



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de los cambios genéticos en un miembro  
de la familia PE\_PGRS (Rv1818c) de  
*Mycobacterium tuberculosis* sobre la  
respuesta inmune humoral

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO

P R E S E N T A  
LUIS FERNANDO FLORES PAÑOLA

Tutora: Dra. Clara Inés Espitia Pinzón



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

División de Estudios Profesionales

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:  
"Efecto de los cambios genéticos en un miembro de la familia PE PGRS (Rv1818c)  
de Mycobacterium tuberculosis sobre la respuesta inmune humoral".

realizado por Luis Fernando Flores Pañola

con número de cuenta 400074032 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en  
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a) Propietario	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón	
Propietario	Dra. Luz María López Marín	
Propietario	Dr. Enrique Ortega Soto	
Suplente	Biól. María Jazmín Aguilar Medina	
Suplente	Biól. Antonio Cruz Peralta	

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, D.F., a 30 de Junio  
**CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA**

del 2006.



M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Flores  
Pañola  
Luis Fernando  
55 13 28 22  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
400074032

2. Datos del tutor

Dra  
Clara Inés  
Espitia  
Pinzón

3. Datos del sinodal 1

Dra  
Luz María  
López  
Marín

4. Datos del sinodal 2

Dr  
Enrique  
Ortega  
Soto

5. Datos del sinodal 3

Biól  
María Jazmín  
Aguilar  
Medina

6. Datos del sinodal 4

Biól  
Antonio  
Cruz  
Peralta

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de los cambios genéticos en un miembro de la familia PE\_PGRS (Rv1818c) de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la respuesta inmune humoral  
87 p  
2006

# **A G R A D E C I M I E N T O S**

## **A la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón**

Por darme la oportunidad de residir en su laboratorio así como por su apreciable ayuda en la realización de este trabajo.

## **Al Dr. Arturo Angeles Angeles**

Porque sin su ayuda, simple y llanamente, no hubiera logrado todo lo que hasta ahora, no sólo en mi vida académica; también en la personal.

## **A Ingrid Beatriz Cohen Falquez**

Porque siempre estuvo conmigo durante la realización de este trabajo. Por saber ser buena compañera, amiga y maestra. ¡Qué vaina!

## **Al resto de mis compañeros de laboratorio**

Antonio, Cristina, Wendy, Pedro, Martha, Elizabeth, Edén, Ana Laura, Margarita y Anaíd, por sus consejos oportunos y por crear un buen ambiente de trabajo y de superación profesional.

## **A José Ávila**

Por mostrarme el concepto de amabilidad bajo cualquier circunstancia con todas las personas y el mundo. Mi vida cambió debido a ello.

# DEDICATORIA

## **Al Dr. Arturo Angeles Angeles**

Por enseñarme a ser, por darme la oportunidad de tratar de ser alguien en la vida, por todos sus consejos, por abrirme las puertas de su casa, por la confianza otorgada y por darme todas las facilidades posibles para hacer de mi vida algo disfrutable.

## **A mi padre**

Me abriste las puertas al mundo y mira, hasta dónde me han llevado. Lejos de casa pero siempre cerca en mi mente. Te quiero mucho papá.

## **A mi madre**

No he conocido mujer más valiente, entregada, decidida, cariñosa, comprensiva y sobre todo, fuerte ante los problemas y la vida como tú. Te quiero mucho mamá.

## **A mis hermanos**

Carlos Antonio (mi Tony), Francisco Javier (mi Paco), Gloria Isabel (Mi Yayarmix) y Mario Alfredo (mi enano). ¡Nomás por ser mis hermanitos!

## **A Ingrid**

Sin ti, esto no hubiera sido posible.

## **A mi primo Hugo**

Siempre te recuerdo primo, a pesar de las distancias.

## **Al resto de mis amigos**

La Chío Peligrosa (Alias Rocío Hernández), El Bunny (Alias Raymundo Soler), El Poncho (Alias Alfonso Lozano), El Roscar (Alias Oscar García), El Kametustra (Alias Víctor Kameyama), La Rana (Alias René Beamonte), a Iván, Tulio, Jamie, Luis Ramírez Trejo... y a todos los demás.

## **A todos los animales, plantas, hongos, protistas y bacterias del mundo.**

# Í N D I C E

<b>1. CAPÍTULO 1</b>	
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 HISTORIA DE LA ENFERMEDAD: TUBERCULOSIS.....	1
1.2 LA TUBERCULOSIS EN EL MUNDO.....	2
1.3 LA TUBERCULOSIS EN MÉXICO.....	5
1.4 EL AGENTE CAUSAL: <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .....	8
1.5 TUBERCULOSIS: ASPECTOS PARTICULARES DE LA ENFERMEDAD.....	9
1.6 BCG: LA ÚNICA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD.....	12
1.7 PATOGENIA Y RESPUESTA INMUNE CONTRA EL BACILO TUBERCULOSO.....	12
1.8 RESPUESTA INMUNE HUMORAL.....	14
<b>2. CAPÍTULO 2</b>	
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>16</b>
2.1 LA FAMILIA PE .....	16
2.2 GENERALIDADES E IMPORTANCIA DE LA SUBFAMILIA PE_PGRS	
LA PROTEÍNA RV1818 <sup>C<sup>PE_PGRS</sup></sup> DE LA SUBFAMILIA PE_PGRS.....	18
2.3 VARIACIÓN ANTIGÉNICA	
GENERALIDADES.....	20

LA RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.....	21
2.4 MT1866 <sup>PE_PGRS</sup> Y RV1818C <sup>PE_PGRS</sup> : SEMEJANZAS Y DIFERENCIAS.....	24
<b>3. CAPÍTULO 3</b>	
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>4. CAPÍTULO 4</b>	
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>5. CAPÍTULO 5</b>	
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	28
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
<b>6. CAPÍTULO 6</b>	
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>29</b>
<b>7. CAPÍTULO 7</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>8. CAPÍTULO 8</b>	
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
a. AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN MT1866.....	36
b. CLONACIÓN DE MT1866 EN PET-15B.....	37
c. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MT1866 <sup>PE_PGRS</sup> Y RV1818C <sup>PE_PGRS</sup> ....	38
d. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MT1866 <sup>PE_PGRS</sup> Y RV1818C <sup>PE_PGRS</sup> ..	39
e. INMUNO-BLOT Y <i>ELISA</i> .....	40

<b>9. CAPÍTULO 9</b>	
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>10. CAPÍTULO 10</b>	
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>11. CAPÍTULO 11</b>	
<b>ANEXOS .....</b>	<b>53</b>
<b>12. CAPÍTULO 12</b>	
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>71</b>
<b>13. CAPÍTULO 13</b>	
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>79</b>

# R E S U M E N

Las proteínas de la familia PE fueron descubiertas recientemente en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y suman 99 miembros. Los primeros 110 aminoácidos de su extremo amino-terminal presentan alta homología entre sí y la región carboxilo-terminal es rica en alanina y glicina. Las evidencias que se tienen hasta la fecha sugieren que los genes PE/PE\_PGRS están restringidos a miembros del complejo *M. tuberculosis* y a otras pocas especies micobacterianas.

La genómica comparativa entre las cepas H37Rv y CDC1551 de *M. tuberculosis* mostró que la mayor variabilidad entre los genomas se da a nivel de las proteínas PE\_PGRS y que son los eventos de inserción-delección en la región C-terminal, los que al parecer contribuyen a la generación de tal variación. Las diferencias existentes entre las proteínas PE\_PGRS intra e intercepas ha llevado a postular que éstas podrían ser una fuente de variación antigénica en *M. tuberculosis*. Un ejemplo de los cambios presentes en las proteínas PE\_PGRS lo ilustran las secuencias PE\_PGRS Rv1818c de la cepa H37Rv y la MT1866, de la cepa CDC1551. La proteína MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> tiene una delección de 30 aminoácidos (aa) y una inserción de 3 aa en la región PGRS, en comparación con su ortóloga la Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup>.

El objetivo de este trabajo es establecer si las diferencias existentes entre las proteínas Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> se traducen en un reconocimiento diferencial por parte de los anticuerpos generados por pacientes enfermos con tuberculosis.

En este trabajo, los genes *rv1818c*<sup>PE\_PGRS</sup> y *mt1866*<sup>PE\_PGRS</sup> fueron amplificados por PCR y clonados en el vector de expresión procarionte pET-15b. Las proteínas recombinantes Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> fueron purificadas por Cromatografía de afinidad a níquel, cuantificadas y transferidas a membranas de PVDF e incubadas por Western-blot con sueros provenientes de 2 grupos de individuos: sanos PPD positivos

y PPD negativos, y enfermos de tuberculosis pulmonar y extra-pulmonar. Estos resultados fueron corroborados por ELISA.

Los resultados muestran que los cambios presentados en la proteína MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> de *M. tuberculosis* CDC1551 afectan el reconocimiento de la misma por los anticuerpos humanos provenientes tanto de individuos sanos como de enfermos con tuberculosis y que la disminución en el reconocimiento de la proteína MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> de *M. tuberculosis* CDC1551 por parte de los anticuerpos humanos cuando se compara con la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> de *M. tuberculosis* H37Rv, sugiere que los cambios presentados afectan su antigenicidad. Por lo tanto, basados en los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede proponer que las variaciones (inserciones/delecciones) que se presentan en las secuencias de los genes PE\_PGRS en las diferentes cepas de *M. tuberculosis* son recursos potenciales de variación antigénica.

# I N T R O D U C C I Ó N

## Historia de la enfermedad: tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad que ha representado desde hace mucho tiempo un serio problema de salud para la humanidad. Existe evidencia de la enfermedad en momias encontradas en Egipto y en Sudamérica, a las cuales se les calcula una edad aproximada de 5000 a 7000 años. Estas momias presentaban algunos indicios típicos de la enfermedad de Pott, que es una manifestación de la tuberculosis, que afecta principalmente la columna vertebral. En el antiguo Egipto, ubicado temporalmente entre los años 3700 a 1000 a.C., la tuberculosis fue uno de los padecimientos más comunes en la población en general<sup>1-4</sup>.

No fue sino hasta el siglo XVII cuando en Europa, particularmente en Holanda, se iniciaron los primeros trabajos descriptivos de la tuberculosis. Franciscus de la Boe, en 1679, se dio a la tarea de describir e identificar en los pulmones, las lesiones producto de la enfermedad denominándolas *tubérculos* debido a que se asemejaban por su forma a tubérculos comestibles que habitualmente eran parte de la dieta alimenticia europea. Cuarenta y tres años más tarde, en 1722, el londinense Benjamín Marten dio a conocer sus teorías que afirmaban que la enfermedad conocida como tuberculosis era causada por *animalillos* microscópicos<sup>5</sup>.

A pesar de estos avances, el conocimiento de la enfermedad era poco y las poblaciones, como por ejemplo las europeas, se enfermaban y morían por tuberculosis, entre otras enfermedades.

Años más tarde, el 24 de marzo de 1882, Robert Koch, conocido bacteriólogo de la época de origen alemán, expuso frente a la *Sociedad Berlinesa de Fisiología* sus detallados trabajos de identificación del agente causal de la tuberculosis en lesiones granulomatosas mediante una tinción específica. Koch aseveró que el responsable de la tuberculosis era una bacteria de forma bacilar a la que le dio el nombre de *Mycobacterium tuberculosis*<sup>5</sup>. De manera coloquial, se le conoce como *el bacilo de Koch*.

Es ampliamente conocido en nuestra época, que en Europa y en Estados Unidos, la tuberculosis pulmonar fue la principal causa de muerte en la población en los siglos XVIII y XIX, asociada, entre otras muchas razones, a condiciones de extrema pobreza como la desnutrición y el hacinamiento, todo ello ocurrió principalmente durante la Revolución Industrial. La tuberculosis se expandió desde algunos países europeos hacia otros ubicados en el mismo continente e incluso hasta América<sup>5</sup>.

### **La tuberculosis en el mundo**

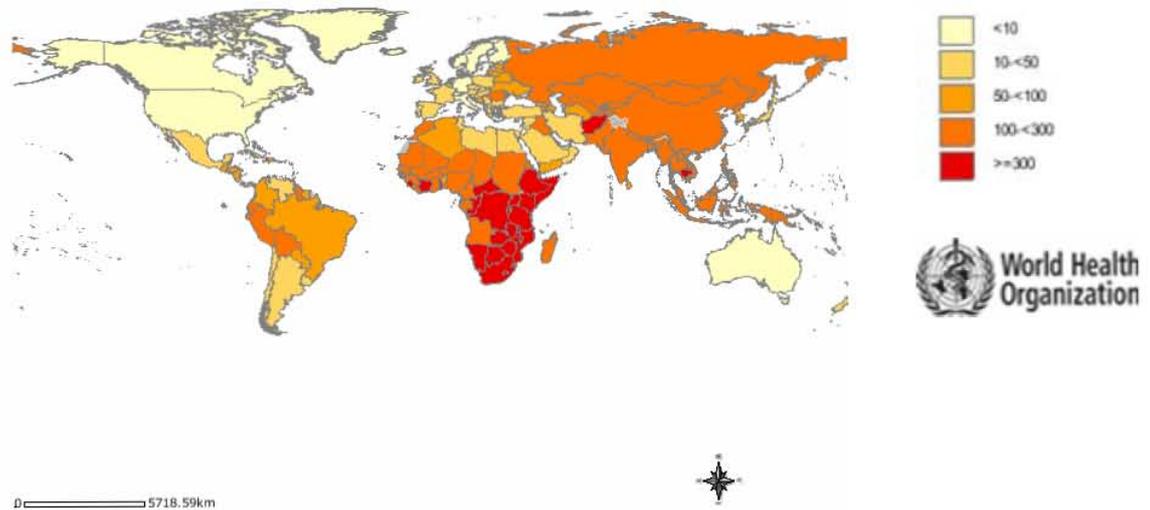
Sin lugar a dudas, la tuberculosis representa un grave problema de salud para la humanidad desde la antigüedad y aún prevalece en la época actual<sup>6</sup>. Los reportes emitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que del año 2000 al 2020 aproximadamente, 1000 millones de personas estarán infectadas con el bacilo tuberculoso, de los cuales entre 150 y 200 millones se enfermarán y entre 35 y 40 millones morirán<sup>7</sup>. En años recientes, la OMS estimó que aproximadamente 8 millones de nuevos casos de tuberculosis ocurren cada año y 3 millones de personas mueren anualmente.

Las elevadas cifras mencionadas anteriormente se deben principalmente al poco o carente control y tratamiento que se tiene de la enfermedad, sobretodo en países tercermundistas o en vías de desarrollo que pertenecen a África, Asia y América Latina, entre estos últimos, nuestro país México<sup>8</sup>. Es por ello que desde 1993, la OMS declaró a la tuberculosis como una enfermedad de emergencia global<sup>9</sup>.

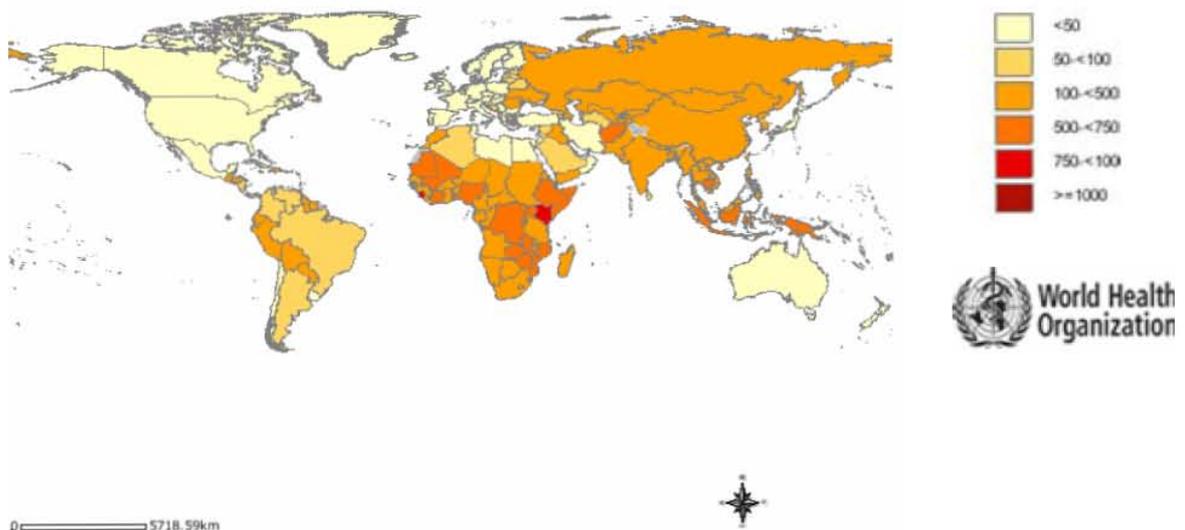
Se estima que actualmente una tercera parte de la población mundial está infectada con el bacilo tuberculoso, 5 a 10% de ésta llega a desarrollar la enfermedad en alguna etapa de su vida<sup>10</sup>.

En gran parte, el repunte de esta enfermedad en la época actual (Fig. 1), se ha debido a la alta incidencia de personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>11</sup>, sin menospreciar las condiciones de pobreza, desnutrición, falta de control y detección oportuna del padecimiento

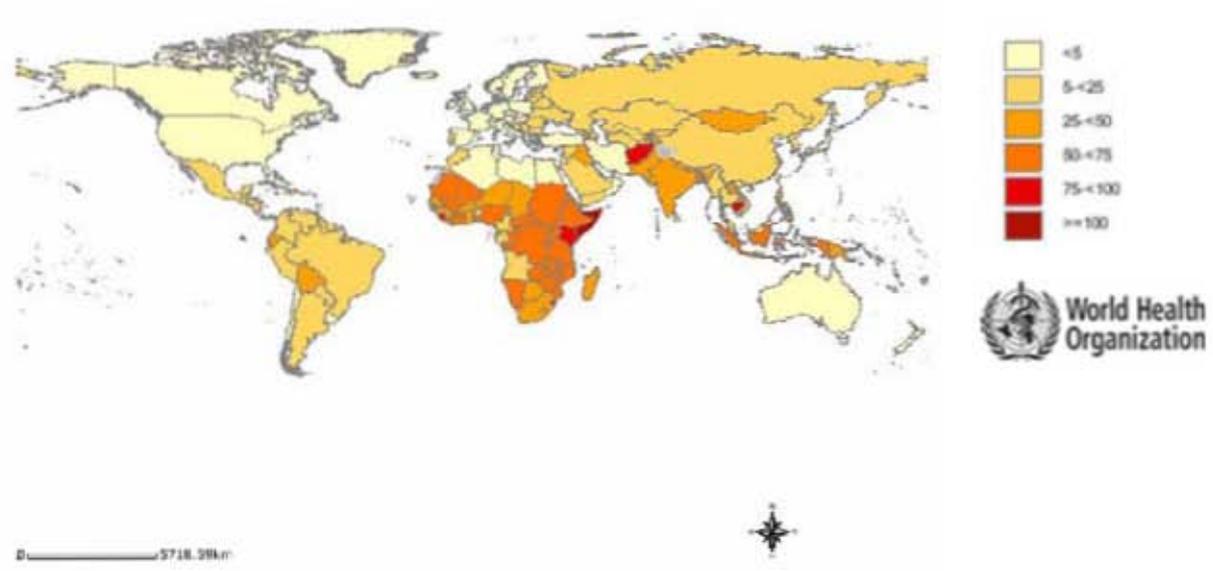
tuberculosis<sup>12-16</sup>. Dada la precaria situación anterior, las tasas de prevalencia (Fig. 2) y mortalidad (Fig. 3) se han mantenido muy elevadas en todo el mundo donde destacan principalmente países del continente africano.



