



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación del control de crecimiento intracelular y la producción de citocinas pro-inflamatorias por los leucocitos de sangre periférica frente a la infección con *Mycobacterium bovis* BCG Δ BCG1419c y *Mycobacterium bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c, micobacterias candidatas a vacuna contra la tuberculosis pulmonar

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

EDWIN URIEL ROJAS VALLES

TUTORA:

DRA. MARÍA TERESA HERRERA BARRIOS



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

CD. MX., 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

Datos del alumno:

- | | |
|---------------------|---|
| - Apellido paterno: | - Rojas |
| - Apellido materno: | - Valles |
| - Nombre(s): | - Edwin Uriel |
| - Teléfono: | - 5543817058 |
| - Universidad: | - Universidad Nacional Autónoma de México |
| - Facultad: | - Facultad de Ciencias |
| - Carrera: | - Biología |
| - Número de cuenta: | - 112004107 |

Datos del tutor:

- | | |
|---------------------|----------------|
| - Grado: | - Dra. |
| - Nombre(s): | - María Teresa |
| - Apellido paterno: | - Herrera |
| - Apellido materno: | - Barrios |

Datos del presidente:

- | | |
|---------------------|-------------|
| - Grado: | - Dra. |
| - Nombre(s): | - Esmeralda |
| - Apellido paterno: | - Juárez |
| - Apellido materno: | - Carvajal |

Datos del vocal:

- | | |
|---------------------|----------------|
| - Grado: | - Dr. |
| - Nombre(s): | - José Eduardo |
| - Apellido paterno: | - Rodríguez |
| - Apellido materno: | - Bustamante |

Datos del suplente 1:

- | | |
|---------------------|----------------|
| - Grado: | - Dr. |
| - Nombre(s): | - Luis Horacio |
| - Apellido paterno: | - Gutiérrez |
| - Apellido materno: | - González |

Datos del suplente 2:

- | | |
|---------------------|-----------|
| - Grado: | - Dra. |
| - Nombre(s): | - Silvia |
| - Apellido paterno: | - Guzmán |
| - Apellido materno: | - Beltrán |

Datos del trabajo escrito:

- | | |
|---------------------|--|
| - Título | - Evaluación del control de crecimiento intracelular y la producción de citocinas pro-inflamatorias por los leucocitos de sangre periférica frente a la infección con <i>Mycobacterium bovis</i> BCG Δ BCG1419c y <i>Mycobacterium bovis</i> BCG Δ BCG1419c::Rv1354c, micobacterias candidatas a vacuna contra la tuberculosis pulmonar. |
| - Número de páginas | - 40 |
| - Año: | - 2023 |
-

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, por haber sido mi segunda casa. Gracias por brindarme las herramientas académicas necesarias para desarrollarme profesionalmente y por haberme enseñado lo hermoso que es la biología.

A todos los profesores que me formaron y transmitieron todas sus enseñanzas. En particular me gustaría agradecer a la Dra. Mireya Ramírez Ballesteros, por haberme enseñado lo increíble que es el mundo de la microbiología.

A mis compañeros y grandes amigos que formé durante mi carrera: Ana Garduño, Naomi Martínez, Amairani Ventura, Alejandro Legaspi, Ana Reyes, Carlos Magaña, Mario Gutiérrez, Fernanda Arcos y Esthela Rodríguez. Gracias por todo el apoyo tanto académico como emocional, que me brindaron durante toda la carrera.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", por haberme permitido formar parte de sus estudiantes, brindándome tanto sus instalaciones como los insumos necesarios para la realización de mis diferentes actividades académicas.

Al Departamento de Investigación en Microbiología del INER, por aceptarme para formar parte de su grupo y por el apoyo que me brindaron en todo momento.

A la Jefa del Departamento de Investigación en Microbiología, la Dra. Yolanda González Hernández por permitirme colaborar con ella en la realización de un artículo de revisión. Gracias por la confianza y apoyo.

A mis sinodales, la Dra. Esmeralda Juárez Carvajal, la Dra. Silvia Guzmán Beltrán, al Dr. José Eduardo Rodríguez Bustamante y al Dr. Luis Horacio Gutiérrez González, por el tiempo que me brindaron para la revisión de este trabajo. Agradezco su apoyo, comentarios, sugerencias y correcciones que enriquecieron el desarrollo de mi tesis.

A mi tutora, la Dra. María Teresa Herrera Barrios, le agradezco enormemente todo su apoyo, tiempo, paciencia y dedicación. Gracias por transmitirme todos sus conocimientos y por enseñarme lo maravilloso que es la inmunología. Siempre estaré agradecido por todo el apoyo emocional y la confianza que me ha brindado durante todos estos años, demostrándome que además de ser una gran investigadora es un gran ser humano.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis tías Rebeca, Olga y Norma Rojas, por todo el apoyo, amor y confianza que me han brindado durante toda la vida. Gracias por todas las motivaciones que siempre me dan para ser una mejor persona y para superarme profesionalmente, las amo.

A mi primo, Hasiel Rojas, por ser mi amigo, confidente y cómplice, te adoro.

A mis mejores amigos: Mariana Mediana, Berenice Miranda, Oscar Sotero y Daniela Nieblas, por todo el apoyo que me han ofrecido. Gracias por todas las convivencias y pláticas motivacionales que me han dado en el transcurso de todos estos años.

A mi mejor amiga, Patricia Hernández Medina, quien a pesar de ya no estar en vida conmigo siempre estará en mi corazón. Estoy muy contento por haber conocido a una persona tan increíble como tú. Gracias por ser mi soporte durante muchos años.

A mi psicóloga, Gabriela Vargas, por sostenerme en los momentos más tristes y vulnerables de mi vida. Gracias por las terapias y apoyo emocional que me ha brindado, así como por enseñarme que mi salud mental es muy importante y valiosa.

A mis hermanas por elección, Fernanda Martínez y Alejandra Zarazua, quienes me han demostrado que se pueden curar heridas con una simple frase. Llegaron justo en el momento que más lo necesitaba, muchas gracias por entenderme como nadie más y estar conmigo en las buenas y en las malas. Gracias por todo su apoyo, las amo.

A mi prima, amiga y hermana: Jeniffer Martínez. Gracias por ser esa persona que me abrió su corazón y me brindó su apoyo cuando estaba más vulnerable. Estoy muy feliz de que tú seas la persona en la que puedo confiar, así como el hombro en donde puedo llorar. Eres una de las personas más importantes en mi vida, te amo.

A mi hermana, Sofía Mariluna Rojas Valles, por su amor incondicional. Estoy muy feliz de tener una hermana tan inteligente, hermosa y cariñosa como tú. Gracias por todo tu apoyo, por la paciencia que me has tenido, por los mensajes motivacionales que siempre me das y, sobretodo, por festejar todos mis logros. Recuerda que siempre te he amado y siempre lo haré.

Especialmente, quiero darle las gracias a mi madre, Marisol Rojas Valles, a quien le dedico esta tesis con todo mi corazón. Mamá, agradezco todo el esfuerzo que has hecho para darme lo mejor. Gracias por todas las palabras de aliento y todas las pláticas motivacionales que me has dado, aún cuando yo pensé que lo mejor era rendirme. Eres la mujer más increíble que he conocido y a la que más admiro, amo e idolatro. Sabes que te amo demasiado y que estoy muy orgulloso del ser humano tan hermoso que eres. Este y todos mis logros siempre estarán dedicados para ti.

Este proyecto se realizó en el Departamento de Investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", Secretaría de Salud, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Herrera Barrios.

ÍNDICE

	Abreviaturas.....	1
	Resumen.....	2
1	Introducción.....	3
	1.1. Tuberculosis (TB).....	3
	1.2. Epidemiología de la TB.....	3
	1.2.1. Epidemiología de la TB en México.....	3
	1.3. Agente etiológico.....	4
	1.3.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
	1.4. Fisiopatología e inmunobiología de la TB.....	5
	1.5. Prevención contra la TB.....	7
	1.5.1. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG (vacuna).....	7
	1.6. Nuevas vacunas contra la TB.....	11
	1.6.1. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG Δ BCG1419c.....	12
	1.6.2. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG Δ BCG1419c::Rv1354c.....	13
2	Justificación.....	15
3	Hipótesis.....	15
4	Objetivo general.....	15
	4.1. Objetivos particulares.....	15
5	Materiales y métodos.....	16
	5.1. Grupo de estudio.....	16
	5.2. Toma de muestra de sangre periférica.....	16
	5.3. Cultivo de las micobacterias.....	16
	5.4. Modelo de infección en sangre (control de crecimiento intracelular).....	16
	5.5. Producción de citocinas pro-inflamatorias.....	17
	5.6. Análisis estadísticos.....	17
6	Resultados.....	17
	6.1. Características del grupo de estudio.....	17
	6.2. Control del crecimiento intracelular.....	19
	6.3. Producción de TNF- α	19
	6.4. Producción de IFN- γ	22
7	Discusión.....	23
8	Conclusión.....	27
9	Referencias.....	27
	Material suplementario.....	32

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AEC	<i>Alveolar Epithelial Cells</i>
AEC-I	<i>Alveolar Epithelial Cells (Type I)</i>
AEC-II	<i>Alveolar Epithelial Cells (Type II)</i>
Ac	Anticuerpo
Ags	Antígenos
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFP-10	<i>10kDa Culture Filtrate Protein</i>
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
c-di-GMP	<i>Cyclic di guanosine monophosphate</i>
DC	<i>Dendritic cells</i>
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DGC	Diguanilato ciclasa
ESAT-6	<i>Early Secreted Antigenic Target 6kDa</i>
PDE	Fosfodiesterasa
GMP	Guanosín monofosfato
GTP	Guanosín trifosfato
h	Horas
IgG	Inmunoglobulina G
IFN	Interferón
IL	Interleucina
MA	Macrófagos alveolares
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis Complex</i>

Abreviatura	Significado
NTM	<i>Nontuberculous mycobacteria</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
pGpG	<i>5'-phosphoguanlyl-(3'-5')-guanosine</i>
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RD-1	Región de diferenciación 1
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
TA	Temperatura ambiente
T _H	<i>T helper lymphocyte</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i>
TB	Tuberculosis
TBL	Tuberculosis latente
TBP	Tuberculosis pulmonar
T7SS	<i>Type VII Secretion System</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

Introducción: La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa que se transmite por aerosoles y es causada, principalmente, por *Mycobacterium tuberculosis*. La Organización Mundial de la Salud reportó en 2020 que un cuarto de la población mundial se encuentra infectada. Además, se estimaron 10 millones de nuevos casos, y se reportaron 1.5 millones de defunciones. La TB es una emergencia de salud pública y hasta ahora la única medida preventiva es la vacuna BCG. La protección conferida por la vacuna BCG presenta una efectividad variable (0-80%) y no protege contra la forma más común de la enfermedad, la TB pulmonar. Debido a esto, surge la necesidad de desarrollar nuevas vacunas para cubrir con estas necesidades. En esta dirección, a partir de la cepa parental *M. bovis* BCG, se han generado las mutantes *M. bovis* BCG Δ BCG1419c (la cual carece del gen *BCG1419c* que codifica para una c-di-GMP fosfodiesterasa) y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c (la cual además de carecer del gen *BCG1419c*, tiene una inserción del gen *Rv1354c* el cual codifica para una diguanilato ciclasa). Los niveles elevados del c-di-GMP se han correlacionado con un aumento en la producción de biopelícula. Por lo tanto, esta característica de crecer en biopelícula podría asemejar aspectos patológicos inexplorados de la TB, confiriendo una protección más prolongada y efectiva. En el presente trabajo se evaluaron algunos aspectos inmunológicos de los leucocitos de sangre periférica al ser infectados con las cepas mutantes candidatas a vacuna.

Objetivo: Evaluar el control de crecimiento intracelular y la producción de citocinas pro-inflamatorias de los leucocitos de sangre periférica frente a la infección con las cepas mutantes, candidatas a vacuna contra la TB.

Metodología: Se estudió a 15 voluntarios sanos, y se hizo la infección de sangre periférica con *M. bovis* BCG, *M. bovis* BCG Δ BCG1419c o *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c. Se estudió una cinética de 1, 24 y 48 horas post-infección. A los tiempos indicados se estudió la capacidad de controlar el crecimiento intracelular de las micobacterias mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias, y en los sobrenadantes se determinó la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IFN- γ) por la técnica de ELISA.

Resultados: La cuantificación de las UFC mostraron que los leucocitos de sangre periférica mantuvieron un control del crecimiento intracelular de las cepas mutantes, *M. bovis* BCG Δ BCG1419c y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c, de manera constante. Mientras que las UFC de la cepa parental *M. bovis* BCG disminuyeron conforme pasó el tiempo en comparación con la primera hora post-infección. Por otro lado, las cepas mutantes *M. bovis* BCG Δ BCG1419c y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c favorecieron una mayor producción de TNF- α por parte de los leucocitos a las 24 y 48 horas post-infección, de manera similar a la cepa parental *M. bovis* BCG. Además, solo la cepa mutante *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c indujo una mayor producción de IFN- γ por parte de los leucocitos. Sin embargo, la producción de IFN- γ fue baja.

Conclusiones: Nuestros resultados demostraron que los leucocitos de sangre periférica fueron capaces de mantener un control constante del crecimiento de las cepas mutantes *M. bovis* BCG Δ BCG1419c y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c, al no haber un aumento o disminución en la cuantificación de las UFC. Mientras que, en la cepa parental *M. bovis* BCG se observó una reducción en la viabilidad bacteriana al mostrar una disminución en las UFC. Además, se observó que las cepas mutantes indujeron un aumento en la producción de TNF- α e IFN- γ conforme pasó el tiempo post-infección. Estos resultados podrían sugerir que los cambios genéticos inferidos en las cepas mutantes les podrían otorgar una ventaja, permitiendo que permanezcan por más tiempo y así favorezcan una interacción inmunológica más eficiente y prolongada, en comparación con la cepa vacunal *M. bovis* BCG.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tuberculosis (TB)

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*; dado que la TB es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, se ha considerado una emergencia de salud pública desde los últimos 25 años¹⁻³. Se encuentra clasificada dentro de las 13 principales causas de muerte a nivel mundial y, hasta antes de la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2, era la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso, por encima del virus de inmunodeficiencia humana (VIH)^{3,4}. *M. tuberculosis* afecta principalmente a los pulmones (TB pulmonar, TBP), aunque también puede afectar otros sitios causando TB extrapulmonar³⁻⁵. La TBP representa cerca del 86% de todos los casos de la enfermedad mientras que las formas extrapulmonares representan el 14%, encontrándose principalmente: TB linfática, TB meníngea y TB miliar⁶⁻¹⁰.

Esta enfermedad se transmite por aerosoles. Cuando una persona con TBP elimina a las micobacterias al toser, éstas sobreviven y permanecen suspendidas en el aire permitiendo que sean inhaladas por otra persona^{3,11}. El nuevo individuo puede ser susceptible a la infección y así tener un potencial para desarrollar la enfermedad en forma activa^{3,11}.

La TBP puede presentarse como una infección asintomática (TBL, TB latente) la cual del 90-95% de los pacientes la presentan⁶. Se caracteriza por tener a la micobacteria sin generar contagio. Sin embargo, la TBL puede progresar a la forma activa del 5-10% de la población infectada, entrando a un estado transmisible de la infección⁶. Es importante mencionar que la progresión a la forma activa de la TB depende de la susceptibilidad del hospedero y la virulencia de la micobacteria.

Esta enfermedad puede afectar a cualquier persona, aunque, cerca del 90% de los individuos que desarrollan la enfermedad son mayores de 15 años³. La incidencia de las personas que desarrollan TB es mayor en hombres (56%) que en mujeres (33%); mientras que en los niños menores a 15 años es menos frecuente (11%)³.

1.2. Epidemiología de la TB

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 2020 que, aproximadamente, hubo 10 millones de nuevos casos de personas con TB; además se reportaron 1.5 millones de defunciones atribuibles a esta enfermedad, incluidas 214,000 muertes de personas co-infectadas con el VIH³. En 2020, la pandemia causada por la COVID-19 causó un aumento en las defunciones respecto a las reportadas en 2019 (1.4 millones), presentando el primer aumento de casos desde 2005^{3,12}.

A pesar de que la TB sigue mostrando índices de morbilidad y mortalidad elevados, la enfermedad se atribuye a países con población de bajos ingresos, afectando principalmente a 30^{2,3}. Ocho de los 30 principales países con carga alta de TB, representaron dos tercios del total mundial: India (26%), China (8.5%), Indonesia (8.4%), Filipinas (6%), Pakistan (5.8%), Nigeria (4.6%), Bangladesh (3.6%) y Sudáfrica (3.3%)³.

1.2.1. Epidemiología de la TB en México

En 2020, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, la Dirección de Epidemiología y la Secretaría de Salud reportaron en México 13,199 nuevos casos de TBP y 3,184 de nuevos casos de otras formas de TB¹³. Además, la Dirección General de Información de Salud reportó 1,786 defunciones a

causa de la TBP, 89 defunciones a causa de TB del sistema nervioso y 70 defunciones a causa de secuelas de la TB, entre las que se encuentran: fibrosis parenquimatosa, cavidades tuberculosas, aspergilosis, vasculitis, bronquiectasis y trombosis^{14,15}.

