



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación de la cepa mutante de la ATPasa de
tipo P, CtpF (Mtb Δ ctpF) de *Mycobacterium
tuberculosis* H37Rv, como nuevo candidato
vacunal, en un modelo de ratón BALB /c de
tuberculosis pulmonar progresiva**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

LEONARDO ALEJANDRO DELGADO IBARRA



DIRECTOR DE TESIS:
DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PÁYAN

Ciudad Universitaria, CD. MX., 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.

Dedico este trabajo sobre todo a mi madre, padre y hermano, que durante todo este proceso me demostraron su apoyo, para no rendirme durante la realización de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación académica, profesional y personal.

Agradezco a mis sinodales, Dra. Laura del Carmen Vargas Parada, Dra. Edén Marcela Rodríguez Flores, Dra. Brenda Noemí Marquina Castillo y al Biól. José Luis Ramos Balderas, por su tiempo, consejos y enseñanzas, durante este proceso.

Al laboratorio de Patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, especialmente a la Dr. Dulce Mata, Dr. Brenda Marquina, y Dr. Hernández por el apoyo y confianza para elaborar mi trabajo.

A mi director de tesis el Dr. Jorge Alberto Barrios Payán por compartir sus conocimientos y apoyo durante todo este proceso.

Tabla de contenido

Resumen	1
Capítulo 1. Introducción	3
Capítulo 2. Marco Teórico.....	6
2.1 Generalidades de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
2.2 Pared celular	8
2.3 Infección y desarrollo de la Enfermedad	9
2.4 Tratamiento	10
2.5 Tipos de Vacunas	11
2.6 Bacilo de Calmette-Guérin (BCG).....	12
2.9 Las ATPasas en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.10 ctpF	18
2.11 Mtb Δ ctpF	19
Capítulo 3.....	22
3.1 Justificación.....	23
3.2 Hipótesis.....	24
3.3 Objetivo	25
3.4 Objetivos específicos	25
Capítulo 4. Material y Métodos.....	26
4.1 Cepas	27

4.2 Animales de Experimentación	27
4.3 Modelo experimental	28
4.4 BCG Ph	29
4.5 Título micobacteriano	29
4.6 Vacunación	30
4.7 Reto y días de eutanasia	30
4.8 Eutanasia y obtención de muestras	30
4.9 Determinación de carga bacilar	31
4.10 Análisis histológico	32
Capítulo 5. Resultados	34
Capítulo 6. Discusión	41
Capítulo 7. Conclusiones	46
Capítulo 8. Referencias	48

Índice de Figuras

Figura 1. Vacunación de BCG en el mundo.....	13
Figura 2. Desarrollo de Vacunas contra la TB a nivel mundial.....	15
Figura 3. Modelo sobre el funcionamiento de ctpF.....	19
Figura 4. Curva de sobrevida en ratones BALB/c.....	20
Figura 5. Caja Petri marcada, con medio 7H10-OADC.....	32
Figura 6. Curva de sobrevida en ratones vacunados.....	36
Figura 7. Comparación entre UFC en pulmón en ratones retados con la cepa H37Rv, a los 2 y 4 meses.....	37
Figura 8. Comparación entre los porcentajes de neumonía en pulmón de ratones retados con la cepa H37Rv, a los 2 y 4 meses.....	39

Índice de Tablas

Tabla 1. Concentraciones reales de inóculo para vacunación e infección.....35

Tabla 2. Comparación de los valores de UFC y porcentaje de neumonía entre los grupos a los 2 y 4 meses, post reto con la cepa wild type H37Rv.....40

Abreviaturas

ABSL3 Instalaciones de Seguridad Biológica Animal Nivel 3

ATP Adenosín Trifosfato

BCG Bacilo de Calmette-Guérin (*Mycobacterium bovis*)

BCG Ph Bacilo de Calmette-Guérin Phipps (*Mycobacteriem bovis*)

BSL-3 Nivel de Bioseguridad 3

DIEB Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

h Hora

H37Rv Cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*

IFN- γ Interferón gamma

IL Interleucina

INCMNSZ Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Mtb *Mycobacterium tuberculosis*

Mtb Δ ctpF Cepa H37Rv con delección en el gen ctpF

OMS Organización Mundial de la salud

SERCA ATPasa del retículo sarco/endoplásmico

SS Solución salina

TB Tuberculosis

TBL Tuberculosis latente

TNF- α Factor de necrosis tumoral

UFC Unidades formadoras de colonia

WT Cepa tipo silvestre

μ L Microlitros

μ M Micrómetro

Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa cuyo agente causal es la micobacteria patógena *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enfermedad es considerada por la OMS como una amenaza para la salud, ya que se encuentra entre las 10 principales causas de muerte en general y es la primera causa de muerte por un agente patógeno. La TB puede presentarse como una infección latente, se estima que un cuarto de la población mundial presenta este tipo de infección. A pesar de existir tratamiento y vacuna, esto no ha dado los resultados esperados para erradicarla. El largo tiempo de tratamiento (al menos 6 meses) propicia que los pacientes lo incumplan, provocando el surgimiento de cepas resistentes a los antibióticos. El Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) proveniente de *Mycobacterium bovis* es la única vacuna aprobada para utilizarse contra la TB, pero ofrece una protección muy variable, en niños presenta una buena respuesta contra las formas graves de la enfermedad, pero en adultos la protección difiere de individuo a individuo. Por lo anterior es importante centrarse en nuevos medicamentos que reduzcan el tiempo de tratamiento y la generación de nuevas vacunas con una mejor eficacia. Las proteínas de membrana se consideran objetivos farmacológicos debido al papel que tiene en el transporte de iones para conservar la homeostasis, entre las células y el ambiente que los rodea. En el presente trabajo se evaluó en un modelo de TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c, si la cepa mutante de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (*Mtb* Δ ctpF) la cual presenta una deleción en el gen ctpF, que es una ATPasa de tipo P que se encarga del transporte de calcio, a través de la membrana durante la etapa de infección, favorece un mejor control de la enfermedad. El grupo de ratones vacunado con la mutante *Mtb* Δ ctpF presentó una menor carga bacilar y menor porcentaje de neumonía, comparado con el grupo control inoculado con solución salina y el grupo con Bacilo de Calmette-Guérin Phipps (BCG Ph). Estos resultados

marcan la pauta para seguir realizando estudios con mutantes de *Mycobacterium tuberculosis*, como la Mtb Δ ctpF, abriendo la puerta a un nuevo tipo de vacunas contra la TB.

Capítulo 1. Introducción

La tuberculosis (TB) es causada por la micobacteria patógena *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que se transmite entre las personas a través de aerosoles producidos al hablar, toser o estornudar; las gotas de estos aerosoles transportan a las micobacterias. Mtb, es una bacteria intracelular y, a pesar que puede infectar diferentes tipos de células, los macrófagos alveolares son su nicho más frecuente. La mayoría de las personas infectadas son clínicamente asintomáticas, en este escenario, donde la bacteria permanece viable en los tejidos del huésped, pero en un estado de equilibrio, en el cual el microorganismo no ataca las células del hospedero y el sistema inmunológico tampoco lo elimina, se le conoce como infección latente (TBL)¹.

De ahí la necesidad de contar con una vacuna efectiva para detener el ciclo de infección. Por ahora, la vacuna Bacilo Calmette-Guérin (BCG) es la única disponible contra la TB; sin embargo, su efectividad, es muy variable. Las hipótesis más aceptadas para explicar las discrepancias en su efectividad son la pérdida progresiva de la capacidad de BCG para estimular una respuesta inmune duradera, además de la alta prevalencia a la exposición continua a micobacterias ambientales, que podrían bloquear o enmascarar respuestas inmunes inducidas por la vacuna².

Las proteínas de membrana se consideran objetivos farmacológicos de interés debido a su papel como transportadores y mediadores (i) en la interacción de la célula con el entorno circundante, (ii) entre las células y (iii) entre los compartimentos celulares. Las ATPasas de tipo P forman una superfamilia de transportadores de cationes de varias membranas biológicas. Estas proteínas se encuentran en todos los organismos vivos y bombean iones específicos a través de la bicapa lipídica a expensas de una molécula de ATP por ciclo. Por lo tanto, las ATPasas tipo P mantienen gradientes electroquímicos pronunciados y la homeostasis celular³.

ctpF es una ATPasa de tipo P que responde cuando Mtb se trata con sustancias tóxicas como especies reactivas de nitrógeno, especies reactivas de oxígeno y bajo hipoxia. Este comportamiento sugiere que ctpF podría ser parte crucial de las estrategias del bacilo tuberculoso para enfrentar las condiciones ambientales que se presentan durante la infección⁴.

Se ha propuesto utilizar este tipo de mutaciones para elaborar vacunas atenuadas al presentar la cepa modificaciones que afectan su viabilidad. Sin embargo, el diseño de este tipo de vacunas donde se lleva a cabo la delección de genes presenta grandes retos de seguridad de acuerdo al consenso de Ginebra; se recomienda la presencia de al menos dos mutaciones independientes no reversibles⁵. Por lo anterior este experimento se considera como un experimento piloto ya que solo se caracteriza una primera mutante⁶.

Capítulo 2. Marco Teórico

En la actualidad, la TB sigue siendo un problema de salud pública importante, es una de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo y la principal causa de muerte provocada por un solo agente infeccioso. En 2019, a nivel mundial, se estimaron 10 millones de casos y alrededor de 1.4 millones de muertes por esta infección; de ellas, 208,000 tenían VIH. La mayoría de las personas afectadas a menudo enfrentan dificultades económicas, vulnerabilidad, marginación y discriminación⁷.

Además de los factores de riesgo medioambientales y socioeconómicos bien establecidos, en los últimos tiempos han aparecido nuevas fuerzas que impulsan la pandemia mundial: el VIH / SIDA y la aparición de micobacterias con resistencia a los fármacos⁸.