**Figura 1.** Incidencia de tuberculosis estimada a nivel mundial en 2003. Casos presentados por cada 100,000 habitantes por año. Tomado de WHO Stop TB Department. [www.who.int/gtb](http://www.who.int/gtb)



**Figura 2.** Prevalencia de tuberculosis estimada mundialmente en 2003. Casos presentados por cada 100,000 habitantes por año. Tomado de WHO Stop TB Department. [www.who.int/gtb](http://www.who.int/gtb)



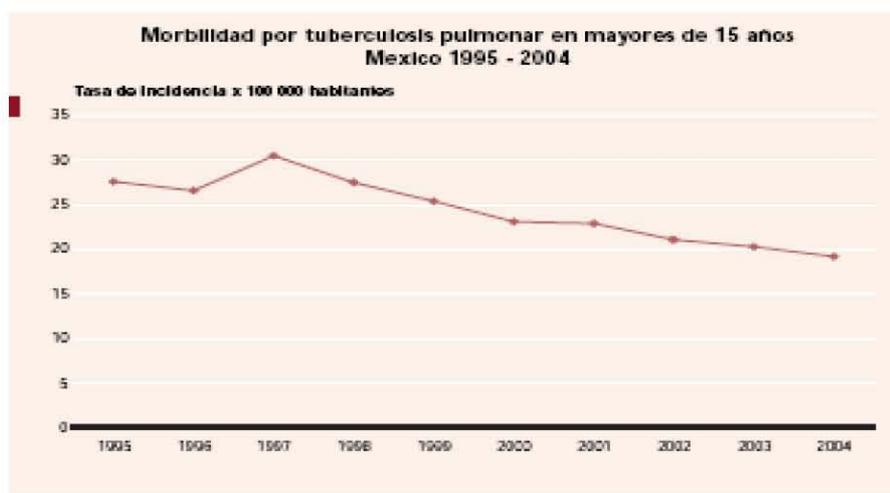
**Figura 3.** Mortalidad debido a tuberculosis estimada mundialmente en 2003. Casos presentados por cada 100,000 habitantes por año. Tomado de WHO Stop TB Department. [www.who.int/gtb](http://www.who.int/gtb)

**Nota:** Para mayor detalle de los mapas anteriores consultar el **A N E X O II**

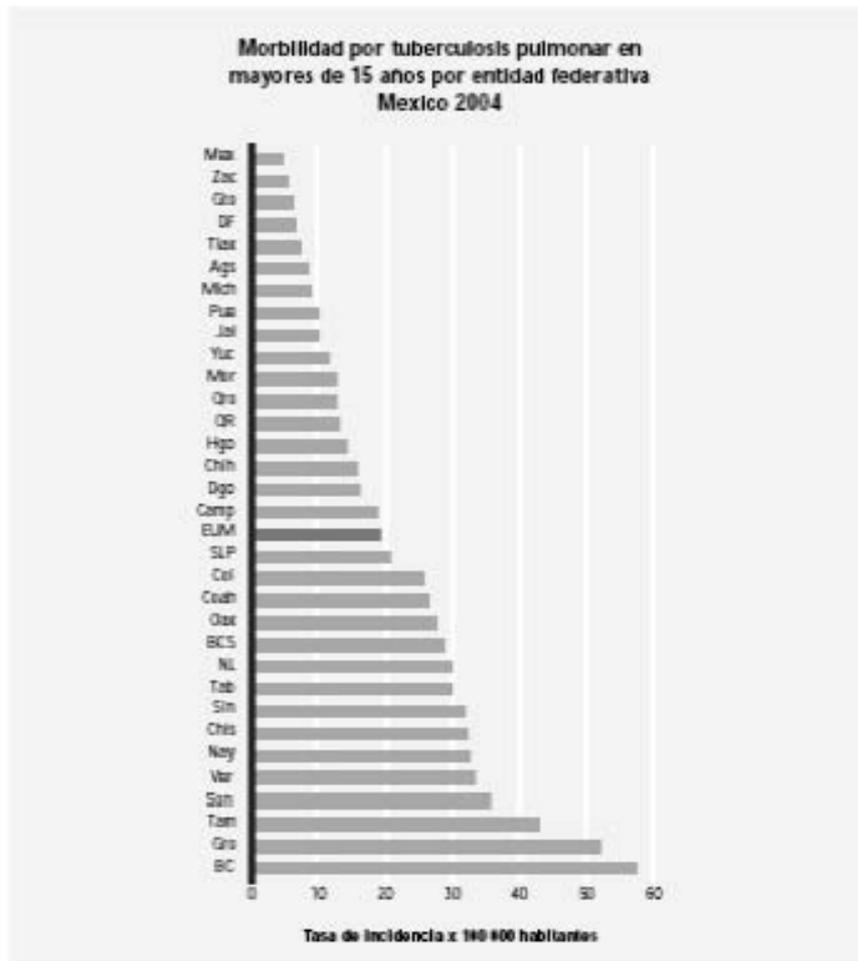
## La tuberculosis en México

Según la Secretaría de Salud, en su reporte de 1993, la tuberculosis ocupó el 10° lugar de las causas de muerte en la población mexicana. Un año antes se dio a conocer la tasa de mortalidad a nivel nacional cuya estimación fue de 6 por cada 100,000 habitantes<sup>17</sup>. Para 1996, se sabía que el 81.7% de los casos nuevos de ese año se debieron a tuberculosis pulmonar mientras que el 18.3% restante a tuberculosis extrapulmonar<sup>18</sup>.

Fue durante el año de 1997 cuando la OMS declaró a México como uno de los 13 países, con alto riesgo para que su población se enfermase por tuberculosis. En ese año se registró también la mayor incidencia de la enfermedad entre la población mexicana (Fig. 4). En el año 2001, la Secretaría de Salud estimó la incidencia de esta enfermedad en 17 casos por cada 100,000 habitantes,<sup>19,20</sup> la mayoría de éstos residieron en la población joven y adulta en edad productiva. En menores de 15 años, la tasa es de 23 casos por cada 100,000 habitantes<sup>21</sup> (Fig. 4). La tasa de 17 casos por cada 100,000 habitantes parece mantenerse estable. Sin embargo, según estimaciones, ésta pudiera ser más alta, considerando que existe un subregistro en el reporte de los casos<sup>19</sup>. Los estados de la República Mexicana con la mayor incidencia de tuberculosis en mayores de 15 años son Sonora, Tamaulipas, Guerrero, y Baja California<sup>22</sup> (Fig. 5).



**Figura 4.** Incidencia de tuberculosis en México. Tasas de morbilidad por tuberculosis pulmonar durante 1995-2004. Tomado de Salud: México 2004.



**Figura 5.** Incidencia de tuberculosis en México. Tasas de morbilidad por tuberculosis pulmonar en mayores de 15 años, por estado. Tomado de Salud: México 2004.

Debido a las altas tasas de prevalencia y morbilidad que se presentan en nuestro país, el control y prevención de la tuberculosis es uno de los aspectos prioritarios, que ha llevado a la implementación de un *Programa de Control y Prevención de la Tuberculosis en México* con resultados satisfactorios en algunos estados de la República Mexicana, donde destacan Nayarit, Aguascalientes, Colima, y el Distrito Federal (Fig. 6).



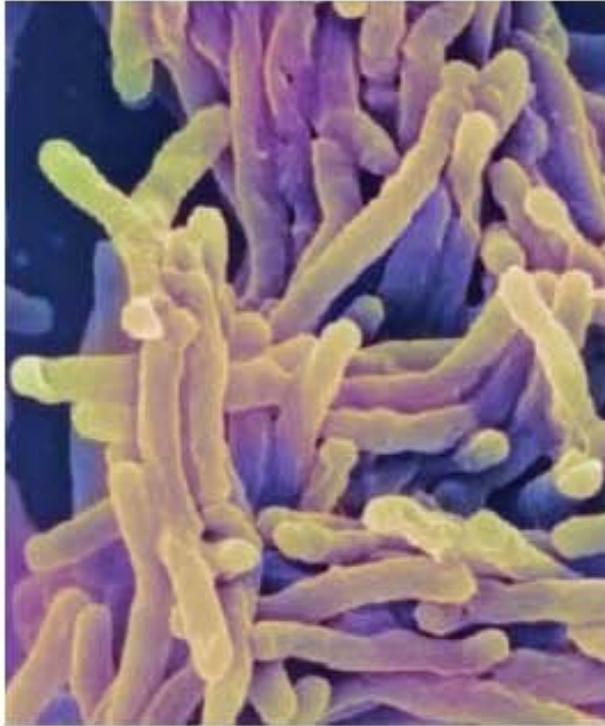
**Figura 6.** Desempeño por estado del Programa de Control y Prevención de tuberculosis en México. Tomado de Salud: México 2004.

## **El agente causal: *Mycobacterium tuberculosis***

La tuberculosis es causada por una bacteria denominada *Mycobacterium tuberculosis*. Ésta pertenece al complejo homónimo, *M. tuberculosis*, en donde también se encuentran: *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG* y *Mycobacterium canettii*<sup>1</sup>. *M. tuberculosis* pertenece al género *Mycobacterium* el cual se ubica en la familia *Mycobacteriaceae* que pertenece al orden *Actinomycetales* de la clase *Actinobacteridae*<sup>5</sup>.

Visto al microscopio, *M. tuberculosis* es un microorganismo de forma bacilar larga y recta de aproximadamente  $0.4 \times 3 \mu\text{m}$  (Fig. 7). Es una bacteria aerobia estricta, no esporulada ni encapsulada, es inmóvil y tiene un periodo de replicación lento que oscila entre las 18 y 20 horas. Dada esta característica, se requiere de 2 a 6 semanas para apreciarse en medios de cultivo convencionales.

*M. tuberculosis* posee más características que la hacen identificable: en su pared celular tiene una capa de lípidos que representan aproximadamente 40% de su peso. Entre estos lípidos cabe destacar a los ácidos grasos de cadena larga como por ejemplo los ácidos micólicos. Otros componentes de la pared celular de esta bacteria son los lipoarabinomananos, arabinogalactanos, el fenoltiocerol y el ácido micoserosico<sup>5</sup>. Dadas estas particularidades en su pared, aún cuando son tratados con alcoholes y ácidos son capaces de retener un colorante de fucsina fenificada por lo que a las bacterias con estas características se les denomina comúnmente bacterias ácido-alcohol-resistentes<sup>23</sup>.



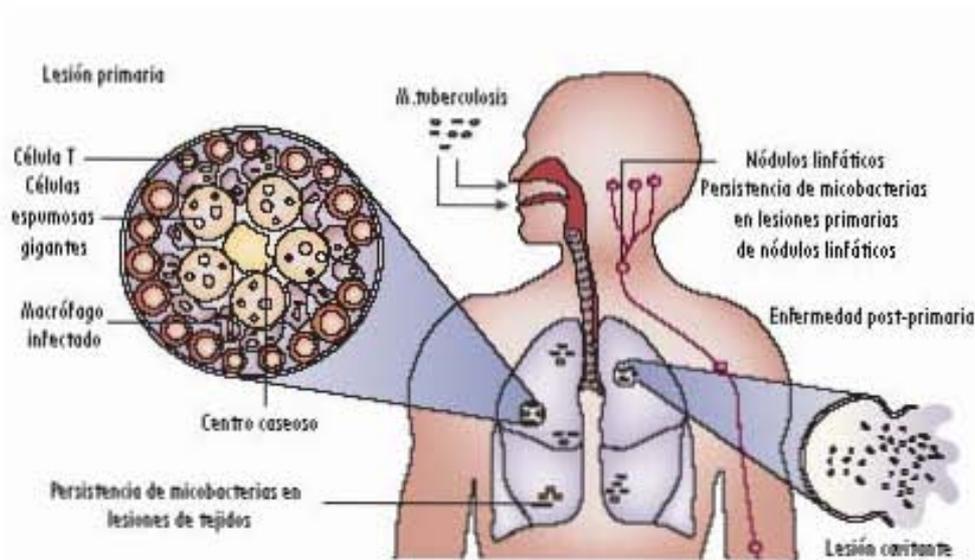
**Figura 7.** El agente causal de la tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*. Tomado de Jabado, N., and Gros P. 2005. Tuberculosis: the genetics of vulnerability. *Nature Views and Reviews* (434): 709-711.

### **Tuberculosis: aspectos particulares de la enfermedad**

De manera general, se considera a la tuberculosis como una enfermedad crónico-infecciosa<sup>24,25</sup>. La principal vía de infección por *M. tuberculosis* es la aérea. Esta infección sucede cuando una persona enferma tose o estornuda en el ambiente cercano a otras personas, como por ejemplo sus familiares, compañeros de trabajo o de escuela, entre otros. Sin embargo, se requiere generalmente de una exposición prolongada al microorganismo para infectarse, debido principalmente a que se expulsan cantidades relativamente pequeñas de bacterias cada vez (aproximadamente 3000 bacilos). Aún así, teóricamente al menos, una única bacteria podría ser capaz de desencadenar la enfermedad<sup>26</sup>.

La micobacteria pasa directamente a los alvéolos una vez inhalada y permanece en ellos. Los pulmones son los órganos primarios afectados por la infección.<sup>27,28,49-52</sup> (Fig. 8) La tuberculosis pulmonar es más frecuente que la extrapulmonar. En el 10% de los casos, la bacteria produce la enfermedad dada

la susceptibilidad del hospedero aunque éste puede contenerla en estado de latencia en el 90% de los casos<sup>29</sup>.



**Figura 8.** Los pulmones son los principales órganos afectados por la tuberculosis dado que la adquisición de la bacteria es por vía aérea. 1 de cada 10 individuos se enferma y 9 logran contener la infección. Tomado de Stewart G. et al. 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature Rev Microb.* 1 (2): 97-105.

Los principales síntomas que se presentan en los enfermos con tuberculosis son la fiebre, la debilidad, el dolor en el pecho, la pérdida de apetito y peso (Figs. 9 y 10), disnea y tos, esta última acompañada de sangre en los casos más severos (hemoptisis).

Además de la tuberculosis pulmonar, que es la forma más común de la enfermedad, existen la tuberculosis extrapulmonar y miliar, que afectan los nodos linfáticos y órganos como hígado, riñones, bazo, médula ósea, cerebro, meninges y genitales. Se ha sugerido que hay factores de la bacteria y del hospedero que ayudan al transporte de carga bacilar, pero en general es aceptado que esta transportación se da por medio de vasos sanguíneos y linfáticos.



**Figura 9.** Paciente con tuberculosis pulmonar avanzada. Tailandia, 1995. Se aprecia considerable pérdida de peso. En países orientales, la tuberculosis es un grave problema de salud pública, aún en años recientes. Tomada de [www.stoptb/org](http://www.stoptb.org).



**Figura 10.** Paciente con tuberculosis pulmonar avanzada recibiendo tratamiento. Nicaragua, 1997. Se observa pérdida de peso en el paciente. En algunos países sudamericanos, la disponibilidad de los medicamentos para hacer frente a la enfermedad, resulta otro problema a enfrentar por parte de la comunidad médica. Tomada de [www.stoptb/org](http://www.stoptb.org).

## **BCG: la única vacuna contra la enfermedad**

Fueron los franceses Albert Calmette y Alphonse Guérin quienes en 1924, después de 230 pases de atenuación de la cepa con *M. bovis* lograron la primera y única vacuna que se tiene aceptada mundialmente hasta la fecha para proteger de la tuberculosis a humanos y recibe el nombre de BCG (Bacilo de Calmette y Guérin). Esta vacuna llega al 65% de la población general y se ha sugerido que posee 75% de eficacia para prevenir la tuberculosis pulmonar principalmente en la población infantil. Estas cifras son variables dado que en India la efectividad es de 0%<sup>25,30</sup>. Es importante señalar que BCG no protege de la infección en la población adulta.

Años más tarde, alrededor de 1945, salieron a la luz los primeros antibióticos capaces de combatir la enfermedad, entre ellos la estreptomina seguida de agentes antifímicos como la isoniacida, el etambutol, y la rifampicina principalmente<sup>25,30</sup>.

## **Patogenia y respuesta inmune contra el bacilo tuberculoso**

El riesgo principal para adquirir la infección por *M. tuberculosis* se da al inhalar los bacilos. El concepto de que las micobacterias puedan existir en cantidades suficientes en el aire para causar la infección estuvo en controversia hasta mediados del siglo XX. Los estudios clásicos de Wells y Riley en 1955 demostraron que estos agentes infecciosos podrían transmitirse por estornudos, expectoraciones o incluso por el habla.

Un estornudo puede contener millones de partículas infecciosas con diámetros de menos de 100  $\mu\text{m}$ , con media de 10  $\mu\text{m}$ . Una vez inhaladas, pasan a los alvéolos pulmonares y cuando se ha establecido propiamente la infección se afectan principalmente los lóbulos pulmonares superiores dadas las preferencias aeróbicas de la bacteria<sup>31</sup>.

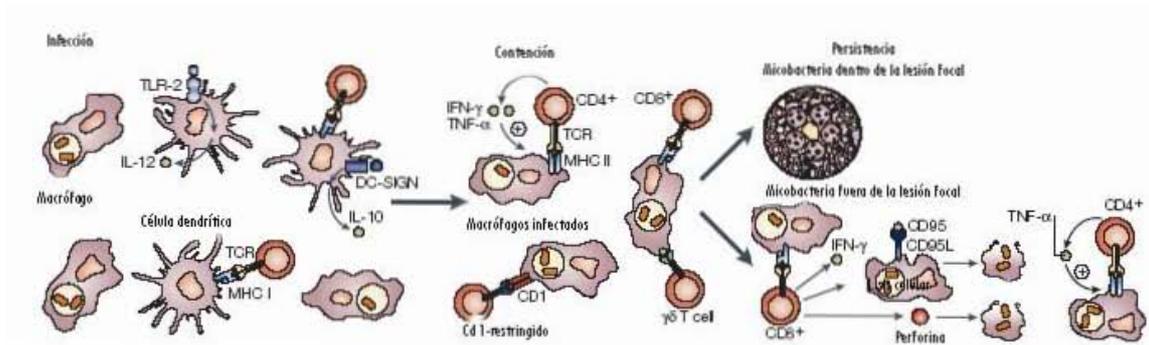
Actualmente, se cuenta con muchos avances en el conocimiento de la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*. Aún así, muchas preguntas en este tema

siguen sin respuesta y muchos procesos de evasión de la respuesta inmune por parte de la micobacteria aún no se comprenden del todo.

Cuando la micobacteria llega al alvéolo pulmonar se produce una reacción de tipo inflamatorio en la que predominantemente se encuentran neutrófilos polimorfonucleares. A este sitio de infección, llegan macrófagos que ingieren a las micobacterias y las transportan al sistema linfático. Aparentemente la capacidad de estos macrófagos para destruir a los bacilos en este punto de la infección es escasa o nula dado que éstos pueden seguir dividiéndose por varias semanas aparentemente al impedir que el fagosoma, en el cual radica, y el lisosoma se unan. Así, logra multiplicarse en el interior del macrófago llegando incluso a destruirlo.

Sin embargo, una vez que los macrófagos logran presentar antígenos micobacterianos en moléculas al *Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)*, los linfocitos T se activan y liberan citocinas como las interleucinas 1 y 2 (IL1, IL2), interferón gamma (INF- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que son unos de los principales mediadores de la respuesta inmune protectora. Estas citocinas activan a más macrófagos los cuales llegan al sitio de la primo-infección con el objetivo de contener la infección, formándose de esta manera el granuloma característico que trata de delimitar a un único espacio físico la lesión. En este granuloma, se encuentran no sólo macrófagos y linfocitos, sino también células gigantes multinucleadas, que también son macrófagos pero con núcleos periféricos que rodean cualquier antígeno bacilar<sup>32-36</sup>. El granuloma posee tejido necrótico hacia el centro de éste y se ha sugerido que puede deberse al exceso de TNF- $\alpha$  y productos enzimáticos liberados por neutrófilos y macrófagos además de la actividad de los linfocitos T citotóxicos de eliminación de las células infectadas por el bacilo<sup>46-48</sup>.

