



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estandarización de un modelo de
tuberculosis latente en ratones Balb/c**

T E S I S

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Blanca Estela Tovar Vázquez



**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Dulce Adriana Mata Espinosa**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Tovar
Vázquez
Blanca Estela
044 55 81 54 33 39
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
31016565-9
2. Datos del asesor
Dra.
Dulce Adriana
Mata
Espinosa
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Concepción
Toriello
Nájera
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Jorge Alberto
García
Alvarez
5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Guadalupe
Vidal
Gaona
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Edén Marcela
Rodríguez
Flores
7. Datos del trabajo escrito
Estandarización de un modelo de tuberculosis latente en ratones Balb/c
75 p
2017

“La confianza en sí mismo es el primer secreto del éxito”

Ralph Waldo Emerson

Dedicatorias

A mis padres y hermanos, por su apoyo y confianza en todo momento, gracias por ayudarme a culminar este sueño.

A mi familia, quienes de una u otra manera han estado conmigo desde el inicio, mostrando su apoyo incondicional.

Agradecimientos

A mi asesora, la Dra. Dulce Adriana Mata Espinosa, agradezco sus enseñanzas, consejos y por el tiempo que ha dedicado para la realización de este trabajo.

A los doctores, Concepción Toriello, Jorge Antonio García, Edén Rodríguez y a la M. en C. Guadalupe Vidal, por revisar el trabajo, agradezco sus observaciones y recomendaciones.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando, por su confianza y por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo

A los doctores Brenda Marquina y Jorge Barrios, por su asesoría y orientación.

A mis amigos, Gustavo, Mary, Brian, Mafer, Israel, Daniel, gracias por haberme brindado su amistad en la mejor etapa de mi vida, por todos esos momentos de locuras, y por su apoyo incondicional durante estos años. **Adry**, agradezco la amistad que me has brindado, por todo el apoyo que he recibido de ti, así como por la paciencia que has tenido conmigo. **Jackie**, gracias por mostrarme una mejor visión de la vida, por creer en mí cuando ni yo misma creía, por todas las palabras de aliento, por tu apoyo, por ser esa hermana que no tuve.

A los miembros del laboratorio de Patología Experimental del INCMNZZS, gracias por su ayuda y sus consejos.

Índice

Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Abreviaturas	iii
Resumen	iv
I. Marco Teórico	
1. Tuberculosis	
1.1. Generalidades	1
1.2. Historia	1
1.3. Agente Causal	2
1.4. Infección primaria	5
1.5. Epidemiología	7
2. Tuberculosis Latente	
2.1. Latencia	9
2.2. Latencia en <i>M. tuberculosis</i>	11
2.3. Epidemiología	12
2.4. Diagnóstico	13
2.4.1. Tuberculina	13
2.4.2. Ensayos de interferón gamma (IGRA's)	14
2.5. Factores de riesgo	16
2.6. Marcadores de latencia	17
2.6.1. Alfa Cristalina	18
2.6.2. Isocitrato liasa	18

II. Antecedentes	
1. Modelos de tuberculosis latente	20
1.1. Modelos <i>in vitro</i> de tuberculosis latente	20
1.1.1. Modelo de Wayne	21
1.2. Modelos <i>in vivo</i> de tuberculosis latente	22
1.2.1. Modelos murinos	22
III. Justificación	26
IV. Objetivos	
1. Objetivo general	27
2. Objetivos particulares	27
V. Materiales y métodos	
1. Modelo murino	
1.1. Infección animal	28
1.2. Sacrificio	29
2. Procesamiento de tejidos murinos	
2.1. Determinación de Unidades Formadoras de Colonias	31
2.2. Preparación del tejido murino para su estudio histológico	31
2.3. Técnicas moleculares	
2.3.1. Extracción de RNA	32
2.3.2. RT-PCR	33
2.3.3. PCR Punto final	34
2.3.4. PCR Tiempo real	35
2.3.5. Procesamiento de sangre periférica	37

VI. Resultados	
1. Determinación de carga bacilar	38
2. Análisis histológico	43
3. Técnicas moleculares	
3.1. Calidad de RNA	45
3.2. PCR punto final	47
3.3. PCR Tiempo Real	48
3.4. Extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre periférica	51
VII. Discusión	52
VIII. Conclusión	62
IX. Perspectivas	64
X. Referencias	65

Índice de figuras

Figura 1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
Figura 2. Granuloma representativo de tuberculosis	6
Figura 3. Incidencia mundial estimada de tuberculosis en 2015	7
Figura 4. Tardígrado <i>Bertolanius volubilis</i>	9
Figura 5. Modelo del Ying-Yang	12
Figura 6. Distribución del tejido pulmonar	31
Figura 7. Micrografías representativas de los pulmones de ratones infectados con las diferentes dosis a los 210 días post infección	44
Figura 8. Detección de la secuencia IS6110 de la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> por PCR punto final	47
Figura 9. Detección de la secuencia 16S de rRNA de la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> por PCR punto final	48

Índice de tablas

Tabla 1. Distribución de los animales del experimento	29
Tabla 2. Volumen de elementos del kit omniscrypt RT, para síntesis de cDNA	33
Tabla 3. Volumen de elementos del kit HotStarTaq DNA Polymerase, para PCR punto final	34
Tabla 4. Volumen de elementos de la Quantitect SYBR Green PCR kit, empleado en qPCR	35
Tabla 5. Primers empleados en qPCR	36
Tabla 6. Resultados positivos y negativos durante el conteo de UFC de pulmones de ratones infectados	42
Tabla 7. Muestras con cultivo negativo y cultivo bajo en medio 7H10	47

Abreviaturas

- Acr o hspX, α -cristalina
- ADC, Albumina, dextrosa y catalasa
- BCG, Bacilo de Calmette-Guérin
- BM, Biología Molecular
- cDNA, DNA Complementario
- DNA, Ácido desoxirribonucleico
- DEPC, Dietilpirocarbonato
- FDA, Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
- ICL, Isocitrato liasa
- IFN- γ , Interferón gamma
- IGRAs, Ensayos de liberación de IFN- γ
- *M. tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*
- OADC, Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa
- OMS, Organización Mundial de la Salud
- Pb, Pares de bases
- PBS, Buffer de fosfatos salino
- PCR, Reacción en cadena de la polimerasa
- PPD, Derivado Proteico Purificado
- qPCR, Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real o cuantitativo
- RNA, Ácido Ribonucleico
- RNS, Especies reactivas de nitrógeno

- ROS, Especies reactivas de oxígeno
- rRNA 16S, RNA ribosómico de la subunidad ribosómica 16S
- rRNA, RNA ribosomal
- RT-PCR, Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa
- TB, Tuberculosis
- TL, Tuberculosis Latente
- TST, Prueba cutánea de la tuberculina (The Mantoux tuberculin skin test)
- UFC, Unidades formadoras de colonias
- VIH, Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa de transmisión aérea causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Es uno de los principales problemas de salud mundial. Existen varios escenarios frente a una infección por *M. tuberculosis*, si el sistema inmune de un individuo es competente puede eliminar a los bacilos, pero si está comprometido, puede desarrollarse la enfermedad activa, o bien, el bacilo pueden evadir al sistema inmune y alojarse en el interior de las células del huésped sin causar daño, dando origen a un estado de infección latente. Este estadio de la enfermedad puede permanecer en el individuo por largo tiempo pasando desapercibida, sin embargo, estas bacterias en estado latente pueden reactivarse derivando una enfermedad activa. La información que existe sobre este estadio de la enfermedad aún es limitada, debido a que los modelos experimentales hasta ahora descritos no reproducen fielmente esta condición en la micobacteria. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue estandarizar un modelo animal que permita caracterizar los mecanismos moleculares e inmunológicos de la latencia, brindando oportunidades para buscar tratamientos que eviten la reactivación de la enfermedad. Para ello, ratones machos de la cepa BALB/C fueron inoculados vía intratraqueal con UFC de la cepa prototipo H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, con dosis de 10, 100, 250 y 500 UFC. En tejido pulmonar se determinó la carga bacilar, y se realizó extracción de RNA micobacteriano, para la identificación de biomarcadores de latencia. Los resultados mostraron que la carga bacilar aumenta exponencialmente sobre el primer mes de infección, disminuyendo de la misma manera hacia los siete meses de infección. La dosis de 10 UFC fue la que mostró los mejores resultados, observando una tendencia hacia UFC negativos en los miembros del grupo. En individuos UFC negativos, pudo ser corroborada la presencia de la micobacterias viables en estado de latencia mediante técnicas moleculares. Los resultados obtenidos hasta ahora, podrían indicar que el establecimiento de un modelo de tuberculosis latente, es posible empleando dosis bajas de micobacterias.

Marco Teórico

1. Tuberculosis

1.1 Generalidades

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa cuyo agente causal es *Mycobacterium tuberculosis*, este pertenece al complejo *M. tuberculosis*, el cual engloba a las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. canetti*, siendo *M. tuberculosis*, la causante del mayor porcentaje de esta enfermedad, afectando principalmente a los pulmones, sin embargo, puede diseminarse a otros órganos, dando origen a tuberculosis extrapulmonar (Caminero Luna, 2003; Palomino, 2007).

Los integrantes del complejo *M. tuberculosis*, taxonómicamente se encuentran dentro del orden *Actinomycetales*, conformando a la familia *Mycobacteriaceae* y el género *Mycobacterium* (Caminero Luna, 2003).

1.2 Historia

La enfermedad ha estado presente desde hace cientos de años, se tienen descripciones de restos momificados en donde se han observado claros signos de enfermedad tuberculosa, además existen descripciones médicas antiguas, en donde se puede intuir la presencia de la enfermedad (Daniel, 2006). La enfermedad ha estado presente en todos los continentes, sin embargo, es más frecuente

encontrar indicios de la enfermedad en Europa antigua, en donde fue relacionada incluso con maldiciones divinas o bien con estatus sociales altos. Esta enfermedad alcanzó su mayor apogeo a finales del siglo XVII y mitad del siglo XIX, erradicando a poco más del 25% de la población europea (Saldarriaga-Cantillo, 2009).

Fue hasta el 24 de marzo de 1882, cuando Robert Koch, descubrió el agente causal de la tuberculosis, el bacilo de Koch, denominado así en su honor (Caminero Luna, 2003). A partir de ese momento, se han realizado diversos estudios sobre esta enfermedad, cuyo único objetivo ha sido lograr su erradicación, y aunque esto aún no se ha logrado, se han tenido grandes avances, entre ellos la vacuna BCG, la cual ha disminuido considerablemente la alta tasa de mortalidad de la enfermedad.

1.3 Agente Causal

M. tuberculosis es un bacilo alargado, mide aproximadamente 0.85 μm de longitud y 0.4 μm de grosor (Figura 1a). Es un organismo intracelular, inmóvil, requiere de condiciones ambientales estrictas para un adecuado crecimiento, requiere una alta concentración de oxígeno, presión atmosférica de máximo 140 mm/Hg y un pH de 7.4, llevando acabo su replicación cada 14 a 24 horas (Caminero Luna, 2003). Su característica principal es el alto porcentaje de lípidos 70-80% en su pared celular (Palomino, 2007).

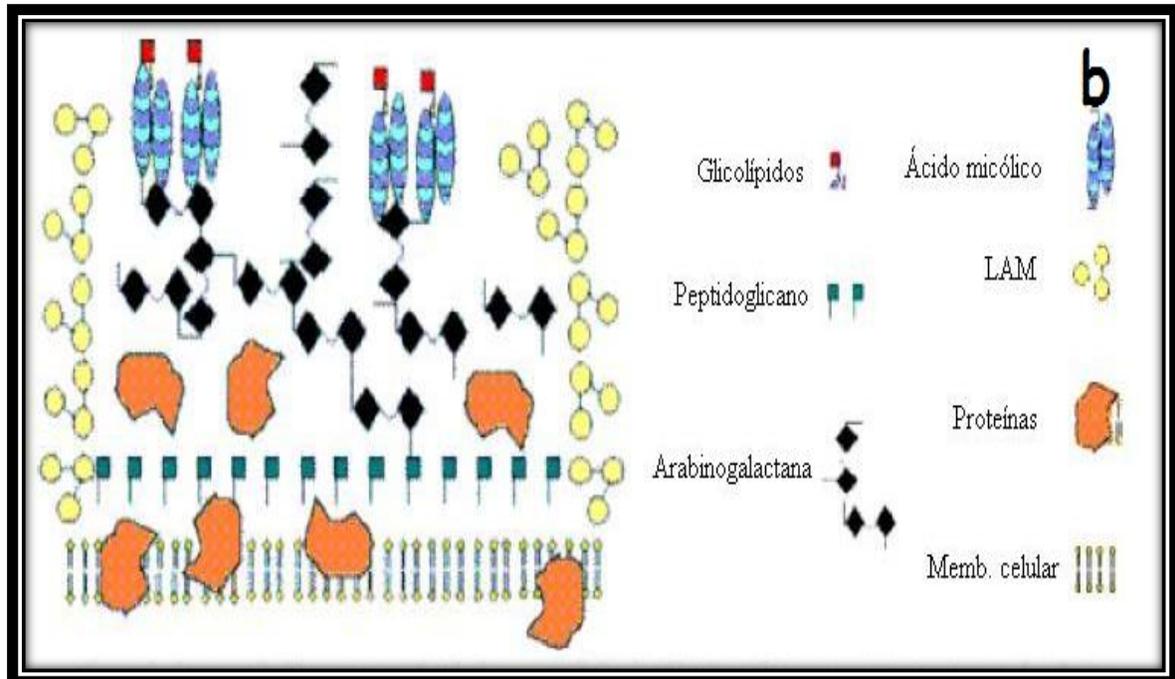
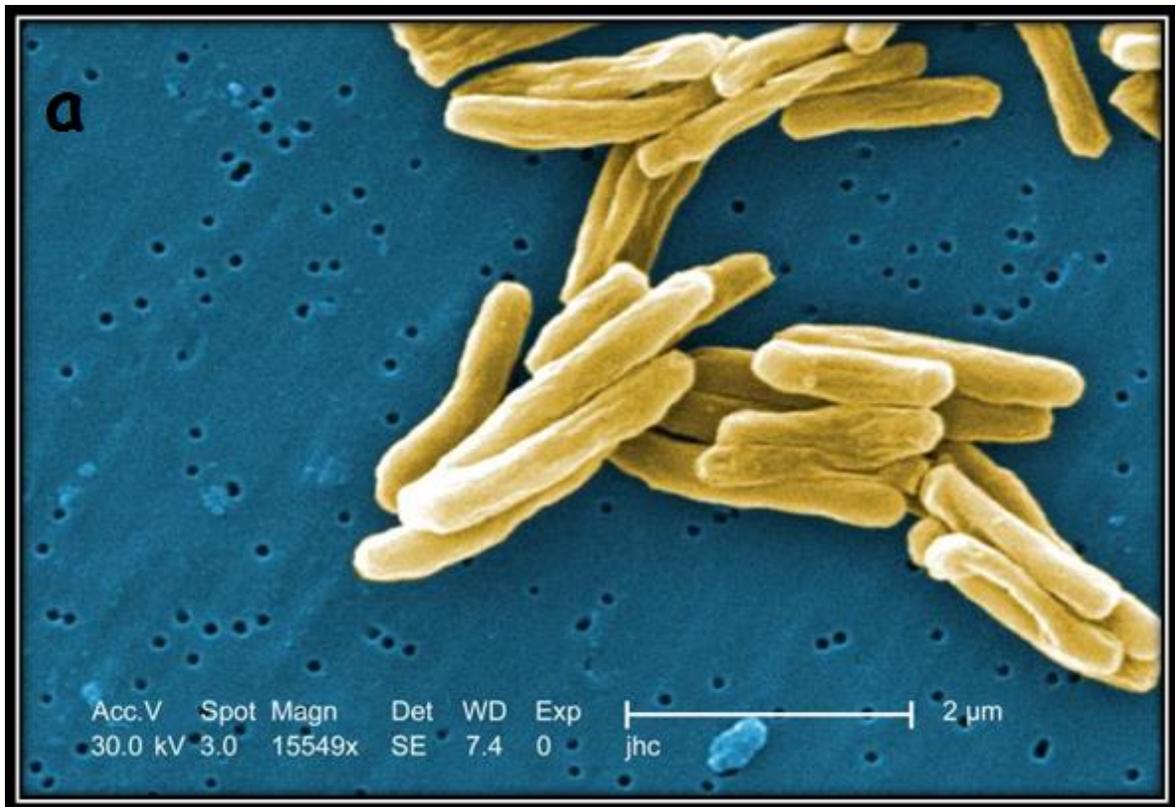


Figura 1. *Mycobacterium tuberculosis*. a. Aspecto morfológico de *M. tuberculosis*. b. Estructura de la pared celular de *M. tuberculosis*. Tomadas de Todar, 2017; Gorocica et al., 2005.