1.3. Agente etiológico

Las micobacterias pertenecen al dominio *Bacteria*, filo *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, y son el único género (*Mycobacterium*) de la familia *Mycobacteriaceae*^{16,17}. El género *Mycobacterium* comprende a más de 170 especies, de las cuales gran parte se encuentran en el medio ambiente, en los suelos, y la gran mayoría no son patógenas¹⁸. Sin embargo, hay un grupo selecto de micobacterias patógenas en animales y humanos¹⁹.

Las especies de este género son bacilos alargados, ligeramente curvos, aeróbicos (aunque algunas especies pueden crecer bajo una reducción de oxígeno atmosférico), no forman esporas y no presentan motilidad^{16,17,20}. Su característica más distintiva es un alto contenido de lípidos (ácidos micólicos y otros componentes cerosos) en su pared celular, brindándoles la propiedad de ser ácido-alcohol resistentes, ya que pueden resistir la decoloración con alcoholes acidificados y ácidos minerales fuertes^{16,17}. En la **Figura 1** se esquematiza la composición de la pared celular de las micobacterias.

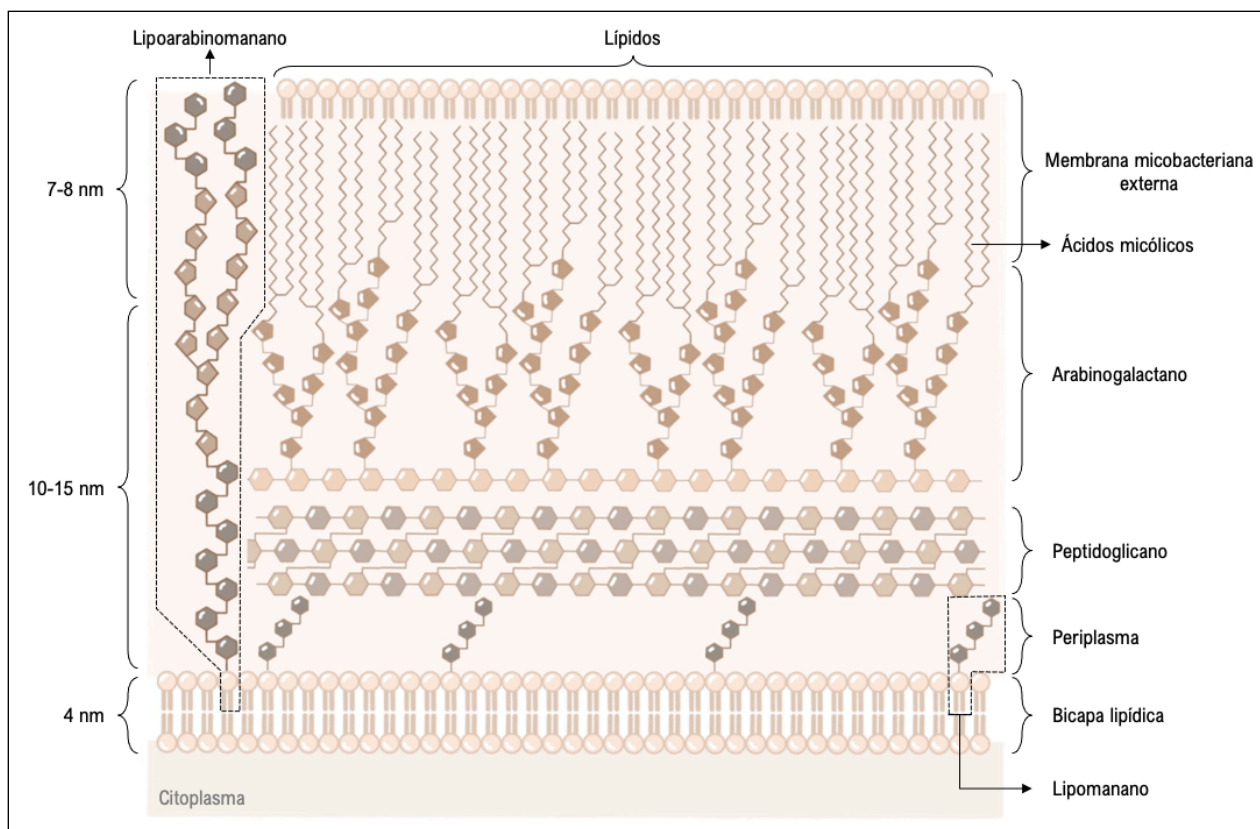


Figura 1. Componentes de la pared celular del género *Mycobacterium*. La membrana micobacteriana presenta lipoarabinomanano, lipomanano y fosfatidilinositol monosódicos (no mostrado). Además, las siguientes capas de su pared celular presentan arabinogalactano esterificado con ácidos micólicos, un grupo de lípidos hidroxilados unidos covalentemente al peptidoglicano; que le proporcionan a las micobacterias una barrera de permeabilidad hidrofóbica cerosa. Creado a partir de las ref. (17, 20, 28).

Las especies del género *Mycobacterium* se dividen en dos grupos: especies de crecimiento lento (*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. leprae*, etc.), y especies de crecimiento rápido (*M. abscessus*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. chelonae*, *M. parafortuitum*, etc.)^{18,20}. Por otro lado, debido a un enfoque bio-médico, las micobacterias también se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad para generar TB en humanos, dividiéndose en: complejo de *M. tuberculosis* (MTBC, por sus siglas en inglés), que es un grupo de micobacterias estrechamente relacionadas con una identidad de secuencia de nucleótidos mayor al 99% (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. canneti*); y un grupo de micobacterias no tuberculosas (NTM, por sus siglas en inglés), donde se incluyen a todas las demás micobacterias, que se encuentran en el medio ambiente^{18,20-24}. Sin embargo, las NTM también pueden generar enfermedad en individuos inmunocomprometidos o con padecimientos pulmonares pre-existentes.

1.3.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Dentro del MTBC se encuentra *M. tuberculosis*, el principal agente causal de la TB en humanos. Esta micobacteria fue descubierta por Robert Koch en 1882, y es un patógeno intracelular facultativo de crecimiento lento, la cual se puede dividir en aproximadamente 20-24 horas (h)^{1,6,21}. *M. tuberculosis* es un patógeno obligado que reside en los macrófagos por tiempo indefinido.

En 1998 se secuenció por primera vez el genoma de *M. tuberculosis* utilizando la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, cepa que se aisló de un paciente con TBP en 1905²⁵. La cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv es la más utilizada para diversos experimentos ya que se acepta como la cepa de referencia de *M. tuberculosis*²⁵. El genoma de *M. tuberculosis* comprende un cromosoma de DNA circular de aproximadamente 4.41 megabases, con aproximadamente 4,000 genes^{1,17,26}. La región característica de *M. tuberculosis* es la región de diferencia 1 (RD-1) que le confiere la virulencia a esta cepa. Este fragmento contiene genes que codifican para cinco sistemas de secreción de tipo 7 (T7SS, por sus siglas en inglés) conocidos como ESX1-5^{6,26-28}. Los T7SS se encargan de transportar proteínas a través de la pared celular^{6,27}. El ESX1 se encarga de secretar dos de las principales proteínas de *M. tuberculosis* relacionadas con su virulencia: ESAT-6 (*Early Secreted Antigenic Target 6 kDa*) y CFP-10 (*10 kDa Culture Filtrate Proteína*), las cuales participan en el proceso de traslocación de la micobacteria del fagolisosoma al citosol, y que posteriormente se renombraron como *EsxA* y *EsxB*^{6,26-28}.

1.4. Fisiopatología e inmunopatología de la TB

La infección comienza cuando un paciente con TBP activa elimina micobacterias al toser, permitiendo que entren a los pulmones de otro individuo (**Figura 2a**)^{6,29}. Las micobacterias pueden superar diversas barreras representadas por las células epiteliales bronquiales y las células mieloides pulmonares encargadas de eliminar cerca del 99% de los patógenos inhalados^{6,29,30}. Las micobacterias logran llegar al espacio alveolar donde se encuentra con las células epiteliales alveolares (AEC, por sus siglas en inglés) y con los macrófagos alveolares (MA)^{6,29,30}. Las AEC se dividen en: AEC de tipo I, las cuales representan cerca del 95% del epitelio alveolar, son planas y son responsables de la difusión de gases y, por ende, del intercambio gaseoso; por otro lado, las AEC de tipo II tienen una forma cuboide y tienen funciones secretoras^{30,31}. Las AEC-II secretan surfactantes que contienen citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos que ayudan a activar a los MA, permitiendo incrementar sus mecanismos bactericidas, entre los que se encuentran: fagocitosis, acidificación del fagosoma, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) - nitrógeno (RNS), secreción de citocinas y quimiocinas, y autofagia^{29,31,32}.

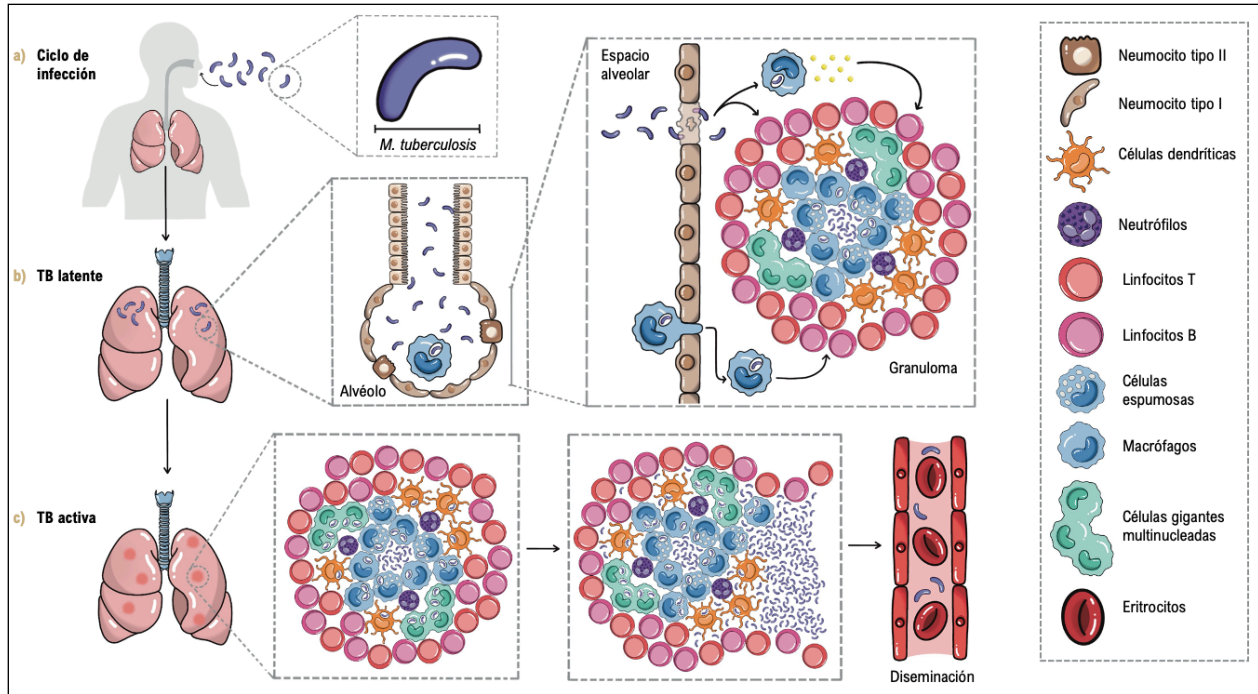


Figura 2. Fisiopatología de la TB. A) El ciclo de infección inicia cuando *M. tuberculosis* ingresa al individuo por vía aérea donde llegará a los alvéolos y se encontrará con los MA. B) Los MA serán los encargados de eliminar a las micobacterias. Sin embargo, si esta línea de defensa falla en erradicar a las micobacterias, se desencadenará una compleja señalización dentro del parénquima pulmonar para formar una estructura multicelular denominada granuloma, que se encargará de contener a las bacterias. Este estadio se denomina fase latente, ya que el paciente no presenta síntomas y no es capaz de infectar a otros individuos. C) Si la carga micobacteriana dentro del granuloma aumenta y/o el paciente se encuentra inmunocomprometido, el granuloma no podrá contener a las micobacterias, permitiendo su diseminación por vía linfática o hematológica a otros órganos. Este estadio se denomina fase activa, donde el paciente ya presenta síntomas y es capaz de infectar. Creado a partir de las ref. (6, 35, 36).

Una vez que las micobacterias han sido fagocitadas por los MA, éstos podrán contenerlas y eliminarlas. Sin embargo, si la carga micobacteriana está aumentada en un individuo inmunocomprometido, es más probable que las micobacterias puedan evadir las estrategias del sistema inmune y persistir en los MA. En este punto, *M. tuberculosis* utilizará sus factores de virulencia para contrarrestar los mecanismos bactericidas que presentan los MA, como la secreción del péptido ESAT-6 que evita la fusión del fagosoma con el lisosoma permitiendo que la micobacteria entre y permanezca en el citoplasma^{6,30,33}. Entonces, las micobacterias se multiplicarán y podrán causar la muerte de los MA³⁰. Las micobacterias liberadas infectarán a más MA repitiendo el ciclo hasta generar una carga bacteriana muy elevada. Además, mediante sus mecanismos de evasión, las micobacterias pueden favorecer una respuesta anti-inflamatoria, favoreciendo su replicación y persistencia³⁴.

Posterior a todo el proceso de infección de los MA y otras células, las micobacterias pueden atravesar el epitelio alveolar, llegando al tejido intersticial pulmonar donde el proceso continúa⁶. Las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) y los monocitos, transportarán los Ags (antígenos) micobacterianos procesados a los ganglios linfáticos para presentarlos a los linfocitos T CD4⁺^{6,35}. Por otro lado, hay un reclutamiento de células en el sitio de infección generando una estructura que contendrá

a las micobacterias para evitar que se diseminen, denominada granuloma^{6,29,35}. Este granuloma consiste en diferentes células de la respuesta inmune innata como: macrófagos, células gigantes multinucleadas, DC y neutrófilos, así como fibroblastos y células epiteliales, las cuales están recubiertas de linfocitos T y B^{29,36}. Esta estructura es característica de la TBL, ya que previene la diseminación de las micobacterias; sin embargo, las micobacterias encuentran un nicho en el cual se encuentran células que pueden ser infectadas y ser utilizadas para replicarse dentro de ellas (Figura 2b)^{6,29}. La formación del granuloma se desarrolla en el 90% de los individuos infectados, conduciendo a la forma latente de la enfermedad³³.

A pesar del mecanismo tan complejo que posee el sistema inmune para contener a las micobacterias, la primo-infección puede progresar a la forma activa de la enfermedad (Figura 2c)^{29,33}. En esta etapa, los mecanismos inmunológicos dañan al paciente y permiten la diseminación de las micobacterias. Por un lado, se ha mencionado que al momento de diseminación de los bacilos, los factores de virulencia de *M. tuberculosis*, como ESAT-6, causan el paso de macrófagos M1 (productores de IL-6, IL-12 y TNF- α) a macrófagos de tipo M2 (productores de IL-10)³³. Este cambio en el fenotipo de los macrófagos no permite que los pacientes tengan una respuesta inflamatoria, ya que la IL-10 disminuye la eliminación efectiva de las micobacterias^{31,33,37,38}. La IL-10 está involucrada en procesos de inhibición de linfocitos T_{H1} y macrófagos M1, los cuales desempeñan un papel fundamental en el control y eliminación de las micobacterias^{31,33,37,38}. Por otro lado, también se ha mencionado que las células T están involucradas en la formación de cavidades, que son complejos celulares que contienen macrófagos y neutrófilos necrosados con material necrótico caseoso²⁹. Estas cavidades descargan una gran cantidad de micobacterias a las vías aéreas, lo que permite la eliminación de las micobacterias en la expectoración²⁹. Por lo tanto, la inhibición de mecanismos de eliminación y contención de las micobacterias, permiten que los pacientes muestren síntomas y puedan diseminar a las micobacterias, iniciando el ciclo de transmisión de la enfermedad (Figura 2a).

El paciente con TBP activa presenta síntomas como: tos, fiebre, pérdida de peso y hemoptisis, aunado a alteraciones en los pulmones observadas en la radiografía de tórax^{5,23}. Es por esto que, los pacientes con TBP activa deben tener tratamiento. Sin embargo, uno de los grandes retos que presenta el control y eliminación de la enfermedad es la resistencia a los fármacos que presenta *M. tuberculosis* (a través de mutaciones genéticas), formando un estadio denominado TB fármaco-resistente^{2,6}.

1.5. Prevención contra la TB

En la actualidad, la única medida preventiva contra la TB es la vacuna BCG (Bacilo de Calmette y Guérin), que ha sido utilizada por más de un siglo y consiste en una micobacteria viva-atenuada que carece principalmente del gen RD-1 y deriva de la cepa *M. bovis*³⁹. *M. bovis* es causante de TB en el ganado y otros animales³⁹. La región RD-1 codifica para factores de virulencia relacionados con la supervivencia de la micobacteria dentro de los fagocitos; por consiguiente, la supervivencia y crecimiento de *M. bovis* BCG en los fagocitos es deficiente⁴⁰.

1.5.1. *Mycobacterium bovis* BCG (vacuna)

La vacuna BCG fue desarrollada por León Charles Albert Calmette (1863-1933) y Jean-Marie Camille Guérin (1872-1961), en el Instituto Pasteur en Francia^{39,41}. Por más de 30 años, Calmette y Guérin, estudiaron la forma de obtener una cepa viva atenuada de virulencia fija, para poder utilizarla como vacu-

na⁴². Hasta que, en 1920 obtuvieron una cepa con menor virulencia pero que conservaba su inmunogenicidad^{39,41-43}. Esta cepa fue cultivada en un medio que contenía rodajas de papa, bilis de res y glicerina, la cual pasó por más de 230 pases, entre 1908 y 1920, generando cambios morfológicos y nivel de virulencia en los bacilos, debido a que los cobayos infectados con estos bacilos no presentaron lesiones^{39,42}.