Muchas micobacterias son eliminadas mediante los mecanismos de respuesta inmune descritos anteriormente, sin embargo, algunos bacilos pueden persistir en el hospedero<sup>27</sup>.



**Figura 11.** Mecanismo inmune de contención de *M. tuberculosis*. Una vez que la micobacteria ha infectado al hospedero, las células dendríticas dan el “priming” a los linfocitos T, los cuales activan a los macrófagos con el objetivo de contener la fase inicial de la multiplicación bacteriana. Cuando hay falla en este mecanismo de contención entonces se genera la tuberculosis primaria. Bacterias viables pueden persistir de dos maneras: secuestradas dentro de lesiones focales o afuera de las lesiones. Se presume que esta última acción se mantiene bajo chequeo de la presión inmune. IFN, interferon gamma; IL, interleucina; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; TCR, Receptor de antígenos tipo T ; TLR, Receptor tipo Toll-like; TNF, factor de necrosis tumoral. Tomado de Stewart G. et al. 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature Rev Microb.* 1 (2): 97-105.

## Respuesta inmune humoral

La mayoría de la literatura que describe el mecanismo de inmunidad contra *M. tuberculosis* asevera que el papel de los anticuerpos es nulo. Sin embargo, no se ha encontrado evidencia hasta la fecha de que esta aseveración sea totalmente cierta. Aunque los anticuerpos por sí solos no son suficientes para atacar y erradicar el bacilo del hospedero dadas sus preferencias de residencia intracelular, sí son necesarios en algún momento de la infección<sup>29</sup>.

Un número considerable de componentes micobacterianos tienen efectos farmacológicos potentes. Entre ellos se destacan al lipoarabinomano (LAM), una variedad de moléculas inductoras de citocinas y los mensajeros secundarios de inositol fosfoglicano-like (IPG) que fueron descubiertos recientemente en las micobacterias. La neutralización de algunos de estos componentes por anticuerpos apropiados puede tener un papel importante en la inmunidad contra la infección<sup>37</sup>.

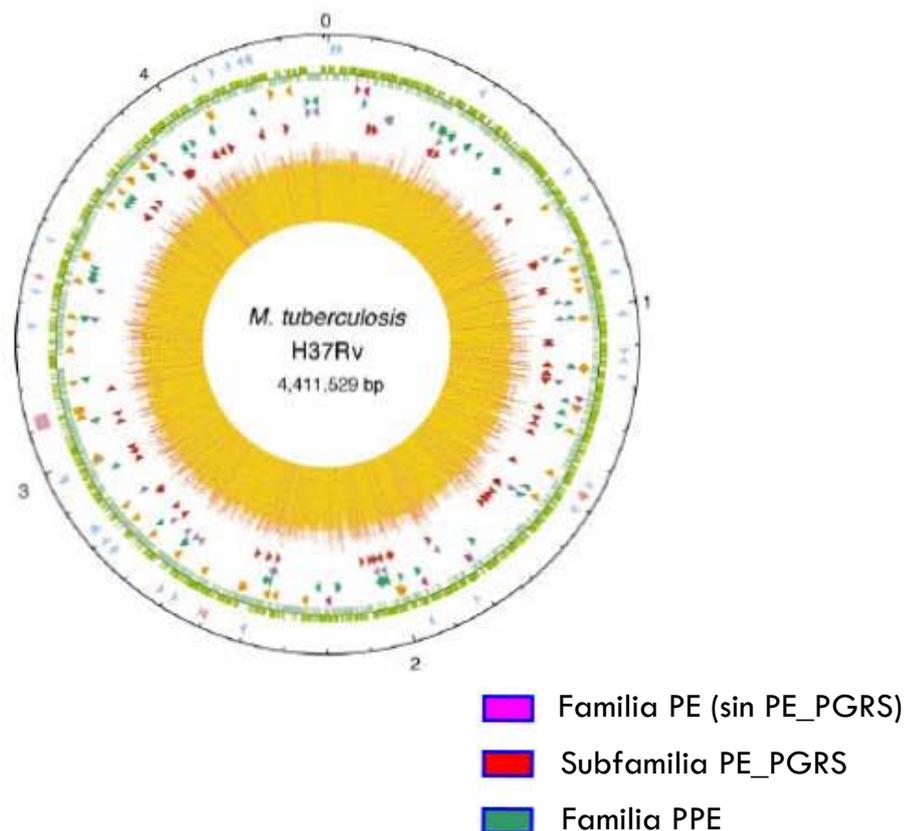
Algunos investigadores han discutido sobre el papel de las células B y los anticuerpos en la protección contra la tuberculosis. Estudios recientes sugieren que éstas pueden contribuir a la respuesta inmune contra la enfermedad<sup>38</sup>.

Los antígenos micobacterianos que inducen una respuesta humoral en humanos han sido estudiados principalmente con la idea de identificar antígenos relevantes útiles para el diagnóstico de la tuberculosis. Muchas proteínas antigénicas de *M. tuberculosis* han sido identificadas utilizando anticuerpos monoclonales murinos<sup>39</sup>. Los antígenos inmunodominantes en el ratón incluyen a las proteínas de 71, 65, 38, 23, 19, 14, y 12 KDa. Los principales antígenos proteicos de *M. leprae* y *M. tuberculosis* han sido clonados en vectores como *E. coli*. Sin embargo, no todos los antígenos identificados, basados en la respuesta inmune murina, son útiles para estudiar la respuesta inmune humana. Aún así, a nivel mundial existen varios laboratorios que han identificado y purificado antígenos de *M. tuberculosis* para ser utilizados en diagnóstico de tuberculosis en adultos y durante la niñez<sup>40-45</sup>.

# ANTECEDENTES

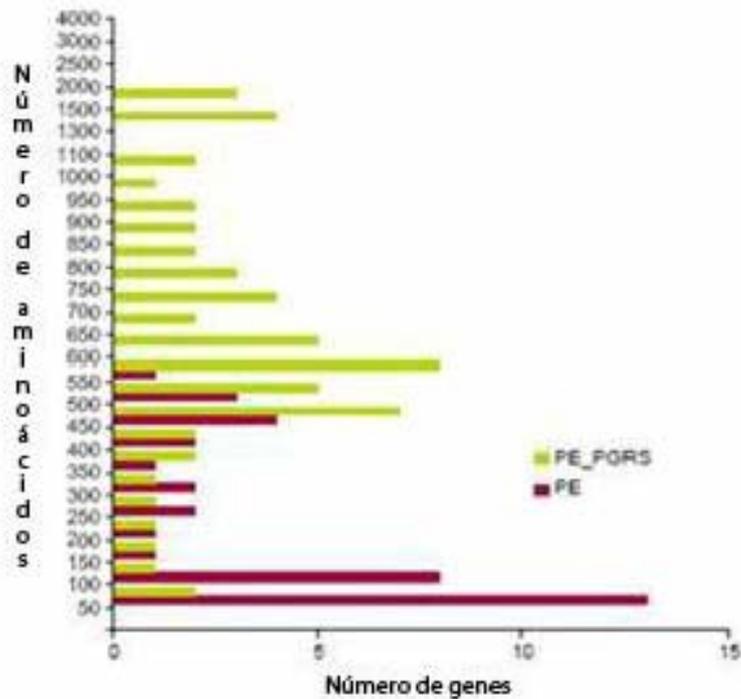
## La familia PE

A partir de la secuenciación del genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* en 1998, se detectó que 4.3% de su genoma está destinado a la producción de proteínas que presentan secuencias ricas en glicina y alanina. La familia génica que agrupa a los miembros con estas características se nombró PE (por los motivos conservados Pro-Glu ubicados en las posiciones 8 y 9 respectivamente) y comprende a dos subfamilias: la PE y la PE\_PGRS (PGRS del inglés *Polymorphic GC-rich Repetitive Sequences*), las cuales suman 99 miembros divididos en 38 genes PE y 61 PE\_PGRS, que se encuentran dispersos en el genoma (Fig. 12)<sup>53</sup>.



**Figura 12.** Genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Tomado de Cole, S.T., et al.1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393:537-544.



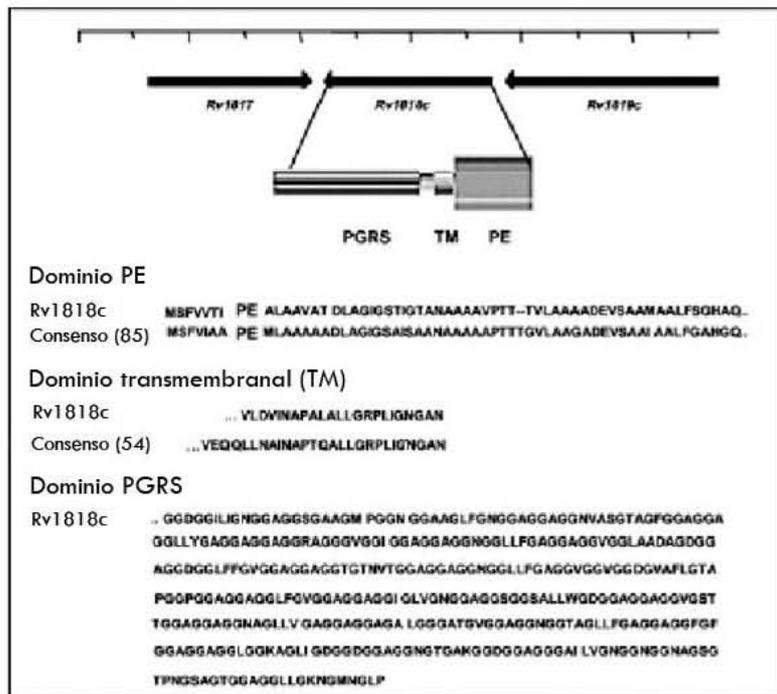


**Figura 14.** *Tamaño de los genes miembros de la familia PE.* Tomado de Brennan, M.J., Delogu. 2002. The PE multigene family: a “molecular mantra” for micobacteria. *Trends in Microb.* 10, 246-249.

## Generalidades e importancia de la subfamilia PE\_PGRS

### La proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> de la subfamilia PE\_PGRS

La proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> es un miembro típico de la subfamilia PE\_PGRS. Posee una región amino-terminal que tiene un alto grado de homología con las proteínas que pertenecen a la subfamilia PE. Asimismo, posee una región carboxilo-terminal con un alto contenido de glicina y alanina (41% y 20% respectivamente), que contiene numerosas repeticiones del motivo GGAGGA en el dominio PGRS (Fig. 15). Además, tiene un tamaño cercano a los 500 aminoácidos, que es el tamaño promedio de los genes PE\_PGRS<sup>54</sup>. No obstante que comparte un alto grado de homología con varios miembros de la subfamilia PE\_PGRS, el miembro más cercano es la proteína Rv1756c, con la cual comparte un 60% de homología<sup>53</sup>.



**Figura 15.** Dominios identificados en la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> de *M. tuberculosis* H37Rv. Tomado de Brennan M. J., et al. 2001. Evidence that mycobacterial PE\_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infection and Immunity*. 69: 12, 7326-33.

Al parecer, esta proteína se localiza en la pared celular. En un trabajo experimental, mediante mutagénesis por transposición se identificaron mutantes de *M. bovis* BCG cuyo crecimiento era disperso en medio líquido, además de que perdían la habilidad de entrar y de sobrevivir en macrófagos. Las bacterias que presentaban el fenotipo disperso tenían insertado un transposón en la proteína PE\_PGRS Rv1818c. Estos resultados sugieren que la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> podría estar implicada en la interacción bacteria-bacteria y bacteria-hospedero<sup>56</sup>. Por otra parte, la sobreexpresión de esta proteína en *M. smegmatis* afecta drásticamente la morfología de la pared celular, por lo cual, esta proteína PE\_PGRS tan rica en glicina, podría tener funciones estructurales en la pared celular micobacteriana<sup>56</sup>. Se ha visto que las proteínas ricas en glicina tienen funciones estructurales en las paredes celulares de plantas y en estructuras elásticas de la seda de las arañas<sup>57</sup>.

La inmunogenicidad de la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> ha sido estudiada ampliamente en el ratón<sup>55</sup>. Se ha investigado la respuesta inmune contra la PE\_PGRS Rv1818c (Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup>) y contra su región PE (Rv1818c<sup>PE</sup>) mediante la inmunización con construcciones de DNA. Se observó una respuesta inmune humoral significativa contra la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> pero no contra la Rv1818c<sup>PE</sup>, mientras que la respuesta celular medida por la producción de INF- $\gamma$  fue principalmente inducida por la región PE<sup>58</sup>.

Por otro lado, se demostró que la expresión de dos genes PE\_PGRS por parte de *M. marinum* estaban asociados con la mayor replicación de micobacterias en macrófagos de ranas lo que sugiere que algunas proteínas PE\_PGRS están presentes en los estadios de la infección por *M. tuberculosis*<sup>59</sup>.

La expresión de algunas proteínas PE\_PGRS también ha sido evaluada en estudios clínicos con pacientes infectados por *M. tuberculosis*<sup>60</sup>. La evidencia que se tiene hasta el momento, sugiere que algunas proteínas codificadas por ciertos miembros de la subfamilia génica PE\_PGRS podrían estar presentes en la pared celular micobacteriana y se ha postulado que podrían ser fuentes de variación antigénica dado el alto polimorfismo existente intra e intercepas<sup>54</sup>.

## **Variación antigénica**

### **Generalidades**

Aunque aparentemente homogéneas, las poblaciones bacterianas que representan a una cepa son muchas veces heterogéneas a nivel celular y genético. Este fenómeno, que ha sido intensamente estudiado en algunos microorganismos, particularmente patógenos, está probablemente disperso en gran escala en los organismos procariontes. El fenómeno de variación en cuestión, es resultado de cambios espontáneos en la información genética de las especies, a lo que comúnmente se le ha denominado *variación genética*, que ocurre a frecuencias relativamente altas, lo que afecta no sólo a las grandes poblaciones sino también a las pequeñas.

A menudo estos cambios repercuten en variación fenotípica de los componentes de superficie. Esto es particularmente importante en el caso de las bacterias patógenas porque la mayoría de las estructuras variables estudiadas

distan mucho de ser esenciales en la colonización y supervivencia del patógeno dentro del hospedero. La habilidad de variar la inmunogenicidad de estructuras importantes y de adecuar o sincronizar la especificidad de los receptores o adhesinas es de considerable ventaja evolutiva para los patógenos, los cuales pueden encontrar cambios impredecibles en su ambiente<sup>61</sup>.

La función del sistema inmune en los macroorganismos depende de rearrreglos genéticos extensos que son cruciales para mantener la diversidad de anticuerpos y los receptores de las células T. Uno de los primeros ejemplos descritos de variación antigénica se hizo para el tripanosoma africano<sup>62</sup> y se basó en la enorme diversidad de respuesta inmune generada. Una proteína variable cubre por completo la superficie de este patógeno, lo cual le permite escapar de la respuesta inmune por parte de su hospedero. Por otro lado, la espiroqueta *Borrelia hermsii*, que causa fiebre recurrente, presenta variación antigénica para evadir la respuesta inmune del hospedero. Esta bacteria produce grandes cantidades de una lipoproteína variable que puede ser suficiente para cubrir toda la superficie<sup>61</sup>.

### **La recombinación homóloga**

Es ampliamente sabido que la recombinación homóloga genera variación molecular en las bacterias y depende de la función de RecA. La proteína RecA promueve el alineamiento de DNA de cadena sencilla a cualquier secuencia complementaria de DNA de doble cadena desplazando una de las cadenas originales.

*Borrelia hermsii* utiliza un mecanismo similar al de los gonococos y tripanosomas para alterar sus principales proteínas variables llamadas *Vmp*. Existen al menos 27 genes variables *vmp*. En *Bacillus thuringiensis*, se producen nuevas especificidades de toxinas por recombinación entre y dentro de los genes de estas toxinas<sup>63</sup>.

Hay muchos ejemplos de variación resultante de pérdida o ganancia de dominios repetidos dentro de moléculas. La proteína M de los *Streptococos* es altamente diversa en cuanto a su tamaño, con cerca de 80 serotipos antigénicamente diferentes. En el serotipo M6, la proteína consiste de varias

repeticiones de aminoácidos agrupados en cuatro regiones. La variación en tamaño probablemente ocurra cuando las repeticiones son deletadas por recombinación entre elementos repetidos en *tandem* dentro de la secuencia.

*Mycoplasma hyorhinis* expresa combinaciones variables de muchas lipoproteínas de superficie (Vlp) que varían en tamaño. El tamaño de las Vlp varía cuando secuencias repetidas que codifican para los dominios extracelulares se ganan o se pierden. El antígeno inmunodominante de superficie de *Anaplasma marginale* es también polimórfico en tamaño y esto correlaciona con las variaciones en el número de secuencias repetidas en *tandem* cercanas al extremo 5' del gen. En ninguno de estos ejemplos se sabe si los cambios ocurren por recombinación homóloga o por un mecanismo RecA independiente<sup>61, 64</sup>.

Algunos motivos repetidos son utilizados por ciertas bacterias para alterar el nivel de expresión de una proteína. Se piensa que la pérdida o ganancia de repeticiones ocurren por un proceso que involucra la replicación de DNA denominada deslizamiento de cadenas de DNA<sup>64</sup>.

Se ha demostrado que existen genes que codifican para las proteínas Opa de los gonococos con muchas copias dispersas en el genoma. Cada copia incluye repeticiones de CTCTT en el extremo 5' que codifican para el centro hidrofóbico del péptido señal. Se ha propuesto que el deslizamiento de cadenas de DNA es el responsable de alterar el número de repeticiones y es RecA independiente<sup>65</sup>.

Por otro lado, el género *Yersinia* provee un ejemplo especial de cambios en la región nucleotídica asociada con el incremento de su virulencia. La secuencia *yopA* de *Yersinia pestis* sólo difiere de aquella que es menos virulenta, *Yersinia pseudotuberculosis*, por 15 nucleótidos, incluyendo la delección de una base en *polyA*, lo que ocasiona un cambio en el marco de lectura<sup>66, 67</sup>.

Para evadir la respuesta inmune del hospedero, los patógenos bacterianos mutan para generar variantes. El papel que juegan en este proceso las DNA-polimerasas IV y V, también conocidas como mutasas, ha sido descubierto en los últimos años, enfocándose arduamente a los antígenos de superficie que son reconocidos por el sistema inmune<sup>68</sup>.

La variación genética es el resultado de cambios espontáneos en genes de todas las especies (entre ellas los patógenos) que pueden llevar a alteraciones

fenotípicas o bien a variación antigénica. Actualmente se sabe que diferentes patógenos como *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Borrelia hermsii* y *Borrelia burgdorferi* poseen variación antigénica<sup>69-72</sup>.

Debido al extenso polimorfismo presente entre los miembros de la familia de proteínas PE\_PGRS, se ha postulado que éstas podrían ser una fuente de variación antigénica intra e inter cepas, es decir, en una misma cepa así como también entre cepas para *M. tuberculosis*. Se especula que la recombinación homóloga intragénica entre *tandems* repetidos podría ser el mecanismo responsable de la variación presente en los genes PE\_PGRS de *M. tuberculosis*<sup>74</sup>. La genómica comparativa de las dos cepas de *M. tuberculosis* que hasta la fecha han sido secuenciadas, H37Rv y CDC1551 enfatiza el rol de los eventos de inserción-delección en la generación de variación en la familia PE\_PGRS<sup>1,75</sup>.