La pared es el componente principal de la micobacteria, tiene una estructura compleja y está compuesta de cuatro capas (Figura 1b):

1. Peptidoglicano
2. Polímeros de arabinosa y galactosa
3. Ácidos micolicos
4. Lípidos superficiales

Su alto contenido en lípidos es responsable de conferirles ácido-alcohol-resistencia, denominándolos bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Los lípidos de su pared celular impiden que colorantes comunes, como los característicos de la tinción Gram penetren, por lo cual para teñirlos se utiliza una tinción especial (tinción Ziehl-Neelsen). Además los lípidos le otorgan resistencia a un gran número de antibióticos, pues éstos actúan como barrera permeable únicamente a solutos hidrofílicos (Pumarola, *et al.*, 2000; Quirós-Roldán *et al.*, 2001; Palomino, 2007).

El género *Mycobacterium* se estableció hace miles de años, por lo cual no es difícil imaginar el nivel de evolución que deben presentar estos microorganismos para ser capaces de sobrevivir hasta nuestros días, pues están capacitados para sobrevivir en diversos ambientes y afectar a diversas especies animales. Tampoco es difícil imaginar la magnitud del daño que han causado sobre la especie humana. Es bien sabido que a lo largo de la historia, la TB ha tenido diversos puntos de apogeo, causando epidemias mundiales que han conllevado a la muerte de un gran número de personas, por lo cual estos patógenos pueden catalogarse como “Los microorganismos que más muertes han causado en la historia” (Daniel, 2006).

1.4 Infección primaria

Se sabe que cantidades mínimas, 1-10 bacilos, podrían ser suficientes para causar una infección (Lewis, 2007), una gotita de *flügge* puede contener 1-400 bacilos, por lo cual no se sabe exactamente la cantidad de bacilos que inician el proceso de infección (Sakamoto, 2012). Una vez dentro del huésped, los bacilos logran establecerse en el espacio alveolar, donde son detectados por el sistema inmune, siendo fagocitados por macrófagos alveolares y células dendríticas, los cuales secretan citocinas y quimiocinas, que atraen a otras células del sistema inmune, como monocitos, neutrófilos y linfocitos, los cuales viajan al sitio de infección primario, con el fin de contener la infección, esta respuesta inmune permanece de 2 a 8 semanas después de la infección (Sakamoto, 2012). *M. tuberculosis* también es capaz de infectar células no fagocíticas en el espacio alveolar, como células endoteliales y neumocitos tipo I y tipo II (Ahmad, 2011; Russel *et al.*, 2009; Flynn *et al.*, 2011; Jordao y Vieira, 2011).

Durante la respuesta activa del sistema inmune, las células especializadas, como linfocitos T activados, macrófagos, células dendríticas, así como fibroblastos y células endoteliales, entre otras células, forman una estructura denominada granuloma, característica de ésta enfermedad (Figura 2), el cual tiene como objetivo formar una barrera física e inmunológica para contener la infección, evitando su diseminación (Ahmad, 2011; Guirado y Schlesinger, 2013; Saunders y Britton, 2007).

¹Las gotitas de *Flügge* son partículas diminutas expelidas al hablar, toser, estornudar o respirar, que pueden transportar gérmenes infecciosos de un individuo a otro. Estas partículas miden de 0.5 a 10 µm, y pueden permanecer hasta 30 minutos en el aire en suspensión (Murillo-Godínez, 2009).

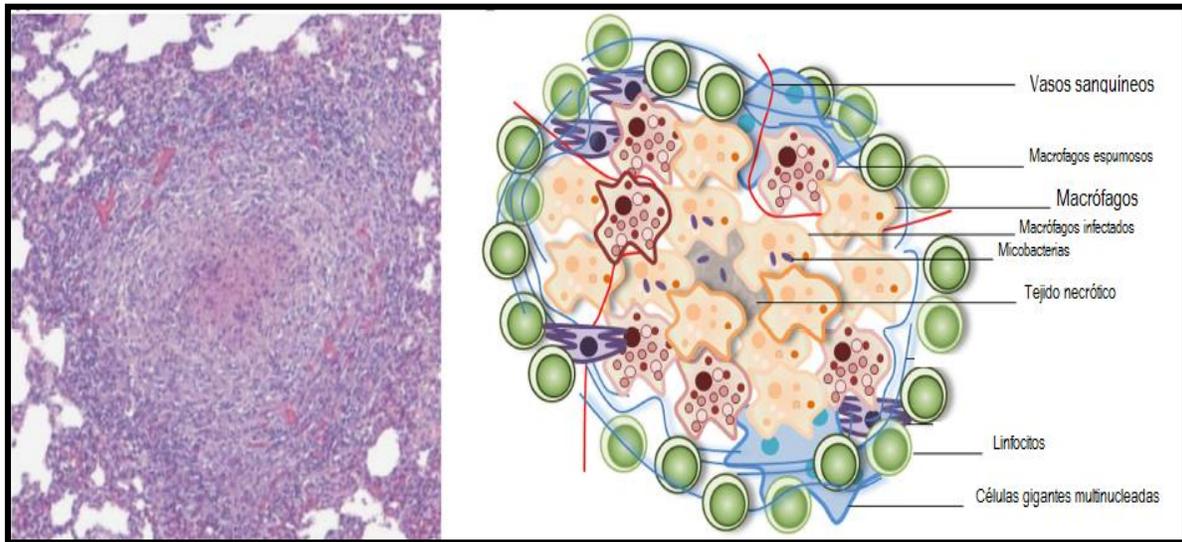


Figura 2. Granuloma representativo de tuberculosis. Izquierda: imagen histológica de un granuloma de cobayo. Derecha: caricatura que ilustra los componentes principales de un granuloma. Tomada y editada de: Guidado y Schelesinger, 2013.

Gracias a la eficiencia y rapidez con la que el sistema inmune actúa, en la mayoría de los casos, aproximadamente 90%, los bacilos pueden ser controlados, evitando el desarrollo de la enfermedad activa, y aproximadamente en 10% de los casos desarrollan la enfermedad activa, caracterizada por el crecimiento exponencial de los bacilos (Ahmad, 2011). Cuando el sistema inmune logra un adecuado control del crecimiento bacteriano, puede ser capaz de eliminar al bacilo, dando como resultado ausencia de enfermedad, sin embargo, en algunas ocasiones los bacilos logran evadir al sistema inmune; son capaces de resistir la eliminación mediante fagolisosomas de los macrófagos, además son capaces de soportar el microambiente hostil del granuloma (hipoxia, pH ácido, presencia de óxido nítrico, etc.), llegando a un punto de equilibrio entre la respuesta del sistema inmune y el

crecimiento bacilar. Los bacilos se alojan en el interior de las células del huésped sin causar daño, por un periodo prolongado de tiempo, dando origen a un estado de infección latente (Ahmad, 2011; Ernst, 2012).

1.5 Epidemiología

La TB es uno de los principales problemas de salud mundial, contabilizándose en 2015, 10.4 millones de nuevos casos, además de 1.8 millones de muertes (WHO, 2016). Esta enfermedad ha sido denominada como una “enfermedad de pobres”, debido a que la mayor incidencia se encuentra en países tercermundistas (Figura 3), en donde la desnutrición es un problema persistente. En África, son reportados anualmente una gran cantidad de nuevos casos, viéndose afectada en mayor proporción la población infantil. India, Indonesia, China, Pakistán, Nigeria y Sudáfrica albergan el 60% de los casos de TB (WHO, 2016).

En el caso de México, estadísticas de la base de datos de la OMS en 2016, reportan un total de 22,294 casos notificados de TB en la población, correspondiendo un 81% a casos de TB pulmonar. La mayor incidencia se presenta en hombres mayores de 14 años, contabilizándose un estimado de 2.1 muertes por cada 100,000 habitantes a causa de este padecimiento.

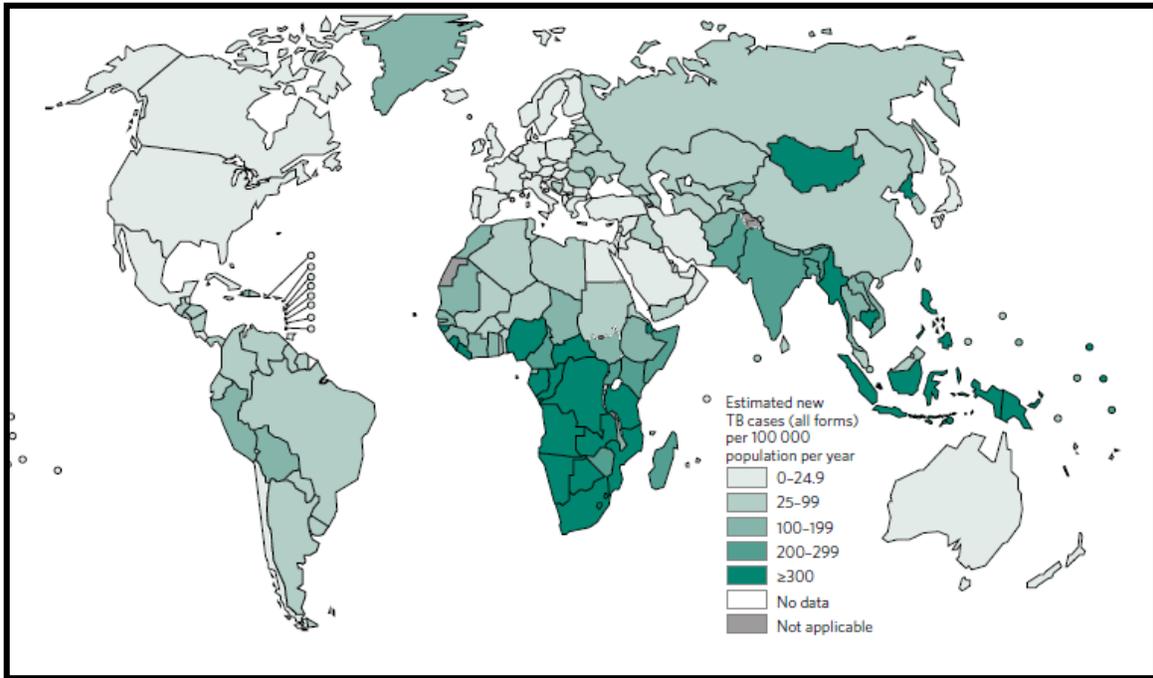


Figura 3. Incidencia mundial estimada de tuberculosis en 2015. Tomada del Reporte Global de Tuberculosis-OMS, 2016.

2. Tuberculosis Latente

2.1 Latencia

Según la Real Academia Española, la latencia es un término empleado para definir algo que se encuentra “oculto, escondido o aparentemente inactivo”. El término ha sido utilizado ampliamente en Biología, ya que en varios rubros de la naturaleza ha sido empleado para definir lo que es llevado a cabo por diversos organismos, desde animales y plantas, hasta pequeños microorganismos. En todos existe un mismo fin: la supervivencia de la especie. En algunos animales, es bien sabido que su tasa metabólica disminuye considerablemente, frente a algún agente que pone en riesgo su supervivencia, por ejemplo, la falta de agua o bien un cambio brusco de la temperatura, el animal hace frente a esto manteniéndose a salvo hasta que las condiciones ambientales adecuadas regresan (Hill *et al.*, 2006). Un claro ejemplo de esto se presenta en los tardígrados (Figura 4), invertebrados microscópicos que ante factores exógenos desfavorables presentan anhidrobiosis (disminución de actividad metabólica ante ausencia en la disponibilidad de agua), anaxobiosis (disminución de actividad metabólica ante baja concentración de oxígeno), criobiosis (disminución de actividad metabólica ante descenso extremo de temperatura), la tasa metabólica disminuye llegando a niveles indetectables, entrando en un estado de latencia denominado criptobiosis, en el cual pueden permanecer por tiempo indefinido (Guidetti *et al.*, 2011).

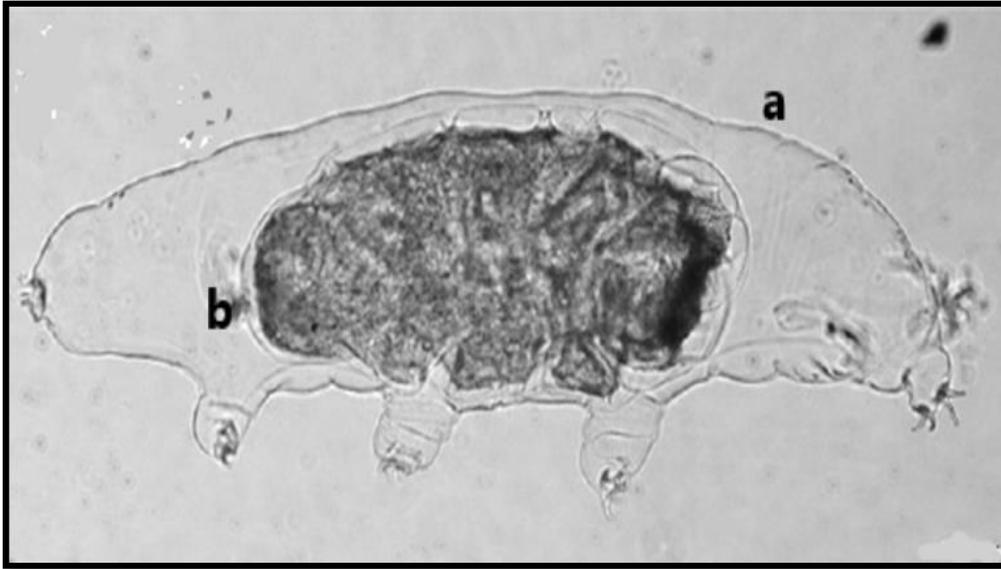


Figura 4. Tardígrado *Bertolanius volubilis*. a) ejemplar en condiciones normales. b) ejemplar ante condiciones desfavorables. Tomada y editada de Guidetti *et al.*, 2011.

En el caso de las plantas, las semillas son las que entran en este estado de latencia, ya que después del periodo reproductivo viene una época de condiciones adversas para la especie, lo cual impedirá que las nuevas generaciones aparezcan inmediatamente, es por esto que la semilla “duerme” por un periodo de tiempo, durante el cual la semilla madura y se prepara para dar origen a un nuevo ejemplar cuando las condiciones ambientales sean las adecuadas (Márquez *et al.*, 2012). Lo mismo ocurre con los microorganismos, la mayoría de ellos patógenos, quienes buscan sobrevivir no afectando a su huésped, con el fin de lograr un mayor porcentaje de infección. Algunos microorganismos emplean esto durante su ciclo de vida, como diversos virus y algunas bacterias como *M. tuberculosis*.

2.2 Latencia en *M. tuberculosis*

La Infección por Tuberculosis Latente (LTBI) se define clínicamente mediante una prueba cutánea reactiva de la tuberculina (TST), indicando una respuesta positiva de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), sin la presencia de sintomatología de enfermedad activa (Dutta y Karakousis, 2014).

