el espacio intersticial (flecha).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen propuestas que, con base en datos epidemiológicos, sugieren una posible asociación entre la vacunación masiva con BCG en países del sureste de Asia y la selección de cepas con una mayor capacidad para evadir la respuesta inmunológica suscitada por la vacunación, como las cepas del genotipo Beijing (Linaje 2).

El estudio del complejo *Mycobacterium tuberculosis* ha revelado su amplia variabilidad genética, volviendo necesario el desarrollo de nuevas estrategias que permitan determinar de manera precisa las variaciones genotípicas que impliquen variabilidad en el curso de la enfermedad.

Las tecnologías de secuenciación masiva pueden contribuir de manera importante a correlacionar genotipos específicos de cepas con un comportamiento determinado. Actualmente no existen estudios, en el mejor de nuestros conocimientos, que indaguen sobre el efecto de la vacunación en la virulencia de cepas del genotipo Beijing de MTB, así como los posibles cambios a nivel genómico y transcriptómico que podrían asociarse a perfiles de virulencia variables.

Por lo anterior, proponemos explorar, en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva, el efecto de la vacunación sobre la virulencia de diversas cepas de MTB, así como explorar variantes genómicas y cambios en el transcriptoma del hospedero posiblemente relacionadas a cada fenotipo.

JUSTIFICACIÓN

La vacunación con BCG no ha sido suficiente como estrategia profiláctica para lograr un control global de la tuberculosis. Aunado a ello, existen genotipos del linaje moderno de MTB para los cuales la evidencia experimental indica se promueve un menor nivel de protección por la vacunación con BCG. Por estos motivos, es necesario identificar mediante estrategias de secuenciación masiva los posibles cambios generados en la bacteria posterior a ser expuesta a un hospedero vacunado, así como los cambios transcripcionales en el hospedero que se asocian con un curso más grave de la enfermedad.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen variantes genómicas en las bacterias del genotipo Beijing de MTB 46 y 48 posterior a ser expuestas al sistema inmune de hospederos vacunados con BCG y existen cambios en el transcriptoma de los hospederos infectados con bacterias recolectadas de ratones vacunados?

HIPÓTESIS

Las cepas del genotipo Beijing que fueron expuestas al sistema inmunológico de ratones vacunados con BCG presentarán un perfil de virulencia y genómico distinto, y producirán un perfil transcriptómico distinto en ratones infectados, en comparación al de las cepas parentales.

OBJETIVO GENERAL

Valorar el efecto de exposición a hospederos vacunados con BCG mediante la secuenciación masiva del genoma de cepas de MTB del genotipo Beijing y el transcriptoma de hospederos infectados con dichas bacterias para identificar si existen cambios en dichos perfiles.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Secuenciar el genoma de las cepas 46 y 48 (cepas parentales) y de las cepas 46P y 48V (bacterias recolectadas de pulmones de animales vacunados con BCG Phipps y BCG Vietnam, respectivamente).
2. Ensamblar *de novo* los genomas secuenciados.
3. Anotar los genomas obtenidos.
4. Identificar variantes genéticas entre las cepas 46 vs. 46P y 48 vs. 48V, mediante una comparación contra una cepa referencia del genotipo Beijing.
5. Estandarizar la recolección diferencial de RNAm de MTB y de ratón utilizando como muestra el tejido pulmonar de ratones infectados con las cepas 46, 46P, 48 y 48V para obtener RNAm de calidad y cantidad suficiente para su uso en técnicas de secuenciación masiva.
6. Obtener RNAm huésped/hospedero de pulmones de ratones infectados con las cepas 46, 46P, 48 y 48V y sacrificados al día 21 postinfección.
7. Secuenciar el transcriptoma del hospedero obtenido de los pulmones infectados con las cepas 46, 46P, 48 y 48V.
8. Mapear las lecturas obtenidas contra el genoma de referencia de *Mus musculus*.
9. Identificar expresión diferencial en genes expresados por parte del hospedero al ser infectado con las cepas 46 vs. 46P y 48 vs. 48V.
10. Utilizar sondas de captura biotiniladas para enriquecer las muestras de RNA de transcritos de MTB.
11. Identificar los genes de MTB con mayor expresión durante la infección *in vivo* a partir de RNAm bacteriano proveniente de muestras de tejido pulmonar infectado con las cepas 46, 46P, 48 y 48V y enriquecido por sondas de captura.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Diagrama de Flujo

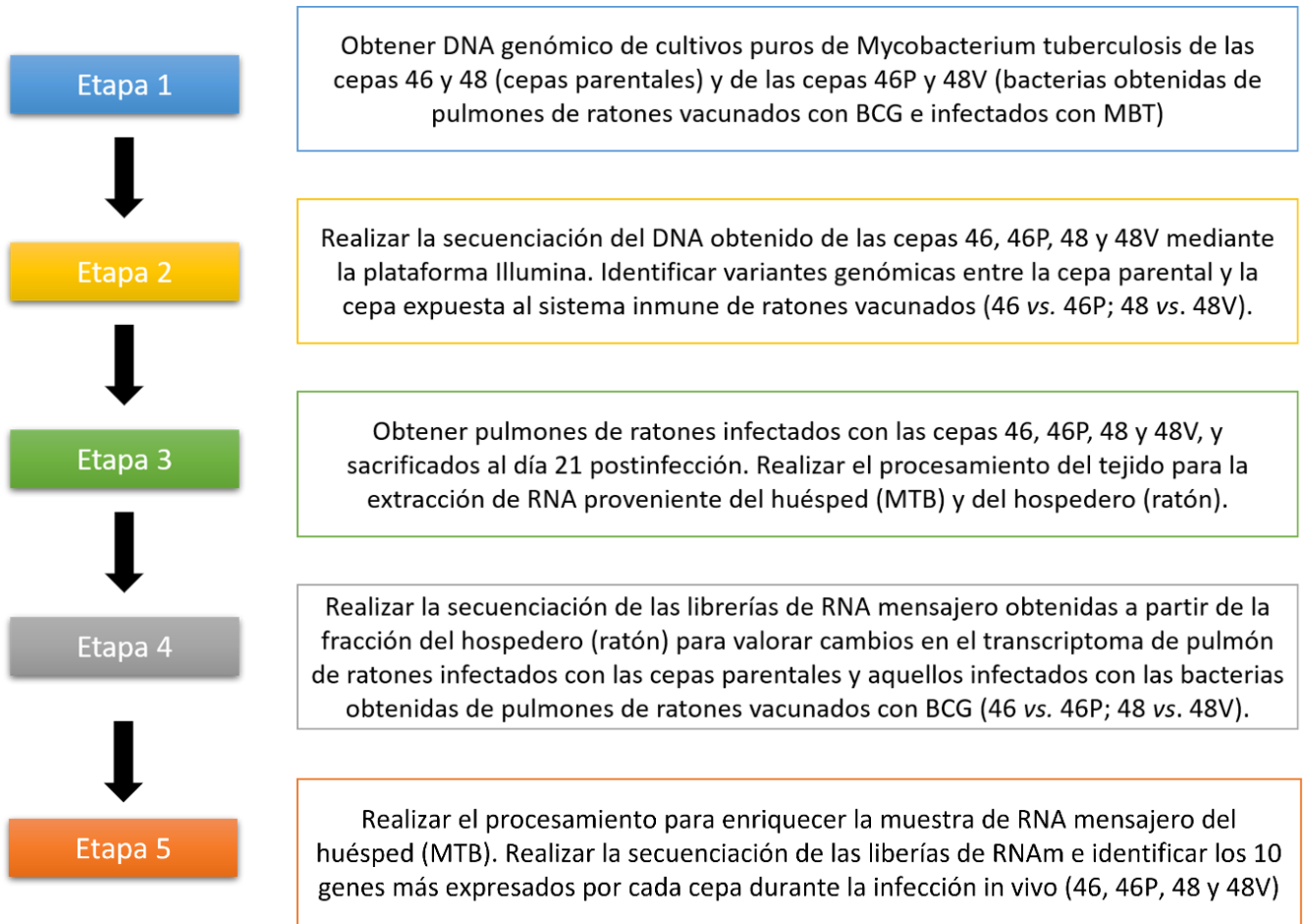


Figura 13. Diagrama de flujo mostrando el diseño experimental

DISEÑO EXPERIMENTAL

Esquema ilustrado

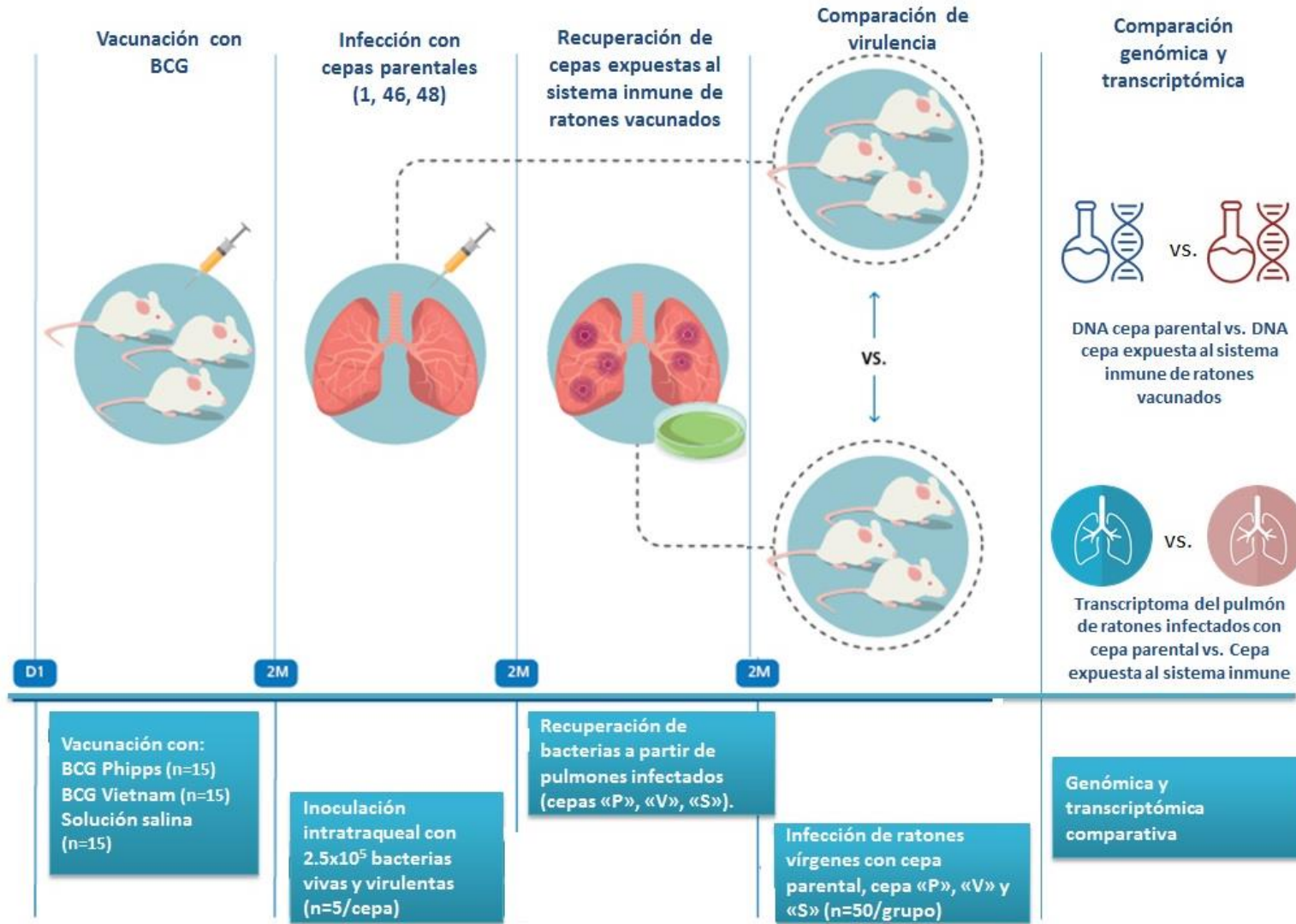


Figura 14. Diseño experimental esquemático.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo experimental

Como se estableció en el marco teórico, MTB es un patógeno cuyo hospedero natural son los humanos, a quienes infecta preferentemente y en cuyo medio logra completar su ciclo de vida. Es por lo tanto un gran reto encontrar un modelo experimental que reproduzca *exactamente* la enfermedad tal cual se produce en humanos por parte de este microorganismo. Hasta la fecha, no existe un modelo único que presente todos los diversos aspectos de la patogénesis de la enfermedad en humanos, por lo tanto es de gran importancia seleccionar el modelo experimental con base en sus fortalezas pero conociendo sus limitaciones antes de extrapolar los resultados obtenidos [93]. Entre los diferentes modelos *in vivo* se incluyen los cobayos, ratones, conejos y primates no humanos (PNH). Cada uno posee ventajas y limitaciones específicas que se resumen en la **Tabla 4**. El modelo murino, entre estos, es uno de los modelos más ampliamente utilizados por diversas razones, incluyendo el fácil manejo, bajo costo, poco espacio requerido y la amplia disponibilidad de herramientas inmunológicas y genéticas para realizar investigación.

El modelo experimental utilizado para llevar a cabo estos experimentos es el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva descrito por Hernández-Pando y cols. [94]. Este modelo experimental utiliza ratones macho de la cepa BALB/c que tienen entre 6-8 semanas de vida. Los animales son infectados por la vía intratraqueal con 250,000 UFCs de bacterias de la cepa H37Rv vivas y virulentas. Posteriormente, los animales son seguidos a lo largo de un periodo de 4 meses para documentar muertes espontáneas ocurridas como consecuencia de la infección. Durante este periodo, se lleva a cabo una cinética de sacrificios para ir siguiendo el proceso histopatológico y la carga bacteriana a lo largo de la infección, grupos de n=5 animales son sacrificados el día 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 postinfección. En este modelo experimental se distinguen dos fases de la enfermedad. La primera es una etapa aguda, caracterizada por la presencia de infiltrado inflamatorio en el intersticio alveolo-capilar, vasos sanguíneos y pared bronquial, con la formación de granulomas. La fase aguda tiene una duración de 1-28 días con una predominancia de células Th1, manifestado por una alta producción de IL-2 y de IFN- γ . Posteriormente sigue una fase crónica la cual

se caracteriza por neumonía, necrosis y fibrosis focal, así como un aumento en la producción de IL-4 y decremento en IFN- γ .

Tabla 4. Características de los distintos modelos experimentales de tuberculosis

Modelo	Tipo de lesiones pulmonares	Susceptibilidad a MTB	Costos asociados a mantenimiento	Aplicaciones frecuentes
Murino	No tiende a formar lesiones necróticas ni cavitaciones	Baja	Costos bajo-moderados	Inmunología de la tuberculosis. Evaluación de candidatos farmacológicos y de vacunación.
Cobayos	Tiende a formar lesiones necróticas y centros caseosos, pero rara vez genera cavitaciones.	Alta	Costos moderados	Seguridad y eficacia de vacunas.
Conejos	Forman lesiones con necrosis, centros caseosos y cavitaciones.	Depende de la cepa de MTB. Mayor susceptibilidad a <i>M. bovis</i> .	Costos moderados-altos	Modelo de transmisión. Utilizado también para formas raras de la TB (meníngea; cutánea)
PNH	Forman lesiones con necrosis, centros caseosos y cavitaciones.	Alta	Costos altos	Evaluación de eficacia de fármacos y vacunas; estrategias terapéuticas; estudio de respuestas patológicas/inmunológicas a MTB.
Pez zebra	-	Susceptible a <i>M. marinum</i> .	Costos bajo-moderados	Modelo de infección latente; dinámica de formación de granulomas.

*Adaptada de Kumar & Gupta (2018).

Selección de cepas de MTB y crecimiento en medio de cultivo

Se seleccionaron cuatro cepas a partir de datos de experimentos previos (descritos en la sección antecedentes), las cuales presentaron diferencias en sus niveles de virulencia a partir de la exposición al sistema inmunológico de ratones previamente vacunados con una de dos cepas de BCG (BCG Phipps; BCG Vietnam). Diversos factores fueron tomados en cuenta para la selección de dichas cepas, incluyendo su genotipo (se incluyeron a dos cepas del genotipo Beijing [cepas 46 y 48]), su lugar de origen (la cepa 46 fue recolectada en el Sureste de Asia, en el país de Vietnam; la cepa 48 fue recolectada en el país de Sudáfrica). Por último, se consideró si la cepa pertenecía al subgrupo de bacterias “típicas” o “atípicas” del genotipo Beijing (46: Beijing típica; 48: Beijing atípica). Aunado a estos factores importantes, las cepas 46 y 48 habían sido previamente utilizadas en un modelo experimental el cual tuvo como objetivo evaluar el efecto de la vacunación sobre la virulencia de dichas bacterias (sección de **Antecedentes**). La **Tabla 5** muestra un resumen de las características de las bacterias elegidas para los experimentos de genómica y transcriptómica comparativa.

Tabla 5. Cepas de MTB seleccionadas para experimentos de genómica y transcriptómica

Código	Especie	Genotipo	Linaje	Características
46	M. tuberculosis	Beijing	2	Recolectada en Vietnam en el 2002. Transmisión n=4.
46P	M. tuberculosis	Beijing	2	Recolectada a partir de ratones vacunados con BCG Phipps e infectados con la cepa parental 46. Mayor virulencia en comparación con su cepa parental.
48	M. tuberculosis	Beijing	2	Recolectada en Sudáfrica a partir de un paciente masculino, baciloscopia (+++). Transmisión n=0.
48V	M. tuberculosis	Beijing	2	Recolectada a partir de ratones vacunados con BCG Vietnam e infectados con la cepa parental 48. Mayor virulencia en comparación con su cepa parental.

Las cepas seleccionadas se crecieron en medio líquido Middlebrook 7H9 (Laboratorios Difco, Detroit, MI, USA) adicionado con glicerol, Tween-80 y enriquecido con ADC (albumina, dextrosa y catalasa) a 37°C, en agitación a 75 RPM. Una botella del cultivo líquido fue utilizada para determinar el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica usando un espectrofotómetro y realizando lecturas seriadas del crecimiento bacteriano cada tercer día a 600 nm (DO₆₀₀). A partir de estos datos se determinó el momento en el que el crecimiento bacteriano alcanzó fase mid-log. En ese momento las bacterias fueron recuperadas mediante la centrifugación del cultivo a 3000 RPM durante 5 minutos, el pellet que se obtuvo se utilizó para realizar la extracción de ADN, posterior a la valoración de su pureza por tinción Ziehl-Neelsen y siembra en agar sangre.

Extracción de DNA a partir de bacterias provenientes de cultivo líquido

Se utilizó el kit de ZYMO Research *Quick-DNA*TM Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Catálogo D6010). La extracción se realizó siguiendo el protocolo diseñado para bacterias. Inicialmente, se resuspendió el pellet bacteriano obtenido a partir del cultivo en 1 mL de SSE. Se tomaron 200 µL de dicho concentrado bacteriano, se lavaron con SSE (total de dos lavados) y se le agregaron 800 µL de buffer de lisis con RLT-βmercapto. Dicha mezcla fue homogenizada con la pipeta y colocada en un tubo *bashing-beads*. Las células fueron lisadas en un equipo MP fastprep a una velocidad de 6.5 durante 1 minuto. Se centrifugó el tubo a 10,000 x g por un minuto y se

colocaron 400 μL en una columna Zymo-Spin III-F para su centrifugación a 8,000 x g por 1 minuto. Se agregó 1,200 μL de Buffer de lisis al tubo colector del paso anterior. Se transfirieron 800 μL de la mezcla a una columna Zymo-Spin IICR en un tubo colector y se centrifugó a 10,000 x g por 1 minuto. Se eliminó el líquido y se repitió el paso con el resto del contenido. Se añadieron 200 μL del *DNA Pre-Wash Buffer* a la columna y se centrifugó a 10,000 x g por un minuto. Se añadieron 500 μL del *g-DNA Wash Buffer* a la columna. Se centrifugó a 10,000 x g por un minuto. La columna fue transferida a un tubo de microcentrífuga limpio. Se añadieron 100 μL del DNA Elution Buffer. La columna con el buffer fue incubada por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 10,000 x g por 30 segundos para eluir el ADN. La integridad del ADN eluido fue valorada mediante electroforesis en un gel de agarosa, y su concentración fue medida usando un espectrofotómetro multiposos EPOCH (Biotek, Estados Unidos) a 260 nm. Una vez cuantificado, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Recuperación de pulmones provenientes de ratones infectados con las cepas 46, 46P, 48 y 48V al día 21 postinfección

Se utilizó el modelo de infección pulmonar progresiva con MTB en ratones BALB/c, previamente descrito y caracterizado [94, 95]. Brevemente, se sembraron cultivos líquidos a partir del lote semilla de cada una de las cepas seleccionadas (46, 46P, 48 y 48V). Cada lote semilla se mantiene a -80°C , se extrae del REVCO y manteniendo la muestra en hielo seco esta es raspada para recuperar bacterias sin descongelar el lote. Dicho raspado se coloca en medio líquido 7H9 suplementado con glicerol, Tween-80 y OADC (ácido oleico, dextrosa, albumina y catalasa) y posteriormente se incuba en agitación a 35°C , 75 RPM. Los cultivos fueron monitoreados y recuperados cuando alcanzaron la fase mid-log. La viabilidad bacteriana fue valorada usando el kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Eugene, OR) para citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los cultivos líquidos fueron centrifugados a 10,000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se eliminó y el botón fue resuspendido en 2 mL de NaCl al 0.85%. Un mL de esta suspensión se colocó en un nuevo tubo Falcon de 50 mL y se agregaron 20 mL de NaCl al 0.85%, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. La muestra se centrifugó a 10,000 x g durante 15 minutos y posteriormente fue resuspendida en 20

mL de NaCl al 0.85% y centrifugado nuevamente a 10,000 x g durante 5 minutos para eliminar trazas de medio de cultivo. El botón fue resuspendido en un tubo diferente con 10 mL de NaCl al 0.85% y 1 mL de esta suspensión fue utilizado para valorar por densidad óptica con un espectrofotómetro a 600 nm. La suspensión fue diluida en 1:100 en agua estéril filtrada, y esta nueva solución fue utilizada para preparar diferentes diluciones en tubos compatibles con citómetro en un volumen total de 2 mL. Se preparó una mezcla con 35 μ L de componente A y 35 μ L de componente B. Se agregaron 6 μ L de esta mezcla a cada muestra. Posteriormente la mezcla se incubó en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los datos posteriormente fueron adquiridos usando un citómetro y procedimientos estándar. El kit utilizado contiene SYTO9 y yoduro de propidio, por lo cual las bacterias son marcadas en rojo cuando están muertas y en verde cuando están vivas. Todas las cepas de MTB se valoraron para asegurar que tuvieran un mínimo de 90% viabilidad celular para poder ser utilizadas en experimentos animales. Adicionalmente todas las recuperaciones de bacterias se realizaron en una campana de flujo laminar y una muestra de cada frasco se utilizó para realizar tinciones de Ziehl-Neelsen y Gram previo a continuar con la recuperación. En caso de que se observaran únicamente bacilos ácido-alcohol resistentes en las tinciones se procedía a la recuperación, una muestra de cada cepa fue sembrada en agar sangre para corroborar su pureza a los 2 días. Cualquier crecimiento ajeno a MTB constituía una muestra contaminada lo cual conllevaba a su desecho inmediato.

Una vez que las bacterias de cada lote fueron valoradas con respecto a su pureza y viabilidad, estas fueron utilizadas para realizar diluciones seriadas con PBS-Tween 80, y posteriormente cada dilución fue sembrada en agar 7H10. Las cajas de agar sembradas se incubaron a 37°C con 5% CO₂ durante un periodo entre 14-21 días hasta observar el crecimiento de colonias. El número de colonias fue contado y extrapolado para mostrar los datos como UFC por mL de suspensión bacteriana. Utilizando estos datos, se calculó el inóculo para la infección de animales.

Tubos individuales conteniendo 1 mL de suspensión de cada cepa de MTB (46, 46P, 48, 48V) fueron descongelados a 37°C y preparados para infectar grupos de 50 ratones macho de la cepa BALB/c entre 6-8 semanas de edad vírgenes a vacunación. La solución para inocular a los animales fue preparada considerando un total de 250,000 bacterias en 100 μ L de SSE. Una vez preparados los inóculos, se realizó la

siembra de soluciones seriadas de cada preparado como control de calidad del proceso de infección. Una vez infectados, los animales fueron monitoreados y sacrificados de acuerdo con el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva previamente descrito. Brevemente, n=5 ratones por grupo fueron sacrificados posterior a anestesia total en los días 1, 3, 7, 14, 21 y 28 (en caso de llegar a este punto en la cinética). Se realizó un lavado exhaustivo de la región torácica de cada ratón. Los pulmones fueron extraídos utilizando dos juegos de material quirúrgico previamente esterilizado y posteriormente fueron colocados en criotubos estériles e inmersos en nitrógeno líquido para su congelación. Posteriormente los criotubos se colocaron a -80°C hasta su uso posterior.

Tres muestras de cada tiempo experimental fueron procesadas para análisis histopatológico como parte del control experimental de reproducibilidad del tipo de daño previamente observado utilizando estas cepas en este modelo murino. Brevemente, el pulmón izquierdo de tres de los animales sacrificados fue perfundido por la vía traqueal para su fijación química con alcohol absoluto. Los pulmones fueron posteriormente deshidratados y embebidos en parafina. Se cortaron secciones de 4 μm de cada bloque y se tiñeron utilizando la tinción de rutina, Hematoxilina y eosina, para poder evaluar hallazgos histopatológicos. Los parámetros histopatológicos evaluados en este estudio incluyen neumonía (expresado como el porcentaje del área pulmonar afectada); necrosis (expresado como el porcentaje del área pulmonar afectada); número promedio de granulomas por sección pulmonar evaluada y tamaño promedio de los granulomas por sección pulmonar evaluada (en μm^2). Las definiciones de cada parámetro han sido previamente establecidas en este modelo murino, brevemente la neumonía se define como áreas de infiltrado inflamatorio que ocupan el lumen alveolar y el intersticio alveolocapilar. La necrosis se definió como áreas con destrucción de la arquitectura del parénquima pulmonar con abundante debris celular eosinofílico, junto con núcleos fragmentados o cariorexis. Para la cuantificación del área de los granulomas, los granulomas se definieron como agregados nodulares bien delimitados de linfocitos y macrófagos los cuales pueden incluir células dendríticas y fibroblastos en respuesta a una infección de MTB [94, 96], los cuales fueron evaluados en toda la extensión del corte histológico de cada pulmón estudiado. Todos los parámetros se reportan como valor promedio y desviación estándar de tres sujetos distintos. Las evaluaciones histomorfométricas fueron

realizadas utilizando un analizador automatizado de imágenes (QWin Leica, Milton Keynes, Cambridge, UK).

Extracción diferencial de RNA huésped/hospedero

Los pulmones obtenidos a partir de la cinética de infección previamente descrita fueron posteriormente utilizados para extracción de RNA utilizando una técnica estandarizada durante los estudios de posgrado. Mediante esta metodología se logra una separación parcial del RNAm contenido en la muestra en RNAm del hospedero (ratón) y RNAm del huésped (bacteria), para realizar la secuenciación de cada una y así conocer la expresión de genes en el momento clave de la infección *in vivo*.

Los pulmones obtenidos a partir del sacrificio realizado al día 21 postinfección son tomados del Revco y colocados en nitrógeno líquido para evitar su descongelamiento. Posteriormente, se enfría un mortero y pistilo con nitrógeno líquido y se coloca el pulmón junto con una cantidad generosa de nitrógeno para comenzar su maceración. El tejido es macerado hasta obtener un polvo fino, agregando nitrógeno líquido para mantener la muestra fría en todo momento. El macerado se coloca en tubos eppendorf previamente enfriados en nitrógeno líquido y se almacenan nuevamente en el Revco hasta su uso posterior. Es de suma importancia asegurarse que la muestra nunca presente aumentos de temperatura que lleven a su descongelamiento para evitar la degradación del RNA. También es de suma importancia utilizar un mortero y pistilo distinto con cada triplicado de muestras que se vayan a macerar para evitar contaminación cruzada. Una vez teniendo el tejido macerado de cada cepa (n=3 pulmones por cada cepa) se procede a realizar la extracción de RNA.

La extracción de RNA se lleva a cabo a partir del tejido pulverizado utilizando el kit de ZYMO Research *Quick-RNATM* MiniPrep (Catálogo R1054). Inicialmente, los buffers que contiene el kit se colocan en una hielera con hielo (exceptuando el buffer de lisis). Posteriormente, el Buffer de Lisis RLT plus se suplementa con β -mercapto etanol (10 μ L de β mercapto etanol por cada 100 mL de RLT plus). Se inicia el procedimiento preparando un tubo con 200 μ L de RLT y añadiendo 5 μ L del inhibidor de RNAsas murino (NewEngland Biolabs, M0314S) por cada muestra de tejido que se va a trabajar. Previo a descongelar las muestras, se debe pre-tratar una columna verde por cada muestra a trabajar. Se lava la columna con 400 μ L de RNA Wash Buffer y se centrifuga a 10,000 x *g* /1 min/4°C. Se prepara la siguiente mezcla por cada columna:

75 μ L de DNA Digestion Buffer + 5 μ L de DNase I. Se agregan los 80 μ L a la columna ya lavada con Wash Buffer y se deja incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga a 10,000 x g /1 min/4°C. Una vez teniendo las columnas y el RLT con inhibidor de RNAsas listo, se extraen del Revco las muestras de pulmón macerado y se colocan en una hielera con nitrógeno líquido. Se trabaja una muestra a la vez, colocando el polvo en el tubo que contiene el RLT e inhibidor de RNAsas, se mezcla por pipeteo y se agregan 400 μ L adicionales de RLT plus suplementado, se mezcla nuevamente por pipeteo, cuidando que no queden restos de tejido sin homogenizar. Si la mezcla es muy gruesa se recomienda homogenizar con la pipeta 6 veces y colocar en hielo durante un minuto antes de volver a homogenizar. Una vez homogenizado se centrifuga la muestra a 14,000 x g /5 min/4°C. Se decanta el sobrenadante y al pellet se le agregan 600 μ L buffer de lisis para posteriormente homogenizar, es importante no colocar esta muestra en el hielo. Inmediatamente se pasa la mezcla a una columna amarilla de eliminación de DNA genómico y se centrifuga a 10,000 x g /1 minuto/4°C, se conserva el filtrado el cual es agregado a una columna de eliminación de DNA genómico de Quiagen, y posteriormente se centrifuga 10,000 x g /1 minuto/4°C. Al filtrado se le agregan 600 μ L ETOH 100% y se homogeniza. La mezcla se coloca en la columna verde de purificación de RNA previamente tratada con DNasa. Se centrifuga a 10,000 x g /1 minuto/4°C y se decanta el filtrado. Se agrega el contenido restante por la columna verde nuevamente centrifugando a 10,000 x g /1 minuto/4°C. Se agrega a la columna 400 μ L del prep-Buffer y se centrifuga a 10,000 x g /1 minuto/4°C para posteriormente descartar el sobrenadante. La columna se deja secar con la tapa abierta por 2 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 35 μ L de agua libre de RNAsas en el centro de la membrana. Se centrifuga a 14,000 x g /2 min/4°C en un tubo eppendorf 1.5 mL estéril y rotulado con los datos de la muestra. Se repite este último paso con 35 μ L adicionales de agua para tener al final dos eluciones de RNA de 35 μ L cada una. Se toman 2 μ L de cada elución y se almacenan aparte para cuantificar la muestra. Otros 2 μ L de cada elución son almacenados en otro tubo para ser utilizados en la electroforesis de control de calidad de la muestra. Por último, se almacenan 2 μ L de cada muestra en un tubo Eppendorf para cuantificación del Número de Integridad Ribosomal (RIN). El RNA obtenido a partir de este procesamiento se almacena como RNA huésped (MTB); el procedimiento se repite con otro tubo que contenga

macerado de pulmón del mismo sujeto experimental, siguiendo el mismo protocolo exceptuando la centrifugación inicial a $14,000 \times g / 5 \text{ min} / 4^\circ\text{C}$; el RNA obtenido de este segundo macerado se almacena rotulado como RNA hospedero (ratón). Se realiza la extracción de 6 muestras de tejido (3: RNA huésped/ 3 RNA hospedero) proveniente de 3 ratones distintos sacrificados al día 21 postinfección con cada cepa (46, 46P, 48 y 48V). Una vez analizado el RIN se continúa el procesamiento para enriquecimiento de RNAm y creación de librerías de RNA.

Elaboración de librerías de DNA y secuenciación

El DNAg obtenido a partir de cada cepa de MTB (46, 46P, 48 y 48V) se cuantificó por espectrofotometría utilizando el equipo EPOCH, se calculó la cantidad total de DNA presente en la muestra considerando el volumen y se procedió a realizar el protocolo de preparación de librería siguiendo las instrucciones del kit Illumina TruSeq DNA PCR-Free library prep kit (Illumina, San Diego, USA, Cat. No. 20015962). Cada librería fue construida partiendo de $2 \mu\text{L}$ de DNAg proveniente de cada cepa (46, 46P, 48, 48V). El protocolo consiste en 6 pasos generales: Fragmentación del DNA, Reparación de extremos y selección del tamaño de la librería, adenilación de extremos 3', ligación de adaptadores, control de calidad de la librería y normalización de librerías.

Se preparan los reactivos para la fragmentación del DNA, durante este paso fragmentamos la muestra de DNAg para obtener un inserto de 550 pb. Se descongelan y/o atemperan los reactivos Resuspension buffer (RSB) y las perlas sample purification beads (SPB) (estas últimas deben estar a temperatura ambiente para trabajar correctamente). Normalizar el DNAg con RSB para obtener $2 \mu\text{L}$ de DNAg en un volumen total de $55 \mu\text{L}$. Mezclar con la pipeta y centrifugar brevemente. Transferir $52.5 \mu\text{L}$ de la muestra de DNA a un tubo Covartis. Centrifugar los tubos a $280 \times g / 5$ segundos. Fragmentar en el equipo considerando los parámetros para un inserto de 550 pb y posteriormente centrifugar a $280 \times g / 5$ segundos. Transferir $50 \mu\text{L}$ de la muestra a una placa de 96 pozos. Mezclar con el vortex y posteriormente agregar $80 \mu\text{L}$ de SPB a cada pozo. Mezclar por pipeteo e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente centrifugar a $280 \times g / 1 \text{ min}$. Colocar en una gradilla magnética y esperar aproximadamente 8 minutos hasta que el líquido se aclare. Eliminar el sobrenadante de cada pozo y lavar dos veces agregando $200 \mu\text{L}$

de alcohol 80% fresco a cada pozo, incubar con las perlas magnéticas por 30 segundos, remover y eliminar el sobrenadante de cada pozo. Al final del segundo lavado, utilizar una pipeta de 20 μL para eliminar cualquier traza de alcohol remanente y dejar que las perlas se sequen en la gradilla magnética por 5 minutos. Posteriormente, agregar el RSB a cada pozo y mezclar por pipeteo. Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos y centrifugar a $280 \times g$ /1 minutos. Colocar en la gradilla magnética y esperar a que el líquido se aclare, transferir 50 μL del sobrenadante a una nueva placa de 96 pozos. En el siguiente paso se utilizará el End-Repair Mix (ERP) para convertir los extremos de las muestras en extremos romos (una exonucleasa elimina los extremos colgantes del extremo 3', y una polimerasa completa los extremos 5'). Agregar 10 μL de end-repair control (CTE) a cada pozo y posteriormente agregar 40 μL de ERP. Mezclar con la pipeta, centrifugar y colocar en el termociclador con el programa para reparación de extremos. Cada pozo debe contener 100 μL . Posteriormente mezclar en el vortex y agregar 160 μL de SPB diluido en agua grado PCR. Mezclar con la pipeta e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugar a $280 \times g$ /1 min y colocar en gradilla magnética hasta que el líquido se aclare. Transferir 250 μL del sobrenadante a una plaza de 96 pozos y descartar las SPB remanentes. Posteriormente, agregar 30 μL de perlas SPB a cada pozo, mezclar con la pipeta e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a $280 \times g$ /1 minutos y colocar en gradilla magnética hasta que el líquido se aclare. Eliminar el sobrenadante de cada pozo y lavar las perlas dos veces con alcohol 80%, dejar secar las perlas por 5 minutos posterior al segundo lavado y agregar 17.5 μL de RSB a cada pozo, retirar de la gradilla magnética y mezclar con la pipeta. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a $280 \times g$ /1 minuto. Colocar en gradilla magnética hasta que el líquido se aclare y transferir 15 μL a un pozo en una placa de 96 pozos. Posteriormente pasamos a la adenilación de los extremos, en este paso se agrega un nucleótido de adenina al extremo romo 3' para evitar que se unan extremo con extremo durante la reacción para ligar los adaptadores. Cada adaptador posee un nucleótido complementario (Timina [T]) en el extremo 3' para poder ligar el adaptador al fragmento. Con esto se disminuye la formación de quimeras (templados concatenados). Se agrega 2.5 μL de control de adenilación de extremos (CTA) a cada pozo, posteriormente se agregan 12.5 μL de mezcla de adenilación (ATL) y se mezcla con la pipeta, posteriormente se coloca en el

termociclador y se corre el programa ATAIL70, cada pozo contiene un volumen de 30 μL . Una vez que concluye este paso pasamos a la ligación de los adaptadores. Se agregan a cada pozo los siguientes reactivos: control de ligación (CTL) (2.5 μL), mezcla de ligación (LIG) 2 (2.5 μL), y adaptadores de DNA (2.5 μL). Mezclar con la pipeta y centrifugar a 280 x g /1 minuto. Incubar en el termociclador y correr el programa LIG, cada pozo contiene un volumen de 37.5 μL . Agregar 5 μL de mezcla para parar ligación (STL) a cada pozo y mezclar con la pipeta, centrifugar a 280 x g /1 minuto y limpiar los fragmentos ligados utilizando las perlas SPB (se corren dos pasos de limpieza, en el primero se utilizan 42.5 μL de perlas y en el segundo 50 μL de perlas). Del producto de estas dos rondas de limpieza, se transferirán 20 μL a una nueva placa para poder posteriormente hacer la evaluación de calidad de la librería. Se verifica el tamaño del fragmento mediante el Bioanalyzer usando un chip High Sensitivity DNA kit. Por último, se normaliza la librería a 4 nM y se genera el pool de librerías para secuenciación agregando volúmenes iguales de cada librería a la placa Pooled diluted cluster template plate (PDP). Cada librería fue secuenciada en versión paired-end (2 x 150) usando un equipo Illumina NextSeq500 en el Instituto de Biotecnología (IBT, Cuernavaca, México).

Tratamiento de RNA total para la preparación de librerías

Una vez que se haya corroborado la integridad del RNA total extraído a partir de las muestras de tejido pulmonar macerado (RIN >7.0), las muestras son sometidas a un proceso de enriquecimiento de RNAm previo a su secuenciación.

La estrategia inicial para la caracterización del transcriptoma de la bacteria implica la depleción del RNA ribosomal (RNAr) a partir de la muestra de RNA total, para lo cual se utiliza el kit RiboZero Epidemiology (Epicentre, Madison, Wisconsin, USA. Cat. No. MRZE724). Se siguen los pasos indicados en el protocolo elaborado por la compañía. Inicialmente se deben dejar atemperar los reactivos que contiene el kit (los reactivos que están a -80 tardan hasta 1 hora en descongelarse, por lo cual se debe anticipar este tiempo antes de sacar las muestras de RNA del congelador para evitar su degradación). Para preparar las perlas magnéticas se colocan 225 μL por cada muestra que se va a trabajar en un tubo eppendorf. Se colocan en la gradilla magnética por un minuto y se elimina el sobrenadante. Se agregan 225 μL de agua libre de RNAsas y se mezcla en el vórtex brevemente. Posteriormente, se colocan en

la gradilla magnética un minuto y se elimina el sobrenadante. Este paso se repite para un total de dos lavados. Posterior al último lavado, se remueven los tubos de la gradilla magnética y se agregan 60 μL de solución de resuspensión, se mezcla brevemente en el vórtex y se dividen en nuevos tubos eppendorf, agregando 65 μL de las perlas magnéticas y 1 μL de inhibidor de RNAsas, este tubo se mezcla brevemente en el vortex y se dejan a temperatura ambiente hasta su uso. Para iniciar el procesamiento de las muestras se agrega en un tubo de 0.2 mL los siguientes reactivos en el orden indicado: agua (volumen depende de muestra), RZ reaction buffer 4 μL , muestra RNA (volumen depende de concentración de muestra, agregar equivalente a 1 μg), ribozero removal solution 8 μL , el volumen final de la muestra debe ser de 40 μL , los volúmenes de agua y RNA se deben ajustar para dar este volumen final en cada muestra. Se agita la reacción y se incuba a 68° durante 10 minutos. Se saca del termociclador y se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos. En estos minutos se debe precalentar el termociclador a 50°. Para continuar con la reacción de perlas y remoción del RNAr se deben agregar los contenidos del tubo que contiene el RNA al tubo que contiene las perlas magnéticas y mezclar por 10 segundos en el vórtex a baja velocidad. Esta mezcla se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos, posteriormente se mezcla en el vórtex 10 segundos a baja velocidad. Se coloca la muestra en el termociclador a 50° por 5 minutos. Posteriormente se coloca en la gradilla magnética por 1 minuto, y se recupera el sobrenadante (que contiene el RNA) a un nuevo tubo (se recuperarán aproximadamente 85-90 μL de sobrenadante). Este nuevo tubo se coloca en hielo y se continúa con el paso de purificación utilizando las perlas agentpure XP RNA clean. Para iniciar, las perlas se deben mezclar en el vórtex durante 2 minutos, y se adicionan las perlas a la reacción obtenida del paso previo en el tubo que contiene el RNA (ajustar para el volumen exacto de muestra). Se coloca esta mezcla en la gradilla magnética durante 5 minutos, se aspira la solución aclarada y se descarta. Se adiciona al tubo 700 μL de etanol y se incuba 30 segundos. Posteriormente se aspira y descarta el etanol, este paso se repite para un total de 3 lavados. Los tubos posteriormente se dejan secar a temperatura ambiente con la tapa abierta por 10 minutos. Se eluye la muestra en 7 μL de agua libre de RNAsas y se almacena para su análisis de calidad y uso posterior. Una vez corroborada la depleción por medio de un chip de bioanalizador, se procede a realizar la preparación de la librería de RNA.

Elaboración de librerías de RNA y secuenciación

Las librerías de RNA se elaboran utilizando el kit de NEBNext Ultra RNA library prep kit for Illumina (catálogo E7530L), así como los NEBNext multiplex oligos for Illumina index primers set 1 (E7335S). El primer paso implica la fragmentación y cebado del RNAm, se utilizan entre 10-100ng totales del RNA depletado de ribosomales, en un volumen de 5 μ L, se agregan 4 μ L de buffer de reacción de síntesis de primera cadena, 1 μ L de random primers para dar un volumen final de 10 μ L. Se ajustaron las condiciones para obtener insertos de \sim 200 bases. Las muestras se incuban a 94° por 15 minutos, posteriormente los tubos se transfieren a hielo y se procede de manera inmediata a la síntesis de la primera cadena de DNAc. Al RNA fragmentado y cebado del paso anterior se agregan 0.5 μ L de inhibidor de RNAsa murino, 1 μ L de transcriptasa inversa ProtoScript II, 8.5 μ L de agua libre de nucleasas para una muestra con un volumen final de 20 μ L. Esta muestra se incuba en un termociclador siguiendo el protocolo de síntesis de la primera cadena (10 minutos a 25°C; 15 minutos a 42°C; 15 minutos a 70°C; dejar a 4°C). Pasar inmediatamente a la síntesis de segunda cadena de cDNA. Se adicionan los siguientes reactivos a la reacción de síntesis de primera cadena de cDNA (20 μ L): Agua libre de Nucleasas 48 μ L, Buffer de reacción de síntesis de segunda cadena (10X) 8 μ L, Mix de enzima de síntesis de segunda cadena 4 μ L, para una muestra con un volumen final de 80 μ L. Se mezcla muy bien por pipeteo varias veces y se incuba en un termociclador precalentado 1 hora a 16°C con la tapa a 40°C o menos. El siguiente paso es la purificación del DNAc de doble cadena usando las perlas AgentCourt AMPure XP, se inicia mezclando las perlas en el vórtex por 2 minutos para homogenizar. Posteriormente se adicionan 144 μ L de perlas a la reacción de síntesis de segunda cadena del paso anterior (80 μ L aprox.) Se mezcla muy bien con Vórtex o pipeta varias veces y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Se hace un spin en la centrifuga para bajar el contenido y se coloca la muestra en la gradilla magnética por 5 minutos. Se adicionan 200 μ L de etanol al 80% recién preparado, se espera 30 segundos, y posteriormente se descarta el sobrenadante. Este paso se repite para hacer en total dos lavados. Posteriormente se deja secar por 10 minutos con las tapas abiertas para que se evapore el etanol, cuidando no sobre secar las muestras. El DNA se eluye de las perlas con 60 μ L de agua libre de nucleasas, se adiciona el agua y se mezcla por pipeteo para

posteriormente colocar en la gradilla magnética hasta que la solución se aclare. Se remueven 55.5 μ L del sobrenadante y se colocan en un tubo limpio y bien rotulado. La muestra ahora pasará por la reparación final / dA-tail de la biblioteca de cDNA. A los 55.5 μ l de cDNA de doble cadena purificados se le adicionan los siguientes componentes: Buffer de reacción de reparación de extremos (10X) 6.5 μ L, mix de enzima End prep 3 μ L, para dar una muestra con un volumen final 65 μ L, la cual se incuba en el termociclador por 30 minutos a 20°C, 30 minutos a 65°C y se deja a 4°C. Se procede inmediatamente a la ligación de adaptadores. Es importante tener listos los adaptadores, los cuales se deben diluir a 1.5 μ M, haciendo una dilución 1:9 con agua estéril para su uso inmediato. Al cDNA dA-Tailed se le adicionan los siguientes componentes por librería: Master Mix ligasa Blunt/TA 15 μ L, Adaptador NEBNext diluido 1 μ L, Agua libre de nucleasas 2.5 μ L, para una muestra con un volumen final de 83.5 μ L. La muestra se mezcla muy bien por pipeteo y se hace un spin para bajar todo el contenido, posteriormente se incuba 15 minutos a 20°C en el termociclador y se adicionan 3 μ L de enzima USER a la mezcla de ligación. Se mezcla bien y se incuba a 37°C por 15 minutos. Se continua con la purificación de la Reacción de ligación usando AMPure XP Beads. A la reacción de ligación (86.5 μ l), se agregan 13.5 μ L de agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen de 100 μ L. Se agregan 100 μ L de las perlas AMPure XP y se mezcla bien con Vórtex o pipeta, posteriormente se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente. Se hace un spin para bajar el contenido y se coloca en la gradilla magnética por 5 minutos. Se adicionan 200 μ L de etanol al 80% fresco, se espera 30 segundos, posteriormente se retira y descarta el sobrenadante. Este paso se repite para realizar dos lavados en total. Posteriormente se deja secar 10 minutos con tapas abiertas para que se evapore el etanol, cuidando no dejar secar demasiado. El DNA se eluye de las perlas con 52 μ L de agua libre de nucleasas, se mezcla por pipeteo y se coloca en la gradilla magnética hasta que se aclare. Se remueven 50 μ L del sobrenadante y se colocan en un tubo limpio, se les adicionan 50 μ L de perlas AMPure XP y se mezcla bien con Vórtex o pipeta, posteriormente se incuban 5 minutos a temperatura ambiente en la gradilla magnética con las tapas abiertas, se hace un spin para bajar todo el contenido y se coloca en la gradilla magnética por 5 minutos, se adicionan 200 μ L de etanol al 80% fresco, se deja 30 segundos y se retira. Este paso se repite para un total de 2 lavados. La muestra al final se deja secar 10 minutos con las tapas abiertas para que

se evapore el etanol, cuidando no dejar secar demasiado. El DNA se eluye de las perlas con 25 μ L de agua libre de nucleasas, se mezcla con Vórtex o pipeta, y se hace un spin para bajar el contenido, se coloca en la gradilla magnética hasta que la solución se aclare, y se transfieren 23 μ L del sobrenadante a un tubo limpio y se procede inmediatamente al paso de enriquecimiento por PCR. A los 23 μ L eluidos en el paso anterior se le adicionan NEBNext High-Fidelity PCR Master Mix, 2X 25 μ L, Universal PCR Primer (25 μ M) 1 μ L, el índice seleccionado (1 diferente por cada muestra para poder hacer secuenciación multiplex) Index (X) Primer (25 μ M) 1 μ L, para un volumen final de 50 μ L. Se coloca en el termociclador y se corre el siguiente programa: 98° 30 segundos (1 ciclo), 98° 10 segundos, 65° 30 segundos, 72° 30 segundos (15 ciclos), 72° 5 minutos (1 ciclo), dejar a 4°. Por último, la reacción se purifica usando las perlas AgentCourt AMPure XP, previamente mezcladas en el vortex para resuspender. Se adicionan 50 μ L de las perlas Agencourt AMPure XP (1.0X) a la reacción de PCR, se mezcla con el vórtex o por pipeteo y se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos, se hace un spin, y se coloca en la gradilla magnética por 5 minutos, se descarta el sobrenadante. Se adicionan al tubo 200 μ L de etanol al 80% fresco, después de 30 segundos se retira y descarta el sobrenadante, este paso se repite para un total de dos lavados. Se deja secar por 10 minutos con las tapas abiertas para que se evapore el etanol, cuidando no dejar secar demasiado. El DNA se eluye de las perlas con 23 μ L de agua libre de nucleasas, se mezcla con Vórtex o por pipeteo, se hace un spin y se coloca en la gradilla magnética hasta que la solución se aclare. Se remueven 20 μ L del sobrenadante y se coloca en un tubo limpio, posteriormente se almacena a -20°C. Una vez finalizada la librería se realiza el control de calidad mediante una corrida de la muestra en un bioanalyzer utilizando un chip de alta sensibilidad. Las librerías de RNA del hospedero (ratón) fueron secuenciadas mediante un equipo Illumina HiSeq 2500 en versión single-end en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática de la Red de Apoyo a la Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Enriquecimiento de transcritos de MTB mediante sondas de captura y secuenciación

Para enriquecer las secuencias y obtener una mayor proporción de transcritos de MTB durante el proceso de secuenciación y análisis, se estandarizó una estrategia

novedosa para la utilización de sondas biotiniladas de captura hechas específicamente con el material de cada una de las cepas utilizadas en los experimentos previos. Mediante esta estrategia, se logra una mejor depleción de RNAr y un enriquecimiento en transcritos de RNAm de MTB, eliminando una mayor proporción de RNAm del hospedero (ratón). Brevemente, se extrajo DNAg de cada cepa utilizada en los experimentos *in vivo* (46, 46P, 48 y 48V). El DNA fue fragmentado usando un instrumento Covaris para lograr un tamaño promedio de 100-300 pares de bases. Los fragmentos resultantes fueron procesados con el kit NEBNext Fast DNA Library Prep Set para Ion Torrent (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA; catálogo E6270S). Las secuencias fueron amplificadas utilizando cebadores biotinilados y purificados siguiendo el protocolo de purificación con perlas AMPure XP beads siguiendo el protocolo descrito previamente. Una vez que se corrobora el tamaño mediante un gel, se realiza el proceso de hibridación de la librería utilizando las sondas para enriquecer los transcritos de MTB.

Se prepara una reacción de hibridación por cada librería a secuenciar. En un tubo para PCR se adicionan 12.8 μ L de Buffer A, 1.6 μ L de Buffer B, X μ L de Sondas (equivalente a 500ng), Y μ L de librería (equivalente a 100ng). Se agrega agua suficiente para que el volumen de todas las reacciones sea el mismo, cuidando que el volumen final no pase de 60 μ L. Se prepara un Control de Hibridación por cada conjunto de librerías que se pongan a hibridar al mismo tiempo. En un tubo para PCR se adicionan 12.8 μ L de Buffer A, 1.6 μ L de Buffer B, X μ L de Sondas CTRL (equivalente a 500ng), Y μ L de CTRL 1 (equivalente a 100ng) y Z μ L de CTRL 2 (equivalente a 100ng). Se agrega agua suficiente para que el volumen del control sea el mismo que el de las reacciones de las librerías. Las reacciones se colocan en un termociclador con el siguiente programa: 95°C/5min, 92°C/1min, 89°C/1min, 86°C/1min, 83°C/1min, 80°C/1min, 77°C/1min, 74°C/1min, 71°C/1min, 68°C/1min, 65°C/72 horas. Una vez completadas las 72 horas de hibridación, se procede al lavado de las reacciones utilizando las perlas magnéticas MyOne (Dyabeads MyOne Streptavidin C1; Invitrogen, Waltham, CA, USA; Catálogo: 65001) (20 μ L de perlas por librería hibridizada). Se lavan las perlas con buffer de lavado I (80 μ L buffer por cada 20 μ L de perlas), se homogeniza y se coloca en la gradilla magnética. Una vez aclarado, se elimina el sobrenadante y se repite el proceso para un total de 3 lavados. Las perlas ya lavadas se resuspenden en 20 μ L de buffer de lavado I. Una vez

teniendo listas y lavadas las perlas se procede con el lavado del DNA no capturado. Se agrega la reacción de la hibridación a las perlas lavadas y se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se coloca en la gradilla magnética y se recupera el sobrenadante lavado (rotular tubo como H1). Se agrega a las perlas 50 μ L de buffer de lavado II y se homogeniza. La mezcla se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos y posteriormente se coloca en la gradilla magnética. Se guarda el sobrenadante en un tubo rotulado como H2. Se agregan 50 μ L del buffer de lavado III precalentado a 65°C y se homogeniza la mezcla. Se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos y se coloca en la gradilla magnética. Se guarda el sobrenadante en un tubo rotulado como H3. Este paso se repite y se almacena el sobrenadante en un tubo rotulado como H4. Posteriormente se realiza el lavado del DNA capturado por las sondas biotiniladas. Se agrega a las perlas 50 μ L del buffer de lavado IV pre-calentado a 99°C y se homogeniza. Se incuba la mezcla a 99°C por 5 minutos y posteriormente se coloca en la gradilla magnética, guardando el sobrenadante en un tubo rotulado como H5. Se repite este paso y se guarda el sobrenadante en un tubo rotulado como H6. Al finalizar se unen los contenidos de H1+H2+H3+H4 en un solo tubo (rotular tubo I) y se unen H5+H5 en otro tubo (rotular tubo II). Ambos sobrenadantes se purifican utilizando las perlas Ampure XP. Se agrega a cada sobrenadante 1.8X de perlas Ampure y se purifica siguiendo el protocolo descrito previamente. Una vez eluido el DNA purificado en agua estéril, se realiza un qPCR diagnóstico de la fracción que se va a secuenciar (muestra capturada) y el control de hibridación. Se prepara la siguiente reacción en un tubo de PCR: Master Mix 7.5 μ L, oligo 1 0.8 μ L, Oligo 2 0.8 μ L, agua 4 μ L, DNA 2 μ L. Se coloca en el termociclador y se corre el siguiente programa: 95°C/ 5 min (1 ciclo), 95°C/ 30 seg, 60°C/ 30 seg, 72°C/ 30 seg (30 ciclos), 95°C/ 5 seg, 65°C/ 1 min, 97°C (1 ciclo), 4°C/ 30 seg (1 ciclo). se evaluó la calidad de las librerías capturadas usando el equipo 2100 Bioanalyzer y el kit High sensitivity DNA Kit Agilent, Cat 50674626; una vez verificadas las condiciones de las librerías construidas se secuenciaron en versión paired-end utilizando el sistema Illumina HiSeq 2500 a partir de la preparación de una mezcla equimolar de las librerías.

Genómica comparativa

Las librerías de DNA fueron secuenciadas y las lecturas recuperadas para realizar armados genómicos. Las secuencias crudas fueron filtradas para eliminar secuencias de baja calidad y sus adaptadores eliminados usando los programas FASTX-toolkit (v0.0.13) y Trimmomatic (v 0.33) [97], respectivamente. Se utilizó la plataforma CLC Genomics Workbench (v 10) para ensamblar los genomas de las 4 cepas secuenciadas. Posteriormente se procedió a realizar el llamado de variants utilizando el programa Snippy (V4.3.6) siguiendo los parámetros de la configuración estándar.

Los genomas fueron anotados utilizando el programa Prokka (v1.13) en sus parámetros de configuración estándar [98]. Las variantes inicialmente se identificaron entre las cepas secuenciadas y un genoma de referencia recientemente curado y depositado en el NCBI (Beijing NITR203). Todas las variantes compartidas entre las cepas que fueron secuenciadas antes y después de la exposición al sistema inmunológico de ratones vacunados fueron filtradas y eliminadas de análisis posteriores, dejando únicamente las variantes únicas a la cepa parental (previo a la exposición al sistema inmune de ratones vacunados) o aquellas variantes únicas a las cepas secuenciadas posterior a la exposición al sistema inmune de ratones vacunados. Estas variantes fueron consideradas como aquellas con relevancia biológica para fines comparativos. Las variantes únicas fueron comparadas entre las cepas parentales y las obtenidas a partir de ratones vacunados, realizando la comparación entre las siguientes duplas de cepas: 46 vs. 46P y 48 vs. 48V. Adicionalmente, las variantes fueron comparadas entre las dos cepas obtenidas a partir de pulmones de ratones vacunados para determinar la presencia de alguna mutación compartida (46P vs. 48V).

Transcriptómica comparativa

Las librerías de RNA extraído del hospedero (ratón) fueron secuenciadas y las lecturas crudas fueron inicialmente filtradas para eliminar secuencias de baja calidad y sus adaptadores eliminados usando los programas FASTX-toolkit (v0.0.13) y Trimmomatic (v 0.33) [97], respectivamente. Posteriormente, las lecturas fueron mapeadas usando el programa BWA_MEM [99], contra el genoma de referencia de *Mus musculus* (GCA_000001635.8 GRCm38.p6). El conteo de lecturas se realizó con HTSeq versión 0.11.1 [100]. La expresión diferencial de genes (EDG) se valoró

usando el paquete para bioconductor DESeq2 (v 3.7) [101]. Finalmente, se utilizaron los programas GO (Ontología de genes [Gene Ontology] análisis de enriquecimiento para genes con expresión diferencial, considerando la jerarquía funcional de los genes expresados de manera diferencial) y KEGG para valorar el enriquecimiento, ambos evaluados a través de WebGestalt [102].

Las librerías de RNA extraído del huésped (MTB) fueron secuenciadas y las lecturas crudas fueron filtradas para eliminar secuencias de baja calidad y sus adaptadores eliminados usando los programas FASTX-toolkit (v0.0.13) y Trimmomatic (v 0.33) [97], respectivamente. Posteriormente, se descargaron las secuencias ribosomales de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mus musculus* a partir de la base de datos de Silva [103]. Se descargaron los genomas de *Mus musculus* y de cada una de las cepas a analizar (46, 46P, 48, 48V, previamente secuenciadas). Los datos descargados fueron utilizados para generar un archivo multifasta con todas las secuencias ribosomales de ambos organismos, para crear una base de datos compuesta. Las lecturas del transcriptoma de MTB fueron mapeadas contra la base de datos compuesta usando Smalt, con una cobertura mínima del 80% para evitar falsos positivos que pudieran afectar la cuantificación de las lecturas. Se contabilizaron las lecturas mapeadas a cada uno de los contenidos del archivo para obtener las proporciones de lecturas asociadas a ribosomales, transcritos de ratón, transcritos de MTB. Las lecturas que mapearon contra el genoma de ratón o secuencias de RNAr fueron separadas usando el programa Samtools (V1.3.1). Para determinar el número de lecturas que mapearon contra genes de MTB se realizó la intersección entre el archivo bam alineado y el archivo gff correspondiente que contiene todas las anotaciones usando Bedtools (v2.26.0), para así obtener la cuenta de las lecturas que pertenecen a cada uno de los genes en el genoma bacteriano.

Análisis estadístico

Este estudio fue planeado para observar un tamaño de efecto estimado de 0.25, con un α de 0.05 y un total de 4 grupos experimentales en el ensayo inicial (cepa parental, P, V y S). El cálculo para el tamaño de muestra fue planeado para un experimento con medidas repetidas (con un total de 6 puntos planeados en la cinética para recolección de datos). El poder del estudio se fijó a 0.95, para cumplir con los parámetros estadísticos realizados en análisis multigrupo. El tamaño de muestra calculado fue de

n=168 sujetos por grupo por ensayo. Adicionalmente se agregaron 8 sujetos por grupo experimental para considerar pérdidas potenciales durante la metodología de la infección o por pérdidas de muestras por causas no previstas. Un total de 200 sujetos fueron incluidos en cada experimento de virulencia. El cálculo de muestra se realizó con base en el modelo de Faul y cols. Para ensayos en el contexto de ciencias biomédicas [104]. Para determinar la significancia estadística en los ensayos de carga bacilar e histopatología se realizó una comparación entre los 4 grupos experimentales utilizando una ANOVA de dos colas, seguido por una prueba de Bonferroni para poder identificar diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo). Para evaluar diferencias entre las curvas de supervivencia se llevó a cabo una prueba Log-Rank para identificar diferencias a lo largo de la duración del ensayo. Cada análisis de supervivencia se realizó con 50 sujetos experimentales por grupo, con un total de 200 sujetos por cada ensayo realizado. Los sujetos que fueron sacrificados en los tiempos determinados por la cinética experimental fueron censurados al día de la eutanasia. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa GraphPad Prism Software (v 6.0). Para los análisis de ontología génica los procesos enriquecidos fueron identificados como aquellos con un valor de $p < 0.05$ en una prueba exacta de Fisher.

RESULTADOS

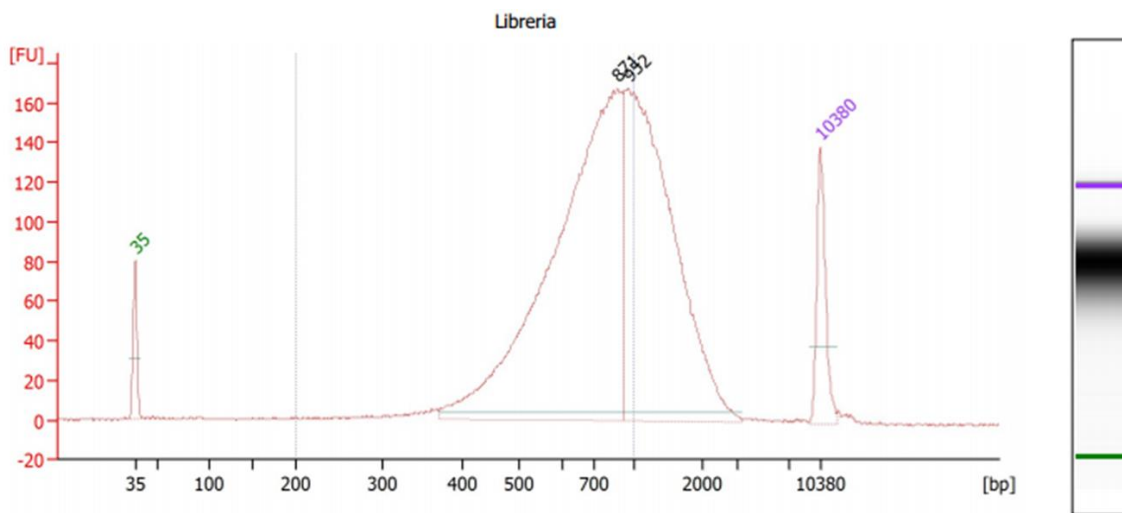
Perfil genómico

El DNA proveniente de las cepas 46, 46P, 48 y 48V fue extraído y su calidad evaluada por medio de electroforesis en gel de agarosa, posteriormente fue cuantificado y almacenado para su uso posterior (**Tabla 6**). Una vez asegurada la cantidad y calidad de la muestra (3 μg totales por cada cepa) se procedió a la creación de librerías (**Figura 15**). Las librerías de DNA fueron secuenciadas mediante la plataforma Illumina NextSeq500 del Instituto de Biotecnología (IBT, Cuernavaca, México). Posterior a la secuenciación, se realizó el curado de las secuencias crudas, eliminando secuencias de baja calidad ($Q < 20$). Las secuencias que pasaron el filtrado se utilizaron para ensamblar los genomas *de novo*, utilizando la plataforma CLC Genomics Workbench (V10). En el caso de la cepa 46, se logró una profundidad de

secuenciación de 475, se logró un ensamble de 4,362,907 pb en un total de 71 contigs. El mayor contig fue de 302,594 pb y el N50 fue de 151,200. Para la cepa 46P, se logró una profundidad de secuenciación de 715, con un tamaño del ensamble de 4,359,576 en 83 contigs, con una N50 de 135,482. La cepa 48 tuvo una profundidad de secuenciación de 663, con un tamaño de ensamble de 4,359,701 en 86 contigs y una N50 de 151,128. Por último, la cepa 48V tuvo una profundidad de 479 y un tamaño de ensamble de 4,359,576, con una N50 de 137,687. Las características de la secuenciación y el ensamblaje se detallan en la **Tabla 7**.

Tabla 6. Cuantificación de muestras de DNA genómico para preparación de librerías mediante la técnica PCR-free

Muestra	[DNA]	260/280	DNA total
46	30.804	1.841	2.2 µg/100 µL
46P	33.705	1.831	3.370 µg/100 µL
48	46.001	1.891	4.269 µg/100 µL
48V	112.515	1.883	11.251 µg/100 µL



Overall Results for sample 3 : Librería

Number of peaks found: 2 Corr. Area 1: 1,757.9
 Noise: 0.4

Peak table for sample 3 : Librería

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	871	1,047.96	1,822.6	
3	952	748.26	1,190.4	
4	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Region table for sample 3 : Librería

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Color
200	1,000	1,757.9	66	689	24.6	1,390.67	3,390.5	Blue

Figura 15. Librería creada con la técnica PCR-free

Tabla 7. Ensamblajes del genoma de las cepas secuenciadas

Ensamble	Número de contigs	Profundidad	Tamaño del ensamble	Mayor contig	N50 (pb)	N90 (pb)
46	71	475.56	4362907	302594	151200	54709
46P	83	715.25	4359576	303349	135482	47066
48	86	663.31	4359701	303331	151128	42231
48V	81	479.49	4359576	294930	137687	49723

Al comparar las secuencias provenientes de las cepas parentales (46, 48) y las secuencias de bacterias obtenidas a partir de pulmones de ratones vacunados con BCG, se observaron diversas variantes. Las variantes fueron comparadas entre las cepas parentales y las cepas obtenidas de pulmones de ratones vacunados (46 vs. 46P; 48 vs. 48V). Inicialmente, se hizo la comparación entre las variantes de cada genoma contra el

genoma de referencia NITR203. Posteriormente se eliminaron aquellas variantes que fueran compartidas entre la cepa 46 y 46P vs. NITR203, y entre las compartidas entre la cepa 48 y 48V vs. NITR203. Al final de esta depuración se obtuvieron únicamente las variantes únicas entre las cepas 46 vs. 46P y 48 vs. 48V. Adicionalmente se hizo una comparación entre las variantes únicas compartidas entre las cepas obtenidas de los pulmones de ratones vacunados (46P vs. 48V) para identificar variantes asociadas al cambio de fenotipo en ambas cepas Beijing.

La comparación entre las cepas 46 vs. 46P reveló la presencia de 5 variantes únicas. Dos de estas variantes se encontraron en el genoma de la cepa 46, y corresponden a un cambio en el marco de lectura en el gen que codifica para la proteína glicerol cinasa. Adicionalmente, se observó una variante de tipo sinónima en el gen que codifica para la proteína ESAT-6-like protein Esxl. Por otra parte, la cepa 46P presentó tres variantes únicas en comparación con su cepa parental, las cuales corresponden en todos los casos a genes que codifican proteínas de la familia PE y PPE. Las variantes identificadas en la comparación 46 vs. 46P se resumen en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Variantes identificadas en los genomas de las cepas 46 y 46P

Cepa	Variantes observadas	Tipo de variante	Cambio en la secuencia	Producto
46	2	Cambio en el marco de lectura	c.545dupG p.Val183fs	Glicerol cinasa
		Variante sinónima	c.169C>T p.Leu57Leu	Proteína ESAT-6-like Esxl
46P	3	Inserción en el marco de lectura	c.3913_3914insGCACCGGCG p.Gly1304_Val1305insGlyThrGly	Proteína de la familia PE
		Cambio en el marco de lectura	c.1305_1306dupCC p.Gln436fs	Proteína de la familia PPE PPE13
		Mutación con cambio de sentido	c.812T>C p.Val271Ala	Proteína de la familia PE

En el caso de la cepa 48, se observaron 5 variantes únicas, las cuales incluyen una inserción en el marco de lectura de una proteína de la familia PE, así como una variante con cambio de sentido en la subunidad beta de la RNA polimerasa. Adicionalmente, se observaron tres variantes sinónimas, dos en genes que codifican para proteínas de la familia PE y una variante en el gen que codifica para la proteína con dominio DUF222. En el caso de la cepa 48V, se observaron 9 variantes en comparación con la cepa 48. Estas

incluyen una inserción en el marco de lectura del gen que codifica para la lipoproteína de la familia LppP/LprE, una inserción en el marco de lectura de un gen que codifica una proteína hipotética, una inserción en el marco de lectura de una proteína de la familia PE y una variante en el marco de lectura de un gen que codifica para una proteína de la familia PE-PGRS. Adicionalmente se identificó una variante con cambio de sentido en el gen que codifica para la RNA polimerasa, subunidad beta. Tres variantes sinónimas fueron también identificadas en la cepa 48V, dos en genes que codifican para proteínas de la familia PE, y una en un gen que codifica para una proteína hipotética. Las variantes identificadas en la comparación 48 vs. 48V se resumen en la **Tabla 9**.

Al comparar las secuencias 46P vs. 48V se identificó una variante compartida entre ambas cepas, la cual corresponde a una inserción en el marco de lectura del gen que codifica para una proteína de la familia PE.

Las bases de datos para los genomas secuenciados en este proyecto se han depositado como un Bioproject en los archivos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI; Número de proyecto: PRJNA628024).

Tabla 9. Variantes identificadas en los genomas de las cepas 48 y 48V

Cepa	Variantes	Tipo de variante	Cambio en la secuencia	Producto
48	5	Inserción en el marco de lectura	c.2109_2110insGACGGTGGGGCCGGCG GCAACGGCGCC p.Ala703_Asn704insAspGlyGlyAlaGlyGlyAsnGlyAla	Proteína de la familia PE
		Variante con cambio de sentido	c.3263G>T p.Gly1088Val	RNA polimerasa, subunidad beta
		Variante sinónima	c.1407_1410delTGGGinsCGGT p.471	Proteína de la familia PE
		Variante sinónima	c.195C>T p.Ser65Ser	Proteína con dominio DUF222
		Variante sinónima	c.687T>C p.Gly229Gly	Proteína de la familia PE
48V	9	Variante del marco de lectura	c.58_66dupTTGGCACTG p.Leu22_Ile23insLeuAlaLeu	Lipoproteína de la familia LppP/LprE
		Deleción en el marco de lectura	c.483_500delCAACGGCGGGCGCCGGCG G p.Asn162_Gly167del	hypothetical protein
		Inserción en el marco de lectura	c.3913_3914insGCACCGGCG p.Gly1304_Val1305insGlyThrGly	Proteína de la familia PE
		Cambio en el marco de lectura y variante con cambio de sentido	c.4774_4777delAAGGinsGAGGT p.Lys1592fs	Proteína de la familia PE-PGRS
		Variante con cambio de sentido	c.1416_1426delTGTGAGTAGTTinsCATC AACAGTA p.ValSerSerSer473IleAsnSerThr	Proteína hipotética
		Variante con cambio de sentido	c.3259_3263delCGGGGinsTGGGT p.ArgGly1087TrpVal	RNA polimerasa, subunidad beta
		Variante sinónima	c.1407T>C p.Gly469Gly	Proteína de la familia PE
		Variante sinónima	c.1713T>C p.Gly571Gly	Proteína de la familia PE
		Variante sinónima	c.1809A>T p.Ala603Ala	Proteína hipotética

Perfil transcriptómico del hospedero

El Segundo objetivo implicó la caracterización del transcriptoma del hospedero (ratón) al día 21 postinfección para determinar perfiles de expresión diferencial que pudieran apoyar el cambio en el fenotipo de la enfermedad entre ratones infectados con las cepas parentales (46, 48) y aquellos infectados con las cepas obtenidas a partir de ratones vacunados (46P, 48V). El RNA fue aislado de los pulmones de animales infectados con cada una de las cepas y sacrificados al día 21 postinfección. Este día

fue seleccionado por representar el momento en el cual hay una diferencia significativa en la carga bacilar pulmonar, así como el día a partir del cual comienza a disminuir la sobrevivencia de los animales infectados con las cepas 46P y 48V, de acuerdo con los ensayos presentados en los antecedentes de este trabajo.

La extracción de RNA mediante el protocolo estandarizado durante estos estudios derivó en la obtención de RNA de calidad y cantidad suficiente para la caracterización transcriptómica. La información detallada respecto a las muestras utilizadas para la secuenciación del transcriptoma se muestra en la **Tabla 10**, los electroferogramas que muestran la calidad de las muestras analizadas por Bioanalyzer se muestra en la **Figura 16**.

Tabla 10. Muestras de RNA total de hospedero utilizadas para la creación de librerías y RNA-seq

Número en formato recepción	Muestra	Volumen	ng/µl Qubit	RIN	1200 µl totales		
					Total	Muestra	Agua
1	1A	50	60.6	7.1	3030	19.80	30.20
2	1B	50	58.1	7.7	2905	20.65	29.35
3	1C	50	57.7	7.1	2885	20.80	29.20
4	2A	50	34	8	1700	35.29	14.71
5	2B	50	232	8.9	11600	5.17	44.83
6	2C	50	268	8.8	13400	4.48	45.52
7	3A	50	70.8	8.3	3540	16.95	33.05
8	3B	50	56.4	8.3	2820	21.28	28.72
9	3C	50	78.1	8.1	3905	15.36	34.64
10	4A	50	93	8.7	4650	12.90	37.10
11	4B	50	314	9	15700	3.82	46.18
12	4C	50	193	9.1	9650	6.22	43.78

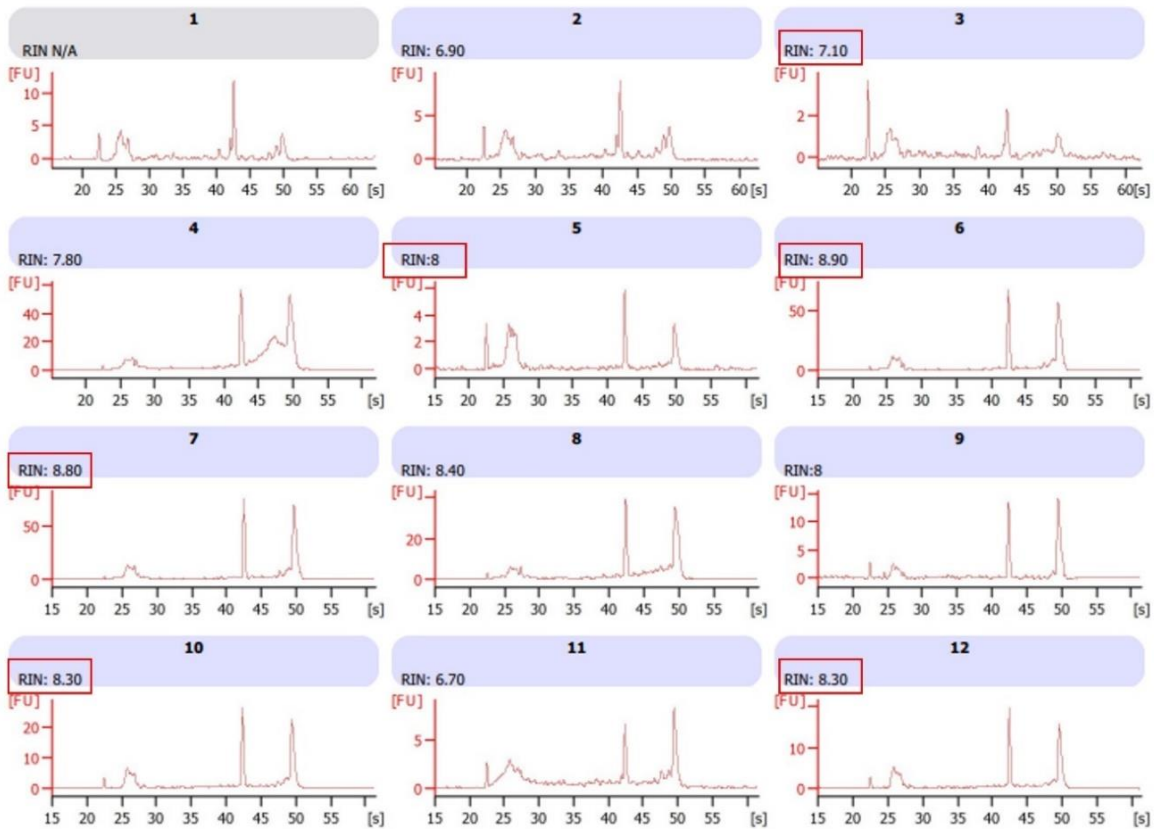


Figura 16. Electroferogramas obtenidos a partir del Bioanalyzer para valoración de RIN en muestras de RNA total obtenido a partir de pulmones de ratones infectados

Una vez obtenido el RNA a partir de cada muestra (n=3 sujetos experimentales por cada cepa estudiada) este es utilizado para crear librerías de RNA utilizando la plataforma NEB-Next Ultra RNA Library Prep kit for Illumina. Se lleva a cabo el procedimiento, agregando un índice distinto a cada muestra (12 índices totales) para poder llevar a cabo la secuenciación multiplex. La **Figura 17** muestra una librería de RNA del hospedero para caracterización del transcriptoma lista para secuenciación.

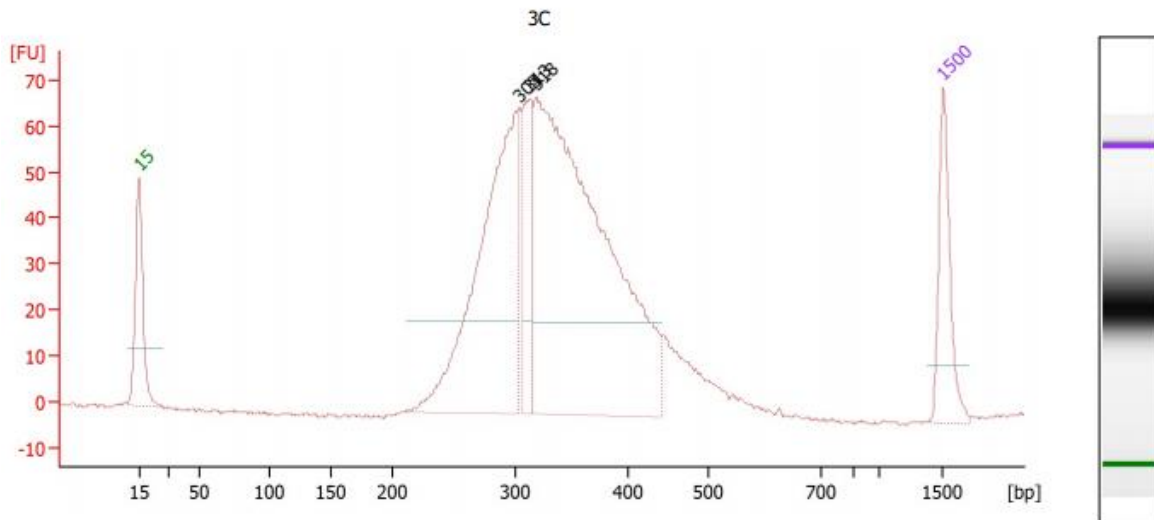


Figura 17. Librería de RNA del hospedero para caracterización del transcriptoma pulmonar

En los análisis de expresión diferencial, se identificó la presencia de 41 genes sobre expresados y 8 genes sub expresados en los animales infectados con la cepa 46 en comparación con aquellos infectados con la cepa 46P (**Apéndice Tabla A1; Tabla A2**). En el caso de los animales infectados con la cepa 48, se observaron 45 genes sobre expresados y 69 genes sub expresados en comparación con aquellos infectados con la cepa 48V a los 21 días postinfección (**Apéndice Tabla A3; Tabla A4**).

Diversos procesos biológicos fueron impactados en relación con los genes sobre expresados para cada juego de cepas (46 vs. 46P; 48 vs. 48V). Para los animales infectados con la cepa 46, los genes sobre expresados se agruparon en términos de procesos relacionados con el sistema inmune, incluyendo genes asociados con la respuesta inmunológica, migración de leucocitos, quimiotaxis leucocitaria, respuesta al estrés, respuesta inflamatoria y respuesta inflamatoria aguda, unión a motivos de quimiocinas C-X-X, y unión de interleucina-8, entre otros (**Figura 18**). En el caso de los animales infectados con la cepa 48, los genes sobre expresados incluyen aquellos relacionados con procesos inmunológicos, incluyendo procesos del sistema inmune, respuesta inmunológica, migración de leucocitos, regulación positiva de activación leucocitaria, respuesta inflamatoria y respuesta inflamatoria aguda. Adicionalmente, otras vías que se vieron enriquecidas en los animales infectados con estas cepas

incluyeron la regulación el alza de procesos catabólicos para el colágeno y el desarrollo de nódulos linfáticos (**Figura 19**).

Por último, se identificaron varias vías influenciadas por la expresión diferencial de genes en animales infectados con las cepas previamente mencionadas. En el caso de la comparación entre la cepa 46 vs. 46P, cuatro vías se encontraron enriquecidas en términos de genes sobre expresados (cascada del complemento y la coagulación [n=4]; interacciones de receptores de citocinas [n=5]; linaje hematopoyético [n=3]; vías de señalización por receptores tipo toll [n=3]). En el caso de los animales infectados con las cepas 48 vs. 48V, se identificaron 3 vías enriquecidas en genes sobre expresados (amebiasis [n=3]; interacciones de receptores de citocinas [n=4], diferenciación de osteoclastos [n=3]).

Por último, al comparar a los animales infectados con ambos juegos de bacterias (46 vs. 46P; 48 vs. 48V), se identificaron dos genes sobre expresados en los animales infectados con las cepas parentales en comparación con aquellos infectados con las cepas provenientes de ratones vacunados, estos genes codifican para los productos glucoproteína-2 y Vanina-1.

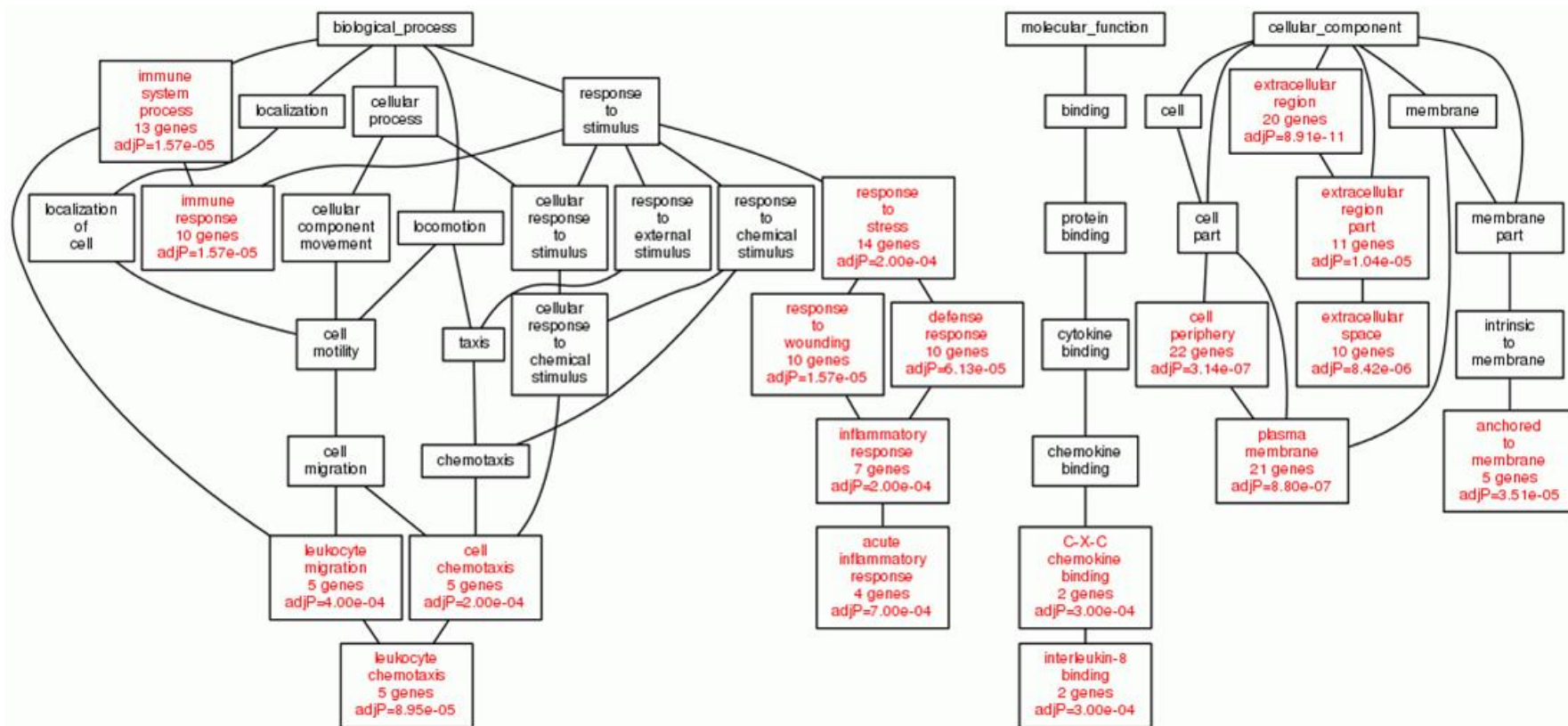


Figura 18. Procesos biológicos afectados por la sobre-expresión de genes en animales infectados con la cepa 46 vs. 46P al día 21 postinfección. Análisis de enriquecimiento por Gene Ontology y KEGG, ambos evaluados a través de WebGestalt.

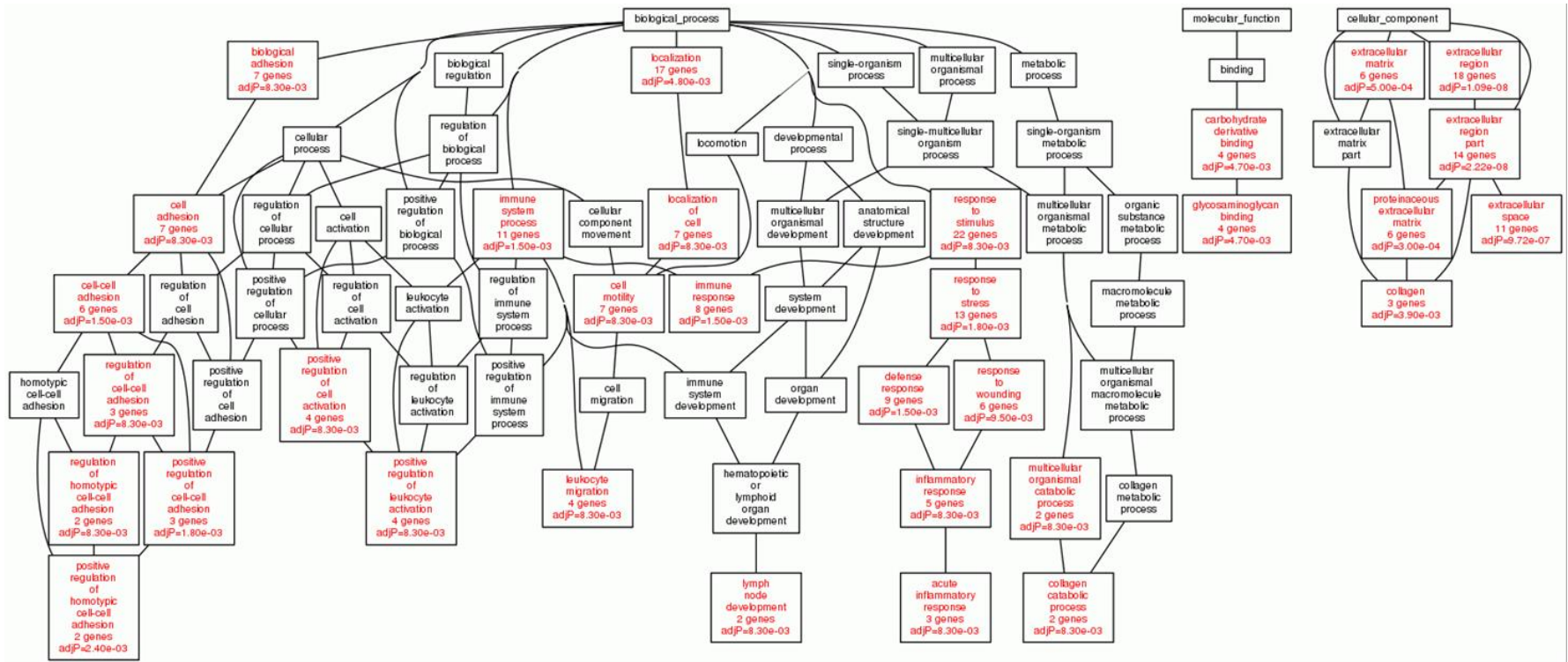


Figura 19. Procesos biológicos afectados por la sobre-expresión de genes en animales infectados con la cepa 48 vs. 48v al día 21 postinfección. Análisis de enriquecimiento por Gene Ontology y KEGG, ambos evaluados a través de WebGestalt.

Análisis histopatológico

Al analizar los genes con expresión diferencial en los hospederos infectados con las cepas parentales en comparación a las cepas provenientes de ratones vacunados, un gen en particular fue considerado de gran interés a nivel de los hallazgos experimentales. Vanina-1, producto de uno de los genes sobre expresados en animales infectados con ambas cepas parentales del genotipo Beijing (46 y 48) ha sido descrito en experimentos previos como un factor relevante para el desarrollo de granulomas durante infecciones por microorganismos patógenos intracelulares. De manera particular, durante los ensayos de virulencia y análisis histopatológico uno de los hallazgos más particulares al comparar los pulmones de los animales infectados con las cepas parentales en comparación con las cepas provenientes de ratones vacunados fue el hecho de que el infiltrado inflamatorio pulmonar era consistentemente más abundante en los pulmones provenientes de ratones infectados con las cepas 46 y 48 vs. Los animales infectados con las cepas 46P y 48V. Una de las hipótesis planteadas durante los experimentos realizados para valorar la virulencia de estas cepas, era que posiblemente las cepas desarrollaban mutaciones en genes que codificaban para proteínas de relevancia antigénica, evitando así el reconocimiento por parte del sistema inmunológico lo cual les permitía proliferar hasta el punto de generar un proceso de destrucción de la arquitectura pulmonar que resultaba incompatible con las necesidades de hematosis de los animales, los cuales morían por insuficiencia respiratoria. Tres pulmones provenientes de los animales infectados con las cepas 46, 46P, 48 y 48V los cuales habían sido perfundidos con formol y embebidos en parafina fueron utilizados para evaluar cualitativamente el daño pulmonar mediante microscopía óptica.

De manera general, los animales infectados con las cepas 46P y 48V desarrollaron daño histológico de forma más temprana y agresiva en comparación con los animales infectados con las cepas parentales 46 y 48. Particularmente, los animales infectados con la cepa 46 vs. 46P desarrollaron un patrón de daño distinto (**Figura 20**). Los pulmones obtenidos de animales infectados con la cepa 46P mostraron un desarrollo de daño tipo neumonía de manera más temprana durante el curso de la enfermedad, con pequeños parches neumónicos apareciendo desde el día 14 postinfección en

comparación con la cepa 46P (9.8 vs. 0%; $p < 0.001$), e incrementando gradualmente a lo largo del día 21 (20.9 vs. 13.2%; $p < 0.01$) y 28 (65.5 vs. 60.5%; $p > 0.05$) postinfección (**Figura 21A**). A pesar de que el área afectada por neumonía fue cuantitativamente similar al día 28 postinfección entre ambas cepas, en el caso de los animales infectados con la cepa 46P se observó la presencia de otro patrón de daño histopatológico, necrosis pulmonar, que inició el día 21 postinfección (2.5% vs. 11.6%; $p < 0.05$) y se extendió de manera considerable a lo largo de la arquitectura pulmonar para el día 28 (4.9% vs. 46.6%; $p < 0.001$) postinfección (**Figura 21B**). Adicionalmente, cuantificamos el número y tamaño de los granulomas presentes en animales infectados con las cepas 46 vs. 46P, identificando que los animales infectados con la cepa parental (46) desarrollaron granulomas de forma más temprana (día 7 postinfección) en comparación con ratones infectados con la cepa proveniente de ratones vacunados (46P), en quienes el desarrollo de granulomas fue más tardío (día 14 postinfección) (**Figura 21C**). El tamaño de los granulomas también mostró diferencias significativas entre los animales infectados con la cepa 46, que desarrollaron granulomas en promedio dos o tres veces más grandes en comparación con los animales infectados con la cepa 46P (**Figura 21D**).

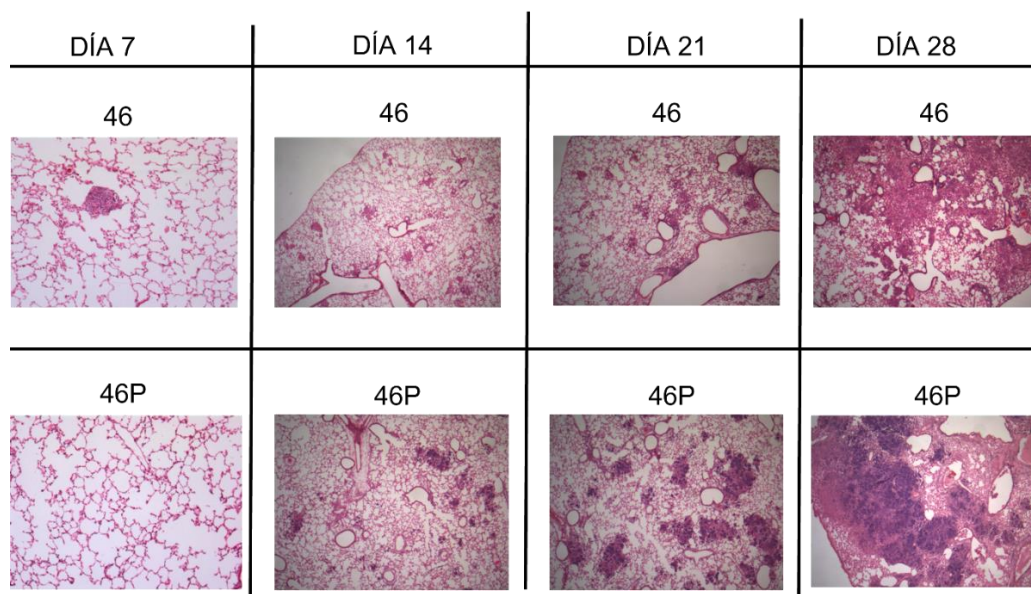


Figura 20. Imágenes representativas de daño histopatológico observado en los animales hospederos infectados con las cepas 46 y 46P durante la cinética de infección (N=3 sujetos experimentales por día de la cinética).

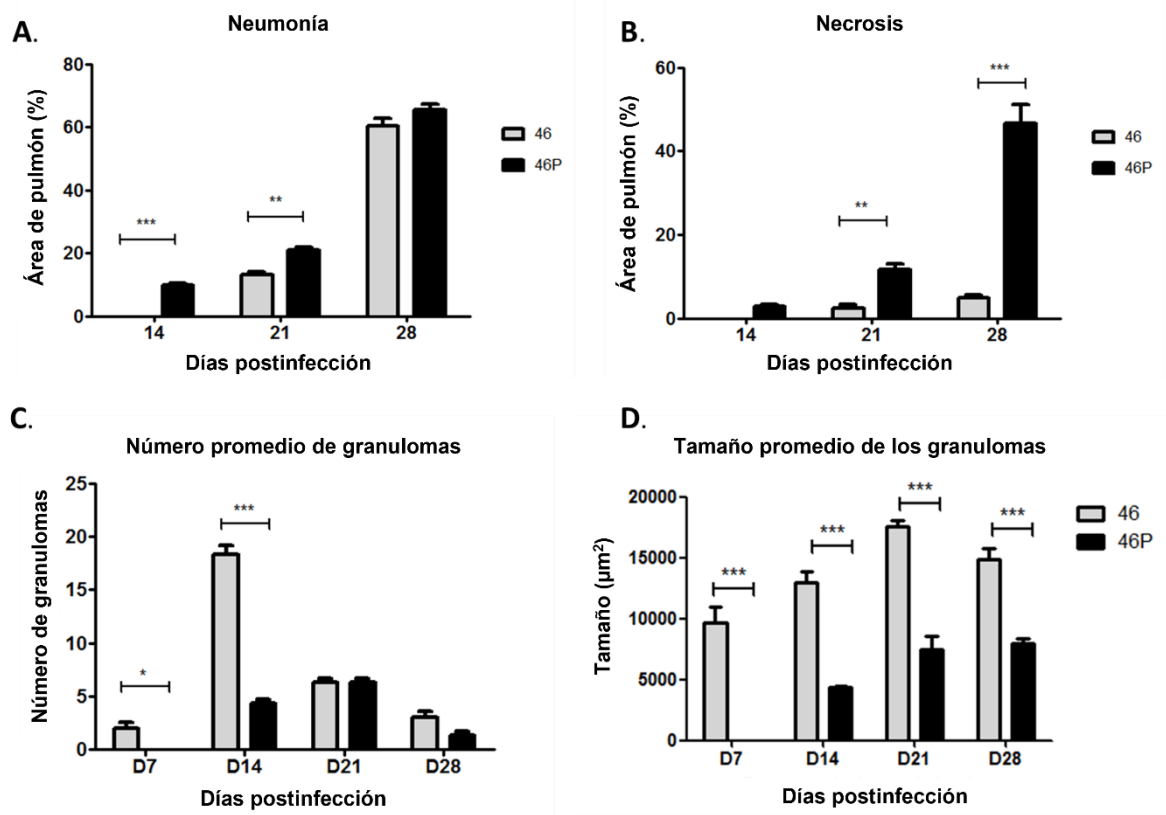


Figura 21. Histomorfometría de pulmones recuperados de animales infectados con la cepa 46 vs. 46P. (N=3 sujetos experimentales por día de la cinética). Comparación realizada mediante ANOVA de dos colas.

Los parámetros histopatológicos que fueron evaluados en los animales infectados con las cepas 48 y 48V mostraron un patrón similar a los descritos para las cepas 46 y 46P. Los animales infectados con la cepa 48V desarrollaron neumonía de manera más temprana y con una mayor área de pulmón comprometida en comparación con aquellos infectados con la cepa 48 (**Figura 22, 23A**). Los animales infectados con la cepa 48V mostraron pequeñas áreas de neumonía al día 14 postinfección (0% vs. 2.2%), las cuales incrementaron significativamente al día 21 postinfección (27.8% vs. 44.9%; $p < 0.05$) en comparación con los animales infectados con la cepa 48 (**Figura 23A**). Respecto a la necrosis pulmonar, los animales infectados con la cepa 48V desarrollaron pequeñas zonas de necrosis pulmonar al día 14 postinfección (0% vs. 0.5%; $p > 0.05$), las cuales fueron significativamente mayores al día 21 postinfección en comparación a aquellas identificadas en los animales infectados con la cepa 48 parental (8.4% vs. 42.9%; $p < 0.001$) (**Figura 23B**). De manera similar a los animales

infectados con las cepas 46 y 46P, los animales infectados con la cepa 48V tuvieron un número menor de granulomas a lo largo de la cinética de infección, así como un tamaño significativamente menor en los granulomas desarrollados por los animales infectados con esta cepa (**Figura 23C,23D**).

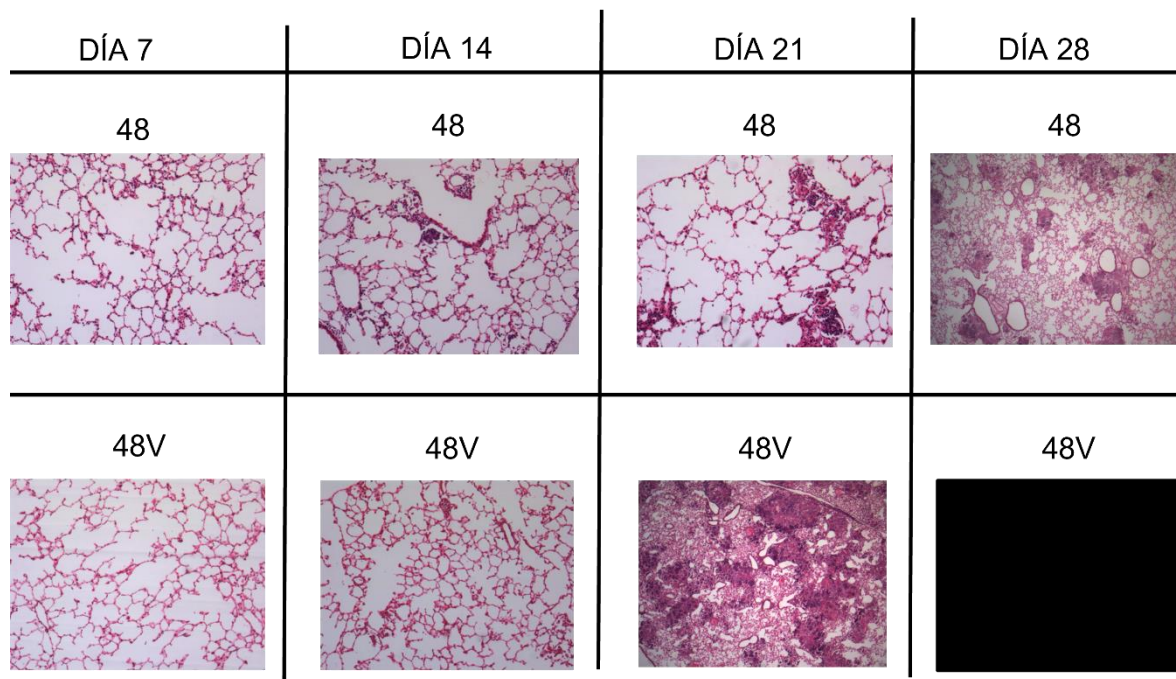


Figura 22. Imágenes representativas de daño histopatológico observado en los animales infectados con las cepas 48 y 48V durante la cinética de infección. Los animales infectados con la cepa 48V murieron de forma espontánea previo al día 28 de la cinética, por lo cual no hay imagen representativa de este grupo experimental para este día específico (N=3 sujetos experimentales por día de la cinética).

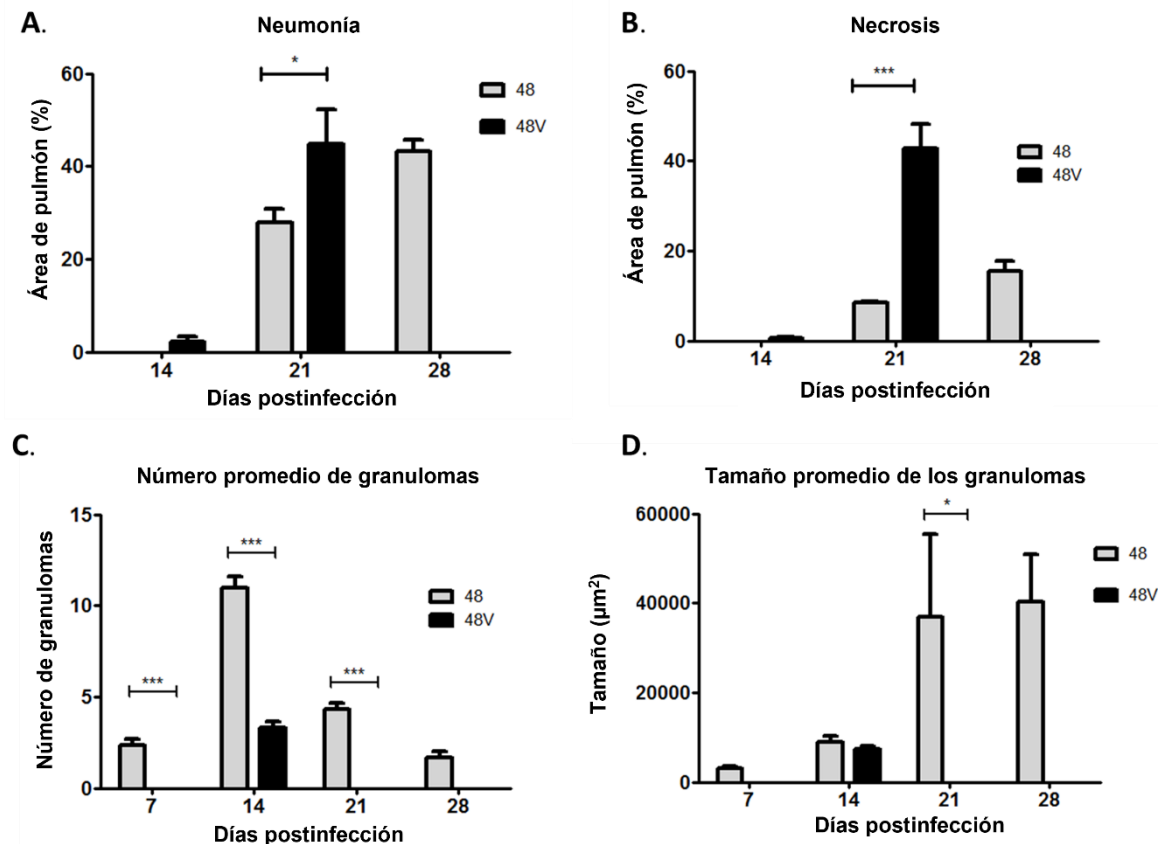


Figura 23. Histomorfometría de pulmones recuperados de animales infectados con la cepa 48 vs. 48V (N=3 sujetos experimentales por día de la cinética). Comparación realizada mediante ANOVA de dos colas.

Perfil transcriptómico del huésped

Mediante la estandarización de la metodología de extracción diferencial de RNA con nitrógeno líquido logramos mejorar la calidad del RNA extraído de un RIN de 3.1 a obtener muestras con RIN 7.0-9.0, la cual fue considerada suficiente para proceder con los ensayos de depleción de RNAr y enriquecimiento por sondas biotiniladas para aumentar la proporción de los transcritos de RNA de MTB en las muestras de pulmones infectados con las cepas 46, 46P, 48 y 48V al día 21 postinfección (**Figura 24**).

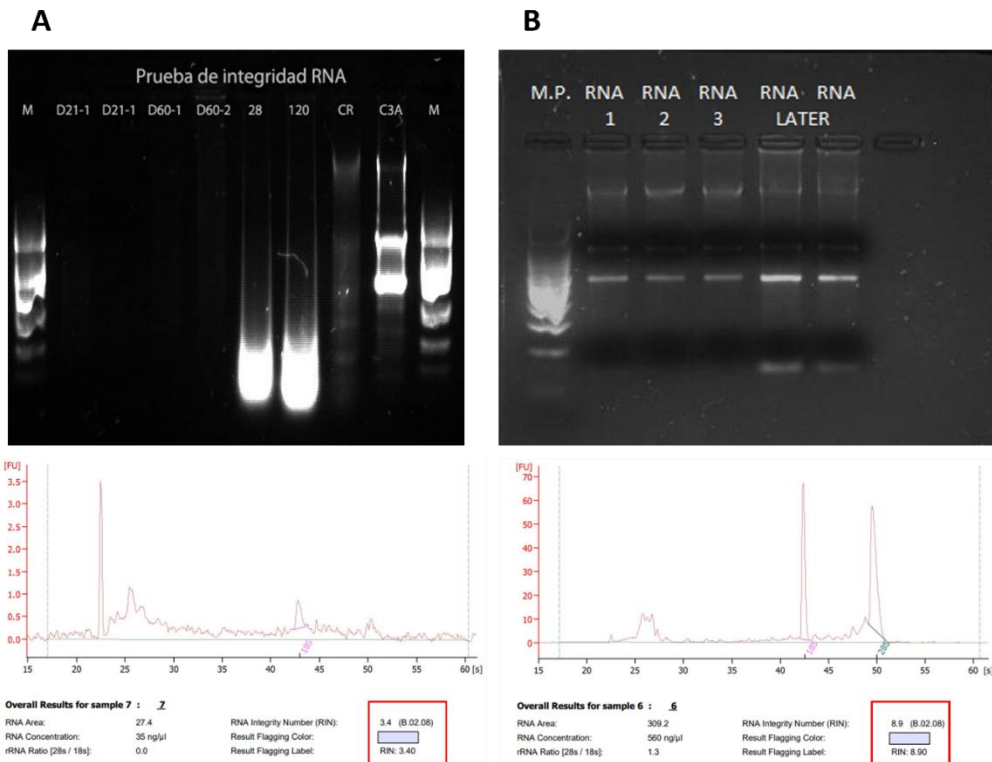


Figura 24. Muestra representativa de la evaluación de calidad de RNA extraído a partir de pulmones infectados con las cepas 46, 48, 46P y 48V antes (A) y después (B) de la estandarización de la metodología de extracción diferencial.

Una vez obtenido el RNA total usando la técnica de extracción diferencial de las muestras de pulmones de ratones infectados con las cepas 46 (n=3), 46P (n=3), 48 (n=3) y 48V (n=3) se procedió a realizar la depleción del RNAr procarionta y eucariota utilizando el kit RiboZero Epidemiology, logrando depletar las muestras de RNAr, lo cual fue evaluado mediante el ensayo Eukaryote Total RNA Nano (**Figura 25**).

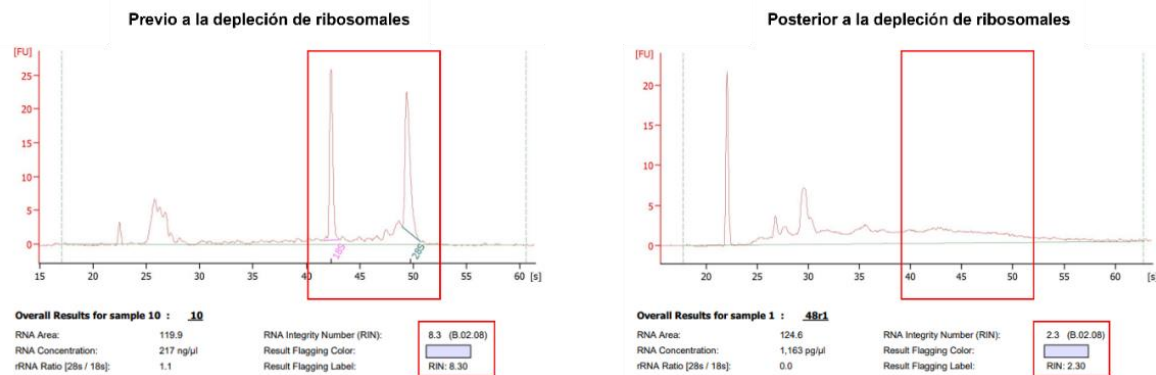


Figura 25. Muestra representativa de RNA total antes (A) y después (B) de la remoción del RNAr usando el kit RiboZero Epidemiology.

La **Figura 26** ejemplifica una muestra representativa de librería de RNA de huésped (MTB) partiendo de la técnica de extracción diferencial y la depleción de ribosomales con el kit RiboZero Epidemiology.

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [pg/ul]	Assigned Conc. [pg/ul]	Peak Molarity [pmol/l]	% Integrated Area	Peak Comment	Observations
25	448	-	27600	-		Lower Marker
486	845	-	2670	100.00		
1500	250	250	256	-		Upper Marker

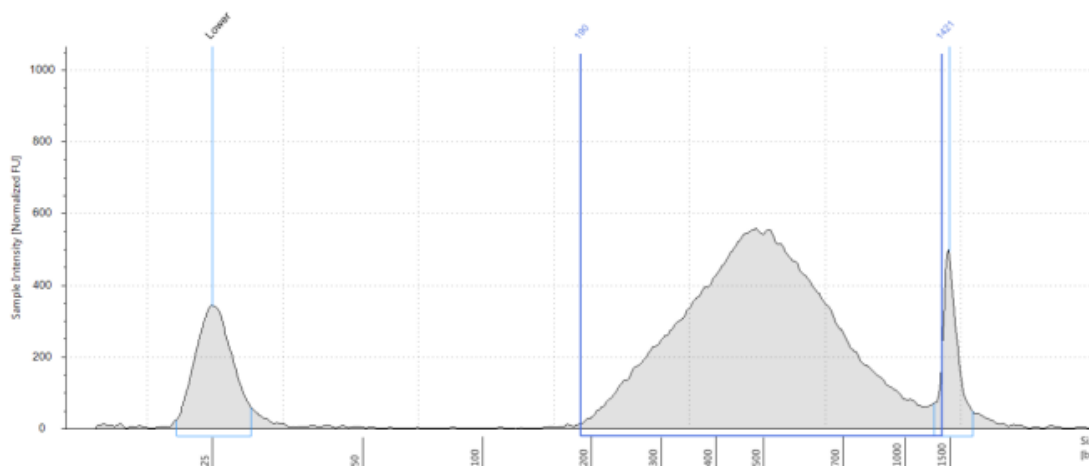


Figura 26. Perfil del material genético posterior al proceso de enriquecimiento por centrifugación y depleción de ribosomales y preparación de la librería de RNA.

Las 12 librerías de RNA fueron secuenciadas y las lecturas crudas limpiadas para eliminar aquellas de baja calidad ($Q < 20$) (**Tabla 11**).

Tabla 11. Lecturas obtenidas a partir de la secuenciación de las librerías de RNA obtenidas mediante la técnica de extracción diferencial, captura con sondas biotiniladas y limpieza de lecturas crudas.

Muestra	Lecturas totales	Lecturas limpias (%)
46 R1	13,307,572	12,530,748 (94.16%)
46 R2	58,663,806	55,691,502 (94.93%)
46 R3	21,828,318	18,867,714 (86.44%)
46P R1	42,490,578	39,494,097 (92.95%)
46P R2	3,892,188	3,435,631 (88.27%)
46P R3	17,407,662	16,231,658 (93.24%)
48 R1	72,046,958	69,118,767 (95.94%)
48 R2	42,809,972	40,069,200 (93.60%)
48 R3	9,511,188	8,945,455 (94.05%)
48V R1	6,989,450	6,273,402 (89.76%)
48V R2	11,693,702	10,871,089 (92.97%)
48V R3	46,961,260	45,831,955 (97.60%)

Las librerías se mapearon de manera independiente contra los ensamblajes de genomas de cada una de las cepas parentales secuenciados en el objetivo anterior (perfil genómico del huésped). Las librerías de RNA 46 R1, 46 R2, 46 R3, 46P R1, 46P R2 y 46P R3 fueron mapeadas contra el ensamblaje de la cepa 46 (archivo 46_S7) y las librerías de RNA 48 R1, 48 R2, 48 R3, 48V R1, 48V R2 y 48V R3 fueron mapeadas contra el ensamblaje de la cepa 48 (archivo 48_S8). Adicionalmente se mapearon contra el genoma de ratón (GRCm38) y contra las secuencias de RNAr de MTB depositadas en la base de datos SILVA (**Tabla 12**).

Tabla 12. Proporción de RNA correspondiente al hospedero (ratón), a secuencias de ribosomales (RNAr) y correspondiente a lecturas de MTB.

Muestra	Lecturas que mapean contra ratón (%)	Lecturas que mapean a RNAr (%)	Lecturas que mapean contra MTB (%)
46 R1	99.970	0.006	0.024
46 R2	99.980	0.003	0.017
46 R3	99.984	0.002	0.013
46P R1	99.960	0.004	0.036
46P R2	99.957	0.008	0.035
46P R3	99.969	0.003	0.027
48 R1	99.994	0.003	0.006
48 R2	99.989	0.005	0.006
48 R3	99.883	0.001	0.107
48V R1	99.948	0.037	0.015
48V R2	99.982	0.011	0.007
48V R3	99.968	0.011	0.021

Las lecturas mapeadas a *M. tuberculosis* se anotaron de acuerdo con el archivo. gff del genoma correspondiente. En el caso de la cepa 46, Se observaron 1137 genes totales, para la cepa 46P se observaron 1510 genes totales. El transcriptoma de la cepa 48 mostro la expresión de 1869 genes totales, mientras que en el de la cepa 48V se observaron 921 genes totales. Las **Tablas 13-16** muestran los 10 genes mayormente expresados para cada cepa, en orden de mayor a menor expresión.

Tabla 13. Diez genes con mayor cantidad de lecturas en las muestras de RNA de la cepa 46 durante la infección *in vivo* de ratones al día 21 postinfección.

Clasificación	Nombre del gen	Observaciones
1	ssrA	Codifica para una molécula de RNA de transferencia-mensajero; forma un complejo ribonucleoproteico junto con la proteína B pequeña, el factor de elongación Tu y la proteína ribosomal S1. Funciona rehabilitando ribosomas truncados en el proceso de traducción y es esencial en MTB [105].
2	groL2	Codifica para la chaperonina 2, también conocida como el antígeno de 65kDa de MTB, una de las principales proteínas inmunoreactivas de la bacteria [106]
3	lcl1	Codifica para la isocitrato liasa 1; involucrada en el crecimiento y supervivencia de MTB al participar en el ciclo del glioxilato para usar lípidos como fuente principal de carbonos en condiciones de hipoxia, por lo cual ha sido propuesta como blanco terapéutico particularmente para la tuberculosis latente [107].
4	pstS1	Codifica para una proteína de unión a fosfatos reconocida como un agonista de los receptores TLR-2. Induce la producción de citocinas por parte de monocitos (TNF- α ; IL-6, IL-12), media la fagocitosis de la bacteria [108, 109].
5	gyrB1	Codifica para la subunidad 1 de la DNA-girasa, una topoisomerasa que desenrolla DNA de doble cadena de manera ATP-dependiente; blanco de quinolonas para el tratamiento de segunda línea [110].
6	esxH	Codifica para la proteína similar a ESAT-6, sustrato del sistema de secreción Esx-3 tipo VII. Junto con otros sustratos forman un heterodímero inmunogénico y han sido investigados como candidatos a vacunas [111].
7	pckG	Codifica para la fosfoenolpiruvato carboxinasa, enzima gluconeogénica que cataliza la conversión de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato, paso limitante de la vía. Induce una fuerte respuesta inmune celular en modelos experimentales de tuberculosis, activando la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-12 [112].
8	Glucosil-hidrolasa putativa	Catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos; su función en MTB varía entre el remodelaje de peptidoglucano y la hidrólisis de β -glucano [113].
9	proC	Codifica para la proteína Pirrolina 5-carboxilato reductasa; cataliza la reducción de 1-pirrolina-5-carboxilato (PCA) a L-prolina.
10	EspA	Codifica para la proteína asociada al sistema de secreción ESX-1. Requerida para la secreción de ESAT-6 y CFP-10. Ha sido involucrada en la traslocación de bacteria del fagolisosoma al citoplasma en sus hospederos [114].

Tabla 14. Diez genes con mayor cantidad de lecturas en las muestras de RNA de la cepa 46P durante la infección *in vivo* de ratones al día 21 postinfección.

Clasificación	Nombre del gen	Observaciones
1	ssrA	Codifica para una molécula de RNA de transferencia-mensajero; forma un complejo ribonucleoproteico junto con la proteína B pequeña, el factor de elongación Tu y la proteína ribosomal S1. Funciona rehabilitando ribosomas truncados en el proceso de traducción y es esencial en MTB [105].
2	groL2	Codifica para la chaperonina 2, también conocida como el antígeno de 65kDa de MTB, una de las principales proteínas inmunoreactivas de la bacteria [106]
3	lcl1	Codifica para la isocitrato liasa 1; involucrada en el crecimiento y sobrevivida de MTB al participar en el ciclo del glioxilato para usar lípidos como fuente principal de carbonos en condiciones de hipoxia, por lo cual ha sido propuesta como blanco terapéutico particularmente para la tuberculosis latente [107].
4	kasA	Codifica para la proteína 3-oxoacil sintasa 1, parte del sistema de elongación de ácidos grasos de MTB, FAS-II. Involucrado en la biosíntesis de ácido micólico [115].
5	VapB4	Codifica para la antitoxina VapB4, parte de un sistema bacteriano toxina-antitoxina que juega un papel crítico en la regulación de la expresión génica, conllevando a cambios inducidos por estrés incluyendo una latencia reversible [116].
6	Proteína hipotética	-
7	Pks 15/1	Codifica para la poliketido sintasa tipo 1, la cual cataliza la elongación de intermediarios para la biosíntesis de fenolftiocerol (PPOL) un importante intermediario en la biosíntesis del glucolípido fenólico, ampliamente estudiado por su efecto inmunomodulador que limita la respuesta protectora contra ciertas cepas [117].
8	EspA	Codifica para la proteína asociada al sistema de secreción ESX-1. Requerida para la secreción de ESAT-6 y CFP-10. Ha sido involucrada en la traslocación de bacteria del fagolisosoma al citoplasma en sus hospederos [114].
9	metE	Codifica para la proteína que cataliza la transferencia de un grupo metilo a la homocisteína, formando metionina [118].
10	Glucosil-hidrolasa putativa	Catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos; su función en MTB varía entre el remodelaje de peptidoglucano y la hidrólisis de β -glucano [113].

Tabla 15. Diez genes con mayor cantidad de lecturas en las muestras de RNA de la cepa 48 durante la infección *in vivo* de ratones al día 21 postinfección

Clasificación	Nombre del gen	Observaciones
1	ssrA	Codifica para una molécula de RNA de transferencia-mensajero; forma un complejo ribonucleoproteico junto con la proteína B pequeña, el factor de elongación Tu y la proteína ribosomal S1. Funciona rehabilitando ribosomas truncados en el proceso de traducción y es esencial en MTB [105].
2	groL2	Codifica para la chaperonina 2, también conocida como el antígeno de 65kDa de MTB, una de las principales proteínas inmunoreactivas de la bacteria [106]
3	lcl1	Codifica para la isocitrato liasa 1; involucrada en el crecimiento y sobrevivida de MTB al participar en el ciclo del glioxilato para usar lípidos como fuente principal de carbonos en condiciones de hipoxia, por lo cual ha sido propuesta como blanco terapéutico particularmente para la tuberculosis latente [107].
4	RNAr 16S	-
5	mas	Codifica para la proteína sintasa de ácido micocerósico, componente importante de lípidos, como el fitiocerol, considerado un factor de virulencia en MTB [119].
6	Proteína putativa	-
7	hspX	Codifica para una chaperona de la α -cristalina. Las células que expresan este gen crecen más lentamente y son menos susceptibles a la autólisis en medio de cultivo, sugiriendo que la proteína podría disminuir el crecimiento de MTB <i>in vitro</i> y posiblemente <i>in vivo</i> [120].
8	pks2	Codifica para la sintasa de ácido hidroxiptioceránico, involucrada en la biosíntesis de sulfolípidos [121].
9	EsxH	Codifica para la proteína similar a ESAT-6, sustrato del sistema de secreción Esx-3 tipo VII. Junto con otros sustratos forman un heterodímero inmunogénico y han sido investigados como candidatos a vacunas [111].
10	nrdE	Codifica para la subunidad alfa de la reductasa de ribonucleósidos difosfato, la cual sintetiza precursores para la síntesis de DNA [122].

Tabla 16. Diez genes con mayor cantidad de lecturas en las muestras de RNA de la cepa 48V durante la infección *in vivo* de ratones al día 21 postinfección

Clasificación	Nombre del gen	Observaciones
1	ssrA	Codifica para una molécula de RNA de transferencia-mensajero; forma un complejo ribonucleoproteico junto con la proteína B pequeña, el factor de elongación Tu y la proteína ribosomal S1. Funciona rehabilitando ribosomas truncados en el proceso de traducción y es esencial en MTB [105].
2	RNAr 23S	-
3	tuf_1	Codifica para el factor de elongación Tu, factor responsable de la selección y unión del aminoacil-RNA ^t en el ribosoma durante la traducción [123].
4	Icl1	Codifica para la isocitrato liasa 1; involucrada en el crecimiento y supervivencia de MTB al participar en el ciclo del glioxilato para usar lípidos como fuente principal de carbonos en condiciones de hipoxia, por lo cual ha sido propuesta como blanco terapéutico particularmente para la tuberculosis latente [107].
5	RNAr 16S	-
6	Proteína putativa	-
7	Proteína hipotética	-
8	Rip3	Codifica para una metaloproteasa putativa de Zinc.
9	EspA	Codifica para la proteína asociada al sistema de secreción ESX-1. Requerida para la secreción de ESAT-6 y CFP-10. Ha sido involucrada en la traslocación de bacteria del fagolisosoma al citoplasma en sus hospederos [114].
10	EccB3_1	Codifica para la ATPasa EccB3 del sistema de secreción ESX-3, el cual es necesario para mantener la homeostasis de Zinc y Hierro [124].

DISCUSIÓN

La OMS estima que en las últimas dos décadas un total de 43 millones de vidas han sido salvadas gracias a un mejor control de la tuberculosis. A pesar de estos datos alentadores, seguimos muy lejos de lograr las metas establecidas en la estrategia END-TB, las cuales incluyen la reducción de la mortalidad global atribuible a tuberculosis en un 95% para el año 2030 [1]. La tendencia actual a nivel global muestra una reducción del 2% anual en el número de muertes por tuberculosis; sin embargo, se requiere una reducción anual de 17% para lograr alcanzar la meta establecida por la OMS. Con base en esta información es claro que impera la necesidad de “redoblar los esfuerzos” para eliminar a la tuberculosis como problema de salud pública mundial [2, 125]. Ha pasado un siglo desde la introducción de la BCG como la primera, y hasta la fecha única, vacuna profiláctica para el control de la tuberculosis aprobada por la OMS [60]; a pesar de representar una estrategia extremadamente exitosa en diversas regiones geográficas, las limitaciones de la BCG para prevenir el desarrollo de enfermedad pulmonar han sido bien documentados en diversos países a lo largo de las últimas décadas. La vacunación con BCG ha demostrado ser una estrategia altamente costo-efectiva, adicionalmente ha demostrado de manera consistente prevenir en contra de las formas graves de la tuberculosis en la infancia, incluyendo la tuberculosis meníngea y la tuberculosis miliar [126]. Sin embargo, la capacidad para prevenir la tuberculosis pulmonar, la forma más frecuente de la enfermedad, mediante el uso de la BCG es menos marcada, y se ha descrito que esta capacidad es menor ante ciertos genotipos de MTB, incluyendo el genotipo Beijing. Previamente se ha sugerido que la BCG podría actuar como una fuerza de presión selectiva, favoreciendo cambios genéticos y fenotípicos que a su vez podrían contribuir al éxito en la diseminación de este linaje de MTB, sin embargo, hasta este momento se carecía de datos experimentales para evaluar esta posibilidad [64]. En este estudio que fue desarrollado en dos fases a lo largo de una década (fase de virulencia; fase de evaluación genómica y transcriptómica) se presenta evidencia partiendo de un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva, en el cual se evaluó a través de las ciencias “ómicas” el efecto de la vacunación con BCG sobre el perfil genómico y transcriptómico de dos cepas del genotipo Beijing, considerando los cambios genotípicos y transcripcionales que pudieran aportar evidencia respecto a las

diferencias en virulencia observadas en dichas cepas posterior a ser expuestas a ratones vacunados con BCG. De manera interesante, durante los estudios de maestría se determinó que únicamente las cepas del genotipo Beijing (46 vs. 46P; 48 vs. 48V) habían mostrado un cambio en su perfil de virulencia con base en los criterios establecidos en el modelo murino de Hernández-Pando y cols [91, 94], a diferencia de la cepa tipo de laboratorio H37Rv, en cuyo caso no se observó una diferencia significativa en los parámetros de sobrevivencia, carga bacilar o daño histopatológico derivado de la exposición al sistema inmune de ratones vacunados [91]. Los datos presentados son consistentes con estudios previos, en los cuales se ha concluido que las cepas del genotipo Beijing podrían tener ventajas adaptativas en comparación con otros genotipos, incluyendo el genotipo Euro-Americano (H37Rv). Dichas ventajas incluyen un aumento en la expresión de α -cristalina y el regulón dosR, así como la inducción de una respuesta inmune no protectora por parte del hospedero infectado [127, 128]. En conjunto, estas características conllevan a una elevación en la virulencia, evasión de la respuesta inmune del hospedero, y un aumento en la capacidad de establecer latencia [127]. Por dichas observaciones generadas a partir de este estudio previo, se tomó la determinación de continuar los ensayos de genómica y transcriptómica considerando únicamente aquellas cepas que hubieran presentado un aumento de virulencia en los tres parámetros establecidos.

La vacunación de un hospedero es un proceso que consecuentemente prepara al sistema inmune para generar una variedad de células, citocinas y factores humorales para generar un microambiente hostil en contra de un patógeno determinado. En el caso de MTB, la evidencia experimental muestra que es un patógeno el cual puede adaptarse a diversos microambientes subóptimos para su supervivencia, incluyendo la deficiencia de nutrientes, acidez del medio e incluso la hipoxia [129]. En el caso de la BCG, a pesar de suscitar una respuesta inmune que puede generar un ambiente hostil para la bacteria, frecuentemente la infección, e incluso la enfermedad, no puede prevenirse, como es el caso con las vacunas imperfectas [80, 130]. Durante este proceso, las bacterias con mayor *fitness* puede sufrir una evolución adaptativa [131]. Respectivamente, la vacunación masiva puede afectar el balance entre las cepas previamente existentes consideradas “silvestres” y aquellas que sean consideradas resistentes a la vacuna, favoreciendo la mayor diseminación de las últimas [131, 132]. Esto es particularmente el caso cuando el nivel de inmunidad inducido por la

vacunación es menor en términos de la reactividad cruzada al ser comparado con la inmunidad adquirida por una infección de manera natural, y cuando la variabilidad de cepas del patógeno es alta [132]. Estos cambios en las poblaciones de patógenos, los cuales buscan “evadir” o “engañar” a su hospedero han sido ampliamente documentadas en el caso de otros patógenos [86]. En un estudio realizado en pacientes de Holanda, los investigadores observaron diversos polimorfismos en factores de virulencia de *Bordetella pertussis* posterior a la introducción de la vacuna celular completa a nivel poblacional. Estos polimorfismos adicionalmente se asociaron con cepas del patógeno que se recuperaron de sujetos que habían sido previamente vacunados [86]. Es interesante mencionar que los autores de este estudio observaron una relación estadísticamente significativa entre el porcentaje de subtipos específicos del factor de virulencia P.69 presente en las cepas aisladas a partir de individuos enfermos de tos ferina, y su nivel de inmunidad inducida por la vacunación, la cual fue inferida partiendo de la edad a la que se inmuniza contra *Bordetella pertussis* en esta población, y el efecto de disminución de la inmunidad generada a partir de la vacunación a medida que aumenta la edad del sujeto. En este caso, se tomó en cuenta que los grupos de edades 0, 3, 4-11, 12-48 y >48 presentaban niveles de cero (no han sido vacunados), parcial, óptima y decreciente inmunidad inducida por la vacunación, respectivamente. En este caso, la relación observada fue una relación inversa entre los subtipos del factor de virulencia P.69 y el nivel de inmunidad por vacunación. Presumiblemente, estos polimorfismos permitieron que la bacteria causara enfermedad en hospederos que habían sido previamente vacunados, al tener ahora factores de virulencia distintos (plausiblemente generando un menor reconocimiento inmunológico) en comparación con los encontrados en las cepas de la vacuna celular completa. Dichos hallazgos destacan el posible papel de la vacunación como factor influyente en el cambio de la estructura poblacional del patógeno, al modificarse el porcentaje de cepas que presentaban la variante de P.69A (asociada con la vacuna) a cepas con variantes de P.69 distintas a las presentes en la vacuna. Por lo tanto, como fue discutido por van Loo Inge “similar al uso de antibióticos, la vacunación impone una fuerza de presión selectiva considerable en las poblaciones de microorganismos, sin embargo los estudios a largo plazo, basados en poblaciones, que evalúen este efecto de la vacunación masiva son limitados” [133].

También se ha descrito evidencia en este respecto en el caso de la vacuna contra *Haemophilus influenzae*, en cuyo caso se observó un ligero incremento en la incidencia de enfermedad invasiva posterior a la implementación de la vacunación [82]. Por otra parte, la estructura poblacional del virus del sarampión también ha tenido cambios los cuales podrían ser resultado de la vacunación, y la evidencia muestra que los genes en cepas aisladas en la era pre-vacunación tienen variantes importantes las cuales resultan en diferencias antigénicas cuando son comparados con las cepas virales aisladas en la era post-vacunación y con las cepas utilizadas para la preparación de las vacunas [83, 84]. Recientemente, diversos brotes de sarampión han sido identificados en regiones con una alta cobertura de vacunación (>95%), y los resultados obtenidos a partir de estudios epidemiológicos sugieren una mayor prevalencia de genotipos específicos que tienen una capacidad sustancial para transmitirse entre hospederos vacunados. Tal es el caso de un brote epidémico reportado en 2015 en Cataluña, el cual se ha relacionado con diferencias antigénicas entre las cepas circulantes (denominadas variantes de escape inmunológico) y las cepas utilizadas para preparar vacunas, así como también con una inmunidad menguante [85]. En general, los resultados de diversos estudios en una variedad de microorganismos sugieren que los genotipos circulantes de patógenos podrían cambiar a lo largo del tiempo, y por lo tanto esto debe servir como un punto clave con respecto a la evaluación continua de la eficacia de la cepa vacunal cuando se considera el escenario de epidemiología molecular observado en este momento y región.

Entre las diferentes familias de MTB, el genotipo Beijing es reconocido por ser particularmente capaz de evadir la respuesta inmune [24]. Algunos de los miembros de esta familia han causado, a partir de múltiples determinantes, enfermedad grave en hospederos vírgenes, así como hospederos vacunados, creando un nuevo riesgo en regiones donde la tuberculosis parecía ya no representar una amenaza a la salud pública desde hace varias décadas, como el caso del brote de la cepa W en la ciudad de Nueva York [134]. En este sentido, uno de los hallazgos más interesantes a partir de los resultados presentados en los antecedentes de este trabajo de investigación es el hecho de que las dos cepas del genotipo Beijing seleccionadas para el ensayo mostraron un aumento en su perfil de virulencia, así como un cambio en su perfil genómico y en el perfil transcriptómico del hospedero, posterior a la exposición al

sistema inmune de ratones vacunados con BCG. En cambio, la cepa H37Rv (del genotipo Euro-Americano) no mostro dicho cambio en su perfil de virulencia, por lo cual no se realizaron estudios adicionales que incurrían en costos importantes a nivel experimental siendo que el fenotipo de la enfermedad no presento variaciones significativas entre las cepas parental (cepa parental con el código 1), y las recolectadas a partir de hospederos vacunados (1P, 1V). Esta observación subraya las diferentes respuestas ante hospederos vacunados que se pueden suscitar entre los diversos genotipos de MTB. Es importante destacar que la cepa H37Rv es una cepa tipo de laboratorio, adaptada a condiciones estándar de cultivo y mantenimiento, por lo cual es posible que su capacidad para adaptarse a otras circunstancias hostiles esté disminuida en comparación con cepas recolectadas como aislados clínicos que circulan de manera silvestre.

Por otra parte, también es importante destacar que en el caso de las cepas 46 y 48, la exposición a ratones sham-vacunados con SSE no suscitó un cambio en la virulencia medible a través del modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva (46 vs. 46S; 48 vs. 48V), sugiriendo que el cambio en la virulencia se asocia con la exposición a hospederos vacunados. Sin embargo, cabe mencionar que ambas cepas del genotipo Beijing respondieron de manera distinta en términos de la subcepa de BCG que produjo las diferencias en el fenotipo de enfermedad. En el caso de la cepa 46, la exposición a ratones vacunados con la cepa BCG Phipps fue la condición a partir de la cual se recabó la cepa hipervirulenta, 46P. Mientras que en el caso de la cepa 48, la vacunación con la cepa BCG Vietnam fue la condición a partir de la cual se recabó la cepa hipervirulenta, 48V. Ambas cepas de BCG fueron seleccionadas para este estudio debido a información recabada en ensayos anteriores que mostraron un mayor nivel de protección por parte de BCG Phipps contra diversas cepas de MTB, incluyendo la cepa H37Rv, y un menor nivel de protección en el caso de BCG Vietnam, representando así una BCG de mayor eficacia y otra de menor eficacia [135]. De manera interesante, la cepa 46 fue aislada de la región de Vietnam, y por lo tanto sería factible que dicha cepa podría ya haber estado expuesta, y haberse adaptado, a hospederos vacunados con dicha cepa, a diferencia de la cepa 48, aislada en Sudáfrica. Sin embargo, esta es meramente una hipótesis, se requieren estudios adicionales para caracterizar los factores que subyacen a esta observación. Es importante también destacar el hecho de que la cepa 46 es una cepa Beijing típica,

mientras que la cepa 48 es una cepa Beijing atípica. Las primeras representan cepas más prevalentes y de manera general se describe que las cepas atípicas lograron mantener una población estable con menos virulencia y transmisibilidad. Se ha planteado la hipótesis de que las cepas atípicas dieron lugar a las cepas típicas por algún evento que les permitió ganar una ventaja competitiva, expandirse y prevalecer. Es posible que la vacunación masiva con BCG pudiera corresponder a dicho evento, aunque esto nuevamente es meramente especulativo y se requieren estudios adicionales para su evaluación. Sin embargo, los datos del presente experimento muestran un cambio numéricamente mayor en la carga bacilar de la cepa 48V en comparación con la 46P.

Otro hallazgo que es importante destacar es que los ensayos de virulencia inicialmente parecían sugerir un mecanismo común por el cual las bacterias del genotipo Beijing 46 y 48 aumentaban su virulencia posterior a la exposición a hospederos vacunados, ya que ambas cepas 46P y 48V mostraron similitudes en las curvas de supervivencia (100% de mortalidad a la cuarta semana postinfección), en el tipo de daño histopatológico (generando necrosis pulmonar masiva), así como muy baja inflamación y formación de granulomas en los días 1-14 postinfección, sugiriendo un bajo reconocimiento por parte del sistema inmunológico. Sin embargo, el patrón transcripcional de los pulmones de animales infectados con dichas cepas tuvo solamente dos genes cuya expresión diferencial se observó en las comparaciones hechas entre animales infectados con las cepas parentales y las cepas obtenidas de animales vacunados. Los animales infectados con las cepas 46 y 46P mostraron expresión diferencial de genes cuyos productos tienen importantes funciones inmunes; por ejemplo, la molécula CD-14, un conocido co-receptor en monocitos y macrófagos cuya función se asocia con la unión a moléculas microbianas. Estudios previos en ratones *knockout* para CD14 infectados con MTB mostraron que estos animales tienen una disminución en la respuesta inflamatoria, la cual los protege de desenlaces letales a lo largo de la infección [136]. En el caso de los animales infectados con las cepas 48 y 48V, los genes con expresión diferencial incluyen *cytokine-like 1*, un conocido factor quimiotáctico para monocitos y macrófagos. Esta citocina es similar a la CCL2, la cual ha mostrado incrementar la acumulación de macrófagos y linfocitos T en el pulmón, así como mediar su organización durante la infección por MTB [137], un hallazgo que sugeriría una posible explicación para la

diferencia en la inflamación a nivel pulmonar durante los primeros 14 días postinfección. Otros genes que presentaron expresión diferencial incluyen IL-33 y el receptor de interleucina 1 (tipo 1). En el caso específico de MTB, IL-33 ha mostrado tener un efecto protector en animales infectados, así como un efecto terapéutico cuando se administra de manera sistémica postinfección [138].

A pesar de las diferencias generales en el perfil transcriptómico, cabe destacar la presencia de dos genes sobre expresados en ambos casos al hacer la comparación 46 vs. 46P y 48 vs. 48V. El primero es el gen que codifica para la glucoproteína 2, la cual juega un papel importante en la respuesta inmune innata, y el gen que codifica para Vanina-1, la cual en ratones se ha demostrado regula la migración de progenitores de linfocitos T al timo para su maduración. A pesar de que el papel de ambos productos no ha sido explorado, a la fecha, durante la infección por MTB, es importante notar que la Vanina-1 ha sido previamente estudiada en modelos con otros microorganismos. En un estudio anterior, la Vanina-1 mostro controlar la formación de granulomas y polarización de macrófagos durante la infección por *Coxiella burnetii* [139]. En este estudio, los autores concluyen que la Vanina-1 es un componente clave para modelar la naturaleza e intensidad de la respuesta inmune contra la infección, esto derivado del hecho de que dicha molécula tiene un papel importante en el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección y la polarización de macrófagos. Los ensayos mostraron que los ratones K.O. tuvieron una disminución significativa en la formación de granulomas, probablemente resultado de la alteración en el tráfico de leucocitos y una reducción en la producción de citocinas. A pesar de que su función en animales infectados con MTB no ha sido estudiada, nuestros resultados muestran que los animales infectados con estas cepas tienen una expresión diferencial de este gen, y que esto correlaciona histológicamente con una disminución en la capacidad de formar granulomas por parte de los animales infectados con las cepas 46P y 48V, en comparación con los animales infectados con las cepas parentales. Esto sugiere que la limitación en el número y tamaño de los granulomas observado en este ensayo podría derivar de la expresión diferencial de Vanina-1. Estos resultados ameritan una investigación exhaustiva a mediano plazo para caracterizar el rol del gen Vanina-1 durante la infección por MTB, y su potencial efecto terapéutico como inmunomodulador. Es importante subrayar que el cambio en el nivel de expresión mostró un rango superior de 1.44, sin embargo, estos niveles han mostrado ser

clínicamente relevantes en ensayos previos [140], por lo tanto, su significancia biológica en este momento no puede concluirse de manera contundente.

Por último, el diseño experimental también permitió obtener información importante en el perfil de la bacteria, tanto a nivel genómico como a nivel transcriptómico, este último presentado por primera vez en un modelo *in vivo* de infección por cepas del genotipo Beijing. En términos del perfil genómico de las cepas 46 vs. 46P y 48 vs. 48V, la evidencia parece apoyar la hipótesis de que las variantes que diferencian las cepas se asocian con genes cuyos productos pueden impactar el reconocimiento de la vacuna por parte del sistema inmunológico, incluyendo las proteínas de la familia PE y PPE. Dichas proteínas representan el 10% de las regiones codificantes en los genomas de MTB, comparten un motivo prolina-ácido glutámico (PE) o prolina-prolina-ácido glutámico (PPE) y a pesar de que su función específica como familia aún no está completamente elucidada, diversos autores sugieren que podrían proveer variación antigénica. Las secuencias son de una naturaleza polimórfica, y por lo tanto la relevancia biológica de dichas mutaciones requiere ensayos adicionales para ser valorada. Sin embargo, una alteración que podría explicar las diferencias en el perfil de inflamación observado entre los animales infectados con la cepa 46 vs. 46P es la variante de tipo cambio en el marco de lectura del gen que codifica para la proteína PPE13 en la cepa 46P, misma que no se encontraba en la cepa parental 46. De manera interesante, esta PPE se ha identificado como responsable de la inducción de la secreción de IL-1B a través de la activación del *inflamósoma* por NLRP3 [141]. Dicha citocina es clave en la respuesta del hospedero contra MTB, dirigiendo la respuesta inmune por parte de los linfocitos T [142]. Es importante también recalcar que, al representar una amplia región del genoma codificante, no se puede descartar el hecho de que dichas observaciones sean el producto de variaciones estocásticas, y no una relación directa con las condiciones experimentales planteadas en este estudio.

En el caso del transcriptoma del hospedero, la metodología desarrollada en este estudio nos da por primera vez, hasta el mejor de nuestros conocimientos, la oportunidad de identificar los genes mayormente expresados durante la infección *in vivo* con cepas del genotipo Beijing. En el caso de la cepa 46 y 46P, los resultados muestran que existen genes expresados dentro de los top 10 en ambas cepas, incluyendo RNAt, chaperonina 2 (también conocida como el antígeno de 65 kDa), la

isocitrato liasa 1, la glucosil hidrolasa, y la proteína asociada al sistema de secreción ESX-1 (EspA). Es interesante que 5 genes entre los mayormente expresados se comparten en la cepa 46 y 46P, subrayando su similitud. Sin embargo, existen genes que solamente son expresados en el top 10 por la cepa 46, incluyendo a la proteína de unión a fosfatos PstS1, la subunidad B de la DNA girasa, la proteína similar a ESAT-6 EsxH, el fosfoenolpiruvato carboxinasa y la pirrolina-5-carboxilato reductasa. En general, dichos genes se asocian con procesos de gluconeogénesis y metabolismo de aminoácidos (probablemente para entrar a la vía gluconeogénica). Interesantemente la PstS1 es un agonista del receptor TLR-2, y en ensayos con MTB se ha observado que dicho producto de la bacteria señala a través de esta vía para regular las células presentadoras de antígenos [108], lo cual, por supuesto podría explicar las características de la enfermedad observadas en animales infectados con la cepa 46, incluyendo una mayor formación de granulomas, infiltrado inflamatorio y menor carga bacilar. En el caso de la cepa 46P, los genes con mayor expresión únicos a esta cepa incluyen a la 3-oxoacil sintasa 1 (kasA), una proteína acarreadora de acilos, la antitoxina VapB4, la poliketido sintasa tipo I Pks15/1 y la 5-metiltetrahydropteroylglutamato-homocisteína metiltransferasa (metE). Entre estos cabe destacar el papel de kasA como un paso clave para la síntesis de ácidos micólicos, así como de la Pks15/1 que funciona para la síntesis del glucolípido fenólico, lípido bioactivo modulador de la respuesta inmune ampliamente estudiado en el contexto de la virulencia de cepas del genotipo Beijing [143].

El perfil transcriptómico de la cepa 48 y 48V también delimita un perfil interesante, en este caso, ambas cepas comparten algunos genes entre el top 10 expresados, incluyendo RNAt, isocitrato liasa y RNAr 16S. Sin embargo, la cepa 48 parental adicionalmente tiene una alta expresión de chaperonina 2, sintasa de ácido micocerosico, α -cristalina, pks2 (involucrada en la síntesis de sulfolípidos-1 [121]), la proteína similar a ESAT-6 y la subunidad α de la ribonucleósido-difosfato reductasa. En cambio, la cepa 48V expresa RNAr 23S, el factor de elongación Tu, la metaloproteasa Rip3 y la proteína EspA así como la ATPasa del sistema de secreción ESX3.

Por último, se observó la presencia de algunos genes compartidos entre los más expresados por parte de las 4 cepas, incluyendo a la isocitrato liasa, una enzima necesaria para el ciclo del glioxilato, el cual se activa por parte de MTB al exponerse a

ambientes de hipoxia para utilizar ácidos grasos como fuente principal de carbono [144].

De manera general, los experimentos presentados en este estudio presentan evidencia a nivel experimental en términos del papel que juegan los hospederos vacunados en el contexto de las interacciones hospedero-patógeno. A partir de nuestros resultados, se podría sugerir que los hospederos interactúan de manera distinta con patógenos que presentan diversos niveles de virulencia, a pesar de ser extremadamente similares en términos genómicos. Los patógenos, por otra parte, están constantemente adaptándose a un ambiente cambiante, siendo capaces de producir cambios que alteren el reconocimiento por parte del sistema inmunológico del hospedero para poder así sobrevivir a pesar de existir una población altamente vacunada. Sin embargo, se debe enfatizar la necesidad de interpretar estos datos de manera cautelosa, los cuales surgen de un modelo murino y no existe en este momento la posibilidad de extrapolarlos más allá del modelo experimental. Por otra parte, la información nos permite hacer un llamado urgente en cuestión a la necesidad imperiosa de producir una vacuna de mayor eficacia para el control de la tuberculosis. Como en el caso de *Bordetella pertusis*, es posible que la introducción de una nueva estrategia profiláctica (como fue el caso de la vacuna acelular) pueda contrarrestar la ventaja adaptativa de las variantes adaptadas a la vacunación [86, 145, 146].

El estudio presentado tiene diversas fortalezas, incluyendo el uso de ratones singénicos para disminuir la variabilidad interhospedero, así como el uso de metodologías para evitar artefactos durante la comparación genómica, incluyendo el uso de técnicas libres de PCR para generar las librerías de secuenciación de DNA, así como una profundidad de secuenciación entre 475 y 715 para cada una de las cepas secuenciadas. Sin embargo, es importante también subrayar que los resultados deben interpretarse a la luz de las limitaciones, que incluyen un diseño metodológico que no consideró la secuenciación de cepas adicionales, y el hecho de que se utilizaron solamente dos cepas del genotipo Beijing para conducir el ensayo.

Por último, cabe hacer hincapié en el hecho de que hasta este momento la vacunación es la intervención más costo-efectiva en términos de salud, y salva aproximadamente 3 millones de vidas al año. Sin embargo, la vacunación con BCG como única estrategia profiláctica no ha logrado cumplir con las necesidades epidemiológicas actuales y por lo tanto esfuerzos considerables, tanto financieros

como intelectuales, deben ser requeridos a nivel global para buscar una estrategia de mayor eficacia. Mientras tanto, el uso óptimo de la BCG recomendado por la OMS sigue siendo estrictamente necesario a la luz de las tendencias actuales de incidencia y mortalidad por tuberculosis.

RESUMEN DE RESULTADOS

1. Las diferencias identificadas en el perfil genómico y transcriptómico de las cepas 46, 46P, 48 y 48V correlacionan con las diferencias en virulencia observadas en estudios anteriores.
2. El aumento de la expresión en el gen que codifica para la proteína Vanina-1 se asocia con la mayor capacidad en animales infectados con las cepas 46 y 48 para formar granulomas más temprano y de mayor tamaño en comparación con aquellos infectados con la cepa 48V.
3. En el proceso de infección *in vivo* existen diferencias importantes respecto a los genes con mayor cantidad de lecturas por parte de las cepas 46 vs. 46P y 48 vs. 48V.
4. Se requiere una optimización de la metodología de extracción diferencial de RNA o una secuenciación con mayor número de lecturas para lograr caracterizar los perfiles de expresión diferencial en la bacteria durante el proceso de infección *in vivo*.
5. Nuestro trabajo señala que el perfil genómico, transcriptómico y fenotípico de la enfermedad apuntan hacia un mecanismo de evasión de la respuesta inmune, sin embargo, no hay suficiente evidencia para determinar en este momento el/los mecanismos involucrados que conllevan al cambio en el perfil de virulencia observado.
6. Actualmente los datos obtenidos en este estudio resaltan la complejidad ya previamente descrita respecto a la virulencia de MTB, subrayando que incluso entre cepas del mismo genotipo no existe un único factor de virulencia, por lo que es de suma importancia realizar estudios adicionales para elucidar el papel de las alteraciones encontradas en estos ensayos.

CONCLUSIÓN

En un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva la exposición de las cepas del genotipo Beijing a hospederos vacunados con BCG generó una presión selectiva que favoreció la selección de cepas con cambios genómicos en comparación con las cepas parentales, generando un fenotipo de enfermedad más agresivo en cuestión a mortalidad y carga bacilar, probablemente mediado por un fallo en el reconocimiento del patógeno y la disminución en la activación temprana por parte del sistema inmune.

PERSPECTIVAS

1. Incrementar la eficiencia de la técnica de extracción diferencial de RNA del hospedero para lograr llevar a cabo estudios de expresión diferencial de genes.
2. Evaluar el papel de Vanina-1 durante la infección *in vivo* mediante PCR cuantitativa e inmunohistoquímica a lo largo de todos los días destacados en la cinética de infección establecida.
3. Caracterizar el efecto de la vacunación en cepas de otras familias del complejo MTB.
4. Evaluar las características de virulencia y el perfil transcripcional generado a partir de bacterias obtenidas de individuos vacunados y sin vacunar quienes hayan presentado tuberculosis en el contexto de un mismo brote epidemiológico y cumplan la definición de contactos.

REFERENCIAS

- [1] W.H. Organization., Global tuberculosis report 2020., 2020.
- [2] W.H. Organization., 2017., Bending the Curve - Ending TB: Annual Report, (New Delhi: World Health Organization (2017).) (2017).
- [3] D.G.d. Epidemiología. http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html. (Accessed 11 de Octubre del 2020. .
- [4] S.H. Kaufmann, How can immunology contribute to the control of tuberculosis?, *Nat Rev Immunol* 1(1) (2001) 20-30.
- [5] A. O'Garra, P.S. Redford, F.W. McNab, C.I. Bloom, R.J. Wilkinson, M.P. Berry, The immune response in tuberculosis, *Annu Rev Immunol* 31 (2013) 475-527.
- [6] M. Pai, M.A. Behr, D. Dowdy, K. Dheda, M. Divangahi, C.C. Boehme, A. Ginsberg, S. Swaminathan, M. Spigelman, H. Getahun, D. Menzies, M. Raviglione, Tuberculosis, *Nat Rev Dis Primers* 2 (2016) 16076.
- [7] E. Guirado, L.S. Schlesinger, Modeling the Mycobacterium tuberculosis Granuloma - the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease, *Front Immunol* 4 (2013) 98.
- [8] I. Comas, M. Coscolla, T. Luo, S. Borrell, K.E. Holt, M. Kato-Maeda, J. Parkhill, B. Malla, S. Berg, G. Thwaites, D. Yeboah-Manu, G. Bothamley, J. Mei, L. Wei, S. Bentley, S.R. Harris, S. Niemann, R. Diel, A. Aseffa, Q. Gao, D. Young, S. Gagneux, Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans, *Nat Genet* 45(10) (2013) 1176-82.
- [9] T. Paulson, Epidemiology: A mortal foe, *Nature* 502(7470) (2013) S2-3.
- [10] I. Hershkovitz, H.D. Donoghue, D.E. Minnikin, G.S. Besra, O.Y. Lee, A.M. Gernaey, E. Galili, V. Eshed, C.L. Greenblatt, E. Lemma, G.K. Bar-Gal, M. Spigelman, Detection and molecular characterization of 9,000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean, *PLoS One* 3(10) (2008) e3426.
- [11] D. Heemskerck, M. Caws, B. Marais, J. Farrar, Tuberculosis in Adults and Children, London, 2015.

- [12] K.K. Shah, B.S. Pritt, M.P. Alexander, Histopathologic review of granulomatous inflammation, *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* 7 (2017) 1-12.
- [13] M.S. Glickman, W.R. Jacobs, Jr., Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline, *Cell* 104(4) (2001) 477-85.
- [14] J. Furin, H. Cox, M. Pai, Tuberculosis, *Lancet* 393(10181) (2019) 1642-1656.
- [15] W.H. Organization, Global tuberculosis report, Geneva, 2018.
- [16] J.M. Bello-Lopez, G. Leon-Garcia, A. Rojas-Bernabe, V. Fernandez-Sanchez, O. Garcia-Hernandez, J. Mancilla Ramirez, G. Ibanez-Cervantes, Morbidity Trends and Risk of Tuberculosis: Mexico 2007-2017, *Can Respir J* 2019 (2019) 8295261.
- [17] L.S. Palomino JC, Ritacco V, Tuberculosis. From basic science to patient care. First edition. , (2007).
- [18] B.A. Forbes, G.S. Hall, M.B. Miller, S.M. Novak, M.C. Rowlinson, M. Salfinger, A. Somoskovi, D.M. Warshauer, M.L. Wilson, Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria, *Clin Microbiol Rev* 31(2) (2018).
- [19] I. Smith, *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence, *Clin Microbiol Rev* 16(3) (2003) 463-96.
- [20] S. Sturgill-Koszycki, P.H. Schlesinger, P. Chakraborty, P.L. Haddix, H.L. Collins, A.K. Fok, R.D. Allen, S.L. Gluck, J. Heuser, D.G. Russell, Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase, *Science* 263(5147) (1994) 678-81.
- [21] M. Druszczynska, M. Kowalewicz-Kulbat, M. Fol, M. Wlodarczyk, W. Rudnicka, Latent *M. tuberculosis* infection--pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention strategies, *Pol J Microbiol* 61(1) (2012) 3-10.
- [22] A. Zumla, M. Raviglione, R. Hafner, C.F. von Reyn, Tuberculosis, *N Engl J Med* 368(8) (2013) 745-55.
- [23] L.A. Pirofski, A. Casadevall, Q and A: What is a pathogen? A question that begs the point, *BMC Biol* 10 (2012) 6.
- [24] B. Lopez, D. Aguilar, H. Orozco, M. Burger, C. Espitia, V. Ritacco, L. Barrera, K. Kremer, R. Hernandez-Pando, K. Huygen, D. van Soolingen, A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes, *Clin Exp Immunol* 133(1) (2003) 30-7.

- [25] M.A. Forrellad, L.I. Klepp, A. Gioffre, J. Sabio y Garcia, H.R. Morbidoni, M. de la Paz Santangelo, A.A. Cataldi, F. Bigi, Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex, *Virulence* 4(1) (2013) 3-66.
- [26] S.F.-V.a.C.I.E. Gabriela Echeverria-Valencia, *Virulence Factors and Pathogenicity of Mycobacterium*, Intechopen2017.
- [27] H. Alonso, J. Parra, W. Malaga, D. Payros, C.F. Liu, C. Berrone, C. Robert, E. Meunier, O. Burlet-Schiltz, M. Riviere, C. Guilhot, Protein O-mannosylation deficiency increases LprG-associated lipoarabinomannan release by Mycobacterium tuberculosis and enhances the TLR2-associated inflammatory response, *Sci Rep* 7(1) (2017) 7913.
- [28] T. Fukuda, T. Matsumura, M. Ato, M. Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, S. Matsumoto, K. Kobayashi, T. Kinoshita, Y.S. Morita, Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis, *mBio* 4(1) (2013) e00472-12.
- [29] H. Makinoshima, M.S. Glickman, Regulation of Mycobacterium tuberculosis cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis, *Nature* 436(7049) (2005) 406-9.
- [30] H.N. Murphy, G.R. Stewart, V.V. Mischenko, A.S. Apt, R. Harris, M.S. McAlister, P.C. Driscoll, D.B. Young, B.D. Robertson, The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis, *J Biol Chem* 280(15) (2005) 14524-9.
- [31] M.B. Reed, P. Domenech, C. Manca, H. Su, A.K. Barczak, B.N. Kreiswirth, G. Kaplan, C.E. Barry, 3rd, A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response, *Nature* 431(7004) (2004) 84-7.
- [32] J.E. Posey, T.M. Shinnick, F.D. Quinn, Characterization of the twin-arginine translocase secretion system of Mycobacterium smegmatis, *J Bacteriol* 188(4) (2006) 1332-40.
- [33] A.S. Pym, P. Brodin, R. Brosch, M. Huerre, S.T. Cole, Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti, *Mol Microbiol* 46(3) (2002) 709-17.

- [34] D. Bottai, M. Di Luca, L. Majlessi, W. Frigui, R. Simeone, F. Sayes, W. Bitter, M.J. Brennan, C. Leclerc, G. Batoni, M. Campa, R. Brosch, S. Esin, Disruption of the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation, *Mol Microbiol* 83(6) (2012) 1195-209.
- [35] R. Iantomasi, M. Sali, A. Cascioferro, I. Palucci, A. Zumbo, S. Soldini, S. Rocca, E. Greco, G. Maulucci, M. De Spirito, M. Fraziano, G. Fadda, R. Manganeli, G. Delogu, PE_PGRS30 is required for the full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, *Cell Microbiol* 14(3) (2012) 356-67.
- [36] N.K. Saini, A. Baena, T.W. Ng, M.M. Venkataswamy, S.C. Kennedy, S. Kunnath-Velayudhan, L.J. Carreno, J. Xu, J. Chan, M.H. Larsen, W.R. Jacobs, Jr., S.A. Porcelli, Suppression of autophagy and antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS47, *Nat Microbiol* 1(9) (2016) 16133.
- [37] L.S. Ates, A. Dippenaar, R. Ummels, S.R. Piersma, A.D. van der Woude, K. van der Kuij, F. Le Chevalier, D. Mata-Espinosa, J. Barrios-Payan, B. Marquina-Castillo, C. Guapillo, C.R. Jimenez, A. Pain, E.N.G. Houben, R.M. Warren, R. Brosch, R. Hernandez-Pando, W. Bitter, Mutations in ppe38 block PE_PGRS secretion and increase virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nat Microbiol* 3(2) (2018) 181-188.
- [38] R. Lathigra, Y. Zhang, M. Hill, M.J. Garcia, P.S. Jackett, J. Ivanyi, Lack of production of the 19-kDa glycolipoprotein in certain strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Res Microbiol* 147(4) (1996) 237-49.
- [39] M. Henao-Tamayo, A.P. Junqueira-Kipnis, D. Ordway, M. Gonzales-Juarrero, G.R. Stewart, D.B. Young, R.J. Wilkinson, R.J. Basaraba, I.M. Orme, A mutant of *Mycobacterium tuberculosis* lacking the 19-kDa lipoprotein Rv3763 is highly attenuated in vivo but retains potent vaccinogenic properties, *Vaccine* 25(41) (2007) 7153-9.
- [40] R.L. Gaur, K. Ren, A. Blumenthal, S. Bhamidi, F.D. Gonzalez-Nilo, M. Jackson, R.N. Zare, S. Ehrt, J.D. Ernst, N. Banaei, LprG-mediated surface expression of lipoarabinomannan is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS Pathog* 10(9) (2014) e1004376.

- [41] M.V. Bianco, F.C. Blanco, M.A. Forrellad, D. Aguilar, E. Campos, L.I. Klepp, R. Hernandez-Pando, A.A. Cataldi, F. Bigi, Knockout mutation of p27-p55 operon severely reduces replication of *Mycobacterium bovis* in a macrophagic cell line and survival in a mouse model of infection, *Virulence* 2(3) (2011) 233-7.
- [42] F. Bigi, A. Gioffre, L. Klepp, M.P. Santangelo, A. Alito, K. Caimi, V. Meikle, M. Zumarraga, O. Taboga, M.I. Romano, A. Cataldi, The knockout of the *lprG-Rv1410* operon produces strong attenuation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Microbes Infect* 6(2) (2004) 182-7.
- [43] Y. Yuan, D.D. Crane, R.M. Simpson, Y.Q. Zhu, M.J. Hickey, D.R. Sherman, C.E. Barry, 3rd, The 16-kDa alpha-crystallin (*Acr*) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16) (1998) 9578-83.
- [44] Y. Hu, F. Movahedzadeh, N.G. Stoker, A.R. Coates, Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* alpha-crystallin-like *hspX* gene causes increased bacterial growth in vivo, *Infect Immun* 74(2) (2006) 861-8.
- [45] A.M. Cadena, S.M. Fortune, J.L. Flynn, Heterogeneity in tuberculosis, *Nat Rev Immunol* 17(11) (2017) 691-702.
- [46] J.K. Sia, J. Rengarajan, Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections, *Microbiol Spectr* 7(4) (2019).
- [47] D.K. Male, and Ivan M. Roitt. , *Inmunología*, 8va edición. ed., Elsevier, Barcelona, 2014.
- [48] C.H. Liu, H. Liu, B. Ge, Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion, *Cell Mol Immunol* 14(12) (2017) 963-975.
- [49] K.D. Mayer-Barber, D.L. Barber, Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection, *Cold Spring Harb Perspect Med* 5(12) (2015).
- [50] A.J. Wolf, L. Desvignes, B. Linas, N. Banaiee, T. Tamura, K. Takatsu, J.D. Ernst, Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs, *J Exp Med* 205(1) (2008) 105-15.

- [51] E. Torrado, A.M. Cooper, Cytokines in the balance of protection and pathology during mycobacterial infections, *Adv Exp Med Biol* 783 (2013) 121-40.
- [52] S.A. Khader, G.K. Bell, J.E. Pearl, J.J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G.E. Cilley, F. Shen, S.M. Eaton, S.L. Gaffen, S.L. Swain, R.M. Locksley, L. Haynes, T.D. Randall, A.M. Cooper, IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge, *Nat Immunol* 8(4) (2007) 369-77.
- [53] M. Silva Miranda, A. Breiman, S. Allain, F. Deknuydt, F. Altare, The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria?, *Clin Dev Immunol* 2012 (2012) 139127.
- [54] E.J. Rubin, The granuloma in tuberculosis--friend or foe?, *N Engl J Med* 360(23) (2009) 2471-3.
- [55] A. Ahmed, S. Rakshit, V. Adiga, M. Dias, P. Dwarkanath, G. D'Souza, A. Vyakarnam, A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond, *Immunol Rev* 301(1) (2021) 98-121.
- [56] S. Luca, T. Mihaescu, History of BCG Vaccine, *Maedica (Bucur)* 8(1) (2013) 53-8.
- [57] P. Orduña, A.I. Castillo-Rodal, Y. López-Vidal, BCG Vaccine and its use in Mexico, 2013.
- [58] G.W. Comstock, C.E. Palmer, Long-term results of BCG vaccination in the southern United States, *Am Rev Respir Dis* 93(2) (1966) 171-83.
- [59] P.D. Hart, I. Sutherland, BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life, *Br Med J* 2(6082) (1977) 293-5.
- [60] J. Liu, V. Tran, A.S. Leung, D.C. Alexander, B. Zhu, BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy, *Hum Vaccin* 5(2) (2009) 70-8.
- [61] G.V. Baily, Tuberculosis prevention Trial, Madras, *Indian J Med Res* 72 Suppl (1980) 1-74.
- [62] Trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention: first report--Tuberculosis Prevention Trial, *Bull World Health Organ* 57(5) (1979) 819-27.

- [63] G.A. Colditz, T.F. Brewer, C.S. Berkey, M.E. Wilson, E. Burdick, H.V. Fineberg, F. Mosteller, Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature, *JAMA* 271(9) (1994) 698-702.
- [64] F. Abebe, G. Bjune, The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and low-level protection by bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccines: is there a link?, *Clin Exp Immunol* 145(3) (2006) 389-97.
- [65] P. Mangtani, I. Abubakar, C. Ariti, R. Beynon, L. Pimpin, P.E. Fine, L.C. Rodrigues, P.G. Smith, M. Lipman, P.F. Whiting, J.A. Sterne, Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials, *Clin Infect Dis* 58(4) (2014) 470-80.
- [66] A.C. Hesselning, M.F. Cotton, C. Fordham von Reyn, S.M. Graham, R.P. Gie, G.D. Hussey, Consensus statement on the revised World Health Organization recommendations for BCG vaccination in HIV-infected infants, *Int J Tuberc Lung Dis* 12(12) (2008) 1376-9.
- [67] D.G. Russell, C.E. Barry, 3rd, J.L. Flynn, Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us, *Science* 328(5980) (2010) 852-6.
- [68] W.H. Organization, BCG vaccines: WHO position paper 2018. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260306/WER9308.pdf;jsessionid=C6BACBA1D807F8376CBE60DA45F67354?sequence=1>.
- [69] D. Brites, S. Gagneux, The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *Adv Exp Med Biol* 1019 (2017) 1-26.
- [70] M. Hanekom, N.C. Gey van Pittius, C. McEvoy, T.C. Victor, P.D. Van Helden, R.M. Warren, *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success, *Tuberculosis (Edinb)* 91(6) (2011) 510-23.
- [71] S. Gagneux, Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*, *Nat Rev Microbiol* 16(4) (2018) 202-213.
- [72] F. Coll, R. McNerney, J.A. Guerra-Assuncao, J.R. Glynn, J. Perdigao, M. Viveiros, I. Portugal, A. Pain, N. Martin, T.G. Clark, A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains, *Nat Commun* 5 (2014) 4812.
- [73] I. Mokrousov, H.M. Ly, T. Otten, N.N. Lan, B. Vyshnevskiy, S. Hoffner, O. Narvskaya, Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing

genotype: clues from human phylogeography, *Genome Res* 15(10) (2005) 1357-64.

[74] M. Merker, C. Blin, S. Mona, N. Duforet-Frebourg, S. Lecher, E. Willery, M.G. Blum, S. Rusch-Gerdes, I. Mokrousov, E. Aleksic, C. Allix-Beguec, A. Antierens, E. Augustynowicz-Kopec, M. Ballif, F. Barletta, H.P. Beck, C.E. Barry, 3rd, M. Bonnet, E. Borroni, I. Campos-Herrero, D. Cirillo, H. Cox, S. Crowe, V. Crudu, R. Diel, F. Drobniowski, M. Fauville-Dufaux, S. Gagneux, S. Ghebremichael, M. Hanekom, S. Hoffner, W.W. Jiao, S. Kalon, T.A. Kohl, I. Kontsevaya, T. Lillebaek, S. Maeda, V. Nikolayevskyy, M. Rasmussen, N. Rastogi, S. Samper, E. Sanchez-Padilla, B. Savic, I.C. Shamputa, A. Shen, L.H. Sng, P. Stakenas, K. Toit, F. Varaine, D. Vukovic, C. Wahl, R. Warren, P. Supply, S. Niemann, T. Wirth, Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage, *Nat Genet* 47(3) (2015) 242-9.

[75] D. van Soolingen, L. Qian, P.E. de Haas, J.T. Douglas, H. Traore, F. Portaels, H.Z. Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa, J.D. van Embden, Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia, *J Clin Microbiol* 33(12) (1995) 3234-8.

[76] C. Manca, L. Tsenova, A. Bergtold, S. Freeman, M. Tovey, J.M. Musser, C.E. Barry, 3rd, V.H. Freedman, G. Kaplan, Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10) (2001) 5752-7.

[77] D. Ordway, M. Henao-Tamayo, M. Harton, G. Palanisamy, J. Troudt, C. Shanley, R.J. Basaraba, I.M. Orme, The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation, *J Immunol* 179(1) (2007) 522-31.

[78] L. Rindi, I. Peroni, N. Lari, D. Bonanni, E. Tortoli, C. Garzelli, Variation of the expression of *Mycobacterium tuberculosis* ppe44 gene among clinical isolates, *FEMS Immunol Med Microbiol* 51(2) (2007) 381-7.

[79] K. Kremer, M.J. van-der-Werf, B.K. Au, D.D. Anh, K.M. Kam, H.R. van-Doorn, M.W. Borgdorff, D. van-Soolingen, Vaccine-induced immunity circumvented by

typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains, *Emerg Infect Dis* 15(2) (2009) 335-9.

[80] S. Gandon, M. Mackinnon, S. Nee, A. Read, Imperfect vaccination: some epidemiological and evolutionary consequences, *Proc Biol Sci* 270(1520) (2003) 1129-36.

[81] S. Gandon, M.J. Mackinnon, S. Nee, A.F. Read, Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence, *Nature* 414(6865) (2001) 751-6.

[82] G. Urwin, J.A. Krohn, K. Deaver-Robinson, J.D. Wenger, M.M. Farley, Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype f: clinical and epidemiologic characteristics in the *H. influenzae* serotype b vaccine era. The *Haemophilus influenzae* Study Group, *Clin Infect Dis* 22(6) (1996) 1069-76.

[83] P.A. Rota, A.E. Bloom, J.A. Vanchiere, W.J. Bellini, Evolution of the nucleoprotein and matrix genes of wild-type strains of measles virus isolated from recent epidemics, *Virology* 198(2) (1994) 724-30.

[84] A. Tamin, P.A. Rota, Z.D. Wang, J.L. Heath, L.J. Anderson, W.J. Bellini, Antigenic analysis of current wild type and vaccine strains of measles virus, *J Infect Dis* 170(4) (1994) 795-801.

[85] I. Barrabeig, A. Anton, N. Torner, T. Pumarola, J. Costa, A. Dominguez, C. Working Group for the Study for Mumps in, Mumps: MMR vaccination and genetic diversity of mumps virus, 2007-2011 in Catalonia, Spain, *BMC Infect Dis* 19(1) (2019) 954.

[86] F.R. Mooi, H. van Oirschot, K. Heuvelman, H.G. van der Heide, W. Gastra, R.J. Willems, Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution, *Infect Immun* 66(2) (1998) 670-5.

[87] V.V. Ganusov, R. Antia, Imperfect vaccines and the evolution of pathogens causing acute infections in vertebrates, *Evolution* 60(5) (2006) 957-69.

[88] J.B. Andre, S. Gandon, Vaccination, within-host dynamics, and virulence evolution, *Evolution* 60(1) (2006) 13-23.

[89] F.R. Mooi, *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen, *Infect Genet Evol* 10(1) (2010) 36-49.

- [90] A.R. McLean, Vaccination, evolution and changes in the efficacy of vaccines: a theoretical framework, *Proc Biol Sci* 261(1362) (1995) 389-93.
- [91] Z.L. Zatarain-Barron, O. Ramos-Espinosa, B. Marquina-Castillo, J. Barrios-Payan, F. Cornejo-Granados, O. Maya-Lucas, G. Lopez-Leal, C. Molina-Romero, R.M. Anthony, A. Ochoa-Leyva, I.A. De La Rosa-Velazquez, R.G. Rebollar-Vega, R.M. Warren, D.A. Mata-Espinosa, R. Hernandez-Pando, D. van Soolingen, Evidence for the Effect of Vaccination on Host-Pathogen Interactions in a Murine Model of Pulmonary Tuberculosis by *Mycobacterium tuberculosis*, *Front Immunol* 11 (2020) 930.
- [92] R. Sarkar, L. Lenders, K.A. Wilkinson, R.J. Wilkinson, M.P. Nicol, Modern lineages of *Mycobacterium tuberculosis* exhibit lineage-specific patterns of growth and cytokine induction in human monocyte-derived macrophages, *PLoS One* 7(8) (2012) e43170.
- [93] A.K. Singh, U.D. Gupta, Animal models of tuberculosis: Lesson learnt, *Indian J Med Res* 147(5) (2018) 456-463.
- [94] R. Hernandez-Pando, H. Orozco, A. Sampieri, L. Pavon, C. Velasquillo, J. Larriva-Sahd, J.M. Alcocer, M.V. Madrid, Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis, *Immunology* 89(1) (1996) 26-33.
- [95] R. Hernandez-Pando, H. Orozco, K. Arriaga, A. Sampieri, J. Larriva-Sahd, V. Madrid-Marina, Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis, *Immunology* 90(4) (1997) 607-17.
- [96] L. Ramakrishnan, Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis, *Nat Rev Immunol* 12(5) (2012) 352-66.
- [97] A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics* 30(15) (2014) 2114-20.
- [98] T. Seemann, Prokka: rapid prokaryotic genome annotation, *Bioinformatics* 30(14) (2014) 2068-9.
- [99] H. Li, R. Durbin, Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform, *Bioinformatics* 25(14) (2009) 1754-60.

- [100] S. Anders, P.T. Pyl, W. Huber, HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data, *Bioinformatics* 31(2) (2015) 166-9.
- [101] M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol* 15(12) (2014) 550.
- [102] J. Wang, S. Vasaikar, Z. Shi, M. Greer, B. Zhang, WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit, *Nucleic Acids Res* 45(W1) (2017) W130-W137.
- [103] C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, F.O. Glockner, The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucleic Acids Res* 41(Database issue) (2013) D590-6.
- [104] F. Faul, E. Erdfelder, A.G. Lang, A. Buchner, G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences, *Behav Res Methods* 39(2) (2007) 175-91.
- [105] Y. Personne, T. Parish, Mycobacterium tuberculosis possesses an unusual tmRNA rescue system, *Tuberculosis (Edinb)* 94(1) (2014) 34-42.
- [106] C.A. Colaco, A. MacDougall, Mycobacterial chaperonins: the tail wags the dog, *FEMS Microbiol Lett* 350(1) (2014) 20-4.
- [107] S. Sundararajan, R. Muniyan, Latent tuberculosis: interaction of virulence factors in Mycobacterium tuberculosis, *Mol Biol Rep* 48(8) (2021) 6181-6196.
- [108] M.G. Drage, N.D. Pecora, A.G. Hise, M. Febbraio, R.L. Silverstein, D.T. Golenbock, W.H. Boom, C.V. Harding, TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of Mycobacterium tuberculosis, *Cell Immunol* 258(1) (2009) 29-37.
- [109] M. Esparza, B. Palomares, T. Garcia, P. Espinosa, E. Zenteno, R. Mancilla, PstS-1, the 38-kDa Mycobacterium tuberculosis glycoprotein, is an adhesin, which binds the macrophage mannose receptor and promotes phagocytosis, *Scand J Immunol* 81(1) (2015) 46-55.
- [110] J. Piton, S. Petrella, M. Delarue, G. Andre-Leroux, V. Jarlier, A. Aubry, C. Mayer, Structural insights into the quinolone resistance mechanism of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase, *PLoS One* 5(8) (2010) e12245.

- [111] A.L. Granados-Tristan, A. Borrego-Loya, L.A. Gonzalez-Escalante, G.J. Esquivel-Lucio, D.Y. Marquez-Urbe, J. Rigal-Leal, R.J. Robles-Gonzalez, A.L. Arriaga-Guerrero, B. Silva-Ramirez, C.E. Hernandez-Luna, J.F. Contreras-Cordero, L. Villarreal-Trevino, R. Mercado Hernandez, M. Bermudez De Leon, K. Penuelas-Urquides, Role of *esxG* and *esxH* Genes in Drug-Resistant Mycobacterium, *Microb Drug Resist* 26(11) (2020) 1279-1290.
- [112] K. Liu, X. Ba, J. Yu, J. Li, Q. Wei, G. Han, G. Li, Y. Cui, The phosphoenolpyruvate carboxykinase of Mycobacterium tuberculosis induces strong cell-mediated immune responses in mice, *Mol Cell Biochem* 288(1-2) (2006) 65-71.
- [113] N. van Wyk, M. Drancourt, B. Henrissat, L. Kremer, Current perspectives on the families of glycoside hydrolases of Mycobacterium tuberculosis: their importance and prospects for assigning function to unknowns, *Glycobiology* 27(2) (2017) 112-122.
- [114] N. van der Wel, D. Hava, D. Houben, D. Fluitsma, M. van Zon, J. Pierson, M. Brenner, P.J. Peters, M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells, *Cell* 129(7) (2007) 1287-98.
- [115] H. Marrakchi, M.A. Laneelle, M. Daffe, Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond, *Chem Biol* 21(1) (2014) 67-85.
- [116] G. Jin, M.S. Pavelka, Jr., J.S. Butler, Structure-function analysis of VapB4 antitoxin identifies critical features of a minimal VapC4 toxin-binding module, *J Bacteriol* 197(7) (2015) 1197-207.
- [117] R. Oldenburg, V. Mayau, J. Prandi, A. Arbues, C. Astarie-Dequeker, C. Guilhot, C. Werts, N. Winter, C. Demangel, Mycobacterial Phenolic Glycolipids Selectively Disable TRIF-Dependent TLR4 Signaling in Macrophages, *Front Immunol* 9 (2018) 2.
- [118] D.F. Warner, S. Savvi, V. Mizrahi, S.S. Dawes, A riboswitch regulates expression of the coenzyme B12-independent methionine synthase in Mycobacterium tuberculosis: implications for differential methionine synthase function in strains H37Rv and CDC1551, *J Bacteriol* 189(9) (2007) 3655-9.
- [119] T.D. Sirakova, V.S. Dubey, H.J. Kim, M.H. Cynamon, P.E. Kolattukudy, The largest open reading frame (*pks12*) in the Mycobacterium tuberculosis genome is

involved in pathogenesis and dimycocerosyl phthiocerol synthesis, *Infect Immun* 71(7) (2003) 3794-801.

[120] Y. Yuan, D.D. Crane, C.E. Barry, 3rd, Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog, *J Bacteriol* 178(15) (1996) 4484-92.

[121] T.D. Sirakova, A.K. Thirumala, V.S. Dubey, H. Sprecher, P.E. Kolattukudy, The *Mycobacterium tuberculosis* pks2 gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis, *J Biol Chem* 276(20) (2001) 16833-9.

[122] M.B. Mowa, D.F. Warner, G. Kaplan, B.D. Kana, V. Mizrahi, Function and regulation of class I ribonucleotide reductase-encoding genes in mycobacteria, *J Bacteriol* 191(3) (2009) 985-95.

[123] A. Sajid, G. Arora, M. Gupta, A. Singhal, K. Chakraborty, V.K. Nandicoori, Y. Singh, Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* elongation factor Tu with GTP is regulated by phosphorylation, *J Bacteriol* 193(19) (2011) 5347-58.

[124] A. Serafini, D. Pisu, G. Palu, G.M. Rodriguez, R. Manganeli, The ESX-3 secretion system is necessary for iron and zinc homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS One* 8(10) (2013) e78351.

[125] Anti-Tuberculosis Organisation in London: Comprehensive Scheme for Adults and Children, *Hospital (Lond 1886)* 58(1515) (1915) 271-272.

[126] A.R. Bloom BR, Cohen T, Dye C, Fraser H, Gomez GB, et al. Tuberculosis., H.K. In: Rd, Bertozzi S, Bloom BR, Jha P., Major Infectious

Diseases, The World Bank Washington DC, 2017.

[127] I. Parwati, R. van Crevel, D. van Soolingen, Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains, *Lancet Infect Dis* 10(2) (2010) 103-11.

[128] A. van Laarhoven, J.J. Mandemakers, J. Kleinnijenhuis, M. Enaimi, E. Lachmandas, L.A. Joosten, T.H. Ottenhoff, M.G. Netea, D. van Soolingen, R. van Crevel, Low induction of proinflammatory cytokines parallels evolutionary success of modern strains within the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype, *Infect Immun* 81(10) (2013) 3750-6.

- [129] R.W. Stokes, S.J. Waddell, Adjusting to a new home: Mycobacterium tuberculosis gene expression in response to an intracellular lifestyle, *Future Microbiol* 4(10) (2009) 1317-35.
- [130] D.J. Ordway, S. Shang, M. Henao-Tamayo, A. Obregon-Henao, L. Nold, M. Caraway, C.A. Shanley, R.J. Basaraba, C.G. Duncan, I.M. Orme, Mycobacterium bovis BCG-mediated protection against W-Beijing strains of Mycobacterium tuberculosis is diminished concomitant with the emergence of regulatory T cells, *Clin Vaccine Immunol* 18(9) (2011) 1527-35.
- [131] A. Engering, L. Hogerwerf, J. Slingenbergh, Pathogen-host-environment interplay and disease emergence, *Emerg Microbes Infect* 2(2) (2013) e5.
- [132] A.R. McLean, Vaccines and their impact on the control of disease, *Br Med Bull* 54(3) (1998) 545-56.
- [133] v.L.I. HM, Vaccine-Driven Evolution of Bordetella pertussis: Changes in Population Structure and Strain Fitness. , Microbiology UMC Utrecht, Available online at: <https://dspace.library.uu.nl/bitstream/handle/1874/450/full.pdf?sequence=1>, 2002.
- [134] T.B. Agerton, S.E. Valway, R.J. Blinkhorn, K.L. Shilkret, R. Reves, W.W. Schluter, B. Gore, C.J. Pozsik, B.B. Plikaytis, C. Woodley, I.M. Onorato, Spread of strain W, a highly drug-resistant strain of Mycobacterium tuberculosis, across the United States, *Clin Infect Dis* 29(1) (1999) 85-92; discussion 93-5.
- [135] A.I. Castillo-Rodal, M. Castanon-Arreola, R. Hernandez-Pando, J.J. Calva, E. Sada-Diaz, Y. Lopez-Vidal, Mycobacterium bovis BCG substrains confer different levels of protection against Mycobacterium tuberculosis infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis, *Infect Immun* 74(3) (2006) 1718-24.
- [136] C.W. Wieland, G.J. van der Windt, W.J. Wiersinga, S. Florquin, T. van der Poll, CD14 contributes to pulmonary inflammation and mortality during murine tuberculosis, *Immunology* 125(2) (2008) 272-9.
- [137] R. Domingo-Gonzalez, O. Prince, A. Cooper, S.A. Khader, Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection, *Microbiol Spectr* 4(5) (2016).

- [138] A.R. Pineros, L.W. Campos, D.M. Fonseca, T.B. Bertolini, A.F. Gembre, R.Q. Prado, J.C. Alves-Filho, S.G. Ramos, M. Russo, V.L. Bonato, M2 macrophages or IL-33 treatment attenuate ongoing *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Sci Rep* 7 (2017) 41240.
- [139] S. Meghari, C. Berruyer, H. Lepidi, F. Galland, P. Naquet, J.L. Mege, Vanin-1 controls granuloma formation and macrophage polarization in *Coxiella burnetii* infection, *Eur J Immunol* 37(1) (2007) 24-32.
- [140] S. Wang, L. He, J. Wu, Z. Zhou, Y. Gao, J. Chen, L. Shao, Y. Zhang, W. Zhang, Transcriptional Profiling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Identifies Diagnostic Biomarkers That Distinguish Active and Latent Tuberculosis, *Front Immunol* 10 (2019) 2948.
- [141] Y. Yang, P. Xu, P. He, F. Shi, Y. Tang, C. Guan, H. Zeng, Y. Zhou, Q. Song, B. Zhou, S. Jiang, C. Shao, J. Sun, Y. Yang, X. Wang, H. Song, Mycobacterial PPE13 activates inflammasome by interacting with the NATCH and LRR domains of NLRP3, *FASEB J* 34(9) (2020) 12820-12833.
- [142] N.P. Juffermans, S. Florquin, L. Camoglio, A. Verbon, A.H. Kolk, P. Speelman, S.J. van Deventer, T. van Der Poll, Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis, *J Infect Dis* 182(3) (2000) 902-8.
- [143] R. Zenteno-Cuevas, F.X. Silva-Hernandez, F. Mendoza-Damian, M.D. Ramirez-Hernandez, K. Vazquez-Medina, L. Widrobo-Garcia, A. Cuellar-Sanchez, R. Muniz-Salazar, L. Enciso-Moreno, L.M. Perez-Navarro, J.A. Enciso-Moreno, Characterisation of pks15/1 in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico, *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(6) (2013) 718-23.
- [144] T.V. Pham, A.S. Murkin, M.M. Moynihan, L. Harris, P.C. Tyler, N. Shetty, J.C. Sacchettini, H.L. Huang, T.D. Meek, Mechanism-based inactivator of isocitrate lyases 1 and 2 from *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(29) (2017) 7617-7622.
- [145] D. Dorji, F. Mooi, O. Yantorno, R. Deora, R.M. Graham, T.K. Mukkur, *Bordetella Pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping

cough vaccines for improved performance, *Med Microbiol Immunol* 207(1) (2018) 3-26.

[146] E.S. Hovingh, R. Mariman, L. Solans, D. Hijdra, H.J. Hamstra, I. Jongerius, M. van Gent, F. Mooi, C. Locht, E. Pinelli, *Bordetella pertussis* pertactin knock-out strains reveal immunomodulatory properties of this virulence factor, *Emerg Microbes Infect* 7(1) (2018) 39.

APÉNDICE

Tabla A1. Genes sobre-expresados en los animales infectados con la cepa 46 vs. 46P al día 21 postinfección

Identificador	Cambio (LogFold)	Valor de p	GeneID	Locus	Descripción
gene15521	1.3398356 33	0.0026528 01	11689	NC_000072 .6	gene_id=gene15521;Dbxref=GeneID:11689,MGI:MGI:87999;Name=Alox5;description=arachidonate 5-lipoxygenase;gbkey=Gene;gene=Alox5;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=5-LO,5-LOX,5LO,5LX,AI850497,F730011J02
gene28273	1.4493925 9	0.0026528 01	276952	NC_000077 .6	gene_id=gene28273;Dbxref=GeneID:276952,MGI:MGI:2685575;Name=Rasl10b;description=RAS-like%2C family 10%2C member B;gbkey=Gene;gene=Rasl10b;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=B230331P10Rik,Gm729,VTS58635
gene15617	1.2778818 19	0.0123717 92	232345	NC_000072 .6	gene_id=gene15617;Dbxref=GeneID:232345,MGI:MGI:2449119;Name=A2m;description=alpha-2-macroglobulin;gbkey=Gene;gene=A2m;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=A2mp
gene32151	1.3236510 6	0.0123717 92	74145	NC_000079 .6	gene_id=gene32151;Dbxref=GeneID:74145,MGI:MGI:1921395;Name=F13a1;description=coagulation factor XIII%2C A1 subunit;gbkey=Gene;gene=F13a1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1200014I03Rik,AI462306,F13a
gene41262	1.3293497 65	0.0123717 92	72432	NC_000084 .6	gene_id=gene41262;Dbxref=GeneID:72432,MGI:MGI:1919682;Name=Spink5;description=serine peptidase inhibitor%2C Kazal type 5;gbkey=Gene;gene=Spink5;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2310065D10Rik,AV238912,LEKT1,LETK1,VAKT1
gene12427	1.2706437 56	0.0123898 35	20750	NC_000071 .6	gene_id=gene12427;Dbxref=GeneID:20750,MGI:MGI:98389;Name=Spp1;description=secreted phosphoprotein 1;gbkey=Gene;gene=Spp1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2AR,Apl-1,BNSP,Bsp,BSPI,Eta,ETA-1,OP,Opn,Opnl,Ric,Spp-1
gene16776	1.2405962 42	0.0133921 63	12273	NC_000073 .6	gene_id=gene16776;Dbxref=GeneID:12273,MGI:MGI:88232;Name=C5ar1;description=complement component 5a receptor 1;gbkey=Gene;gene=C5ar1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=C5aR,C5r1,Cd88,D7Msu1
gene2215	1.2403144 51	0.0133921 63	240913	NC_000067 .6	gene_id=gene2215;Dbxref=GeneID:240913,MGI:MGI:1339949;Name=Adams4;description=a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif%2C 4;gbkey=Gene;gene=Adams4;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=3830423K05,ADAM-TS4,ADAMTS-2,ADMP-1,mKIAA0688
gene875	1.2645599 52	0.0133921 63	12765	NC_000067 .6	gene_id=gene875;Dbxref=GeneID:12765,MGI:MGI:105303;Name=Cxcr2;description=chemokine (C-X-C motif) receptor 2;gbkey=Gene;gene=Cxcr2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=CD128,CDw128,Cmkar2,Gpcr16,IL-8rb,IL-8Rh,IL8RA,Il8rb,mIL-8RH
gene7757	1.2527620 79	0.0138891 28	12655	NC_000069 .6	gene_id=gene7757;Dbxref=GeneID:12655,MGI:MGI:1330860;Name=Chil3;description=chitinase-like 3;gbkey=Gene;gene=Chil3;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AI505981,Chi3I3,ECF-L,Ym1
gene39522	1.2431940 37	0.0220769 7	378460	NC_000083 .6	gene_id=gene39522;Dbxref=GeneID:378460,MGI:MGI:3576625;Name=Pram1;description=PML-RAR alpha-regulated adaptor molecule 1;gbkey=Gene;gene=Pram1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AY665714

gene425	1.2213725 67	0.0220769 7	16178	NC_000067 .6	gene_id=gene425;Dbxref=GeneID:16178,MGI:MGI:96546;Name=Il1r2;description=interleukin 1 receptor%2C type II;gbkey=Gene;gene=Il1r2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=CD121b,Il1r-2
gene26476	1.1268532 58	0.0245341 82	58223	NC_000076 .6	gene_id=gene26476;Dbxref=GeneID:58223,MGI:MGI:1927899;Name=Mmp19;description=matrix metalloproteinase 19;gbkey=Gene;gene=Mmp19;gene_biotype=protein_coding
gene26627	1.2010071 76	0.0245341 82	18413	NC_000077 .6	gene_id=gene26627;Dbxref=GeneID:18413,MGI:MGI:104749;Name=Osm;description=oncostatin M;gbkey=Gene;gene=Osm;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=OncoM
gene35454	1.1516599 26	0.0245341 82	16365	NC_000080 .6	gene_id=gene35454;Dbxref=GeneID:16365,MGI:MGI:103206;Name=Acod1;description=aconitate decarboxylase 1;gbkey=Gene;gene=Acod1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AI323667,CAD,Irg1
gene19818	1.1268760 63	0.0267164 39	11501	NC_000073 .6	gene_id=gene19818;Dbxref=GeneID:11501,MGI:MGI:107825;Name=Adam8;description=a disintegrin and metalloproteinase domain 8;gbkey=Gene;gene=Adam8;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=ADAM 8,CD156,CD156a,E430039A18Rik,MS2
gene29395	1.0803439 54	0.0267164 39	80879	NC_000077 .6	gene_id=gene29395;Dbxref=GeneID:80879,MGI:MGI:1933438;Name=Slc16a3;description=solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters)%2C member 3;gbkey=Gene;gene=Slc16a3;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Mct3,Mct4
gene37268	1.1452430 46	0.0267164 39	18022	NC_000081 .6	gene_id=gene37268;Dbxref=GeneID:18022,MGI:MGI:97308;Name=Nfe2;description=nuclear factor%2C erythroid derived 2;gbkey=Gene;gene=Nfe2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=NF-E2,NF-E2/P45,p45,p45nf-e2,p45NFE2
gene12956	1.1392514 63	0.0339130 97	80885	NC_000071 .6	gene_id=gene12956;Dbxref=GeneID:80885,MGI:MGI:1933383;Name=Hcar2;description=hydroxycarboxylic acid receptor 2;gbkey=Gene;gene=Hcar2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Gpr109a,Gpr109b,HM74,mHM74b,Niacr1,PUMA-G,Pumag
gene16262	1.1311926 12	0.0339130 97	245126	NC_000073 .6	gene_id=gene16262;Dbxref=GeneID:245126,MGI:MGI:2442280;Name=Tarm1;description=T cell-interacting%2C activating receptor on myeloid cells 1;gbkey=Gene;gene=Tarm1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=9930022N03Rik,ENSMUSG0000053338,Gm9904,OLT-2
gene28288	1.1506645 03	0.0339130 97	20303	NC_000077 .6	gene_id=gene28288;Dbxref=GeneID:20303,MGI:MGI:98261;Name=Ccl4;description=chemokine (C-C motif) ligand 4;gbkey=Gene;gene=Ccl4;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Act-2,AT744.1,MIP-1B,Mip1b,Scya4
gene35339	1.1808604 86	0.0339130 97	380924	NC_000080 .6	gene_id=gene35339;Dbxref=GeneID:380924,MGI:MGI:2685142;Name=Olfm4;description=olfactomedin 4;gbkey=Gene;gene=Olfm4;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=GC1,Gm296,Gm913,GW112,OlfD,pPD4
gene8097	1.0291375	0.0339130 97	74442	NC_000069 .6	gene_id=gene8097;Dbxref=GeneID:74442,MGI:MGI:1921692;Name=Sgms2;description=sphingomyelin synthase 2;gbkey=Gene;gene=Sgms2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=4933405A16Rik,5133401H06Rik,AI854299
gene40162	1.0597765 98	0.0341188 37	76905	NC_000083 .6	gene_id=gene40162;Dbxref=GeneID:76905,MGI:MGI:1924155;Name=Lrg1;description=leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1;gbkey=Gene;gene=Lrg1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1300008B03Rik,2310031E04Rik,Lrg,Lrhg
gene16282	1.1648201 9	0.0341535 64	10003890 9	NC_000073 .6	gene_id=gene16282;Dbxref=GeneID:10003890,MGI:MGI:3709645;Name=Gm14548;description=predicted gene 14548;gbkey=Gene;gene=Gm14548;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=OTTMUSG00000017169

gene24743	1.1348626 14	0.0341535 64	22361	NC_000076 .6	gene_id=gene24743;Dbxref=GeneID:22361,MGI:MGI:108395;Name=Vnn1;description=vanin 1;gbkey=Gene;gene=Vnn1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=V-1
gene6670	0.8723217 14	0.0341535 64	26570	NC_000069 .6	gene_id=gene6670;Dbxref=GeneID:26570,MGI:MGI:1347355;Name=Slc7a11;description=solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter%2C y+ system)%2C member 11;gbkey=Gene;gene=Slc7a11;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=9930009M05Rik,AI451155,sut,xCT
gene17133	1.0207734 38	0.0344279 95	18793	NC_000073 .6	gene_id=gene17133;Dbxref=GeneID:18793,MGI:MGI:97612;Name=Plaur;description=plasminogen activator%2C urokinase receptor;gbkey=Gene;gene=Plaur;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Cd87,u-PAR,uPAR
gene43019	1.1202811 96	0.0344279 95	240672	NC_000085 .6	gene_id=gene43019;Dbxref=GeneID:240672,MGI:MGI:2685183;Name=Dusp5;description=dual specificity phosphatase 5;gbkey=Gene;gene=Dusp5;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Gm337
gene14047	1.1028871 46	0.0372055 9	338523	NC_000072 .6	gene_id=gene14047;Dbxref=GeneID:338523,MGI:MGI:2443388;Name=Kdm7a;description=lysine (K)-specific demethylase 7A;gbkey=Gene;gene=Kdm7a;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=A630082K20Rik,BB041802,ENSMUSG00000073143,Jhd m1d,mKIAA1718
gene17151	1.1446774 18	0.0372055 9	26366	NC_000073 .6	gene_id=gene17151;Dbxref=GeneID:26366,MGI:MGI:1347248;Name=Ceacam10;description=carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 10;gbkey=Gene;gene=Ceacam10;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Bgp3,Cea10
gene19372	1.0393957 55	0.0372055 9	67133	NC_000073 .6	gene_id=gene19372;Dbxref=GeneID:67133,MGI:MGI:1914383;Name=Gp2;description=glycoprotein 2 (zymogen granule membrane);gbkey=Gene;gene=Gp2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2310037118Rik,AV060639
gene38104	1.1158221 09	0.0372055 9	57263	NC_000082 .6	gene_id=gene38104;Dbxref=GeneID:57263,MGI:MGI:1888505;Name=Retnlb;description=resistin like beta;gbkey=Gene;gene=Retnlb;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=9030012B21Rik,Fizz2,Relmb,RELMbeta,Xcp3
gene30846	1.1060841 68	0.0399333 62	20716	NC_000078 .6	gene_id=gene30846;Dbxref=GeneID:20716,MGI:MGI:105045;Name=Serpina3n;description=serine (or cysteine) peptidase inhibitor%2C clade A%2C member 3N;gbkey=Gene;gene=Serpina3n;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Sp12-2,Sp12-2,Sp12/eb.4
gene14369	0.8265481 62	0.0437770 52	93695	NC_000072 .6	gene_id=gene14369;Dbxref=GeneID:93695,MGI:MGI:1934765;Name=Gpnmb;description=glycoprotein (transmembrane) nmb;gbkey=Gene;gene=Gpnmb;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=DC-HIL,Dchil,ipd
gene17785	0.9808754 2	0.0490019 89	12489	NC_000073 .6	gene_id=gene17785;Dbxref=GeneID:12489,MGI:MGI:99440;Name=Cd33;description=CD33 antigen;gbkey=Gene;gene=Cd33;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=gp67,Siglec-3
gene34812	1.0428777 34	0.0491097 06	16995	NC_000080 .6	gene_id=gene34812;Dbxref=GeneID:16995,MGI:MGI:1309472;Name=Ltb4r1;description=leukotriene B4 receptor 1;gbkey=Gene;gene=Ltb4r1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=BLT1,BLTR,Ltb4r,mBLTR
gene37773	1.0800731 71	0.0491097 06	16180	NC_000082 .6	gene_id=gene37773;Dbxref=GeneID:16180,MGI:MGI:104975;Name=Il1rap;description=interleukin 1 receptor accessory protein;gbkey=Gene;gene=Il1rap;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=6430709H04Rik,AI255955,AV239853,IL-1RAcP
gene41090	1.0062930 52	0.0491097 06	12475	NC_000084 .6	gene_id=gene41090;Dbxref=GeneID:12475,MGI:MGI:88318;Name=Cd14;description=CD14 antigen;gbkey=Gene;gene=Cd14;gene_biotype=protein_coding

gene43127	1.079628103	0.049592131	12979	NC_000085.6	gene_id=gene43127;Dbxref=GeneID:12979,MGI:MGI:1339756;Name=Csf1r-ps;gbkey=Gene;gene=Csf1r-ps;gene_biotype=pseudogene;pseudo=true
gene21101	1.098657914	0.050091706	72054	NC_000074.6	gene_id=gene21101;Dbxref=GeneID:72054,MGI:MGI:1919304;Name=Cyp4f18;description=cytochrome P450%2C family 4%2C subfamily f%2C polypeptide 18;gbkey=Gene;gene=Cyp4f18;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1810054N16Rik,Cyp4f3,Cypf18

Tabla A2. Genes sub-expresados en los animales infectados con la cepa 46 vs. 46P al día 21 postinfección

Identificador	Cambio (LogFold)	Valor de p	Genel D	Locus	Descripción
gene2684	-1.458064019	0.00068714	12902	NC_000067.6	gene_id=gene2684;Dbxref=GeneID:12902,MGI:MGI:88489;Name=Cr2;description=complement receptor 2;gbkey=Gene;gene=Cr2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=C3DR,CD21,CD35,Cr-1,Cr-2,Cr1
gene40855	-1.503257074	0.00221544	13507	NC_000084.6	gene_id=gene40855;Dbxref=GeneID:13507,MGI:MGI:1194993;Name=Dsc3;description=desmocollin 3;gbkey=Gene;gene=Dsc3;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=5430426124Rik
gene30026	-1.273874499	0.01388913	12810	NC_000078.6	gene_id=gene30026;Dbxref=GeneID:12810,MGI:MGI:1278313;Name=Coch;description=cochlin;gbkey=Gene;gene=Coch;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AW122937,Coch-5B2,D12H14S564E
gene30803	-1.044243919	0.01388913	76933	NC_000078.6	gene_id=gene30803;Dbxref=GeneID:76933,MGI:MGI:1924183;Name=Ifi2712a;description=interferon%2C alpha-inducible protein 27 like 2A;gbkey=Gene;gene=Ifi2712a;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2310061N23Rik,Ifi27,Isig12,Isig12(b1)
gene1564	-1.065015212	0.02671644	69169	NC_000067.6	gene_id=gene1564;Dbxref=GeneID:69169,MGI:MGI:1916419;Name=Fcmr;description=Fc fragment of IgM receptor;gbkey=Gene;gene=Fcmr;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1810037B05Rik,Faim3,FcmuR,Toso
gene33554	-0.901741189	0.03415356	625360	NC_000079.6	gene_id=gene33554;Dbxref=GeneID:625360,MGI:MGI:4840510;Name=BC147527;description=cDNA sequence BC147527;gbkey=Gene;gene=BC147527;gene_biotype=protein_coding
gene8962	-0.918228662	0.03720559	18507	NC_000070.6	gene_id=gene8962;Dbxref=GeneID:18507,MGI:MGI:97489;Name=Pax5;description=paired box 5;gbkey=Gene;gene=Pax5;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=BSAP,EBB-1,KLP,Pax-5
gene36520	-0.907030218	0.03804746	71898	NC_000081.6	gene_id=gene36520;Dbxref=GeneID:71898,MGI:MGI:1919148;Name=Apol9b;description=apolipoprotein L 9b;gbkey=Gene;gene=Apol9b;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2310016F22Rik

Tabla A3. Genes sobre-expresados en los animales infectados con la cepa 48 vs. 48V al día 21 postinfección

Identificador	Cambio (LogFol d)	Valor de p	GeneID	Locus	Descripción
gene2147	1.327055135	3.17E-08	19737	NC_000067.6	gene_id=gene2147;Dbxref=GeneID:19737,MGI:MGI:1098434;Name=Rgs5;description=regulator of G-protein signaling 5;gbkey=Gene;gene=Rgs5;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1110070A02Rik
gene10825	1.781387236	1.47E-07	230899	NC_000070.6	gene_id=gene10825;Dbxref=GeneID:230899,MGI:MGI:97367;Name=Nppa;description=natriuretic peptide type A;gbkey=Gene;gene=Nppa;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Anf,ANP,Pnd
gene40126	1.570639919	0.00011546	20888	NC_000083.6	gene_id=gene40126;Dbxref=GeneID:20888,MGI:MGI:102928;Name=Sult1c1;description=sulfotransferase family%2C cytosolic%2C 1C%2C member 1;gbkey=Gene;gene=Sult1c1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=(PST)G,mOLFST,P-SULT,ST1C1,Stp2,Sult1a2
gene22252	1.118198504	0.00015779	17392	NC_000075.6	gene_id=gene22252;Dbxref=GeneID:17392,MGI:MGI:97010;Name=Mmp3;description=matrix metalloproteinase 3;gbkey=Gene;gene=Mmp3;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=EMS-2,MMP-3,SL-1,SLN-1,SLN1,Stmy1,STR-1,Str1
gene25988	0.963709919	0.00017693	13179	NC_000076.6	gene_id=gene25988;Dbxref=GeneID:13179,MGI:MGI:94872;Name=Dcn;description=decorin;gbkey=Gene;gene=Dcn;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=DC,DSPG2,PG40,PGII,PGS2,SLRR1B
gene14077	1.403690986	0.00033826	232714	NC_000072.6	gene_id=gene14077;Dbxref=GeneID:232714,MGI:MGI:1203495;Name=Mgam;description=maltase-glucoamylase;gbkey=Gene;gene=Mgam;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=6030407P20Rik,MGA
gene12293	0.895690379	0.00046832	55985	NC_000071.6	gene_id=gene12293;Dbxref=GeneID:55985,MGI:MGI:1888499;Name=Cxcl13;description=chemokine (C-X-C motif) ligand 13;gbkey=Gene;gene=Cxcl13;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=4631412M08Rik,Angie,ANGIE2,BCA-1,BLC,BLR1L,Scyb13
gene32076	1.268540274	0.00058293	20706	NC_000079.6	gene_id=gene32076;Dbxref=GeneID:20706,MGI:MGI:894668;Name=Serpnb9b;description=serine (or cysteine) peptidase inhibitor%2C clade B%2C member 9b;gbkey=Gene;gene=Serpnb9b;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1600019A21Rik,ovalbumin,R86,RP23-391I11.4,SPI-CI,Spi10
gene40470	0.951267019	0.00082882	13078	NC_000083.6	gene_id=gene40470;Dbxref=GeneID:13078,MGI:MGI:88590;Name=Cyp1b1;description=cytochrome P450%2C family 1%2C subfamily b%2C polypeptide 1;gbkey=Gene;gene=Cyp1b1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=CP1B,P4501b1
gene45354	1.212216684	0.00271102	237178	NC_000086.7	gene_id=gene45354;Dbxref=GeneID:237178,MGI:MGI:1097157;Name=Ppef1;description=protein phosphatase with EF hand calcium-binding domain 1;gbkey=Gene;gene=Ppef1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=PPEF-1
gene2233	1.184895995	0.00342309	16429	NC_000067.6	gene_id=gene2233;Dbxref=GeneID:16429,MGI:MGI:1333831;Name=Itln1;description=intelectin 1 (galactofuranose binding);gbkey=Gene;gene=Itln1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=IntL,Itln,Itln2,Itln3,Itln5,Itlna,Lfr
gene12859	0.950421565	0.00416616	246728	NC_000071.6	gene_id=gene12859;Dbxref=GeneID:246728,MGI:MGI:2180852;Name=Oas2;description=2'-5' oligoadenylate synthetase 2;gbkey=Gene;gene=Oas2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Oasl11

gene35066	0.930489546	0.0044739	12759	NC_000080.6	gene_id=gene35066;Dbxref=GeneID:12759,MGI:MGI:88423;Name=Clu;description=clusterin;gbkey=Gene;gene=Clu;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=A1893575,ApoJ,Cli,D14Ucla3,Sgp-2,Sgp2,SP-40,Sugp-2
gene8265	1.224262538	0.00668327	12722	NC_000069.6	gene_id=gene8265;Dbxref=GeneID:12722,MGI:MGI:1316732;Name=Cla3a1;description=chloride channel accessory 3A1;gbkey=Gene;gene=Cla3a1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Cacc,Cla1
gene42601	0.654313362	0.00695645	77125	NC_000085.6	gene_id=gene42601;Dbxref=GeneID:77125,MGI:MGI:1924375;Name=Il33;description=interleukin 33;gbkey=Gene;gene=Il33;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=9230117N10Rik,Il-33,Il1f11,NF-HEV
gene15115	1.236623199	0.00757436	108169150	NC_000072.6	gene_id=gene15115;Dbxref=GeneID:108169150;Name=LOC108169150;gbkey=Gene;gene=LOC108169150;gene_biotype=protein_coding
gene17356	0.84672878	0.00757436	233046	NC_000073.6	gene_id=gene17356;Dbxref=GeneID:233046,MGI:MGI:2386851;Name=Rasgrp4;description=RAS guanyl releasing protein 4;gbkey=Gene;gene=Rasgrp4;gene_biotype=protein_coding
gene45446	1.090810947	0.00770226	17318	NC_000086.7	gene_id=gene45446;Dbxref=GeneID:17318,MGI:MGI:1100537;Name=Mid1;description=midline 1;gbkey=Gene;gene=Mid1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=61B3-R,DXHXS1141,Fxy,Trim18
gene28391	1.217266145	0.00935795	17523	NC_000077.6	gene_id=gene28391;Dbxref=GeneID:17523,MGI:MGI:97137;Name=Mpo;description=myeloperoxidase;gbkey=Gene;gene=Mpo;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=mKIAA4033
gene31561	0.716673844	0.00935795	17101	NC_000079.6	gene_id=gene31561;Dbxref=GeneID:17101,MGI:MGI:107448;Name=Lyst;description=lysosomal trafficking regulator;gbkey=Gene;gene=Lyst;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=beige,bg,D13Sfk13
gene15117	0.828711174	0.01025138	17119	NC_000072.6	gene_id=gene15117;Dbxref=GeneID:17119,MGI:MGI:96908;Name=Mxd1;description=MAX dimerization protein 1;gbkey=Gene;gene=Mxd1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AW122478,Mad,Mad1
gene43063	1.118653423	0.01034976	226245	NC_000085.6	gene_id=gene43063;Dbxref=GeneID:226245,MGI:MGI:2443041;Name=Plekhs1;description=pleckstrin homology domain containing%2C family S member 1;gbkey=Gene;gene=Plekhs1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=9930023K05Rik
gene36167	1.097938395	0.01104855	15117	NC_000081.6	gene_id=gene36167;Dbxref=GeneID:15117,MGI:MGI:107821;Name=Has2;description=hyaluronan synthase 2;gbkey=Gene;gene=Has2;gene_biotype=protein_coding
gene9276	1.181463988	0.01331922	18406	NC_000070.6	gene_id=gene9276;Dbxref=GeneID:18406,MGI:MGI:97444;Name=Orm2;description=orosomucoid 2;gbkey=Gene;gene=Orm2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Agp1,Orm-2
gene14668	1.103330864	0.01356304	243469	NC_000072.6	gene_id=gene14668;Dbxref=GeneID:243469,MGI:MGI:96494;Name=Igk;description=immunoglobulin kappa chain complex;gbkey=Gene;gene=Igk;gene_biotype=other;gene_synonym=kappa
gene19112	0.635398516	0.01356304	668139	NC_000073.6	gene_id=gene19112;Dbxref=GeneID:668139,MGI:MGI:3644223;Name=Gm8995;gbkey=Gene;gene=Gm8995;gene_biotype=misc_RNA
gene36138	0.795836982	0.01356304	18383	NC_000081.6	gene_id=gene36138;Dbxref=GeneID:18383,MGI:MGI:109587;Name=Tnfrsf11b;description=tumor necrosis factor receptor superfamily%2C member 11b (osteoprotegerin);gbkey=Gene;gene=Tnfrsf11b;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=OCIF,Opg,TR1

gene35064	1.083241268	0.01379331	219151	NC_000080.6	gene_id=gene35064;Dbxref=GeneID:219151,MGI:MGI:2444418;Name=Scara3;description=scavenger receptor class A%2C member 3;gbkey=Gene;gene=Scara3;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=APC7,C130058N24Rik,CSR,CSR1,MSLR1,MSRL1
gene24743	0.694933571	0.01661792	22361	NC_000076.6	gene_id=gene24743;Dbxref=GeneID:22361,MGI:MGI:108395;Name=Vnn1;description=vanin 1;gbkey=Gene;gene=Vnn1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=V-1
gene19372	1.119170279	0.02045189	67133	NC_000073.6	gene_id=gene19372;Dbxref=GeneID:67133,MGI:MGI:1914383;Name=Gp2;description=glycoprotein 2 (zymogen granule membrane);gbkey=Gene;gene=Gp2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2310037118Rik,AV060639
gene22441	1.130537862	0.02045189	53867	NC_000075.6	gene_id=gene22441;Dbxref=GeneID:53867,MGI:MGI:1858212;Name=Col5a3;description=collagen%2C type V%2C alpha 3;gbkey=Gene;gene=Col5a3;gene_biotype=protein_coding
gene25580	1.133411516	0.02206623	19152	NC_000076.6	gene_id=gene25580;Dbxref=GeneID:19152,MGI:MGI:893580;Name=Prtn3;description=proteinase 3;gbkey=Gene;gene=Prtn3;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=mPR3,PR3
gene34061	0.836520141	0.02909568	78754	NC_000080.6	gene_id=gene34061;Dbxref=GeneID:78754,MGI:MGI:1926004;Name=Galnt15;description=UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 15;gbkey=Gene;gene=Galnt15;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=4631401E18Rik,Galnt12,mpp-GalNAc-T15
gene43016	1.095982279	0.02909568	381232	NC_000085.6	gene_id=gene43016;Dbxref=GeneID:381232,MGI:MGI:1922001;Name=Mirt1;description=myocardial infarction associated transcript 1;gbkey=Gene;gene=Mirt1;gene_biotype=lncRNA;gene_synonym=4833407H14Rik,5430437C04Rik,5830416P10Rik,ENSMUSG00000074788,Gm10758
gene35168	0.851637174	0.02924815	213053	NC_000080.6	gene_id=gene35168;Dbxref=GeneID:213053,MGI:MGI:2384851;Name=Slc39a14;description=solute carrier family 39 (zinc transporter)%2C member 14;gbkey=Gene;gene=Slc39a14;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=FAD-123,fad123,ZIP-14,Zip14
gene19675	1.10055924	0.02994922	12945	NC_000073.6	gene_id=gene19675;Dbxref=GeneID:12945,MGI:MGI:106210;Name=Dmbt1;description=deleted in malignant brain tumors 1;gbkey=Gene;gene=Dmbt1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=CRP,CRP-[a],CRP-[b],Crdp,DBMT1,gp300,p80
gene42995	1.07187425	0.03929091	58178	NC_000085.6	gene_id=gene42995;Dbxref=GeneID:58178,MGI:MGI:1929666;Name=Sorcs1;description=sortilin-related VPS10 domain containing receptor 1;gbkey=Gene;gene=Sorcs1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=mSorCS,Sorcs
gene29908	1.030824771	0.04355426	23795	NC_000078.6	gene_id=gene29908;Dbxref=GeneID:23795,MGI:MGI:1344405;Name=Agr2;description=anterior gradient 2;gbkey=Gene;gene=Agr2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Agr2h,Gob-4,HAG-2,mAG-2,XAG-2
gene427	0.676661381	0.0448093	16177	NC_000067.6	gene_id=gene427;Dbxref=GeneID:16177,MGI:MGI:96545;Name=Il1r1;description=interleukin 1 receptor%2C type I;gbkey=Gene;gene=Il1r1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=CD121a,CD121b,IL-1R1,IL-iR,Il1r-1
gene35303	1.027865646	0.04650261	21943	NC_000080.6	gene_id=gene35303;Dbxref=GeneID:21943,MGI:MGI:1100089;Name=Tnfsf11;description=tumor necrosis factor (ligand) superfamily%2C member 11;gbkey=Gene;gene=Tnfsf11;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Ly109l,ODF,OPG,OPGL,RANKL,Trance
gene19832	0.991243359	0.04790815	244233	NC_000073.6	gene_id=gene19832;Dbxref=GeneID:244233,MGI:MGI:2443796;Name=Cd163l1;description=CD163 molecule-like 1;gbkey=Gene;gene=Cd163l1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=B430307C05,E430002D04Rik,Scart1

gene217 32	0.655242 557	0.04790 815	20650	NC_00007 4.6	gene_id=gene21732;Dbxref=GeneID:20650,MGI:MGI:101771;Name=Sntb2;description=syntrophin%2C basic 2;gbkey=Gene;gene=Sntb2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Snt2
gene290 66	0.731441 846	0.04790 815	104681	NC_00007 7.6	gene_id=gene29066;Dbxref=GeneID:104681,MGI:MGI:2144585;Name=Slc16a6;description=solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters)%2C member 6;gbkey=Gene;gene=Slc16a6;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AW743111,ESTM12,MCT 6,MCT 7,MCT6
gene450 41	1.042013 965	0.05008 478	12738	NC_00008 6.7	gene_id=gene45041;Dbxref=GeneID:12738,MGI:MGI:1276110;Name=Cldn2;description=claudin 2;gbkey=Gene;gene=Cldn2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AL022813
gene306 65	1.017744 152	0.05009 093	13371	NC_00007 8.6	gene_id=gene30665;Dbxref=GeneID:13371,MGI:MGI:1338833;Name=Dio2;description=deiodinase%2C iodothyronine%2C type II;gbkey=Gene;gene=Dio2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=5DII,AI324267,DIOII

Tabla A4. Genes sub-expresados en los animales infectados con la cepa 48 vs. 48V al día 21 postinfección

Identificador	Cambio (LogFold)	Valor de p	Gene ID	Locus	Descripción
gene20823	-1.422979279	1.70E-13	15446	NC_000074.6	gene_id=gene20823;Dbxref=GeneID:15446,MGI:MGI:108085;Name=Hpgd;description=hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD);gbkey=Gene;gene=Hpgd;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=15-PGDH,AV026552
gene17244	-1.65392743	4.17E-07	13107	NC_000073.6	gene_id=gene17244;Dbxref=GeneID:13107,MGI:MGI:88608;Name=Cyp2f2;description=cytochrome P450%2C family 2%2C subfamily f%2C polypeptide 2;gbkey=Gene;gene=Cyp2f2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Cyp2f
gene2572	-1.370319491	1.16E-06	16526	NC_000067.6	gene_id=gene2572;Dbxref=GeneID:16526,MGI:MGI:109366;Name=Kcnk2;description=potassium channel%2C subfamily K%2C member 2;gbkey=Gene;gene=Kcnk2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=A430027H14Rik,AI848635,TREK-1
gene23238	-1.697740318	1.71E-05	13076	NC_000075.6	gene_id=gene23238;Dbxref=GeneID:13076,MGI:MGI:88588;Name=Cyp1a1;description=cytochrome P450%2C family 1%2C subfamily a%2C polypeptide 1;gbkey=Gene;gene=Cyp1a1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AHH,AHRR,CP11,Cyp1a2,P450-1
gene43351	-0.833663389	3.00E-05	21912	NC_000086.7	gene_id=gene43351;Dbxref=GeneID:21912,MGI:MGI:1298407;Name=Tspan7;description=tetraspanin 7;gbkey=Gene;gene=Tspan7;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1200014P11Rik,A15,AI323365,Cd231,Mxs1,PE31,R74651,TALLA,Tm4sf2
gene852	-1.52352334	0.00011814	16008	NC_000067.6	gene_id=gene852;Dbxref=GeneID:16008,MGI:MGI:96437;Name=Igfbp2;description=insulin-like growth factor binding protein 2;gbkey=Gene;gene=Igfbp2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AI255832,IBP-2,Igfbp-2,mIGFBP-2
gene22051	-1.214826891	0.000145807	13479	NC_000074.6	gene_id=gene22051;Dbxref=GeneID:13479,MGI:MGI:94917;Name=Dpep1;description=dipeptidase 1 (renal);gbkey=Gene;gene=Dpep1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AI327012,MBD
gene28434	-0.977449235	0.000145807	67888	NC_000077.6	gene_id=gene28434;Dbxref=GeneID:67888,MGI:MGI:1915138;Name=Tmem100;description=transmembrane protein 100;gbkey=Gene;gene=Tmem100;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1810057C19Rik,AV011897
gene14498	-1.35266694	0.000229855	21743	NC_000072.6	gene_id=gene14498;Dbxref=GeneID:21743,MGI:MGI:102963;Name=Inmt;description=indolethylamine N-methyltransferase;gbkey=Gene;gene=Inmt;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Temt
gene27644	-0.758206477	0.000268147	18858	NC_000077.6	gene_id=gene27644;Dbxref=GeneID:18858,MGI:MGI:97631;Name=Pmp22;description=peripheral myelin protein 22;gbkey=Gene;gene=Pmp22;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=22kDa,Gas-3,HNPP,Tr,trembler
gene30349	-0.889819362	0.000338256	238276	NC_000078.6	gene_id=gene30349;Dbxref=GeneID:238276,MGI:MGI:2685104;Name=Akap5;description=A kinase (PRKA) anchor protein 5;gbkey=Gene;gene=Akap5;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=3526401B18Rik,AKAP 150,AKAP-5,AKAP150,BB098886,Gm258,P150

gene40580	- 0.73251 0683	0.00058 2934	1381 9	NC_000 083.6	gene_id=gene40580;Dbxref=GeneID:13819,MGI:MGI:109169;Name=Epas1;description=endothelial PAS domain protein 1;gbkey=Gene;gene=Epas1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=bHLHe73,HIF-2alpha,HIF2A,HLF,HRF,MOP2
gene7804	- 1.08793 874	0.00082 8823	1486 2	NC_000 069.6	gene_id=gene7804;Dbxref=GeneID:14862,MGI:MGI:95860;Name=Gstm1;description=glutathione S-transferase%2C mu 1;gbkey=Gene;gene=Gstm1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Gstb-1,Gstb1
gene13670	- 1.18367 658	0.00135 267	1897 9	NC_000 072.6	gene_id=gene13670;Dbxref=GeneID:18979,MGI:MGI:103295;Name=Pon1;description=paraoxonase 1;gbkey=Gene;gene=Pon1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Pon
gene21974	- 0.79937 1442	0.00135 267	1522 7	NC_000 074.6	gene_id=gene21974;Dbxref=GeneID:15227,MGI:MGI:1347470;Name=Foxf1;description=forkhead box F1;gbkey=Gene;gene=Foxf1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Al450827,Foxf1a,Freac-1,FREAC1,HFH-8,Hfh8
gene31134	- 0.71019 8343	0.00173 2845	6833 7	NC_000 078.6	gene_id=gene31134;Dbxref=GeneID:68337,MGI:MGI:1915587;Name=Crip2;description=cysteine rich protein 2;gbkey=Gene;gene=Crip2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=0610010123Rik,AW743261,C77570,Crp,CRP2,CRP4,ESP1,Hlp
gene21619	- 1.34245 8417	0.00262 846	1255 6	NC_000 074.6	gene_id=gene21619;Dbxref=GeneID:12556,MGI:MGI:106671;Name=Cdh16;description=cadherin 16;gbkey=Gene;gene=Cdh16;gene_biotype=protein_coding
gene43290	- 1.29119 036	0.00278 2157	2098 37	NC_000 086.7	gene_id=gene43290;Dbxref=GeneID:209837,MGI:MGI:2148066;Name=Slc38a5;description=solute carrier family 38%2C member 5;gbkey=Gene;gene=Slc38a5;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=C81234,E330031E14,JM24,SN2
gene11821	- 1.02397 4174	0.00282 9965	1242 5	NC_000 071.6	gene_id=gene11821;Dbxref=GeneID:12425,MGI:MGI:99478;Name=Cckar;description=cholecystokinin A receptor;gbkey=Gene;gene=Cckar;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AW106902
gene44959	- 1.07468 5777	0.00312 4559	4062 17	NC_000 086.7	gene_id=gene44959;Dbxref=GeneID:406217,MGI:MGI:3606746;Name=Bex4;description=brain expressed X-linked 4;gbkey=Gene;gene=Bex4;gene_biotype=protein_coding
gene21516	- 1.13856 7824	0.00342 3086	6780 1	NC_000 074.6	gene_id=gene21516;Dbxref=GeneID:67801,MGI:MGI:1915051;Name=Plip;description=plasma membrane proteolipid;gbkey=Gene;gene=Plip;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=0610010106Rik,AV001002,Plapi,Tm4sf11
gene43896	- 0.85833 2434	0.00441 6867	6615 8	NC_000 086.7	gene_id=gene43896;Dbxref=GeneID:66158,MGI:MGI:1913408;Name=Cxx1a;description=CAAX box 1A;gbkey=Gene;gene=Cxx1a;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1110012005Rik,Mar8.2A/B,Mart8b
gene37601	- 0.68895 805	0.00593 9209	1274 1	NC_000 082.6	gene_id=gene37601;Dbxref=GeneID:12741,MGI:MGI:1276112;Name=Cldn5;description=claudin 5;gbkey=Gene;gene=Cldn5;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Al854493,MBEC1,Tmvcf
gene137	- 0.77688	0.00661	1238	NC_000	gene_id=gene13779;Dbxref=GeneID:12389,MGI:MGI:102709;Name=Cav1;description=caveolin 1%2C caveolae

79	2921	4123	9	072.6	protein;gbkey=Gene;gene=Cav1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Cav,Cav-1
gene44956	- 1.15326 395	0.00690 7502	1206 9	NC_000 086.7	gene_id=gene44956;Dbxref=GeneID:12069,MGI:MGI:1338017;Name=Bex2;description=brain expressed X-linked 2;gbkey=Gene;gene=Bex2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AL024066,Bex1
gene19968	- 1.10888 1879	0.00762 9668	1600 2	NC_000 073.6	gene_id=gene19968;Dbxref=GeneID:16002,MGI:MGI:96434;Name=Igf2;description=insulin-like growth factor 2;gbkey=Gene;gene=Igf2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AL033362,Igf-2,Igf-II,M6pr,Mpr,Peg2
gene27031	- 0.83912 621	0.00820 3321	2166 43	NC_000 077.6	gene_id=gene27031;Dbxref=GeneID:216643,MGI:MGI:2387597;Name=Gabrp;description=gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor%2C pi;gbkey=Gene;gene=Gabrp;gene_biotype=protein_coding
gene11674	- 0.72509 4369	0.00935 795	2311 62	NC_000 071.6	gene_id=gene11674;Dbxref=GeneID:231162,MGI:MGI:2684993;Name=Cytl1;description=cytokine-like 1;gbkey=Gene;gene=Cytl1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=4930443F05Rik,4Cytl1,C17,Cyt1,Gm147
gene37203	- 1.21489 3373	0.00991 7327	2239 17	NC_000 081.6	gene_id=gene37203;Dbxref=GeneID:223917,MGI:MGI:2385030;Name=Krt79;description=keratin 79;gbkey=Gene;gene=Krt79;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=BC031593
gene29386	- 1.03505 7864	0.01025 1381	1240 9	NC_000 077.6	gene_id=gene29386;Dbxref=GeneID:12409,MGI:MGI:107200;Name=Cbr2;description=carbonyl reductase 2;gbkey=Gene;gene=Cbr2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=MLCR
gene48450	- 0.88230 7396	0.01025 1381	1771 7	NC_005 089.1	gene_id=gene48450;Dbxref=GeneID:17717,MGI:MGI:102500;Name=ND2;Note=URF2;gbkey=Gene;gene=ND2;gene_biotype=protein_coding
gene43089	- 1.09035 1284	0.01034 9755	1458 5	NC_000 085.6	gene_id=gene43089;Dbxref=GeneID:14585,MGI:MGI:1100842;Name=Gfra1;description=glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1;gbkey=Gene;gene=Gfra1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AU042498
gene28321	- 0.64945 2272	0.01055 1399	1235 1	NC_000 077.6	gene_id=gene28321;Dbxref=GeneID:12351,MGI:MGI:1096574;Name=Car4;description=carbonic anhydrase 4;gbkey=Gene;gene=Car4;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AW456718,Ca4
gene12779	- 0.96421 8312	0.01219 4125	4339 43	NC_000 071.6	gene_id=gene12779;Dbxref=GeneID:433943,MGI:MGI:3648223;Name=Gstm2-ps1;description=glutathione S-transferase mu 2 (muscle)%2C pseudogene 1;gbkey=Gene;gene=Gstm2-ps1;gene_biotype=pseudogene;gene_synonym=EG433943,Gm5562;pseudo=true
gene23525	- 0.73188 226	0.01540 1118	1023 71	NC_000 075.6	gene_id=gene23525;Dbxref=GeneID:102371,MGI:MGI:2142908;Name=Myzap;description=myocardial zonula adherens protein;gbkey=Gene;gene=Myzap;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AA407270,AV006038,Gcom1,Gm640,Grin1a7,Myozap
gene21669	- 0.64760 4047	0.01565 4694	6797 1	NC_000 074.6	gene_id=gene21669;Dbxref=GeneID:67971,MGI:MGI:1915221;Name=Tppp3;description=tubulin polymerization-promoting protein family member 3;gbkey=Gene;gene=Tppp3;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2700055K07Rik,Ceacam9,CGI-38,mmCGM8

gene7020	- 0.89446 3569	0.01565 4694	6865 9	NC_000 069.6	gene_id=gene7020;Dbxref=GeneID:68659,MGI:MGI:1915909;Name=Fam198b;description=family with sequence similarity 198%2C member B;gbkey=Gene;gene=Fam198b;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1110032E23Rik,2210419I08Rik,AV011458,Ened
gene14486	- 0.87034 7755	0.01841 0756	6993 8	NC_000 072.6	gene_id=gene14486;Dbxref=GeneID:69938,MGI:MGI:1917188;Name=Scrn1;description=secernin 1;gbkey=Gene;gene=Scrn1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2810019K23Rik,6330535A03Rik,AI852905,mKIAA0193,SES1
gene34260	- 1.01016 3281	0.01841 0756	1358 7	NC_000 080.6	gene_id=gene34260;Dbxref=GeneID:13587,MGI:MGI:108020;Name=Ear2;description=eosinophil-associated%2C ribonuclease A family%2C member 2;gbkey=Gene;gene=Ear2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=EAR-13,EAR-2,ECP,ECP 2,Raf3,Rnase2
gene37352	- 0.68613 5444	0.01841 0756	2396 91	NC_000 082.6	gene_id=gene37352;Dbxref=GeneID:239691,MGI:MGI:2146559;Name=AU021092;description=expressed sequence AU021092;gbkey=Gene;gene=AU021092;gene_biotype=protein_coding
gene41259	- 0.90432 1125	0.02045 1893	1171 58	NC_000 084.6	gene_id=gene41259;Dbxref=GeneID:117158,MGI:MGI:2153470;Name=Scgb3a2;description=secretoglobin%2C family 3A%2C member 2;gbkey=Gene;gene=Scgb3a2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=LuLeu1,Pnsp1,UGRP1,Utgrp1
gene30130	- 0.59515 4655	0.02062 2482	6686 4	NC_000 078.6	gene_id=gene30130;Dbxref=GeneID:66864,MGI:MGI:1914114;Name=Clec14a;description=C-type lectin domain family 14%2C member a;gbkey=Gene;gene=Clec14a;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1200003C23Rik,AI642649
gene43962	- 0.58345 1502	0.02206 6229	1419 9	NC_000 086.7	gene_id=gene43962;Dbxref=GeneID:14199,MGI:MGI:1298387;Name=Fhl1;description=four and a half LIM domains 1;gbkey=Gene;gene=Fhl1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=FHL-1,KyoT,RAM14-1,SLIM,SLIM-1
gene19986	- 0.76223 6834	0.02342 3984	1257 7	NC_000 073.6	gene_id=gene19986;Dbxref=GeneID:12577,MGI:MGI:104564;Name=Cdkn1c;description=cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57);gbkey=Gene;gene=Cdkn1c;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AL024410,CDKI,Kip2,p57(kip2),p57Kip2
gene43897	- 0.70147 1567	0.02504 4034	5531 27	NC_000 086.7	gene_id=gene43897;Dbxref=GeneID:553127,MGI:MGI:3576504;Name=Cxx1b;description=CAAX box 1B;gbkey=Gene;gene=Cxx1b;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Mart8c
gene899	- 1.09027 5207	0.02504 4034	2411 13	NC_000 067.6	gene_id=gene899;Dbxref=GeneID:241113,MGI:MGI:1891343;Name=Prkag3;description=protein kinase%2C AMP-activated%2C gamma 3 non-catalytic subunit;gbkey=Gene;gene=Prkag3;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Amkg3,Ampkg3,AMPKg3L,AMPKg3S
gene28086	- 1.03572 6499	0.02728 479	1556 7	NC_000 077.6	gene_id=gene28086;Dbxref=GeneID:15567,MGI:MGI:96285;Name=Slc6a4;description=solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter%2C serotonin)%2C member 4;gbkey=Gene;gene=Slc6a4;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=5-HTT,AI323329,Htt,Sert
gene32179	- 0.94778 2603	0.02728 479	1216 1	NC_000 079.6	gene_id=gene32179;Dbxref=GeneID:12161,MGI:MGI:88182;Name=Bmp6;description=bone morphogenetic protein 6;gbkey=Gene;gene=Bmp6;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=D13Wsu115e,Vgr1
gene361	- 1.04494	0.02873	2394	NC_000	gene_id=gene36125;Dbxref=GeneID:239435,MGI:MGI:2181621;Name=Aard;description=alanine and arginine rich domain containing

25	7192	5777	35	081.6	protein;gbkey=Gene;gene=Aard;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=A5D3,AV328152
gene21477	- 0.69198 6822	0.02909 5678	1041 58	NC_000 074.6	gene_id=gene21477;Dbxref=GeneID:104158,MGI:MGI:2148202;Name=Ces1d;description=carboxylesterase 1D;gbkey=Gene;gene=Ces1d;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Ces3,TGH
gene26616	- 0.83971 7705	0.03128 2734	3806 83	NC_000 077.6	gene_id=gene26616;Dbxref=GeneID:380683,MGI:MGI:3617848;Name=Sec14l3;description=SEC14-like lipid binding 3;gbkey=Gene;gene=Sec14l3;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1110069O07Rik
gene28814	- 0.55538 2124	0.03138 4003	5440 9	NC_000 077.6	gene_id=gene28814;Dbxref=GeneID:54409,MGI:MGI:1859650;Name=Ramp2;description=receptor (calcitonin) activity modifying protein 2;gbkey=Gene;gene=Ramp2;gene_biotype=protein_coding
gene21279	- 1.02535 3823	0.03555 4886	7013 4	NC_000 074.6	gene_id=gene21279;Dbxref=GeneID:70134,MGI:MGI:1917384;Name=2210011C24Rik;description=RIKEN cDNA 2210011C24 gene;gbkey=Gene;gene=2210011C24Rik;gene_biotype=protein_coding
gene26830	- 0.85352 0586	0.03555 4886	5596 3	NC_000 077.6	gene_id=gene26830;Dbxref=GeneID:55963,MGI:MGI:2135601;Name=Slc1a4;description=solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter)%2C member 4;gbkey=Gene;gene=Slc1a4;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=ASCT-1,ASCT1,AW045657,SATT
gene42473	- 0.64900 839	0.03555 4886	1166 8	NC_000 085.6	gene_id=gene42473;Dbxref=GeneID:11668,MGI:MGI:1353450;Name=Aldh1a1;description=aldehyde dehydrogenase family 1%2C subfamily A1;gbkey=Gene;gene=Aldh1a1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=Ahd-2,Ahd2,Aldh1,Aldh1a2,E1,Raldh1
gene22704	- 0.80903 9756	0.04084 5368	6401 1	NC_000 075.6	gene_id=gene22704;Dbxref=GeneID:64011,MGI:MGI:1927184;Name=Nrgn;description=neurogranin;gbkey=Gene;gene=Nrgn;gene_biotype=protein_codi ng;gene_synonym=0710001B06Rik,AI838505,NG,NG/RC3,Pss1,R75334,RC3
gene39913	- 0.60453 8989	0.04291 7358	2247 92	NC_000 083.6	gene_id=gene39913;Dbxref=GeneID:224792,MGI:MGI:2182928;Name=Adgrf5;description=adhesion G protein-coupled receptor F5;gbkey=Gene;gene=Adgrf5;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=8430401C09Rik,9330185D23,AI528491,Gpr116,mKIAA0758
gene15487	- 0.87675 2092	0.04437 8886	2096 5	NC_000 072.6	gene_id=gene15487;Dbxref=GeneID:20965,MGI:MGI:103020;Name=Syn2;description=synapsin II;gbkey=Gene;gene=Syn2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2900074L19Rik,AI836018,AI841723
gene18757	- 0.59464 162	0.04605 9236	1776 0	NC_000 073.6	gene_id=gene18757;Dbxref=GeneID:17760,MGI:MGI:1201690;Name=Map6;description=microtubule-associated protein 6;gbkey=Gene;gene=Map6;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2810411E12Rik,Map-6,Mtap6,STOP
gene2038	- 0.93269 0524	0.04790 8146	1426 2	NC_000 067.6	gene_id=gene2038;Dbxref=GeneID:14262,MGI:MGI:1100496;Name=Fmo3;description=flavin containing monooxygenase 3;gbkey=Gene;gene=Fmo3;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AW111792
gene17367	- 0.74958 6049	0.05008 4784	6845 8	NC_000 073.6	gene_id=gene17367;Dbxref=GeneID:68458,MGI:MGI:1931139;Name=Ppp1r14a;description=protein phosphatase 1%2C regulatory (inhibitor) subunit 14A;gbkey=Gene;gene=Ppp1r14a;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1110001M11Rik,Cpi17

gene20194	- 0.55450 9178	0.05008 4784	1406 8	NC_000 074.6	gene_id=gene20194;Dbxref=GeneID:14068,MGI:MGI:109325;Name=F7;description=coagulation factor VII;gbkey=Gene;gene=F7;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=A1132620,Cf7,FVII
gene26392	- 0.73025 7723	0.05008 4784	4077 90	NC_000 076.6	gene_id=gene26392;Dbxref=GeneID:407790,MGI:MGI:3039567;Name=Ndufa4l2;description=NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex%2C 4-like 2;gbkey=Gene;gene=Ndufa4l2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=BC064011
gene40075	- 0.76966 9309	0.05008 4784	7644 1	NC_000 083.6	gene_id=gene40075;Dbxref=GeneID:76441,MGI:MGI:1923691;Name=Daam2;description=dishevelled associated activator of morphogenesis 2;gbkey=Gene;gene=Daam2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2310016D11Rik,AI843643,AW557870
gene41304	- 0.60327 0438	0.05008 4784	1258 3	NC_000 084.6	gene_id=gene41304;Dbxref=GeneID:12583,MGI:MGI:105925;Name=Cdo1;description=cysteine dioxygenase 1%2C cytosolic;gbkey=Gene;gene=Cdo1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=1300002L19Rik,Cdo,D18Ucla3
gene15720	- 0.63676 083	0.05009 0925	6920 2	NC_000 072.6	gene_id=gene15720;Dbxref=GeneID:69202,MGI:MGI:1916452;Name=Ptms;description=parathyrosin;gbkey=Gene;gene=Ptms;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2610009E16Rik
gene23851	- 0.99373 2542	0.05020 0288	7647 7	NC_000 075.6	gene_id=gene23851;Dbxref=GeneID:76477,MGI:MGI:1923727;Name=Pcolce2;description=procollagen C-endopeptidase enhancer 2;gbkey=Gene;gene=Pcolce2;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=2400001O18Rik,Pcpe2
gene6920	- 0.91050 6108	0.05020 0288	1092 22	NC_000 069.6	gene_id=gene6920;Dbxref=GeneID:109222,MGI:MGI:1924461;Name=Rarres1;description=retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1;gbkey=Gene;gene=Rarres1;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=5430417P09Rik,AI662122
gene27838	- 0.70811 9943	0.05070 7385	2168 67	NC_000 077.6	gene_id=gene27838;Dbxref=GeneID:216867,MGI:MGI:2663709;Name=Slc16a11;description=solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters)%2C member 11;gbkey=Gene;gene=Slc16a11;gene_biotype=protein_coding;gene_synonym=AB041591,MCT 11,MNCb-2717