La evidencia que se tiene hasta la fecha sugiere que numerosos genes PE y PE\_PGRS están restringidos a miembros del complejo *M. tuberculosis* y a otras pocas especies micobacterianas que prefieren hospederos humanos así como otras especies mamíferas<sup>1,60,76,77</sup>. Esto implica que la familia multigénica PE podría tener un papel en la infección y supervivencia micobacteriana en tejidos del hospedero, o como se ha sugerido, que muchos genes PE\_PGRS podrían funcionar como fuentes de variación antigénica para *M. tuberculosis* con el objetivo de evadir la respuesta inmune montada por el hospedero<sup>40</sup>. Se ha demostrado por RT-PCR que existe expresión diferencial de algunas secuencias PE ante aislados clínicos de *M. tuberculosis* durante su crecimiento *in vitro*<sup>78</sup>.

Sin embargo, es poco aún lo que se sabe acerca de la función de la familia génica PE aunque se ha demostrado que algunas proteínas PE\_PGRS son preferentemente expresadas dentro de las células hospederas<sup>59</sup>.

Dada la marcada conservación en las secuencias del proteoma de los bacilos tuberculosos y por consiguiente la pérdida de diversidad en aminoácidos, es concebible que la mayor fuente de cambios antigénicos esté asociado con las proteínas PE\_PGRS<sup>23,55, 56</sup>.

El completo entendimiento del papel y la función de las proteínas PE y PE\_PGRS en *M. tuberculosis* será un paso importante en la comprensión de la biología de este patógeno tan exitoso en humanos.

## **MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> y Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup>: semejanzas y diferencias**

Los genomas de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, la cepa más comúnmente utilizada a nivel laboratorio para estudiar la tuberculosis, y de la CDC1551, aislado clínico de un brote de tuberculosis en una población rural de EE.UU. en el año 2000<sup>79</sup>, muestran semejanza de 99% a nivel de nucleótidos<sup>80</sup> pero ambas cepas muestran diferencias fenotípicas *in vivo* e *in vitro* que tal vez podrían ser explicadas por cambios a nivel de expresión de proteínas. En el año 2000, en Gran Bretaña, se realizó un estudio donde se comparó mediante electroforesis de dos dimensiones el proteoma de ambas cepas, obteniéndose como resultado que de 1750 proteínas identificadas tanto en H37Rv como en CDC1551, sólo diferían en 17: 7 eran únicas de CDC1551 y 3 de H37Rv; 2 mostraron mayor intensidad en H37Rv, asimismo, ambas cepas diferían 1 proteína en su patrón vertical y 4 mostraron diferencias a lo largo del tiempo<sup>75</sup>. Interesantemente, se observó que las principales diferencias entre ellas radican en la variabilidad de las PE\_PGRS. Esta variabilidad se da por inserciones y/o deleciones y mutaciones puntuales en los genes que codifican para éstas. Un ejemplo ilustrativo, se muestra en la comparación de los genes *rv1818c* y su ortólogo en CDC1551, el *mt1866*. La proteína en CDC1551 codificada por el gen *mt1866* tiene una deleción de 30 aminoácidos y una inserción de 3 de éstos en la región o dominio PGRS, en comparación con la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> de H37Rv (Fig. 16). Recientemente, la secuenciación del gen *rv1818c* de 123 aislados clínicos de *M. tuberculosis* mostró que existen variaciones de esta proteína entre las cepas. Se observaron nuevas regiones de inserción y/o deleción, así como mutaciones puntuales<sup>81</sup>.

```

      *           20           *           40           *           60
Rv1818c : msfvvtipealaavatdlagigstigtanaaaaavptttvlaaaadevsaamaalfsghaqay : 62
MT1866  : msfvvtipealaavatdlagigstigtanaaaaavptttvlaaaadevsaamaalfsghaqay : 62
      MSFVVTIPEALAAVATDLAGIGSTIGTANAAAAVPTTTVLA AAADEVSAAMAALFSGHAQAY

      *           80           *           100          *           120
Rv1818c : qalsaqaalpheqfvraltagagsyaaaeaasaaplegvldvinapalallgrpligngang : 124
MT1866  : qalsaqaalpheqfvraltagagsyaaaeaasaaplegvldvinapalallgrpligngang : 124
      QALSQAALFHEQFVRALTAGAGSYAAEAESAAPLEGVLDVINAPALALLGRPLIGNGANG

      *           140          *           160          *           180
Rv1818c : apgtganggdggilignggaggsgaagmpggnggaaglfngggaggaggmvasgtagfggag : 186
MT1866  : apgtganggdggilignggaggsgaagmpggnggaaglfngggaggaggmvasgtagfggag : 186
      APGTGANGGDGGILIGNGGAGGSGAAGMPGGNGGAAGLFGNGGAGGAGGNVASGTAGFGGAG

      *           200          *           220          *           240
Rv1818c : gagglllygaggaggaggragggvggiggaggagnggllfgaggaggvgglaadagdgaggag : 248
MT1866  : gagg-----nggllfgaggaggvgglaadagdgaggag : 218
      GAGG                                     NGGLLFGAGGAGGVGGLAADAGDGGAGG

      *           260          *           280          *           300          *
Rv1818c : dgglffgvggaggaggtgtntvggaggagnggllfgaggvggvggdgvaflgtapggppga : 310
MT1866  : dgglffgvggaggaggtgtntvggaggagnggllfgaggvggvggdgvaflgtapggppga : 280
      DGGLFFGVGGAGGAGGTGTNVTGGAGGAGGNGLLFGAGGVGGVGGDGVAF LGTAPGGPPGA

      320           *           340           *           360           *
Rv1818c : ggagglfvgggaggaggiglvngggagsggsallwgdggaggaggvgsttggaggagnag : 372
MT1866  : ggagglfvgggaggaggiglvngggagsggsallwgdggaggaggvgsttggaggagnag : 342
      GGAGGLFGVGGAGGAGGIGLVNGGAGSGGSALLWGDGGAGGAGGVGSTTGGAGGAGGNAG

      380           *           400           *           420           *
Rv1818c : llvgaggaggagalgggatgvggaggnggtagllfgagga--ggfvgggaggaggllgkag : 431
MT1866  : llvgaggaggagalgggatgvggaggnggtagllfgagga    GGFVGGAGGAGGLGKAG : 404
      LLVGAGGAGGAGALGGGATGVGGAGGNGGTAGLLFGAGGA    GGFVGGAGGAGGLGKAG

      440           *           460           *           480           *
Rv1818c : ligdggdggaggngtgakggdggagggaillvngngngnagsgtpngsagtggagllgkng : 493
MT1866  : ligdggdggaggngtgakggdggagggaillvngngngnagsgtpngsagtggagllgkng : 466
      LIGDGGDGGAGGNGTGAKGGDGGAGGGAILLVNGNGNGNAGSGTPNGSAGTGGAGLLGKNG

      500
Rv1818c : mnglp- : 498
MT1866  : mnglp- : 471
      MNGLP

```

**Figura 16.** Comparación entre las proteínas Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> de *Mycobacterium tuberculosis*. El alineamiento fue realizado en el programa GeneDoc. MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> de la cepa CDC1551 tiene una delección de 30 aa en la posición 191 y una inserción de 3 aa en la posición 413, ambas en la región o dominio PGRS, en comparación con su ortóloga presente en la cepa H37Rv.

## J U S T I F I C A C I Ó N

Debido a la importancia potencial de las proteínas de la familia PE como fuentes de variación antigénica intra e inter cepas en *M. tuberculosis* y, por ende, las implicaciones de este fenómeno sobre la respuesta inmune global generada en contra de la bacteria, se hace necesario estudiar la actividad antigénica contra miembros ortólogos de la familia provenientes de aislados clínicos distintos y que presentan cambios en su secuencia de aminoácidos (inserciones/delecciones) con el fin de establecer el impacto de estos cambios sobre la respuesta inmune.

## **H I P Ó T E S I S**

“Los cambios genéticos presentes en los miembros de la familia PE\_PGRS (Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>) afectarán su reactividad en la respuesta inmune humoral del hospedero”.

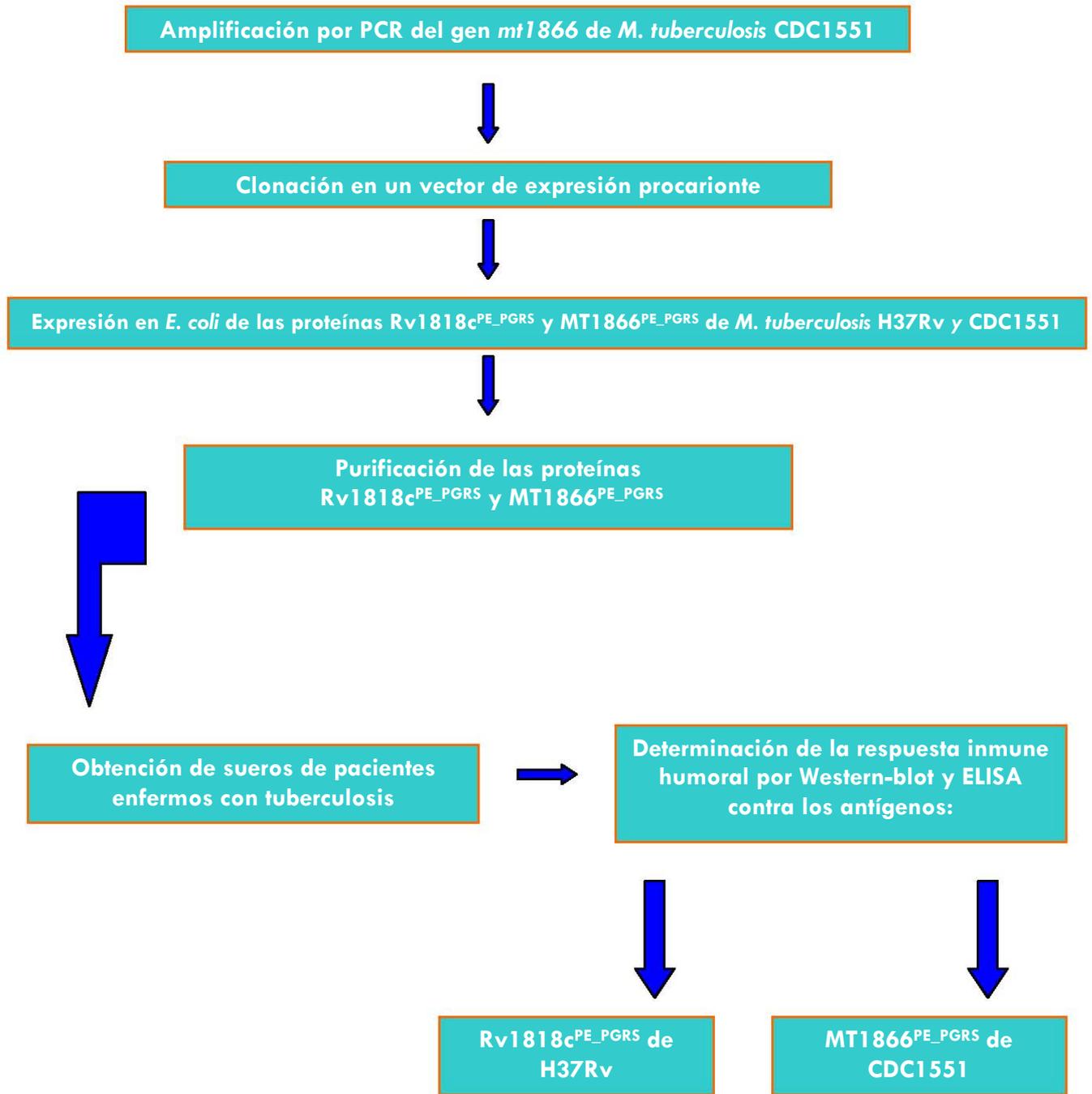
## O B J E T I V O G E N E R A L

Establecer si las diferencias existentes entre las proteínas Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> de *M. tuberculosis* H37Rv y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> de CDC1551 se traducen en un reconocimiento diferencial por parte de los anticuerpos generados por pacientes enfermos con tuberculosis.

## O B J E T I V O S P A R T I C U L A R E S

- Amplificar por PCR el gen *mt1866* de la cepa CDC1551 de *M. tuberculosis*.
- Clonarlo en un vector de expresión procarionte.
- Expresar en *Escherichia coli* las proteínas Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> de las cepas H37Rv y CDC1551 y purificarlas.
- Evaluar la respuesta inmune humoral en pacientes enfermos con tuberculosis y determinar comparativamente la reactividad de anticuerpos contra las proteínas MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> y Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> de *M. tuberculosis* CDC1551 y H37Rv, respectivamente.

# DISEÑO EXPERIMENTAL



# M A T E R I A L E S Y M É T O D O S

## 1. Cepas de *M. tuberculosis*

Cepa H37Rv: ATCC 27294

Cepa CDC1551 donada por el Dr. Rogelio Hernández Pando del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.

## 2. Cultivos de *M. tuberculosis*

Las cepas de *M. tuberculosis* fueron cultivadas en medio Middlebrook 7H11 (Difco), suplementado con OADC 10% (ácido oléico, albúmina, dextrosa y catalasa) durante 15 días a 37 °C.

## 3. Obtención de DNA de las cepas H37Rv y CDC 1551

El DNA se extrajo de acuerdo a un protocolo establecido<sup>82</sup>. Las colonias de *M. tuberculosis* fueron raspadas y colocadas en 400 µl de buffer TE 1X. Después de inactivación a 80 °C durante 20 minutos, se agregaron 50 µl de lisozima 10 mg/ml y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, se agregó una mezcla de 10 µl de proteinasa K 10 mg/ml y 70 µl de SDS al 10% y después de incubarse a 65 °C por 10 minutos se agregaron 100 µl de NaCl 5M y 100 µl de CTAB 10% previamente calentado; la muestra se agitó en el vórtex y al aparecer un color blanco lechoso se incubó nuevamente a 65 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 700 µl de Cloroformo/Alcohol isoamílico en proporción de 24:1 y se centrifugó a 12,000 g durante 45 minutos a 20 °C. Finalmente, se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol a la fase acuosa y se llevó a -20 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente, la muestra se centrifugó a 12,000 g durante 45 minutos a 4 °C. El *pellet* se lavó 3 veces con etanol al 70% y se centrifugó entre cada lavado a 12,000 g durante 45 minutos a 4 °C. El *pellet* obtenido se dejó evaporando toda la noche. Una vez seco, se resuspendió en 40 µl de buffer TE 0.1X.

#### 4. Diseño de oligonucleótidos iniciadores

A partir de la secuencia del gen *mt1866* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y mediante la utilización del programa GeneDoc se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores correspondientes. Se verificó que no fueran autocomplementarios ni complementarios entre sí. El diseño de los oligonucleótidos fue realizado por Ingrid Cohen Falquez, estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas.

MT1866 5' CCG AAG CTC **CAT ATG** TCA TTT GTG GTC ACG 3'  
(T<sub>m</sub>: 72.7 °C, t<sub>m</sub>: 57.8 °C) y

MT1866R 3' **ATG GAT CCC** TAC GGT AAC CCG TTC ATC CCG TTC 5'  
(T<sub>m</sub>: 78 °C, t<sub>m</sub>: 68.7 °C).

Los sitios *NdeI* y *BamHI* añadidos se muestran en negritas.

#### 5. Amplificación del gen *mt1866* de *M. tuberculosis* CDC1551 por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con los *primers* para esta secuencia, se llevó a cabo la estandarización del PCR con el objetivo de amplificar el gen *mt1866* a partir del genoma de *M. tuberculosis* CDC1551. Para el PCR se utilizaron 33 ng/μl de DNA, los *primers* se utilizaron a una concentración de 10mM, DNTP's a 800 μM, MgSO<sub>4</sub> de 1 a 2.5 mM, *Pfx-platinum* a 0.4 μl/reacción, (además de la utilización de un *mejorador* de la reacción incluido en el *Kit Platinum DNA polymerase Automatic Hot Start for Improved PCR Specificity*) de 0.5 a 3X. El volumen final de cada reacción fue de 50 μl. Se ensayaron 5 reacciones variando la temperatura de alineamiento (T<sub>m</sub>) de los *primers* en un gradiente de temperaturas: 57.9 °C, 59.9 °C, 62.5 °C, 65.4 °C, 67.1 °C. Las temperaturas y tiempos de ciclaje fueron: 95°C, 8 min.; 95°C, 1 min.; 58°C, 1 min.; 72°C, 2 min., 72°C, 10 min., durante 25 ciclos. Se utilizó un Termociclador *Eppendorf Mastercycler epgradient*.

## **6. Purificación del producto de PCR**

El producto de amplificación del PCR se resolvió en un gel de agarosa al 0.8% libre de *DNAsas* y *RNAsas*. Después de 1 hora de corrida a 90 volts, el gel se tiñó con Bromuro de etidio y se obtuvo el fragmento amplificado con el *Kit de Extracción de Qiagen- QIAquick Gel Extraction*.

## **7. Verificación de la identidad del producto de PCR**

El producto de amplificación fue también sometido a análisis de restricción utilizando la enzima *SmaI*, para la cual se predicen dos sitios de corte en el gen *mt1866*, en las posiciones 669 y 1124. La reacción de digestión se llevó a cabo en 2 horas con la enzima *SmaI* en Buffer  $Y^+$ /Tango de Fermentas a 30°C. El patrón de digestión se verificó en un gel de agarosa 1%.

## **8. Clonación y expresión del gen *mt1866* en el vector de expresión procarionte: pET-15b**

El gen *mt1866* fue clonado en los sitios *BamHI* y *NdeI* del vector de expresión pET-15b dado que tiene un tallo de histidina en su región N-terminal. El vector se digirió simultáneamente con las dos enzimas en Buffer B durante 3 horas a 37°C en un volumen de 25  $\mu$ l totales.

Después de purificarse con el *Kit de Qiagen* de acuerdo al protocolo del fabricante, se llevó a cabo la ligación utilizando la Enzima T4 Ligasa en un volumen total de 30  $\mu$ l. El plásmido obtenido, pET15b/*mt1866* se electroporó en células termocompetentes TOP 10 F'. Se siguió el método de Midipreps por Lisis Alcalina<sup>81</sup> para obtener el plásmido deseado.

## 9. Digestión de pET-15b/*mt1866*

Para verificar el éxito de la clonación pET-15b/*mt1866* el plásmido se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Nde*I bajo las siguientes condiciones: *Bam*HI, Buffer B, pET-15b/*mt1866* y agua en 15 µl totales por 2 horas y media a 37 °C y después *Nde*I, Buffer R por 5 horas a 37 °C.

## 10. Expresión de las proteínas MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> y Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> en C41 (DE3)

Se electroporaron pET-15b/*mt1866* y pET-15b/*rv1818c* en la cepa de *E.coli* C41. Ésta es derivada de la cepa BL21, que es la cepa que más ampliamente se usa en el laboratorio para expresar proteínas. C41 y BL21 tienen insertado en su genoma el lisógeno DE3, que hace la diferencia en comparación con las cepas de mantenimiento como TOP 10 o DH5<sup>∞</sup>. En estas cepas de mantenimiento, se logra conservar en buen estado el plásmido que se está estudiando debido a que no poseen las enzimas que podrían degradarlo. Por otro lado, el lisógeno DE3 posee el promotor *lac* y el gen de T7, que en conjunto logran un sistema de control de expresión del gen que se está estudiando.