Estudios genómicos han demostrado que la cepa de *M. bovis* BCG carece de la región RD-1 y otros genes que están presentes en *M. tuberculosis* y *M. bovis*; por lo que, esta ausencia está asociada a la atenuación de *M. bovis* BCG^{6,28,39,41}. En la **Tabla 1** se encuentran algunos genes presentes en *M. tuberculosis* H37Rv que están ausentes en *M. bovis* BCG^{44,45}.

Tabla 1. Genes de *M. tuberculosis* H37Rv ausentes en la cepa vacunal *M. bovis* BCG.

Función	Gen presente en H37Rv	Producto	RD-1	Ref.
Virulencia, desintoxicación y adaptación	- Rv1965	- Proteína integral de membrana YrbE3B	- No	[44,45]
	- Rv1966-Rv1969	- Proteínas de la familia Mce 3A-3D	- No	
	- Rv1971	- Proteína Mce 3F	- No	
	- Rv1982c	- Toxina VapC36	- No	
	- Rv3617	- Epóxido hidrolasa EphA	- No	
Metabolismo de lípidos	- Rv0222	- Enoil-CoA hidratasa (EchA1)	- No	[44,45]
Pared y procesos celulares	- Rv1980c	- Proteína inmunogénica Mpt64	- No	[44,45]
	- Rv1984c	- Precursor de cutinasa (CFP21)	- No	
	- Rv1986	- Proteína de membrana integral conservada	- No	
	- Rv3874	- Antígeno EsxB (CFP-10)	- Si	
	- Rv3875	- Antígeno EsxA (ESAT-6)	- Si	
	- Rv3876	- Proteína asociada a la secreción ESX-1 (Esp-I)	- Si	
	- Rv3877	- Componente conservado ESX (EccD1)	- Si	
- Rv3878	- Proteína asociada a la secreción ESX-1 (EspJ)	- Si		
Proteínas PE y PPE	- Rv2352c	- Proteína de la familia PPE (PPE38)	- No	[44,45]
	- Rv3621c	- Proteína de la familia PPE (PPE65)	- No	
	- Rv3622c	- Proteína de la familia PE (PE32)	- No	
	- Rv3739c	- Proteína de la familia PPE (PPE67)	- No	
	- Rv3872	- Proteína de la familia PE (PE35)	- Si	
- Rv3873	- Proteína de la familia PPE (PPE68)	- Si		

En 1921 se administró por primera vez la vacuna BCG en humanos, siendo un neonato que estaba expuesto a los bacilos de la TB, demostrando que después de dos años de constante exposición, no presentaba lesiones patológicas de TB^{39,42}. Después de varios estudios, la vacuna BCG empezó a aplicarse en neonatos alrededor del mundo, ya que redujo la morbilidad y mortalidad causada por la TB, que es más severa en niños^{39,42}.

La vacuna BCG causa activación local en el sitio de administración donde los monocitos, macrófagos y DC fagocitan a los bacilos, degradan y procesan sus componentes inmunogénicos (**Figura 3a**)⁴³. Los Ags estimulan una fuerte respuesta inflamatoria mediante la activación de los PRR⁴³. Una vez que las micobacterias son fagocitadas y procesadas, las DC presentarán los Ags micobacterianos asociados al complejo MHC (*Major histocompatibility complex*) a los linfocitos T, en los ganglios linfáticos o en el bazo, para iniciar una respuesta inmune adaptativa (**Figura 3b**)⁴³. Esta activación se da mediante la secreción de TNF- α , IL-6 e IL-12, para activar tanto a linfocitos T CD4⁺ como a CD8⁺, los cuales producirán niveles elevados de IFN- γ , que es una citocina asociada a la protección ya que favorece la activación de los mecanismos bactericidas en los macrófagos⁴³. Por otro lado, los linfocitos B favorecen la respuesta humoral al incrementar la producción de anticuerpos (Ac) IgG y células B de memoria de larga vida⁴³.

Los Ac tienen la posibilidad de opsonizar a la micobacteria, favorecer su fagocitosis y promover su eliminación. En la **Figura 3** se esquematiza el proceso inmunológico que genera la vacuna BCG.

La vacuna ha demostrado tener una efectividad superior al 70% contra la TB miliar y meníngea en los infantes⁴³. Sin embargo, se ha reportado que la efectividad contra la TBP en adultos va del 0-80%^{6,46}. Esto en parte, debido con la ausencia de creación de semillas mediante liofilización, ya que la propagación de la cepa BCG en diferentes países se realizó mediante pases continuos en diferentes condiciones de laboratorio, resultando en la generación de diferentes cepas BCG con características bioquímicas, moleculares e inmunobiológicas distintas⁴⁷.

Por lo tanto, además de las mutaciones que generó la atenuación entre 1908-1920, existe otra atenuación ocasionada por el sub-cultivo de la cepa vacunal BCG; ya que, a partir de 1924, la cepa de *M. bovis* BCG se envió a 20 países^{43,46}. El sub-cultivo en diferentes condiciones de laboratorio dio lugar

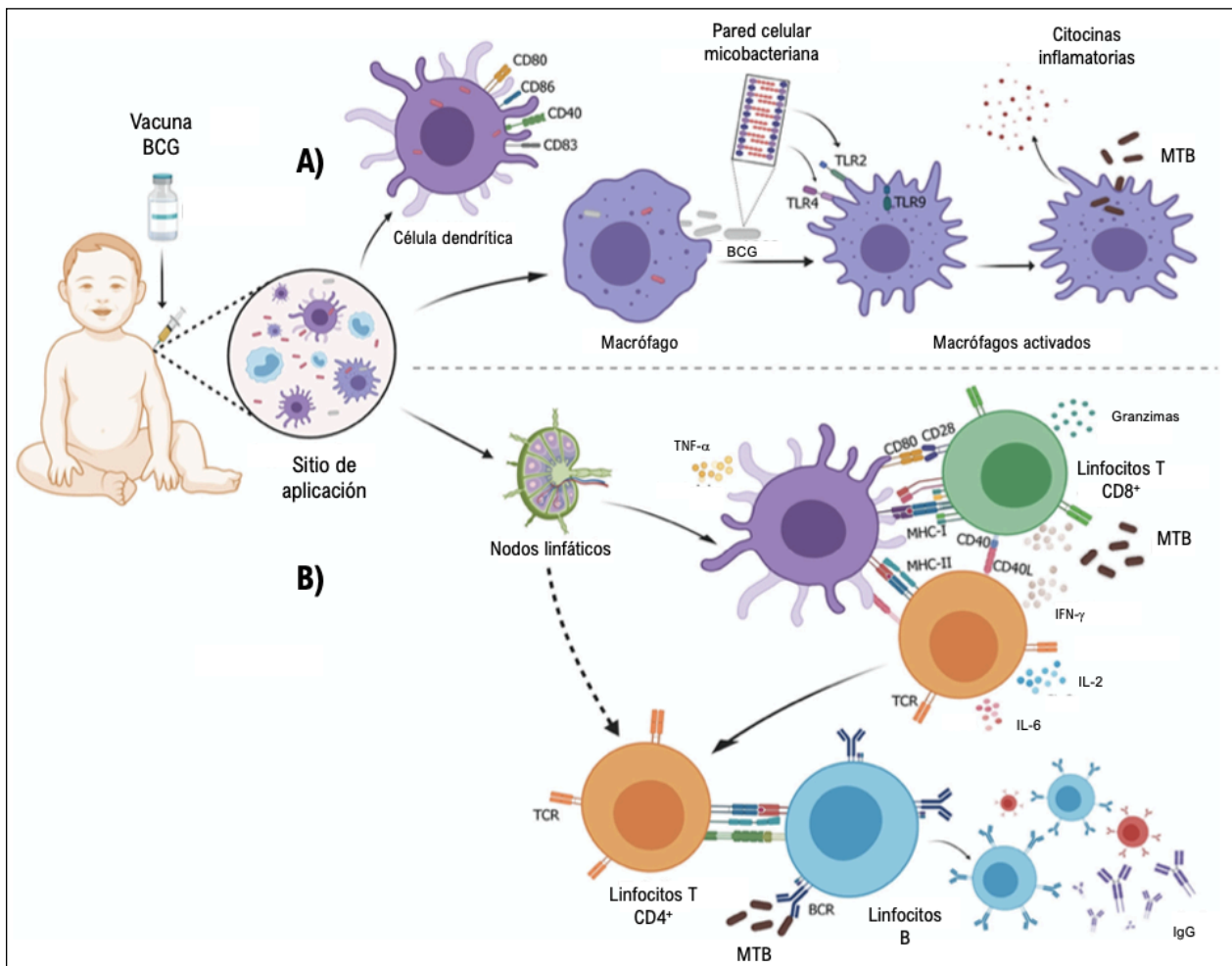


Figura 3. Respuesta inmune generada por *M. bovis* BCG en los neonatos. A) Posterior a la inmunización, los macrófagos y las DC reconocerán los componentes micobacterianos por medio de los PRR como TLR-2, TLR-4 y TLR-9, desencadenando una respuesta inmune innata contra las micobacterias. B) Las DC migran a los nodos linfáticos, donde presentan los Ags micobacterianos a los linfocitos T CD4+ y CD8+, iniciando el proceso de una respuesta inmune adquirida. El inicio de esta respuesta adquirida desencadenará la producción de citocinas que activarán a otras células y, también, a los linfocitos B para generar células de memoria, plasmáticas y productoras de Ac contra los Ags específicos de las micobacterias. Figura obtenida y modificada de la ref. 43.

a diversas formulaciones autorizadas, entre las que se encuentran: la cepa Pasteur francesa (Pasteur 1173P2), la cepa de Dinamarca (Denmark 1331), la cepa brasileña (BCG Mearou RJ), la cepa rusa (Moscow-369) y la cepa japonesa (Tokyo 172-1)^{43,46}. Los reportes han mencionado que existen diferencias genómicas, transcriptómicas y proteómicas entre estas cepas, debido a las diferentes condiciones de sub-cultivo^{46,47}. Estas diferencias genéticas se denominan RD, encontrando que hay una delección en la RD-2 en diferentes cepas obtenidas después de 1927, la cual codifica para diferentes proteínas antigénicas⁴⁰. En la **Figura 4** se muestran algunos resultados inmunobiológicos encontrados entre las principales cepas BCG⁴⁶⁻⁵⁰.

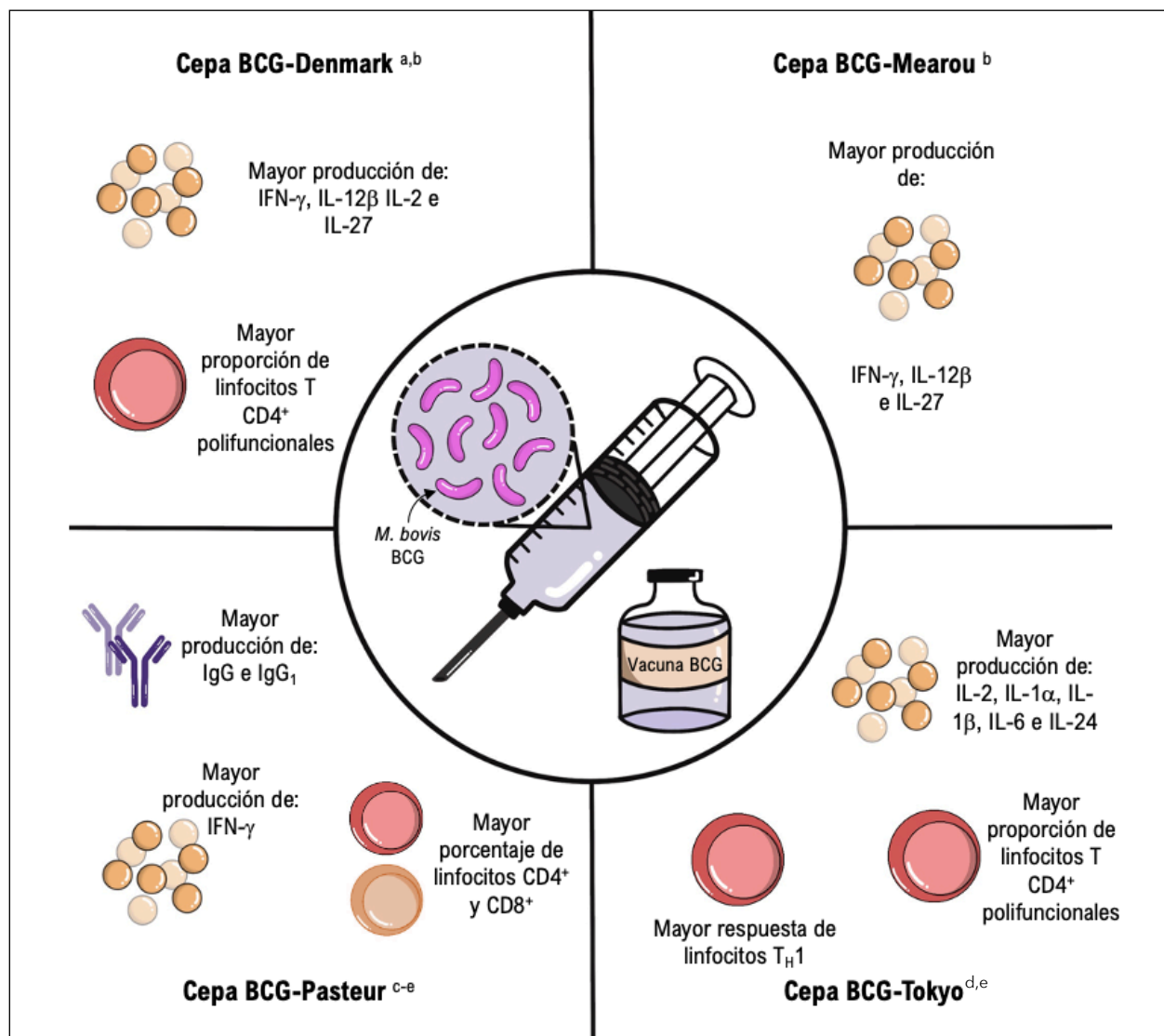


Figura 4. Comparación de la respuesta inmune generada por las principales cepas BCG. Se ha reportado que las diferentes cepas BCG generan diversos tipos de respuesta inmune cuando se comparan entre sí. Las cepas más estudiadas son las cepas Denmark, Mearou, Pasteur y Tokyo, las cuales se han comparado con: A) Moscow-369, B) Tokyo, C) China, D) Mearou y E) Denmark.

La OMS ha incluido la vacuna BCG en el programa de inmunización infantil desde 1974 y hasta 2018, se ha incluido en los programas de vacunación de 180 países⁴³. Sin embargo, la variabilidad genética que presentan las diferentes cepas sigue siendo uno de los principales retos en la prevención contra la TB, ya que la respuesta inmunológica generada por cada cepa BCG es variante.

1.6. Nuevas vacunas contra la TB

A pesar de que la vacuna BCG sigue mostrando ser efectiva para prevenir las formas más severas de la TB en la infancia, como son la TB miliar y meníngea, tiene un espectro de protección contra la TBP en la edad adulta incierto; así como una respuesta inmunológica variable, dependiendo de la cepa utilizada. Además, se ha reportado que la vacuna BCG disminuye su protección conforme pasa el tiempo, siendo eficaz para proteger contra la TB hasta los 10-15 años post-vacunación⁵¹. Aunado a esto, es importante recordar que la TB sigue siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con un difícil diagnóstico, y con grandes retos farmacológicos para tratar la enfermedad, por lo que es de gran importancia la invención y desarrollo de nuevas vacunas.

En la actualidad, existen cerca de 20 candidatas a vacuna en estudios clínicos, de las cuales sólo 14 se encuentran en evaluación activa en diferentes fases clínicas (Fase I-Fase III)⁵². En la **Figura 5** se resumen las características de estas vacunas.