Realmente existen muchos conceptos para definir: TL, ya que no existe un consenso en el término, algunos autores mencionan que se define como la persistencia durante muchos años de *M. tuberculosis* en el hospedero, sin causar enfermedad clínica (Jasmer *et al.*, 2002; Dutta y Karakousis, 2014), otros mencionan que el término latencia no es adecuado, sino que esta característica de *M. tuberculosis*, debe ser denominada “persistencia”, ya que engloba esa capacidad de permanecer en el hospedero, así como la facultad de evadir el tratamiento farmacológico, pues durante el crecimiento bacteriano, existe una alta heterogeneidad y variabilidad. El modelo del Ying-Yang propone que en una población metabólicamente activa susceptible a tratamiento farmacológico, existe una pequeña fracción que persiste a pesar del tratamiento, igualmente, en una población no replicante, existe una pequeña porción que revertirá esta condición (Figura 5) (Dutta y Karakousis, 2014; Zhang, 2014). Por último, este comportamiento también se ha denominado “dormancia”, debido a que las micobacterias son viables pero su actividad metabólica disminuye entrando en un periodo en donde la bacteria “duerme” (Dutta y Karakousis, 2014).

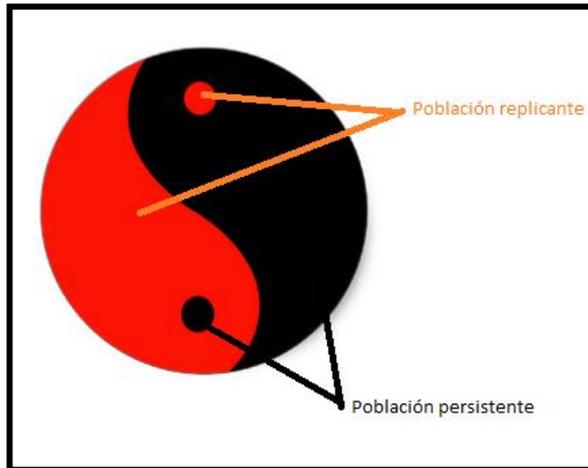


Figura 5. Modelo del Ying-Yang. Heterogeneidad de la población bacteriana. Tomada y editada de Zhang, 2014

2.3 Epidemiología

Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con TL (WHO, 2016). Este estadio de la enfermedad puede permanecer en el individuo por largo tiempo pasando desapercibida, sin embargo, como consecuencia del envejecimiento, reinfección, desnutrición, o bien, por inmunosupresión relacionada con otras enfermedades (como VIH, diabetes mellitus, artritis reumatoide, etc.), estas bacterias en estado latente pueden reactivarse derivando una enfermedad activa en aproximadamente un 10% de los casos (Barrios-Payán, 2010). Se ha reportado la presencia de bacilos latentes en granulomas pulmonares, células epiteliales, células de tejido adiposo, tejido nervioso, tejido digestivo, riñón, bazo, hígado, etc., (Neyrolles *et al.*, 2006; Barrios-Payán *et al.*, 2012; Guirado y Schlesinger, 2013).

2.4 Diagnóstico

El diagnóstico oportuno de la enfermedad activa, es vital para controlar el crecimiento y diseminación de los bacilos, previniendo un aumento de la gravedad de la enfermedad. Actualmente el diagnóstico se basa en pruebas clínicas, presencia de sintomatología y estudios radiológicos (Cascante *et al.*, 2007). Existen pruebas básicas, las cuales han sido empleadas desde años posteriores al descubrimiento de la enfermedad, las cuales se basan en el cultivo, tinción Ziehl-Neelsen de la micobacteria, obtenidas de muestras de esputo, o de tejido extrapulmonar y la prueba TST (Saltini, 2006; Leylabadlo *et al.*, 2016). Sin embargo, el diagnóstico de la TL es incierto, debido a que las técnicas empleadas hasta la fecha no han arrojado resultados positivos, pues de una u otra manera cuentan con cierto margen de error en la distinción de TL y TB activa.

Los avances tecnológicos de la actualidad, han permitido el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos que han aumentado la sensibilidad de las pruebas. La prueba más empleada históricamente es la prueba de la tuberculina y basadas en el principio de ésta, se han desarrollado ensayos inmunológicos (IGRAs), capaces de distinguir entre enfermedad activa o enfermedad latente (Al-Orainey, 2009; Guillén, 2011).

2.4.1 Tuberculina

La técnica más empleada en el mundo es la prueba de la tuberculina, entró en vigor poco después del descubrimiento de la enfermedad (Jasmer, 2002). La prueba

consiste en la administración intradérmica en el antebrazo de PPD, una mezcla de antígenos micobacterianos, 48-72 horas después de la inoculación se observa una reacción de hipersensibilidad retardada, la cual da como resultado una induración. El resultado positivo o negativo, dependerá de los estándares de la región, así como de la historia clínica del paciente. Un resultado positivo oscila entre los 5 mm hasta los 15 mm (Kunst, 2006).

La falta de estandarización, la ausencia de antígenos específicos para micobacterias patógenas, la aparición de falsos positivos derivados del contacto con la vacuna BCG, así como la incapacidad de discrepar entre enfermedad activa o latente, impiden que la prueba de la tuberculina sea catalogada como método diagnóstico efectivo de la infección latente, lo cual ha llevado a la búsqueda de nuevas metodologías, no obstante, su uso sigue siendo elevado a nivel mundial, principalmente, por el bajo costo que ésta tiene, por lo cual es altamente empleada en países en vías de desarrollo (Kunst, 2006).

2.4.2 *Ensayos de interferón gamma (IGRA's)*

Con el fin de tener diagnósticos más específicos, se han diseñado nuevas técnicas de diagnóstico basadas en ensayos inmunológicos, capaces de distinguir entre los dos estadios de la enfermedad. Estos ensayos basan su principio en la cuantificación de INF- γ liberado por células T, en respuesta a antígenos tuberculosos específicos (Kunst, 2006). A pesar de la notable mejoría que muestran y de la facilidad y rapidez con la que son aplicadas, su eficacia aún no ha sido

comprobada, pues en los estudios comparativos realizados, los resultados son muy heterogéneos, por lo cual no se tiene una conclusión concreta sobre el rendimiento de las pruebas (Talati *et al.*, 2009; Person *et al.*, 2013).

Las técnicas de diagnóstico disponibles en el mercado son:

- QuantiFERON-TB

Es una técnica desarrollada por Cellestis®, Victoria, Australia, aprobada por la FDA en 2001. A partir de ese año se han desarrollado mejoras en la técnica, teniendo actualmente disponible la tercera generación (QuantiFERON-TB Gold in tube), la cual emplea péptidos sintéticos que simulan antígenos tuberculosos específicos, como el ESAT-6, CFP-10 y el TB 7.7 (Puñal y Quero, 2010). ESAT-6 y CFP-10 están codificadas por la región RD-1 del genoma del *M. tuberculosis*, brindando una alta especificidad, ya que estos antígenos se encuentran ausentes en la mayoría de las micobacterias ambientales (Puñal y Quero, 2010).

La prueba consiste en la estimulación de células mononucleares obtenidas de sangre periférica, con los antígenos mencionados durante 72 horas, posteriormente se cuantifica la cantidad de IFN- γ liberado. El software proporcionado en el kit determina si la prueba es positiva después de realizar una serie de algoritmos tomando en cuenta los estándares de la región (Puñal y Quiero, 2010; Kasprovicz *et al.*, 2011).

- T-SPOT TB

Es una técnica desarrollada por Oxford Immunotec®, Oxford, Reino Unido. El principio de esta prueba es muy similar a la prueba del QuantiFERON-TB. De igual manera se emplean células obtenidas de sangre periférica, el número de células se ajusta a 250.000 células/ml, las cuales son colocadas en una placa con pozos, siendo estimuladas con los antígenos ESAT-6 y CFP-10, la placa se incuba durante 22 horas y posteriormente se realiza un inmunospot, con el cual se cuantifica el número de células productoras de INF- γ . El kit cuenta con un software específico, el cual realizará los algoritmos necesarios, arrojando resultados positivos o negativos dependiendo de la cantidad de puntos observados (Van Leeuwen *et al.*, 2007; Puñal y Queiro, 2010).

2.5 Factores de riesgo de reactivación

Alrededor del 10% de la población infectada con tuberculosis latente, desarrollará la enfermedad activa en algún punto de su vida (Divangahi, 2013), cada individuo posee un determinado porcentaje de riesgo de reactivar la enfermedad. El riesgo aumenta o disminuye dependiendo de diversos factores, entre ellos el lugar de origen y de residencia, ya que, si existe incidencia de tuberculosis alta en la zona, es más probable que exista una infección o reinfección, lo que desencadenará la enfermedad activa (Verver *et al.*, 2004). Otros de los factores que aumentan la tasa de riesgo son la desnutrición que afecta a más de 1000 millones de personas, coinfección con VIH, que hasta ahora ha sido una de las mayores pandemias en el mundo; tabaquismo, se sabe que existen más de 1000 millones de fumadores, al

igual que personas que sufren alcoholismo, la diabetes se ha convertido en un grave problema mundial existen más de 200 millones de casos, el constante contacto con personas enfermas (familiares o personal médico), las malas condiciones de vida (como en centros de readaptación social), la edad (individuos con edad más avanzada tienen mayor riesgo de reactivación debido al desgaste inmunológico), etc., ya que todos estos factores aumentan la susceptibilidad del sistema inmune. Cuando existe un deterioro en el sistema inmune, éste es incapaz de combatir cualquier enfermedad, dando como resultado ventajas al bacilo, originando esta pandemia de tuberculosis actual (Divangahi, 2013; WHO, 2016; Chaiear, 2016).

2.6 Marcadores de latencia

Debido a la problemática que representa la reactivación de la tuberculosis latente y la poca eficacia de los métodos de diagnóstico disponibles en el mercado, el estudio de la latencia ha ido en aumento, con el fin de encontrar una estrategia eficaz para detectar a los bacilos latentes. Una de ellas es la detección de biomarcadores potenciales que permiten la diferenciación entre TB activa y TL. Dos de ellos son la proteína *alfa cristalina* y la enzima *isocitrato liasa*, ambas han sido relacionadas con la capacidad de persistencia en el hospedero, ya que son las principales proteínas sobre-expresadas durante el cambio de metabolismo activo a latencia (McKinney *et al.*, 2000; Talavera-Paulin *et al.*, 2016).

2.6.1 Alfa cristalina

Alfa cristalina (Acr), es una proteína de 16 kDa codificada por el gen Acr (Yuan *et al.*, 1998). Ha sido catalogada como la proteína predominante en los cultivos *in vitro* en fase estacionaria de *M. tuberculosis*, durante la hipoxia y se encuentra en elevados niveles dentro de macrófagos durante la infección. Se ha reportado que regula la latencia atenuando crecimiento del bacilo (Pang & Howard, 2007).

Existen dos pequeñas proteínas de choque térmico pertenecientes a la familia Alfa cristalina, Acr1 y Acr2, ambas se expresan después de la infección con *M. tuberculosis* en macrófagos y ratones, debido al ambiente hostil que el bacilo enfrenta, además se relaciona con mecanismos de protección (Najafi-Mosleh *et al.*, 2005). Homólogos de esta proteína se han relacionado con la formación de esporas en bacterias como *Bacillus subtilis* (O'Toole *et al.*, 2003).

2.6.2 Isocitrato Liasa

La isocitrato liasa (ICL), es una enzima esencial para el metabolismo de los ácidos grasos, está implicada en el ciclo del glioxilato que es una vía alternativa para generar energía cuando el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) se encuentra alterado debido al agotamiento de oxígeno o nutrientes. La ICL se puede encontrar en Arqueas, bacterias, hongos, nemátodos, plantas y protistas (Vanni *et al.*, 1990). En plantas superiores juega un papel importante en la germinación de semillas, además ha sido asociada a patogenicidad microbiana y supervivencia, se ha

encontrado en *Aspergillus nidulans*, *M. tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Burkholderia pseudomallei*, *Brucella melitensis* y *Yersinia pestis* (Vanni *et al.*, 1990; Lee, 2015).

M. tuberculosis expresa dos enzimas ICL (ICL1 e ICL2), codificadas por los genes *icl* (Rv0467) y *AceA* (Rv1915 / 6) (Zu Bentrup *et al.*, 1999). La ICL ha sido involucrada en la regulación del crecimiento micobacteriano, virulencia y persistencia dentro del huésped (Muñoz-Elías & McKinney, 2015). Se ha reportado que la inhibición de alguna de las dos enzimas no representa algún problema para la persistencia de *M. tuberculosis*, sin embargo, la inhibición de ambas enzimas es fatal para la micobacteria, pues su capacidad de emplear fuentes de carbono alternas a carbohidratos es suprimida y por lo tanto su persistencia en cultivo en fase estacionaria, así como en macrófagos disminuye considerablemente (Lee *et al.*, 2015).

I. Antecedentes

1. Modelos de tuberculosis latente

Una de las herramientas empleadas que ha causado mayor impacto y ha permitido notables avances, ha sido el desarrollo de modelos experimentales. En el caso de la tuberculosis se han desarrollado modelos *in vitro* e *in vivo*, que han permitido el reconocimiento de la patogenia y la respuesta inmunitaria ante una infección con *M. tuberculosis*, dando un seguimiento a la progresión de la enfermedad, permitiendo el estudio de agentes profilácticos. Sin embargo, el estudio de la latencia en tuberculosis no ha sido tan explorada mediante el uso de modelos, ésto debido a la complejidad de representar las condiciones estresantes que se enfrentan para llegar a un periodo de latencia, no obstante, se han desarrollado algunos modelos, que han permitido entender y prevenir algunos aspectos de la enfermedad, pero el conocimiento de este estadio aún es muy escaso.

1.1 Modelos *in vitro* de tuberculosis latente

Se han desarrollado varios modelos de latencia *in vitro* los cuales han tenido como principal objetivo simular las condiciones que las micobacterias enfrentan dentro del granuloma. La mayoría de los modelos *in vitro* son adaptaciones del modelo de Wayne, el primer modelo que permitió el estudio de la latencia en TB (Fitzgerald *et al.*, 2014).

1.1.1 Modelo de Wayne

El modelo de Wayne se basa en la disminución gradual de la concentración de oxígeno hasta llegar a una microanaerobiosis (Wayne & Hayer, 1996; Wayne & Sohaskey, 2001). En este modelo se observan dos etapas de persistencia no replicante:

- Persistencia No Replicativa 1 (NRP 1): Se observa cuando el nivel de O₂ disuelto se encuentra en aproximadamente 1%. Esta etapa se caracteriza por un lento aumento de la turbidez, por lo cual no se observa aumento en el número de UFC ni síntesis de ADN.
- Persistencia No Replicativa 2 (NRP 2): Se observa cuando el nivel de O₂ se encuentra por debajo del 0.06%. No se observa aumento de la turbidez, ya que los bacilos se desplazan hacia una etapa anaeróbica, por lo cual su capacidad de supervivencia depende de su capacidad de adaptación durante la NRP 1.

El modelo de Wayne fue el pionero en el estudio de los bacilos latentes, permite una comprensión de la latencia bacilar y nos da una idea sobre la adaptación metabólica del organismo durante la fase estacionaria. Sin embargo, no permite una visión general del estado de latencia en el hospedero, pues el constante control de las condiciones ambientales durante el experimento no permite una visión del ambiente latente natural.

1.2 Modelos in vivo de tuberculosis latente

No existen animales que sean un reservorio natural de tuberculosis, por lo cual son empleados animales susceptibles a la enfermedad. Los animales empleados con mayor frecuencia son ratones, cobayos y conejos, debido a la facilidad en su manipulación y al bajo costo que representa su mantenimiento, sin embargo, existen modelos en donde emplean pez cebra, cabras o primates no humanos (Dharmadhikari & Nardell, 2008; Patel *et al.*, 2011). Actualmente no existe un modelo adecuado, ya que los modelos existentes no han logrado representar las condiciones naturales de este periodo de la enfermedad, pues el estado latente es inducido mediante la administración de fármacos, las vías de infección no simulan la natural, etc. El mayor acercamiento hacia un modelo de tuberculosis latente ha sido en primates no humanos, debido a la cercanía genética con los humanos, sin embargo, el elevado costo que representa su mantenimiento, no ha permitido que estos estudios revelen los resultados esperados.

1.2.1 Modelos murinos

Los ratones son generalmente resistentes a la infección de TB cuando se comparan con conejos o cobayos, pero, son los animales de mantenimiento de más bajo costo, fácil manipulación, así como de respuesta inmunitaria similar a los humanos (Orme, 2003), lo que ha permitido el desarrollo de algunos modelos que a continuación se describen:

❖ Modelo de Cornell

El modelo de Cornell fue uno de los primeros modelos murinos propuestos. Fue desarrollado por McCune y colaboradores, en la Universidad de Cornell en 1956.