La TB se manifiesta en dos formas principales: enfermedad activa y TBL. En esta última no hay sintomatología clínica ni es transmisible debido a que la respuesta inmune es capaz de contener el crecimiento del patógeno pero no de eliminarlo, de manera que la bacteria persiste en el organismo manteniendo una baja o nula actividad replicativa⁹. Aproximadamente una cuarta parte de la población mundial padece este tipo de infección y del 5-10% de estas personas desarrollarán la enfermedad activa en algún momento de sus vidas⁷.

La TB daña principalmente los pulmones, pero también puede dañar otros órganos, el período de incubación está relacionado con el estado inmunológico de la persona. Los síntomas típicos de la enfermedad activa son tos crónica, esputo con sangre, sudores nocturnos, fiebre y pérdida de peso, y en los casos extrapulmonares se pueden observar diversos síntomas¹⁰.

2.1 Generalidades de *Mycobacterium tuberculosis*

2.2 Pared celular

Los miembros del género *Mycobacterium* se caracterizan por una envoltura de pared celular muy compleja siendo sus principales componentes el peptidoglicano, el ácido micólico y el arabinogalactano¹², responsables de la notable baja permeabilidad de sus células, lo que les brinda resistencia a muchos fármacos antimicrobianos. Estos componentes son también los que permiten el procedimiento de tinción diferencial característico (tinción ácido-resistente de Zhiel-Neelsen), que distingue específicamente a los miembros de este género¹¹.

Además, estos compuestos han resultado de gran interés por su abundancia, diversidad estructural y antigenicidad, además de su papel en la patogénesis de la TB y su posible utilidad en el desarrollo de fármacos, vacunas, diagnóstico y biomarcadores. Los lípidos de la envoltura celular constituyen alrededor del 40% de la masa celular, aunque este porcentaje puede variar según la especie y las condiciones de crecimiento. Las estructuras químicas particulares y la organización de estos lípidos entre la membrana interna y externa de la envoltura celular micobacteriana explican gran parte de su impermeabilidad. Al estar ubicada en la interfaz entre la bacteria y el huésped, la membrana externa y los lípidos capsulares de Mtb juegan un papel importante en la dirección de las interacciones entre huésped-patógeno¹³.

2.3 Infección y desarrollo de la Enfermedad

Mtb puede establecer una infección en individuos susceptibles después de la inhalación de una o pocas bacterias que son fagocitadas por los macrófagos alveolares¹⁴. Las etapas iniciales de la infección se caracterizan por respuestas inmunes innatas que implican el reclutamiento de células inflamatorias a los pulmones; la inducción de una respuesta inmune adaptativa se produce sólo más tarde, en los ganglios linfáticos donde la presentación de antígenos por las células dendríticas conduce a la expansión de las células T específicas de antígeno¹.

Las células inmunes forman un granuloma alrededor de Mtb en un intento por contener a las bacterias. Estas son las lesiones típicas que se observan en el pulmón infectado¹⁵. Dentro del granuloma, los macrófagos se activan, por ejemplo, por IFN γ secretado por las células T CD4, que restringe la dispersión y replicación de Mtb¹. Los macrófagos alveolares, las células dendríticas y neutrófilos pueden fagocitar micobacterias de las vías respiratorias, y en cierto punto controlar la infección¹⁵. Una vez que Mtb es fagocitada se inicia una serie de mecanismos bactericidas por parte del sistema inmune. Uno de los más importantes se conoce como “estallido respiratorio”, que produce anión superóxido y óxido nítrico¹⁶.

Sin embargo, Mtb ha desarrollado un conjunto de mecanismos de evasión que retrasan el transporte bacteriano al ganglio linfático y le permiten evadir la inmunidad del huésped, dándole tiempo suficiente para establecer una infección productiva, además de retrasar el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa¹⁴.

Mtb puede inhibir la maduración del fagosoma y así evitar la fusión con el lisosoma; otro de los mecanismos que utiliza el hospedero para defenderse es la muerte celular por apoptosis lo que induce la formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por otras células para evitar que se libere el contenido intracelular.

Sin embargo, la micobacteria puede evadir la apoptosis lo que resulta en una disminución de la presentación antigénica favoreciendo la muerte por necrosis. Este proceso ocurre en menos tiempo y permite que el contenido intracelular se libere al ambiente celular facilitando la infección a nuevas células¹⁶.

2.4 Tratamiento

La TB es curable y prevenible. Un gran porcentaje de las personas que desarrollan la enfermedad pueden tratarse con éxito con un régimen de medicamentos durante al menos 6 meses; el tratamiento tiene el beneficio adicional de reducir la transmisión de la infección⁷.

El tratamiento de primera línea actual utiliza una terapia de combinación de dosis empírica estandarizada de cuatro fármacos: isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Este régimen de medicamentos tiene una alta eficiencia en la clínica, con un éxito de tratamiento de aproximadamente el 85%¹⁷.

Actualmente, la cantidad de antibióticos disponibles ha aumentado considerablemente, pero los primeros antibióticos descubiertos durante las décadas de 1950 y 1960 siguen siendo tratamientos de primera línea, en particular rifampicina e isoniazida. La aparición de cepas farmacorresistentes y multirresistentes dificulta enormemente el manejo de esta enfermedad. El mal cumplimiento del tratamiento y la falta de herramientas de diagnóstico rápidas y eficaces, son los principales factores que contribuyen a la aparición y transmisión de cepas farmacorresistente en las poblaciones¹⁸.

Una vacuna se puede definir como una suspensión de microorganismos atenuados, muertos, fracciones antigénicas puras o químicamente modificados, que se administran por diferentes vías para generar una respuesta inmunológica de memoria en prevención a la interacción casual con la fuente antigénica silvestre¹⁹.

2.5 Tipos de Vacunas

Vacunas vivas, atenuadas

En algunos casos es posible atenuar o modificar (mediante mutaciones) microorganismos de modo que pierdan su capacidad para causar enfermedad pero retengan su capacidad para crecer transitoriamente dentro de un huésped inoculado. Este tipo de vacuna imita de manera más estrecha los patrones de crecimiento del agente patógeno pero una desventaja importante es que los virus atenuados pueden mutar y revertirse hacia formas virulentas (tuberculosis, sarampión, rubéola)²⁰.

Vacunas inactivadas o “muertas”

Para elaborar este tipo de vacunas el agente patógeno puede ser tratado con calor o sustancias químicas. Esto mata al patógeno, lo cual lo hace incapaz de replicarse, pero aún le permite inducir una respuesta inmunitaria ya que conserva algunos de los antígenos. Aunque las vacunas vivas atenuadas por lo general solo requieren una dosis para inducir inmunidad duradera, las vacunas inactivadas a menudo requieren refuerzos para alcanzar un estado inmune protector (hepatitis A, cólera, rabia)²⁰

Vacunas de subunidad

Se utilizan macromoléculas purificadas específicas derivadas del agente patógeno, este tipo de vacunas al no contener al patógeno atenuado evitan que la cepa pueda revertir a su forma virulenta y causar la enfermedad grave (tétanos, difteria)²⁰.

2.6 Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)

La única vacuna disponible contra la TB es la BCG, una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* el cual es un patógeno que afecta al ganado vacuno⁸. Esta cepa se aisló originalmente en 1902 y se cultivó continuamente durante 13 años para generar una cepa mutante con poca virulencia. Fue utilizada por primera vez en humanos en 1921 y fue incluida en los programas de inmunización infantil por la OMS desde 1974²¹.

Al momento de su introducción enfrentó desafíos tales como identificar la población objetivo y garantizar una fabricación consistente. El laboratorio donante (Instituto Pasteur) propagó la BCG hasta 1961 y proporcionó pases únicos con cada lote enviado a los laboratorios solicitantes donde se cultivó en medios no estandarizados. Por lo tanto, la cepa estaba mutando tanto en el Instituto Pasteur como en otros laboratorios de producción en todo el mundo. Esto ha dado lugar a diversas formulaciones de BCG autorizadas que se distinguen por su contenido de micobacterias vivas y su composición genética²¹.

Sin embargo, hasta la fecha no ha habido evidencia de que dicha variación genética entre cepas explique la variabilidad en la eficacia²³. En estos términos, no se ha demostrado que ninguna cepa sea mejor que otra y no existe un consenso global sobre qué cepa es óptima para uso general².

En 2019, el 88 % de los niños de todo el mundo recibieron la vacuna durante su primer año de vida²².