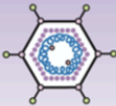
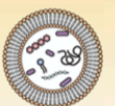




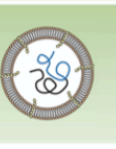

Fase I	Fase IIa	Fase IIb	Fase III
 <p>Ad5 Ag85A Universidad MacMaster, CanSino</p>	 <p>RUTI Archivel Farma, S.L.</p>	 <p>DAR-901 Universidad de Dartmouth</p>	 <p>Vaccae™ Anhui Zhifei Longcom</p>
 <p>ChAdOx1.85/MVA85A (ID/IM/Aerosol) Universidad de Oxford, Universidad de Birmingham</p>	 <p>MTBVAC Biofabri, Iniciativa de Vacunas contra la Tuberculosis, Zaragoza</p>	 <p>M72:AS01_E GlaxoSmithKline, Aeras</p>	 <p>VPM1002 Instituto Serum de India, Max Planck, Gestión de Proyectos de Vacunas GmbH, Iniciativa de Vacunas contra la Tuberculosis</p>
<p>Vaccae™: Lisados de <i>M. vaccae</i> VPM1002: BCG recombinante viva con delección de Ureasa C e inserción de Listeriolisina. MIP: <i>M. indicus pranii</i> inactivada DAR-901: <i>M. obuense</i> muerta por calor M72:AS01_E: Proteína de fusión recombinante (M72) de <i>Rv1196</i> (proteína PPE) y <i>Rv0125</i> (serin proteasa) con adyuvante AS01_E, formulación liposomal del ligando (MPL-A) del receptor tipo Toll (TLR)-4 y fracción de saponina QS21 H56:IC31: Proteína de fusión recombinante (Híbrido-56) de tres antígenos expresados durante los estados: tempranos (Ag85B/micotil transferasa), presumiblemente tarde (<i>Rv2660c</i>) o todas las fases (ESAT-6/<i>EsxA</i>) de una infección por <i>M. tuberculosis</i> en conjunto con un adyuvante IC31 que señala el TLR-9 RUTI: Fragmentos muertos de <i>M. tuberculosis</i> liposomados MTBVAC: <i>M. tuberculosis</i> viva atenuada con delecciones en <i>PhoP</i> y <i>FadD26</i> Revacunación BCG: <i>M. bovis</i> BCG viva atenuada ID93:GLA-SE: Proteína de fusión recombinante (ID93) de cuatro antígenos asociados con la virulencia (<i>Rv2608</i>, <i>Rv3619</i> /<i>EsxV</i> y <i>Rv3620</i>/<i>EsxW</i>) o latencia (<i>Rv1813</i>) en una emulsión de aceite en agua (GLA-SE) de MPL y lípidos glucopiranosil</p>			
<p>ID93:GLA-SE: Instituto de Enfermedades Infecciosas, Aeras H56:IC31: Statens Serum Institute, Valneva, Aeras MIP: Cadila ICMR GamTBvac: Instituto de Investigación de Epidemiología y Microbiología Gamaleya, Rusia Ad5 Ag85A: Vector viral de adenovirus de replicación deficiente serotipo-5 que expresa el antígeno de <i>M. tuberculosis</i> Ag85A ChAdOx1.85A/MVA85A: Vector viral de Adenovirus de Chimpancé de replicación deficiente y del virus vaccinia Ankara que expresan el antígeno de <i>M. tuberculosis</i> Ag85A</p>			
<p>GamTBvac: Dos antígenos fusionados de <i>M. tuberculosis</i> (Ag85A y ESAT-6-CFP-10) con dominio de unión de dextran mezclado con dextran DEAE y el adyuvante CpG (agonista TLR-9) TB/FLU-04L: Vector viral atenuado de influenza que expresa antígenos de <i>M. tuberculosis</i> Ag85A y ESAT-6/<i>EsxA</i></p>			

Figura 5. Candidatas a vacuna que se encuentran en estudios clínicos de manera activa. Dentro de las candidatas a vacuna contra la TB, se encuentra: 1) Vacunas candidatas derivadas de fragmentos o células enteras de micobacterias inactivadas o muertas (RUTI, MIP, Vaccae y DAR-901). 2) Vacunas candidatas derivadas de células vivas atenuadas (VPM1002, BCG y MTBVAC). 3) Vacunas candidatas derivadas de vectores virales vivos atenuados o de replicación deficiente que expresan componentes antigénicos de *M. tuberculosis* (Ad5 Ag85A, TB/FLU-04L y ChAdOx1.85/MVA85A). 4) Vacunas candidatas derivadas de proteínas de fusión en conjunto con un adyuvante (ID93:GLA-SE, GamTBvac, M72:AS01E y H56:IC31). Figura obtenida y modificada de la ref. 52.

Aunque hay diversas candidatas a vacuna en estudios clínicos, y otras más en estudios pre-clínicos, existen diferentes retos que no han permitido la licencia de una nueva vacuna contra la TB. Entre estos retos se encuentran demostrar: dosis de aplicación, seguridad y eficacia; tolerancia e inmunogenicidad en la población objetivo; reactogenicidad (farmacovigilancia de las reacciones adversas generadas por las vacunas); y, sobre todo, demostrar que no hay reversibilidad de la virulencia en las cepas atenuadas, toxicidad y carcinogénesis⁵³. Aunado a esto, la TB sigue siendo una emergencia de salud pública a nivel mundial por lo que es importante la innovación y desarrollo de nuevas vacunas para cubrir con las necesidades que no ha cubierto la vacuna BCG. A este respecto, el grupo del Dr. Mario Alberto Flores Valdez (CIATEJ, México) desarrolló dos cepas candidatas a vacuna contra la TB, *M. bovis* BCGΔBCG1419c y *M. bovis* BCGΔBCG1419c::Rv1354c, derivadas de la cepa parental *M. bovis* BCG⁵⁴. Ambas cepas fueron proporcionadas por el Dr. Flores, para las evaluaciones de esta investigación.

1.6.1. *Mycobacterium bovis* BCGΔBCG1419c

La cepa mutante candidata a vacuna *M. bovis* BCGΔBCG1419c fue desarrollada a partir de una cepa de *M. bovis* BCG 1173P2, la cual mostró una mutación en el gen *BCG1419* (homólogo al *Rv1357c*) generada por un transpasón^{54,55}. El gen *BCG1419c*, codifica para una fosfodiesterasa (PDE) que se encarga de escindir al segundo mensajero c-di-GMP (*cyclic di guanosine monophosphate*) y su delección causa un aumento en la concentración de c-di-GMP^{55,56}.

El c-di-GMP es una molécula intracelular pequeña que actúa como un segundo mensajero, que participa en diversas funciones y es sintetizada a partir de dos nucleótidos GTP (guanosín trifosfato) por parte de las DGC (diguanilato ciclasas, que contienen un dominio GGDEF) y es degradada a pGpG (5'-*phosphoguananylyl*-(3'-5')-*guanosine*) o GMP (guanosín monofosfato) por las PDE (que contienen un dominio EAL)^{57,58}. Los c-di-GMP se unen a diversos efectores como: ribointerruptores, proteínas, complejos proteicos y enzimas, los cuales participan en diversos procesos como: desarrollo, morfogénesis, transición en el ciclo de vida móvil a sésil en diversas bacterias, y en la formación de biopelícula^{58,59}. En cuanto a la formación de biopelícula, se ha establecido como regla general que la actividad de las DGC y las PDE determinan la concentración intracelular de los c-di-GMP, correlacionando niveles altos de c-di-GMP con la formación de biopelícula en diversas bacterias⁵⁸.

En las micobacterias, se han identificado dos genes relacionados con la señalización del c-di-GMP, el gen *Rv1354c* (con dominios GGDEF-EAL) y el *Rv1357c* (homólogo al *BCG1419c*, que contiene un solo dominio EAL), los cuales están muy bien conservados en las cepas *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra y *M. bovis* BCG⁶⁰. La delección del gen *Rv1357c* se ha asociado con una disminución en la tasa de crecimiento de *M. bovis* BCG dentro de macrófagos murinos, sugiriendo un vínculo entre la señalización del c-di-GMP y la infectividad de *M. tuberculosis*^{54,60}. Con base en estos resultados, se han realizado diferentes investigaciones para evaluar a la cepa *M. bovis* BCGΔBCG1419c, al presentar una delección del gen *BCG1419c* y presentando una inserción de un gen de resistencia a la higromicina (denominada *M. bovis* BCGΔBCG1419cHyg^R)⁵⁵.

Se ha evidenciado que ratones vacunados con la cepa *M. bovis* BCGΔBCG1419cHyg^R aumenta su persistencia en los pulmones y bazo en ratones inmunocompetentes BALB/c, en comparación con los ratones vacunados con la cepa parental BCG⁶¹. Basado en los resultados de la mutante *M. bovis* BCGΔBCG1419cHyg^R se generó una segunda mutación en esta cepa, ahora denominada *M. bovis* BCGΔBCG1419c, la cual: carece del gen de resistencia a los antibióticos, carece de más nucleótidos correspondientes al gen *BCG1419c* (918 nucleótidos) y se construyó a partir de otra cepa parental

BCG (ATCC 35734) (Figura 6)⁵⁶. Esta nueva mutante secreta mayores cantidades de proteínas Tuf, DnaK, GroEL1 y GoES, que son abundantes en el PPD (*purified protein derivative*); y, además, mostró modificaciones en la producción de proteínas involucradas en el metabolismo redox y en el metabolismo del nitrógeno/proteínas⁵⁶. Esta nueva mutante fue creada como necesidad para cumplir con requisitos establecidos por el consenso de Ginebra en Suiza, para nuevas vacunas derivadas de micobacterias vivas, en preparación para su posterior evaluación clínica^{56,62-64}.

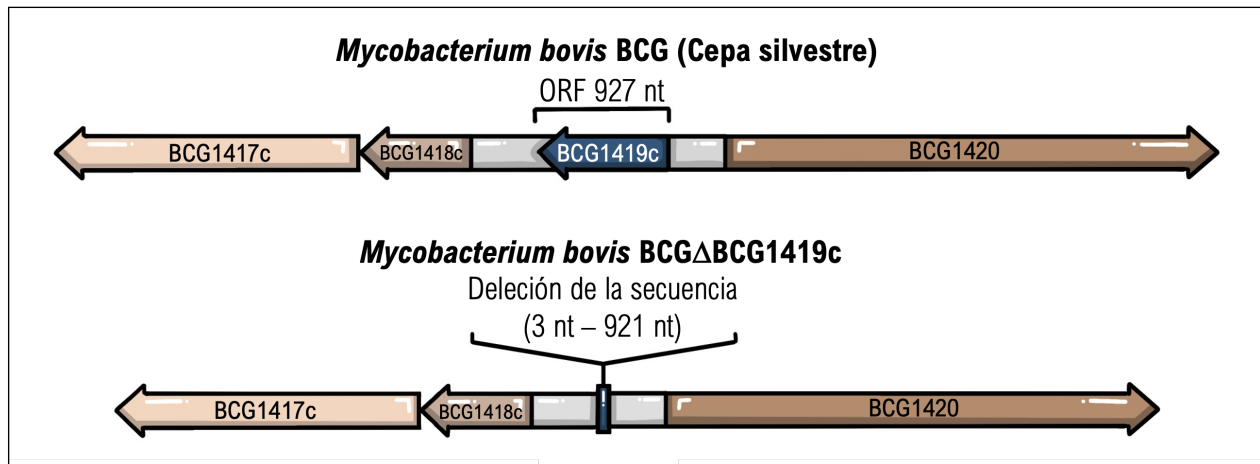


Figura 6. Deleción genética que presenta la cepa candidata a vacuna *M. bovis* BCGΔBCG1419c. La deleción del gen BCG1419c en la cepa candidata a vacuna, evita la codificación de la c-di-GMP PDE, la cual se encarga de escindir al segundo mensajero c-di-GMP. Esta característica permite que se concentre el c-di-GMP en el interior de la célula. El incremento del c-di-GMP se correlaciona con la producción de biopelícula. Creada a partir de la ref. 64.

Dentro de los diversos estudios pre-clínicos de la cepa *M. bovis* BCGΔBCG1419c se ha evaluado: inmunogenicidad, seguridad, protección y prevención contra la TB. Esta cepa aún se encuentra en estudios pre-clínicos, bajo la hipótesis de que la producción de biopelícula asemeja aspectos patológicos de la TB, sugiriendo que podría ser más eficiente que la cepa parental BCG⁶⁴. En la Tabla 2 se resume los estudios realizados con esta cepa candidata a vacuna^{61,64-68}.

1.6.2. *Mycobacterium bovis* BCGΔBCG1419c::Rv1354c

Como se describió anteriormente, en las micobacterias se han descrito dos genes relacionados con la señalización del c-di-GMP: *Rv1354c* y *Rv1357c*⁶⁰. Mientras que la deleción del gen *Rv1357c* (*BCG1419c*) se ha asociado con una atenuación en el crecimiento, no se ha encontrado evidencias de que el gen *Rv1354c* sea esencial para la supervivencia e infectividad de *M. tuberculosis*⁶⁰. Debido a esto, el grupo del Dr. Flores Valdez generó una segunda mutante candidata a vacuna, *M. bovis* BCGΔBCG1419c::Rv1354c, la cual además de carecer del gen *BCG1419c*, presenta una inserción del gen *Rv1354c*, el cual codifica para una DGC que se encarga de producir más cantidades de c-di-GMP debido a su dominio GGDEF. Esta cepa no ha sido patentada y no se han reportado estudios previos, por lo que no se cuenta con mayor información, siendo este estudio pionero en las evaluaciones pre-clínicas de esta cepa.

Aunque son interesantes y prometedores los resultados de la evaluación de estas mutantes en modelo murino, ahora surge la necesidad de iniciar su evaluación en muestras humanas ya que es la

Tabla 2. Evaluaciones inmunobiológicas de la cepa *M. bovis* BCGΔBCG1419c.

Año	Modelo	Tipo de evaluación	Generación de la cepa	Principales resultados	Ref.
2016	- Ratones BALB/c - Ratones nu/nu - Ratones C57BL/6	- Atenuación - Seguridad - Inmunogenicidad - Protección	<i>M. bovis</i> BCGΔBCG1419c Hyg ^R	<ul style="list-style-type: none"> - La cepa candidata a vacuna BCGΔBCG1419c mantiene su perfil atenuado de manera similar a BCG en ratones inmunodeficientes. - Aumentó la frecuencia de células T productoras de IFN-γ al ser estimulados, en comparación con los vacunados con la cepa BCG. - Previene pérdida de peso, reduce la carga bacteriana y el daño tisular en ratones inmunocompetentes, en comparación con los ratones vacunados con BCG, en la fase tardía de la TB progresiva. - Al evaluar una reactivación de TB crónica, los ratones fueron inmunosuprimidos con corticoesterona, y los ratones vacunados con BCGΔBCG1419c mostraron una mejor resistencia a la reactivación de la enfermedad. 	[61]
2018	- Ratones C57BL/6	- Inmunogenicidad - Inmunopatología	<i>M. bovis</i> BCGΔBCG1419c Hyg ^R	<ul style="list-style-type: none"> - Aumentó el número de células secretoras de IFN-γ en el bazo y pulmones, similar a los ratones vacunados con BCG. - Hubo reducción en la carga bacteriana después de ser infectados con la cepa <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, similar a los ratones vacunados con BCG. - Reducción en la producción de IFN-γ, TNF-α, IL-6 e IL-10, después de retar a los ratones con aerosoles que contenían <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. - Hubo menor daño tisular pulmonar (perivascularitis y alveolitis), en comparación con el grupo no vacunado. Además, hubo menor daño pulmonar total en comparación con el grupo vacunado BCG. 	[68]
2018	- Cuyos	- Eficacia	<i>M. bovis</i> BCGΔBCG1419c Hyg ^R	<ul style="list-style-type: none"> - Eficiencia comparable con la cepa BCG al reducir la replicación de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en los pulmones de cobayos. - Reducción en la disminución hematogena y disminución en la carga bacilar en el bazo. - Disminución en las lesiones pulmonares similar a los cuyos vacunados con BCG. 	[67]
2018	- Tejido tridimensional <i>in vitro</i> derivado de sangre humana	- Inmunogenicidad	<i>M. bovis</i> BCGΔBCG1419c Hyg ^R	<ul style="list-style-type: none"> - Secreción de IL-6 y MCP-1 comparable con <i>M. tuberculosis</i>, en comparación con las células no infectadas. - Reclutamiento de monocitos que asemeja a la formación temprana del granuloma, fue similar a la que presentó la cepa vacunal BCG. 	[66]
2020	- Ratones BALB/c con y sin DM2	- Eficiencia - Inmunobiología contra las formas agudas y crónicas de la TB	<i>M. bovis</i> BCGΔBCG1419c Hyg ^R	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción en resistencia a la insulina y pérdida de peso en ratones con DM2 post-infección, comparados con los ratones con DM2 vacunados con BCG. - Reducción de la patología pulmonar en la TB crónica. - En ratones con DM2 resultó en una respuesta T CD8⁺, con mayor porcentaje de macrófagos y neutrófilos. Aunado a esto, hubo un aumento de IFN-γ, una reducción de IL-4 en una fase aguda de la TB y un aumento en la producción de IL-1β en la fase crónica de la TB. 	[65]
2021	- Macrófagos murinos (RAW 264.7) - Ratones atímicos - Ratones BALB/c - Ratones C57BL/6	- Eficacia - Atenuación - Seguridad - Inmunopatología contra la TBP y TB extrapulmonar	<i>M. bovis</i> BCGΔBCG1419c	<ul style="list-style-type: none"> - Fue más segura y mostró menor replicación en macrófagos murinos. - Los ratones atímicos mostraron mayor supervivencia y menor carga bacteriana en los pulmones. - Los ratones BALB/c presentaron menor replicación bacteriana en los pulmones y en el bazo. - En los cobayos fue más efectiva que BCG, mostraron una reducción de TNF-α e IL-17 así como menor daño pulmonar. Conduciendo a un mejor control de la enfermedad. - En cobayos hubo menor reducción en la carga bacteriana en el bazo, así como menor severidad en las lesiones del bazo. - Los cobayos mostraron menor severidad de las lesiones pulmonares. Además, mejora el control de la patogenicidad contra la TB extrapulmonar. 	[64]

dirección para el desarrollo de una vacuna contra la TB con la finalidad de constituir una alternativa a la vacuna BCG.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la TB es una de las principales causas de defunción a nivel mundial, a que existen diversos factores que evitan la erradicación de la TB y a que solo existe una vacuna como medida preventiva, la cual presenta una efectividad incierta. Es necesario, el desarrollo de nuevas vacunas contra la TB. En este sentido, se han desarrollado dos cepas mutantes candidatas a vacuna (*M. bovis* BCG Δ BCG1419c y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c) para cubrir con estas necesidades. En particular, *M. bovis* BCG Δ BCG1419c se ha utilizado en estudios *in vivo* e *in vitro* en modelo murino y de cabaño, para evaluar la inmunogenicidad, efectividad y protección de la cepa; donde se han encontrado resultados prometedores. Por otro lado, *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c aún no ha sido evaluada ni reportada, por lo que es necesario su evaluación.