Este modelo emplea ratones Webster suizos, los cuales fueron infectados por vía intravenosa con dosis altas (5×10^5 a 2×10^6) de UFC de *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Después de la infección, los ratones fueron tratados con isoniazida y pirazinamida durante 3 meses, posteriormente se obtuvieron UFC negativas, en todos los individuos. Para verificar la existencia de bacilos en estado latente después de la administración del tratamiento, los ratones fueron tratados con cortisona, para inmunosuprimirlos, obteniendo reactivación de la enfermedad.

El modelo de Cornell es uno de los más aceptados y usados, ya que existen varios modelos que emplean el mismo principio realizando algunas variaciones.

❖ Modelo de recrudescencia

Orme y colaboradores, en 1988 desarrollaron un modelo denominado “Modelo de recrudescencia”, en el cual ratones hembra B6D2F1 (C57BL/6 x DBA/2) de 3 meses de edad fueron expuestas mediante nebulizaciones a dosis de 5 a 10 UFC de *M. tuberculosis* cepa Erdman. Inmediatamente después de la infección no se obtuvieron bacilos cultivables, sin embargo, alrededor de los 6 meses postinfección la carga bacilar osciló entre las 3000 y 4000 UFC y después de 18 meses, se observó que la enfermedad recrudece, es decir, de ser una enfermedad

aparentemente controlada, aumenta progresivamente, esto debido a que los ratones de 22 a 24 meses de edad, ya no tienen la capacidad de resistir ante una reactivación de la enfermedad. Confirmando que la edad avanzada es un factor de riesgo de reactivación de la enfermedad.

❖ Modelo de Phyu

En 1998 Phyu y colaboradores, desarrollaron un modelo murino de TL, inoculando ratones B6D2F1Bom de 17 semanas de edad, con dosis de 4×10^1 a 1×10^8 UFC de *M. tuberculosis* H37Rv. En ratones infectados con una dosis baja, se observó una cuantificación de UFC constante a lo largo del experimento y no se observaron signos clínicos de la enfermedad, sobreviviendo hasta 100 semanas después de la infección.

A las 53 semanas postinfección, la mitad de los individuos fueron inmunosuprimidos con corticosterona para reactivar la infección latente, encontrando un incremento del conteo de UFC, así como la presencia de sintomatología clínica.

❖ Modelo de Arriaga

En 2002, Arriaga y colaboradores, establecieron un modelo experimental utilizando ratones híbridos B6D2F1 (C57BL/6 x DBA/2). Los ratones fueron inoculados con distintas dosis de bacterias: dosis bajas 4×10^3 UFC a dosis altas 1×10^6 UFC de *M. tuberculosis* H37Rv por vía intratraqueal. Después de 9 meses los animales infectados con dosis baja presentaron 100% de sobrevida, incluso 2 años después

del inicio del experimento. Por otra parte, el conteo de UFC permaneció constante durante todo el experimento, manteniéndose alrededor de las 100 000 UFC.

Este modelo logra establecer una infección controlada con conteo de UFC constantes, sin observación de reactivación espontánea de la enfermedad, sin embargo, los bacilos son cultivables durante todo el curso del experimento, por lo cual, el estado de latencia no puede ser observado completamente.

❖ Modelo de tuberculosis latente para el desarrollo de vacunas

Suely Kashino y colaboradores (2006), propusieron el uso de una cepa mutante denominada *M. tuberculosis* cepa 18b para el establecimiento de un modelo de tuberculosis latente. Emplearon ratones cepa Balb/c los cuales fueron infectados vía intravenosa con 1×10^6 o 2×10^6 UFC. Esta cepa de *M. tuberculosis* se caracteriza por ser una mutante dependiente de estreptomicina, por lo cual ante la ausencia del fármaco desarrolla un proceso infeccioso semejante a la TL, observándose un aumento en la producción de la proteína alfa cristalina, lo cual mantiene viable a las bacterias mutantes. Cuando es administrada estreptomicina al medio, se observa un aumento en la carga bacilar, es decir, la bacteria mutante, logra salir de su estado de latencia.

II. Justificación

La información que existe sobre la latencia aún es limitada, debido a que los modelos experimentales que existen no reproducen fielmente esta condición en la micobacteria, ya que la inducen a través de la administración de terapia farmacológica seguida de inmunosupresión con corticosteroides.

Esta situación hace evidente la necesidad de implementar un modelo verdadero de latencia, en el cual las bacterias no sean cultivables por métodos convencionales, pero detectables por técnicas moleculares buscando la expresión de biomarcadores como la Isocitrato Liasa y la α -cristalina.

Un modelo animal nos permitiría caracterizar los mecanismos moleculares e inmunológicos de la latencia, brindando oportunidades para buscar tratamientos que eviten la reactivación de la tuberculosis.

III. Objetivos

1. *Objetivo general*

- Establecer un modelo de tuberculosis latente, empleando dosis infectivas bajas de *M. tuberculosis* H37Rv.

2. *Objetivos particulares*

- Determinar la dosis mínima reproducible adecuada de micobacteria, que favorezca el establecimiento de un modelo de latencia.
- Identificar individuos con cultivo negativo a través de la determinación de carga bacilar durante una cinética en los días 7, 14, 21, 28, 60, 150 y 210 post-infección.
- Identificar biomarcadores de latencia mediante la extracción de RNA micobacteriano de los tejidos infectados, para la detección de animales con TL.

IV. Materiales y métodos

1. Modelo murino

1.1 Infección animal

Grupos de 49 ratones machos de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad, proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), fueron anestesiados con sevoflurano (100 µL por ratón), e inoculados vía intratraqueal con UFC de la cepa prototipo H37Rv de *M. tuberculosis*, las dosis empleadas fueron 10, 100, 250 y 500 UFC, suspendidas en 100 µl de solución salina estéril, realizando la respectiva siembra (control de infección) en placas de agar con medio 7H10 (Difco, Detroit, MI USA) adicionado con OADC (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD).

Las bacterias empleadas para la infección fueron crecidas en medio 7H9 con 0.5% de glicerol y 0.05% de tween 80 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) adicionado con ADC (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD), y extraídas en fase logarítmica a una densidad óptica de 0.6 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm y se corroboró la pureza mediante tinción Ziehl-Neelsen y se calculó la concentración del lote por determinación de carga bacteriana como más adelante se describe.

Los ratones fueron mantenidos en grupos de 7 animales, en micro aisladores conectados a un sistema de presión positiva (Allenton, USA), administrando agua y comida *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar nivel de bioseguridad III.

El protocolo y uso de animales fue aprobado por el Comité de Investigación de Animales (CINVA) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

CEPA	DOSIS	CINÉTICA DE SACRIFICIO	RATONES POR DÍA DE SACRIFICIO	RATONES POR GRUPO
H37Rv	10 UFC	7, 14, 21, 28, 60, 150 y 210 días	7	49
	100 UFC			
	250 UFC			
	500 UFC			
Ratones totales del experimento:			196	

Tabla 1. Distribución de los animales del experimento.

1.2. Sacrificio

Grupos de 7 ratones de cada grupo fueron anestesiados con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal con una dosis de 210 mg/kg y sacrificados por exanguinación a los días 7, 14, 21, 28, 60, 150 y 210 post-infección (Tabla 1). De cada individuo se obtuvieron ambos pulmones, bazo, sangre periférica y suero.

Inmediatamente después de la exanguinación, 100 µl de sangre fueron colocados en aproximadamente 1cm² de papel filtrante cuantitativo grado 41 (Whatman), recomendado para procedimiento analíticos con partículas espesas. El cual fue almacenado a -70°C, para su posterior procesamiento.

El pulmón derecho de cada uno de los individuos fue congelado en nitrógeno líquido inmediatamente, y guardado a -70°C hasta su procesamiento, para determinar la carga bacilar. El pulmón izquierdo de 4 individuos fue tratado de la misma manera, para su análisis molecular, y los 3 pulmones izquierdos restantes, fueron perfundidos vía intratraqueal con etanol y conservados en etanol absoluto para su posterior análisis histológico (Figura 6). El bazo y el suero, fueron congelados y almacenados en las mismas condiciones.

R ₁	UFC - BM
R ₂	UFC - BM
R ₃	UFC - BM
R ₄	UFC - BM
R ₅	UFC - Histología
R ₆	UFC - Histología
R ₇	UFC - Histología

Figura 6. Distribución del tejido pulmonar. Dónde: R: Ratón, UFC: Unidades Formadoras de Colonias, BM: Biología Molecular.

2. Procesamiento de tejidos murinos

2.1 Determinación de Unidades Formadoras de Colonias

En la determinación de carga bacteriana, la micobacteria es cultivada en un medio sólido específico, mediante diluciones seriadas, teniendo como objetivo conocer el número de bacterias que hay en el pulmón del ratón en cada uno de los tiempos estudiados. Los resultados son expresados como miles de bacterias por pulmón.

El pulmón derecho destinado a la cuantificación de UFC, fue homogenizado de forma mecánica con perlas de zirconia en un homogeneizador de tejidos (Fast-Prep-24 versión 6004.3), sometiendo la muestra a 1 pulso de 4 m/s^2 durante 20 segundos, enseguida se colocó 1 mL de PBS-Tween 80 al 0.05%, y se homogeneizó nuevamente sometiendo a 3 pulsos más. El material homogeneizado fue sonificado durante 45 segundos (Ultrasonic Cleaner Cole Palmer), y se hicieron diluciones seriadas (1:10) del material, sembrando por duplicado en cajas Petri con medio Bacto Middlebrook 7H10 (Difco, Detroit, MI USA), enriquecido con OADC (Becton, Dickinson y Compañía, Sparks, MD). Las placas fueron incubadas a 37°C y 5% de CO_2 . El conteo de colonias se realizó a los 14 y 21 días posteriores.

2.2 Preparación del tejido murino para su estudio histológico

Los pulmones destinados para su estudio histológico, perfundidos y mantenidos con etanol absoluto, fueron cortados por la región parasagital, deshidratados y

embebidos en parafina. Se realizaron cortes de 4 μm de espesor con un micrótomo (Leica, Microtome, RM2145), los cuales fueron sometidos a una tinción con hematoxilina-eosina para su posterior observación.

2.3 Técnicas moleculares

2.3.1 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA fue empleado el kit Quick RNA mini prep (Zymo Research, Irvine, USA). Los pulmones destinados para el aislamiento de RNA fueron macerados en un mortero, manteniéndolos congelados usando nitrógeno líquido. El pulmón fue pulverizado perfectamente y colocado en 600 μl de RLT- β -mercapto frío, centrifugados a 14 000 rpm durante cinco minutos, el RNA del hospedero contenido en el sobrenadante fue almacenado a -70°C , mientras que el RNA de la micobacteria contenido en el pellet siguió el proceso de extracción agregando buffer de lisis (incluido en el kit) centrifugando a 10 000 rpm por un minuto en una columna para secuestrar el DNA, se agregaron 600 μl de ETOH al 100% al filtrado y se colocó en otra columna, previamente tratada con DNAsas, siguiendo con un proceso de centrifugación a 10 000 rpm por un minuto. Se descartó el filtrado y fueron colocados 400 μl de prep-buffer centrifugando a 10 000 rpm durante un minuto, siguiendo con una serie de lavados con 700 μl y 400 μl de wash buffer, centrifugando a 10 000 rpm por un minuto y 14 000 rpm durante dos minutos, por ultimo fueron agregados 35 μl de agua libre de RNAsas en el centro de la columna y se sometió a un proceso de centrifugación a 14 000 rpm por dos minutos

obteniendo el RNA puro. La calidad y cantidad del RNA obtenido, fue cuantificada empleando un espectrofotómetro de Microplaca Epoch 2 (BioTek Instruments, Inc, USA).

2.3.2 RT-PCR

A partir del RNA obtenido fue sintetizado cDNA, usando el kit omniscrypt RT (Qiagen, Hilden, Alemania), 100 ng de RNA y oligo dT (Promega corporation Madison WI). De cada muestra se realizó un control negativo de reacción, empleando todos los reactivos excepto la Omniscript Reverse Transcriptase, para descartar la presencia de DNA genómico (Tabla 2).

Master Mix	Volumen por reacción
10X Buffer RT	2.5 µl
dNTP Mix (5mM de cada dNTP)	2.5 µl
Oligo dT Primer	2.5 µl
RNase inhibitor	1 µl
Omniscrypt Reverse Transcriptase	1 µl
Agua libre de RNAsas	Agua necesaria para un volumen final de 25 µl
RNA	Volumen necesario de RNA para una concentración de 100ng/µl.

Tabla 2. Volumen de reactivos del kit omniscrypt RT, para síntesis de cDNA.

2.3.3 PCR punto final

Se realizó PCR punto final para amplificar los transcritos de interés (Tabla 3), empleando el kit HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Alemania), bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Master Mix	Volumen por reacción
Hotstar	12.5 µl
Iniciador sentido	0.5 µl
Iniciador antisentido	0.5 µl
cDNA	1 µl (100ng/ µl)
Agua libre de RNAsas	10.5 µl

Tabla 3. Volumen de reactivos del kit HotStarTaq DNA Polymerase para PCR punto final.

Con el fin de analizar los productos de la amplificación mediante electroforesis, se prepararon geles de agarosa al 2%, se corrieron a 100 mV y se observaron empleando un transiluminador con luz ultravioleta.

2.3.4 PCR Tiempo real

Se realizó qPCR con el fin de identificar la presencia de material genético de *M. tuberculosis*, ya que esta técnica permite la detección de cantidades mínimas, cuantificando hasta 1 copia del transcrito. Se utilizó Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen, USA) (Tabla 4). Se utilizó un equipo 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, USA). Las condiciones usadas fueron: Desnaturalización inicial 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, T_M específica de cada primer empleado durante 20 segundos y por último 72°C por 35 segundos. La cuantificación se realizó empleando curvas estándar, utilizando diluciones seriadas de DNA de concentración conocida, preparadas mediante la amplificación por PCR. La cuantificación se realizó por duplicado.

Master Mix	Volumen por reacción
SYBR Green®	12.5 µl
Iniciador sentido	0.5 µl
Iniciador antisentido	0.5 µl
cDNA	1 µl (100ng/ µl)
Agua libre de RNAsas	10.5 µl

Tabla 4. Volumen de reactivos de la Quantitect SYBR Green PCR kit, empleado en qPCR.

Los primers específicos fueron los siguientes:

Primer	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño (pb)	Especificaciones
IS 6110	⁵ CCTGCGAGCGTAGGCCGTCGG ³ ⁵ CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG ³	68	123	Componente específico del complejo <i>M. tuberculosis</i> , que se encuentra usualmente repetido a lo largo del cromosoma bacteriano.
16S	⁵ ATGACGGCCTTCGGGTTGTA ³ ⁵ CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC ³	66	120	Amplifica una región común a todas las especies del género <i>Mycobacterium</i> , codifica el RNA ribosómico, que constituye el 80% del contenido en RNA de las bacterias.
PCL1	⁵ TGTGTTTGGTGGTTTCACATT ³ ⁵ GGAAAAGGGAGCCAAAGGTA ³	60	120	Es el promotor más activo del operon codificante para RNA ribosómico de <i>M. tuberculosis</i> . Solo hay una copia por genoma bacteriano.
ftsZ	⁵ GCAGCGACTTGGGCTTGTTTC ³ ⁵ GGGTGAGCGGCGTCTTGAC ³	62	71	Codifica para una proteína implicada en la síntesis del septum bacteriano. Solo hay una copia del gen por cada genoma.
hspX	⁵ AGCAGAAGGACTTCGACGGTC ³ ⁵ GTGCGAACGAAGGAACCGTA ³	64	60	Codifica para la proteína bacteriana α -cristalina. Biomarcador de latencia. Solo hay una copia del gen por cada genoma.
ICL	⁵ TTCCTGCACTTCGACATACG ³ ⁵ CCAAGTTCCAGAAGGAGCTG ³	58	146	Codifica para la enzima isocitrato liasa, implicada en el metabolismo de ácidos grasos.