C41 tiene al menos una mutación no caracterizada que previene la muerte celular asociada con la expresión de proteínas tóxicas recombinantes. Esto puede ocurrir limitando la acumulación de RNA mensajero de la proteína expresada. C41 baja la toxicidad del RNA mensajero y permite que la mayoría de las proteínas sean expresadas. Se ha visto que cuando estas células se utilizan con el promotor de T7 se obtienen buenas cantidades de la proteína que se está trabajando.

Tanto C41 como BL21, son deficientes en la proteasa *lon* así como en la proteína *ompT*, las cuales pueden degradar proteínas durante la purificación, por lo tanto, las proteínas que se deseen expresar deberán ser más estables en este tipo de cepas.

Se tomaron 3 colonias producto de la electroporación y se inocularon en 5 ml de LB/Amp 50 mg/ml, para realizar *Minipreps* por Lisis alcalina y verificar que efectivamente C41 tenía la construcción con el gen *mt1866*. Una vez verificado, se llevó a cabo un ensayo de inducción de expresión de la proteína con IPTG

durante 3 horas. Se inoculó 1 colonia en 10 ml de LB/Amp 100 mg/ml durante 6 horas, de este cultivo se tomó 1 ml y se inoculó en 100 ml de LB/Amp 100 mg/ml durante 8 horas y finalmente se sembró en 1000 ml de LB/Amp 100mg/ml durante 6 horas. Se probaron además, diferentes concentraciones de IPTG para determinar su concentración ideal en cultivo. Se realizaron las curvas de crecimiento correspondientes y se determinó en qué fracción celular se encontraba la proteína.

### **11. Sodium dodecil sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) e inmunoelectrotransferencia de las proteínas recombinantes**

Los extractos de *E. coli* fueron resueltos en un gel SDS-PAGE al 12%. En cada carril se cargaron 10 µg de proteína total. Una vez terminada la electroforesis, el gel fue transferido a membrana de nylon *Polivynil Difluoride* (PVDF) P-mobilion (Millipore, Co, Bedford, Mass) a 60 volts durante 1 hora para posteriormente ser teñida mediante la tinción de azul de Coomassie o incubadas con un anticuerpo monoclonal *anti-His HRP* y un policlonal *anti-Rv1818c<sup>PE-PGRS</sup>* en solución de BSA 3%-PBS-Tween-20 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación lenta. La membrana se lavó 2 veces con PBS-Tween-20 0.05% con duración de 3 minutos cada lavado. Enseguida, se incubó durante 30 minutos con un secundario, HRP-rec-Proteína A acoplada a peroxidasa en dilución 1:2000 en BSA 1%-PBS-Tween-20 0.05%, también en agitación lenta. La membrana se lavó 2 veces con PBS-Tween-20 0.05% con duración de 3 minutos cada lavado. Finalmente, se reveló incubando la membrana con 1 µl/ml de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en PBS y Diaminobencidina (DAB).

### **12. Purificación de las proteínas recombinantes**

La inducción de las proteínas MT1866<sup>PE-PGRS</sup> y Rv1818c<sup>PE-PGRS</sup> se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* C41 (DE3) en la cual se formaron cuerpos de inclusión producto de la sobreexpresión de la proteína insoluble recombinante. Estos cuerpos de inclusión fueron solubilizados con Buffer de lisis desnaturante en presencia de

Urea 8M y se pasaron por una columna de purificación por afinidad a níquel (Amersham Biosciences). Las proteínas fueron re-naturalizadas sin observarse precipitación.

### **13. Sueros humanos**

Se utilizaron 25 sueros de enfermos con tuberculosis, tanto pulmonar como extrapulmonar del *Hospital General de México*. Todos los pacientes enfermos con tuberculosis fueron diagnosticados por medio de radiografía así como por cultivo. También se usaron 25 sueros de individuos sanos los cuales fueron obtenidos de personas pertenecientes al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. En este último caso, se verificó la ausencia de la enfermedad por radiografía.

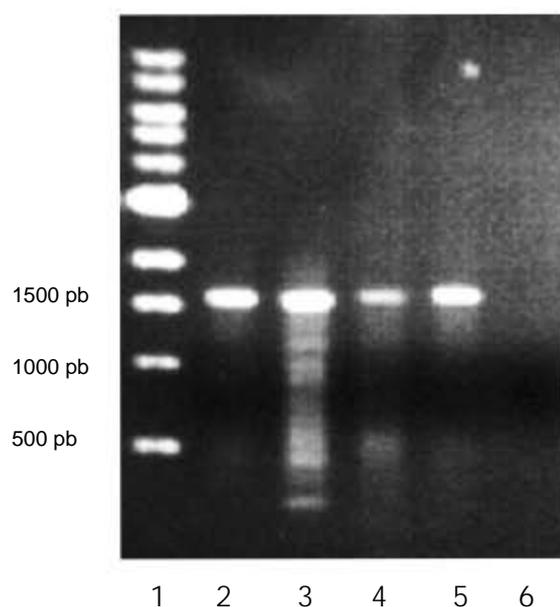
### **14. ELISA**

La reactividad de los sueros contra los antígenos Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> se detectó en placas de ELISA para microtitulación Nunc Apogent USA. En las placas se colocaron 2.5 µg de antígeno por pozo en 100 µl de Buffer de Carbonatos a pH 9.6 y se dejaron durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, las placas se lavaron en agitación constante 4 veces, 4 min. cada lavado, con PBS 1X-Tween 20-0.05%. Enseguida, las placas se bloquearon durante 2 horas a 37°C con 200 µl por pozo de PBS 1X-Tween 20 0.05%-BSA 2% y lavadas 1 vez con PBS 1X-Tween 20 0.05%. Se agregaron 100 µl por pozo de las diluciones de los sueros a probar (1:100 y 1:200) en PBS 1X-Tween 20-0.01%-BSA 1%. Se dejaron incubando 1 hora a 37°C y después se lavaron durante 4 min., 4 veces con PBS 1X-Tween 20 0.05%. Enseguida, se incubaron durante 1 hora a 37°C con 100 µl por pozo de Anti-IgG1 humano biotinilado en una dilución de 1:1000, y después con un secundario, 100µl por pozo de streptavidina peroxidasa en una dilución 1:2000 en PBS 1X-Tween 20-0.01%-BSA 1%. Después, las placas se lavaron durante 4 min., 4 veces con PBS 1X-Tween 20-0.05%. Finalmente, las placas fueron reveladas con 100 µl por pozo de TMB/E y leídas después de 10 min. a OD<sub>450nm</sub> en lector de ELISA TermoLab Systems Multiscan Ascent.

# R E S U L T A D O S

## 1. Amplificación por PCR del gen *mt1866*

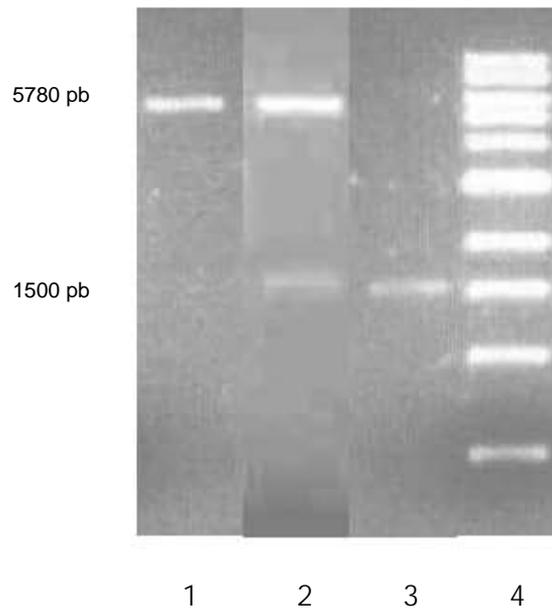
La amplificación del gen *mt1866* a partir del DNA genómico de la cepa CDC1551 de *M. tuberculosis*, se ilustra en la Figura 17. Se logró la amplificación óptima de esta secuencia de 1580 pb. a una concentración de  $\text{MgSO}_4$  1mM.



**Figura 17.** Gel de agarosa al 0.8%. Resultado de la amplificación por PCR del gen *mt1866*. Carril 1: MPM, Carril 2: *mt1866* con 1mM  $\text{MgSO}_4$ , Carril 3: *mt1866* con 1.5mM  $\text{MgSO}_4$ , Carril 4: *mt1866* con 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , Carril 5: *mt1866* con 2.5mM  $\text{MgSO}_4$  y Carril 6: Control negativo (C-).

## 2. Clonación de *mt1866* en pET-15b

El plásmido pET-15b de 5780 pb., conteniendo el inserto de 1580 pb que corresponde al gen *mt1866* se muestra en la Figura 18. La construcción pET-15b/*mt1866* se corroboró mediante secuenciación. La digestión pET-15b/*mt1866* con *Bam*HI y *Nde*I genera los fragmentos esperados de 5780 y 1580 pb.

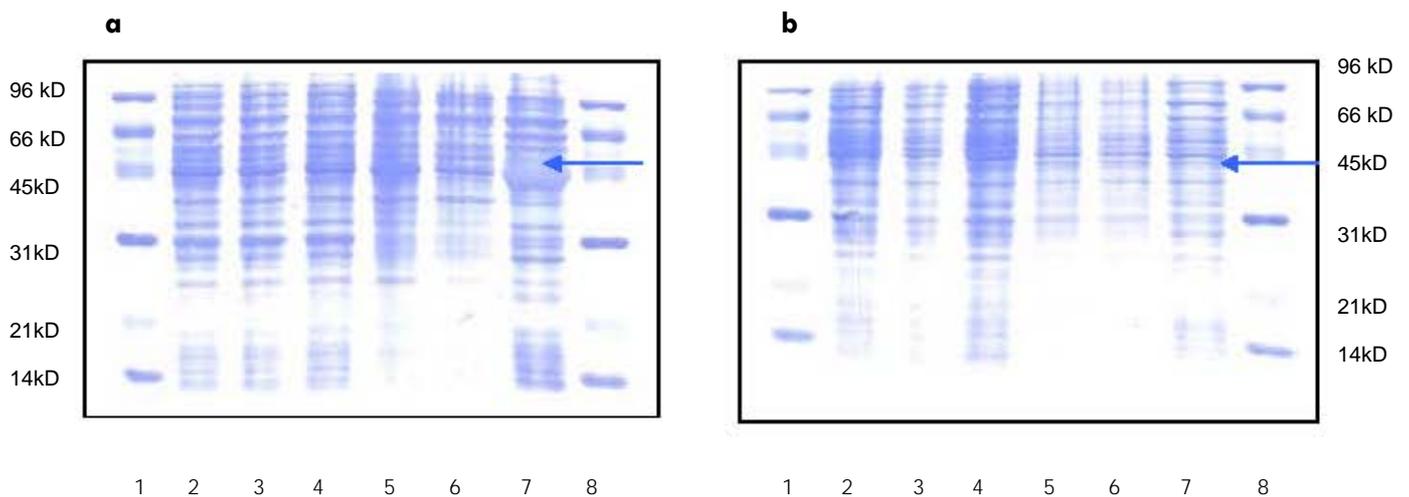


**Figura 18.** Gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: vector linearizado previa clonación; carril 2: patrón de digestión con las enzimas *Bam*HI y *Nde*I. Se aprecia el pET-15b linearizado a la altura de 5780 pb y el gen *mt1866* a la altura de 1580 pb, carril 3: *mt1866* puro.; carril 4: Peso molecular.

El proceso de amplificación, clonación y expresión del gen *rv1818c* en pET-15b fue realizado de la misma manera que para el gen *mt1866* (como parte de la tesis doctoral de Ingrid Cohen).

### 3. Expresión de las proteínas recombinantes MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> y Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup>

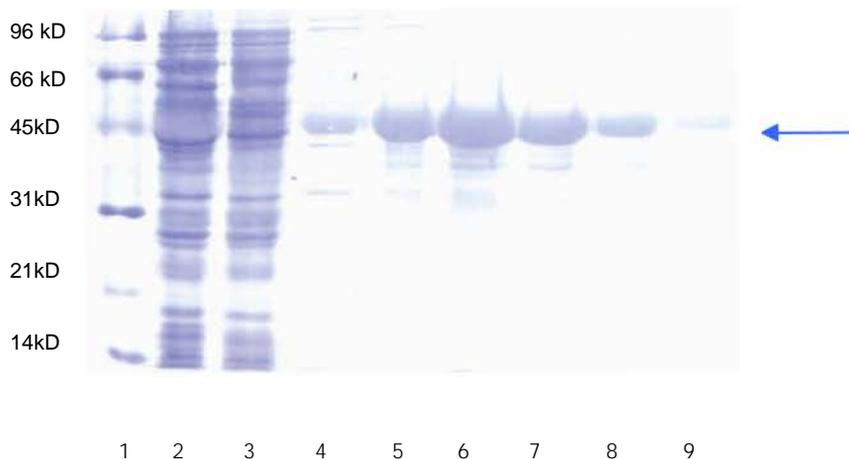
Las proteínas recombinantes MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> y Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> esperadas en el peso molecular de 45 kD, se obtuvieron en cuerpos de inclusión que fueron solubilizados con un buffer de lisis en presencia de Urea 8M, como se muestra en la figura 19, las proteínas Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> se expresan en buena cantidad. Se puede observar que existe proteína recombinante acumulada en cuerpos de inclusión en el lisado total de *E. coli*. Al separar las fracciones *pellet* y sobrenadante, se puede observar que existe proteína en ambas, sin embargo, se aprecia mayor cantidad en el primero. Al efectuar los lavados con Tritón X-100, se eliminan muchas proteínas de *E. coli* y con ello se obtiene una muestra más pura a pasar por la Columna de purificación.



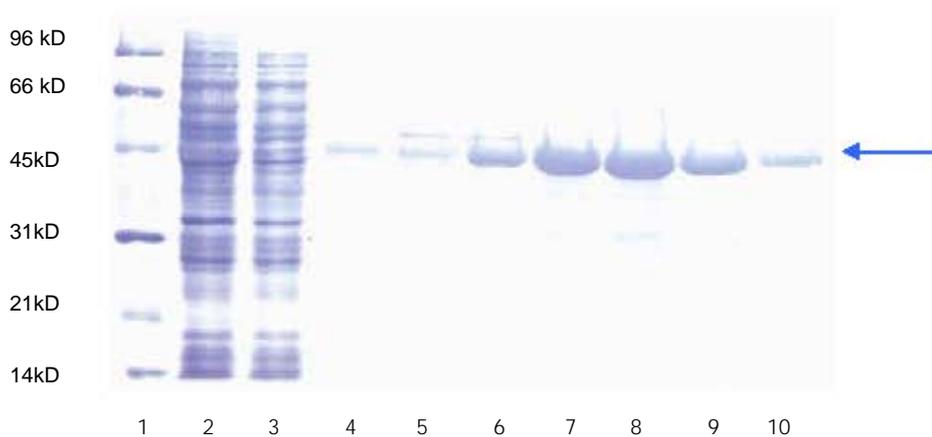
**Figuras 19a y 19b.** SDS-PAGE al 12%. a) Cuerpos de inclusión con la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y b) de MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>. Carril 1: PM, Carril 2: Lisado total de *E. coli*, Carril 3: Pellet, Carril 4: Sobrenadante, Carril 5: 1<sup>er</sup> lavado con Tritón X-100 2%, Carril 6: 2<sup>o</sup> lavado, Carril 7: Cuerpos de inclusión antes de Columna de purificación por níquel, Carril 8: PM. Las flechas indican las bandas de las proteínas expresadas de interés.

#### 4. Purificación de las proteínas recombinantes Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>

Las proteínas recombinantes Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> se purificaron por Cromatografía de afinidad en columna de níquel y se ilustran en las figuras 20a y 20b. Como resultado de la purificación, se obtuvieron buenas cantidades de las proteínas de interés. Se puede observar que existen buenas cantidades de proteína antes de pasarla por la Columna de purificación y que en la fracción no pegada se eliminan la mayoría de las proteínas de *E. coli*. Aunque la purificación fue exitosa, no fue suficientemente eficiente para obtener a ambas proteínas en su máximo estado de pureza, debido a la ligera presencia de contaminantes de *E. coli*.



**Figura 20a.** SDS-PAGE al 12%. Membrana de PVDF teñida con Azul de Coomassie. Fracciones resultado de la purificación por afinidad a níquel de la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup>. Carril 1: PM, Carril 2: Antes de pasar por la Columna, Carril 3: Fracción no pegada. Carriles 4 a 9: Fracciones resultado de la purificación donde se encuentra la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup>. La flecha indica la banda de la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> ubicada a los 45kD.



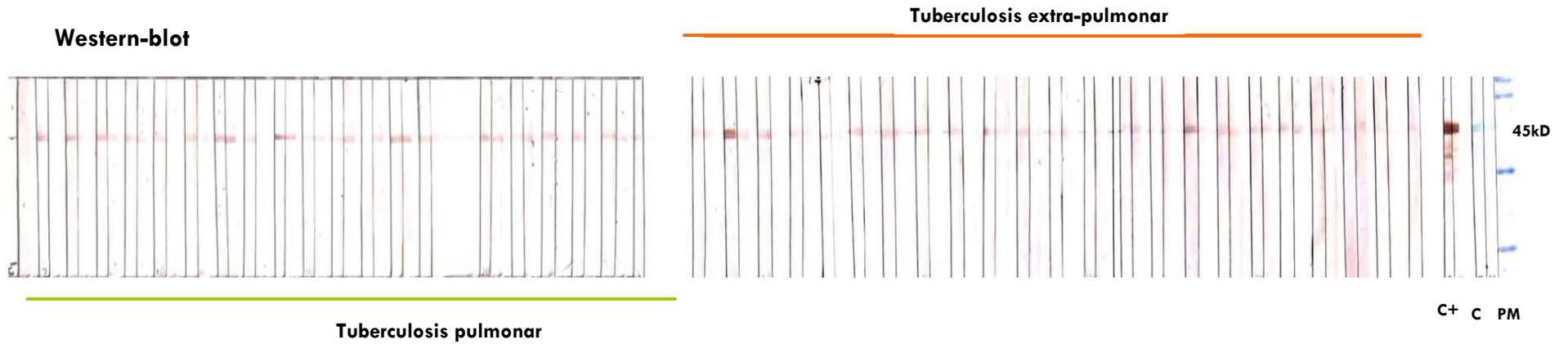
**Figura 20b.** SDS-PAGE al 12%.Fracciones resultado de la purificación por afinidad a níquel de la proteína MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>. Carril 1: PM, Carril 2: Antes de pasar por la Columna, Carril 3: Fracción No pegada a la Columna, Carriles 4 a 10: Fracciones resultado de la purificación donde se encuentra la proteína MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>. La flecha indica la banda de la proteína MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> ubicada a los 45kD.