Es indispensable investigar la inmunidad que se genera con las cepas candidatas a vacuna en células humanas de manera *in vitro*. En este trabajo de investigación se propone evaluar algunos aspectos de la respuesta inmune en células humanas, como los leucocitos de sangre periférica. En particular se busca evaluar dos aspectos inmunológicos, el control de crecimiento intracelular y la producción de citocinas pro-inflamatorias, debido a que son mecanismos bactericidas y celulares importantes para diversas interacciones fisiológicas. Se piensa que la característica de crecer en biopelícula de las cepas mutantes les podría permitir permanecer por más tiempo y, por lo tanto, las células del sistema inmune tendrían la oportunidad de interactuar por un tiempo más prolongado desarrollando una respuesta inmune más eficiente y duradera. En este sentido, es fundamental conocer si las células humanas son capaces de controlar el crecimiento de las cepas candidatas a vacuna y, así mismo, si son capaces de desencadenar una respuesta inmunológica mediada por citocinas.

3. HIPÓTESIS

Los cambios inducidos en las cepas *M. bovis* BCG Δ BCG1419c y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c permitirán que los leucocitos de sangre periférica tengan una mejor eficiencia para controlar su crecimiento intracelular, así como de inducir una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el control de crecimiento intracelular y la producción de citocinas pro-inflamatorias de los leucocitos de sangre periférica frente a la infección con las micobacterias mutantes candidatas a vacuna contra la TB.

4.1. Objetivos particulares

1. Evaluar la capacidad de los leucocitos de sangres periférica para controlar el crecimiento de *M. bovis* BCG Δ BCG1419c o *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c después de ser fagocitadas, mediante la medición de unidades formadoras de colonias (UFC).
2. Evaluar la producción de citocinas pro-inflamatorias en los sobrenadantes de los leucocitos de sangre periférica infectados con *M. bovis* BCG Δ BCG1419c o *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c, mediante la técnica de ELISA.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Este protocolo fue aprobado por parte del Comité de Investigación, el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Bioseguridad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" (INER) y se realizó en el Departamento de Investigación en Microbiología del INER. Todos los voluntarios incluidos en el protocolo firmaron una carta de consentimiento.

5.1. Grupo de estudio

Se incluyeron 15 voluntarios sanos de población abierta, con un rango de edad de 18-59 años, los cuales no estuvieran en contacto previo con pacientes con TBP.

A todos los voluntarios se le realizaron estudios de laboratorio como biometría hemática, química sanguínea, hemoglobina glicada, insulina y perfil de lípidos. Adicionalmente, se les tomó una placa de tórax y se les aplicó una prueba intradérmica PPD, haciendo una lectura a las 72 h. A los voluntarios se les aplicó un cuestionario para recabar información médica.

Se excluyeron a los participantes que presentaran: infección con VIH, embarazo, anemia ($Hb \leq 10$ mg/dl), tratamiento con inmunosupresores, creatinina >1.2 mg/dl, afección renal y DM2.

5.2. Toma de muestra de sangre periférica

A los voluntarios se les tomó una muestra de 12 ml de sangre venosa por método de flebotomía estándar en tubos con heparina.

5.3. Cultivo de las micobacterias

Las micobacterias *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 2167), *M. bovis* BCG (ATCC 35734), *M. bovis* BCG Δ BCG1419c (donada por el Dr. Flores Valdez) y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c (donada por el Dr. Flores Valdez) se sembraron en medio líquido 7H9 suplementado con 10% OADC y 0.05% de Tween 80. Se incubaron en agitación constante a 37°C durante 21 días. Posteriormente, se cosecharon en tubos de 50 ml y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Se desechó el sobrenadante y la masa micobacteriana se resuspendió al 10% del volumen original del cultivo con medio 7H9 suplementado. De la suspensión de micobacterias se hicieron alícuotas de 1ml y se almacenaron a -70°C. Después, se determinó su concentración haciendo diluciones seriadas 1:10 en medio 7H9 suplementado, las cuales se sembraron por triplicado en agar 7H10. Se incubaron durante 21 días a 37°C para que las bacterias se encontraran en fase estacionaria del crecimiento. Se contaron las UFC y se determinó la concentración del stock en UFC/ml. Estas micobacterias fueron utilizadas para los experimentos de infección.

5.4. Modelo de infección en sangre (control de crecimiento intracelular)

Con la finalidad de evaluar la capacidad de los leucocitos de sangre periférica para controlar el crecimiento de las micobacterias, se utilizó el modelo de infección en sangre. Se marcaron tubos de 2 ml con tapón de rosca de acuerdo a la cinética del estudio (1, 24 y 48 h post-infección). A cada tubo se agregaron 300 μ l de sangre y se infectaron con 150 μ l de la micobacteria correspondiente (MOI 5), y se agregaron 150 μ l de PBS. Los tubos fueron cerrados y se incubaron a 37°C al 5% de CO₂ con agitación suave y constante. A los tiempos indicados, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos a TA. Se separaron los sobrenadantes, y fueron transferidos a tubos spin X (Corning Costar,

USA), y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos a TA. Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C para posteriormente hacer la determinación de citocinas pro-inflamatorias.

Mientras que al paquete celular se le agregó 1 ml de agua estéril y se incubó a TA durante 10 minutos, agitando brevemente con vórtex a los 5 minutos. Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos a TA y se eliminó el sobrenadante; el paquete celular se resuspendió con ayuda de vórtex. Se hicieron 4 diluciones seriadas 1:10 tomando todo el paquete celular y agregándolo a un tubo con 450 µl de medio 7H9 suplementado, se mezcló y se transfirieron 50 µl de la dilución al siguiente tubo, y así sucesivamente. Se sembraron, por triplicado, 10 µl de cada dilución en agar 7H10 suplementado. Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂, durante 14-21 días. Se contaron las UFC y se hizo un promedio, reportando en UFC/ml.

5.5. Producción de citocinas pro-inflamatorias

Para determinar la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IFN- γ) se utilizó un ELISA de tipo sándwich. Las placas de 96 pozos se recubrieron con Ac anti-TNF- α (1:500) o anti-IFN- γ (1:1000), y se incubaron a 37°C durante dos horas. Se retiraron las soluciones y los pozos se lavaron tres veces con solución de lavado. Posteriormente los pozos se bloquearon con superbloc (Pierce, cat. 17-516Q) durante 30 minutos a 37°C. Se retiró el superbloc y se añadieron los sobrenadantes obtenidos de los ensayos de infección, incluyendo curva de calibración con concentraciones de la citocina (TNF- α e IFN- γ), y se incubaron a 37°C durante dos horas. Los pozos se lavaron tres veces con solución de lavado y se añadió un segundo Ac anti-TNF- α o anti-IFN- γ (conjugado a biotina, 1:1000); se incubaron durante 30 minutos a TA. Luego, los pozos se lavaron seis veces y se añadió el sustrato de fosfatasa, y se incubaron durante 20 minutos a TA. Finalmente, se añadió NaOH 1M, para parar la reacción, y se hizo la lectura de absorbancia a 405 nm. La concentración de TNF- α e IFN- γ se determinó utilizando la curva estándar y se reportó en pg/ml.

5.6. Análisis estadísticos

Para evaluar el control de crecimiento intracelular y la producción de citocinas pro-inflamatorias, se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y se utilizó un alfa de 0.05 ($\alpha=0.05$). Los resultados no mostraron una distribución normal, por lo que se realizaron pruebas de Friedman ($\alpha=0.05$), pruebas no paramétricas, donde se comparó el tiempo de cada muestra. Al finalizar, se realizó una prueba de Wilcoxon ($\alpha=0.05$), para muestras pareadas y se consideró una p menor a 0.05 ($p<0.05$) para establecer la significancia estadística. Los análisis y las gráficas se realizaron utilizando el Software GraphPad Prism versión 9.4.1

6. RESULTADOS

6.1. Características del grupo de estudio

Las características clínicas y demográficas de la población de estudio, voluntarios sanos, se encuentran en la [Tabla 3](#). Se incluyeron 8 mujeres y 7 hombres, con una mediana de edad de 45 años. El índice de masa corporal (IMC) hace referencia a una población con sobrepeso, en comparación con los valores de referencia. Solo uno de los voluntarios no recibió la aplicación de la vacuna BCG, y sólo un voluntario fue positivo a la prueba intradérmica de PPD. La mediana del LDL (*low-density lipoprotein*) se encontró dentro del rango subóptimo. La población mostró una mediana de 95 mg/dl de glucosa,

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de la población de estudio.

Variables	Población (n=15) Mediana [Rango]	Valores de referencia
Sexo (Mujeres/Hombres)	8 / 7	---
Edad (años)	45 [18-58]	---
IMC (Kg/m ²)	26.1 [20-31.2] *	18.5-24.99
BCG (Si/No)	14 / 1	---
PPD (+/-)	1 / 14	---
Leucocitos (x10 ⁹ /l)	6.2 [4.6-9.1]	4.5-11
Neutrófilos (%)	55.5 [33-66]	55-62
Linfocitos (%)	35.4 [27.3-60]	20-40
Monocitos (%)	7 [5-11.8]	4-10
Eosinófilos (%)	1.6 [0-6.4]	1-3
Basófilos (%)	0.7 [0-3]	0-1
Eritrocitos (x10 ⁹ /l)	5.1 [3.9-6]	4.5-5.5
Hemoglobina (gr/dl)	14.6 [6.8-18.2]	13.5-16.5
Hematocrito (%)	43.7 [23.1-52.4]	40.5-49.5
Plaquetas (x10 ⁹ /l)	253 [172.1-342]	140-400
Glucosa (mg/dl)	95 [79-115]	70-99
Urea (mg/dl)	30 [17-47]	13-56
Ácido úrico (mg/dl)	4.6 [3.2-8.1]	2.4-7.16
Creatinina (mg/dl)	0.8 [0.5-1.2]	0.6-1
Colesterol total (mg/dl)	179.9 [92.8-230.9]	< 200
Triacilgliceroles (mg/dl)	117.6 [60.4-215.2]	< 150
HDL (mg/dl)	44.8 [30.5-72.8]	41-59
LDL (mg/dl)	120.2 [44.9-170.8]	< 100 óptimo / 100-129 subóptimo
Hemoglobina glicada (%)	5.7 [5.1-6.1] *	< 5.7
Insulina (μU/ml)	9.7 [4.6-21.7]	5.5-12

* = Fuera del rango de los valores considerados normales, IMC = Índices de masa corporal, HDL = Lipoproteína de alta densidad, LDL = Lipoproteína de baja densidad.

encontrándose dentro de los valores de referencia. Sin embargo, la población mostró una mediana de 5.7% de hemoglobina glicada, haciendo referencia a una población con posibles alteraciones de glucosa en ayunas o con pre-diabetes. El análisis de las placas de tórax mostró que ninguno de los voluntarios presentó alteraciones pulmonares.

6.2. Control del crecimiento intracelular

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los leucocitos de sangre periférica para controlar el crecimiento de las diferentes micobacterias después de ser fagocitadas, cuantificamos las UFC a la hora, 24 y 48 horas post-infección. En la [Figura 7a](#) observamos que no hubo diferencias significativas a las diferentes horas post-infección, demostrando que los leucocitos mantuvieron constante el control intracelular de *M. tuberculosis* H37Ra. Por otro lado, como se observa en la [Figura 7b](#), hubo una disminución de las UFC de *M. bovis* BCG a las 24 y 48 horas post-infección, en comparación con la primera hora post-infección ($p=0.0052$ y $p=0.0001$, respectivamente). Esto sugiere que los leucocitos fueron capaces de eliminar a *M. bovis* BCG, conforme pasó el tiempo, mostrando la capacidad de controlar el crecimiento al reducir la carga de *M. bovis* BCG. En cuanto a las micobacterias candidatas a vacuna, *M. bovis* BCG Δ BCG1419c ([Figura 7c](#)) y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c ([Figura 7d](#)), no se mostraron diferencias significativas en las diferentes horas post-infección, demostrando que los leucocitos fueron capaces de mantener un control constante de las micobacterias candidatas a vacuna de manera similar a *M. tuberculosis* H37Ra.

Al comparar cada tiempo post-infección entre las diferentes micobacterias, se observó que el patrón de las cepas mutantes (*M. bovis* BCG Δ BCG1419c y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c) fue similar al patrón presentado por *M. tuberculosis* H37Ra, sin mostrar diferencias significativas a las diferentes horas del estudio ([Figura Suplementaria 1](#)). Esto podría plantear que los leucocitos de sangre periférica mantienen un control de crecimiento constante de estas micobacterias. Por otro lado, en la [Figura S1a](#) se observó que sólo *M. tuberculosis* H37Ra y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c mostraron un patrón diferente a *M. bovis* BCG, respecto a la primera hora post-infección ($p=0.0112$ y $p=0.0015$, respectivamente). Esto podría sugerir que el control intracelular de *M. bovis* BCG es deficiente en comparación con *M. tuberculosis* H37Ra y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c a la primera hora post-infección. Sin embargo, a las 24 y 48 horas post-infección el control intracelular de *M. bovis* BCG presentó un patrón similar al de las demás micobacterias, sin mostrar diferencias significativas ([Figura S1b,c](#)).

6.3. Producción de TNF- α

En los sobrenadantes de los ensayos de infección se hizo la determinación de la producción de la citocina pro-inflamatoria TNF- α por los leucocitos de sangre periférica infectados con las diferentes micobacterias. Como se observa en la [Figura 8a](#), los leucocitos infectados con *M. tuberculosis* H37Ra, no mostraron diferencias significativas en la producción de TNF- α durante la cinética del estudio. Además, como se observa en la [Tabla 4](#) la producción de TNF- α mostró una mediana muy similar en el tiempo basal (1 hora) y a las 24 y 48 h post-infección. Por otra parte, al infectar a los leucocitos con las cepas *M. bovis* BCG ([Figura 8b](#)), *M. bovis* BCG Δ BCG1419c ([Figura 8c](#)) o *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c ([Figura 8d](#)); en general se observó un patrón similar, al haber un aumento significativo en la producción de TNF- α a las 24 y 48 h post-infección en comparación con el tiempo basal (1 hora).

En la [Figura 8b](#) se muestra que a las 24 y 48 horas post-infección con la cepa vacunal *M. bovis* BCG, hubo un aumento en la producción de TNF- α respecto a la primera hora (basal), mostrando diferencias

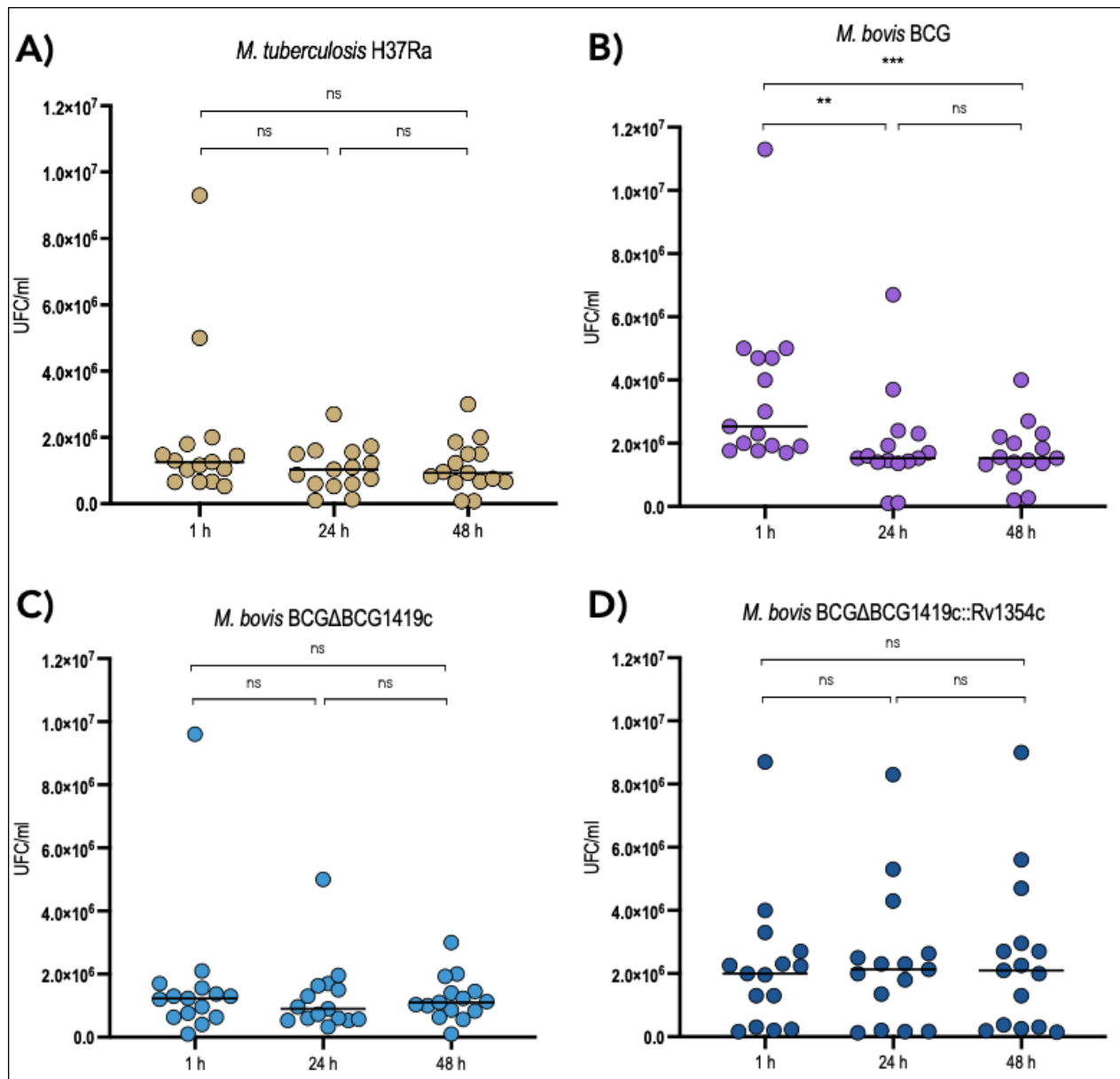


Figura 7. Control intracelular de las cepas candidatas a vacuna contra la TB (*M. bovis* BCG Δ BCG1419c y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c) por los leucocitos. La sangre obtenida se infectó con las diferentes micobacterias, y a los tiempos indicados se realizaron los ensayos de cuantificación de UFC para medir la carga bacteriana de: A) *M. tuberculosis* H37Ra, B) *M. bovis* BCG, C) *M. bovis* BCG Δ BCG1419c y D) *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c. Wilcoxon test (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.009$, ***= $p < 0.0009$). $n = 15$. La línea horizontal representa la mediana.

significativas ($p = 0.0067$ y $p = 0.0004$, respectivamente). Por otro lado, en la Figura 8c se puede observar que hubo un aumento en la producción TNF- α por parte de los leucocitos al ser infectados con la cepa candidata a vacuna *M. bovis* BCG Δ BCG1419c, a las 24 y 48 horas post-infección ($p = 0.0125$ y $p = 0.0181$, respectivamente). Por último, en la Figura 8d se muestra la producción de TNF- α por parte de los leucocitos al ser infectados con la cepa candidata a vacuna *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c, mostrando un aumento en la producción de esta citocina a las 24 y 48 horas post-infección ($p = 0.0004$

Tabla 4. Producción de TNF- α por parte de los leucocitos al ser infectados con las micobacterias.

Micobacteria	1 hora (Mediana)	24 horas (Mediana)	48 horas (Mediana)
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	140.4 pg/ml	155.5 pg/ml	160 pg/ml
<i>M. bovis</i> BCG	25.5 pg/ml	92.6 pg/ml	98 pg/ml
<i>M. bovis</i> BCG Δ BCG1419c	21.5 pg/ml	46.2 pg/ml	39 pg/ml
<i>M. bovis</i> BCG Δ BCG1419c::R1354c	87.3 pg/ml	339.4 pg/ml	355.4 pg/ml

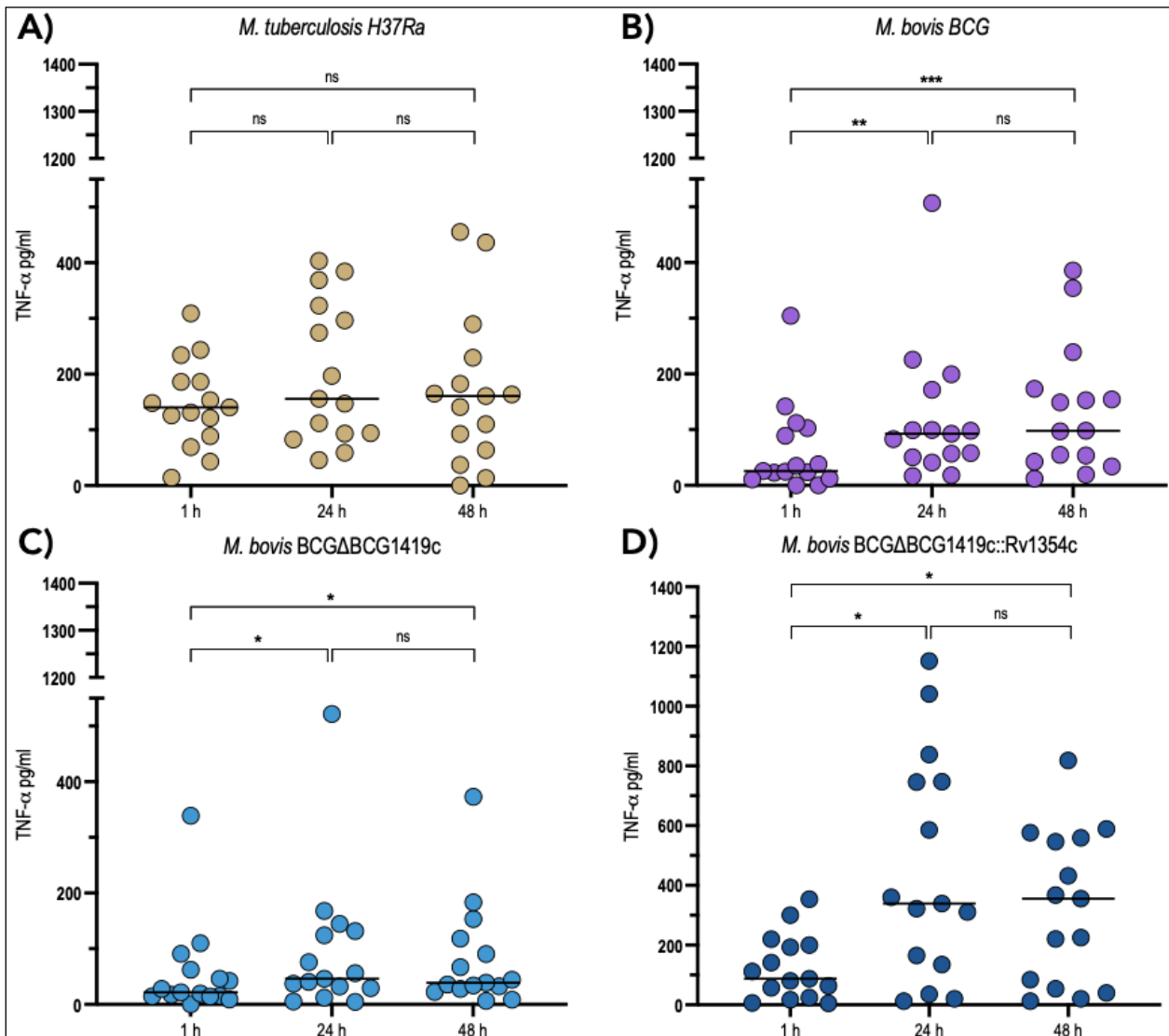


Figura 8. Los leucocitos produjeron TNF- α al ser infectados con las cepas candidatas a vacuna contra la TB (*M. bovis* BCG Δ BCG1419c y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c), de manera similar que la cepa vacunal BCG. La sangre obtenida se infectó con las diferentes micobacterias, y a los tiempos indicados se obtuvieron los sobrenadantes para medir la producción de TNF- α . A) *M. tuberculosis* H37Ra, B) *M. bovis* BCG, C) *M. bovis* BCG Δ BCG1419c y D) *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c. Wilcoxon test (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.009$, ***= $p < 0.0009$). $n = 15$. La línea horizontal representa la mediana.

y $p=0.0006$, respectivamente). Estos resultados indican que las cepas candidatas a vacuna (*M. bovis* BCG Δ BCG1419c y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c) promueven una respuesta inflamatoria mediada por la producción de TNF- α , de manera similar a la cepa parental *M. bovis* BCG.

A pesar de estos hallazgos, es importante mencionar que tanto la cepa parental *M. bovis* BCG como la cepa candidata a vacuna *M. bovis* BCG Δ BCG1419c muestran una tendencia en inducir menor producción de TNF- α en comparación con *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c (Tabla 4). Sin embargo, al comparar la producción de TNF- α en cada tiempo, entre las diferentes micobacterias, sólo se observó que la cepa *M. bovis* BCG Δ BCG1419c indujo menor producción de TNF- α en comparación con la cepa *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c a las 24 y 48 horas post-infección ($p=0.0028$ y $p=0.0105$, respectivamente) (Figura S2b,c). Además, en el tiempo basal de una hora se observó que los leucocitos de sangre periférica, correspondientes al grupo infectado con *M. tuberculosis* H37Ra, mostraron una mayor producción de TNF- α en comparación con los grupos infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c ($p=0.0242$ y $p=0.0069$, respectivamente) (Figura S2a).

6.4. Producción de IFN- γ

Complementariamente, se evaluó la producción de la citocina pro-inflamatoria IFN- γ en los sobrenadantes de los experimentos de infección de los leucocitos de sangre periférica al ser infectados con las diferentes micobacterias. No se observó un aumento significativo en la producción de IFN- γ durante la cinética de estudio por parte de los leucocitos al ser infectados con las cepas *M. tuberculosis* H37Ra (Figura 9a), *M. bovis* BCG (Figura 9b) y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c (Figura 9c). Por otro lado, en la Figura 9d se observa que hubo un aumento en la producción de IFN- γ cuando los leucocitos de sangre periférica fueron infectados con la cepa candidata a vacuna *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c. Este aumento mostró diferencias significativas a las 24 y 48 horas post-infección ($p=0.0273$ y $p=0.0234$, respectivamente). Sin embargo, como se observa en la Tabla 5, los niveles de producción de IFN- γ fueron bajos. Además, al comparar la producción de IFN- γ en cada tiempo, no se observaron diferencias significativas en la producción de esta citocina inducida por *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c en comparación con las demás micobacterias (Figura S3).

Tabla 5. Producción de IFN- γ por parte de los leucocitos al ser infectados con las micobacterias.

Micobacteria	1 hora (Mediana)	24 horas (Mediana)	48 horas (Mediana)
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	0 pg/ml	12.2 pg/ml	29.4 pg/ml
<i>M. bovis</i> BCG	0 pg/ml	17.06 pg/ml	1.17 pg/ml
<i>M. bovis</i> BCG Δ BCG1419c	0 pg/ml	12.8 pg/ml	14.10 pg/ml
<i>M. bovis</i> BCG Δ BCG1419c::R1354c	0 pg/ml	23.4 pg/ml	40.73 pg/ml

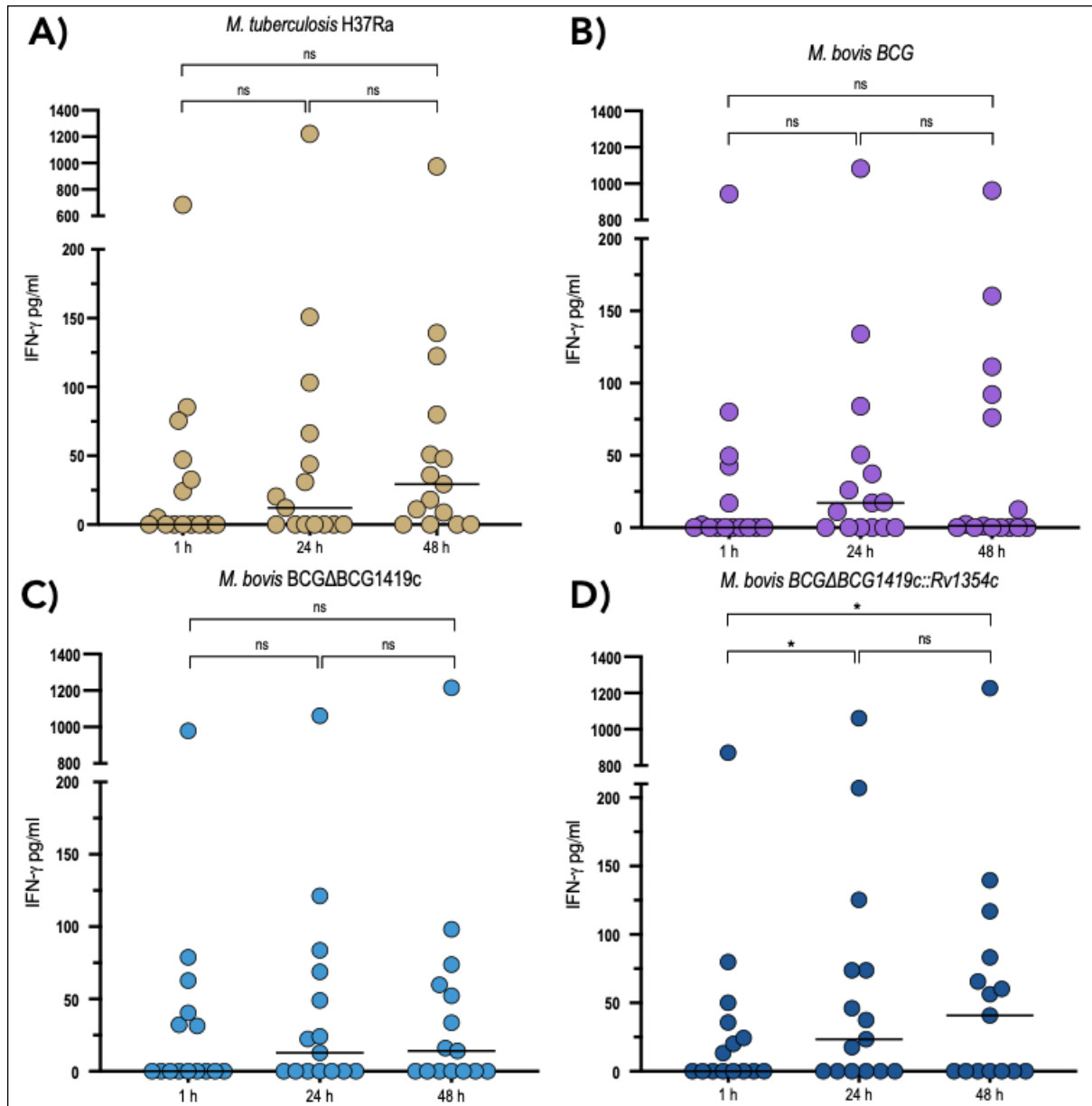


Figura 9. Los leucocitos indujeron una mayor producción de IFN- γ al ser infectados con la cepa candidata a vacuna *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c. La sangre obtenida se infectó con las diferentes micobacterias, y a los tiempos indicados se obtuvieron los sobrenadantes para medir la producción de IFN- γ . A) *M. tuberculosis* H37Ra, B) *M. bovis* BCG, C) *M. bovis* BCG Δ BCG1419c y D) *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c. Wilcoxon test (*=p<0.05, **=p<0.009, ***=p<0.0009). n=15. La línea horizontal representa la mediana.

7. DISCUSIÓN

Actualmente, debido a la pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2, la generación de nuevas vacunas ha mostrado un gran auge, ya que son una necesidad mundial para prevenir diversas enfermedades, mostrando un costo-beneficio elevado para la población mundial. Si bien, ya existen vacunas para prevenir ciertas enfermedades, es de suma importancia generar nuevas vacunas para cubrir con las

necesidades que van surgiendo en el transcurso del tiempo, entre las que se encuentran: variabilidad genética y deriva génica de los microorganismos; así como efectividad variable de las vacunas, tiempo corto o variable de protección, y efectividad baja o nula contra diferentes formas de la enfermedad a prevenir.

Pese a que se cuenta con una vacuna para prevenir la TB, la vacuna BCG tiene una efectividad muy variable y conforme pasa el tiempo post-vacunación va disminuyendo su capacidad protectora, por lo que no protege contra la TBP en adultos. Aunado a esto, la TB sigue mostrando índices elevados de mortalidad y, además, la cuarta parte de la población mundial está infectada con el bacilo causante de la TB^{3,4}. Es por esto que, se han generado nuevas vacunas, entre las que se encuentran las vacunas derivadas de micobacterias vivas atenuadas como MTBVAC y VPM1002 (ambas se encuentran en estudios clínicos)⁵², o como las cepas candidatas a vacuna reportadas en este trabajo, *M. bovis* BCGΔBCG1419c y *M. bovis* BCGΔBCG1419c::Rv1354c, las cuales se encuentran en estudios pre-clínicos. La única vacuna que ha sido evaluada y que ha mostrado resultados prometedores en diferentes modelos en roedores ha sido la cepa *M. bovis* BCGΔBCG1419c. Sin embargo, surge la necesidad de seguir realizando evaluaciones pre-clínicas, ahora en células humanas, para seguir avanzando hacia las siguientes fases de desarrollo.

Estudios previos han reportado que la cepa mutante *M. bovis* BCGΔBCG1419cHyg^R mostró ser inmunogénica, segura, preventiva e incluso protectora, al disminuir daño tisular, en los diferentes modelos murinos en comparación con la cepa parental *M. bovis* BCG (Tabla 2)^{61,65-68}. Sin embargo, en este proyecto se evaluó a la cepa *M. bovis* BCGΔBCG1419c, la cual no ha sido tan ampliamente evaluada como *M. bovis* BCGΔBCG1419cHyg^R, pero si ha mostrado resultados prometedores como son: mayor seguridad, mayor supervivencia en ratones atímicos (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl); mejor efectividad para controlar la patogenia de la TBP al reducir citocinas pro-inflamatorias, reducir carga bacilar y daño tisular en los pulmones; así como la reducción de la severidad en el bazo, mejorando el control de la patogenia contra la TB extrapulmonar (Tabla 2)⁶⁴.

Con este proyecto de investigación hemos iniciado una fase experimental pre-clínica en células humanas de voluntarios sanos. Donde observamos que al infectar a los leucocitos de sangre periférica con la cepa vacunal *M. bovis* BCG, los leucocitos redujeron y controlaron el crecimiento intracelular de esta micobacteria al cuantificar las UFC conformé pasó el tiempo post-infección (Figura 7b). Por otro lado, en comparación con las cepas candidatas a vacuna *M. bovis* BCGΔBCG1419c (Figura 7c) y *M. bovis* BCGΔBCG1419c::Rv1354c (Figura 7d), se puede observar que los leucocitos mantuvieron un control intracelular constante de estas micobacterias a los diferentes tiempos del estudio, ya que no hubo un aumento o disminución de la carga bacteriana. Además, al comparar las UFC de todas las micobacterias con respecto al tiempo post-infección, se observó que *M. tuberculosis* H37Ra y *M. bovis* BCGΔBCG1419c fueron mejor controladas a la primera hora post-infección en comparación con la cepa parental *M. bovis* BCG (Figura S1a). Recordemos que la principal característica de ambas cepas candidatas a vacuna es crecer en biofilm; lo que podría darles una ventaja en inducir el desarrollo de una respuesta inmune más prolongada. Por lo tanto, nuestros resultados nos permitirían inferir en una perspectiva futura como vacuna, que las cepas *M. bovis* BCGΔBCG1419c y *M. bovis* BCGΔBCG1419c::Rv1354c podrían ser controladas con una mejor eficiencia desde el inicio de la inoculación, y mantenerse por más tiempo, desarrollando una interacción inmunológica más prolongada.

La biopelícula es una estructura extracelular en la que se encuentran agregados de microorganismos, la cual consta de sustancias extrapoliméricas, proteínas de unión a carbohidratos y DNA extrace-

lular (generalmente proviene de una autólisis de una subpoblación bacteriana)⁶⁹⁻⁷¹. Esta estructura se ha asociado con una infección crónica en los humanos por parte de *M. tuberculosis*, debido a la resistencia a los antibióticos que les brinda la biopelícula, así como una protección contra el sistema inmune⁷². Sin embargo, los componentes de las biopelículas en las micobacterias aún no están del todo claros y, sobre todo, la señalización para generar las biopelículas es un mecanismo complejo que incluye diversas vías⁷³. Por lo tanto, nosotros inferimos que esta característica de crecer en biofilm, por parte de *M. bovis* BCGΔBCG1419c y *M. bovis* BCGΔBCG1419c::Rv1354c, puede asemejar aspectos de una enfermedad crónica por TB, permitiendo que las micobacterias residan y sean controladas por más tiempo por parte de los leucocitos de sangre periférica. Esto quizá permita una prolongación en el tiempo de interacción con las células del sistema inmune para favorecer el desarrollo de una respuesta de memoria más eficiente. Desconocemos si la falta de eliminación de las cepas candidatas tendrá repercusiones en los individuos. Sin embargo, se necesitan realizar más evaluaciones pre-clínicas en células humanas con una cinética mayor para demostrar la atenuación de estas cepas candidatas a vacuna.

Es importante mencionar que dentro de los leucocitos que se encuentran en la sangre, los neutrófilos (50-70%) y los monocitos (5-10%) son las principales células encargadas de fagocitar a los diversos microorganismos presentes en sangre. Por un lado, se ha reportado que los neutrófilos son las principales células en infiltrarse en los pulmones después de una infección por *M. tuberculosis* y, a su vez, muestran un mayor nivel de fagocitosis y una mayor generación de ROS en comparación con los macrófagos^{32,74}. Por otro lado, se ha reportado que los monocitos pueden presentar tres subpoblaciones, dependiendo de su *cluster of differentiation* (CD), dividiéndose en: clásicos (CD14⁺⁺,CD16⁻), intermedios (CD14⁺,CD16⁺) y no clásicos (CD14⁺,CD16⁺⁺)⁷⁵. Se ha encontrado que en una infección por TB los monocitos más abundantes son los que presentan CD16⁺ (monocitos intermedios y no clásicos), los cuales se caracterizan por tener un comportamiento pro-inflamatorio al secretar citocinas como TNF- α en respuesta a la infección, así como en participar en la proliferación y estimulación de células T⁷⁵. Estudios en ratones han reportado que los monocitos CD16⁺, producen niveles más altos de TNF- α que los monocitos CD16⁻⁷⁵. Además, se ha mencionado que los neutrófilos secretan TNF- α , para que actúen de manera autocrina, como de manera parácrina en las diferentes células inmunitarias⁷⁶. Por lo tanto, esperaríamos que al ser células más abundantes en la sangre, los neutrófilos y los monocitos sean los encargados de fagocitar y controlar el crecimiento intracelular de las cepas candidatas a vacuna y, a su vez, sean las que produzcan este aumento de TNF- α observado en la [Figura 8](#). Sin embargo, una de las limitaciones que presenta este trabajo es que no se analizaron las subpoblaciones de monocitos predominantes en sangre, ya que con los reportes mencionados anteriormente, nosotros esperaríamos que los monocitos CD16⁺ fueran más abundantes, permitiéndonos comprobar que el aumento en la producción de TNF- α se debe a éstas células, ya que los neutrófilos presentan una vida media más corta.

Se observó que ambas cepas candidatas a vacuna, indujeron a los leucocitos de sangre periférica a producir una mayor cantidad de TNF- α , conforme pasó el tiempo post-infección, encontrando que hubo un aumento significativo de esta citocina a las 24 y 48 h post-infección, en comparación con el tiempo basal (primera hora). Por otro lado, en conjunto con los resultados obtenidos para evaluar la capacidad que presentaron los leucocitos de sangre periférica para controlar el crecimiento intracelular de las micobacterias, nosotros inferimos que hay una posible relación entre el control del crecimiento de las micobacterias con la producción de TNF- α . Por lo que, al mantener constante la carga bacilar

de los leucocitos, habrá una respuesta inmunológica eficiente por parte de los leucocitos, incrementando la secreción del TNF- α . Esta citocina, es muy importante en respuesta a una infección por *M. tuberculosis*, ya que se asocia con: proliferación y diferenciación de células inmunes, migración debida a procesos inflamatorios, participación en la activación de macrófagos por parte de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y reclutamiento de células, en conjunto con diversas quimiocinas, para formar el granuloma³⁷. Aunado a esto, es importante mencionar que al comparar la producción de TNF- α por parte de los leucocitos al ser infectados con las diferentes micobacterias, sólo *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c indujo mayor producción de TNF- α en comparación con *M. bovis* BCG Δ BCG1419c a las 24 y 48 h post-infección (Figura 52b,c). Sin embargo, desconocemos si esta mayor producción de TNF- α inducida por *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c sea perjudicial en un individuo, ya que si hay una respuesta inflamatoria exacerbada sin haber un equilibrio con la producción de citocinas anti-inflamatorias, se puede causar daño en los individuos.

Adicionalmente, en comparación con el aumento en la producción de TNF- α por parte de los leucocitos al ser infectados con *M. bovis* BCG y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c, los leucocitos no mostraron un aumento en la producción de IFN- γ (Figura 9b,c). Sin embargo, los leucocitos si mostraron un aumento en la producción de IFN- γ al ser infectados con la cepa *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c conforme transcurrió el tiempo post-infección (Figura 9d). Esta citocina es la principal molécula relacionada con la protección contra la TB ya que se encarga de activar macrófagos, permitiendo una migración y cambio de función³⁷. El grupo del Dr. Flores Valdez, ha reportado que en ratones C57BL/6 la cepa candidata a vacuna *M. bovis* BCG Δ BCG1419c mostró una reducción en la producción de IFN- γ en los pulmones, al ser infectados post-vacunación; mencionando que esta cepa candidata podría mantener un equilibrio en la respuesta inflamatoria⁶⁸. Sin embargo, en nuestro estudio mostramos que este aumento en la producción de IFN- γ , le podría dar una ventaja a la cepa candidata a vacuna *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c, aunque sus niveles de producción son bajos (Tabla 5). Podríamos inferir que al administrarse de manera intradérmica, habrá una mayor activación de macrófagos M1, permitiendo un procesamiento y una presentación de Ags más eficiente. Sin embargo, debido a que la cepa *M. bovis* BCG Δ BCG1419c mostró una disminución en la expresión de IL-10⁶⁸, es necesario evaluar si la cepa *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c también tiende a inducir una menor producción de IL-10; ya que, en caso de haber una menor producción de esta citocina nos permitiría inferir que no habrá una diferenciación a macrófagos M2, los cuales se han asociado con una eliminación y presentación antigénica de las micobacterias deficiente.

Una limitante que presenta este estudio es que no se evaluaron las citocinas anti-inflamatorias que se producen en este modelo de infección en sangre completa. Es importante considerar que una respuesta inflamatoria exacerbada puede causar daño tisular en el hospedero, por lo que es necesario evaluar la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10, TFG- β e IL-4, las cuales tienen efectos reguladores en la TB^{77,78}. Al evaluar estas citocinas anti-inflamatorias nos permitiría tener más respuestas sobre el equilibrio que podrían, o no, tener las células de la respuesta inmunológica que se desarrolla con las mutantes candidatas a vacuna. Aunque todas estas hipótesis, son una perspectiva futura de lo que podría ocurrir en un individuo al ser vacunado. Sin embargo, aún se están realizando estas evaluaciones pre-clínicas de manera *in vitro*.

8. CONCLUSIÓN

Los leucocitos de sangre periférica fueron capaces de mantener un control constante del crecimiento intracelular de las cepas mutantes *M. bovis* BCG Δ BCG1419c y *M. bovis* BCG Δ BCG1419c::Rv1354c, candidatas a vacuna contra la TB, aunado a una producción elevada de TNF- α e IFN- γ . Sugiriendo que los cambios genéticos inferidos en ellas les podrían dar una ventaja, favoreciendo una interacción inmunológica más prolongada o una activación mayor, respecto a la cepa vacunal *M. bovis* BCG.

9. REFERENCIAS

1. Koch A, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. 2018;26(6):555-556. doi:10.1016/j.tim.2018.02.012
2. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. *Lancet*. 2019;393(10181):1642-1656. doi:10.1016/S0140-6736(19)30308-3
3. World Health Organization. Tuberculosis. Recuperado el 15 de febrero de 2022 de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
4. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2021*; 2021. Recuperado el 15 de febrero de 2022 de <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
5. Lyon S, Rossman M. Pulmonary Tuberculosis. *Microbiol Spectr*. 2017;5(1). doi:10.1128/microbiolspec.TNMI7-0032-2016.
6. Pai M, Behr MA, Dowdy D, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2. doi:10.1038/nrdp.2016.76
7. Rodriguez-Takeuchi SY, Renjifo ME, Medina FJ. Extrapulmonary tuberculosis: Pathophysiology and imaging findings. *Radiographics*. 2019;39(7):2023-2037. doi:10.1148/rg.2019190109
8. Ramirez-Lapausa M, Menendez-Saldana A, Noguera-Asensio A. Extrapulmonary tuberculosis: An overview. *Rev Española Sanid Penit*. 205AD;17:3-11. doi:10.4321/S1575-06202015000100002
9. Moguel Hernández A, Gutiérrez Cázarez Z, Pérez Ricárdez ML, Zarco González AP, Blancas Ojeda MH, Duck Hernández E. Análisis epidemiológico de casos de tuberculosis meníngea en el «Hospital para el Niño Poblano» en un periodo de 13 años. *An Médicos la Asoc Médica del Cent Médico ABC*. 2021;66(1):19-24. doi:10.35366/99485
10. Underwood J, Cresswell F, Salam AP, et al. Complications of miliary tuberculosis: Low mortality and predictive biomarkers from a UK cohort. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):1-7. doi:10.1186/s12879-017-2397-6
11. Churchyard G, Kim P, Shah NS, et al. What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. *J Infect Dis*. 2017;216(Suppl 6):S629-S635. doi:10.1093/infdis/jix362
12. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2020*.; 2020. Recuperado el 20 de febrero de 2021 de <http://apps.who.int/bookorders.%0Ahttps://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
13. SUIVE, DGE, Secretaría de Salud. *Distribución de Casos Nuevos de Enfermedad Por Grupos de Edad*.; 2020. Recuperado el 28 de julio de 2021 de https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2020/morbilidad/nacional/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_grupo_edad.pdf
14. Sistema de Información de la Secretaría de Salud. Causas de defunción. *Dir Gen Inf Salud*. Published online 2020. Recuperado el 28 de julio de 2021 de <http://sinaiscap.salud.gob.mx:8080/DGIS/#>
15. Deshpande SS, Joshi AR, Shah A. Aftermath of pulmonary tuberculosis: Computed tomography assessment. *Polish J Radiol*. 2020;85(1):e144-e154. doi:10.5114/pjr.2020.93714

16. Payeur JB. *Mycobacterium*. *Encycl Food Microbiol Second Ed*. 2014;2:841-853. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00229-9
17. Van Ingen J. *Mycobacteria*. *Infect Dis (Auckl)*. 2017;Fourth Edi:1645-1659. doi:10.1016/b978-0-7020-6285-8.00185-4
18. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(4):202-213. doi:10.1038/nrmicro.2018.8
19. Mashabela GT, De Wet TJ, Warner DF. *Mycobacterium tuberculosis* metabolism. *Microbiol Spectr*. 2019;7(4):1107-1128. doi:10.1128/9781683670131.ch67
20. Bender, Madigan, Buckley, Sattley, Stahl. *Brock Biology of Microorganisms 15th Edition* (2019, Pearson); 2019.
21. Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. *Overview of Bacteria*; 2017. doi:10.1016/b978-0-12-805351-5.00006-5
22. Addo K., Owusu-darko K, Yeboah-manu D, et al. Mycobacterial species causing pulmonary tuberculosis At the korle bu teaching hospital, Accra,. *Ghana Med J*. 2007;41(2):52-57. doi:10.4314/gmj.v41i2.55293
23. CDC. Self-study modules on tuberculosis. *Clin Chest Med*. Recuperado el 13 de diciembre de 2021 de <https://www.cdc.gov/tb/education/ssmodules/default.htm>
24. Carreto-Binaghi L, González Y, Guzmán-Beltrán S. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria: Diagnosis, treatment and antimicrobial resistance mechanisms. *Neumol y Cir Torax(Mexico)*. 2021;80(2):141-153. doi:10.35366/100997
25. Chitale P, Lemenze AD, Fogarty EC, et al. A comprehensive update to the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv reference genome. *bioRxiv*. Published online 2022:2022.07.15.500236. doi:10.1038/s41467-022-34853-x
26. Méndez-López MV et al. Genes y determinantes de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* que contribuyen a la evasión de la respuesta inmune. *Vacci Monit*. 2020;29(2):82-92.
27. Madacki J, Mas Fiol G, Brosch R. Update on the virulence factors of the obligate pathogen *Mycobacterium tuberculosis* and related tuberculosis-causing mycobacteria. *Infect Genet Evol*. 2019;72(December):67-77. doi:10.1016/j.meegid.2018.12.013
28. Rivera-Calzada A, Famelis N, Llorca O, Geibel S. Type VII secretion systems: structure, functions and transport models. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(9):567-584. doi:10.1038/s41579-021-00560-5
29. Torrelles JB, Schlesinger LS. Integrating Lung Physiology, Immunology, and Tuberculosis. *Trends Microbiol*. 2017;25(8):688-697. doi:10.1016/j.tim.2017.03.007
30. Cardona PJ. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;36(1):38-46. doi:10.1016/j.eimc.2017.10.015
31. de Waal AM, Hiemstra PS, Ottenhoff TH, Joosten SA, van der Does AM. Lung epithelial cells interact with immune cells and bacteria to shape the microenvironment in tuberculosis. *Thorax*. 2022;77(4):408-416. doi:10.1136/thoraxjnl-2021-217997
32. Liu CH, Liu H, Ge B. Innate immunity in tuberculosis: Host defense vs pathogen evasion. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(12):963-975. doi:10.1038/cmi.2017.88
33. de Martino M, Lodi L, Galli L, Chiappini E. Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*: A Narrative Review. *Front Pediatr*. 2019;7(August):1-8. doi:10.3389/fped.2019.00350
34. Ferluga J, Yasmin H, Al-Ahdal MN, Bhakta S, Kishore U. Natural and trained innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology*. 2020;225(3):151951. doi:10.1016/j.imbio.2020.151951
35. Sia JK, Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Gram-Positive Pathog*. Published online 2019:1056-1086. doi:10.1128/9781683670131.ch64

36. Zhai W, Wu F, Zhang Y, Fu Y, Liu Z. The immune escape mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2). doi:10.3390/ijms20020340
37. Domingo-Gonzalez R, Prince O, Cooper A, Khader SA. Cytokines and chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberc Tuberc Bacillus Second Ed*. Published online 2017:33-72. doi:10.1128/9781555819569.ch2
38. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology*. 2018;223(4-5):383-396. doi:10.1016/j.imbio.2017.11.001
39. Lange C, Aaby P, Behr MA, et al. 100 years of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(1):e2-e12. doi:10.1016/S1473-3099(21)00403-5
40. Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum Vaccin*. 2009;5(2):70-78. doi:10.4161/hv.5.2.7210
41. Fatima S, Kumari A, Das G, Dwivedi VP. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sci*. 2020;252(March):117594. doi:10.1016/j.lfs.2020.117594
42. Calmette A. Preventive Vaccination against Tuberculosis with BCG. *J R Soc Med*. 1931;24(11):1481-1490. doi:10.1177/003591573102401109
43. Li J, Zhan L, Qin C. The double-sided effects of *Mycobacterium Bovis* bacillus Calmette-Guérin vaccine. *npj Vaccines*. 2021;6(1):1-11. doi:10.1038/s41541-020-00278-0
44. Sarno A, Bitencourt J, Queiroz A, Arruda S. In silico comparisons of lipid-related genes between mycobacterium tuberculosis and BCG vaccine strains. *Genet Mol Biol*. 2021;44(4). doi:10.1590/1678-4685-GMB-2021-0024
45. Daugelat S, Kowall J, Mattow J, et al. The RD1 proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: Expression in *Mycobacterium smegmatis* and biochemical characterization. *Microbes Infect*. 2003;5(12):1082-1095. doi:10.1016/S1286-4579(03)00205-3
46. Cho T, Khatchadourian C, Nguyen H, Dara Y, Jung S, Venketaraman V. A review of the BCG vaccine and other approaches toward tuberculosis eradication. *Hum Vaccines Immunother*. 2021;17(8):2454-2470. doi:10.1080/21645515.2021.1885280
47. Abdallah AM, Hill-Cawthorne GA, Otto TD, et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep*. 2015;5(October):1-15. doi:10.1038/srep15443
48. Wu B, Huang C, Garcia L, et al. Unique gene expression profiles in infants vaccinated with different strains of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *Infect Immun*. 2007;75(7):3658-3664. doi:10.1128/IAI.00244-07
49. Wang JF, Dai FY, Gong XL, Bao L. Commonly administered bacille Calmette-Guérin strains induce comparable immune response. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):15834-15839.
50. Ritz N, Hanekom WA, Robins-Browne R, Britton WJ, Curtis N. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(5):821-841. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00118.x
51. Abubakar I, Pimpin L, Ariti C, et al. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2013;17(37):1-4. doi:10.3310/hta17370
52. Sable SB, Posey JE, Scriba TJ. Tuberculosis vaccine development: Progress in clinical evaluation. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(1). doi:10.1128/cmr.00100-19
53. McShane H. Insights and challenges in tuberculosis vaccine development. *Lancet Respir Med*. 2019;7(9):810-819. doi:10.1016/S2213-2600(19)30274-7
54. Flores-Valdez MA, De Jesús Aceves-Sánchez M, Montero-Pérez SA, Sánchez-López AD, Gutiérrez-Pabello JA, Hernández-Pando R. Vaccination of mice with recombinant bacille Calmette-Guérin

- harboring Rv1357c protects similarly to native BCG. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16(6):774-776. doi:10.5588/ijtld.11.0735
55. Flores-Valdez MA, De Jesús Aceves-Sánchez M, Pedroza-Roldán C, et al. The cyclic di-GMP phosphodiesterase gene Rv1357c/BCG1419c affects BCG Pellicle production and in Vivo maintenance. *IUBMB Life.* 2015;67(2):129-138. doi:10.1002/iub.1353
 56. Velazquez-Fernandez JB, Ferreira-Souza GHM, Rodriguez-Campos J, et al. Proteomic characterization of a second-generation version of the BCG Δ BCG1419c vaccine candidate by means of electrospray-ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Pathog Dis.* 2021;79(1). doi:10.1093/femspd/ftaa070
 57. Hall CL, Lee VT. Cyclic-di-GMP regulation of virulence in bacterial pathogens. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018;9(1):1-19. doi:10.1002/wrna.1454
 58. Valentini M, Filloux A. Multiple roles of c-di-GMP signaling in bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2019;73:387-406. doi:10.1146/annurev-micro-020518-115555
 59. Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: Second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(5):271-284. doi:10.1038/nrmicro.2016.190
 60. Cui T, He ZG. C-di-GMP signaling and implications for pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chinese Sci Bull.* 2012;57(34):4387-4393. doi:10.1007/s11434-012-5298-5
 61. Pedroza-Roldán C, Guapillo C, Barrios-Payán J, et al. The BCG Δ BCG1419c strain, which produces more pellicle in vitro, improves control of chronic tuberculosis in vivo. *Vaccine.* 2016;34(40):4763-4770. doi:10.1016/j.vaccine.2016.08.035
 62. Kamath AT, Fruth U, Brennan MJ, et al. New live mycobacterial vaccines: The Geneva consensus on essential steps towards clinical development. *Vaccine.* 2005;23(29):3753-3761. doi:10.1016/j.vaccine.2005.03.001
 63. Walker KB, Brennan MJ, Ho MM, et al. The second Geneva Consensus: Recommendations for novel live TB vaccines. *Vaccine.* 2010;28(11):2259-2270. doi:10.1016/j.vaccine.2009.12.083
 64. Aceves-Sánchez M de J, Flores-Valdez MA, Pedroza-Roldán C, et al. Vaccination with BCG Δ BCG1419c protects against pulmonary and extrapulmonary TB and is safer than BCG. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-14. doi:10.1038/s41598-021-91993-8
 65. Segura-Cerda CA, Marquina-Castillo B, Lozano-Ordaz V, et al. BCG and BCG Δ BCG1419c protect type 2 diabetic mice against tuberculosis via different participation of T and B lymphocytes, dendritic cells and pro-inflammatory cytokines. *npj Vaccines.* 2020;5(1):1-10. doi:10.1038/s41541-020-0169-6
 66. Parasa VR, Rose J, Castillo-Diaz LA, et al. Evaluation of the immunogenic capability of the BCG strains BCG Δ BCG1419c and BCG Δ BCG1416c in a three-dimensional human lung tissue model. *Vaccine.* 2018;36(14):1811-1815. doi:10.1016/j.vaccine.2018.02.044
 67. Aceves-Sánchez MDJ, Flores-Valdez MA, Shanley C, Orme I, Bielefeldt-Ohmann H. Vaccination of Guinea pigs with BCG Δ BCG1419c transiently reduces hematogenous spread of *M. tuberculosis* to the spleen. *Pathog Dis.* 2019;76(9):1-6. doi:10.1093/femspd/fty088
 68. Flores-Valdez MA, Pedroza-Roldán C, Aceves-Sánchez M de J, et al. The BCG Δ BCG1419c vaccine candidate reduces lung pathology, IL-6, TNF- α , and IL-10 during chronic TB infection. *Front Microbiol.* 2018;9(JUN):1-12. doi:10.3389/fmicb.2018.01281
 69. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chinese Med Assoc.* 2018;81(1):7-11. doi:10.1016/j.jcma.2017.07.012
 70. Mirzaei R, Mohammadzadeh R, Sholeh M, et al. The importance of intracellular bacterial biofilm in infectious diseases. *Microb Pathog.* 2020;147(July):104393. doi:10.1016/j.micpath.2020.104393

71. Montanaro L, Poggi A, Visai L, et al. Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs*. 2011;34(9):824-831. doi:10.5301/ijao.5000051
72. Chakraborty P, Bajeli S, Kaushal D, Radotra BD, Kumar A. Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun*. 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-21748-6
73. Esteban J, García-Coca M. *Mycobacterium* biofilms. *Front Microbiol*. 2018;8(JAN):1-8. doi:10.3389/fmicb.2017.02651
74. Hilda JN, Das S, Tripathy SP, Hanna LE. Role of neutrophils in tuberculosis: A bird's eye view. *Innate Immun*. 2020;26(4):240-247. doi:10.1177/1753425919881176
75. Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front Immunol*. 2018;9(July):1-8. doi:10.3389/fimmu.2018.01726
76. Pavón Romero L, Jiménez Martínez MC, Garcés Alvarez ME. *Inmunología Molecular, Celular y Traslacional*. Wolters Kluwer; 2016.
77. Etna MP, Giacomini E, Severa M, Coccia EM. Pro-and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: A two-edged sword in TB pathogenesis. *Semin Immunol*. 2014;26(6):543-551. doi:10.1016/j.smim.2014.09.011
78. Cooper AM, Mayer-Barber KD, Sher A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunol*. 2011;4(3):252-260. doi:10.1038/mi.2011.13

MATERIAL SUPLEMENTARIO

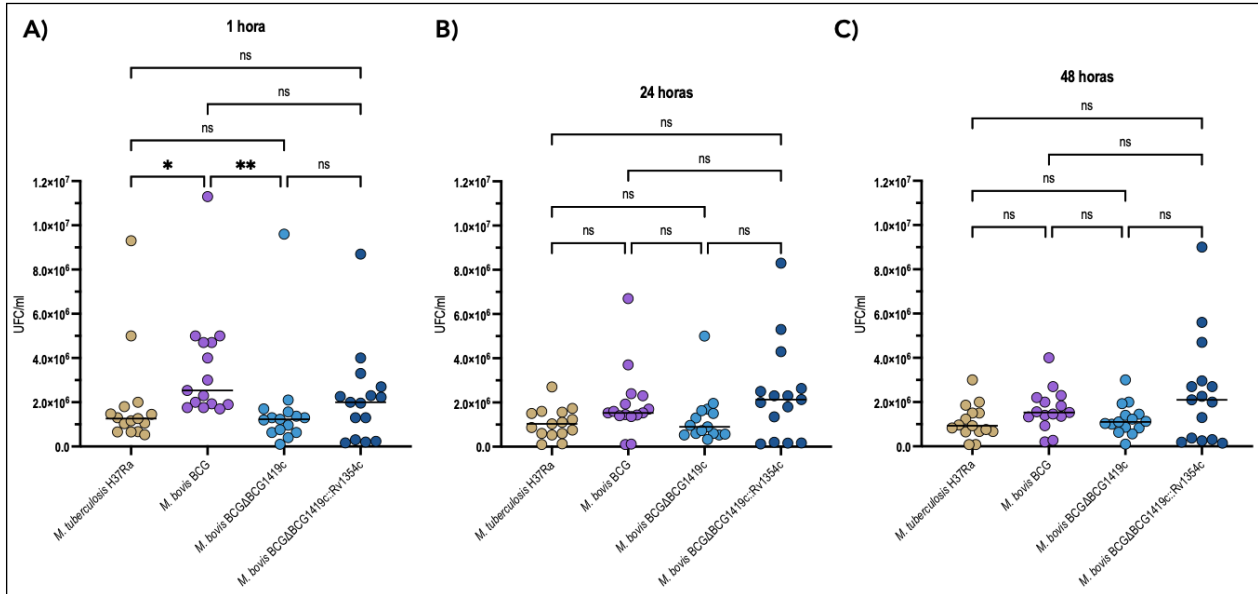


Figura S1. Control del crecimiento intracelular de las micobacterias por los leucocitos de sangre periférica. La sangre obtenida se infectó con las diferentes micobacterias (*M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* BCG, *M. bovis* BCGΔBCG1419c y *M. bovis* BCGΔBCG1419c::Rv1354c), y a los tiempos indicados se realizaron los ensayos de cuantificación de UFC para medir la carga bacteriana. A) 1 hora, B) 24 horas y C) 48 horas post-infección. Kruskal-Wallis test (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.009$, ***= $p < 0.0009$). $n = 15$. La línea horizontal representa la mediana.

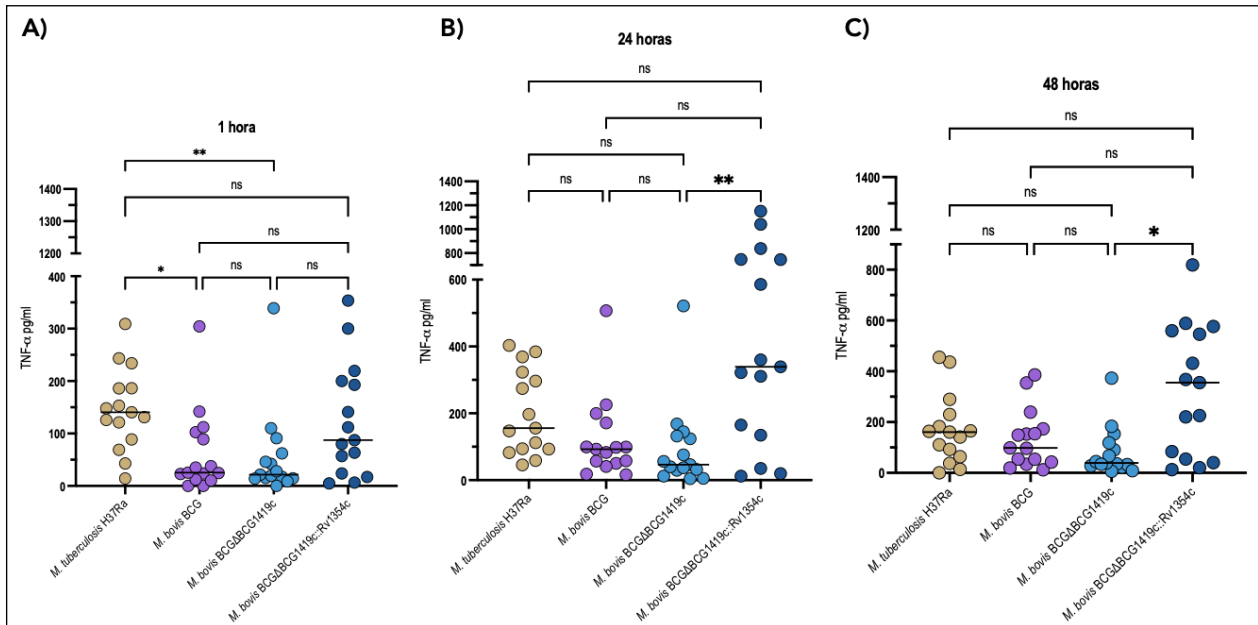


Figura S2. Perfil de producción del TNF- α por parte de los leucocitos de sangre periférica al ser infectados con las diferentes micobacterias. La sangre obtenida se infectó con las diferentes micobacterias (*M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* BCG, *M. bovis* BCGΔBCG1419c y *M. bovis* BCGΔBCG1419c::Rv1354c), y a los tiempos indicados se obtuvieron los sobrenadantes para medir la producción de TNF- α . A) 1 hora, B) 24 horas y C) 48 horas post-infección. Kruskal-Wallis test (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.009$, ***= $p < 0.0009$). $n = 15$. La línea horizontal representa la mediana.

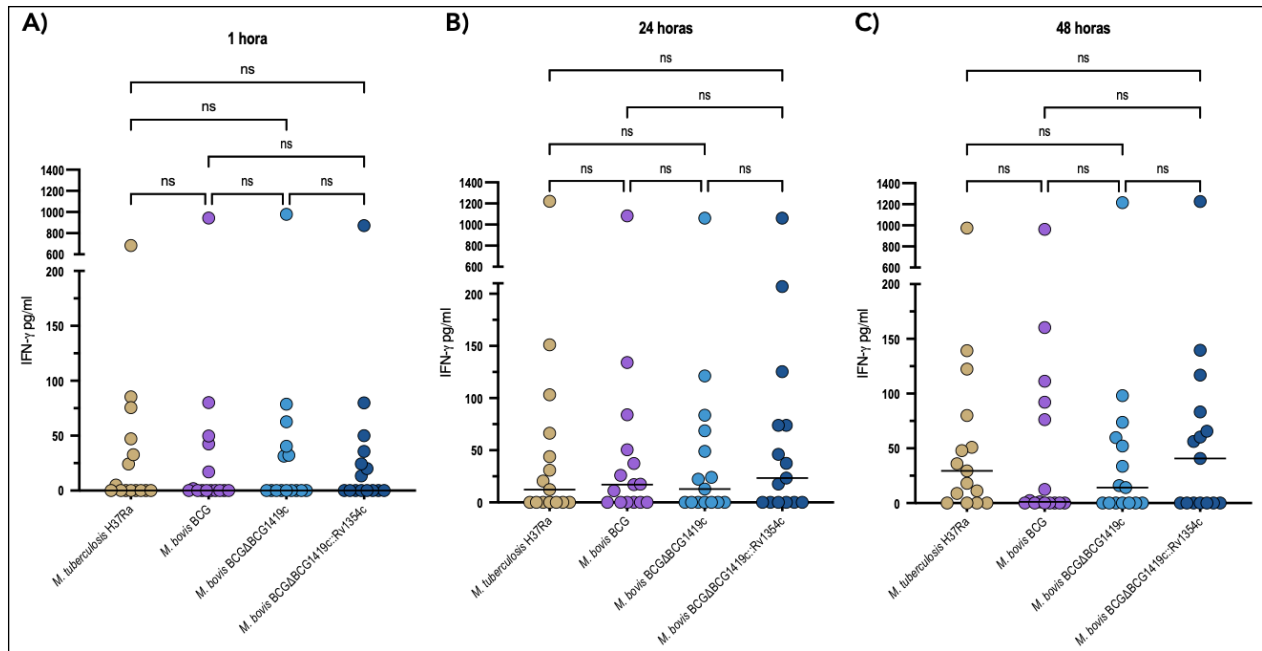


Figura S3. Perfil de producción del IFN- γ por parte de los leucocitos de sangre periférica al ser infectados con las diferentes micobacterias. La sangre obtenida se infectó con las diferentes micobacterias (*M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* BCG, *M. bovis* BCGΔBCG1419c y *M. bovis* BCGΔBCG1419c::Rv1354c), y a los tiempos indicados se obtuvieron los sobrenadantes para medir la producción de IFN- γ . A) 1 hora, B) 24 horas y C) 48 horas post-infección. Kruskal-Wallis test (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.009$, ***= $p < 0.0009$). $n = 15$. La línea horizontal representa la mediana.