Tabla 5. Primers empleados en qPCR. Tm: Temperatura de fusión. Pb: Pares de bases. (Cubero *et al.*, 2012)

3. *Procesamiento de sangre periférica*

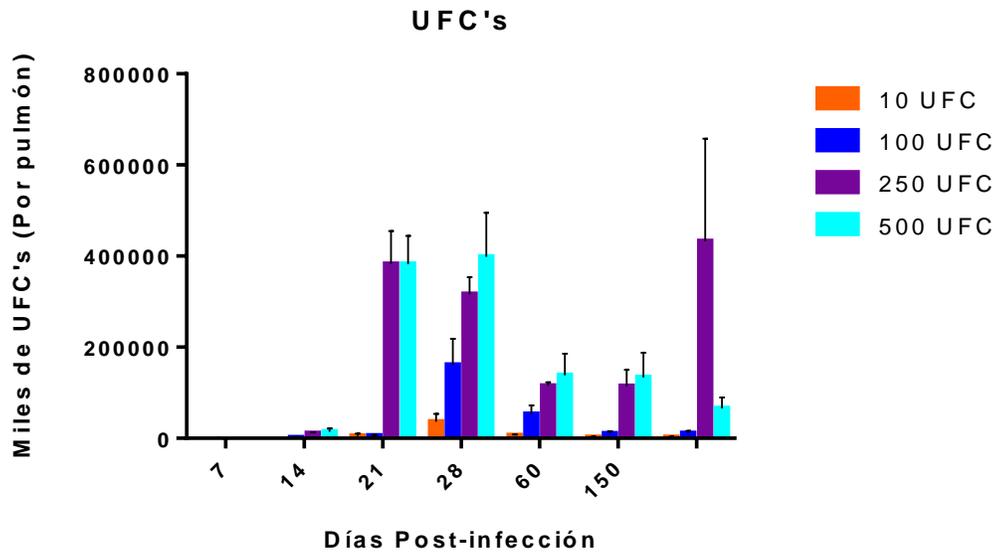
Las muestras de sangre periférica en papel filtro, fueron empleadas para la estandarización de la extracción de ácidos nucleicos, de acuerdo a la metodología empleada por Cubero *et al*, 2012. La región del filtro con la muestra fue puesta en contacto con glass beads (perlas de vidrio de 150-212mm) y 500 µl de buffer de lisis (EDTA 0,1mM pH 8, Tris 10mM pH8, DTT 2mM y 800u/ml de inhibidor de ribonucleasas). La lisis mecánica se realizó sometiendo la muestra a 7 pulsos de 4 m/s² durante 45 segundos en Fast Prep-24 versión 6004.3, manteniendo la muestra durante 5 minutos en hielo después de cada pulso. Los ácidos nucleicos fueron recolectados por centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos y precipitados con acetato de sodio 3 M pH 5.2 e isopropanol al 100% durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron durante 20 min a 12000 rpm, se lavaron con 500 µl de etanol frío al 70%, y finalmente los ácidos nucleicos se resuspendieron en 40 µl de H₂O DEPC. La calidad y cantidad del RNA obtenido se cuantificó empleando un espectrofotómetro de Microplaca Epoch 2 (BioTek Instruments, Inc, USA).

V. Resultados

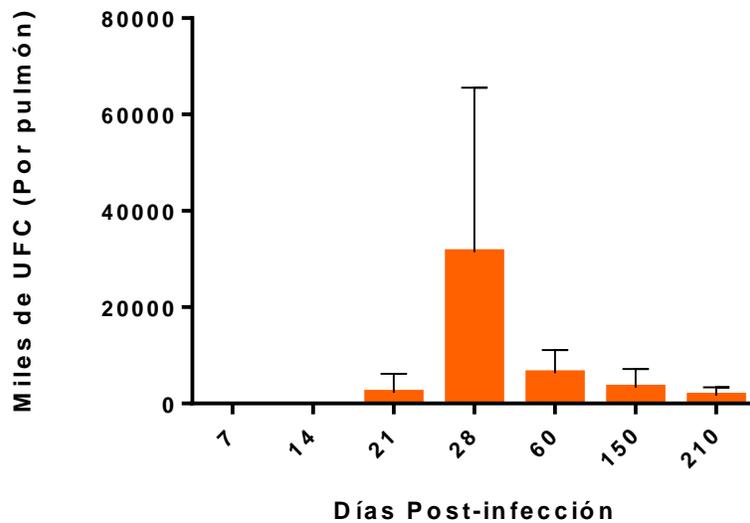
1. *Determinación de carga bacilar*

La carga bacilar, fue determinada sembrando diferentes diluciones de los homogenizados pulmonares y contando las UFC. Como muestra la gráfica 1, las cuatro dosis de bacterias presentaron carga bacilar a lo largo del experimento, las dosis bajas de 10 UFC y 100 UFC mostraron una tendencia similar, manteniendo un conteo de UFC bajo, observando un aumento de UFC en los primeros días, disminuyendo los últimos días del experimento, se observó un comportamiento similar entre las dosis altas presentando un conteo de UFC más elevado.

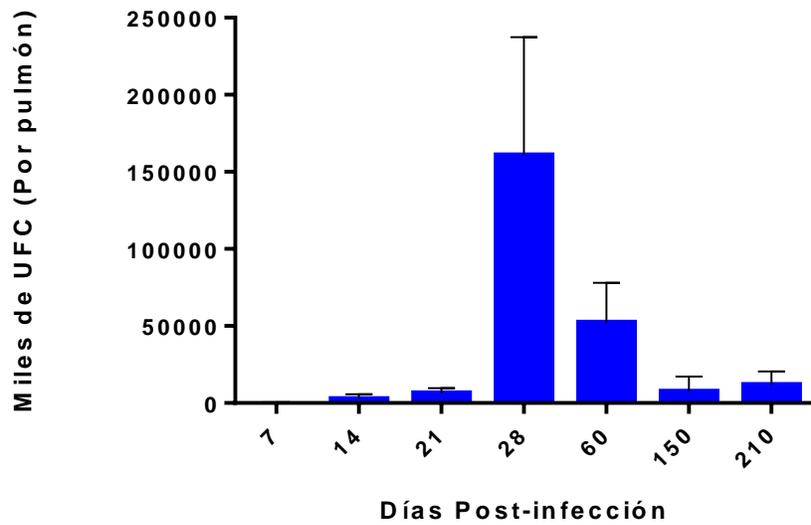
En las dosis bajas se observa un pico máximo en el conteo al día 28, obteniendo un conteo máximo de 36 000 UFC en la dosis de 10 UFC (Gráfica 2) y 160 000 UFC para la dosis de 100 UFC (Gráfica 3), disminuyendo en los días posteriores hasta un conteo de 2 300 UFC y 10 000 UFC a los 7 meses respectivamente. Por otra parte, las dosis altas, mostraron sus picos máximos a partir del día 21, contabilizándose 380 000 UFC y 400 000 UFC para las dosis de 250 y 500 UFC, disminuyendo hasta las 65 000 UFC en la dosis de 500 UFC a los 7 meses (Gráfica 5), no se observó esta disminución en el grupo infectado con 250 UFC (Gráfica 4).



Gráfica 1. Unidades formadoras de colonias en pulmón. En la gráfica se muestra la comparación de la carga bacilar entre los 4 grupos de estudio. Ratones infectados con 10, 100, 250 y 500 UFC de *M. tuberculosis* H37Rv. Se muestra la media y desviación estándar de los datos del grupo (n=7).

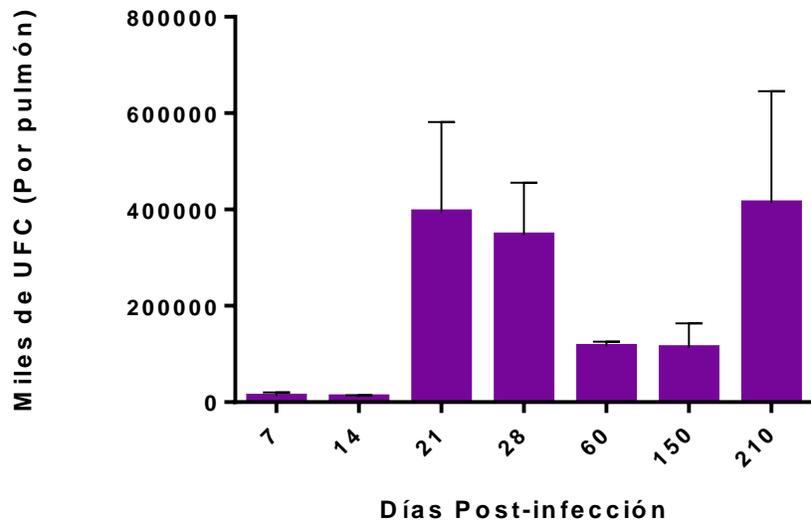


Gráfica 2. Unidades formadoras de colonias en pulmón de ratones infectados con 10 UFC. En la gráfica se muestra la carga bacilar de ratones infectados vía intratraqueal con *M. tuberculosis* H37Rv. Se muestra la media y desviación estándar de los datos del grupo (n=7).



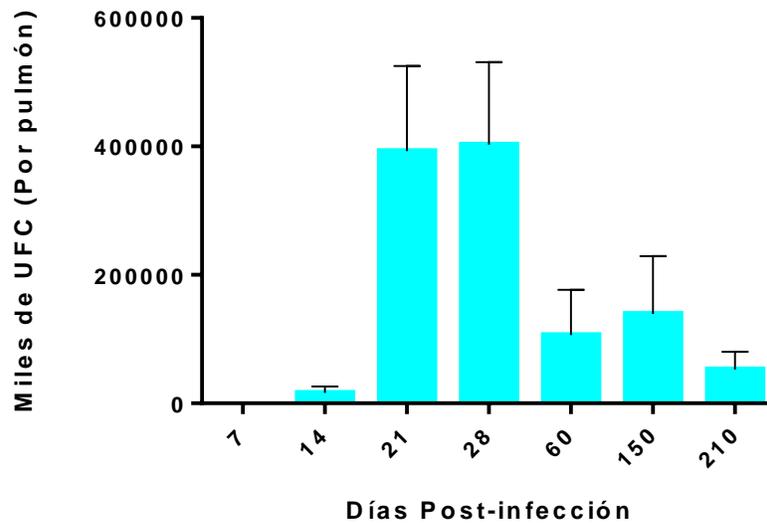
Gráfica 3. Unidades formadoras de colonias en pulmón de ratones infectados con 100 UFC.

En la gráfica se muestra la carga bacilar de ratones infectados vía intratraqueal con *M. tuberculosis* H37Rv. Se muestra la media y desviación estándar de los datos del grupo (n=7).



Gráfica 4. Unidades formadoras de colonias en pulmón de ratones infectados con 250 UFC.

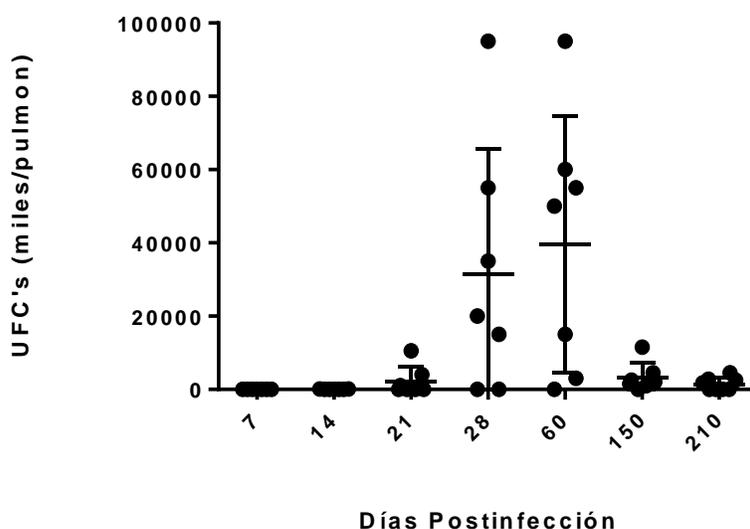
En la gráfica se muestra la carga bacilar de ratones infectados vía intratraqueal con *M. tuberculosis* H37Rv. Se muestra la media y desviación estándar de los datos del grupo (n=7).



Gráfica 5. Unidades formadoras de colonias en pulmón de ratones infectados con 500 UFC.

En la gráfica se muestra la carga bacilar de ratones infectados vía intratraqueal con *M. tuberculosis* H37Rv. Se muestra la media y desviación estándar de los datos del grupo (n=7).

Con respecto a los resultados obtenidos en el grupo infectado con 10 UFC (Gráfica 6), no se contabilizó crecimiento bacilar en los primeros días del experimento (día 7 y 14), sin embargo, al día 28 se observa un considerable aumento en algunos integrantes del grupo, los conteos fueron muy heterogéneos. El conteo de UFC a los días 21, 150 y 210 fue muy homogéneo, observando incluso algunos individuos con resultado negativo en el conteo de UFC. Esta tendencia hacia UFC negativo aumentó con respecto al tiempo, contabilizando 4 individuos con UFC negativo a los 210 días (Tabla 6).



Gráfica 6. Unidades formadoras de colonias en pulmón de ratones infectados con 10 UFC individual. En la gráfica se muestra la carga bacilar de ratones infectados vía intratraqueal con *M. tuberculosis* H37Rv. Se muestra el conteo de UFC individual en cada tiempo de sacrificio (n=7).

Individuo/Día	7	14	21	28	60	150	210
R1	X	√	√	√	√	√	X
R2	X	X	X	√	X	√	X
R3	X	√	√	√	√	X	√
R4	X	X	X	√	√	√	X
R5	X	X	√	√	√	√	√
R6	X	X	√	X	√	√	X
R7	X	X	X	√	√	√	√
R8	-	-	-	-	-	-	√

Tabla 6. Resultados positivos y negativos durante el conteo de UFC de pulmones de ratones infectados. Se muestran los resultados obtenidos a lo largo del experimento en el grupo infectado con 10 UFC de *M. tuberculosis* H37Rv.

Dónde: X: Cultivo negativo. √: Cultivo positivo. -: No existe el individuo

2. Análisis histológico

Se analizaron los pulmones de los ratones infectados con las 4 dosis empleadas, observando muy poco daño tisular a lo largo del experimento. A los 210 días se observa daño sin que éste sea significativo, ya que el espacio alveolar puede ser observado con facilidad, en la mayoría de la superficie pulmonar, llamando la atención unas pequeñas áreas neumónicas (zonas con coloración intensa) en los pulmones de ratones infectados con 100, 250 y 500 UFC (Figura 7B, 7C y 7D), ésto no es visible en ratones infectados con 10 UFC (Figura 7A). Se puede observar que el daño aumenta correlacionando con la dosis de UFC empleada, entre mayor dosis, mayor es el daño observado.