## 5. Inmuno-blot y ELISA

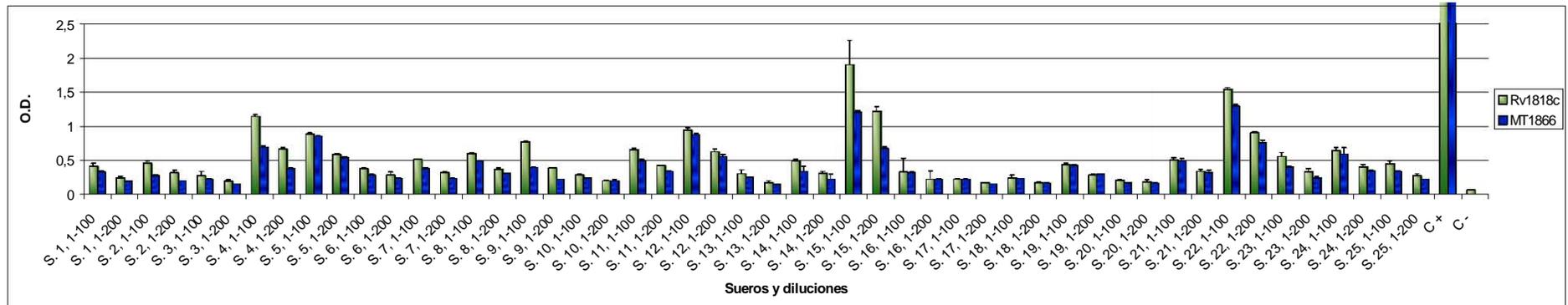
Los antígenos Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> purificados por Cromatografía de afinidad a níquel se analizaron por Western-blot y ELISA con 25 sueros de pacientes enfermos con tuberculosis comprobada. Asimismo, los antígenos fueron probados frente a 25 sueros de individuos sanos categorizados en PPD positivos y PPD negativos como se muestran en las figuras 21 a 25. De cada suero se probaron 2 diluciones seriadas, 1:100 y 1:200. Se puede observar que en ambas diluciones hubo reconocimiento por parte de los anticuerpos IgG1 de pacientes enfermos con tuberculosis, tanto pulmonar como extra-pulmonar así como también de los individuos sanos, tanto PPD positivos como PPD negativos cuando fueron probados por Western-blot y ELISA frente a ambos antígenos (Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>). Cuando se analizan comparativamente los resultados obtenidos por Western-blot y ELISA de los individuos sanos y de los pacientes enfermos con tuberculosis, se puede observar que de manera general hay más sueros reactivos en el grupo de los enfermos con tuberculosis. Interesantemente, algunos sueros provenientes de individuos sanos PPD negativos,

presentaron alta reactividad. En algunos casos, el reconocimiento de los anticuerpos se observa igual o muy similar contra ambos antígenos, en ambos grupos, sin embargo, se aprecia un mayor reconocimiento de la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> en todos los sueros probados cuando se compara con la reactividad de la MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>.

En las figuras 23 a 25 se puede analizar comparativamente la reactividad de los antígenos Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> por cada suero probado, tanto de los pacientes enfermos con tuberculosis (figura 23) como de los individuos sanos (figura 24) así como de ambos grupos (figura 25) haciéndose evidente que existen muchos sueros de ambos grupos que reconocen diferencialmente a los antígenos utilizados en este estudio. Asimismo, se puede observar que existen otros sueros cuyo reconocimiento antigénico es muy parecido, o incluso parece igual. En todos los casos presentados, la tendencia existente señala un mayor reconocimiento antigénico de la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> al compararlo con el de la MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>.

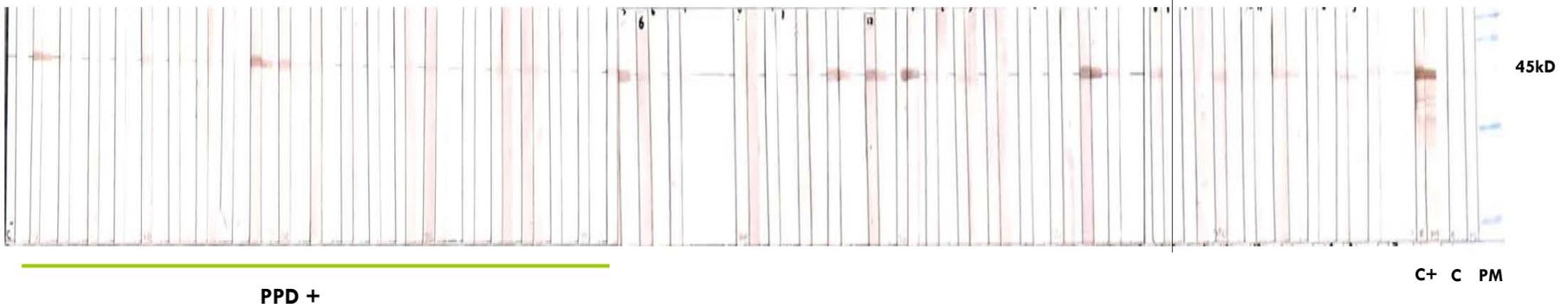


**ELISA**

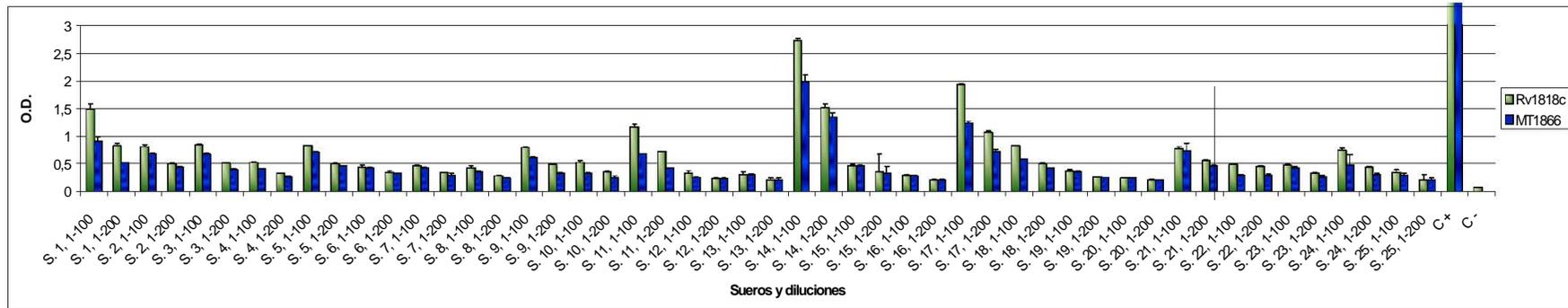


**Figura 21.** Western-blot y ELISA. Se aprecian las diferencias en el reconocimiento por parte de anticuerpos de sueros de pacientes enfermos con tuberculosis frente a los antígenos recombinantes Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>. La línea verde comprende a los individuos con tuberculosis pulmonar y la línea naranja los individuos con tuberculosis extra-pulmonar. De cada par de tiras presentado en el Western-blot, la primera de ellas corresponde a la Rv1818c y la segunda, que está justo a su lado, a la MT1866. S: suero. C+ Suero hiperinmune, C: Coomassie Tinción de, PM: Marcador de peso molecular.

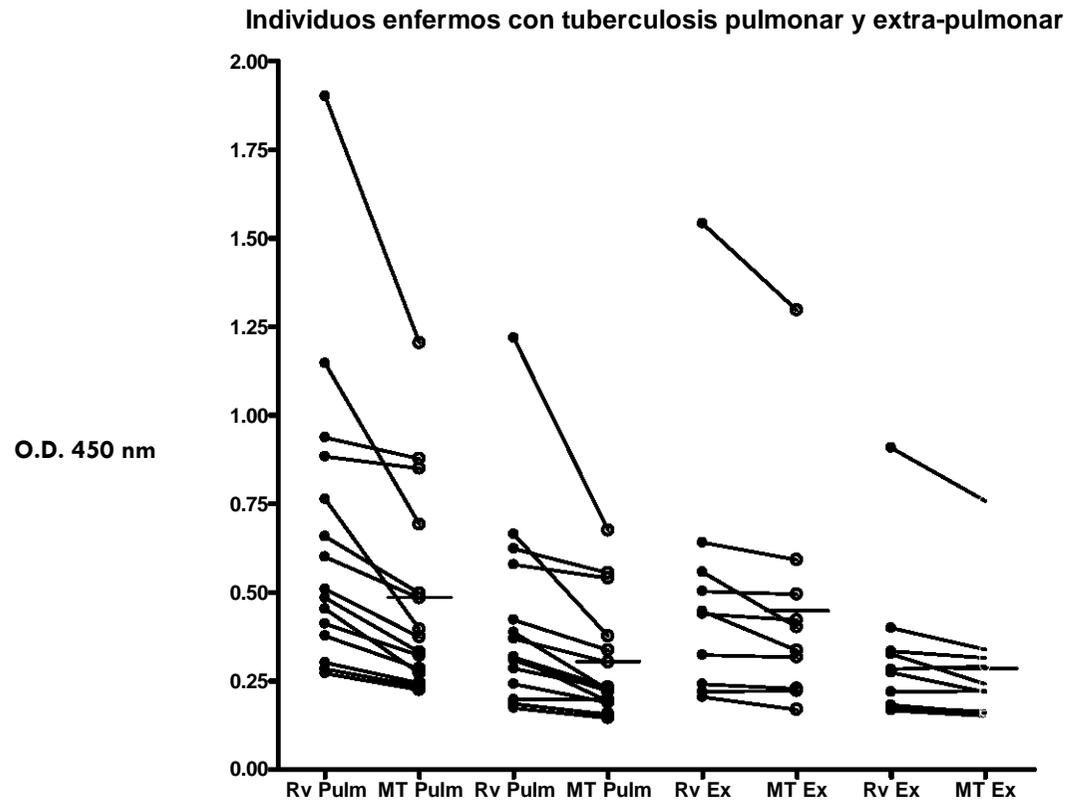
**Western-blot**



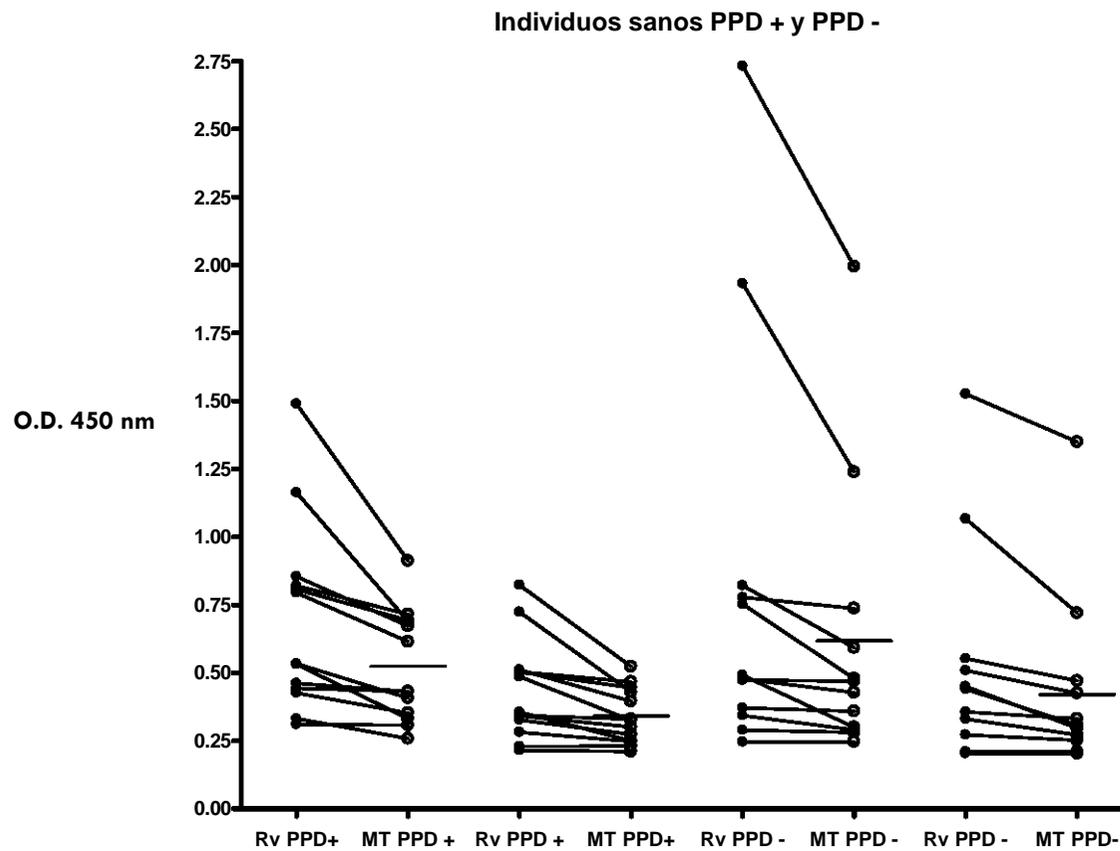
**ELISA**



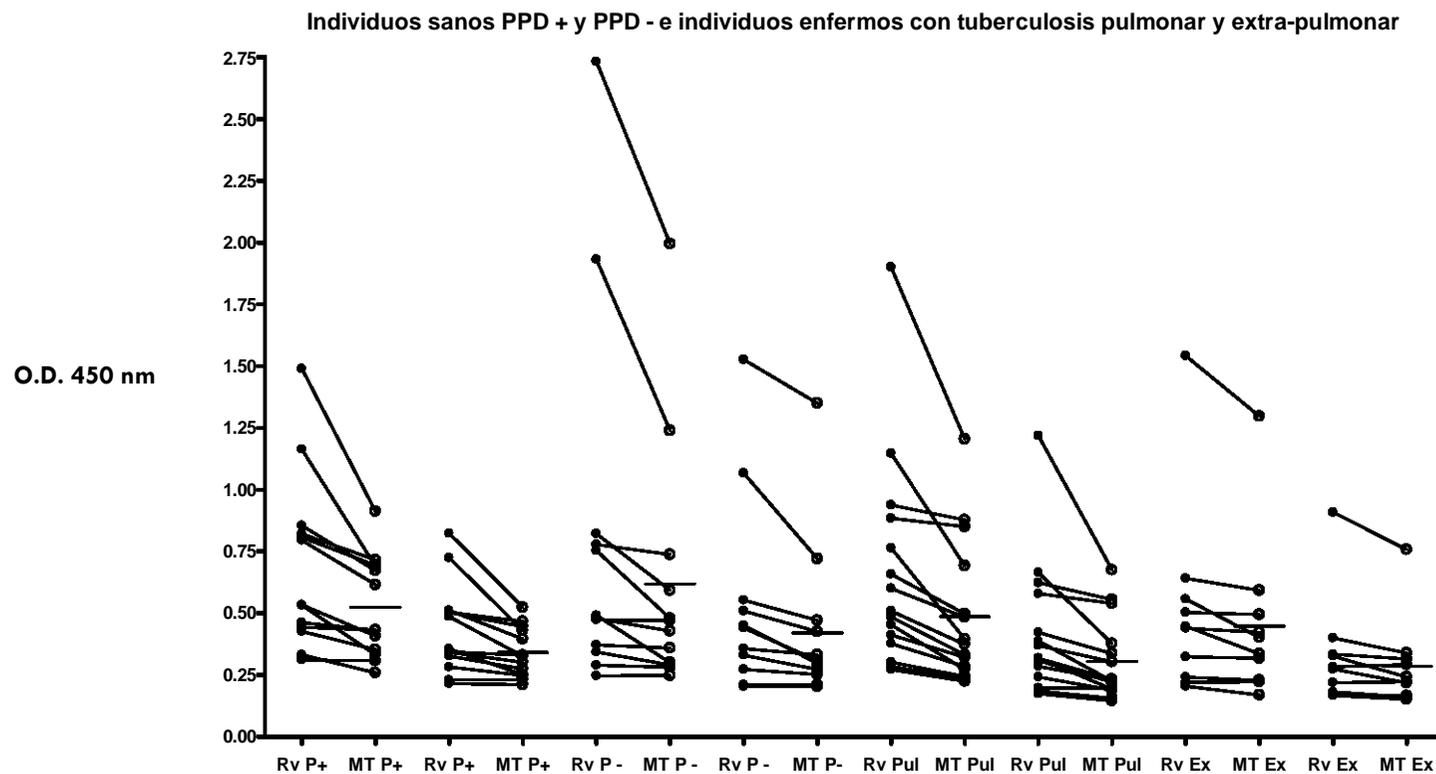
**Figura 22.** Western-blot y ELISA. Se aprecian las diferencias en el reconocimiento por parte de anticuerpos de sueros de individuos sanos frente a los antígenos recombinantes Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>. La línea verde abarca los individuos PPD + y la línea naranja los individuos PPD -. De cada par de tiras presentado en el Western-blot, la primera de ellas corresponde a la Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y la segunda, que está justo a su lado, a la MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>. S: suero. C+ Suero hiperinmune, C: Coomassie Tinción de, PM: Marcador de peso molecular.



**Figura 23.** Reactividad de los individuos enfermos con tuberculosis pulmonar y extra-pulmonar frente a los antígenos Rv1818c y MT1866 por ELISA. El primer par de datos presentados equivalen a la dilución 1:100 y el segundo a la 1:200; asimismo, el tercer par de datos equivalen a la 1:100 y el cuarto a la 1:200. La línea observada completamente horizontal es la media. Rv: Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup>, MT: MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>, Pulm: tuberculosis pulmonar, Ex: tuberculosis extrapulmonar.



**Figura 24.** Reactividad de los individuos sanos frente a los antígenos Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> por ELISA. El primer par de datos presentados equivalen a la dilución 1:100 y el segundo a la 1:200; asimismo, el tercer par de datos equivalen a 1:100 y el cuarto par de datos a 1:200. Los individuos fueron categorizados en PPD + y PPD -. La línea observada completamente horizontal es la media. Rv: Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup>, MT: MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>, PPD: Purified Protein Derivative (Prueba de la tuberculina).



**Figura 25.** Reactividad de los individuos sanos y enfermos con tuberculosis frente a los antígenos Rv1818c y MT1866 por ELISA. El primer par de datos presentados equivalen a la dilución 1:100 y el segundo a la 1:200; asimismo, el tercer par de datos equivalen a la 1:100 y el cuarto par de datos a la 1:200; el patrón de dilución continúa en el 5° par de datos: 1:100, 6° par, 1:200, 7° par, 1:100 y 8° par, 1:200. Los individuos fueron categorizados en PPD + y PPD -, Enfermos con tuberculosis pulmonar y extra-pulmonar. La línea observada completamente horizontal es la media. Rv: Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup>, MT: MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>, P: (PPD) Purified Protein Derivative (Prueba de la tuberculina), P+: PPD +, P-: PPD -, Pul: tuberculosis pulmonar, E: tuberculosis extra-pulmonar.

## D I S C U S I Ó N

Hasta la fecha, el papel que poseen las proteínas de la familia PE durante la infección por *M. tuberculosis* es un misterio. Se desconoce la función o funciones de la mayoría de estas proteínas. Sin embargo, se ha sugerido el papel de algunas de ellas en la interacción bacteria-bacteria y bacteria-hospedero<sup>56</sup>. Muchas proteínas PE\_PGRS son blanco de la respuesta inmune por parte del hospedero. Se sabe también que la familia PE está restringida a miembros del complejo *M. tuberculosis*, donde además de este último se encuentran *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti* y *M. microti*, todas ellas patógenas, encontrándose, además, en otras pocas especies micobacterianas<sup>1,60,76,77</sup>.

Dado el alto grado de polimorfismos intra e intercepas presentes en las secuencias PE\_PGRS, se ha postulado que éstas podrían representar una fuente de variación antigénica para *M. tuberculosis*<sup>40</sup>. Esta posibilidad es relevante en cuanto a la respuesta inmune montada por el hospedero. Para estudiar el posible papel de las proteínas PE\_PGRS en la variación antigénica se requiere no sólo de un cuidadoso y extenso análisis a nivel de los polimorfismos en estos genes sino también de sus dominios inmunodominantes. Por ejemplo, la investigación a nivel de respuesta inmune contra las proteínas PE\_PGRS ha sugerido que el dominio PGRS, que es donde se encuentran los polimorfismos, contiene principalmente epítopes para células B. Los antisueros contra una proteína recombinante PE\_PGRS puede dar reactividad cruzada con otras proteínas PE\_PGRS, pero no con todas. Esto sugiere que existen epítopes compartidos entre algunas de ellas, pero que los cambios introducidos en las secuencias por

inserciones y/o deleciones pueden modificar el reconocimiento por los anticuerpos.