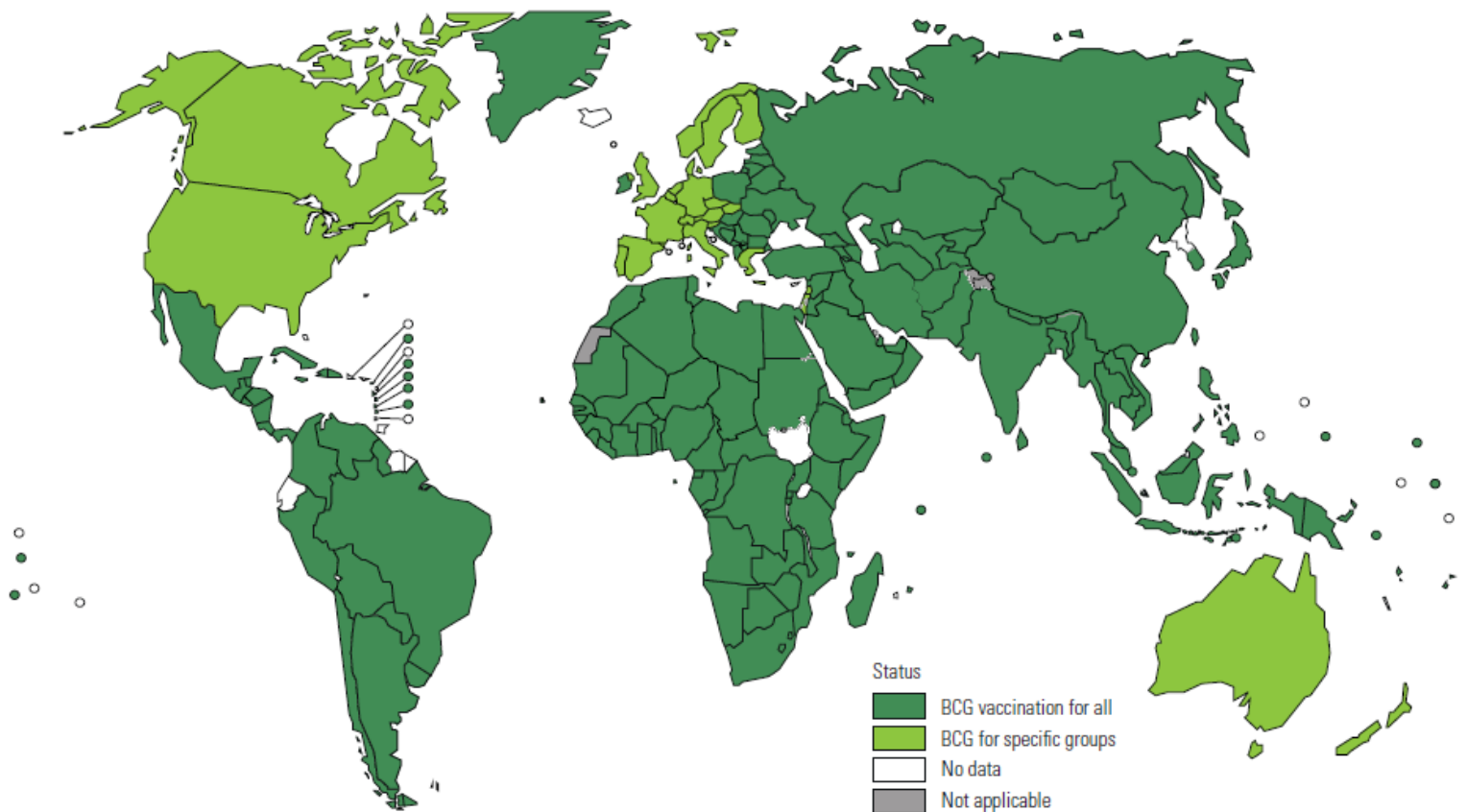


Figura 1. Vacunación de BCG en el mundo, el código de colores muestra si el país vacunó a toda la población o solo un grupo en específico, tomado de Global Tuberculosis Report, 2020⁷.

Se han realizado ensayos donde los resultados muestran que la protección contra la TB puede variar con la cepa de vacunación utilizada³⁸. Esta variación en la respuesta inmunitaria entre cepas de vacunas, también se ha observado en estudios de modelos animales⁴². De hecho, ensayos clínicos han estimado que la eficacia de la vacuna varía ampliamente del 0 % en un ensayo de Chingleput en el sur de la India a 80 % en un ensayo del Consejo de Investigación Médica del Reino Unido²².

Pero el tipo de cepa utilizada no es el único factor que influye, incluso la inmunización natural con micobacterias saprofitas puede afectar en la protección conferida por la vacuna y también puede afectar en la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. Se han realizado ensayos donde ratones BALB/c se preinmunizan con dosis bajas y altas de micobacterias saprofitas, los resultados muestran que después de la infección con H37Rv en los grupos de dosis bajas se induce una mejor respuesta Th1 que protege parcialmente el desarrollo de la enfermedad progresiva mientras que con la dosis alta, los animales rápidamente establecen una respuesta mixta Th1/Th2 lo que facilita la progresión de la enfermedad y en consecuencia la muerte⁴¹.

Por lo tanto, hay un gran número de factores que pueden influir tanto en el curso de la enfermedad y en la eficacia de BCG aparte de los ya mencionados. Algunos de estos factores serían: huésped (edad, sexo, estado nutricional, comorbilidades), socioeconómicos (higiene, estrés, bajos ingresos), BCG (cepa, dosis), Mtb (virulencia de la cepa, inóculo de infección), los ambientales (ubicación geográfica, clima, alta prevalencia de micobacterias no tuberculosas)³⁸.

Aunque hay algo de pesimismo sobre si una vacuna que evite la infección puede desarrollarse, el consenso general es que una vacuna que previene la progresión de la enfermedad activa podría reducir la prevalencia de la TB pulmonar y en última instancia, romper el ciclo de transmisión¹. Incluso se ha probado la revacunación con BCG a diferentes edades. Dos grandes ensayos realizados en Brasil y Malawi evaluaron la revacunación pero ninguno demostró eficacia lo que dio lugar a recomendaciones de la OMS en contra de esta política¹⁴.

Como vacuna atenuada, la BCG puede causar infección local o sistémica en personas inmunodeprimidas y, por lo tanto, está contraindicada en personas que se beneficiarían de esta inoculación, como las personas VIH positivas que tienen un alto riesgo de desarrollar TB activa. Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna que

sea más segura para su uso en individuos inmunodeprimidos también es una prioridad¹⁵.

Los esfuerzos de desarrollo de nuevas vacunas se centran actualmente para los siguientes regímenes de administración: vacunación profiláctica (prevenir la infección), vacunación posterior a la exposición (se administraría a individuos infectados para prevenir el desarrollo de la enfermedad activa) y vacunación terapéutica (se utilizaría en combinación con o después del tratamiento)¹⁴. Los principales candidatos vacunales en la actualidad se pueden observar en la figura 2.

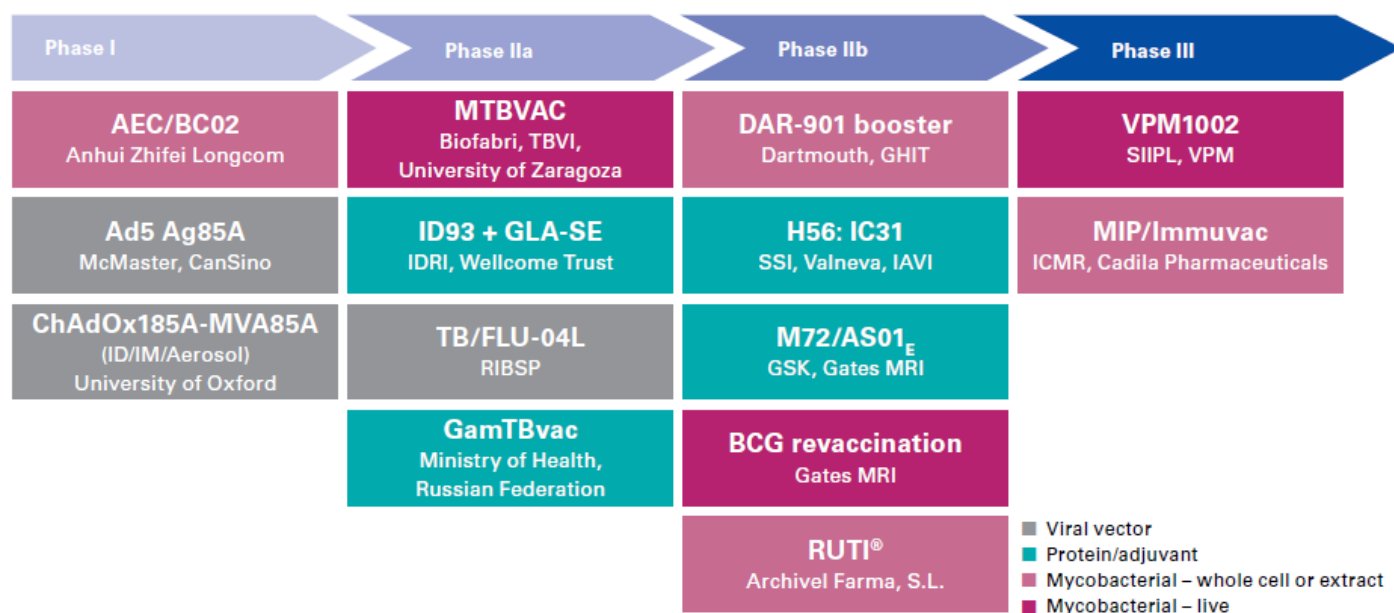


Figura 2. Fase de desarrollo preclínico de nuevas vacunas contra TB a nivel mundial, el código de colores indica el tipo de vacuna (vector viral, proteína/adyuvante, extracto de micobacterias, micobacterias vivas) tomado de Global Tuberculosis Report, 2020⁷.

Algunos resultados de sus ensayos se muestran a continuación; aproximadamente el 50 % de la TB activa se previno con M72:AS01E durante un período de prueba

clínica de 3 años, RUTI se administra como una preparación para la terapia junto con el tratamiento farmacológico, DAR-901 se encontró que era seguro y bien tolerado, pero no logró prevenir la infección según lo determinado por la liberación de IFN- γ , por último MTBVAC, una cepa de Mtb atenuada genéticamente con dos deleciones de genes, después de los ensayos de fase 1 y 2 que mostraron seguridad e inmunogenicidad en adultos y recién nacidos, está actualmente preparando ensayos de eficacia de fase 3 en ambos grupos de edad²².

Una limitación notable del panorama de desarrollo clínico actual, es la falta de estandarización entre ensayos, lo que impide una comparación directa de los resultados inmunológicos de diferentes candidatos a vacunas¹⁴.

2.8 Las ATPasas

El transporte activo a través de la membrana es un requisito fundamental para la vida²⁵. Las ATPasas de tipo P son proteínas de membrana integrales presentes en todos los reinos de la vida; se encargan de mantener gradientes de iones a través de la membrana celular a expensas de una molécula de ATP²⁴.

El mantenimiento de los gradientes adecuados para los iones esenciales hace que las ATPasas de tipo P sean cruciales para la supervivencia celular. En general, las proteínas de membrana se consideran dianas farmacológicas de gran interés debido a su papel como transportadores y mediadores en la interacción de la célula con el entorno³.

2.9 Las ATPasas en *Mycobacterium tuberculosis*

Mtb reside en diferentes nichos *in vivo* y está expuesto a diferentes ambientes durante la enfermedad, incluido el crecimiento intracelular en macrófagos y la

supervivencia en el ambiente anóxico del granuloma. El éxito como patógeno se debe en gran medida a su capacidad para persistir durante largos períodos en el cuerpo²⁶.

La maduración del fagosoma incluye una serie de eventos de fusión con el lisosoma. Los mecanismos utilizados por los fagocitos para matar microbios incluyen: (i) la acidificación fagosómica, (ii) la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y (iii) la manipulación selectiva de varios iones. Tanto el huésped como el patógeno han desarrollado sistemas para detectar iones y bombearlos hacia adentro y afuera de célula, según sus necesidades²⁷.

Estudios previos han analizado el contenido de la vacuola fagosomal de macrófagos durante la infección por Mtb y tras la activación por citocinas inflamatorias. Se observó una disminución temprana en la concentración vacuolar de Ca^{2+} y K^{+} dentro de la primera hora de fagocitosis de Mtb, seguida de una reposición de estos iones en las siguientes 24 h. Esto se acompañó de un aumento temprano y sostenido de la concentración fagosómica de Fe^{2+} y Cu^{2+} , además de un aumento tardío de la concentración de Zn^{2+} , 24 h después de la fagocitosis. El movimiento de algunos de estos iones se modificó aún más tras la activación celular por citocinas inflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$. Para resistir la intoxicación por metales los patógenos suelen utilizar bombas de salida de la familia de la ATPasa tipo P²⁷.

Las ATPasas de tipo P se clasifican filogenéticamente de acuerdo a su especificidad iónica, estas se clasifican en cinco subfamilias (P1 a P5), con otras subclasificaciones A, B, C y D³. Los análisis bioinformáticos recientes indicaron que el complejo de Mtb contiene 12 ATPasas de tipo P que participan en el transporte de iones. Este número alto de transportadores sugiere que pueden desempeñar un papel fundamental en la capacidad de Mtb para sobrevivir dentro de los macrófagos, donde enfrentan altos niveles de metales tóxicos²⁸.

2.10 ctpF

Entre las 12 ATPasas de tipo P codificadas por el genoma de Mtb, ctpF responde al mayor número de condiciones de estrés incluido el estrés oxidativo, la hipoxia y la infección. Es el homólogo micobacteriano de SERCA en eucariotas y su expresión está regulada por el regulador global de latencia DosR⁴.

El regulador global de la latencia DosR se conserva en todas las especies de micobacterias excepto *M. leprae*. Este sistema regulador está implicado en la persistencia de Mtb en los granulomas y media la transcripción de genes en respuesta a la tensión baja de oxígeno para preservar el equilibrio redox y los niveles adecuados de ATP; comprende aproximadamente cincuenta genes²⁸.

Diferentes estudios han mostrado que ctpF está asociado con el bombeo de Ca²⁺ de las células micobacterianas. Particularmente, se han realizado experimentos donde se compara la acumulación de Ca²⁺ entre grupos de micobacterias con y sin el gen ctpF, los resultados muestran que el grupo con el gen presenta menor acumulación de Ca²⁺ en comparación al grupo que se le quitó el gen⁴.

El Ca²⁺ es muy importante y su concentración en varios compartimentos celulares está bajo estricta regulación; una alteración en la concentración de este ion puede causar estragos en la célula²⁴. Además, el calcio está involucrado en procesos biológicos en procariontes como la quimiotaxis, la división celular, la motilidad, la regulación genética, la actividad enzimática y el mantenimiento de la pared y la membrana celular²⁹.

2.11 Mtb Δ ctpF

Todas las formas de vida, incluso las micobacterias, tienen mecanismos como transportadores pasivos y activos para regular la homeostasis del calcio. En estudios previos se consiguió deletar el gen *ctpF*, las micobacterias defectuosas en *ctpF* (Mtb Δ ctpF) acumulan más calcio en comparación con las micobacterias wild type (WT); curiosamente la eliminación de *ctpF* en Mtb también altera la tolerancia de las bacterias al estrés oxidativo y nitrosativo⁴.

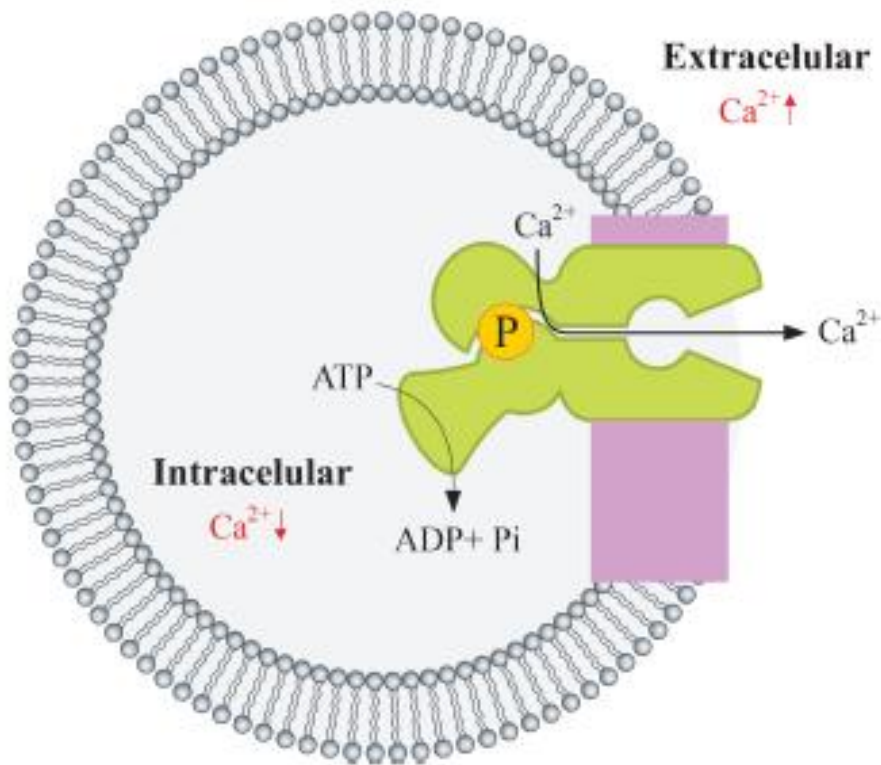


Figura 3. Modelo sobre el funcionamiento de *ctpF*, donde a partir de la hidrólisis del ATP, se transportaría Ca^{2+} intracelular al ambiente extracelular, en contra del gradiente de concentración, tomado de Maya-Hoyos, 2019⁴.

También se han realizado experimentos evaluando si la delección de *ctpF* afecta viabilidad y virulencia de *Mtb*. Se evidenció que dicha mutación genera una disminución significativa en la capacidad replicativa del bacilo en macrófagos alveolares murinos de la línea celular MH-S. Igualmente en un ensayo de sobrevida en ratones BALB/c se encontró que los ratones infectados con la cepa mutante mostraban mayor tiempo medio de supervivencia sugiriendo la atenuación de la cepa mutante^{4,29}.

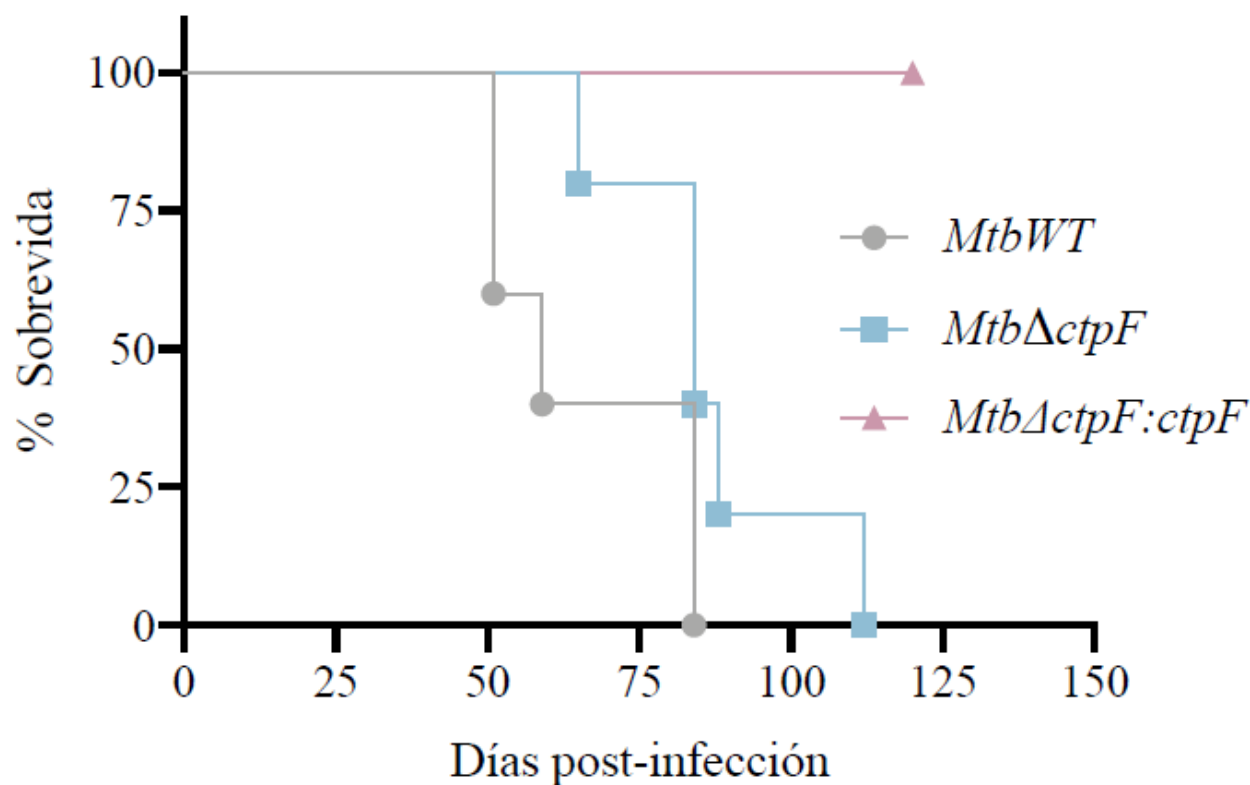


Figura 4. Curva de sobrevida de ratones BALB/c, infectados vía intratraqueal con 2.5×10^5 UFC/100 μ L respectivamente de la cepa wild type (*MtbWT*), la cepa con la delección del gen *ctpF* (*MtbΔctpF*) y la cepa complementa *MtbΔctpF:ctpF*, tomado de Maya-Hoyos,2021²⁹. El grupo retado con *MtbΔctpF* presento mayor sobrevida que el grupo de wild type, por lo tanto, la delección del gen *ctpF* en H37Rv genera una atenuación en la virulencia.

Se espera que este tipo de vacuna que utiliza como base al patógeno que, si es huésped natural del humano, induzcan de manera segura respuestas inmunológicas más específicas y duraderas, que puedan brindar una mejor protección.

Capítulo 3.

3.1 Justificación

La TB continúa siendo un problema de salud mundial con alrededor de un cuarto de la población infectada con TBL. Actualmente la BCG es la única vacuna que puede reducir el riesgo de TB grave en niños, sin embargo, la variabilidad y falta de eficacia en otros grupos de edad y los efectos adversos que puede presentar hacen necesario el desarrollo de nuevas vacunas para cubrir estas necesidades.

3.2 Hipótesis

Los ratones inmunizados con la cepa mutada de *Mycobacterium tuberculosis* Mtb Δ ctpF, la cual presenta la delección de una ATPasas de tipo P encargada del transporte de calcio a través de la membrana plasmática, presentarán una mayor sobrevida, menor carga bacilar y menor porcentaje de neumonía, en comparación con los ratones inmunizados con la vacuna BCG Ph en un modelo de TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c machos.

3.3 Objetivo

Evaluar si la reducción de virulencia en la cepa mutante *Mtb* Δ ctpF permite un mejor control de la TB pulmonar en un modelo de ratones BALB/c comparado contra la vacuna BCG Ph posterior al reto con la cepa wild type virulenta de *Mtb* (H37Rv).

3.4 Objetivos específicos

- Comparar la sobrevivencia en un modelo de TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c entre (i) los grupos BCG Ph, (ii) *Mtb* Δ ctpF y (iii) un grupo control al que solo se le administra solución salina.
- Establecer los efectos en la progresión de la enfermedad entre los grupos vacunados a través de la determinación de carga bacilar y evaluación del nivel de daño pulmonar.

Capítulo 4. Material y Métodos

Todos los experimentos realizados en el presente trabajo se llevaron a cabo en las instalaciones de bioseguridad nivel 3 en el laboratorio de Patología Experimental (BSL-3) y en el DIEB (ABSL-3) en el INCMNSZ. El alumno recibió, la capacitación adecuada para llevar a cabo, todos los protocolos de manera correcta y segura.

4.1 Cepas

Para este trabajo se utilizaron las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (wild type), la cepa de *Mycobacterium bovis* BCG Ph y la cepa mutante de H37Rv Mtb Δ ctpF la cual fue proporcionada por el grupo de la Dra. Milena Maya Hoyos^{4,29}. Las cepas se almacenaron en criotubos de 1.5 ml a -80°C.

4.2 Animales de Experimentación

Todos los experimentos se realizaron en ratones BALB/c machos de 8 semanas de edad. Previamente, se calculó el tamaño de muestra se utilizó el método propuesto de Rojo A.,2014³⁷. Sin embargo, después de la pandemia se ajustó dicho número utilizando información de trabajos previamente publicados^{2,40}. Para este proyecto se utilizaron 30 ratones y se dividieron en tres grupos de 10 ratones cada uno.

4.3 Modelo experimental

El modelo experimental utilizado en nuestro laboratorio corresponde a un modelo de TB pulmonar progresiva el cual se caracteriza por el establecimiento de dos fases principales durante el desarrollo de la enfermedad³⁰.

Etapla temprana: corresponde al primer mes de infección y se caracteriza histológicamente por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos; durante la segunda semana se forman sistemáticamente granulomas constituidos principalmente por linfocitos T CD4 de tipo Th-1 (productores de las citocinas IFN- γ e IL- 2) y macrófagos activados (productores de TNF- α). En esta fase se considera que hay un control temporal de la infección³⁰.

Etapla avanzada o progresiva: En esta fase de la enfermedad, desde el punto de vista inmunológico, se incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th-2), los cuales se caracterizan por producir las interleucinas antagonistas de la respuesta Th-1 como la IL- 4, 10 y 13. Esta respuesta favorece la supervivencia y proliferación bacteriana provocando que la enfermedad progrese generando extensas áreas de neumonía y muerte por insuficiencia respiratoria³⁰.

4.4 BCG Ph

Las subcepas de BCG inducen diferentes niveles de protección en ensayos clínicos por lo que es importante elegir la cepa que presente una mayor protección y control de la enfermedad. Un estudio anterior realizado en el laboratorio comparó diferentes cepas de BCG en el modelo de TB pulmonar progresiva en ratones BALB/c².

Los resultados mostraron que la cepa BCG Ph fue la más eficaz como vacuna en este modelo al presentar un número menor de UFC y disminuir el porcentaje de neumonía a los 2 y 4 meses después del reto en comparación a las demás subcepas evaluadas.

4.5 Título micobacteriano

Antes de llevar a cabo la vacunación de los ratones se realizó un título bacteriano, con el objetivo de tener una adecuada concentración de bacterias con la cual realizar los experimentos de vacunación.

A partir del título bacteriano establecido para el lote se realizaron los cálculos para obtener una concentración de 8,000 UFC de micobacterias suspendidas en 50 µL de solución salina para cada cepa. Una vez determinado el título, las alícuotas requeridas del lote bacteriano se descongelaron a 37°C y se sonicaron durante 45 segundos para disgregar las micobacterias, después en tubos eppendorf se realizaron diluciones seriadas de -1 a -2 por duplicado.

Se sembraron en cajas Petri con medio selectivo para el crecimiento micobacteriano 7H10-OADC (ácido oleico, albumina, dextrosa, catalasa)³⁹, se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y el número de colonias se contó a los 14 y 21 días después del sembrado de acuerdo a lo publicado previamente⁴⁰.

4.6 Vacunación

Se vacunó a los ratones de manera subcutánea en la base de la cola con un inóculo de 50 μ L conteniendo 8,000UFC del grupo correspondiente. Como control se inyectó el mismo volumen de solución salina. Finalmente, para comprobar el título de micobacterias administradas durante la vacunación se realizó un cultivo control^{2,40}.

4.7 Reto y días de eutanasia

Se dejaron pasar dos meses para el establecimiento de la memoria inmunológica, durante todo el experimento los animales se revisaron cada tercer día para llevar el registro de la sobrevivencia.

Transcurrido este período se llevó a cabo el reto para inducir la TB pulmonar progresiva. Los ratones se anestesiaron por inhalación con sevoflurano utilizando 1 ml en una cámara de acrílico. Posteriormente se inocularon intratraquealmente con 250,000 bacterias de la cepa H37Rv suspendidas en 100 μ L de solución salina utilizando una cánula de acero inoxidable (22GX1") con punta roma (1.25mm). Para comprobar el título de bacterias administradas se realizó un cultivo control⁴⁰.

4.8 Eutanasia y obtención de muestras

Se sacrificaron cinco ratones de cada grupo (mutante, BCG y solución salina) en dos momentos distintos del experimento: a los 60 días y a los 120 días post infección. La eutanasia se realizó por exanguinación. El pulmón izquierdo se perfundió con alcohol absoluto para fijarlo y posteriormente incluirlo en bloques de parafina y, hacer cortes histológicos para realizar el análisis morfométrico.

El pulmón derecho se almacenó en criotubos de 1.5 ml; inmediatamente después de su obtención se congeló en nitrógeno líquido y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso para la determinar la carga bacilar por conteo de UFC⁴⁰.

4.9 Determinación de carga bacilar

A partir de las muestras congeladas se evaluó la carga bacilar de cada grupo para cada tiempo de eutanasia. Para cultivar las micobacterias que se encuentran dentro del pulmón se utilizó un homogenizador de tejidos (MP Biomedical, FastPrep-24). Primero se colocó una perla de sílice y zirconia en cada muestra, posteriormente se agregó 1 ml de PBS-Tween y homogenizaron durante 20 segundos. Se repitió el ciclo de homogenización 3 veces.

Posteriormente, las muestras se sonicaron a una frecuencia de 20 kHz durante 45s y se realizaron diluciones seriadas (-1 al -4) del concentrado.

Para las diluciones seriadas se utilizó una placa de 96 pozos y se colocaron 270 µL de medio líquido 7H9³⁹ en cada pozo; luego se tomaron 30 µL del homogenizado (concentrado) y se colocó en uno de los pozos con el medio 7H9, luego se tomaron 30 µL de este pozo y se pasó al siguiente pozo que contiene 270 µL del medio 7H9 y de la misma forma dos veces más.

Luego, cada dilución se sembró en una caja Petri con el medio (7H10-OADC). Cada caja de Petri se dividió primero a la mitad, para poder usarla con dos diferentes ratones, y luego en cuatro secciones, para sembrar las cuatro diluciones seriadas (concentrado, -2, -3 y -4) en un volumen final de 10 µL (Figura 5). Se incubó a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y el número de colonias se contó a los 14 y 21 días después del sembrado⁴⁰.

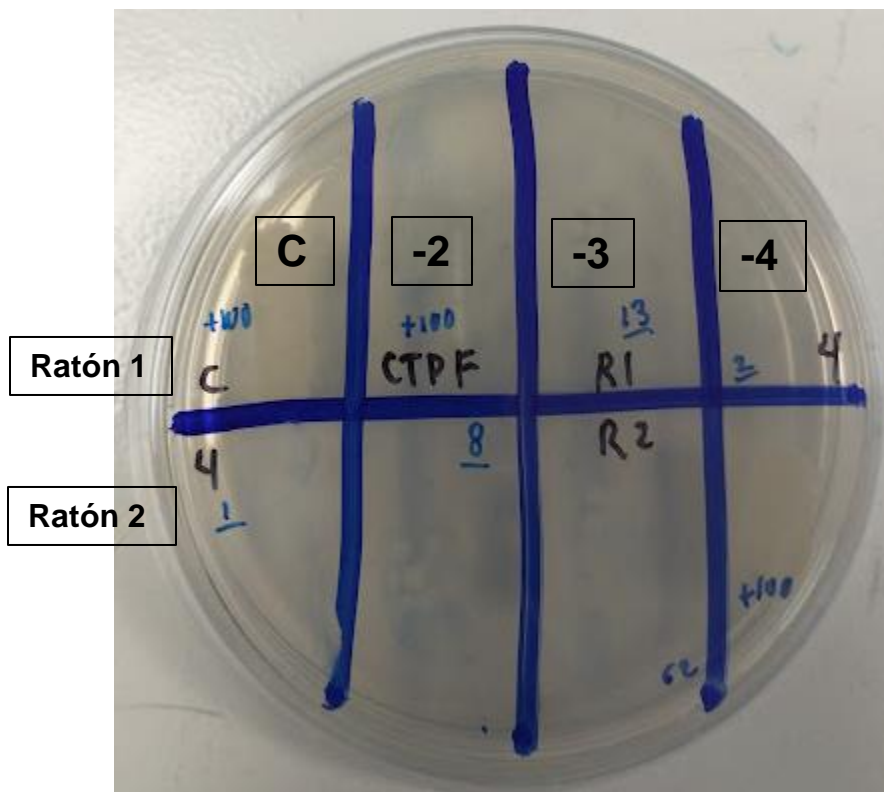


Figura 5. Caja Petri con medio 7H10-OADC. Las divisiones separan las diluciones seriadas (concentrado, -2, -3 y -4) de dos ratones del mismo grupo.

4.10 Análisis histológico

Después de la perfusión con alcohol absoluto, el tejido se dejó fijar durante 72 horas a temperatura ambiente para luego cortar sagitalmente con una navaja. Los cortes de tejido pasaron por alcohol absoluto, xilol y parafina (3 baños de 1 hora cada uno), para finalmente incluirse en bloques de parafina.

Se realizaron cortes histológicos de 4 μ M en un microtomo (Leica RM2135) y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Posteriormente se llevó a cabo un análisis morfométrico para evaluar el área pulmonar afectada por neumonía. Esta cuantificación se realizó en el analizador de imágenes (Leica LASv4.0)⁴⁰.

4.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism versión 8.0, para los análisis histológicos y UFC, en cada caso se llevó a cabo una prueba de Shapiro Wilk para determinar la normalidad de datos, dependiendo de esto se realizó un análisis de varianza tipo Anova o una prueba Kruskal-Wallis y las pruebas post hoc (Tukey y Dunn) dependiendo de las pruebas realizadas anteriormente, para la sobrevida se realizó una prueba Log Rank esta permitió comparar la supervivencia entre grupos.

Capítulo 5. Resultados

Es importante mencionar que el trabajo experimental que se reporta en esta tesis se realizó a lo largo de tres años (2019-2021) ya que hubo una interrupción debido a la pandemia de Covid-19, ocasionando un retraso en la ejecución de los protocolos porque los alumnos no podían asistir al INCMNSZ. La preparación de cultivos y diluciones se llevaron a cabo durante 2019 y el trabajo experimental con ratones se retomó en 2021.

Cuando se realizó la verificación de la cantidad de micobacterias con las que se vacunó a los ratones en el control de calidad realizado el día de la vacunación (2021), el grupo de la cepa mutante *MtbΔctpF* mostró un número menor de UFC del esperado (alrededor de 8,000UFC) (Tabla 1). En el caso de la dilución de la vacuna BCG Ph, el número de UFC fue el esperado. Para el reto con la cepa wild type se esperaba utilizar un inóculo de 250,000 UFC y la prueba de cultivo mostró un inóculo también cercano a lo esperado.

Tabla 1. Concentraciones reales de inóculo para vacunación e infección

BCG Ph	9,250 UFC
<i>MtbΔctpF</i>	1,375 UFC
Reto	222,500 UFC

Originalmente el título de bacterias de la mutante *MtbΔctpF* en 2019 estaba en el rango esperado (9,500 UFC). Sin embargo, un año después, el conteo muestra una disminución en la concentración de micobacterias (a 1,375 UFC).

Sobrevida de ratones vacunados

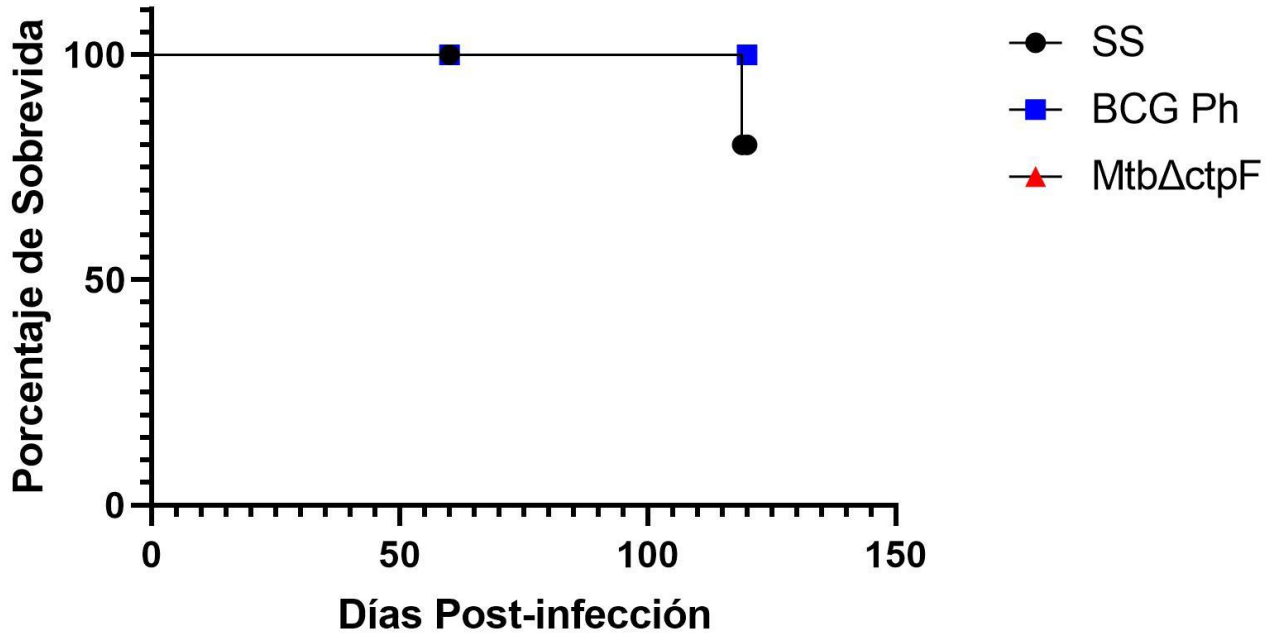


Figura 6. Sobrevida de ratones con solución salina (SS), con vacuna control BCG Ph y con vacuna atenuada *MtbΔctpF* retados con 225.000 UFC de la cepa wild type H37Rv. Como era de esperarse, los ratones vacunados con la mutante *MtbΔctpF* (vacuna atenuada) y con el control de vacuna BCG Ph, respectivamente, presentan mayor sobrevida que el grupo de solución salina. Esto es así porque el grupo que recibió solución salina no está vacunado (no recibió antígeno) y por tanto no ha tenido oportunidad de desarrollar una respuesta inmune protectora.

Comparación de UFC, a los 2 y 4 meses post reto con cepa H37Rv

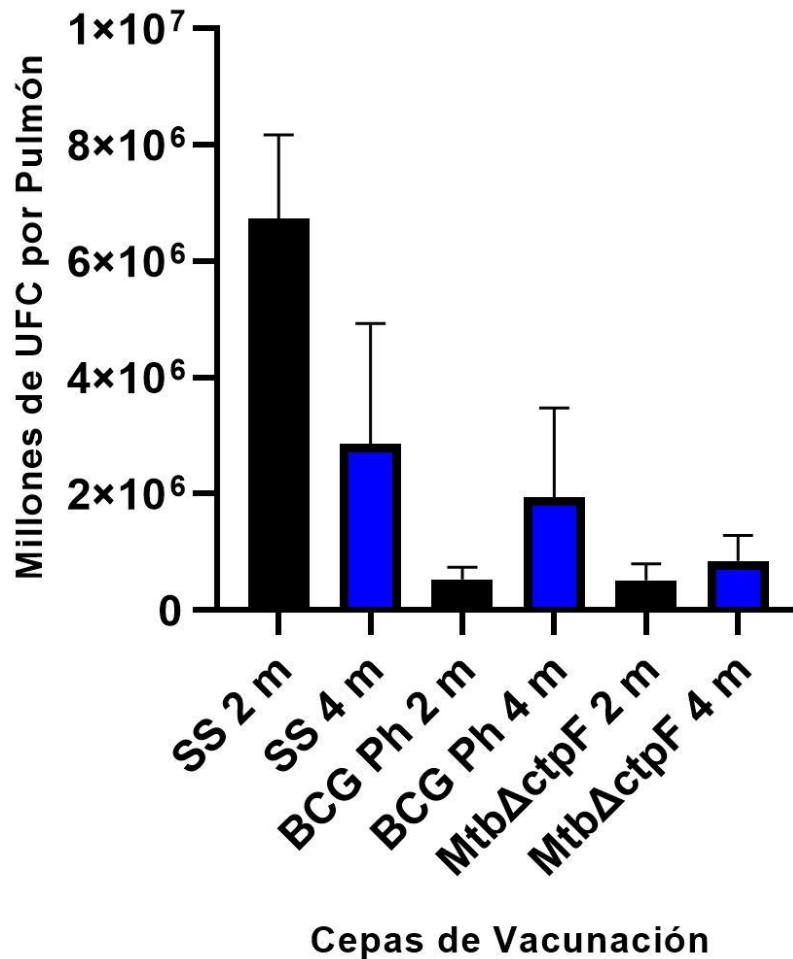


Figura 7. Comparación de las cargas bacilares en pulmón entre los grupos vacunados con SS, BCG Ph y Mtb Δ ctpF, retados con 225.000 UFC de la cepa wild type H37Rv, a los 2 (barras negras) y 4 (barras azules) meses post infección.

Con respecto a la carga bacilar en el pulmón de ratones retados con H37Rv, en el primer tiempo de eutanasia se efectuó un análisis tipo Anova para el segundo tiempo de eutanasia se realizó una prueba Kruskal-Wallis, posteriormente se llevaron a cabo las pruebas pos hoc correspondiente para cada prueba, aquellos grupos entre los cuales el valor de $P < 0.05$ se consideraron diferentes.

A los 2 meses post reto, hay diferencia entre el grupo control y los vacunados con BCG Ph (Valor de $P = < 0.0001$), y Mtb Δ ctpF (Valor de $P = < 0.0001$) respectivamente, entre los grupos de BCG Ph y Mtb Δ ctpF no hay diferencia (Valor de $P = 0.9995$). A los 4 meses post reto, no se encontró diferencia entre ninguno de los grupos, los datos obtenidos entre el grupo control y el grupo de BCG Ph (Valor de $P = > 0.999$), entre BCG Ph y Mtb Δ ctpF (Valor de $P = 0.2878$) y entre el grupo control y el grupo Mtb Δ ctpF (Valor de $P = 0.0927$).

Comparación de Porcentaje de Neumonía a los 2 y 4 meses post reto con cepa H37Rv

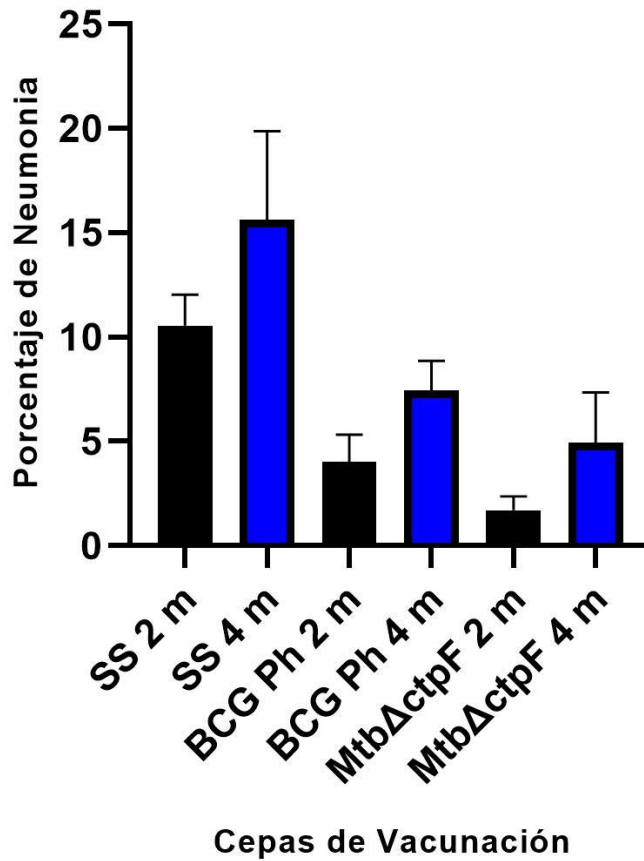


Figura 8. Comparación entre los porcentajes de superficie pulmonar afectados por neumonía entre los grupos vacunados con SS, BCG Ph y MtbΔctpF, retados con 225.000 UFC de la cepa wild type H37Rv, a los 2 (barras negras) y 4 (barras azules) meses post infección

Con respecto al porcentaje de neumonía de ratones retados con H37Rv, en ambos tiempos de eutanasia se efectuó un análisis tipo Anova y las pruebas pos hoc correspondiente, aquellos grupos entre los cuales $P < 0.05$ se consideraron diferentes. En el porcentaje de neumonía a los 2 meses post reto, hay diferencia entre el grupo control con BCG Ph y Mtb Δ ctpF (Valor de $P = < 0.0001$), entre BCG Ph y Mtb Δ ctpF no hay diferencia (Valor de $P = 0.0561$). En los datos de neumonía a los 4 meses post reto, de igual forma que en el anterior tiempo de eutanasia se presentó diferencia entre el grupo control con los grupos de BCG Ph (Valor de $P = 0.0086$) y Mtb Δ ctpF (Valor de $P = 0.0015$), entre BCG Ph y Mtb Δ ctpF no hay diferencia (Valor de $P = 0.4701$).

Tabla.2 Comparación entre los grupos de SS, BCG Ph y Mtb Δ ctpF de los valores de UFC y porcentaje de neumonía a los 2 y 4 meses, post reto con 225,000 UFC de la cepa wild type H37Rv

	2 Meses		4 Meses	
SS	6,730,000 UFC	10.55%	2,855,000 UFC	15.63%
BCG Ph	529,000 UFC	4.00%	1,944,000 UFC	7.45%
Mtb Δ ctpF	512,000 UFC	1.69%	844,000 UFC	4.92%

El grupo de SS presentó el número más alto de carga bacilar en ambos tiempos de eutanasia (6,730,000 UFC y 2,855,000 UFC), BCG Ph mostró una disminución en la cantidad de UFC, sin embargo, Mtb Δ ctpF fue la que presentó la menor carga bacilar en ambos tiempos post infección. Los porcentajes de neumonía a los 2 meses post infección indican que, el grupo de SS tienen los valores más altos, (10.55% y 15.63%), Mtb Δ ctpF presenta el menor porcentaje de neumonía (1.69%). Este panorama se repitió a los 4 meses post infección, siendo el grupo de Mtb Δ ctpF el de menor porcentaje de neumonía (4.92%).

Capítulo 6. Discusión

La TB continúa siendo un tema de preocupación para los sistemas de salud pública a nivel mundial. La búsqueda de nuevas y mejores vacunas contra esta enfermedad es un esfuerzo continuo y por ello en este trabajo se buscó comprobar si utilizando como cepa vacunal, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv con una delección del gen *ctpF*, era posible lograr un mejor control de la enfermedad en un modelo animal de TB pulmonar progresiva.

Actualmente la única vacuna aprobada contra la TB es la BCG la cual, como ya se mencionó previamente, su eficacia está influida por muchos factores tanto del (i) huésped, (ii) la micobacteria y (iii) el ambiente.

Una de las funciones principales de la vacunación es establecer una memoria inmunológica eficaz y duradera para acortar el intervalo entre la infección y el inicio de una respuesta inmunológica adaptativa en el sitio de la infección, de modo que esta pueda controlarse rápidamente y así evitar la diseminación del patógeno¹⁴. En el caso particular de este trabajo no se puede hablar de protección, debido a que no se midieron niveles de anticuerpo o células de memoria, el objetivo fue probar si la vacunación con la cepa atenuada presenta un mejor control de la enfermedad, y así sentar las bases para futuros experimentos.

Hoy en día, hay un gran número de candidatos vacunales en diferentes fases, de estas solo 3 utilizan micobacterias vivas y solo una (MTBVAC) emplea Mtb como base. Uno de los retos que puede presentar una vacuna atenuada es que el patógeno pueda mutar y revertir a su forma virulenta, específicamente para este tipo de vacunas candidatas contra la TB el consenso de Ginebra, recomienda que las vacunas vivas atenuadas tengan dos mutaciones independientes no reversibles que garanticen la estabilidad del evento de atenuación, es decir que cada una de las mutaciones de forma independiente proporcionen un fenotipo de atenuación comprobable³⁶.

Mtb Δ ctpF, utiliza como base una cepa de Mtb H37Rv, comparado con BCG que utiliza una cepa de *Mycobacterium bovis* que infecta al ganado. La cepa presenta una delección en una ATPasa de tipo P, que son proteínas de membrana que ayudan a mantener la homeostasis celular, además se expresan durante la infección por micobacterias como respuesta a la toxicidad producida por los altos niveles de metales en los macrófagos humanos, ctpF se activa en condiciones similares al entorno del fagosoma, en estudios anteriores se explica cómo se llevó a cabo la construcción de la cepa, desde los análisis para verificar que ion es el que transporta, análisis de complementación, la delección del gen y pruebas de pérdida de virulencia en un modelo animal⁴⁻²⁹.

La principal ventaja de usar Mtb viva atenuada como vacuna es que muchas regiones genéticas ausentes en BCG, todavía están presentes en la cepa atenuada. La mutación de esta cepa no busca un antígeno en particular, como otras vacunas, esta delección ayudara a que el sistema inmunológico tenga un repertorio de antígenos más amplio y semejante a la que enfrentaría en una infección real.

En los resultados mostrados se puede observar claramente que, al comparar tanto UFC como el porcentaje de neumonía respectivamente, el grupo vacunado con Mtb Δ ctpF presenta los resultados más bajos, lo que sugiere un mejor control de la TB que BCG Ph, siendo esta cepa la que actualmente presenta un mejor manejo de la enfermedad en este modelo murino. La demora en la vacunación de los ratones causó la muerte de una gran cantidad de las micobacterias en el lote que se utilizaría para vacunar, a pesar de esto, Mtb Δ ctpF presentó los mejores resultados, aun con el bajo número con el que se vacunó, esto sugiere, que además de las micobacterias vivas, el inoculó contenía una gran cantidad de micobacterias muertas, lo que representaba una gran cantidad de antígenos inmunogénicos actuando como un adyuvante lo que genero un aumento en la respuesta inmunológica resultando en un mejor control de la enfermedad.

No se observó diferencia estadística entre los grupos de BCG Ph y Mtb Δ ctpF en ninguno de los parámetros medidos (UFC y porcentaje de neumonía). Es fundamental mencionar que no existe una conexión simple entre un valor de *P* y los resultados probables de estudios posteriores, para tomar la decisión sobre si continuar con una idea de investigación³⁵, por lo tanto, presentar o no una diferencia estadística no implicaría una diferencia biológica. Todos los hallazgos deben interpretarse en el contexto del diseño del estudio, incluida la naturaleza y el tamaño de la muestra, la confiabilidad y validez de los instrumentos utilizados, además del rigor con el que se realizó el estudio³⁴.

Tomado en cuenta los resultados obtenidos, se puede decir que la cepa que presenta la delección del gen ctpF, presenta un mejor control de la enfermedad teniendo un balance entre las UFC y el porcentaje de neumonía, esto es importante ya que como se muestra en el artículo de Castillo y colaboradores², hay cepas de BCG que tienen un número menor de micobacteria en el conteo de UFC, pero el porcentaje de neumonía en los pulmones es muy alta, generando un mal control de la enfermedad, daño pulmonar y probablemente una insuficiencia respiratoria, para el caso particular de la TB tiene que existir un balance, entre la cantidad de micobacterias y la neumonía presente en los pulmones, es importante que se genere una respuesta inmunológica celular rápida e intensa, lo suficientemente fuerte para eliminar al patógeno pero sin provocar daño extenso en el tejido pulmonar, este desbalance se observa en el grupo SS, donde a los 4 meses post reto se presentó una disminución en el número de UFC, en comparación a los números registrados a los 2 meses post reto, sin embargo el porcentaje de neumonía es el más alto entre todos los grupos.

Para lograr un control eficaz contra la TB se requerirá mejoras en el diagnóstico, tratamientos más cortos y un repertorio de vacunas más eficaces, en el presente trabajo se mostró que Mtb Δ ctpF induce una mejor respuesta inmunológica dando como resultado una menor carga bacilar y un menor porcentaje de neumonía, lo

que llevo a un mejor manejo de la enfermedad, además se sientan las bases para realizar futuras investigaciones como, probar $Mtb\Delta ctpF$ contra cepas de Mtb con mayor virulencia, medir otros parámetros como citocinas, células de memoria y anticuerpos, además, de buscar una mutación con la que se pueda unir $Mtb\Delta ctpF$, para que pueda utilizarse como cepa candidata a vacuna contra la TB.

Capítulo 7. Conclusiones

-Se confirma que la delección del gen *ctpF* en la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, disminuye su virulencia en comparación a la cepa wild type.

-La cepa *MtbΔctpF* mostro un mejor control de TB en un modelo pulmonar progresivo en ratones BALB/c, con un menor número de UFC y un menor porcentaje de neumonía, a pesar del menor título bacteriano con el que se vacunó.

-La delección del gen *ctpF* en la cepa H37Rv, puede considerarse como una de las dos mutaciones necesarias, para elaborar una vacuna atenuada contra la TB.

Perspectivas: Los resultados obtenidos en este trabajo ayudaran como base para futuros experimentos como, estudios con mayor número de ratones, evaluar diferentes concentraciones del título bacteriano para vacunar, además de realizar el reto con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con mayor virulencia.

Capítulo 8. Referencias

1. Nunes-Alves, C., Booty, M., Carpenter, S., Jayaraman, P., Rothchild, A. y Behar, S. (2014). In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature Reviews, Microbiology*, Vol. 12, 289–299. DOI: 10.1038/nrmicro3230.
2. Castillo-Rodal, A., Castañon-Arreola, M., Hernández-Pando, R. et al. (2006). *Mycobacterium bovis* BCG Substrains Confer Different Levels of Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in a BALB/c Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. *Infection and Immunity*. Vol. 74, 1718-1724. DOI: 10.1128/IAI.74.3.1718–1724.2006
3. Yatime, L. et al. (2009). P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *Biochim Biophys Acta* , pp. 207–220. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.12.019.
4. Maya-Hoyos, M. et al. (2019). The P-type ATPase CtpF is a plasma membrane transporter mediating calcium efflux in *Mycobacterium tuberculosis* cells. *Heliyon*. DOI: 10.1016/j.heliyon. 2019.e02852.
5. Kamath, A. T. et al. (2005) New live mycobacterial vaccines: The Geneva consensus on essential steps towards clinical development. *Vaccine* 23,3753–3761. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.03.001
6. Lowe NK. (2019) What Is a Pilot Study?. *Journal of Obstetric Gynecologic, Neonatal Nursing*.48, 117–118. DOI: 10.1016/j.jogn.2019.01.005
7. World Health Organization (2020). *Global Tuberculosis Report*.
8. Gagneux S. (2012). Host–pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical Transactions of Royal Society*. DOI:10.1098/rstb.2011.0316

9. Barrios-Payán, J., Castañón-Arreola, M., Flores-Valdez M. y Hernández-Pando, R. (2010). Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente. *Salud Publica Mex.* 52, 70-78. DOI: 10.1590/s0036-36342010000500002
10. Cao, XJ, et al. (2021). MPT64 assays for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Infectious Diseases*, doi: 10.1186/s12879-021-06022-w.
11. Forrellad, MA, et al. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, DOI: 10.4161/viru.22329.
12. Maitra, A., et al. (2019). Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiology Reviews*, Oxford. DOI: 10.1093/femsre/fuz016
13. Jackson, M. (2014) The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harbor Perspectives. Medicine*. DOI: 10.1101/cshperspect.a021105.
14. Andersen, P., Scriba, T. J. (2019) Moving tuberculosis vaccines from theory to practice. *Nature, Reviews Immunology*. 550-562 DOI: 10.1038/s41577-019-0174-z.
15. Nieuwenhuizen, N. E. y Kaufmann, S. H. E. (2018) Next- generation vaccines based on bacille Calmette–Guérin. *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2018.00121.
16. Chávez-Galán, L., Arenas-Del Ángel, M. C., Sada-Ovalle, I. y Lascurainb, R. (2009). Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *Mycobacterium tuberculosis*. *Gac Méd Méx* Vol. 145 No. 4, 323-330.
17. Castro, R. A., Borrell, S. y Gagneux, S. (2020) The within-host evolution of antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*, DOI: 10.1093/femsre/fuaa071.
18. Bañuls, A., Sanou, A., Van Anh, N. y Godreuil, S. (2015) *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of Medical Microbiology* 1261–1269. DOI: 10.1099/jmm.0.000171.

19. Pavón-Romero, L., Jiménez-Martínez, M. y Garcés-Álvarez, M. (2016) Inmunología molecular, celular y traslacional. Wolters Kluwer, España, Barcelona. Pp. 681
20. Owen J., Punt J., Stranford S y Jones P. (2014) Kuby: Inmunología. McGRAW-HILL (7) México D.F. Pp. 578-582
21. Li, J., Zhan, L. y Qin, C. (2021). The double-sided effects of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin vaccine. NPJ Vaccines. DOI: 10.1038/s41541-020-00278-0.
22. Lange, C., et al. (2021). 100 years of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guérin. Lancet Infect Dis. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00403-5..
23. Dockrell, H. M. y Smith S. G. (2017) What have we learnt about BCG vaccination in the 20 years?. Frontiers in Immunology. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01134
24. Garg, R. et al. (2020). *Mycobacterium tuberculosis* Calcium Pump CtpF Modulates the Autophagosome in an mTOR-Dependent Manner. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00461.
25. Bublitz, M. et al. (2010) In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited. Current Opinion in Structural Biology. 431–439. DOI: 10.1016/j.sbi.2010.06.007.
26. Bacon, J., et al (2004) The influence of reduced oxygen availability on pathogenicity and gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis, 205-217. DOI: 10.1016/j.tube.2003.12.011
27. Soldati, T. y Neyrolles, O. (2012). Mycobacteria and the Intraphagosomal Environment: Take It with a Pinch of Salt(s)!', Traffic, 1042–1052. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2012.01358.x.

28. Pulido, P. a. et al. (2014). The DosR dormancy regulator of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates the Na⁺/K⁺ and Ca²⁺ ATPase activities in plasma membrane vesicles of mycobacteria. *Current Microbiology*, 604–610. DOI: 10.1007/s00284-014-0632-6.
29. Maya-Hoyos, M. (2021) ATPasas tipo P2 como blancos para la atenuación de *Mycobacterium tuberculosis*. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química. Tesis de Doctorado en Ciencias-Bioquímicas.
30. Hernández-Pando, R., Orozco E, Aguilar, L. D., López-Casillas, F. y Graham, R. (2004). Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. *Mensaje bioquímico*, Vol. 28, 129-152. Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, UNAM.
31. Hernández-Pando, R., Marquina-Castillo, B., Barrios-Payán, J. y Mata-Espinosa, D. (2012). Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol.* 12(4) 725-31. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.02.013.
32. Kaufmann, S. (2011). Tuberculosis vaccines a new kid on the block. *Nat Med* 17, 159–160 (2011). DOI: 10.1038/nm0211-159
33. Ehrt, S., y Schnappinger, D. (2009). Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol* 1170–1178. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01335.x
34. Chittaranjan, A. (2019). The P Value and Statistical Significance: Misunderstandings, Explanations, Challenges, and Alternatives. *Indian J Psychol Med.* 210-215. DOI: 10.4103/IJPSYM.IJPSYM_193_19.

35. Amrhein, V., Greenland, S. y McShane, B. (2019) Scientists rise up against statistical significance. *Nature* 567, 305-307. DOI: 10.1038/d41586-019-00857-9
36. Walker, K. B., et al. (2010). The second Geneva Consensus: Recommendations for novel live TB vaccines. *Vaccine*, 28, 259-2270. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.12.083
37. Rojo Amigo A. (2014) Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. Valoración de las incidencias. *Sociedad española de las ciencias del animal de laboratorio*. 62: 31-33.
38. Ahmed A., et al. (2021) A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. *Immunological Reviews*, Wiley. DOI: 10.1111/imr.12968.
39. Mendoza Trujillo, I (2019) Efecto de los compuestos rojo y azul (Benzoquinonas) en la actividad citotóxica y bactericida de las células MH-S infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Tesis de licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga.
40. Moreno Mendieta, S. et al. (2019) Raw starch microparticles as BCG adjuvant: Their efficacy depends on the virulence of the infection strains. *Vaccine*. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.04.027
41. Hernández-Pando, R., Mata, D., Aguilar, D. y Orozco, H. (2011). Factores inmunológicos que participan en la progresión de la tuberculosis pulmonar. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXV, 2011, pp. 1-16. Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, UNAM.

42. Cho T, Khatchadourian C, et al. (2021) A review of the BCG vaccine and other approaches toward tuberculosis eradication. *Hum Vaccin Immunother.* doi: 10.1080/21645515.2021.1885280.