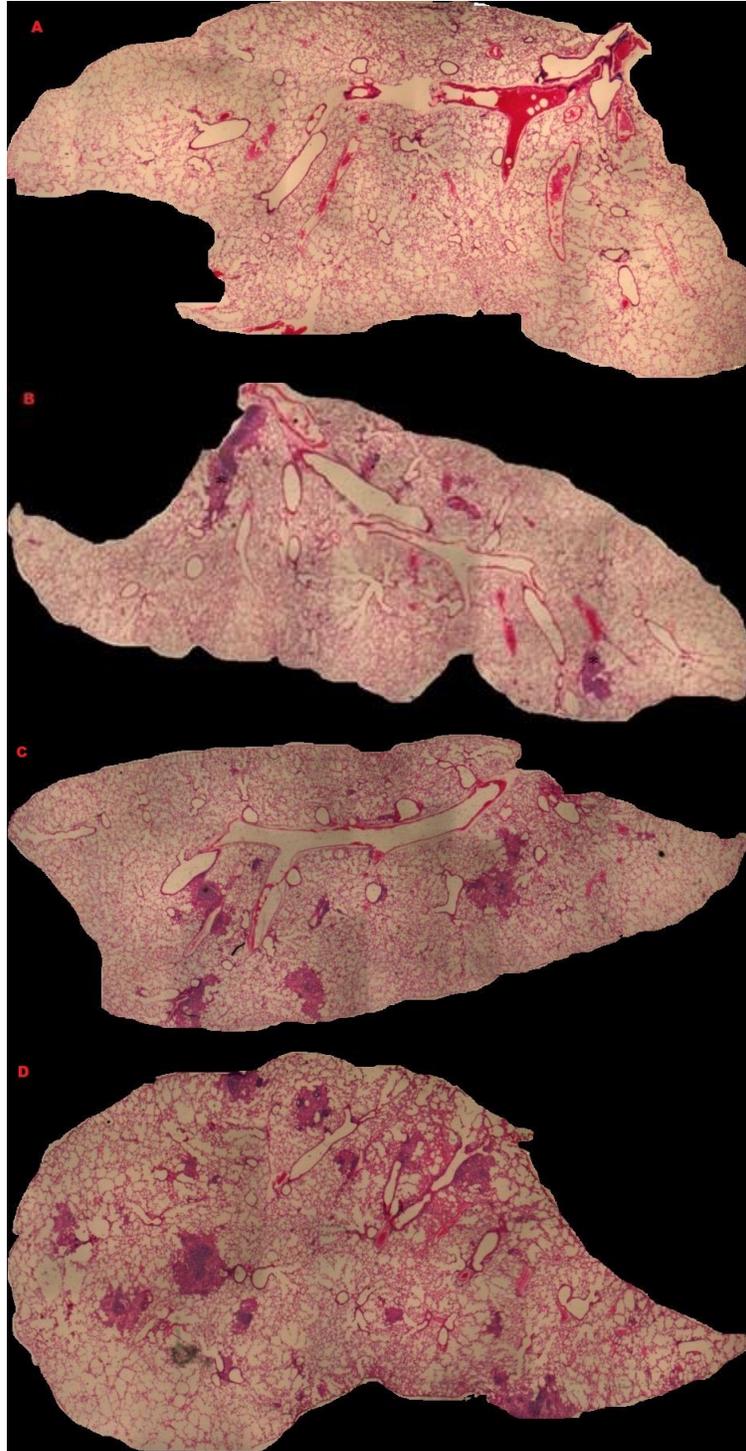


Figura 7. Micrografías representativas de los pulmones de ratones infectados con las diferentes dosis a los 210 días post-infección. 10 UFC (A), 100 UFC (B), 250 UFC (C) y 500 UFC (D). Tinción H&E a 2.5x.

3. Técnicas moleculares

3.1. Calidad del RNA

Aquellos individuos con resultado negativo en el cultivo de UFC (Tabla 5), fueron sometidos a extracción de ácidos nucleicos. Se obtuvo RNA de buena calidad (Tabla 7. Columna 4), necesario para la amplificación de los marcadores de metabolismo y latencia. La pureza del RNA fue medida empleando la relación de absorbancias A260/280, los ácidos nucleicos tienen máximos de absorbancia a 260 nm, por lo cual, la relación de este máximo de absorbancia y la absorbancia a 280 nm se ha utilizado como una medida de pureza. Un valor entre 2.0-2.2 indica un RNA de pureza óptima. Valores A260/280 > 1.7 corresponden a una muestra de RNA con una pureza aceptable. Valores < 1.7 indicarían la presencia de contaminantes con absorbancias cercanas a 280nm (Boletín técnico NanoDrop Lite).

En las 16 muestras analizadas se obtuvo RNA de pureza óptima o aceptable, asegurando resultados confiables en las siguientes metodologías.

Nomenclatura	Muestra	Cultivo	Absorbancia 260/280
1	D7.1	Negativo	1.714
2	D7.2	Negativo	2.986
3	D7.3	Negativo	1.794
4	D14.2	Negativo	2.067
5	D14.4	Negativo	2.049
6	D21.2	Negativo	1.973
7	D21.4	Negativo	2.121
8	D60.1	5000 UFC	2.290
9	D60.2	Negativo	2.146
10	D60.3	3000 UFC	2.164
11	D60.4	6000 UFC	2.067
12	D150.3	Negativo	2.039
13	D210.1	Negativo	2.035
14	D210.2	Negativo	2.221
15	D210.4	Negativo	2.002

Tabla 7. Muestras con cultivo negativo y cultivo bajo en medio 7H10. Columna 1: nomenclatura empleada para reconocer las muestras en las técnicas de biología molecular. Columna 2: Muestra analizada (Se indica el día postinfección y el número de ratón). Columna 3: Resultado del conteo de UFC. Columna 4: Absorbancia 260/280, indica calidad del RNA.

3.2 PCR punto final

Mediante PCR punto final pudo ser identificado en todas las muestras analizadas la secuencia IS6110, un fragmento de 123 pb, presente en los miembros del complejo *M. tuberculosis*, observando mayor intensidad en la imagen del fragmento amplificado, de las muestras del día 7, disminuyendo la intensidad gradualmente en los días posteriores de infección (Figura 8).



Figura 8. Detección de la secuencia IS6110 de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* por PCR punto final. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. MP: marcador de peso molecular, 1-15: muestras en estudio, Ctrl+: control positivo (cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv), Ctrl-: control negativo.

Una vez confirmada la presencia de DNA micobacteriano, mediante PCR punto final se amplificó el segmento de 120 pb 16s, para identificar rRNA, indicativo de viabilidad de la micobacteria. Como se observa en la Figura 9, en ninguna de las muestras analizadas fue posible detectar rRNA.



Figura 9. Detección de la secuencia 16s de rRNA de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* por PCR punto final. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. MP: marcador de peso molecular, 1-15: muestras en estudio, Ctrl-: control negativo, Ctrl+: control positivo (cultivo de *M. tuberculosis*).

3.3 PCR tiempo real

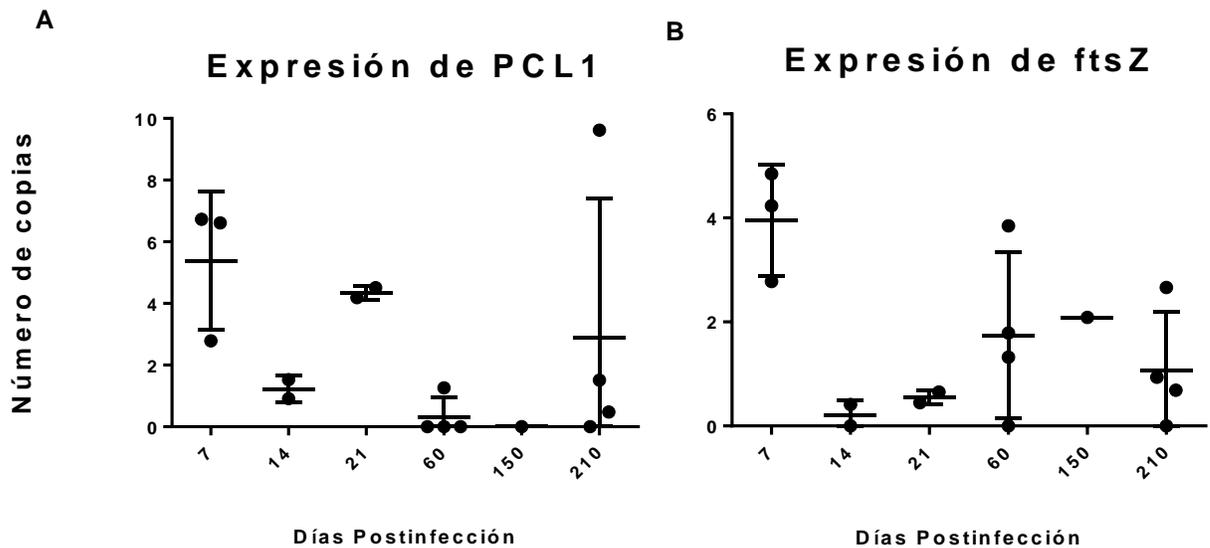
Con el fin de determinar la presencia de *M. tuberculosis*, mediante qPCR se cuantificaron las dianas moleculares empleadas en el experimento (Tabla 4). Sabiendo que con esta técnica se podía realizar la cuantificación absoluta de DNA presente en la muestra.

Una vez determinada la presencia de *M. tuberculosis* en el total de las muestras, se procedió a detectar las dianas implicadas en metabolismo activo: 16s, ftsZ y PCL1. 16s correspondiente a la presencia de rRNA, no fue detectada en ninguna de las muestras en estudio, mientras que ftsZ y PCL1 sólo pudieron ser identificadas en 13 de 16 muestras y en 11 de 16 muestras respectivamente. Cuantificando hasta 5 copias a los 7 días postinfección para ftsZ y 7 copias para PCL1 (Gráfica 7A y 7B).

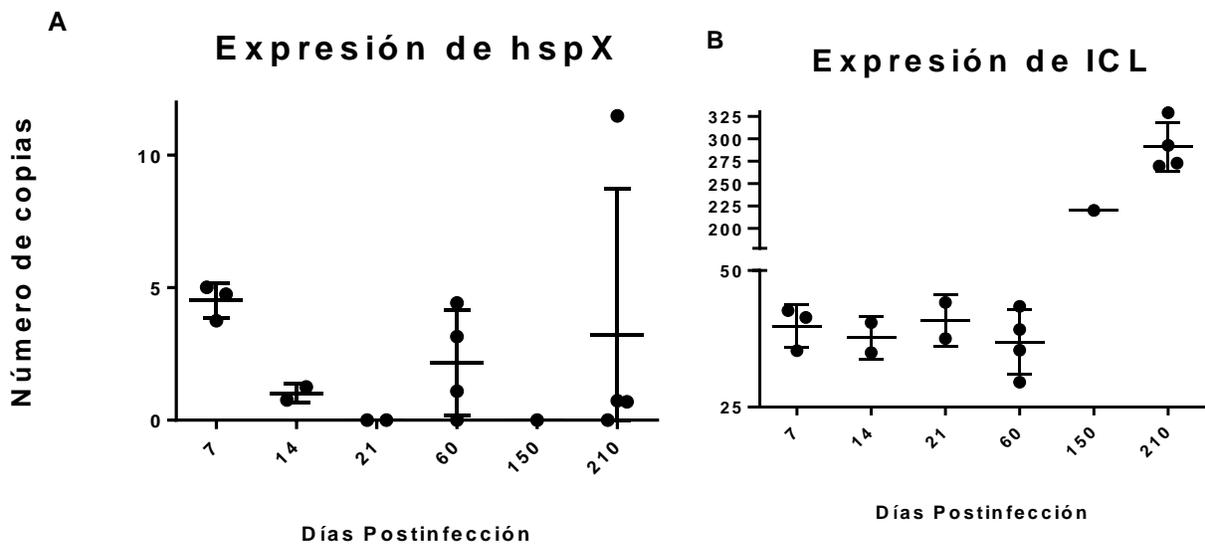
Por otra parte, los resultados de los biomarcadores de latencia mostraron 11 muestras positivas para hspX, mientras que, ICL fue detectada en todas las muestras. ICL mostró cuantificaciones mínimas de 30 copias, llegando hasta las 330 a los 210 días. hspX por su parte, pudo ser cuantificada en niveles de hasta 5 copias (Gráfica 8A y 8B).

En la gráfica 7A y 7B, correspondiente a la expresión de genes de metabolismo activo: PCL1 y ftsZ, se observa el mayor punto de expresión al día 7 en ambas dianas, disminuyendo en los días posteriores del experimento, ftsZ mostró una ligera tendencia a aumentar sobre los últimos días del experimento.

Con respecto a los transcritos de biomarcadores de latencia (gráfica 8A y 8B), se puede observar mayor expresión en el día 7 de hspX, disminuyendo en los días posteriores, manteniéndose durante todo el experimento. ICL por su parte, mostró niveles elevados desde el día 7, siendo notoria su tendencia al aumento sobre la fase final del experimento, detectándose hasta 10 veces más cantidad de transcritos.



Gráfica 7. Expresión de las dianas de metabolismo activo. Se muestra la cuantificación de dianas de metabolismo activo en cDNA de muestras pulmonares de animales infectados por vía intratraqueal con 10 UFC de la cepa tipo de *M. tuberculosis* H37Rv con cultivo negativo. A) Región promotora PCL1, B) Gen Constitutivo ftsZ.



Gráfica 8. Expresión de biomarcadores de latencia. Se muestra la cuantificación de biomarcadores de latencia en cDNA de muestras pulmonares de animales infectados por vía intratraqueal con 10 UFC de la cepa tipo de *M. tuberculosis* H37Rv con cultivo negativo. A) Proteína α cristalina (HspX), B) Enzima Isocitrato liasa (ICL).

3.4 Extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre periférica

La extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre periférica, no fue posible debido a la presencia de abundantes proteínas sanguíneas durante la extracción, ya que el papel filtro empleado, no poseía la cualidad de secuestrar estas proteínas, permitiendo la contaminación de los ácidos nucleicos con ellas.

VI. Discusión

La tuberculosis, es una enfermedad que actualmente destaca a nivel mundial, por su alta prevalencia y la mortalidad que origina *M. tuberculosis* al no ser combatido y erradicado por el sistema inmune o bien por agentes microbicidas. A pesar de los avances de la ciencia y el desarrollo de productos bactericidas contra el bacilo, esta enfermedad sigue siendo importante a nivel mundial. El éxito de esta bacteria se debe a la capacidad de resistencia a antibióticos que ha desarrollado, y en mayor proporción al reservorio del bacilo en la población mundial mediante el establecimiento de infección latente en aproximadamente 2.3 billones de individuos, durante la cual, la micobacteria permanece viable en el hospedero por tiempo indefinido (Houben & Dodd, 2016).

Se sabe que durante la infección primaria, la respuesta inmune innata del huésped, es la encargada de combatir al agente invasor, principalmente por células fagocíticas, en las cuales la micobacteria se enfrentará a condiciones adversas durante su proceso de eliminación en el fagosoma y posteriormente durante la formación del fagolisosoma (Deretic & Fratti, 1999). Por lo cual, *M. tuberculosis*, ha desarrollado la capacidad de ajustarse a estas condiciones adversas en el ambiente del huésped, mediante significativos cambios en su expresión génica (Salina *et al.*, 2009).

Hasta la fecha, la infección por tuberculosis latente, ha sido uno de las grandes enigmas en la comunidad científica y representa uno de los mayores problemas a los que se ha enfrentado la humanidad, pues no existe una vía adecuada para combatirla, por la falta de conocimiento sobre este estadio. Uno de los métodos diseñados en el ámbito médico para el estudio de enfermedades, es el establecimiento de modelos experimentales para obtener datos que permitan el desarrollo de estrategias para combatirlas. Los modelos de tuberculosis se han enfocado en la fase activa de la enfermedad permitiendo el conocimiento de varios aspectos de la enfermedad, así como el desarrollo de antibióticos y vacunas, lo cual ha sido un gran avance contra la enfermedad (Pando *et al.*, 2004).

Los modelos de tuberculosis latente han sido menos estudiados y se han enfocado principalmente en el estudio *in vitro* de la enfermedad, sin embargo, esto no permite una correcta visión de los mecanismos empleados por la micobacteria durante la infección latente, debido al amplio control que existe sobre el ambiente al que son expuestas las micobacterias, exponiéndolas ante condiciones adversas, induciendo el período de latencia principalmente por hipoxia, depleción de nutrientes, disminución del nivel de pH, presencia de ROS y RNS, etc., (Najafi-Mosleh *et al.*, 2005; Gordillo *et al.*, 2006; Deb *et al.*, 2009; Rustad *et al.*, 2009; Alnimr, 2015). Por otra parte, los modelos animales se han convertido en herramientas útiles para el estudio de la tuberculosis, ya que permiten una visión completa sobre varios aspectos de la enfermedad, al simular una infección, además, las micobacterias deben enfrentarse a la respuesta inmune del hospedero, dándonos una visión más

cercana a la enfermedad en humanos, por lo cual éstos resultados a diferencia de los obtenidos *in vitro*, pueden ser tomados con mayor valor.

El propósito de esta tesis fue estandarizar un modelo murino de tuberculosis latente, empleando la línea consanguínea de ratones de BALB/c, caracterizada por su uniformidad fenotípica, igualdad y estabilidad genética, lo cual permite certificar que no existe variabilidad en los parámetros experimentales causados por factores genéticos (Benavides & Guénet, 2003).

La dosis de infección en el establecimiento de modelos animales, ha tomado gran importancia debido a que de ésta depende la respuesta tanto del huésped como del propio agente infeccioso, se ha reportado que la virulencia de un patógeno está determinada por su capacidad de crecimiento, por lo cual los estudios sobre el efecto dosis/respuesta han ido en aumento principalmente en agentes con alta prevalencia y persistencia, entre ellos *M. tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Virus de la influenza tipo A*, etc., (Caceres *et al.*, 2012; Barnewall *et al.*, 2012, Song *et al.*, 2015).

En los modelos de tuberculosis, las dosis empleadas generalmente son elevadas, dado que estos animales no son huéspedes naturales de las micobacterias (Hernandez-Pando, 1995), aunque son medianamente susceptibles (North & Jung, 2004). Las dosis empleadas en este experimento fueron dosis bajas de 10, 100, 250 y 500 UFC, a pesar de ser dosis tan bajas se logra provocar enfermedad, como bien muestra la gráfica 1, en las cuatro dosis se observa conteo de UFC, comprobando que la administración de dosis bajas de bacterias, son capaces de producir

enfermedad, como se ha observado en humanos (Lewis, 2007). La eficacia de estas dosis, es debida a que la administración de las micobacterias se realizó por vía intratraqueal, pues se ha establecido que ésta es la más adecuada para simular la vía natural de infección (Pando *et al.*, 2004), ya que a diferencia de la infección por vías no naturales como la vía intravenosa o intraperitoneal, permite un mejor control de la dosis y garantiza que todas las bacterias se depositen directamente en el pulmón, pues se ha visto que el uso de nebulizadores durante la simulación de infección por vía natural con dosis bajas de bacterias puede favorecer la deglución de las bacterias (Arriaga *et al.*, 2002).

Como se muestra en las gráficas 2, 3, 4 y 5, la carga bacilar aumenta progresivamente, estableciéndose el punto crítico de la enfermedad durante el primer mes de enfermedad, después del cual la carga bacilar disminuye de la misma manera, a diferencia de los modelos para el establecimiento de la enfermedad activa (Hernández-Pando *et al.*, 1996), La dosis de 10 y 500 UFC muestran esta tendencia a disminuir, mientras que, en la dosis de 100 UFC, la carga bacilar se mantiene, tal como se ha reportado en otros estudios (Arriaga *et al.*, 2002), finalmente, la dosis de 250 UFC, muestra hacia el final del experimento un aumento considerable de la carga bacilar, lo cual correlacionaría con lo observado por Orme y colaboradores (1988), en donde, después de estar aparentemente controlada la enfermedad, ésta recrudece, sin embargo, éstos datos muestran una desviación estándar elevada, por lo cual este resultado debe ser corroborado.

El comportamiento de los ratones infectados con dosis de 10 UFC mostró los conteos de UFC más bajos, como era esperado, ocasionando nula sintomatología de la enfermedad, lo cual puede ser corroborado con el análisis histológico, en donde no es perceptible daño en la imagen panorámica del pulmón, este daño es visible en las tres dosis restantes, incluso, como se ha mencionado anteriormente, durante el proceso de contención de la micobacteria, un paso vital es la formación del granuloma, en el tejido neumónico de algunas muestras, se pudieron observar estas pequeñas estructuras, deduciendo que la micobacteria puede permanecer viable en estado de latencia, esperando alguna falla del granuloma para reactivarse (Saunders & Britton, 2007).

El hecho de que el conteo de UFC en algunos individuos infectados con dosis de 10 UFC, haya dado resultado negativo, podría ser un indicativo de que los ratones no fueron infectados, esto pudo ser descartado durante los estudios moleculares realizados, al encontrar la secuencia de inserción IS6110 en el total de las muestras, indicándonos la presencia de la micobacteria; a pesar de que este fragmento se encuentra en todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*, en un número elevado de copias (Van Embden *et al.*, 1993; Spositto *et al.*, 2014), se puede afirmar que el segmento no manifiesta la presencia de otra micobacteria, ya que a los ratones les fue administrado directamente el bacilo *M. tuberculosis*, y la presencia de otras micobacterias es poco probable debido a las condiciones controladas durante el mantenimiento de los animales. Por lo tanto, este resultado indica que los animales fueron infectados correctamente y al mismo tiempo nos revela la

presencia de *M. tuberculosis* en la muestra, sin embargo, no indica si la bacteria es viable o no.

Para verificar la viabilidad de la micobacteria, se buscó la diana rRNA 16S, el ácido ribonucleico ribosomal es el material más abundante en los ribosomas y por lo tanto el tipo de RNA más abundante en la célula. El gen rRNA 16S es un componente de la subunidad 30S de los ribosomas procariontes (Schluenzen *et al.*, 2000). Como mostraron los resultados obtenidos, la presencia de esta diana no fue determinada, ya que ninguna de las dos técnicas empleadas fue capaz de detectarla, este resultado podría llevar a la deducción de la no viabilidad de la micobacteria, por lo cual, para demostrar ésto se examinó la presencia del promotor PCL1, el cual forma parte del operon *rrnA* micobacteriano y toma un papel crucial durante la síntesis de RNA (Gonzalez-y-Merchand *et al.*, 1998).

Se sabe que las micobacterias son divididas en dos grupos, aquellas de crecimiento rápido y las de crecimiento lento, *M. tuberculosis* se clasifica dentro del grupo de las micobacterias de crecimiento lento (Goodfellow & Magee, 1998), ambos grupos expresan operones implicados en la síntesis de RNA, las micobacterias de lento crecimiento expresan un operon, mientras que, las bacterias de rápido crecimiento expresan dos operones (Gonzalez-y-Merchand, 1997). En ambos grupos el promotor PCL1 regula la expresión del operon *rrnA*, sin embargo, en micobacterias de rápido crecimiento su importancia es mínima, ya que la estimulación de la producción de RNA por este promotor es baja, por lo cual se requieren promotores eficaces para la producción rápida de RNA, pues el evento duplicativo se lleva a

cabo en alrededor de dos horas, por el contrario, en bacterias de lento crecimiento, su importancia es elevada, ya que la división se lleva a cabo cada 14-24 horas, por lo cual la producción lenta de RNA es suficiente (Gonzalez-y-Merchand, 1997).

Los resultados obtenidos con respecto a esta diana, mostraron la presencia del promotor en 11 muestras, llamando la atención que en dos de las muestras con cultivo positivo la diana no fue detectada. Durante el día 7 la detección fue mayor, pues en esta etapa la micobacteria no presenta cambios significativos en su expresión génica, estos cambios se dan posteriormente, después de que la bacteria es capaz de sentir las condiciones de su entorno respondiendo ante éstas, por lo cual, se observó una disminución en la expresión de PCL1 en los días posteriores, ya sea por disminución de las bacterias presentes o bien por cambio de la expresión génica. Cabe recalcar que la detección de PCL1 indica la síntesis de RNA, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en la detección de rRNA 16S, sugiriendo que la técnica empleada no fue lo suficientemente sensible para la detección de RNA, si bien, la detección de rRNA no necesariamente implica una situación metabólicamente activa, implica una viabilidad reciente (Cubero de frutos, 2010), se ha descrito que el crecimiento celular depende de la biosíntesis de proteínas, para lo cual es necesaria la síntesis de ribosomas y por lo tanto de RNA (Colston & Cox, 1999), si la micobacteria no se encuentra en un estado replicativo activo, la presencia de RNA no es esencial, estos resultados deben ser corroborados en estudios posteriores.

El gen *ftsZ* codifica para la proteína FtsZ, una proteína homóloga a la tubulina eucariota, que se ubica en el sitio de división celular, actuando como organizador central en la citocinesis (Romberg & Levin, 2003; Gitai, 2005), su presencia nos indica que existen células con división activa. La presencia de esta diana fue detectada en 13 de las muestras estudiadas, obteniendo el mayor punto de expresión al día 7, correlacionándose con los datos obtenidos de PCL1.

Comparando los resultados obtenidos con respecto a las dianas de metabolismo activo, se puede observar una tendencia a la disminución o mantenimiento de la expresión de estos genes, no se observa un aumento excesivo en su expresión durante la duración del experimento, sugiriendo que la expresión génica de las micobacterias presentes en la muestra no está favorecida hacia el metabolismo activo, es decir, el crecimiento de la población micobacteriana no es prioridad.

Para determinar si la población micobacteriana se encontraba en estado de latencia, se determinó la presencia o ausencia de dos de las principales proteínas expresadas durante la latencia; la proteína alfa cristalina y la enzima isocitrato liasa. Alfa cristalina fue detectada en 11 muestras, una de ellas con cultivo positivo, mientras que isocitrato liasa se detectó en las 16 muestras analizadas, dos de ellas expresaron esta única diana, curiosamente una de ellas con cultivo positivo.

A pesar de que la proteína *acr* se ha reportado como una de las más expresadas por *M. tuberculosis* en condiciones estresantes, por lo cual ha sido empleada como un biomarcador de latencia (Hu & Coates, 1999; Silva *et al.*, 2014; Spratt *et al.*,

2010; Iona *et al.*, 2016; Talavera-Paulín *et al.*, 2016), ésto no fue observado en este experimento. Este resultado es interesante, ya que se esperaba mayor expresión de esta diana, durante todo el experimento, sin embargo, su comportamiento fue muy similar a los genes de metabolismo activo, observando la mayor expresión al día 7 y la tendencia a disminuir en días posteriores, se debe tomar en cuenta que *acr* finalmente es una proteína de choque térmico, presente en pequeñas cantidades en todos los organismos, y que ante condiciones estresantes, su expresión se ve elevada ejerciendo su función citoprotectora (Coronato *et al.*, 2009), por lo cual la expresión al día 7 es lógica, ya que la micobacteria se está enfrentando a un ambiente extraño en el cual existe ataque hacia ella; además la *acr* es una chaperona, y como bien se sabe, la función de las chaperonas es intervenir en el plegamiento, ensamblaje y transporte de proteínas (Hartl, 1996), por lo cual, si no existe síntesis de nuevas proteínas, su sobre-expresión no es necesaria.

Por otra parte, el resultado más sorprendente, es el obtenido en la detección de ICL, su expresión se ve elevada desde el día 7, manteniéndose durante los dos meses iniciales del experimento, aumentando considerablemente hacia el final, tal como se esperaba, pues, como bien se mencionó anteriormente, ICL es una enzima protagonista del ciclo del glioxilato, que convierte el isocitrato en succinato, permitiendo el uso de ácidos grasos como fuente de carbono para la generación de energía (Smith, 2003). La expresión de esta enzima se ha visto aumentada en modelos *in vitro*, cuando las bacterias entran en fase estacionaria, relacionándose con la necesidad de obtener fuentes alternas de carbono ante la disminución de nutrientes, estas observaciones también han sido relacionadas con el estado de

latencia pues existen condiciones similares de inanición de nutrientes (Wayne & Lin, 1982; McKinney *et al.*, 2000).

La sobre-expresión observada en los resultados, sugiere que la micobacteria se está enfrentando a esta falta de nutrientes, por lo cual basa la obtención de su energía en el metabolismo de ácidos grasos. Se ha reportado que *M. tuberculosis* se desplaza de un metabolismo de carbohidratos cuando crece *in vitro* a uno que emplea ácidos grasos cuando crece en el huésped infectado (Segal & Bloch, 1956; Forrelad *et al.*, 2014), pues muestra una predilección al almacenamiento de lípidos mediante la acumulación de gotas lipídicas de triacilglicierol en su interior, las cuales emplea posteriormente para favorecer su persistencia (Daniel *et al.*, 2011), además se ha observado que es capaz de emplear lípidos del huésped para este fin (Rodríguez, *et al.*, 2014).

VII. Conclusión

La infección con dosis bajas de micobacterias podría ser capaz de establecer enfermedad en ratones. A pesar de que las cuatro dosis empleadas en el experimento producen enfermedad, la dosis que mostró ser más adecuada para el establecimiento de un modelo de tuberculosis latente, es la dosis de 10 UFC, pues los ratones a través del tiempo, son capaces de controlar la enfermedad, observándose disminución en la carga bacilar de los animales, llegando al punto en donde el cultivo de la micobacteria no es posible. Todas las muestras con cultivo negativo analizadas mediante técnicas moleculares, expresaron la presencia de alguna diana implicada en metabolismo activo o asociada a latencia, exponiendo la viabilidad de las micobacterias, sin embargo, el número de copias de transcritos implicados en latencia fue mayor que los transcritos de metabolismo activo. La diana detectada con mayor expresión fue ICL, indicándonos el estado metabólico de las micobacterias.

Los resultados obtenidos muestran que el establecimiento de un modelo de tuberculosis latente, es posible empleando dosis bajas de micobacterias sin necesidad de la administración de antibióticos para inducir el periodo de latencia, pues los individuos con cultivo negativo aumentan con respecto al tiempo, esperando que en algún momento el total de individuos del grupo muestren cultivo negativo, detectando micobacterias viables en estado de latencia mediante técnicas moleculares.

La prolongación del experimento, así como la evaluación de cepas provenientes de aislados clínicos de casos de reactivación de la enfermedad, favorecerá el establecimiento del modelo.

VIII. Perspectivas

- Evaluar el comportamiento de cepas provenientes de aislados clínicos con informe de reactivación de la enfermedad, para establecer un adecuado modelo de tuberculosis latente.
- Prolongar la duración del experimento, para observar si la tendencia hacia un resultado negativo en el conteo de UFC se presenta en el total de individuos del grupo.
- Administrar cortisona hacia el final del experimento, con el fin de observar reactivación de la enfermedad.
- Evaluar la presencia de tuberculosis extrapulmonar en los individuos UFC negativos.
- Utilizar un protocolo adecuado para la extracción de ácidos nucleicos micobacterianos a partir de sangre.

IX. Referencias

- Ahmad, S. (2011). Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Developmental Immunology*.
- Alnimr, A. M. (2015). Dormancy models for *Mycobacterium tuberculosis*: A minireview. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 641-647.
- Al-Orainey, I. O. (2009). Diagnosis of latent tuberculosis: Can we do better? *Annals of thoracic medicine*, 4(1), 5.
- Arriaga, A. K., Orozco, E. H., Aguilar, L. D., Rook, G. A. W., & Pando, R. H. (2002). Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clinical & Experimental Immunology*, 128(2), 229-237.
- Barnewall, R. E., Comer, J. E., Miller, B. D., Gutting, B. W., Wolfe, D. N., Director-Myska, A. E., Nichols, T. & Taft, S. C. (2012). Achieving consistent multiple daily low-dose *Bacillus anthracis* spore inhalation exposures in the rabbit model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2.
- Barrios-Payán, J. A., Castañón-Arreola, M., Flores-Valdez, M. A., & Hernández-Pando, R. (2010). Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente: Biological, clinical and epidemiological aspects of latent tuberculosis. *salud pública de México*, 52(1), 70-78.
- Barrios-Payán, J., Saqui-Salces, M., Jeyanathan, M., Alcántara-Vázquez, A., Castañón-Arreola, M., Rook, G., & Hernández-Pando, R. (2012). Extrapulmonary locations of *Mycobacterium tuberculosis* DNA during latent infection. *Journal of Infectious Diseases*, 206(8), 1194-1205.
- Benavides, F., & Guénet, J. L. (2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá. Madrid, 215.

- Boletín técnico NanoDrop Lite. Consultado en línea el 20 de julio de 2017 en [<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>].
- Caceres, N., Llopis, I., Marzo, E., Prats, C., Vilaplana, C., de Viedma, D. G., Samper, S., Lopez, D. & Cardona, P. J. (2012). Low dose aerosol fitness at the innate phase of murine infection better predicts virulence amongst clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One, 7(1), e29010.
- Caminero Luna, J. A., & UITER. (2003). Epidemiología de la tuberculosis. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. París: Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), 25-51.
- Cascante, J. A., Pascal, I., Eguía, V. M., & Hueto, J. (2007). Diagnóstico de la infección tuberculosa. In Anales del Sistema Sanitario de Navarra (Vol. 30, pp. 49-65). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Chaiear, N., Bourpoern, J., Sawanyawisuth, K., Sawanyawisuth, K., Limpawattana, P., & Reechaipichitkul, W. (2016). Age is associated with latent tuberculosis in nurses. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 6(12), 940-942.
- Colston, M. J., & Cox, R. A. (1999). Mycobacterial growth and dormancy. Mycobacteria: molecular biology and virulence, 198-219.
- Coronato, S., Di Girolamo, W., Salas, M., Spinelli, O., & Laguens, G. (1999). Biología de las proteínas del shock térmico. Medicina (Buenos Aires), 59, 477-486.
- Cubero de Frutos, N. (2010). Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en estado de la latencia en muestras clínicas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Cubero, N., Esteban, J., Palenque, E., Rosell, A., & Garcia, M. J. (2012). Evaluation of the detection of *Mycobacterium tuberculosis* with metabolic activity in culture-negative human clinical samples. Clinical Microbiology and Infection, 19(3), 273-278.
- Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T. D., & Kolattukudy, P. E. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. PLoS pathogens, 7(6), e1002093.

- Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Respiratory medicine*, 100(11), 1862-1870.
- Deb, C., Lee, C. M., Dubey, V. S., Daniel, J., Abomoelak, B., Sirakova, T. D., Pawar, S., Rogers, L. & Kolattukudy, P. E. (2009). A novel in vitro multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. *PLoS one*, 4(6), e6077.
- Deretic, V., & Fratti, R. A. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Molecular microbiology*, 31(6), 1603-1609.
- Dharmadhikari, A. S., & Nardell, E. A. (2008). What animal models teach humans about tuberculosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 39(5), 503-508.
- Divangahi, M. (2013). *The New paradigm of immunity to tuberculosis*. New York: Springer.
- Dutta, N. K., & Karakousis, P. C. (2014). Latent tuberculosis infection: myths, models, and molecular mechanisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(3), 343-371.
- Ernst, J. D. (2012). The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 581-591.
- Fitzgerald, L. E., Abendaño, N., Juste, R. A., & Alonso-Hearn, M. (2014). Three-dimensional in vitro models of granuloma to study bacteria-host interactions, drug-susceptibility, and resuscitation of dormant mycobacteria. *BioMed research international*.
- Flynn, J. L., Chan, J., & Lin, P. L. (2011). Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal immunology*, 4(3), 271-278.
- Forrellad, M. A., McNeil, M., de la Paz Santangelo, M., Blanco, F. C., García, E., Klepp, L. I., Huff, J., Niederweis, M., Jackson, M. & Bigi, F. (2014). Role of the Mce1 transporter in the lipid homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 94(2), 170-177.
- Gitai, Z. (2005). The new bacterial cell biology: moving parts and subcellular architecture. *Cell*, 120(5), 577-586.
- Gonzalez-y-Merchand, J. A., Colston, M. J., & Cox, R. A. (1998). Roles of multiple promoters in transcription of ribosomal DNA: effects of growth conditions on precursor rRNA synthesis in mycobacteria. *Journal of bacteriology*, 180(21), 5756-5761.

- Gonzalez-y-Merchand, J. A., Garcia, M. J., Gonzalez-Rico, S., Colston, M. J., & Cox, R. A. (1997). Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. *Journal of bacteriology*, 179(22), 6949-6958.
- Goodfellow, M., & Magee, J. G. (1998). Taxonomy of mycobacteria. In *Mycobacteria* (pp. 1-71). Springer US.
- Gordillo, S., Guirado, E., Gil, O., Diaz, J., Amat, I., Molinos, S., Vilaplana, C., Ausina, V. & Cardona, P. J. (2006). Usefulness of *acr* expression for monitoring latent *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in “*in vitro*” and “*in vivo*” experimental models. *Scandinavian journal of immunology*, 64(1), 30-39.
- Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M. D. C., Garfias, Y., Sada, I., & Lascurain, R. (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(2), 142-153.
- Guidetti, R., Altiero, T., & Rebecchi, L. (2011). On dormancy strategies in tardigrades. *Journal of Insect Physiology*, 57(5), 567-576.
- Guillén, M. A. (2011). Avances en el diagnóstico de la infección tuberculosa. *Archivos de Bronconeumología*, 47(10), 521-530.
- Guirado, E., & Schlesinger, L. (2013). Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma—the critical battlefield in host immunity and disease. *Frontiers in immunology*, 4, 98.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583), 571.
- Hernandez-Pando, R., Orozco, H., Honour, J., Silva, P., Leyva, R., & Rook, G. A. W. (1995). Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis; a clue to pathogenesis?. *FEMS immunology and medical microbiology*, 12(1), 63-72.
- Hernández-Pando, R., Orozco, H., Sampieri, A., Pavon, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., Alcocer, J. M. & Madrid, M. V. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 89(1), 26.

- Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson, M. (2006). Fisiología animal. Ed. Médica Panamericana.
- Houben, R. M., & Dodd, P. J. (2016). The global burden of latent tuberculosis infection: a re-estimation using mathematical modelling. PLoS Med, 13(10), e1002152.
- Hu, Y., & Coates, A. R. (1999). Transcription of the Stationary-Phase-Associated hspX Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Is Inversely Related to Synthesis of the 16-Kilodalton Protein. Journal of bacteriology, 181(5), 1380-1387.
- Iona, E., Pardini, M., Mustazzolu, A., Piccaro, G., Nisini, R., Fattorini, L., & Giannoni, F. (2016). *Mycobacterium tuberculosis* gene expression at different stages of hypoxia-induced dormancy and upon resuscitation. Journal of Microbiology, 54(8), 565-572.
- Jasmer, R. M., Nahid, P., & Hopewell, P. C. (2002). Latent tuberculosis infection. New England Journal of Medicine, 347(23), 1860-1866.
- Jordao, L., & Vieira, O. V. (2011). Tuberculosis: new aspects of an old disease. International journal of cell biology, 2011.
- Kashino, S. S., Ovendale, P., Izzo, A., & Campos-Neto, A. (2006). Unique model of dormant infection for tuberculosis vaccine development. Clinical and Vaccine Immunology, 13(9), 1014-1021.
- Kasprovicz, V. O., Churchyard, G., Lawn, S. D., Squire, S. B., & Lalvani, A. (2011). Diagnosing latent tuberculosis in high-risk individuals: rising to the challenge in high-burden areas. Journal of Infectious Diseases, 204(suppl 4), S1168-S1178.
- Kunst, H. (2006). Diagnosis of latent tuberculosis infection: the potential role of new technologies. Respiratory medicine, 100(12), 2098-2106.
- Lee, Y. V., Wahab, H. A., & Choong, Y. S. (2015). Potential inhibitors for isocitrate lyase of *Mycobacterium tuberculosis* and non-M. tuberculosis: a summary. BioMed research international, 2015.
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. Nature Reviews Microbiology, 5(1), 48-56.

- Leylabadlo, H. E., Kafil, H. S., Yousefi, M., Aghazadeh, M., & Asgharzadeh, M. (2016). Pulmonary Tuberculosis Diagnosis: Where We Are? *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 79(3), 134-142.
- Márquez-Guzmán, J., Collazo, M., Martínez, M., Orozco, A., & Vázquez, S. (2012). *Biología de angiospermas*. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México- Coordinación de Servicios Editoriales. DF, México.
- McCune, R. M., Feldmann, F. M., Lambert, H. P., & McDermott, W. (1966). Microbial persistence: I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. *The Journal of experimental medicine*, 123(3), 445.
- McKinney, J. D., zu Bentrup, K. H., Muñoz-Elías, E. J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., Swenson, D., Sacchetti, J., Jacobs, W & Russell, D. G. (2000). Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 406(6797), 735-738.
- Muñoz-Elías, E. J., & McKinney, J. D. (2005). *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nature medicine*, 11(6), 638-644.
- Murillo-Godínez, G. (2009). Las gotitas de Flügge. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 47(3), 290.
- Najafi-Mosleh, M., Farnia, P., Saidi, K. G., Mohammadi, F., Masjedi, M. R., & Velayati, A. A. (2005). Expression of Alpha-Crystalline Protein in the In-vitro model of hypoxically induced nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Tanaffos*, 4(14), 43-52.
- Neyrolles, O., Hernández-Pando, R., Pietri-Rouxel, F., Fornès, P., Tailleux, L., Payán, J. A. B., Pivert, E., Bordat, Y., Aguilar, D. Prévost, M. C., Petit, C. & Gicquel, B. (2006). Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? *PloS one*, 1(1), e43.
- North, R. J., & Jung, Y. J. (2004). Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 599-623.
- Orme, I. (1988). A Mouse Model of the Recrudescence of Latent Tuberculosis in the Elderly. *American Review of Respiratory Disease* 137:716-718

- Orme, I. M. (2003). The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis*, 83(1), 112-115.
- O'Toole, R., Smeulders, M. J., Blokpoel, M. C., Kay, E. J., Lougheed, K., & Williams, H. D. (2003). A two-component regulator of universal stress protein expression and adaptation to oxygen starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 185(5), 1543-1554.
- Palomino, J. C., Leão, S. C., & Ritacco, V. (2007). *Tuberculosis 2007; from basic science to patient care*.
- Pando, R. H., Orozco, H., Aguilar, D., & López, F. (2004). Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. *Mensaje Bioquímico*, 28.
- Pang, X., & Howard, S. T. (2007). Regulation of the α -crystallin gene *acr2* by the MprAB two-component system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 189(17), 6213-6221.
- Patel, K., Jhamb, S. S., & Singh, P. P. (2011). Models of latent tuberculosis: their salient features, limitations, and development. *Journal of laboratory physicians*, 3(2), 75.
- Person, A. K., Pettit, A. C., & Sterling, T. R. (2013). Diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection: an update. *Current respiratory care reports*, 2(4), 199-207.
- Phyu, S., Mustafa, T., Hofstad, T., Nilsen, R., Fosse, R., & Bjune, G. (1998). A mouse model for latent tuberculosis. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 30(1), 59-68.
- Pumarola, A., Torres, A. R., García, J. A., & Piedrola, G. *Microbiología y Parasitología Médica*. 1999. O. MORÁN, R. MAROTO y J. IGLESIAS Especialistas MFYC. EAP Argüelles.
- Puñal, J., Queiro, T. 2010. Interferon- γ release assays (IGRAs) en el diagnóstico de la infección y enfermedad tuberculosa. *Informes, Estudios e Investigación; avalia-t Num.:* 2009/01-1
- Quirós-Roldán, E., Airolidi, M., Moretti, F., & Carosi, G. (2001). Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 50(4), 200-203.
- Real Academia Española. Consultado en línea en [<http://dle.rae.es/>]

- Rodríguez, J. G., Hernández, A. C., Helguera-Repetto, C., Ayala, D. A., Guadarrama-Medina, R., Anzóla, J. M., Bustos, J. R., Zambrano, M. M., Gonzalez-y-Merchand, J., Garcia, M. J. & Del Portillo, P. (2014). Global adaptation to a lipid environment triggers the dormancy-related phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio*, 5(3), e01125-14.
- Romberg, L., & Levin, P. A. (2003). Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 125-154.
- Russell, D. G., Cardona, P. J., Kim, M. J., Allain, S., & Altare, F. (2009). Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature immunology*, 10(9), 943-948.
- Rustad, T. R., Sherrid, A. M., Minch, K. J., & Sherman, D. R. (2009). Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cellular microbiology*, 11(8), 1151-1159.
- Sakamoto, K. (2012). The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Veterinary pathology*, 49(3), 423-439.
- Saldarriaga-Cantillo, A. (2009). Tuberculosis: expression of beauty, horror and pain. *Colombia Médica*, 40(1), 134-137.
- Salina, E. G., Mollenkopf, H. J., Kaufmann, S. H. E., & Kaprelyants, A. S. (2009). *M. Tuberculosis* gene expression during transition to the "Non-culturable" state. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 1(2 (2)).
- Saltini, C. (2006). Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis. *Respiratory medicine*, 100(12), 2085-2097.
- Saunders, B. M., & Britton, W. J. (2007). Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunology and cell biology*, 85(2), 103-111.
- Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. & Yonath, A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell*, 102(5), 615-623.
- Segal, W., & Bloch, H. (1956). Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown in vivo and in vitro. *Journal of bacteriology*, 72(2), 132.

- Silva, B. D. S., Tannus-Silva, D. G. S., Rabahi, M. F., Kipnis, A., & Junqueira-Kipnis, A. P. (2014). The use of *Mycobacterium tuberculosis* HspX and GlcB proteins to identify latent tuberculosis in rheumatoid arthritis patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(1), 29-37.
- Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 463-496.
- Song, Y., Wang, X., Zhang, H., Tang, X., Li, M., Yao, J., Jin, X., Ertl, H. & Zhou, D. (2015). Repeated low-dose influenza virus infection causes severe disease in mice: A model for vaccine evaluation. *Journal of virology*, 89(15), 7841-7851.
- Sposito, F. L. E., Campanerut, P. A. Z., Ghiraldi, L. D., Leite, C. Q. F., Hirata, M. H., Hirata, R. D. C., Siqueira, V. L. D. & Cardoso, R. F. (2014). Multiplex-PCR for differentiation of *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 841-843.
- Spratt, J. M., Britton, W. J., & Triccas, J. A. (2010). In vivo persistence and protective efficacy of the bacille Calmette Guerin vaccine overexpressing the HspX latency antigen. *Bioengineered bugs*, 1(1), 61-65.
- Talati, N. J., Seybold, U., Humphrey, B., Aina, A., Tapia, J., Weinfurter, P., Albalak, R. & Blumberg, H. M. (2009). Poor concordance between interferon- γ release assays and tuberculin skin tests in diagnosis of latent tuberculosis infection among HIV-infected individuals. *BMC infectious diseases*, 9(1), 15.
- Talavera-Paulín, M., García-Morales, L., Ruíz-Sánchez, B. P., Caamal-Ley, Á. D., Hernández-Solis, A., Ramírez-Casanova, E., Cicero-Sabido, R., Espitia, C., Helguera-Repetto, C., González-y-Merchand, J.A., Flores-Mejía, R., Estrada-Parra, S., Estrada-García, I., Chacón-Salinas, R., Wong-Baeza, I. & Serafín-López, J. (2016). Active tuberculosis patients have high levels of IgA anti-alpha-crystallin and isocitrate lyase proteins. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 20(12), 1681-1688.
- Todar, K. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Consultado en línea el 20 de mayo de 2017 en [<http://textbookofbacteriology.net/index.html>]

- Van Embden, J. D., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T. M. & Small, P. (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology*, 31(2), 406-409.
- Van Leeuwen, R. M. L., Bossink, A. W. J., & Thijsen, S. F. T. (2007). Exclusion of active *Mycobacterium tuberculosis* complex infection with the T-SPOT™. TB assay. *European Respiratory Journal*, 29(3), 605-607.
- Vanni, P., Giachetti, E., Pinzauti, G., & McFadden, B. A. (1990). Comparative structure, function and regulation of isocitrate lyase, an important assimilatory enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 95(3), 431-458.
- Verver, S., Warren, R. M., Munch, Z., Richardson, M., van der Spuy, G. D., Borgdorff, M. W., Behr, M. A., Beyers, N. & van Helden, P. D. (2004). Proportion of tuberculosis transmission that takes place in households in a high-incidence area. *The Lancet*, 363(9404), 212-214.
- Wayne, L. G., & Hayes, L. G. (1996). An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infection and immunity*, 64(6), 2062-2069.
- Wayne, L. G., & Lin, K. Y. (1982). Glyoxylate metabolism and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infection and immunity*, 37(3), 1042-1049.
- Wayne, L. G., & Sohaskey, C. D. (2001). Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis* 1. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 139-163.
- WHO. Global Tuberculosis Report 2016. Consultado en línea en: [<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1>].
- Yuan, Y., Crane, D.D., Simpson, R.M., Zhu, Y., Hickey, M.J., Sherman, D.R., & Barry, C.E., III (1998) The 16-kDa α -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Nat Acad Sci USA* 95: 9578–9583.
- Zhang, Y. (2014). Persisters, persistent infections and the Yin–Yang model. *Emerging microbes & infections*, 3(1), e3.

- Zu Bentrup, K. H., Miczak, A., Swenson, D. L., & Russell, D. G. (1999). Characterization of Activity and Expression of Isocitrate Lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 181(23), 7161-7167.