Además, se ha propuesto que estos genes, al ser tan abundantes en el genoma (más del 4% total) representan una fuente importante de adaptación al encontrar nichos adversos en el hospedero. Dadas estas características, no podemos pasar por alto que estos genes podrían estar jugando un papel importante para la micobacteria, sin embargo, el panorama se torna complejo de interpretar dado que, por ejemplo, se han encontrado muy pocos genes PE posiblemente funcionales para *M. leprae*, sin dejar de mencionar que no se han hallado genes PE\_PGRS (aunque se han detectado 30 pseudogenes)<sup>1</sup>.

En este trabajo se utilizó la secuencia codificada por el gen *rv1818c* de *M. tuberculosis* H37Rv como miembro representativo de la familia PE. *Rv1818c* es altamente homólogo con muchos de los genes PE\_PGRS, tiene un tamaño promedio dentro de la subfamilia PE\_PGRS y muestra 60% de identidad con el gen *Rv1756c*. Como muchos otros genes PE\_PGRS, *rv1818c* codifica para una proteína con alto contenido de alanina (20%) y glicina (41%) encontrándose en repeticiones a lo largo del dominio PGRS. Además, la región N-terminal de este gen es altamente homólogo con los genes PE.

Desde hace algunos años, se dilucidó el papel del dominio PGRS en cuanto a blanco de la respuesta inmune humoral: la principal respuesta de los anticuerpos en el hospedero humano están dirigidos contra epítopes ubicados en el dominio PGRS, que es rico en glicina y alanina, en la proteína *Rv1818c*<sup>PE\_PGRS</sup>, fenómeno que no sucede cuando sólo se trata del dominio PE, es decir, los anticuerpos no reconocen este dominio<sup>58</sup>. Interesantemente, la proteína EBNA 1

del virus del Epstein-Barr, que tiene homología con las proteínas PE\_PGRS, es igualmente blanco de la respuesta inmune humoral en el hospedero humano<sup>54</sup>.

Hasta la fecha, no se ha demostrado la expresión de la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> *in vivo* durante la infección por *M. tuberculosis*. Abundantes trabajos han sugerido su participación en la interacción bacteria-bacteria y bacteria-hospedero, mas no se ha dilucidado su papel durante la infección activa, latente o en algún momento particular (colonización, diseminación, entre otros).

En este trabajo, merece especial atención tener en cuenta que existen múltiples factores que intervienen en la infección del hospedero por parte de *M. tuberculosis*. Se demostró que las diferencias en reconocimiento por los anticuerpos IgG1 encontradas entre las proteínas Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> apoyan la idea de la variación antigénica en *M. tuberculosis* dado que en todos los casos analizados, la reactividad contra la Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> fue mayor en comparación con la MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>, la cual tiene una delección de 30 aa y una inserción de 3 aa en el dominio PGRS con respecto a la primera. Se detectaron anticuerpos IgG1 porque además de ser el anticuerpo más abundante en el suero humano, con cerca del 80% del total de anticuerpos, está fuertemente relacionado con la respuesta inmune adaptativa o de memoria. Es capaz de fijar complemento, y tanto los macrófagos, monocitos, neutrófilos y algunos linfocitos tienen receptores para la región Fc de la IgG (FcγR). La unión de complejos antígeno-IgG a las células induce internalización, fagocitosis, activación de funciones efectoras, secreción de citocinas e inmunoregulación. Sus niveles son altos durante la mayoría de la vida media de un individuo<sup>83</sup>.

Por otro lado, en este trabajo se observaron sueros de individuos sanos PPD negativos, que reaccionaron considerablemente contra los antígenos Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>. Para este caso, no podemos descartar que la respuesta sea debido a la vacunación. Se debe tomar en cuenta que la vacunación con BCG podría generar anticuerpos contra antígenos comunes entre *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis*, ambos miembros del complejo *M. tuberculosis*. Aunado a esto, es importante tener en cuenta que la prueba de la tuberculina, utilizada desde hace más de 100 años por su bajo costo y aparente buen resultado, tiene limitaciones, entre las que se encuentran su poca o nula capacidad para discriminar a individuos infectados activamente de aquellos que han sido infectados pero que tienen un estado de infección latente.

Asimismo, se debe considerar que puede haber variación en cuanto al montaje de la respuesta inmune de cada hospedero contra antígenos de *M. tuberculosis*. A pesar de ello, las diferencias encontradas en el reconocimiento por parte de anticuerpos IgG1 contra las dos proteínas recombinantes utilizadas en este trabajo se mantienen, en razón de mayor reconocimiento contra la Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> respecto de su ortóloga la MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>.

Este trabajo no persigue objetivos de diagnóstico de la enfermedad. Existen individuos sanos PPD negativos que reconocieron los antígenos recombinantes. Todo esto se une a la controversia que desata la categorización basada en la prueba de la tuberculina, la cual no distingue tuberculosis activa de tuberculosis latente.

Tanto en los individuos sanos como en los enfermos con tuberculosis, el reconocimiento de anticuerpos IgG1 puede deberse a efectos de la vacunación con BCG, haciendo notar que a pesar de ello las diferencias en el reconocimiento

contra las proteínas recombinantes utilizadas en este trabajo perduran, manteniéndose por encima la respuesta contra la Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> respecto de la MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>. La diferencia en la reactividad en cada suero de los grupos evaluados en este trabajo no puede deberse a reactividad cruzada con otras PE\_PGRS dado que no comparten epítopes como el que se pierde en la MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>.

Dado que la única diferencia entre ambas proteínas es la delección de 30 aa en la proteína MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> así como la inserción de 3 de éstos, ambas en el dominio PGRS, en comparación con la Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup>, las diferencias encontradas en el reconocimiento por parte de anticuerpos humanos IgG1 se atribuyen a estos cambios, lo cual pone de manifiesto la importancia que representa para la micobacteria variar su perfil antigénico intra e inter cepas.

## C O N C L U S I O N E S

- Los cambios presentados en la proteína MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> de *M. tuberculosis* CDC1551 afectan el reconocimiento de la misma por los anticuerpos humanos provenientes tanto de individuos sanos como de enfermos con tuberculosis.
- La disminución en el reconocimiento de la proteína MT1866<sup>PE\_PGRS</sup> de *M. tuberculosis* CDC1551 por parte de los anticuerpos humanos cuando se compara con la proteína Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> de *M. tuberculosis* H37Rv, sugiere que los cambios presentados afectan su antigenicidad.
- Basados en los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede proponer que las variaciones (inserciones/delecciones) que se presentan en las secuencias de los genes PE\_PGRS en las diferentes cepas de *M. tuberculosis* son recursos potenciales de variación antigénica.

# A N E X O I

## REACTIVOS UTILIZADOS:

### Reactivo: Buffer de carga 2X

#### Preparación:

SDS:	2%
Glicerol:	20%
Buffer Stacking Gel 4X:	25%
Azul de bromofenol:	0.0025%

### Reactivo: Solución Azul de Coomassie

#### Preparación:

Brillant Blue R-250 Coomassie. Lab. Bio-Rad 0.1%

Para 200 ml:

Coomassie R-250:	0.2g
Metanol 50%:	100 ml
Ácido acético 7%:	14ml

## SDS-PAGE

### *Gel separador al 12%*

#### Preparación:

Resolving Gel Buffer 4X (Tris 1.5M pH 8.8, SDS 0.4%)	2.5 ml
H <sub>2</sub> O	3.5 ml
Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 0.8% (Bio-Rad)	4.0 ml
Persulfato de amonio (APS) 10%	100 µl
TEMED (N´N´N´N-tetramethylenediamina)	10µl

### **Gel concentrador 4.5%**

#### **Preparación:**

Stacking Gel Buffer 4X Tris 0.5M pH 6.8, SDS 0.4%	1.25 ml
H <sub>2</sub> O	3.0 ml
Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 0.8% (Bio-Rad)	0.75 ml
Persulfato de amonio (APS) 10%	50 µl
TEMED (N´N´N´N-tetramethylenediamina)	10 µl

### **Soluciones utilizadas**

#### *PBS (Solución amortiguadora 10X)*

#### **Preparación:**

NaCl	87.6 gr.
Fosfato de sodio dibásico 1 M (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	77.4 ml
Fosfato de sodio monobásico monohidratado (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O)	22.6 ml

Volumen final: 1000 ml

Solución PBS 1X queda así: pH 7.4, 150 mM NaCl y 0.01 M Fosfatos

#### *Buffer TE, pH 8.0*

#### **Preparación:**

Tris 10mM	1.0 ml
EDTA 1 mM	0.2 ml

Se adicionan 100 ml de agua destilada.

#### *Buffer de Carbonatos, pH 9.6*

#### **Preparación:**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.795 gr
NaHCO <sub>3</sub>	1.465 gr

Se adicionan 500 ml de agua grado reactivo (Milli-Q).

## **Inmuno-blot**

Una vez realizada la electroforesis de las proteínas en geles de poliacrilamida, se transfirieron a membranas de nylon PVDF Immobilion-P. Millipore, Co., Bedford, Mass. (estas membranas deben ser activadas con metanol durante 5 minutos previa transferencia)

Anticuerpo policlonal anti-Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> hecho en conejo.

Proteína A-HRP	Zymed Núm. Catálogo: 10-1123
Polioxietileno sorbital onolaurato Tween-20	Sigma Núm. Catálogo: P-1379
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma Núm. Catálogo: A9647
3´3-diaminobenzidine tetrahydrochloride	Sigma Núm. Catálogo: D5637

## **Cromatografía de Afinidad a níquel**

Columna de níquel	Pharmacia Ni++ NTA Superflow column
HPLC	Bio-Rad

## A N E X O II

Incidencia mundial estimada de tuberculosis por cada 100,000 habitantes por año OMS, 2003	
Cifras representativas por país	
País	2003
Afganistán	333
Albania	23
Argelia	53
Samoa americana	30
Andorra	19
Angola	259
Anguila	25
Antigua y Barbuda	7
Argentina	44
Armenia	70
Australia	6
Austria	14
Azerbaijan	76
Bahamas	40
Bahrein	46
Bangladesh	246
Barbados	12
Belarus	53
Bélgica	14
Belice	56
Benin	87
Bermudas	4
Bhután	110
Bolivia	225
Bosnia y Herzegovina	55
Botswana	633
Brasil	62
Islas vírgenes británicas	15
Brunei Darussalam	54
Bulgaria	43
Burkina Faso	163
Burundi	346
Camboya	508
Camerún	180
Canadá	6
Cabo Verde	168
Islas Caimán	4
República Centroafricana	325
Chad	226
Chile	16
China	102
Colombia	52
El Comoro	50
Congo	380
Islas Cook	30
Costa Rica	15
Croacia	43
Cuba	11
Chipre	4

República Checa	12
Côte d'Ivoire	396
República popular democrática de Corea	178
República democrática del Congo	369
Dinamarca	8
Djibouti	735
Dominica	16
República Dominicana	96
Ecuador	138
Egipto	28
El Salvador	57
Guinea ecuatorial	193
Eritrea	272
Estonia	50
Etiopía	356
Fiji	30
Finlandia	9
Francia	12
Polinesia francesa	30
Gabón	233
Gambia	234
Georgia	83
Alemania	8
Ghana	210
Grecia	20
Greenland	8
Grenada	5
Guam	60
Guatemala	74
Guinea	236
Guinea-Bissau	199
Guyana	130
Haití	323
Honduras	81
Hungría	29
Islandia	3
India	168
Indonesia	285
Iran, República Islámica de	28
Iraq	157
Irlanda	12
Israel	9
Italia	7
Jamaica	8
Japón	31
Jordania	5
Kazakhstan	145
Kenia	610
Kiribati	60
Kuwait	27
Kyrgyzstan	124
República Democrática de Laos	157
Latvia	75
Líbano	12

Lesotho	733
Liberia	251
Jamahiriya árabe Libia	21
Lituania	70
Luxemburgo	12
Madagascar	216
Malawi	442
Malaysia	106
Maldivias	45
Malí	288
Malta	6
Islas Marshall	60
Mauritania	287
Isla Mauricio	64
México	33
Micronesia, Estados federales de	60
Mónaco	2
Mongolia	194
Montserrat	9
Marruecos	112
Mozambique	457
Myanmar	171
Namibia	722
Nauru	30
Nepal	211
Países bajos	8
Países bajos, antillas	9
Nueva Caledonia	60
Nueva Zelandia	11
Nicaragua	63
Níger	158
Nigeria	293
Niue	30
Islas Mariana, al norte	60
Noruega	6
Omán	11
Pakistán	181
Palau	60
Panamá	48
Papúa Nueva Guinea	235
Paraguay	70
Perú	188
Filipinas	296
Polonia	31
Portugal	45
Puerto Rico	6
Qatar	61
República de Corea	87
República de Moldova	139
Romania	149
Federación Rusa	112
Rwanda	374
Santo Kitts y Nevis	11
Santa Lucía	17

San Vicente y Isd Grenadines	29
Samoa	30
San Marino	6
Sao Tome y Príncipe	108
Arabia Saudita	40
Senegal	245
Serbia y Montenegro	35
Sicilia	35
Sierra Leona	427
Singapur	41
Eslovaquia	24
Eslovenia	18
Islas Salomón	60
Somalia	412
Sudáfrica	536
España	27
Sri Lanka	60
Sudán	220
Surinam	69
Swazilanda	1083
Suecia	4
Suiza	7
República árabe siria	42
Tajikistán	168
Tailandia	142
República Yugoslava de Macedonia	31
Timor-Leste	556
Togo	351
Tokelau	30
Tonga	30
Trinidad y Tobago	9
Tunisia	22
Turquía	26
Turkmenistán	67
Turcos e Islas Caicos	20
Tuvalu	30
Uganda	411
Ucrania	92
Emiratos árabes unidos	18
Reino unido de Gran Bretaña e Irlanda del norte	12
República de Tanzania	371
Islas vírgenes de Estados Unidos	11
Estados Unidos de América	5
Uruguay	28
Uzbekistán	115
Vanuatu	60
Venezuela	42
Vietnam	178
Islas Wallis y Futuna	30
Cisjordania y Gaza	24
Yemen	93
Zambia	656
Zimbawe	659

Tomado de: <http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/reportData.asp?rptType=1>

Prevalencia mundial estimada de tuberculosis por cada 100,000 habitantes por año OMS, 2003	
Cifras representativas por país	
País	2003
Afganistán	671
Albania	33
Algeria	53
Samoa americana	54
Andorra	17
Angola	256
Anguila	40
Antigua y Barbuda	10
Argentina	55
Armenia	89
Australia	6
Austria	12
Azerbaijan	109
Bahamas	52
Bahrein	52
Bangladesh	490
Barbados	14
Belarus	59
Bélgica	12
Belice	56
Benin	141
Bermudas	7
Bhután	194
Bolivia	301
Bosnia y Herzegovina	63
Botswana	342
Brasil	91
Islas Vírgenes Británicas	24
Brunei Darussalam	61
Bulgaria	47
Burkina Faso	303
Burundi	519
Camboya	742
Camerún	221
Canadá	4
Cabo Verde	328
Islas Caimán	7
República Centroafricana	493
Chad	439
Chile	17
China	245
Colombia	80
Comoro	103
Congo	489
Islas Cook	59
Costa Rica	18
Croacia	68

Cuba	13
Chipre	4
República Checa	12
Côte d'Ivoire	618
República Popular Democrática de Corea	187
República Democrática del Congo	537
Dinamarca	6
Djibouti	988
Dominica	23
República Dominicana	123
Ecuador	209
Egipto	36
El Salvador	78
Guinea ecuatorial	351
Eritrea	431
Estonia	53
Etiopía	507
Fiji	38
Finlandia	10
Francia	12
Polinesia Francesa	38
Gabón	242
Gambia	337
Georgia	95
Alemania	7
Ghana	369
Grecia	22
Greenland	6
Grenada	8
Guam	105
Guatemala	104
Guinea	394
Guinea-Bissau	300
Guyana	178
Haití	386
Honduras	102
Hungría	33
Islandia	3
India	287
Indonesia	674
Irán (República Islámica de)	36
Iraq	236
Irlanda	12
Israel	8
Italia	6
Jamaica	9
Japón	42
Jordania	5
Kazakhstan	152
Kenia	821
Kiribati	60
Kuwait	31

Kyrgyzstan	140
República Popular Democrática de Laos	327
Latvia	78
Líbano	13
Lesotho	390
Liberia	484
Jamahiriya Árabe Libia	21
Lituania	73
Luxemburgo	10
Madagascar	325
Malawi	469
Malasia	135
Maldivias	39
Malí	582
Malta	6
Islas Marshall	60
Mauritania	664
Isla Mauricio	136
México	45
Micronesia (Estados Federales de )	62
Mónaco	2
Mongolia	237
Montserrat	12
Morocco	105
Mozambique	557
Myanmar	183
Namibia	477
Nauru	36
Nepal	316
Países Bajos	6
Antillas de los Países Bajos	18
Nueva Caledonia	103
Nueva Zelanda	11
Nicaragua	78
Níger	272
Nigeria	518
Niue	59
Islas Marianas del Norte	67
Noruega	5
Omán	12
Pakistán	358
Palau	76
Panamá	52
Papúa Nueva Guinea	527
Paraguay	105
Perú	231
Filipinas	458
Polonia	34
Portugal	37
Puerto Rico	8
Qatar	72
República de Corea	118

República de Moldova	177
Rumania	194
Federación Rusa	157
Rwanda	628
Saint Kitts y Nevis	16
Santa Lucía	22
San Vicente y las Granadinas	40
Samoa	44
San Marino	5
Sao Tome y Príncipe	256
Arabia Saudita	57
Senegal	429
Serbia y Montenegro	44
Seychelles	65
Sierra Leona	794
Singapur	42
Eslovaquia	29
Eslovenia	22
Islas Salomón	60
Somalia	748
Sudáfrica	341
España	27
Sri Lanka	89
Sudán	355
Surinam	102
Swazilanda	683
Suecia	4
Suiza	7
República árabe suiza	52
Tajikistán	267
Tailandia	203
República Yugoslava de Macedonia	37
Timor-Leste	753
Togo	673
Tokelau	59
Tonga	44
Trinidad y Tobago	13
Túnez	24
Turquía	40
Turkmenistán	83
Islas Turcos y Caicos	31
Tuvalu	59
Uganda	621
Ucrania	133
Emiratos Árabes Unidos	26
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte	12
República Unida de Tanzania	476
Islas Vírgenes de los Estados Unidos	18
Estados Unidos de América	3
Uruguay	33
Uzbekistán	156
Vanuatu	71

Venezuela	52
Vietnam	238
Islas Wallis y Futuna	30
Cisjordania y Gaza	37
Yemen	151
Zambia	508
Zimbawe	500

Tomado de: <http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/reportData.asp?rptType=1>

Mortalidad mundial estimada por tuberculosis por cada 100,000 habitantes por año OMS, 2003	
Cifras representativas por país	
País	2003
Afganistán	93
Albania	4
Algeria	2
Samoa Americana	6
Andorra	2
Angola	20
Anguila	5
Antigua y Barbuda	1
Argentina	6
Armenia	11
Australia	1
Austria	1
Azerbaiján	11
Bahamas	6
Bahrein	5
Bangladesh	57
Barbados	2
Belarus	7
Bélgica	1
Belice	4
Benin	12
Bermudas	1
Bhután	21
Bolivia	33
Bosnia y Herzegovina	8
Botswana	34
Brasil	8
Islas Vírgenes Británicas	3
Brunei Darussalam	5
Bulgaria	6
Burkina Faso	33
Burundi	59
Camboya	81
Camerún	21
Canadá	1
Cabo Verde	39

Islas Caimán	1
República Centroafricana	54
Chad	48
Chile	1
China	18
Colombia	8
Comoro	8
Congo	57
Islas Cook	6
Costa Rica	1
Croacia	7
Cuba	1
Chipre	0
República Checa	1
Côte d'Ivoire	68
República Democrática de Corea	16
República Democrática del Congo	59
Dinamarca	1
Djibouti	98
Dominica	3
República Dominicana	15
Ecuador	27
Egipto	3
El Salvador	9
Guinea Ecuatorial	39
Eritrea	52
Estonia	7
Etiopía	60
Fiji	4
Finlandia	1
Francia	1
Polinesia Francesa	5
Gabón	23
Gambia	39
Georgia	13
Alemania	1
Ghana	41
Grecia	2
Greenland	1
Grenada	1
Guam	12
Guatemala	12
Guinea	43
Guinea-Bissau	34
Guyana	21
Haití	50
Honduras	12
Hungría	4
Islandia	0
India	31
Indonesia	65
Irán (República Islámica de)	3

Iraq	33
Irlanda	1
Israel	1
Italia	1
Jamaica	1
Japón	4
Jordania	0
Kazakhstán	19
Kenia	89
Kiribatí	4
Kuwait	3
Kyrgyzstán	18
República Popular Democrática de Laos	26
Latvia	11
Líbano	1
Lesotho	46
Liberia	53
Jamahiriya Árabe Libia	1
Lituania	9
Luxemburgo	1
Madagascar	36
Malawi	52
Malasia	16
Maldivias	2
Malí	64
Malta	1
Islas Marshall	4
Mauritania	73
Isla Mauricio	11
México	5
Micronesia (Estados Federales de )	6
Mónaco	0
Mongolia	32
Montserrat	1
Marruecos	10
Mozambique	62
Myanmar	24
Namibia	52
Nauru	4
Nepal	28
Países Bajos	1
Países Bajos, Antillas	2
Nueva Caledonia	11
Nueva Zelanda	1
Nicaragua	8
Níger	30
Nigeria	57
Niue	6
Islas Marianas del Norte	8
Noruega	1
Omán	1
Pakistán	43

Palau	8
Panamá	4
Papúa Nueva Guinea	47
Paraguay	12
Perú	22
Filipinas	49
Polonia	4
Portugal	5
Puerto Rico	1
Qatar	7
República de Corea	10
República de Moldovia	20
Rumania	20
Federación Rusa	19
Rwanda	69
San Kitts y Nevis	2
Santa Lucía	2
San Vicente y las Granadines	4
Samoa	5
San Marino	1
Sao Tome y Príncipe	28
Arabia Saudita	5
Senegal	47
Serbia y Montenegro	5
Seychelles	5
Sierra Leona	88
Singapur	5
Eslovaquia	4
Eslovenia	3
Islas Salomón	4
Somalia	118
Sudáfrica	28
España	3
Sri Lanka	9
Sudán	54
Surinam	12
Swazilanda	83
Suecia	0
Suiza	1
República Árabe Siria	5
Tajikistán	32
Tailandia	17
República Yugoslava de Macedonia	6
Timor-Leste	95
Togo	74
Tokelau	6
Tonga	5
Trinidad y Tobago	1
Túnez	2
Turquía	4
Turkmenistán	10
Islas Turcos y Caicos	3

<b>Tuvalu</b>	6
<b>Uganda</b>	71
<b>Ucrania</b>	12
<b>Emiratos Árabes Unidos</b>	2
<b>Reino Unido de Gran Bretaña y Norte de Irlanda</b>	1
<b>República Unida de Tanzania</b>	52
<b>Islas Vírgenes de los Estados Unidos</b>	2
<b>Estados Unidos de América</b>	0
<b>Uruguay</b>	3
<b>Uzbekistán</b>	16
<b>Vanuatu</b>	8
<b>Venezuela</b>	5
<b>Vietnam</b>	22
<b>Islas Wallis y Futuna</b>	2
<b>Cisjordania y Gaza</b>	4
<b>Yemen</b>	12
<b>Zambia</b>	61
<b>Zimbawe</b>	61

Tomado de : <http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/reportData.asp?rptType=1>

# G L O S A R I O

- $\mu\text{l}$  microlitros
- a.C. antes de Cristo
- aa aminoácidos
- Amp Ampicilina
- BSA *Bovine serum albumin*
- DAB Diaminobencidina
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- DNAsas Desoxirribonucleasas
- EBNA *Epstein-Barr Nuclear Antigen*
- ELISA *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- g gravedades
- GC Guanina-citosina
- Glu Ácido glutámico
- HPLC *High Performance Liquid Chromatography*
- IgG1 Inmunoglobulinas tipo 1
- IPTG Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido
- kD Kilodaltons
- LB Luria-Bertani, medio de cultivo
- M Molar
- *M. tuberculosis* *Mycobacterium tuberculosis*

- mg miligramos
- min minutos
- mM Milimolar
- NCBI *National Center Biotechnology Institute*
- ng nanogramos
- OADC *Ácido Oléico, Albúmina, Dextrosa y Catalasa*
- OMS *Organización Mundial de la Salud*
- pb pares de bases
- PBS *Phosphate buffer saline*
- PCR *Polimerase chain reaction*
- PE *Subfamilia PE (Pro-Glu)*
- PGRS *Polymorphic GC-rich repetitive sequences*
- PM *Peso molecular*
- PPD *Protein Purified Derivative*
- Pro *Prolina*
- PVDF *Polivinil-difluoride*
- RFLP *Restriction Fragment Length Polymorphism*
- RNAsas *Ribonucleasas*
- SDS-PAGE *Sodium-Duodecil-Sulfate-Poliacrilamide-Gel Electroforesis*
- TE *Tris-EDTA*
- Tm *temperatura de alineamiento*
- TMB/E *3,3',5'5'-tetramethybenzidine*

## B I B L I O G R A F Í A

1. Cole, S. T. 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*. 85, 2919-2928.
2. Crubezy E, Ludes B, Poveda J, Clayton J, Crouau R, Montagnon D. 1998. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian pott's disease of 5,400 years old. *C.R. Acad. Sci. III*. 321(11):941-51.
3. Kapur V, Whittam T, Musser J. 1994. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 year old? *J. Infect Dis*. 170(5):1348-9.
4. Das R. 2000. Tuberculosis. Historical Landmarks. *J. Indian Med. Assoc*. 98(3):112-114.
5. Bloom B.R., Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control. Ed. Howard Hughes Medical Research Institute/Albert Einstein College of Medicine. NY, USA. 1994. pp. 3-47.
6. Daniel T. 2000. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out?. *Int. J. Tuber lung Dis*. 4(5):395-400.
7. Cauten GM, Pio A, tem Dam HG. 2002. Annual Risk of Tuberculosis Infection. *Bull World Health Organ*. 80(6):503-11.
8. Gazzard B. 2001. Tuberculosis, HIV and the developing world. *Clin Med* 1(1): 62-8.
9. WHO Report 2002. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneva, Switzerland. WHO/CDS/TB/2002.295.
10. Davey S. 2001. New global plan to halt TB. *Bull World Health Organ*. 79(12):1172-3.
11. Shafer R, Edlin B. 1996. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade. *Clin Infect Dis*. 22:683-704.

12. Da Silva M. 2000. Perfil de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* aislados de pacientes portadores de HIV/AIDS atendidos en hospital de referencia. *J. Pneumol.* 26(1):25-30.
13. Raviglione M, Snider D, Kochi A. 1995. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity of a worldwide epidemic. *JAMA.* 273:220-6.
14. Dye C, Scheele P, Dolin V, Pathania M. 1999. The WHO Global Surveillance and Monitoring Project, Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 282:677-686.
15. Murray CJ, Styblo K, Rouillon A. 1990. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. *Bull Int Unión Tuberc Lug Dis.* 65(1): 6-24.
16. Rajagopalan S. 2001. Tuberculosis and Aging: A Global Health Problem. *Aging and Infectious diseases. Clin Infect Dis.* 1; 33(7):1034-9.
17. Secretaría de Salud, 1993. Dirección General de Información y Estadística. Mortalidad, 1992. México, D.F.
18. La Salud de las Américas, edición 1998. Vol. II.
19. García M., Valdespino J. 1994. Tuberculosis. Enfermedades tropicales en México. México, D.F. Secretaría de Salud. Pág. 215-228.
20. Pérez-Padilla R. 2001. La tuberculosis en México, deuda añeja de salud pública. *Gac Med Mex.* 137(1): 93-4.
21. Salud: México 2004. Información para la rendición de cuentas. Segunda edición, 2005. D.R. © Secretaría de Salud, México.
22. Levinson W. and E. Jawetz. 2000. Medical microbiology and immunology: examination and board review. 6<sup>th</sup> edition, Mc. Graw-Hill, USA.
23. Flisser A, Velasco A, Martínez C, González F, Briseño B, García R, Caballero A, Hernández I, García H, Gutiérrez L, Rodríguez G, López I, Galindo S, Vázquez R, Balandrano S, Guzmán C, Olivo A, De la Rosa JL, Magos C, Escobar A, Correa D. 2002. Infectious Diseases in Mexico. A Survey from 1995-2000. *Arch Med Res.* 33(4):343-350.
24. Bloom, B.R. and C.J.L. Murray. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257:1055-1064.

25. Sudre P, Ten Dam G, Kochi A. 1992. Tuberculosis in the present time: A global overview of the tuberculosis situation. *Bull World Health Organ.* 70(2):149-59.
26. Leung AN. 1999. Tuberculosis: the essentials. *Radiology.* 210(2):307-322.
27. Stewart G, Robertson BID, Young DB. 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature Rev Microb.* 1(2): 97-105.
28. Milburn HJ. 2001. Primary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med.* 7(3):133-41.
29. GAW Rook and Rogelio Hernández Pando. 1996. The pathogenesis of tuberculosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:259-84.
30. Ten Dam H, Pio A. 1994. Pathogenesis of tuberculosis and effectiveness of BCG vaccination. *Adv Tuberc Res.* 63:225-233.
31. Cardona P, Auxina V. 2000. Histopathology of tuberculosis. Approaching the development of pulmonary lesions through an aerosol-induced experimental model in animals. *Arch Bronconeumol;* 36(11): 645-650.
32. Flynn JL, Ernst JD. 2000. Immune responses in tuberculosis. *Curr Opin in Immunol.* 12(4):432-36.
33. Flynn JL, Chan J. 2001. Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 19:93-129.
34. Kaufmann S. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol.* 1: 20-30.
35. Crevel R, Ottenhoff TH, Meer JW. 2002. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clín Microbiol. Rev.* 15(2): 294-309.
36. Engers HD, Houba V, Bennedsen J, Buchanan TM, Chaparas SD, Kadival G, et al. 1986. Results of a World Health Organization sponsored Workshop to characterize antigens recognized by mycobacterium specific monoclonal antibodies. *Infect Immunol;* 51:718-20.
37. Jonson CM., Cooper AM., Frank AA., Bonorino CBC., Wysoki LJ., Orme IM. 1997. *Mycobacterium tuberculosis* aerogenic rechallenge infections in B cell-deficient mice. *Tuber Lung Dis.;* 78:257-61.

38. Bosio CM., Gardner D., Elkins KL. 2000. Infection of B cell-deficient mice with CDC1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. *J Immunol*; 164:6417-25.
39. Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ., Narayanan PR, Raja A. 2001. Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38kDa antigen in pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*; 81: 249-53.
40. Raja A, Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ. 2002. Immunoglobulin G, A and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol.*; 9: 308-12.
41. Uma Devi KR, Senthil Kumar KS, Ramalingam B, Raja A. 2002. Purification and characterization of three immunodominant proteins (38, 30, and 16 kDa) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif.*; 24: 188-95.
42. Raja A, Ranganathan UD, Bethunaickan R, Dharmalingam, V. 2001. Serologic response to a secreted and a cytosolic antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J.*; 20: 1161-4.
43. Ramalingam B, Uma Devi KR, Swaminathan S, Raja A. 2002. Isotype specific antibody response in Childhood tuberculosis against purified 38kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Trop Pediatr.*; 48: 188-9.
44. Uma Devi KR, Ramalingam B, Raja A. 2002. Qualitative and quantitative analysis of antibody response in childhood tuberculosis against antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Microbiol.*; 20 : 145-9.
45. Senthil Kumar KS, Uma Devi KR, Raja A. 2002. Isolation and evaluation of diagnostic value of two major secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Chest Dis Allied Sci.*; 44: 225-32.
46. Rook G, Steele J, Barnass S, Mace J, Stanford J. 1986. Responsiveness to live *M. tuberculosis*, and common antigens, of sonicate-stimulated T cell lines from normal donors. *Clin. Exp. Immunol.* 63:105-10.

47. Ivanyi J. 1996. Recientes avances en la Inmunología de la tuberculosis. *Vaccinmonitor*. 2:1-3.
48. Orme I. 1987. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 138:293-8.
49. Balasubramanian V, Wiegand EH, Taylor BT, Smith DW. 1994. Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. *Tuber Lung Dis.* 75(3):168-78.
50. Harrison AG, Muggenburg BA, Snipes MB, Bice DE. 1985. The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science*. 230 (4731):1277-1280.
51. Teitelbaum R, Schubert W, Gunther L, Kress Y, Macaluso F, Pollard JW, McMurray DN, Bloom BR. 1999. The M cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*. 10(6): 641-650.
52. Reddy Hayworth DA. 2002. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with human respiratory epithelial cells (HEp-2). *Tuberculosis*. 82 (1): 31-36.
53. Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393, 537-544.
54. Brennan, M.J., Delogu. 2002. The PE multigene family: a "molecular mantra" for mycobacteria. *TRENDS in microb.* 10, 246-249.
55. Banu, S., Honoré N., S-J Brigitte, Philpott D., Prévost M.C., Cole T. S. 2002. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Molecular Microbiology*. 44 (1):9-19.

56. Brennan, M.J., Delogu, G., Chen, Y., Bardarov, S., Kriakov, J., alavi, M., Jacobs, W.R., Jr. 2001. Evidence that mycobacterial PE\_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with others cells. *Infect Immun.* 69, 7326-33.
57. Hayashi CY, Lewis RV. 2000. Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene. *Science.* 25;287:1477-9.
58. Delogu, G., Brennan, M.J. 2001. Comparative immune response to PE and PE\_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 69, 5606-5611.
59. Ramakrishnan L., Federspiel N.A., Falkow S. 2000. Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE\_PGRS family. *Science.* 288, 1436-1439.
60. Espitia C, Laclette J.P., Mondragón-Palomino M., Amador A., Campuzano J., Martens A., Singh M., Cicero R., Zhang Y., Moreno C. 1999. The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins? *Microbiology.* 145:3487-95.
61. Robertson B. D. and Meyer T.F. 1992. Genetic variation in pathogenic bacteria. *Trends Genet.* 8 (12):422-27.
62. Van der Woude MW., Braaten BA., Low DA. 1992. Evidence for global regulatory control of pilus expresión in *Escherichia coli* by *Lrp* and DNA methylation: model building based on análisis of *pap*. *Mol Microbiol.* 6(17):2429-35).
63. Haas, R. and Meyer, T.F. 1986. The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for gene conversion. *Cell* 44 (1), 107-15.
64. Levinson, G., and Gutman, GA. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol.* 4;203-21.
65. Murphy, GL., Terry D. Connell, Diana S Barritt, Michael Koomey and Janne G. Cannon. 1989. Phase variation of gonococcal protein II: regulation of gene expression by slipped-strand mispairing of a repetitive DNA sequence. *Cell.* 56, 539-47.

66. Weiser, J.N., Love, J.M. and Moxon, E.R. 1989. The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. *Cell* 59, 657-65.
67. Rosqvist, R. Skurnik, M. and Wolf-Watz, H. 1991. Increased virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* by two independent mutations. *Nature*. 334, 522-25.
68. Radman M. 1999. Mutation, recombination and incipient speciation of bacteria in the laboratory. *Proc Natl Acad Sci USA*. 22; 96 (13):7348-51.
69. Brunham R.C., Plummer F.A. and Stephens R.S. 1993. Bacterial antigenic variation, host immune response and pathogen-host coevolution. *Infection and Immunity*. 61(6):2273-76.
70. Gilsdorf, J.R. 1998. Antigenic diversity and gene polymorphisms in *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*. 66(11):5053-59.
71. McCrea, K.W., J.L. St. Sauver, C.F. Marrs, D. Clemans, and J.R. Gilsdorf. 1998. Immunologic and structural relationships of the minor pilus subunits among *Haemophilus influenzae* isolates. *Infection and Immunity*. 66:4788-4796.
72. Zhang J.-R. and Norris S.J. 1998. Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene *vlsE* involves cassette-specific, segmental gene conversion. *Infection and Immunity*. 66(8):3698-3704.
73. Hollingshead S. K., Fischetti V.A., Scott J.R. 1987. Size variation in group A streptococcal M protein is generated by homologous recombination between intragenic repeats. *Mol. Gen. Genet*. 207:196-203.
74. Fleischmann R.D., Alland D., Eisen J.A., Carpenter L., White O., Peterson J., DeBoy R., Dodson R., Gwinn M., Haft D., Hickey E., Kolonay J.F., Nelson W.C., Umayam L.A., Ermolaeva M., Salzberg S.L., Delcher A., Utterback T., Weidman J., Khouri H., Gill J., Mikula A., Bishai W., Jacobs W.R. Jr., Venter J.C. and Fraser C.M. 2002. Whole comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *Journal of Bacteriology*. 189, 5479-5490.
75. Betts J.C., Dodson P., Quan Selwyn, Lewis, A.P., Thomas P.J., Duncan K., McAdam R.A. 2000. Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC1551. *Microbiology*. 146: 3205-3216.

76. Poulet S. and Cole T.S. 1995. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Microbiol.* 163:87-95.
77. Sreevatan S., Pan X., Stockbauer KE., Connell ND., Kreiswirth BN., Whittan TS., Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2;94 (18):9869-74.
78. Flores J. y Espitia C. 2003. Differential expression of PE and PE\_PGRS genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Gene.* 318. 75-81.
79. Valway SE, Sánchez MP., Shinnick TF., Orme I., Agerton T., Hoy D., Jones JS., Westmoreland H., Onorato IM. 1999. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Eng J Med.* 5;338 (10):633-9.
80. Delcher AL, Kasif S., Fleischmann RD., Peterson J., White O., Salzberg SL. 1999. Alignment of whole genomes. *Nucleic Acids Res.* 1;27:2369-76.
81. Talarico S., Donal Cave M., Marrs F. C., Forman B., Zhang L., Yang Z. 2005. Variation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS33 gene among clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 10;43:4954-4960.
82. D. Van soelingen, P.E.W. de Haas, P.W.M. Hermans and J.D.A. van Embden. Manual for fingerprinting of *M. tuberculosis* strains. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands. pp. 1-8.
83. Abbas, Abul K., Lichtman H. A. y Pober S. J. Cellular and molecular immunology. 4ª edición. 2000. USA. pp. 309-10.

## **P E R S P E C T I V A S**

Basados en los resultados obtenidos en este trabajo, se hace necesario ampliar el panorama en cuanto a la respuesta inmune global se refiere y para ello se pretende analizar comparativamente la respuesta inmune celular y humoral generada por ratones inmunizados con las proteínas Rv1818c<sup>PE\_PGRS</sup> y MT1866<sup>PE\_PGRS</sup>.

**El presente trabajo se realizó bajo la dirección y  
coordinación de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón**