



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación
Biotecnología de la Salud

**Efecto de la Dipalmitoilfosfatidilcolina
sobre la Actividad Transcripcional de
Mycobacterium tuberculosis H37Rv y
Mycobacterium bovis BCG**

TESIS

Que presenta

QFB Ruy Angesaúl García Vázquez

Como requisito para obtener
el grado de

**Maestría en Ciencias con Orientación en
Biotecnología de la Salud**

Director de tesis
Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina
Dr. José Geovanni Romero Quintana

Culiacán de Rosales, SIN, MEX

Junio, 2017

PRESENTACION

La presente investigación titulada "Efecto de la dipalmitoilfosfatidilcolina sobre la actividad transcripcional de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y *Mycobacterium bovis* BCG" se llevó a cabo en los Laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular, Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Los C. Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina y Dr. José Geovanni Romero Quintana participaron como directores de Tesis. El C. QFB Ruy Angesaúl García Vázquez recibió Beca Nacional por el consejo el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus estudios de Posgrado (Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología).

Dedicatoria

Primeramente a mi familia, mi mamá Ofelia Vázquez, mi papá Ruy García y mi hermana Siria García. Por apoyarme y aguantarme las ausencias

A mi abuelo Rafael Vázquez por enseñarme el valor del trabajo y la humildad que debo de tener.

A mi novia Kimberly Guadalupe Félix Ayón por apoyarme y aguantarme mi mal carácter y la poca atención.

Agradecimientos

A la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina por confiar en mí y tener la paciencia necesaria para ayudarme en mi desarrollo profesional, por las enseñanzas y consejos, muchas gracias.

Al Dr. Rosalío Ramos Payán por los consejos brindados, apoyo y la confianza impartida en mí, muchas gracias nunca lo olvidaré.

Al Dr. José Geovanni Romero Quintana por la ayuda brindada en los momentos buenos y en los malos, ante todo muchas gracias por su amistad.

A mi novia por toda la paciencia y comprensión, los momentos buenos y malos, muchas gracias por estar a mi lado.

A mi compañeros de los Laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa: Manana, Rachel, Eriky, Naye, Gera, Aida, Erika, Nidia, Selene, Eduardo, Saúl, Fergie, Chapo, Germany, Nora, Orange, Jorge, Maryelv, Marimar y Malilla. Por todo esos momentos compartidos, buenos o malos, muchas gracias

ÍNDICE GENERAL

	Pág
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	viii
I RESUMEN	1
II INTRODUCCIÓN	3
III REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
A Tuberculosis	5
1 Epidemiología	6
2 transmisión	10
3 manifestaciones clínicas	10
4 diagnostico	10
5 tratamiento	11
6 patogénesis	13
B <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	14
1 Características de la envoltura	14
b)Factor cuerda (trehalosa 6,6-dimicolato)	16
2 principales tipos de estrés que enfrenta <i>M. Tuberculosis</i>	18
a)Exposición a agentes oxidantes	18
b)Exposición a ph ácidos	19
c) Alteración en las estructuras de la superficie celular	19
d)Hipoxia	20
e)Ausencia de nutrientes	21
3. Mecanismos de evasión de m. Tuberculosis	22
C Morfología del alveolo pulmonar	24
1 surfactante pulmonar	27
D Genética de <i>m. Tuberculosis</i>	28
IV JUSTIFICACIÓN	39
V HIPÓTESIS	40
VI OBJETIVOS	41
A Objetivo general	41

B Ojetivos específicos	41
VII MATERIALES Y MÉTODOS	42
A Diseño experimental	42
B Cultivo de micobacterias	42
1 Estímulos de cultivo	42
2 Unidades formadoras de colonias	43
3 Extracción de RNA total	43
4 RT-PCR en tiempo real	44
5 PCR en tiempo real	40
C Análisis estadístico	49
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
A. Viabilidad de cultivos	50
B. Análisis de la expresión genética	50
IX. CONCLUSIONES	76
X. BIBLIOGRAFÍA	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág
1	Epidemiología de la tuberculosis en México.	9
2	Tinción Ziehl Neelsen ¹²	12
3	Morfología de <i>M. tuberculosis</i>	15
4	Morfología del saco alveolar	26
5	Morfología del alveolo pulmonar	27
6	Molécula del DPPC.	28
7	Estructura tridimensional de sitio de reconocimiento de la proteína DosS.	31
8	Estructura tridimensional del sitio de activación de la proteína DosT	32
9	Via de señalización del sistema Dos	33
10	Estructura tridimensional de la proteína rpf	36
11	UFCs de <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i>	51
12	Integridad del RNA total	52
13	Curva de disociación del gen <i>rRNA 16S</i>	53
14	Cinética de amplificación del gen <i>rRNA 16S</i>	54
15	Curva de disociación del gen <i>hspX</i>	55
16	Cinética de amplificación del gen <i>hspX</i>	56
17	Curva de disociación del gen <i>tgsl</i>	57
18	Cinética de amplificación del gen <i>tgsl</i>	58
19	Curva de disociación del gen <i>rpfE</i>	59
20	Cinética de amplificación del gen <i>rpfE</i>	60
21	Curva de disociación del gen <i>idsA2</i>	61
22	Cinética de amplificación del gen <i>idsA2</i>	62
23	Expresión genética de <i>hspX</i> .	65
24	Expresión genética de <i>tgsl</i>	68
25	Expresión genética de <i>rpfE</i>	71
26	Expresión genética de <i>idsA2</i>	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág
1	Secuencia de los iniciadores	45
2	Tm específicos de los diferentes genes	46
3	Condiciones de reacción	47
4	Condiciones de termociclado	48
5	Expresión genética del gen <i>hspX</i> .	64
6	Expresión del gen <i>tgs1</i>	67
7	Expresión del gen <i>rpfE</i> .	70
8	Expresión del gen <i>idsA2</i> .	72

I RESUMEN

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas con mayor tasa de mortalidad en el mundo. La tasa de morbilidad en México es de 17.2 por cada 100 mil habitantes, mientras que en nuestro estado es de 34.6. El agente causal de esta enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis*, un bacilo ácido alcohol resistente que presenta en su membrana estructuras como lipoarabinomanana, ácido micólico, manosa, proteínas, lípidos y colesterol y que afecta principalmente a los pulmones. La superficie alveolar está recubierta por el surfactante pulmonar, el cual es un complejo lipoproteico que tiene como función mantener la tensión superficial del pulmón y a la vez constituye un mecanismo de defensa innato. Los principales componentes del surfactante son los fosfolípidos (hasta en un 80%) siendo el dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) el principal de ellos (70 a 80%), por lo que posiblemente sea reconocido por *M. tuberculosis* durante su llegada a la superficie alveolar influyendo en su expresión genética. En el presente trabajo se realizó el análisis de la actividad transcripcional de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG después de 2 horas de incubación de la bacteria con 10 mg de DPPC y 12.5 mg de surfactante pulmonar. Los genes analizados fueron *hspX*, *tgs1*, *rpfE* e *idsA2*. Los resultados obtenidos con *M. tuberculosis* mostraron una sobreexpresión del gen *rpfE*, el cual está involucrado en la promoción de la replicación bacteriana, específicamente en el catabolismo de la membrana lipídica. En *M. bovis* se encontraron sobreexpresados los genes *HspX* y *tgs1*, genes involucrados en el estado de dormancia de la micobacteria. El efecto diferencial del DPPC y otros componentes del surfactante pulmonar sobre la expresión genética entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* podría influir en el desarrollo de la infección en el hospedero, permitiendo la activación de mecanismos de evasión inmunológica y factores de virulencia en *M. tuberculosis*.

Palabras claves: *M. tuberculosis*, DPPC, surfactante pulmonar.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease with the highest mortality rate in the world. The morbidity rate in Mexico is 17.2 per 100,000 people, in Sinaloa is 34.6. *Mycobacterium tuberculosis* is the infectious agent that causes the disease it's an acid alcohol resistant bacterium; which has several membrane structures such as lipoarabinomannan, mycolic acid, mannose, proteins, lipids and cholesterol. The alveolar surface is coated by pulmonary surfactant, which is a lipoprotein complex that maintains the lung's surface tension and at the same time constitutes an innate defense mechanism. The main components of surfactant are phospholipids (up to 80%) being the dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) the main component (from 70 to 80%), making it a possible target to be recognized by *M. tuberculosis* during its arrival to the alveolar surface and influence its genetic expression. In this study we analyzed the transcriptional activity of *M. tuberculosis* H37Rv and *M. bovis* BCG after 2 hours of interaction of the bacteria with DPPC and full lung surfactant comparing the gene expressions of *hspX*, *tgs1*, *idsA2*, and *rpfE* using RT-qPCR technique. Our results show an overexpression of *rpfE* on *M. tuberculosis*, which is involved in the promotion of the bacterial replication, specifically in the synthesis of cholesterol and catabolism of lipid membrane. On the other hand, *M. bovis* BCG presents an overexpression of *hspX* and *tgs1* genes that are involved in the dormancy of *Mycobacterium*. The difference observed in the deregulation of these genes between *M. tuberculosis* and *M. bovis* may suggest the cause of virulence of *M. tuberculosis* in the host.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, DPPC, pulmonary surfactant

II INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es un problema de salud pública en el mundo, es una enfermedad infecciosa cuyo resurgimiento se encuentra estrechamente asociado a la epidemia causada por el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y a la aparición de cepas multirresistentes a las drogas antituberculosas. Anualmente se reportan alrededor de 10.4 millones de casos, de los cuales el 15% muere. En México se reporta una tasa de morbilidad de 17 por cada 100 mil habitantes mientras que en Sinaloa es de 34.5. El agente causal es *M. tuberculosis*, microorganismo intracelular obligado, inmóvil, que se replica dentro de los fagosomas de los macrófagos. Su tiempo de duplicación es de 12 horas o más por lo que su crecimiento en medios de cultivo es muy lento. Es sensible al calor, rayos ultravioleta y al sol directo, presenta resistencia a ácidos, alcoholes, álcalis, desinfectantes y a la desecación; además es naturalmente resistente a muchos antibióticos debido principalmente a la envoltura celular altamente hidrofóbica que actúa como una barrera permeable lo que hace difícil su tratamiento. Su pared celular es compleja, posee un alto contenido de lípidos (40%), proteínas y polisacáridos; Esta barrera permeable protege al microorganismo del medio ambiente, contribuye a la persistencia de la enfermedad a la vez que contribuye a la longevidad de la micobacteria. También inicia las reacciones inflamatorias del huésped y actúa en la patogénesis de la enfermedad.

La tuberculosis puede afectar a cualquier órgano, pero la tuberculosis pulmonar es la principal forma de la enfermedad debido a que la bacteria entra al organismo a través del tracto respiratorio y se establece primordialmente en los pulmones, pues es un aerobio estricto y prefiere sitios con alta concentración de oxígeno.

El surfactante pulmonar es una capa interna del alveolo pulmonar el cual tiene como función mantener la tensión superficial del pulmón, además de que constituye un importante mecanismo de defensa innato. El surfactante pulmonar está compuesto por 20 % de proteínas y 80% de fosfolípidos. La

clase predominante de fosfolípidos es el dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), el cual podría interactuar con *M. tuberculosis* cuando la bacteria llega a la superficie alveolar. Dicha interacción podría influir en la actividad transcripcional de la micobacteria, sin embargo, no existen reportes que indiquen cuales son los genes que se expresan en *M. tuberculosis* cuando se encuentra expuesta al DPPC. Algunos estudios han establecido que genes como *hspX*, *tgs1* y *DosR* se expresan en condiciones de hipoxia, sin embargo, se desconoce si estos están desregulados desde el primer contacto con el surfactante pulmonar o hasta la formación del granuloma que se observa dos semanas después del inicio de la infección. Por otro lado, los genes *idsA2* y *rpfE* se expresan solo en condiciones que favorecen la replicación de la micobacteria, pero se desconoce si estos genes se expresan cuando la bacteria tiene contacto con el DPPC o con otro componente del surfactante pulmonar. Con base en lo anterior el objetivo de este estudio es establecer si dichos genes se encuentran desregulados en presencia de DPPC u otros componentes del surfactante pulmonar y comparar la expresión de dichos genes en la especie patogénica y no patogénica para conocer si podrían influir en la activación de factores de virulencia o mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica en *M. tuberculosis*.

III REVISIÓN DE LA LITERATURA

A Tuberculosis

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas que afectan a los seres humanos. Los agentes etiológicos componen el complejo *M. tuberculosis*, que está integrado *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluyendo al *M. bovis* BCG), *M. africanum*, *M. microti* y *M. canettii*. Este grupo presenta una homología de ADN-ADN mayor al 95%. Los estudios de secuenciación han mostrado que las diferencias entre los genomas de *M. tuberculosis* y de las demás especies miembros del complejo radica en supresiones que han sufrido los genomas de estas últimas. Las enfermedades causadas por cualquiera de estas especies son indistinguibles entre sí, pero es *M. tuberculosis* el agente causal de la mayoría de los casos de tuberculosis humana. Aunque se estima una antigüedad de entre 15,000 y 20,000 años, se cree que *M. tuberculosis* evolucionó con otros microorganismos primitivos dentro del propio género de *Mycobacterium*. Se piensa que alguna especie de micobacteria evolucionó de manera diferente y por presión selectiva pasó la barrera biológica y como resultado fue capaz de afectar a animales, dando como resultado el ancestro *M. bovis*, que es la aceptada por muchos como la más antigua de las especies que actualmente integran al complejo *M. tuberculosis*. Aparentemente el surgimiento de *M. tuberculosis* es reciente, no obstante, su presencia ha aquejado al ser humano desde épocas muy antiguas, hecho demostrado por la detección de ADN micobacteriano en tejidos momificados, las evidencias genéticas sugieren incluso que desde la aparición del primer homínido en la tierra, hace 3 millones de años, *M. tuberculosis* H37Rv pudo haberse constituido como agente infeccioso. La infección de *M. bovis* BCG a la especie humana coincide con la domesticación de los animales por parte del hombre y Así posiblemente se pudo surgir como patógeno para el hombre (Anthony, 2017; Donoghue, Spigelman, Greenblatt, Lev-Maor, Bar-Gal, Matheson, et al., 2004; Gutierrez, Brisse, Brosch, Fabre, Omaïs, Marmiesse, et al., 2005; Konomi, Lebowhl, Mowbray, Tattersall, & Zhang, 2002).

La tuberculosis alcanzó índices elevados de mortalidad en el humano en el siglo XIX al ser la causa de aproximadamente de un 50 % de muertes en la población económicamente activa proveniente de ciudades europeas (Báguena Cervellera, 1992; Donoghue, et al., 2004; Konomi, Lebwohl, Mowbray, Tattersall, & Zhang, 2002; Salo, Aufderheide, Buikstra, & Holcomb, 1994); para esta época no se conocía la causa de la enfermedad y por lo tanto, no existía tratamiento alguno. El médico alemán Robert Koch inició los estudios sobre la enfermedad y en 1882 descubrió a *M. tuberculosis* como el agente causal, permitiendo con ello el desarrollo de un tratamiento para la enfermedad. En 1906, en Francia Albert Calmette y Camille Guérin desarrollaron la vacuna contra la tuberculosis, denominada BCG (bacilo de Calmette-Guérin), utilizando una cepa de *M. bovis* BCG aislada de una vaca con mastitis tuberculosa. Aunado a ello en 1943, Selman Waksman descubrió la estreptomycinina e inició el tratamiento con antibiótico de personas con tuberculosis. A pesar de contar con la vacuna y el antibiótico, esta enfermedad sigue siendo un problema de salud mundial (Báguena Cervellera, 1992; Stefan HE Kaufmann & Winau, 2005; Mathema, Kurepina, Bifani, & Kreiswirth, 2006; Schatz & Waksman, 1944).

1. Epidemiología

La tuberculosis es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo clasificada como la segunda causa de muerte por infecciones ocasionando 1.8 millones de decesos anuales, más del 95 % de las muertes ocurren en países con nivel socioeconómico bajo (Raviglione, Snider, & Kochi, 1995).

Con la aparición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), a finales de los 80's, la tuberculosis se convirtió en una de las más grandes pandemias, provocando que adquiriera el carácter de reemergente, debido a que existe un sinergismo entre ambos patógenos (Stefan HE Kaufmann, 2006; palmero, 2007). La infección con VIH se ha reconocido como el mayor factor de riesgo para el desarrollo de la tuberculosis debido a que más del 40% de las personas infectadas con VIH mueren de tuberculosis.

Otras causas que provocaron el resurgimiento de la enfermedad son:

- 1) Aparición de cepas multirresistentes a los antibióticos empleados para el tratamiento contra de tuberculosis. Desde los 90's se han detectado brotes en pacientes infectados con cepas resistentes a isoniacida y rifampicina. Posteriormente se aislaron cepas que presentaban resistencia a etambutol, estreptomina, etionamida y rifabutina (Huebner & Castro, 1994)
- 2) Descuido de los programas de seguimiento de la enfermedad. Una vez que se pensó que la enfermedad estaba bajo control, se empezaron a descuidar los programas de vigilancia a los enfermos, además del abandono del tratamiento por parte de los pacientes.
- 3) Variabilidad en la efectividad de la vacuna BCG. Se ha encontrado gran variabilidad en el grado de protección que ofrece la vacuna de BCG, las cifras se encuentran entre el 2% y el 84 % de efectividad en diversas poblaciones que presentan edades y condiciones socioeconómicas diferentes (Colston, Cox, Ratledge, & Dale, 1999; Young & Robertson, 1999).

Debido a lo anterior, en 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a esta enfermedad como una emergencia global encontrándose principalmente en países del sureste de Asia con 1 millón de casos por año (Dheda, Gumbo, Maartens, Dooley, McNerney, Murray, et al., 2017; S. H. Kaufmann, 2000; C. J. Murray, Styblo, & Rouillon, 1990; OMS, 2015; Raviglione, Snider, & Kochi, 1995).

En el año 2000 se reportaron más de 300 millones de personas infectadas por *M. tuberculosis*, estimándose que 90 millones desarrollarían la enfermedad y que morirían 30 millones. (Dheda, et al., 2017; Raviglione, Snider, & Kochi, 1995).

En la actualidad, la tuberculosis parece agravarse alarmantemente, los datos de la OMS indican que *M. tuberculosis* se ha diseminado infectando a una tercera parte de la población mundial (2 mil millones de habitantes), la cual no ha desarrollado la enfermedad, pero muestra una respuesta positiva de las células T antígeno-específicas en la prueba dérmica antituberculina.

Sin embargo, el 10 % de esta población mundial tiene el riesgo de desarrollar la enfermedad en algún momento de su vida, por lo que al año se presentan de 8 a 9 millones de nuevos casos y paralelamente causa la muerte de aproximadamente 5000 individuos diariamente (Bloom & Murray, 1992; Dheda, *et al.*, 2017; Christopher Dye, Scheele, Dolin, Pathania, & Raviglione, 1999) .

En 2015 se estimó que alrededor del 80% de los enfermos de tuberculosis se encuentran en edad productiva (entre 15 y 49 años). La incidencia más elevada de esta enfermedad se presenta en la región de África Subsahariana, la India, algunos países que pertenecieron a la Unión Soviética, Bolivia y Perú, en los cuales se reportan 100 o más casos por cada 100 mil habitantes. También se estimó que 480 mil personas desarrollaron tuberculosis multirresistente (TB-MDR) a nivel mundial. Se ha valorado que entre el 2000 y 2015 se han salvado 49 millones de vidas gracias a la dispensación de servicios de diagnóstico y tratamiento contra la enfermedad. La incidencia de la tuberculosis se ha disminuido hasta un 1.5% cada año desde el 2000. Una de las metas relacionadas con la salud es erradicar la tuberculosis para el año 2030 (OMS, 2015).

En 2015 en México, la Secretaría de Salud (SS) reportó una incidencia de 16,462 casos, mientras que en Sinaloa se reportaron 842 casos. La morbilidad en México es de 17.2 casos por cada 100 mil habitantes mientras que en nuestro estado es de 34.6. La mortalidad reportada en México fue de 2,223 y en nuestro estado fue de 86 casos (SSA, 2015) (Fig. 1).



Figura 1. Epidemiología de la tuberculosis en México. La incidencia de tuberculosis en nuestro país en 2015 fue de 16,462 casos, mientras que en Sinaloa se reportaron 842 casos. Mientras que la morbilidad en México fue de 17.2 casos por cada 100 mil habitantes y en nuestro estado de 34.6. La mortalidad reportada en México fue de 1.7 de casos por cada 100 mil habitantes y en Sinaloa fue de 2.4 casos. Modificado de SSA (2015)

2. Transmisión

La tuberculosis se transmite de persona a persona por medio de saliva (tos, beso o estornudo) que puede estar suspendida en pequeñas gotas infecciosas por largos periodos de tiempo. Las gotas infecciosas miden entre 0.5 a 5 μm de diámetro generando alrededor de 3,000 en un solo estornudo. Las causas que pueden influir en la aparición del cuadro clínico característico de esta enfermedad son el contacto con un paciente infectado, el grado de intimidad con éste, duración del contacto, el ambiente donde se produce y la virulencia de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Se estima que existe un mayor riesgo de contraer la enfermedad (25%), en personas que cumplan las condiciones anteriormente expuestas. Un paciente con tuberculosis sin tratamiento puede infectar entre 10 y 15 personas por año (Collins & Kaufmann, 2001; Daffe & Etienne, 1999; C. Dye, 2014; Griffith & Kerr, 1996; James, Williams, & Marsh, 2000)

3. Manifestaciones clínicas

Al inicio de la enfermedad, las personas con tuberculosis presentan los mismos síntomas observados en otras enfermedades como son la fiebre, el cansancio, la falta de apetito, pérdida de peso, depresión, sudor nocturno y disnea en casos avanzados; cuando además se presenta tos y hemoptisis (esputo con sangre) por más de quince días, deben realizarse estudios ya que se considera un riesgo respiratorio para las personas. En un 25 % de los casos activos, la infección se traslada a otros órganos causando otras formas de tuberculosis extrapulmonar, ello ocurre con más frecuencia en aquellos pacientes inmunodeprimidos y en niños. A pesar de que la tuberculosis extrapulmonar no es contagiosa, puede coexistir con la forma contagiosa de tuberculosis pulmonar (CDC, 2015).

4. Diagnóstico

El método empleado para diagnosticar la tuberculosis pulmonar, debe realizarse mediante la búsqueda de la bacteria en personas que presenten expectoraciones por 15 o más días, que tengan una edad de 15 años o más

y por último que una autoridad competente del servicio de salud de pie de partida para la búsqueda de la bacteria. Estudios recientes en India, Argelia y Perú muestran que con más de dos semanas de duración de los síntomas respiratorios, la baciloscopía en esputo incrementa la detección de enfermos de tuberculosis en un 46% (Santha, Garg, Subramani, Chandrasekaran, Selvakumar, Sisodia, et al., 2005; SSA, 2015).

La baciloscopía es la técnica más útil en los pacientes con tuberculosis pulmonar ya que es un método económico, simple, rápido y específico. Se deben obtener 3 muestras de cada caso probable de tuberculosis. Cuando una de las 3 muestras resulta positiva se da inicio al tratamiento del paciente. La presencia de la bacteria se demuestra mediante la tinción de Ziehl-Neelsen (Fig. 2) (Caminero, 2003; SSA, 2015).

Existen otros métodos a utilizar según los estándares para el diagnóstico de tuberculosis en México los cuales son:

1. Cultivo
2. Estudio histopatológico
3. Estudio inmunológico
4. Pruebas de biología molecular
5. Estudio radiológico

5. Tratamiento

El tratamiento intensivo se lleva a cabo por una serie de medicamentos comúnmente abreviados HRZE (isoniazida, rifampicina pirazinamida y etambutol) el cual consiste en 60 dosis por 6 meses. El periodo de sostén es de 45 dosis de dos fármacos (H y R), tres dosis por semana (OMS, 2015; SSA, 2015).

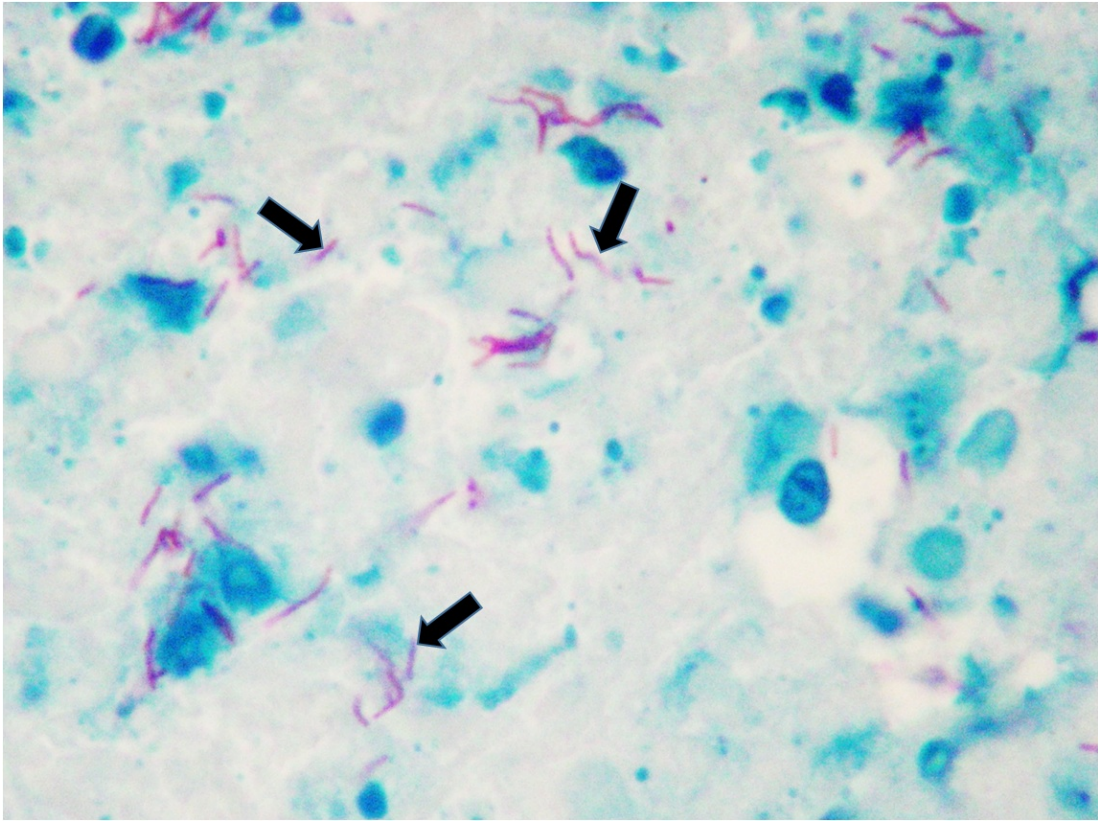


Figura 2. Tinción Ziehl-Neelsen para bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Las micobacterias se tiñen de rojo, mientras que el surfactante, células del sistema inmunitario y otras bacterias se tiñen de azul. Tomado de OMS (2015)

6. Patogénesis

Como se mencionó antes, la bacteria entra al hospedero por medio micropartículas de saliva. Cuando el bacilo se deposita en las vías respiratorias de una persona sana, éste se aloja en los alveolos pulmonares, en los cuales se encuentran agentes surfactantes que reducen la tensión superficial de la interfase aire/líquido y que además actúan como defensa en contra del microorganismo. La micobacteria es fagocitada por los macrófagos alveolares, que usualmente destruyen al patógeno. La muerte de los bacilos depende del poder microbicida de los macrófagos y el grado de virulencia del bacilo (Dannenberg Jr & Rook, 1994; Torrelles & Schlesinger, 2017).

Durante el contacto inicial con la micobacteria, la respuesta inflamatoria del hospedero es inespecífica. Si la infección no cesa en un periodo de 2 o 3 semanas, la inflamación se vuelve granulomatosa y los centros de los granulomas se caseifican y forman los típicos "tubérculos blandos" donde existe un ambiente hipóxico. Aunque *M. tuberculosis* es capaz de multiplicarse a bajos niveles dentro del tejido caseoso debido al bajo pH, a la baja disponibilidad de oxígeno y a la presencia de ácidos grasos tóxicos, esta bacteria puede permanecer por décadas en un estado de dormancia, de esta manera el huésped está infectado, pero no presenta el cuadro clínico característico. Además se ha observado que cuando la bacteria entra en estado de dormancia suele ser resistente a los diferentes antibióticos comúnmente empleados (Colston, Cox, Ratledge, & Dale, 1999; S. H. Kaufmann, 2000; Kumar, Cotran, & Robbins, 2008; Torrelles & Schlesinger, 2017).

Cuando el hospedero infectado se encuentra inmunodeprimido, se proporciona un ambiente ideal para que el bacilo entre en replicación. En pacientes inmunocompetentes la enfermedad puede avanzar a la licuefacción de tejidos y con el tiempo los sitios necróticos incrementan su tamaño hasta que la pared del granuloma se rompe, por lo tanto el material licuado y los bacilos se dispersan hasta depositarse en otros órganos y tejidos del

hospedero así como liberarse al medio ambiente (Dannenberg Jr & Rook, 1994; Torrelles & Schlesinger, 2017).

B Mycobacterium tuberculosis

M. tuberculosis es un bacilo aerobio no esporulado, que reside principalmente en el fagolisosoma de los macrófagos alveolares del hospedero, es ligeramente curvo, no móvil y mide de 0.2 a 0.6 μm de ancho, presenta una longitud de 1.0 a 10 μm (Fig. 1), pero sí posee una estructura inusual de la pared celular la cual además de estar formada por peptidoglicano contiene arabinogalactana, colesterol, lipoarabinomanana y ácidos micólicos (Haley, 2017; Wayne, 1974).

Debido a su alto contenido en lípidos, la superficie celular de la micobacteria es hidrofóbica, por lo que resulta difícil de teñir con los colorantes de uso común. Debido a lo anterior, para teñir a la micobacteria se utiliza la tinción de Ziehl-Neelsen. Las micobacterias resisten la decoloración con alcohol ácido, propiedad por la cual se les denomina bacilos ácido-alcohol resistentes (Brock & Michael, 1993).

Los mecanismos por los cuales *M. tuberculosis* produce la enfermedad en los humanos todavía no han sido totalmente dilucidados; algunos componentes de la pared celular de *M. tuberculosis* se han considerado como posibles factores de virulencia, como por ejemplo: el factor cordón conocido como dimicolato de trehalosa, sulfolípidos, el cual intensifica la toxicidad del efecto cordón, y los micósidos de superficie específicos de la especie (glucolípidos y glucopéptidos) que aparentemente le confieren protección contra el ambiente intracelular (Brock & Michael, 1993).

1. Características de la envoltura

La envoltura de *M. tuberculosis* es una estructura compleja, constituida por capsula, pared celular y membrana plasmática (Brennan, 2003).

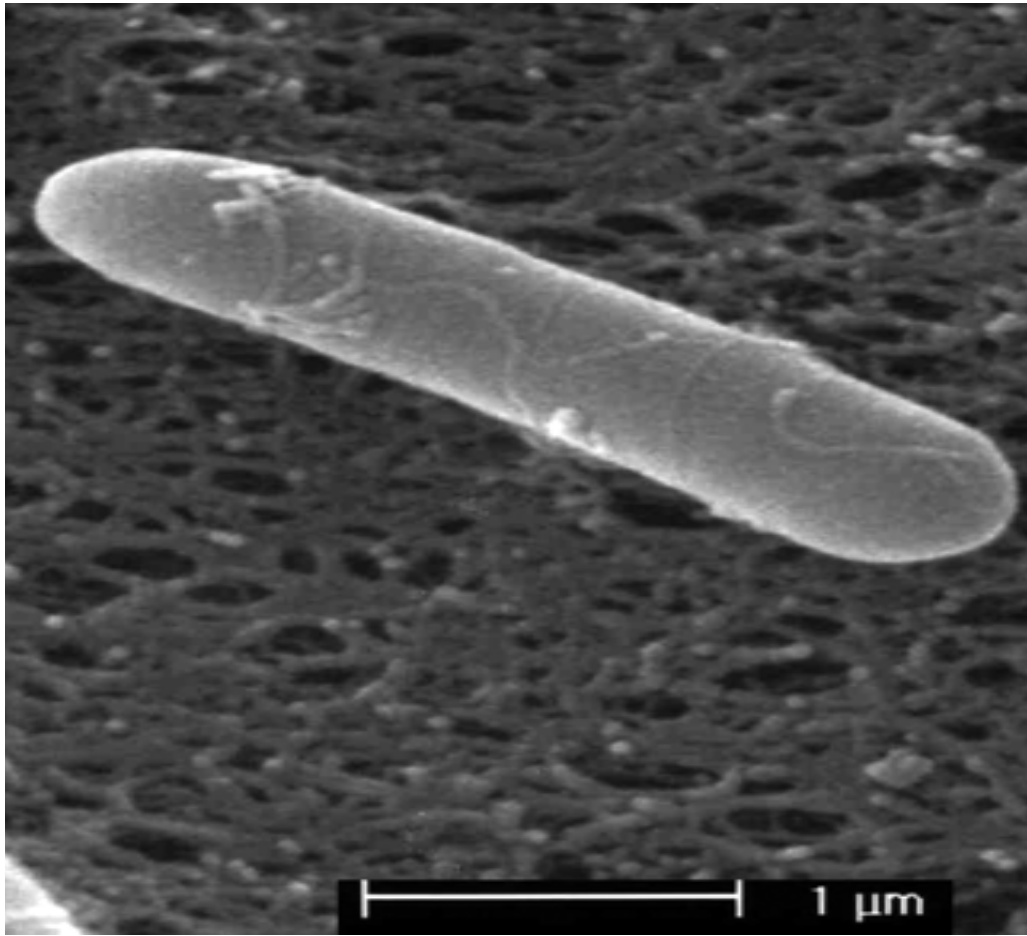


Figura 3. Morfología de *M. tuberculosis*. Es un bacilo aerobio no esporulado, es ligeramente curvo, no móvil y mide de 0.2 a 0.6 μm de ancho, presenta una longitud de 1.0 a 10 μm. Tomado de Brennan (2003)

1. **Capsula:** es la capa externa de la envoltura de las micobacterias y sirve de protección contra múltiples factores externos. Por tanto, tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmunológica. Sus características y composición varían en las diferentes especies y cepas de micobacterias. entre las principales componentes se encuentran el ácido micólico y glicolípidos, antigénicas de la bacteria (Britton, Roche, & Winter, 1994; Gorocica, Jiménez-Martínez, Garfias, Sada, & Lascurain, 2005).
2. **Pared celular:** la pared micobacteriana se localiza por debajo de la capsula separada por un espacio periplasmico que, posee un elevado contenido en lípidos (50-60%) que le confiere un carácter hidrofóbico y la hace refractaria al ataque por hidrolisis enzimática. Es una efectiva barrera frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales y está constituida por el complejo macromolecular formado por acuosos micólicos arabinogalactano, peptidoglicano (mAGP) (Crick, Mahapatra, & Brennan, 2001; Draper, 1998).
3. **Membrana plasmática:** tiene la características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados, dando lugar a las moléculas como la lipoarabinomanana (LAM), la cual junto con proteínas micobacteriales y moléculas de fosfatidilinositol se encuentran anclados en la membrana plasmática. LAM posee un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad y tiene relación fundamental con los polisacáridos O antígenos presentes en otras bacterias (Brennan, 2003; P. Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2015).

Los componentes mayoritarios de la envoltura de las micobacterias son lípidos asociados a carbohidratos (glicolípidos), fosfolípidos glicosilados o carbohidratos complejos sustituidos con ácido micólico o péptidos. Las porciones glicosiladas de estas moléculas son importantes en la interacción con los componentes de la respuesta inmune innata y específica del hospedero. En las células eucariotas los glicolípidos, participan en

mecanismos de comunicación celular, pero en los microorganismos se les considera factores de virulencia. Se estima que el 25% del peso seco de las micobacterias corresponde a lípidos o glicolípidos; el 40% de ellos son moléculas de ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa, que es un disacárido de α -D-glucosa formado por residuos de α -D-gluco-piranosil (1-1)- α -glucopiranososa. La trehalosa es un antígeno presente en numerosas moléculas de micobacterias y existen varias moléculas que contienen este disacárido, las cuales se clasifican en micolatos de trehalosa y sulfolípidos de trehalosa.(Ehlers & Daffé, 1998; Schabbing, Garcia, & Hunter, 1994).

a) Factor cuerda (trehalosa 6,6-dimicolato)

Molécula mixta que se encuentra en la capa periférica de la envoltura. Es abundante en todas las micobacterias patógenas. Recibe ese nombre porque en los cultivos, los microorganismos forman agregados semejantes a cordones. Esta molécula presenta pequeñas variaciones en ciertos grupos químicos, las que son características en las diversas especies de micobacterias y cepas. El factor cuerda está formado por un complejo de tres macromoléculas: peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y micolatos. En condiciones normales, el factor cuerda estimula la actividad de la enzima que hidroliza al dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADasa) en el hospedero, lo que trae como consecuencia la disminución en la cantidad de la coenzima NAD. Esta coenzima es común en las reacciones catabólicas de óxido-reducción, y la ausencia de NAD interrumpe la cadena respiratoria en la mitocondria de las células. El factor cuerda es inmunogénico y se ha intentado usarlo en la prevención de la tuberculosis; además, su naturaleza química favorece la inflamación crónica y ocasiona la formación de granulomas en el pulmón (Gorocica, Jiménez-Martínez, Garfias, Sada, & Lascurain, 2005; Vergne & Daffé, 1998).

2. Principales tipos de estrés que enfrenta *M. tuberculosis* en el momento de infección

La destreza de microorganismos patógenos para soportar el estrés ambiental tanto fuera como dentro del hospedero, juega un papel crítico para determinar su éxito como patógeno (Bodmer, Miltner, & Bermudez, 2000). A continuación se presentan los principales tipos de estrés que la micobacteria enfrenta durante la infección.

a) Exposición a agentes oxidantes

El primer estrés al que se ve enfrentada la bacteria es la exposición a agentes oxidantes. Los macrófagos activos producen intermediarios de nitrógeno (RNI) y de oxígeno reactivos (ROI) (Manganelli, Dubnau, Tyagi, Kramer, & Smith, 1999). El término RNI se refiere a los estados oxidados y a los productos de nitrógeno de la sintasa de óxido nítrico, que incluyen desde el óxido nítrico (NO) a nitrato (NO₃) y que se encuentran en ambientes fisiológicos. Estos intermediarios incluyen NO⁻, NO₂, NO₂⁻, N₂O₃, N₂O₄, s-nitrosotioles, peroxinitrito (OONO), y complejos de hierro-dinitrosil. Los ROI son los productos intermediarios de la reducción del O₂ hasta llegar al agua, como son el superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales hidroxilo (OH⁻) y productos reactivos de éstos con haluros y aminas (Nathan & Shiloh, 2000)

Resistir los efectos del estrés oxidativo y nitrosativo es un proceso crítico para el establecimiento y mantenimiento de la infección por parte de patógenos como *M. tuberculosis*.

Los ROIs y RNIs pueden dañar las bases del ADN, lípidos y varios motivos químicos, tales como los grupos de Fe-S, grupos heme, metales de transición, entre otros (Nathan & Shiloh, 2000; Zahrt & Deretic, 2002). El daño provocado por los ROIs y RNIs conlleva a una inhibición general del metabolismo celular, alterando los procesos asociados con el transporte activo dependiente de protones, utilización de oxígeno y de la fosforilación oxidativa (Zahrt & Deretic, 2002).

b) Exposición a pH ácidos

El segundo tipo de estrés es la exposición a pH ácido. El bloqueo que la micobacteria hace a la acidificación del fagosoma no es completo y éstos empiezan a acidificarse rápidamente después de la fagocitosis; por lo tanto, se presenta un descenso en el pH (Manganelli, Proveddi, Rodrigue, Beaucher, Gaudreau, & Smith, 2004). Si los bacilos están viables, el pH desciende por debajo de 6, aunque luego puede aumentar a 6.5 después de varias horas. Esta acidificación se puede ver como una señal que usa la micobacteria para inducir la expresión de genes que se necesitan para alterar la maduración del fagosoma (Fisher, Plikaytis, & Shinnick, 2002). Sin embargo, un ambiente ácido es una de las condiciones más estresantes que encuentran las células vivientes, ya que para que funcionen normalmente sus proteínas y enzimas, la bacteria debe mantener un pH interno cercano a 7 (Piddington, Kashkouli, & Buchmeier, 2000).

Los genes que se expresan bajo condiciones ácidas juegan un papel en la patogénesis de la tuberculosis permitiendo su adaptación y supervivencia dentro de fagosomas y en la parte interior de las lesiones granulomatosas, que también pueden tener un pH ácido (Saviola, Woolwine, & Bishai, 2003).

Las bacterias Gram positivas pueden presentar varios mecanismos de resistencia a pH ácido. Una combinación de estrategias constitutivas e inducibles que resultan en la remoción de protones (H^+), alcalinización del ambiente externo, cambios en la composición de la pared celular, producción de proteínas de choque general y chaperonas, expresión de reguladores transcripcionales, y respuestas a cambios en la densidad celular, pueden contribuir a la supervivencia (Cotter & Hill, 2003).

c) Alteración en las estructuras de la superficie celular

El tercer tipo de estrés enfrentado es el daño en estructuras de superficie debido a la acción de múltiples respuestas por parte del hospedero (Manganelli, Proveddi, Rodrigue, Beaucher, Gaudreau, & Smith, 2004). Los macrófagos y las células asesinas naturales (NK), por ejemplo, secretan

péptidos tóxicos y proteínas que actúan en la superficie de la micobacteria hidrolizando enlaces de moléculas que permiten la estabilidad de la pared y membrana celular.

Los macrófagos también pueden secretar ácidos grasos libres (AGL) tóxicos para la bacteria dentro del fagosoma y al exterior del mismo (Manganelli, Proveddi, Rodrigue, Beaucher, Gaudreau, & Smith, 2004).

Los AGL cumplen un papel sinérgico con los RNIs en donde los FFA insertan sus motivos no polares en la bicapa lipídica de la membrana celular, causando cambios en la permeabilidad e inactivación de enzimas respiratorias. Los AGL median cambios en las funciones de la membrana, lo cual lleva a una amplificación de la actividad de los RNIs que causan la inactivación de las metaloenzimas bacterianas e inhiben la síntesis de ADN (Akaki, Tomioka, Shimizu, Dekio, & Sato, 2000).

Surfactantes alveolares pueden tener un papel de detergentes con actividad antibacterial (Manganelli, et al. 2004). Los linfocitos T V γ 9/V δ 2 pueden destruir eficientemente a las micobacterias intra y extracelularmente por medio de moléculas citotóxicas como la granulicina y las perforinas (Dieli, Troye-Blomberg, Ivanyi, Fournié, Krensky, Bonneville, et al., 2001).

d) Hipoxia

El cuarto estrés que experimenta la bacteria dentro del granuloma y fagosoma es la hipoxia. *In vivo*, la cantidad de bacilos en una lesión generalmente se correlaciona con el grado de oxígeno presente; esto sugiere que la disponibilidad de oxígeno puede limitar el crecimiento de la micobacteria durante la infección (Park, Guinn, Harrell, Liao, Voskuil, Tompa, et al., 2003). La disminución de oxígeno es una condición que se cree puede ser el mejor candidato para la inducción de genes que se expresan en la persistencia de la micobacteria (Manganelli, Proveddi, Rodrigue, Beaucher, Gaudreau, & Smith, 2004).

La adaptación de la micobacteria frente a la hipoxia dentro del hospedero es un hecho. Dicha adaptación parece ser un paso clave en la persistencia del microorganismo e involucra la acción de varios genes

concomitantemente (Bagchi, Das, & Tyagi, 2002). Esta adaptación es una actividad coordinada a muchos niveles y una rápida alteración puede llevar a la muerte celular.

Bajo condiciones de microaerofilia e hipoxia, la micobacteria sufre cambios a nivel molecular, metabólico, estructural y fisiológico. Uno de ellos es la pérdida de la característica de ser alcohol resistente. Adicionalmente, se produce un engrosamiento de la pared celular, posiblemente este engrosamiento ayude a la micobacteria a sobrevivir bajo condiciones de hipoxia *in vivo*; puede servir como escudo que ofrece protección contra el ambiente hostil y las condiciones tóxicas encontradas en el granuloma (Cunningham & Spreadbury, 1998). Las condiciones de hipoxia también alteran la resistencia a medicamentos antituberculosas convencionales y la sensibilidad a metronidazol.

e) Ausencia de nutrientes

El quinto estrés es la inanición de elementos esenciales (Manganelli, Proveddi, Rodrigue, Beaucher, Gaudreau, & Smith, 2004).

Este se presenta en forma de supresión de aminoácidos, carbohidratos y micronutrientes; Este episodio coincide con la formación de los granulomas (Primm, Andersen, Mizrahi, Avarbock, Rubin, & Barry, 2000).

Algunas especulaciones han centrado el papel del metabolismo de lípidos en mantener la viabilidad de la micobacteria en la ausencia de un crecimiento robusto por la falta de substrato. Bajo esta aproximación, conocida ésta como la hipótesis lipolítica, se cree que el ambiente caseoso intragranular es rico en lípidos y la micobacteria presenta un conjunto de enzimas para utilizar los lípidos como la fuente primaria de carbono (STea Cole, Brosch, Parkhill, Garnier, Churcher, Harris, et al., 1998; Primm, Andersen, Mizrahi, Avarbock, Rubin, & Barry, 2000).

Para que la micobacteria se pueda adaptar a la disminución de nutrientes, ésta debe utilizar una variedad de mecanismos de control transcripcional. En algunos casos, la expresión de genes específicos es controlada por factores sigma alternativos como sigF o sigB. Adicional a esto,

algunos microorganismos, entre ellos *M. tuberculosis*, traducen la inanición de nutrientes en la acumulación de nucleótidos hiperfosforilados de guanina (p) ppGpp. Esto conduce a alteraciones en la expresión de genes que suprimen la síntesis de especies de ARN estables (ARNr, ARNt), induce vías degradativas, activa ciertos genes de fase estacionaria, y modula genes que regulan la replicación del ADN y la tasa de crecimiento (Primm, Andersen, Mizrahi, Avarbock, Rubin, & Barry, 2000).

3. Mecanismos de evasión de *M. tuberculosis*

Después de la infección producida por *M. tuberculosis*, en el hospedero se desencadenan mecanismos de defensa que en ocasiones logran eliminar a las bacterias o solo las inactivan aislándolas del tejido sano en los granulomas. Esta morfología que adoptan en el pulmón se debe al ataque masivo con la ayuda de radicales tóxicos de los macrófagos, células dendríticas y neutrófilos que llegan al sitio de infección con el afán de matar a la bacteria pero al mismo tiempo necrosan el tejido sano (Henderson, Watkins, & Flynn, 1997; Hertz, Kiertscher, Godowski, Bouis, Norgard, Roth, *et al.*, 2001; Tufariello, Chan, & Flynn, 2003).

La lipoarabinomanana (LAM) es un constituyente de la membrana del patógeno que es un factor de virulencia por su interacción con el sistema inmunológico del hospedero. La LAM estimula la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por fagocitos mononucleares e inhibe la producción de interferón gamma (IFN- γ) (M.D. Rossman & MacGregor, 1996).

La citocina más importante para combatir la infección causada por *M. tuberculosis* es el IFN- γ secretado por las células TCD4+ cuando son estimuladas por células presentadoras de antígenos o vía receptores tipo toll (TLR) presentes en macrófagos, neutrófilos o células dendríticas, sin embargo existen reportes que demuestran que *M. tuberculosis* evade los mecanismos escondiendo sus antígenos de membrana (manosa y lipoarabinomanana), por lo tanto el TLR-2 no reconoce a la micobacteria, sin embargo estos mismos antígenos inhiben la expresión del HLA clase II dentro del fagosoma y atenúan la producción de IFN- γ , además, otros autores mencionan la importancia de

las interleucinas 12 y 10 para el reclutamiento así como el TNF- α (Caruso, Serbina, Klein, Triebold, Bloom, & Flynn, 1999; Cooper, Pearl, Brooks, Ehlers, & Orme, 2000; MacMicking, North, LaCourse, Mudgett, Shah, & Nathan, 1997; Selwyn, Hartel, Lewis, Schoenbaum, Vermund, Klein, et al., 1989; Tascon, Stavropoulos, Lukacs, & Colston, 1998; Tufariello, Chan, & Flynn, 2003).

En otro contexto, existen reportes sobre la supervivencia a los radicales libres de *M. tuberculosis* en el granuloma, esta bacteria posee genes y enzimas que oxidan estos radicales, entre ellos se encuentran los genes *noxR*, *ahcB*, *msrA* y *glbN*, dichos genes actúan como enzimas que desintoxican a la *M. tuberculosis* generando su supervivencia (Beckman & Koppenol, 1996; Bryk, Griffin, & Nathan, 2000; St John, Brot, Ruan, Erdjument-Bromage, Tempst, Weissbach, et al., 2001; Tufariello, Chan, & Flynn, 2003; Yu, Mitchell, Xing, Magliozzo, Bloom, & Chan, 1999).

Se sabe que tanto los macrófagos como los neutrófilos internalizan a la bacteria por medio de fagocitosis, una vez dentro de la célula esta se encuentra dentro de un fagosoma temprano, posteriormente este fagosoma se fusiona al lisosoma por medio de un polialcohol de membrana llamado fosfatidilinositol-3-(OH) o hvp534 el cual debe de ser degradado por la acción de otra proteína llamada EEA1 y además debe de ser reconocido por el complejo de sensores llamados N-etilmaleimida, SNAREs y GTPasas, explicado dicho mecanismo *M. tuberculosis* tiene la capacidad de inhibir la acción de EEA1 sobre el fosfatidilinositol-3-(OH) el cual es mediado por lipoarabinomannano y manosa evitando la fusión del fagosoma con el lisosoma (Clemens, Lee, & Horwitz, 2000a, 2000b; Christoforidis, Miaczynska, Ashman, Wilm, Zhao, Yip, et al., 1999; Fratti, Backer, Gruenberg, Corvera, & Deretic, 2001; Fratti, Chua, Vergne, & Deretic, 2003; Hay, 2001; Joglekar & Hay, 2005; Pelham, 2001; Tufariello, Chan, & Flynn, 2003).

Otro mecanismo por el cual la micobacteria escapa del endosoma es por medio de una proteína llamada TACO, existen reportes que muestran que esta proteína evita la fusión del fagosoma con el lisosoma, sin embargo no se cuentan los mecanismos exactos de cómo esta proteína inhibe la fusión y además, existe controversia con otros autores donde mencionan que TACO

no es indispensable para la supervivencia de *M. tuberculosis* (Abuhammad, 2016; Tufariello, Chan, & Flynn, 2003).

Antes de que se conociera el genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv, Collins en 1996 describió 3 posibles factores de virulencia; catalasa peroxidasa, que protege a la micobacteria de la producción de los reactivos intermediarios del oxígeno dentro del fagocito; gen *mce*, que codifica para un factor de colonización de macrófagos, y el gen del factor sigma A (*sigA*) cuya mutación puede inducir la atenuación de cepas virulentas (STea Cole, *et al.*, 1998).

Posteriormente, cuando finalmente se conoce el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, se encontraron otra serie de genes de virulencia que codificaban para la fosfolipasa C, lipasas y estereasas, que pudieran actuar como factores de virulencia, ya que se piensa que dañan las membranas vacuolares y celulares de los macrófagos. También se encontró el homólogo del gen *smpB*, la cual se ha relacionado con la supervivencia intracelular de otras bacterias (STea Cole, *et al.*, 1998).

Un 10% del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv codifica para proteínas que pertenecen a dos familias diferentes ricas en glicina y prolina llamadas PE y PPE, las cuales contienen secuencias repetidas denominadas secuencias polimórficas de GC, al ser estructuras altamente repetidas se ha considerado que representan una fuente de variación antigénica y por consiguiente un factor de virulencia (STea Cole, *et al.*, 1998).

C Morfología del alveolo pulmonar

M. tuberculosis penetra al organismo a través de las vías respiratorias. El sistema respiratorio está conformado por la nariz, boca, faringe, laringe, tráquea, bronquios y pulmones, en estos últimos es donde se deposita la micobacteria y podría iniciar su replicación. La micobacteria es inhalada y posteriormente llega a los sacos alveolares, los cuales están conformados por alveolos individuales cuya función principal es realizar el intercambio de oxígeno-dióxido de carbono (Fig. 4). El alveolo está constituido por una membrana respiratoria, células alveolares tipo I y II, macrófagos alveolares,

fibra elástica y reticular (Fig. 5). Las células alveolares tipo II son las encargadas de secretar un líquido alveolar llamada surfactante pulmonar (Tortora & Derrickson, 2014).

1. Surfactante pulmonar

El surfactante pulmonar es una mezcla de lípidos y proteínas que reduce de forma significativa la tensión superficial dentro del alvéolo pulmonar, previniendo el colapso durante la espiración, además de defender al hospedero de lo que pudiera invadir a estos órganos. El surfactante es producido en las células alveolares tipo II. Es ensamblado y almacenado en los cuerpos lamelares y éstos son transportados por exocitosis a la capa líquida del alvéolo y forma la estructura llamada mielina tubular, que es la principal fuente de la monocapa, que permite que los grupos acil-grasos hidrofóbicos de los fosfolípidos se extiendan hacia el aire mientras que las cabezas polares hidrofílicas lo hagan hacia el agua. Esta monocapa de surfactante disminuye la tensión superficial en la interfaz aire-líquido reemplazando el agua en la superficie. (Ferguson & Schlesinger, 2000; Schmitz & Müller, 1991; Susilovic-Grabovac, Banfi, Brusoni, Mapelli, Ghilardi, Obad, et al., 2017).

El surfactante pulmonar está compuesto en un 80% de fosfolípidos, 8% de lípidos neutrales y 12% de proteínas. La clase predominante de fosfolípidos es el dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (Fig. 6). además de fosfatidilcolina insaturada, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol.

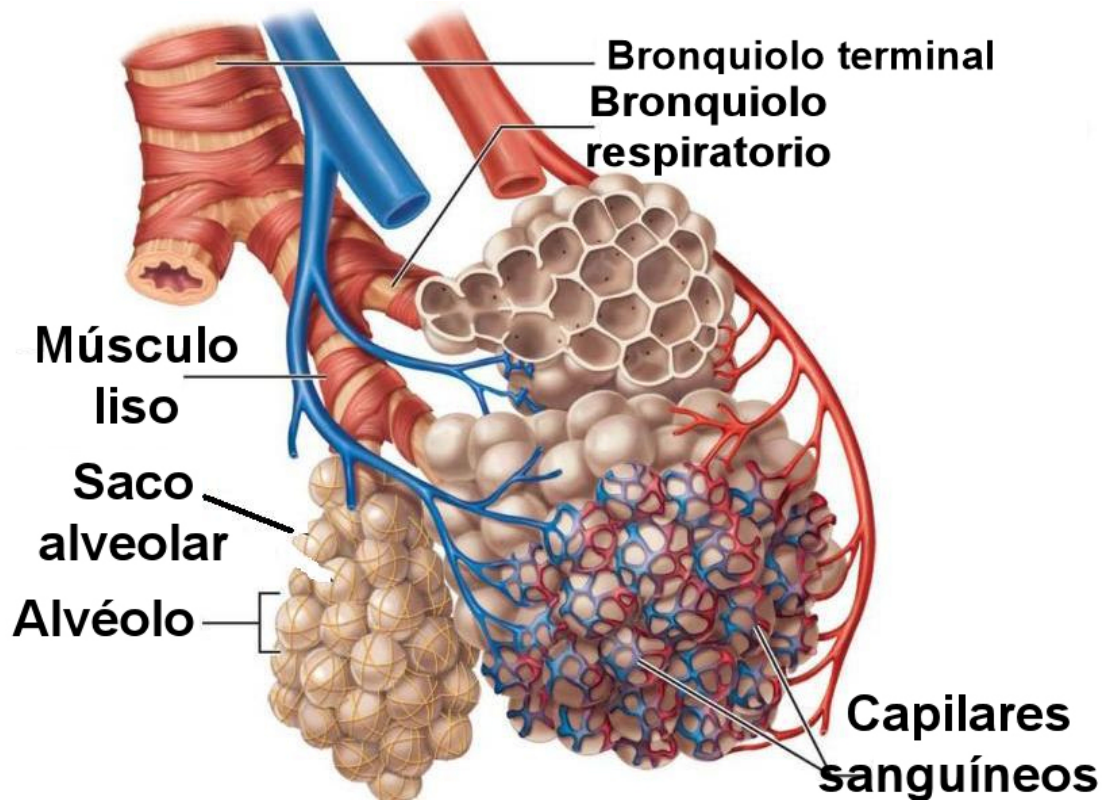


Figura 4. Morfología del saco alveolar. En el pulmón tiene alrededor de 3000 sacos alveolares, cada saco tiene aproximadamente 50 alveolos, por lo tanto hay aproximadamente 150,000 alveolos en el pulmón. Tomado de Tortora and Derrickson (2014).

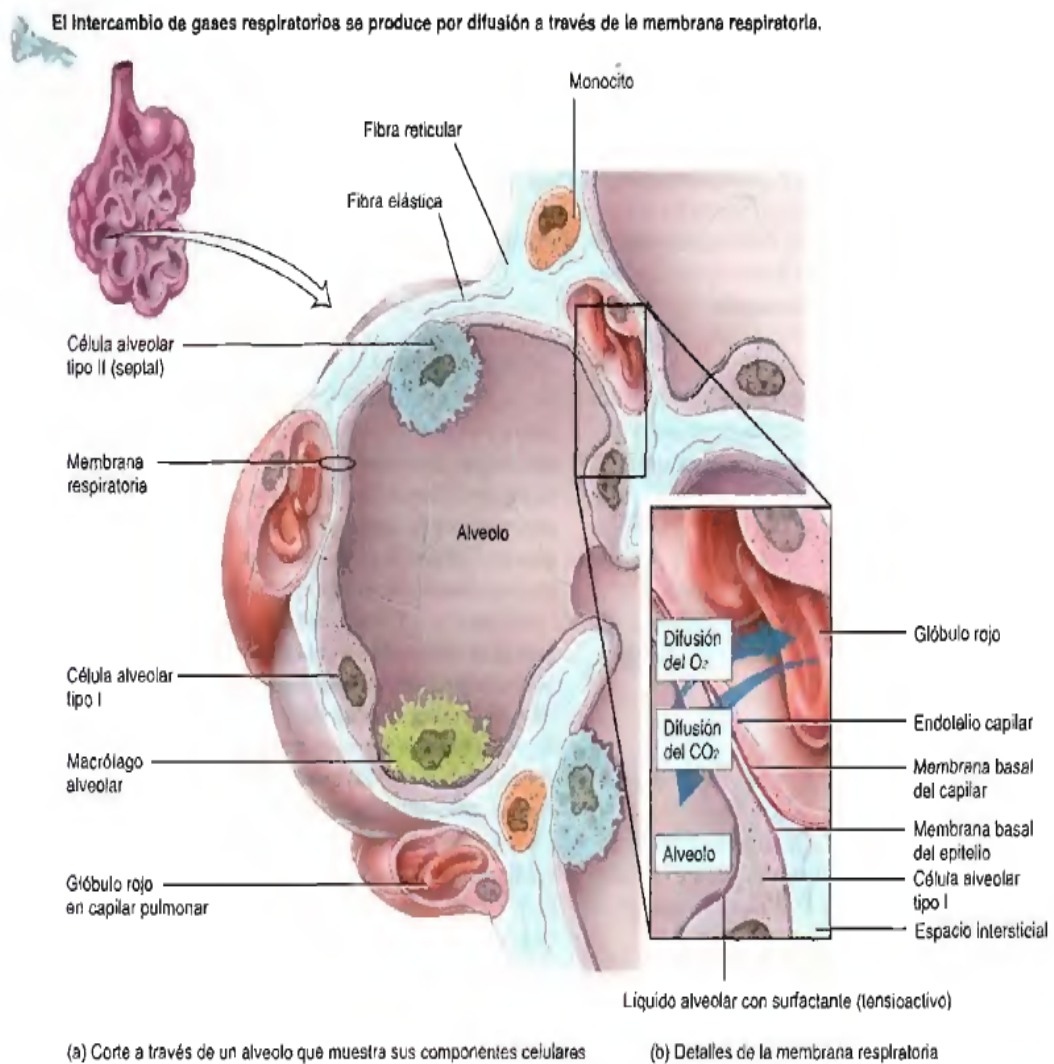


Figura 5. Morfología del alveolo pulmonar. El alveolo está conformado por una capa de surfactante pulmonar, una capa de fibra elástica y reticular. El surfactante pulmonar es secretado por las células alveolares tipo II. Tomado de Tortora and Derrickson (2014).

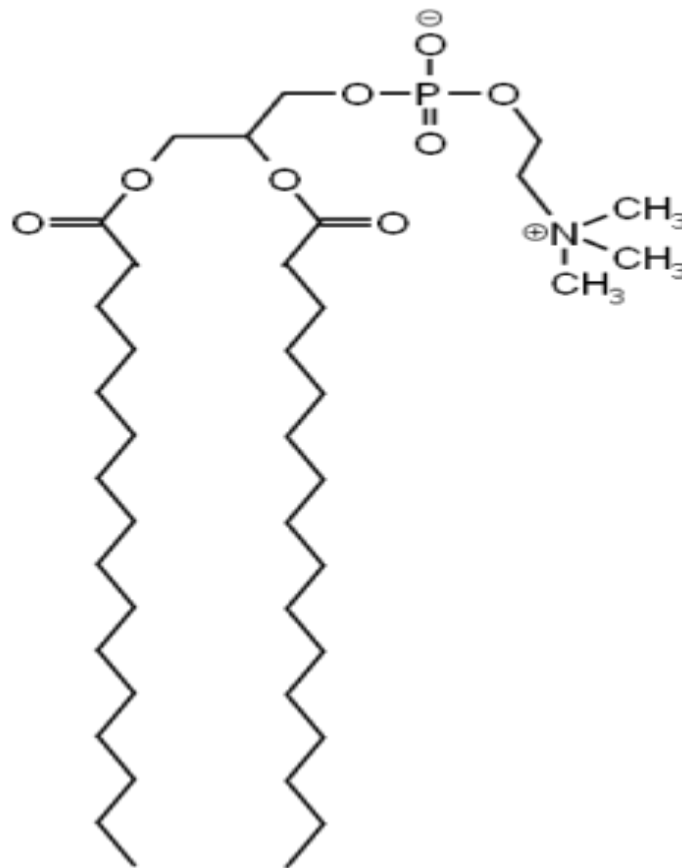


Figura 6. Molécula del DPPC. La estructura del DPPC está compuesta por 2 cadenas de ácido palmítico, un grupo fosfato y una base nitrogenada llamada colina. Tomado de STea Cole, et al. (1998)

De todos ellos, el principal agente responsable de reducir de la tensión superficial, además de proporcionar estabilidad alveolar es el DPPC, pero requiere de las proteínas surfactantes y otros lípidos para facilitar su adsorción en la interfase aire-líquido. Las proteínas surfactantes son cuatro: SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. SP-A y SP-D son hidrofílicas y SP-B y SP-C son hidrofóbicas. SP-A tiene una función regulatoria en la formación de la monocapa que reduce la tensión de superficie. Las proteínas hidrofóbicas son necesarias para mejorar la extensión de los fosfolípidos en los espacios aéreos. SP-B promueve la adsorción de los fosfolípidos e induce la inserción de ellos dentro de la monocapa. SP-C estimula la inserción de los fosfolípidos y puede incrementar la resistencia del surfactante a la inhibición por proteínas séricas y líquido pulmonar (Brandsma & Postle, 2017; Johansson & Curstedt, 1997; Susilovic-Grabovac, et al., 2017).

Además, las proteínas SP-A y SP-D desempeñan un papel importante en la defensa contra patógenos inhalados. Éstas moléculas pertenecen a la familia de las colectinas, la primera es una proteína de 28-36 kDa que facilita la fagocitosis a través de la opsonización de los microorganismos. La proteína SP-D tiene un peso de 43 kDa, e induce la producción de radicales libres de oxígeno en macrófagos alveolares y la estimulación de la migración de polimorfonucleares y monocitos. (Shepherd & Lopez, 2001).

D Genética de *M. tuberculosis*.

El genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv es de 4.41 Mb, está conformado aproximadamente por 4,000 genes, del 52% de ellos se tiene conocimiento acerca de su función de acuerdo a la homología que existe con otros microorganismos, del 48% restante se desconoce su función, sin embargo se sabe que estos genes están altamente conservados entre diferentes especies de micobacterias (Camus, Pryor, Médigue, & Cole, 2002; STea Cole, et al., 1998).

Existen cerca de 250 genes involucrados en el metabolismo de lípidos y policetonas, aproximadamente el 10 % del genoma codifica para dos familias de proteínas no homólogas entre sí, las cuales son ricas en glicina-

ácido glutámico (PE) o en prolina-ácido glutámico (PPE). Se ha observado que una mutación dentro de estas secuencias disminuye la sobrevivencia de los bacilos en los granulomas (STea Cole, et al., 1998; Ramakrishnan, Federspiel, & Falkow, 2000).

Estudios genéticos han demostrado la existencia de genes relacionados con factores de virulencia de *M. tuberculosis*, en dichos genes se han encontrado cuatro copias del operón *mce* (*Mycobacterium cell entry*). La inactivación del gen *mceA1* se asocia a una disminución de la capacidad invasiva a células epiteliales, atribuyéndole así un factor de virulencia más a esta bacteria (Brodin, Majlessi, Marsollier, de Jonge, Bottai, Demangel, et al., 2006; ST Cole, Eiglmeier, Parkhill, James, Thomson, Wheeler, et al., 2001; Flesselles, Anand, Remani, Loosmore, & Klein, 1999).

Algunos estudios han demostrado la capacidad de *M. tuberculosis* para sobrevivir en el ambiente hipóxico que proporciona el granuloma producido por los macrófagos y neutrófilos del hospedero, esta capacidad está inducida por el sistema operón Dos (siglas en inglés "Dormancy survival"), el operón está conformado por una proteína reguladora DosR, y dos proteínas sensoriales DosS y DosT (Fig. 7 y 8), estas dos últimas son proteínas de membrana que reconocerán el oxígeno libre en el ambiente por medio de un hierro unido a una histidina, si este grupo funcional deja de recibir señales de oxígeno, la proteína se autofosforila en la parte interna y actúa como una quinasa donando un grupo fosfato a la proteína DosR. Ésta actuará como un operón y se unirá al sitio operador del ADN que en conjunto con el factor sigma B y ARN polimerasa traducen aproximadamente 48 genes (Fig. 9). Cabe mencionar que el complejo Dos también reconoce radicales libres de óxido nítrico y monóxido de carbono (Kaur, Kumari, Sharma, Sehgal, & Tyagi, 2016; D. R. Sherman, Sabo, Hickey, Arain, Mahairas, Yuan, et al., 1995; Sivaramakrishnan & de Montellano, 2013; Storz & Imlay, 1999).

En la década pasada se identificó el gen *hspX*, el cual codifica para una proteína llamada α -cristalina y es regulado por el operón *DosR*. Este gen se expresa cuando existe un ambiente hipóxico e inanición, produciendo

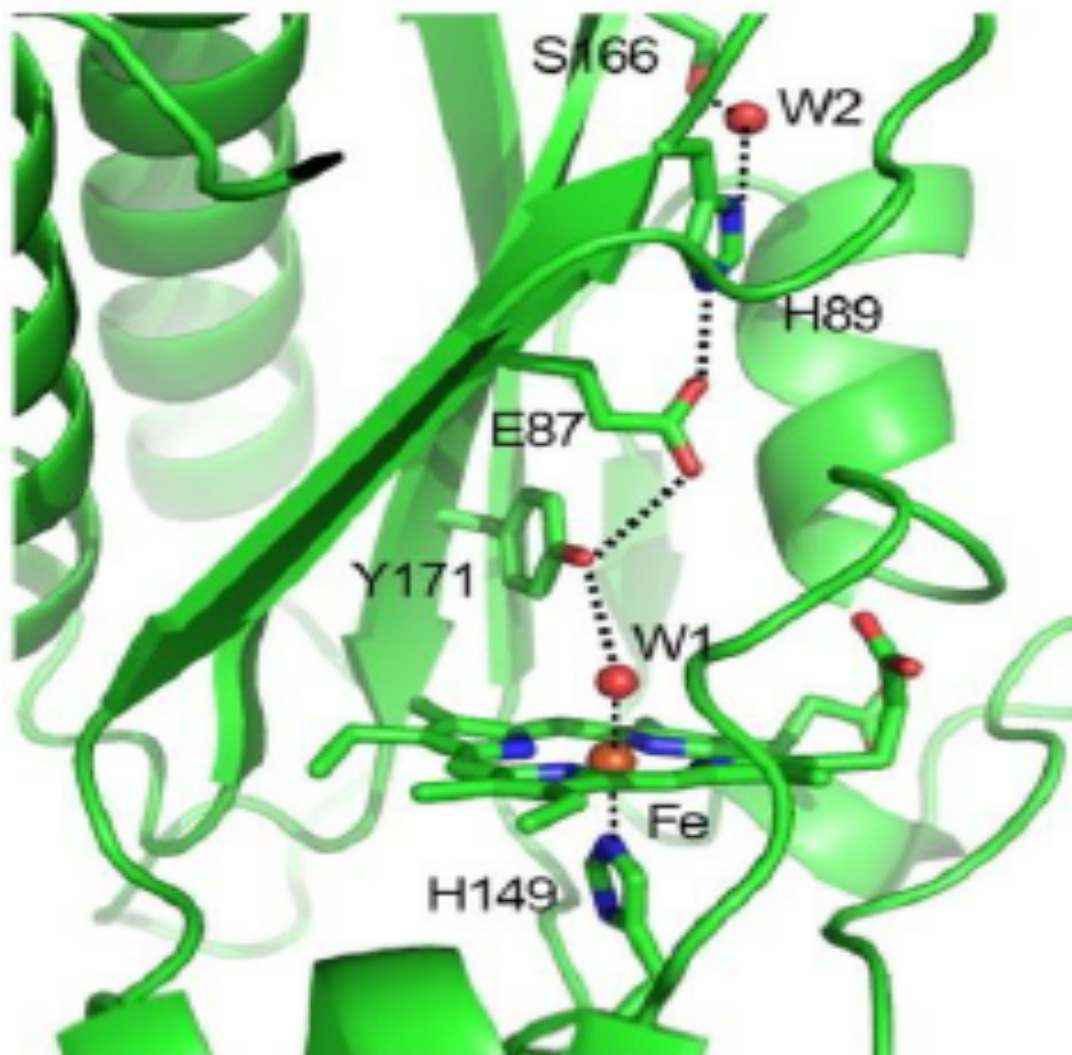


Figura 7. Estructura tridimensional de sitio de reconocimiento de la proteína DosS. La proteína está conformada por un grupo prostético hierro el cual está unido a histidina 149 y triptófano 1, Tomado de Sivaramakrishnan and de Montellano (2013).

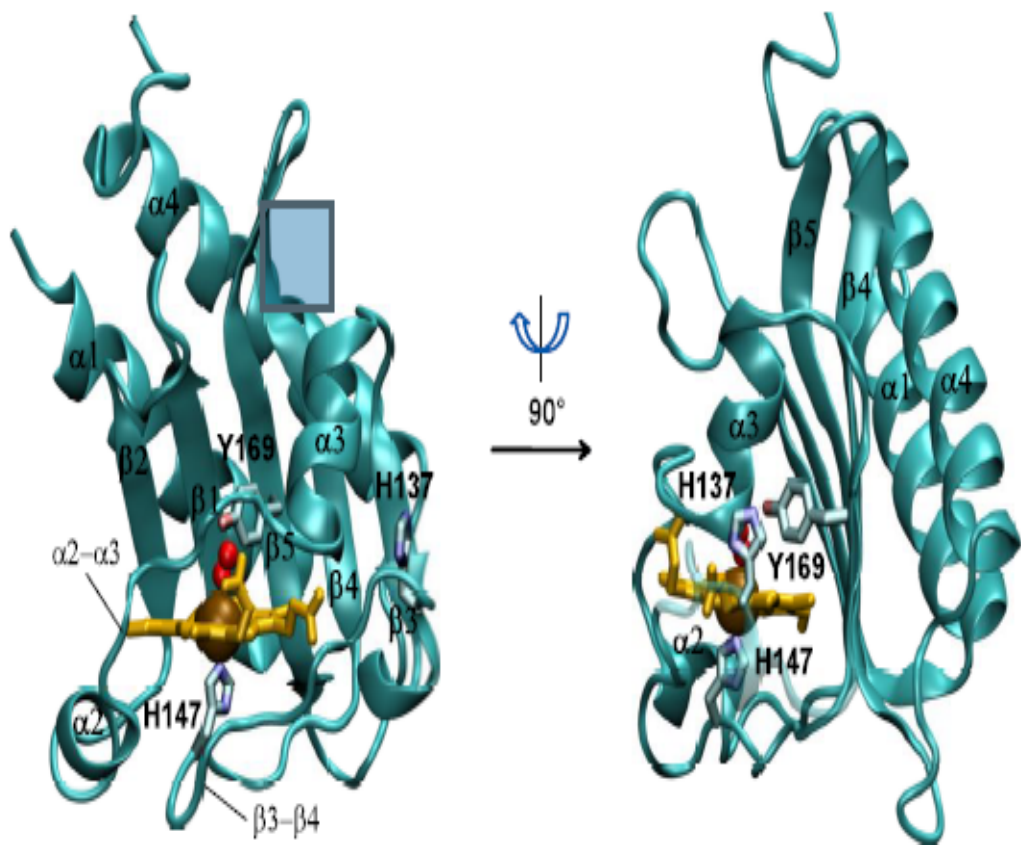


Figura 8. Estructura tridimensional del sitio de activación de la proteína DosT. La proteína está conformada por el grupo prostético hierro unido a los aminoácidos histidina 147 e histidina 137 Tomado de Sivaramakrishnan and de Montellano (2013).

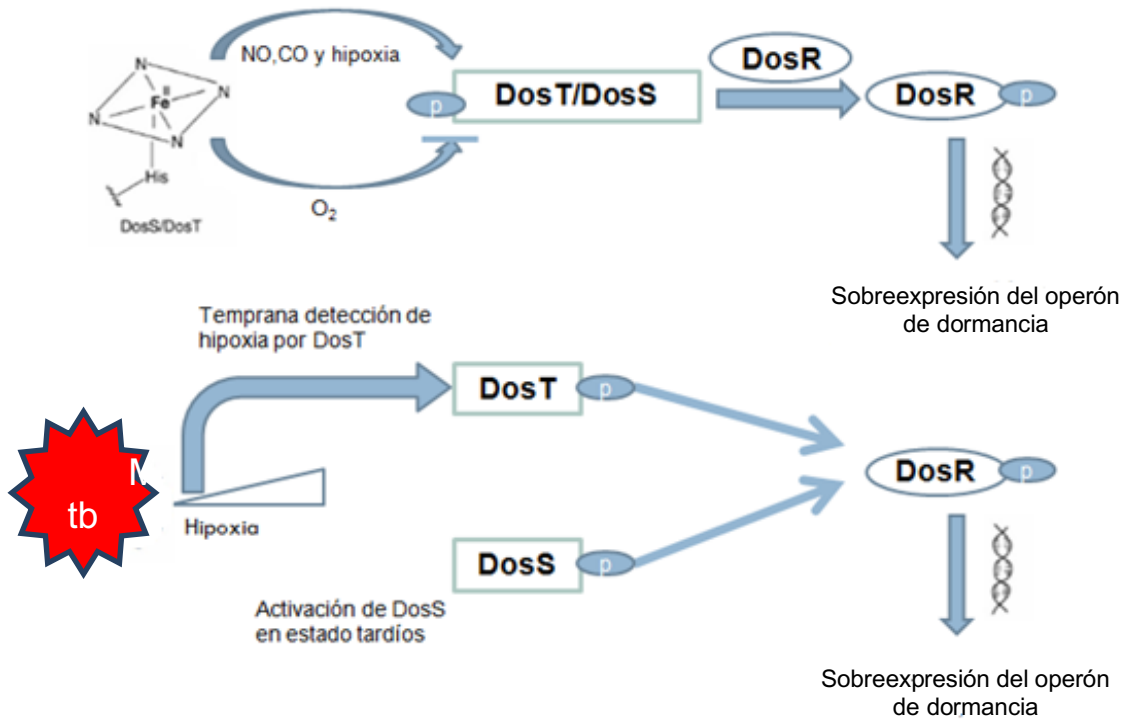


Figura 9. Vía de señalización del sistema Dos. La micobacteria reconocerá las bajas concentraciones de oxígeno del granuloma por DosT y por DosS, estos se autofosforilarán y fosforilarán a DosR, esta se unirá al operador de la región promotora y sobreexpresará aproximadamente 72 genes. Modificado de Sivaramakrishnan and de Montellano (2013).

el estado de dormancia de la bacteria. Una mutación en este gen provoca que *M. tuberculosis* entre en un estado de replicación logarítmico perdiendo así su estado inactivo (David R Sherman, Voskuil, Schnappinger, Liao, Harrell, & Schoolnik, 2001). Se determinó que en condiciones de hipoxia genes *hspX*, *ahpC*, *narX*, *narK2*, *ctpF*, *fdxA*, *pfkB*, *bfrB*, *glpQ1* entre otros genes de origen desconocido se encuentran desregulados (Park, et al., 2003).

Diversos autores han demostrado que el gen *hspX* solo se sobreexpresa en condiciones estresantes para *M. tuberculosis*, el modelo de estrés empleado fue la hipoxia y no se cuentan con modelos donde se exponen al surfactante pulmonar (Hu, Movahedzadeh, Stoker, & Coates, 2006; Park, et al., 2003; David R Sherman, Voskuil, Schnappinger, Liao, Harrell, & Schoolnik, 2001).

León Solís (2004), realizó microarreglos de *M. tuberculosis* después de la exposición a DPPC y surfactante pulmonar, los resultados mostraron que se sobreexpresaron los genes *hspX* *tgs1* e *isdA2* en *M. tuberculosis* cuando se expuso al DPPC, éste último gen involucrado en la síntesis de genaril-genaril pirofosfato enzima involucrada en la síntesis del colesterol.

Se ha demostrado que existe un intercambio entre los triglicéridos de ambas células en dirección macrófago-micobacteria y no al revés, además este intercambio sólo puede llevarse a cabo con concentraciones bajas de oxígeno para esto es necesaria la sobreexpresión del gen *tgs1*, el cual es el responsable de la síntesis de ácidos grasos necesarios para la sobrevivencia de la micobacteria en el granuloma (Daniel, Maamar, Deb, Sirakova, & Kolattukudy, 2011).

Daniel *et. al.* 2011 observó que el gen *tgs1* se expresa en *M. tuberculosis* bajo condiciones de hipoxia la cual produce estrés en la micobacteria, sin embargo no se sabe si la interacción de la micobacteria con el surfactante pulmonar tiene un efecto similar a la hipoxia.

M. tuberculosis contiene genes que se expresan de manera normal en el estado de replicación, entre ellos tenemos al gen *rfp*, el cual codifica para una proteína tipo lisozima (Fig. 10) que degrada la capa de peptidoglicano rompiendo los puentes β -glucosídicos, ácido N-acetilmurámico y N-

acetilglucosamina, acción necesaria para la división celular de esta bacteria. Se ha sugerido que en condiciones adversas esta enzima es inhibida por la acción de productos intermediarios implicados en la sobrevivencia de la bacteria en un estado inactivo, dichos productos son de origen desconocido. Además, existen reportes que demuestran que citocinas liberadas por las células del hospedero (TNF- α , IFN- γ , IL-12, etc.) también inhiben la expresión de gen *rfp*. Sin embargo los mecanismos de supresión y activación de este gen no están bien dilucidados por lo que se deben realizar estudios adicionales que lleven a un mejor entendimiento (Cohen-Gonsaud, Keep, Davies, Ward, Henderson, & Labesse, 2004; Downing, Betts, Young, McAdam, Kelly, Young, et al., 2004; Gupta, Srivastava, & Srivastava, 2010; Gupta & Srivastava, 2012; Hett, Chao, Deng, & Rubin, 2008; Kana, Gordhan, Downing, Sung, Vostroktunova, Machowski, et al., 2008; Mukamolova, Kaprelyants, Young, Young, & Kell, 1998).

El gen *rfp* posee algunas variantes de la A-E, al clonar en *E. coli* diferentes combinaciones de las variantes se determinó que la supresión de la combinación ABCE inhibe el crecimiento de la bacteria, sin embargo cuando se reemplazó la variante E del gen por la D (ABCD), se observó un crecimiento normal de la micobacteria, por lo que se ha concluido que el gen *rfpE* es de gran importancia para el crecimiento de *M. tuberculosis* (Kana, et al., 2008).

Kana et. al. en 2008 determinaron que los genes *rpf* se expresaron en condiciones favorables para la replicación de micobacteria, además se determinó que el gen *rpfE* es el más importante para la replicación de la micobacteria.

Además se ha sugerido que *rfpB* se une a una endopeptidasa putativa de la micobacteria denominada *rpf*-unido a proteína A (Rip-A), esta proteína actúa sinérgicamente con la proteína *rfpE*, se ha reportado que Rip-A regula la degradación del peptidoglicano en conjunto con *rfpB* y E, sin embargo, al igual que en el caso anterior se desconocen los mecanismos por los cuales

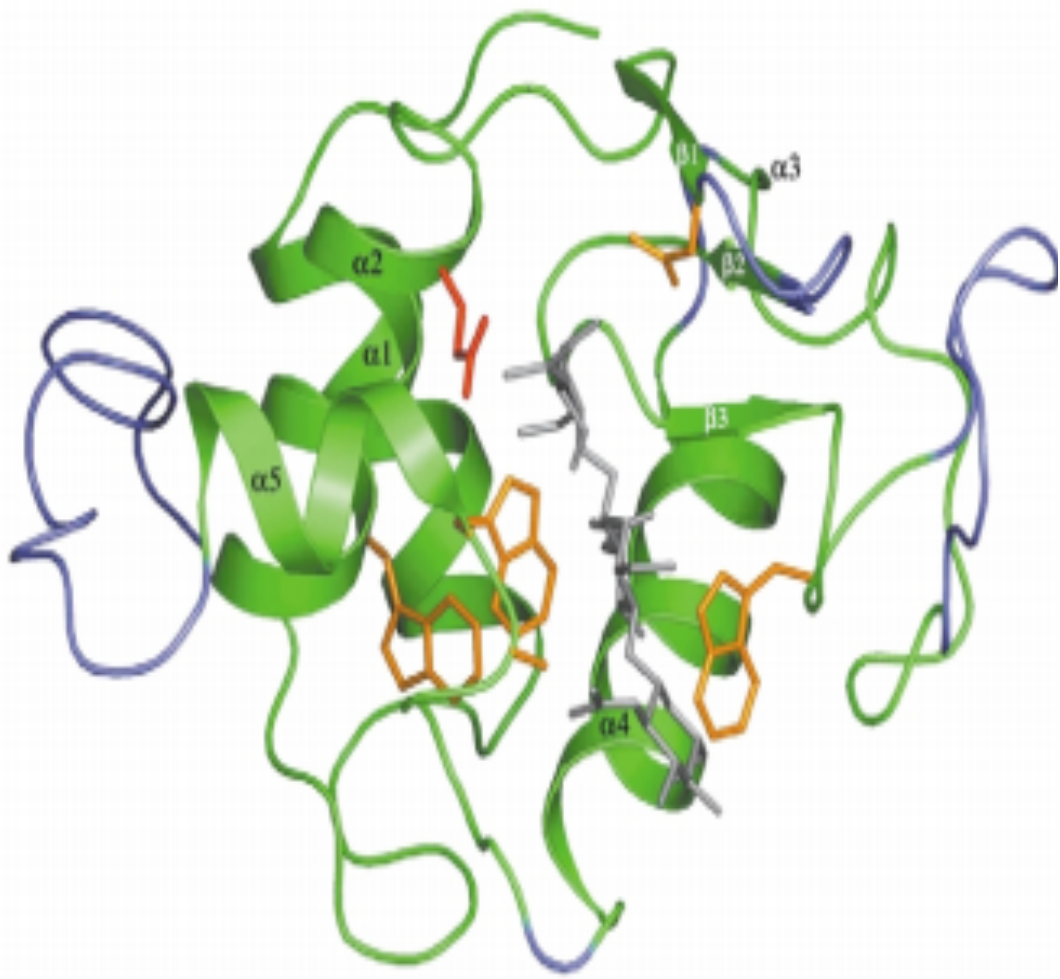


Figura 10. Estructura tridimensional de la proteína rpf. La región activa está conformada por 5 cadenas alfas y 3 cadenas betas plegadas. Tomado de Cohen-Gonsaud, Keep, Davies, Ward, Henderson, and Labesse (2004).

se expresa el gen *rip-A* y *rfp* (Cohen-Gonsaud, Keep, Davies, Ward, Henderson, & Labesse, 2004; Gupta & Srivastava, 2012).

Existe un gran número de genes involucrados en la síntesis de colesterol, esteroides, glicerol y triglicéridos de *M. tuberculosis*, entre ellos se encuentra el *idsA2*, el cual se encuentra sobreexpresado en la síntesis de colesterol y esteroides, aunque esta sobreexpresión no es significativa (Griffin, Gawronski, Dejesus, Ioerger, Akerley, & Sasseti, 2011).

Griffin *et. al.* 2011, determinaron en condiciones hipóxicas los genes involucrados en la síntesis de colesterol y ácidos grasos de *M. tuberculosis*, observaron alrededor de 300 genes desregulados entre ellos se encontraba *idsA2*, sin embargo mencionan que este gen no mostró una sobreexpresión estadísticamente significativa.

Schwab, Rohde, Wang, Chess, Notter, and Russell (2009), realizaron un trabajo similar al presente con ciertas variaciones, en este trabajo se realizó un perfil de genes desregulados al desafiar *M. tuberculosis* con el surfactante pulmonar completo, un extracto de carne que contenía solo las proteínas A y D del surfactante y un extracto de lípidos total del surfactante pulmonar, los resultados de este trabajo muestran que existe mayor expresión de genes en la micobacteria cuando se expuso al surfactante pulmonar completo, por el contrario se observó una menor expresión de genes cuando se expuso solo al extracto de lípidos. Vale la pena mencionar que el gen *rfpE* se incluyó en este estudio, este se expresó a los 30 min al exponerse con el surfactante pulmonar completo.

Debido a lo anteriormente expuesto se sabe que una vez inhalada la micobacteria por el hospedero, ésta interactúa en primera estancia con el surfactante pulmonar, compuesto por 90 % de fosfolípidos y 10% de proteínas, de estos fosfolípidos el DPPC es el predominante, lo cual sugiere que *M. tuberculosis* interactuará en primer lugar con él. Pese a ello se sabe poco sobre la desregulación que pudiera presentarse como resultado de la interacción entre *M. tuberculosis* y el DPPC. Trabajos previos han determinado que algunos genes de estrés como *hspX*, *tgs1* e *idsA2* se encuentran desregulados después de que la micobacteria es expuesta al

DPPC. En el presente estudio realizamos la cuantificación de la expresión de estos genes y del gen *RpfE*, el cual está implicado en la replicación de *M. tuberculosis*.

IV JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas con mayor tasa de mortalidad en el mundo. La tasa de morbilidad en México es de 17.2 por cada 100 mil habitantes mientras que en nuestro estado es de 34.6. No se conocen los receptores y ligandos involucrados en el reconocimiento inicial entre la micobacteria y el surfactante pulmonar, ni los efectos de esta interacción sobre la actividad transcripcional de la bacteria. Dado que el DPPC es el principal componente lipídico del surfactante pulmonar es de suma importancia realizar estudios que permitan entender mejor el efecto que tiene este componente sobre *M. tuberculosis* y en un futuro poder desarrollar un tratamiento que vaya dirigido contra los receptores que median la activación de factores de virulencia y sobrevivencia de la bacteria en el hospedero.

V HIPÓTESIS

El DPPC tiene un efecto diferencial sobre la actividad transcripcional de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG.

VI OBJETIVOS

A Objetivo general

Evaluar el efecto del DPPC sobre la actividad transcripcional de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG.

B Objetivos específicos

1. Cuantificar la expresión de los genes *hspX*, *tgsl*, *rpfE* e *idsA2* en *M. tuberculosis* después de 2 horas de exposición al DPPC.
2. Cuantificar la expresión de los genes *hspX*, *tgsl*, *rpfE* e *idsA2* en *M. tuberculosis* después de 2 horas de exposición al surfactante pulmonar.
3. Cuantificar la expresión de los genes *hspX*, *tgsl*, *rpfE* e *idsA2* en *M. bovis* después de 2 horas de exposición al DPPC.
4. Cuantificar la expresión de los genes *hspX*, *tgsl*, *rpfE* e *idsA2* en *M. bovis* después de 2 horas de exposición al surfactante pulmonar.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A Diseño experimental

El tipo de estudio fue transversal, descriptivo y experimental. Se realizaron los experimentos en la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, específicamente en las instalaciones de los laboratorios de Microbiología Molecular e Inmunología. Se realizaron dos experimentos independientes uno con *M. tuberculosis* H37Rv y otro con *M. bovis* BCG, cada uno con 4 tratamientos (control, SDS 0.05%, 10 mg de DPPC, 12.5 mg de Survanta) y cada factor con 3 réplicas en un tiempo de 2 horas.

B Cultivo de micobacterias.

Las cepas utilizadas fueron *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Rv. Cabe señalar que para el cultivo y manejo de micobacterias se cuenta con un cuarto de cultivo especializado nivel 3 con sistema de presión negativa y campana de bioseguridad (Labconco Purifor Biological Safety Cabinet Class II-Type A2). Para el cultivo se tomó una colonia de las cepas conservadas en medio Lowenstein-Jensen y se sembraron en 5 ml de medio de cultivo Middlebrook 7H9 (BD BBL, USA) adicionado con enriquecimiento OADC (BD BBL, USA) al 10% y glicerol 0.5%. Se incubó a 37°C en agitación 150 rpm para estimular el crecimiento. Una vez alcanzada la fase logarítmica se realizó la resiembra, transfiriendo un inóculo del cultivo a un frasco con 300 ml de medio Middlebrook 7H9 y se continuó incubando hasta tener una $A_{600} \approx 0.5$ (Silver, Walrath, Lee, Jacobson, Horton, Bowman, et al., 2009).

1. Estímulos de cultivo.

5 ml de cultivo se colocaron en tubos cónicos y se centrifugaron a 7,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, las pastillas se resuspendieron en 5 ml de los siguientes medios:

- 1) Middlebrook 7H9 adicionado con enriquecimiento OADC (BD BBL, USA) al 10%, glicerol 0.5% (control basal de expresión).

- 2) Middlebrook 7H9 adicionado con enriquecimiento OADC (BD BBL, USA) al 10%, glicerol 0.5% complementado con SDS 0.05%.
- 3) Middlebrook 7H9 adicionado con enriquecimiento OADC (BD BBL, USA) al 10%, glicerol 0.5% complementado con DPPC 10 mg.
- 4) Middlebrook 7H9 adicionado con enriquecimiento OADC (BD BBL, USA) al 10%, glicerol 0.5% complementado con Survanta 12.5 mg.

Los experimentos se realizaron en un tiempo de exposición de 2 h, por triplicado y se realizaron UFCs para comprobar la viabilidad de las micobacterias.

2. Unidades formadoras de colonias (UFC).

Las bacterias estimuladas y los controles se lavaron con solución salina y se resuspendieron en 1 ml de dicha solución. Se preparó una serie de diluciones de 10^{-1} a 10^{-9} que contenían PBS 1X con 0.05% de tween 80, posteriormente se sembraron 100 μ l de estas diluciones en placas de Middlebrook 7H10 con AODC. Los cultivos serán monitoreados durante 2 semanas de incubación a 37°C para determinar el número de colonias que se formó en las diferentes diluciones, y calcular de esta manera, el número de micobacterias viables a cada dosis y tiempo de los diferentes estímulos ($N \cdot FD \cdot 1000$).

3. Extracción de RNA total.

Después de transcurrido el tiempo de los estímulos, se centrifugaron las micobacterias y se resuspendieron en 800 μ l de TRIZOL (Life technologies, USA) en tubos de rosca de 2 ml estériles que contengan ~100 μ l de perlas de vidrio.

Las micobacterias se lisaron en un “minibeadbeater” de acuerdo al siguiente programa: en tubos de 1.5 ml, se agregaron 220 μ l de cloroformo, se homogenizaron y se le dio un pulso de 60 segundos con velocidad baja (4 m/s). se incubaron durante 5 min en hielo seguido de una centrifugación a

13,000 rpm por 10 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 720 µl de isopropanol, se incubó por 15 min en hielo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C. La pastilla de RNA se lavó con 1 ml de etanol al 80%, se centrifugó a 6,000 rpm durante 5 min a 4°C, dejando secar la pastilla, para proceder a la resuspensión en 22 µl de agua inyectable. Posteriormente se cuantificó a 260nm-280nm en el equipo NanoDrop (Thermo Scientific) y se observó su integridad en geles de agarosa al 1.5%.

4. RT-PCR en tiempo real

El cDNA se sintetizó de la siguiente manera: 2 µg de RNA se colocaron en un tubo de 0.2 ml, con 2 µl de Random Hexamers, la mezcla se llevó a un volumen de 12 µl, incubando a 70°C durante 10 min para posteriormente enfriar en hielo por 2 min. Después se añadieron 4 µl de buffer RT 5 X, 1 µl de dNTPs (10 mM), 1µl de M-MLV transcriptasa inversa (Promega) ajustando a un volumen de 20 µl. Incubando a 37°C por 1 h. El cDNA se congeló hasta su uso a -20°C (Aguilar-Medina, Ramos-Payan, Arambula-Meraz, Sanchez-Torres, & Favila-Castillo, 2010).

5. PCR en tiempo real

La cuantificación de los mensajeros específicos en los grupos de estudio se realizó por qPCR en el equipo del QuantStudio 12K Flex Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando los iniciadores específicos mostrados en el Cuadro 1 y las T_m específicas mostradas en el cuadro 2, las condiciones de reacción y termociclado se muestran en el cuadro 3 y 4. la cuantificación relativa de los genes de expresión fue calculada por el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando como gen constitutivo el rRNA 16S y los resultados se expresaran como Log₂ del número de veces que aumenta o disminuye del gen de estudio en la muestra problema con respecto a la muestra control (fold change Log₂)

Cuadro 1. Secuencia de los iniciadores

Gen	Sentido	Antisentido
<i>Tgs1</i>	GGATCCCGAAGTACAGGTCG	TGCAGATTATGGGCAGACGG
<i>hspX</i>	AATGCCCTTGTCGTAGGTGG	CCCCGAGTTTTCTGAGCTGT
<i>rpfE</i>	AGCCACCCGGATCTGCTCCT C	CCCGTGGCCTACAGCGTGAA C
<i>idsA</i> 2	ACGACCTAAAGTCGGGCAAG	GTGCCAATCGAGGTCCGTAA
<i>rRNA</i> 16S	AGTGGCGAACGGGTGAGTAA	CGTATCTCAGTCCCAGTGTG

Cuadro 2. Tm específicos de los diferentes genes

gen	Tm °C
<i>rRNA 16S</i>	89
<i>hspX</i>	90
<i>tgs1</i>	88
<i>rpfE</i>	91
<i>idsA2</i>	86.5

Cuadro 3. Condiciones de reacción

Reactivos	[] final
Buffer	1X
MgCl₂	2.5 mM
dNTP's	0.2 μM
Iniciador F	0.2 μM
Iniciador R	0.2 μM
H₂O	
Taq	1 U/μl
DNA	0.2 μg/μl
SYBR	0.5X

Cuadro 4. Condiciones de termociclado

Temp°C	Tiempo	Ciclo
95	5 min	1
95	30 s	
55	30 s	
72	30 s	30
82	10 s	
72	5 min	1
22	10 min	1

C Análisis estadístico

Una vez obtenida la información se procedió a su captura en una base de datos electrónica y se verificó la calidad de la misma. Los datos se organizaron y resumieron en cuadros y gráficas que ilustren mejor su distribución. Para probar la asociación entre variables (SDS 0.5%, 10 mg de DPPC, 12.5 mg de Survanta) se empleó el estadístico ANOVA y de comparaciones múltiples de Bonferroni. Un valor p menor de 0.05 será considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis se llevarán a cabo con el paquete estadístico SPSS v20.

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A Viabilidad de cultivos

Los resultados en las UFCs de *M. tuberculosis* y *M. bovis* mostraron una viabilidad mayor del 90% en todos los tratamientos (Fig. 11). En el caso de *M. bovis* se observó un mayor crecimiento en los cultivos expuestos a DPPC ($1.42E+09 \pm 2.55E+08$ UFCs) y surfactante pulmonar ($1.75E+09 \pm 7.07E+07$) en comparación con el cultivo control ($1.03E+09 \pm 1.06E+08$), representando incrementos del 38.5% y 70.7%, respectivamente.

B Análisis de la expresión genética

Se logró purificar ARN total empleando la metodología de TRIzol con muy poca degradación (Fig. 12), con una pureza de ~1.8-2.2. De la misma manera se estandarizaron las condiciones de reacción de los genes *rRNA 16S*, *hspX*, *tgs1*, *rfpE* e *idsA2*, para cuantificar su expresión por PCR en tiempo real, obteniendo el Tm correspondiente de cada gen (Figs. 13, 15, 17, 19 y 21). Se determinó la expresión genética comparando el Ct gen control contra los genes problema (*hspX*, *tgs1*, *rfpE* y *idsA2*) (Figs. 14, 16, 18, 20 y 22), por último, se obtuvo una buena reproducibilidad al realizar el ensayo por triplicado.

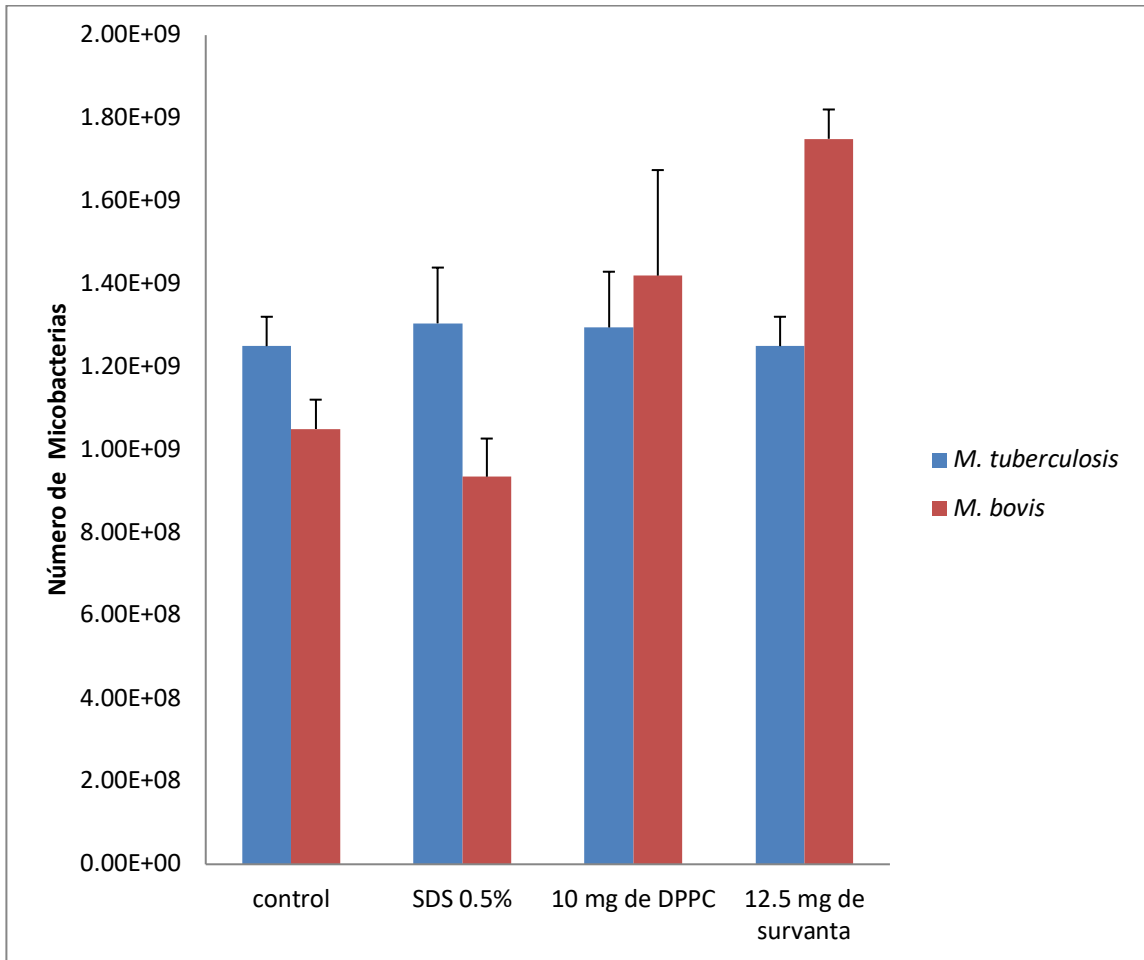


Figura 11. UFCs de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Se muestran la cantidad de bacterias en *M. tuberculosis* y *M. bovis*, a diferentes tratamientos.

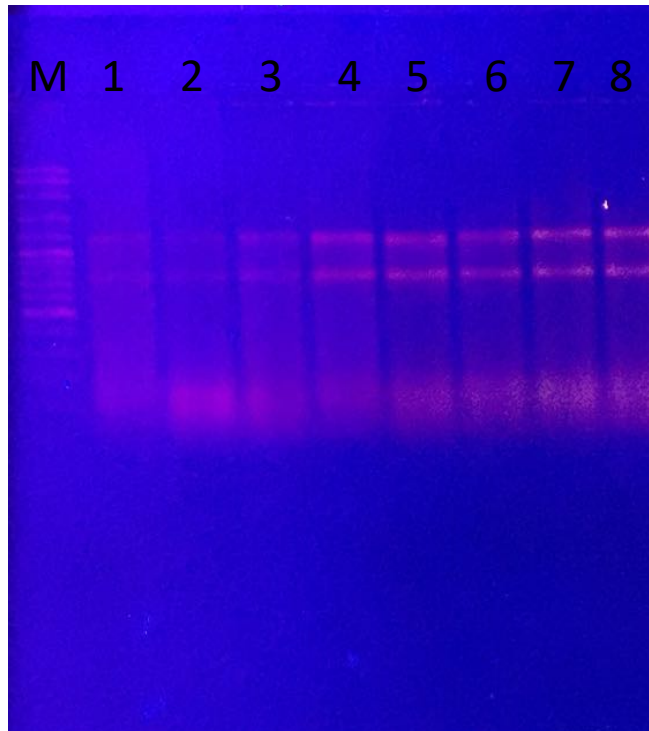


Figura 12. Integridad del RNA total de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG. M=100pb, *M. tuberculosis* (1=Control, 2=SDS 0.5%, 3=DPPC 10 mg, 4=Survanta 12.5 mg), *M. bovis* (5=Control, 6=SDS 0.5%, 7=DPPC 10 mg, 8=Survanta 12.5 mg).

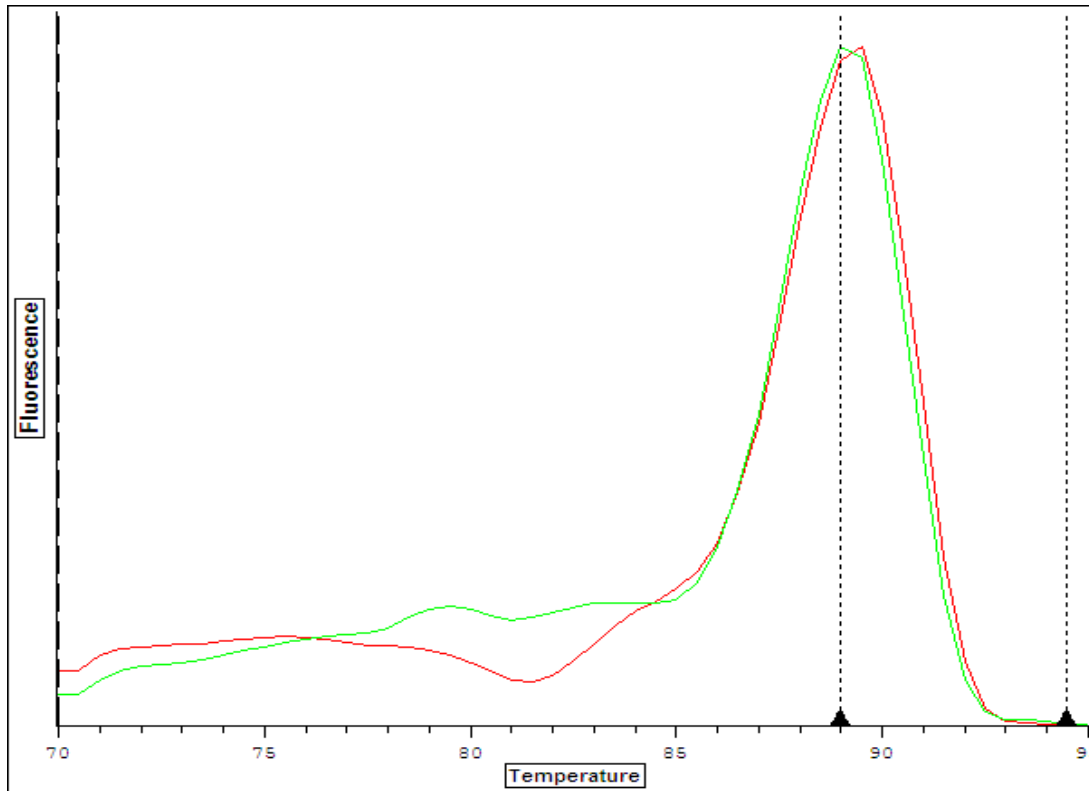


Figura 13. Curva de disociación del amplicón *rRNA 16S*. Se observa una temperatura de disociación a 89°C característico de dicho gen.

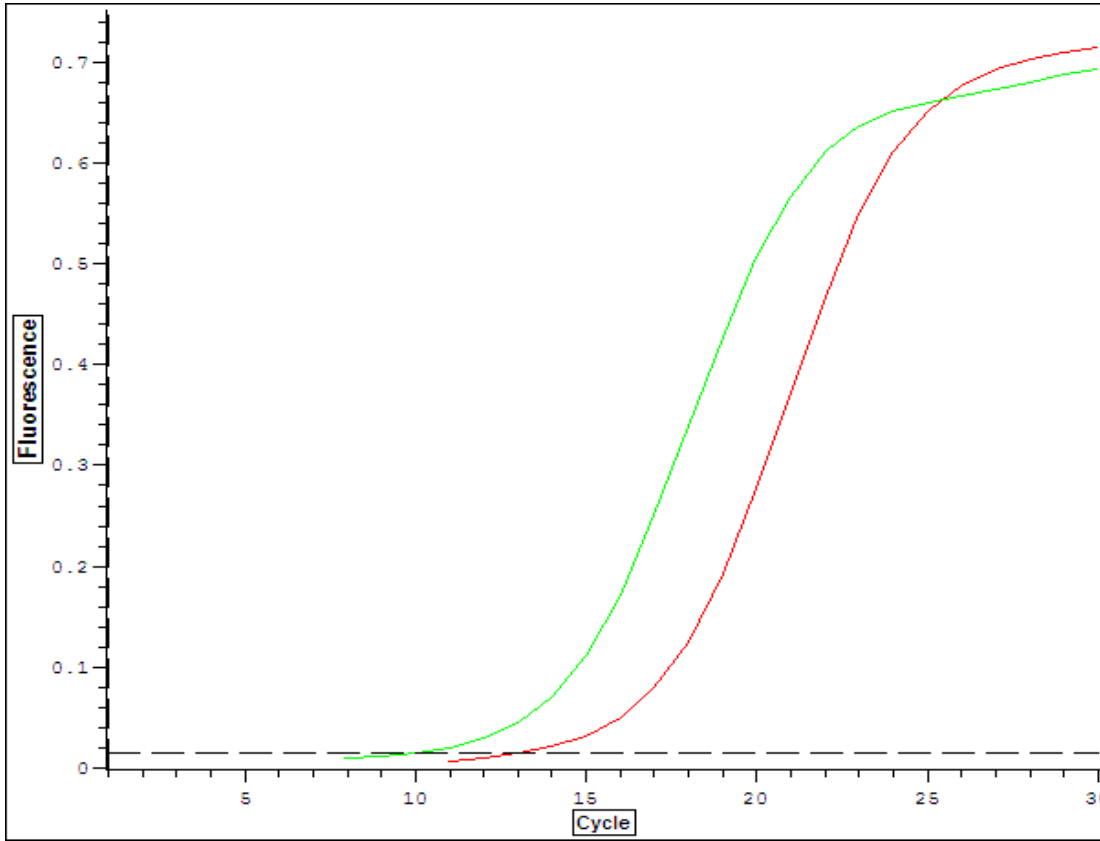


Figura 14. Cinética de amplificación del gen *rRNA 16S*. Se observa un promedio del Ct en 11.8 y una fluorescencia basal de 0.015.

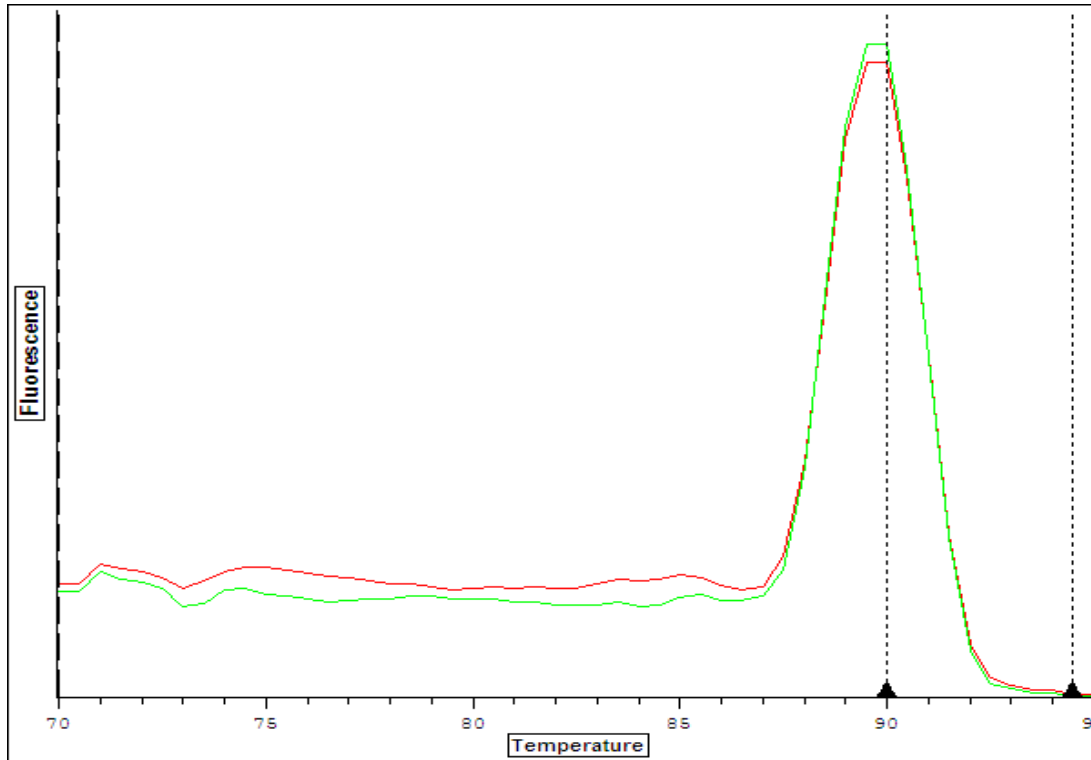


Figura 15. Curva de disociación del amplicon *hspX*. Se observa una temperatura de disociación de 90°C característico de dicho gen.

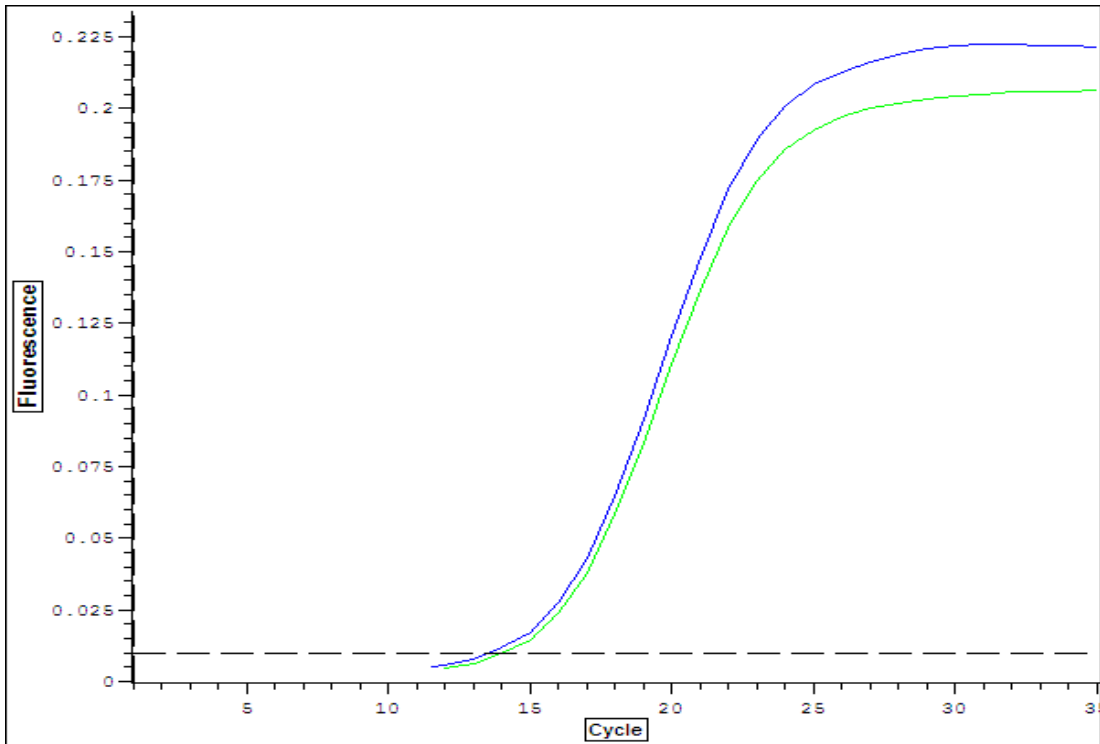


Figura 16. Cinética de amplificación del gen *hspX*. Se observa un promedio del Ct en 13.8 y una fluorescencia basal de 0.015.

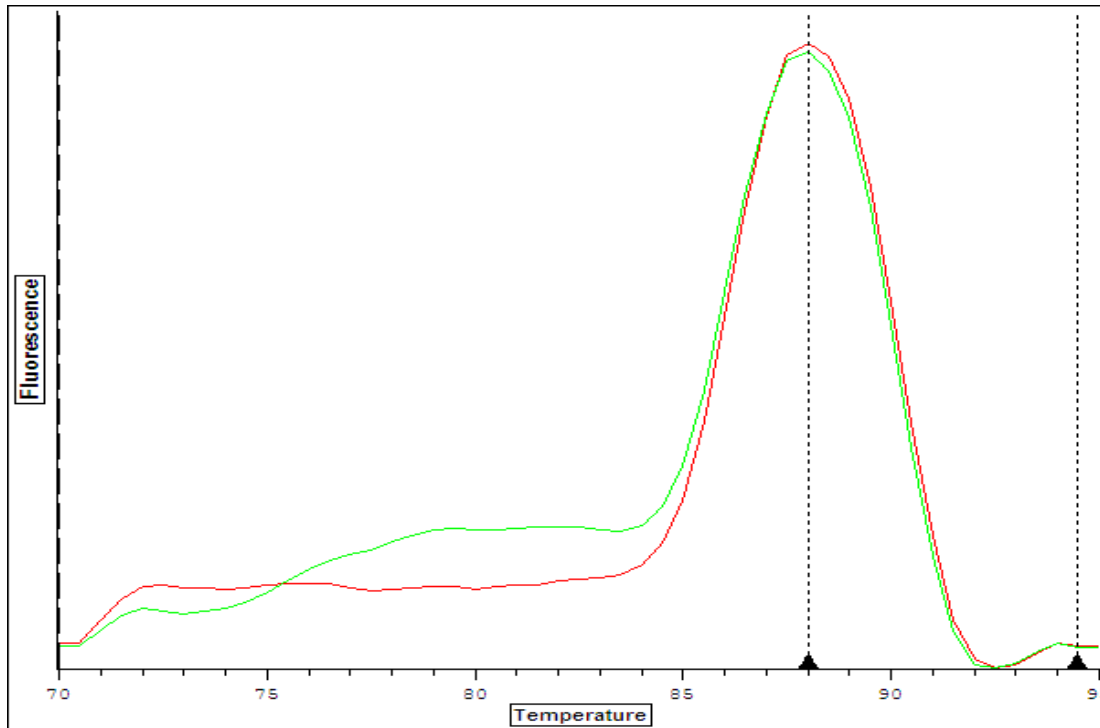


Figura 17. Curva de disociación del amplicón *tgs1*. Se observa una temperatura de disociación de 88°C característico de dicho gen.

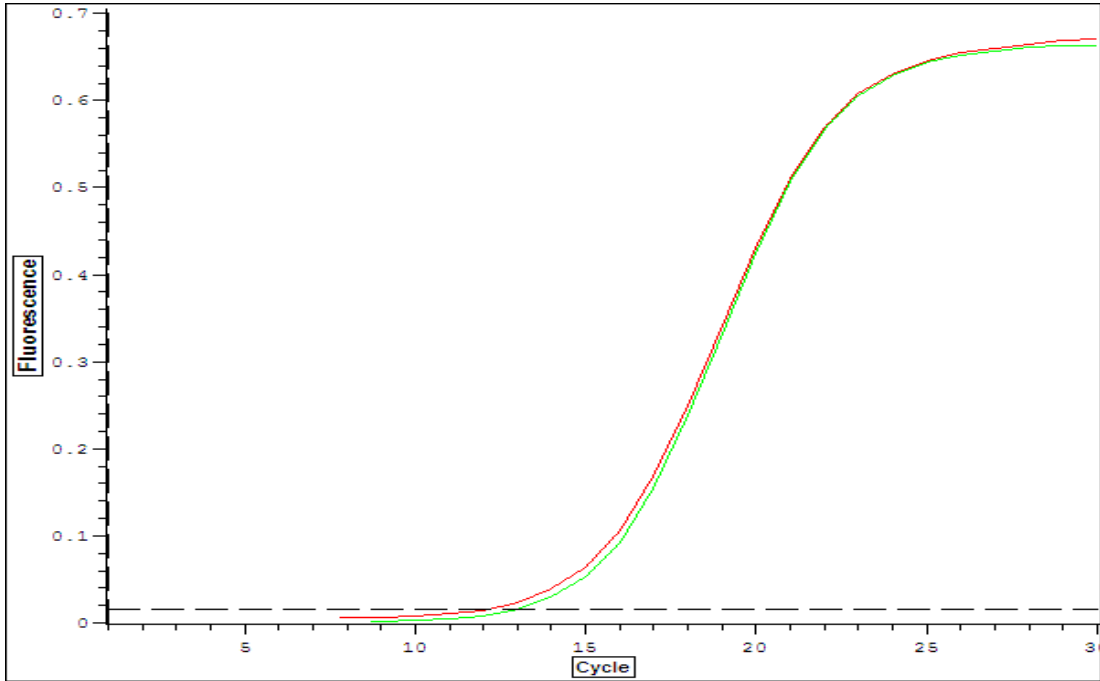


Figura 18. Cinética de amplificación del gen *tgs1*. Se observa un promedio del Ct en 12.5 y una fluorescencia basal de 0.015.

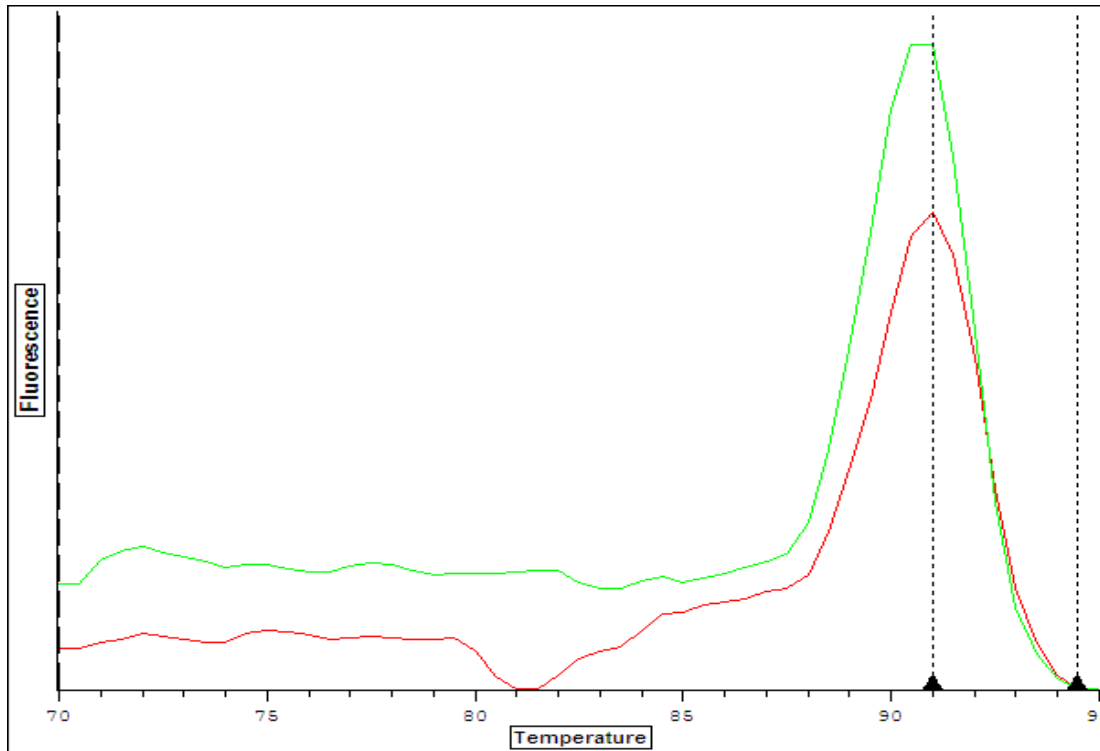


Figura 19. Curva de disociación del amplicón *rpfE*. Se observa una temperatura de disociación de 91°C característico de dicho gen.

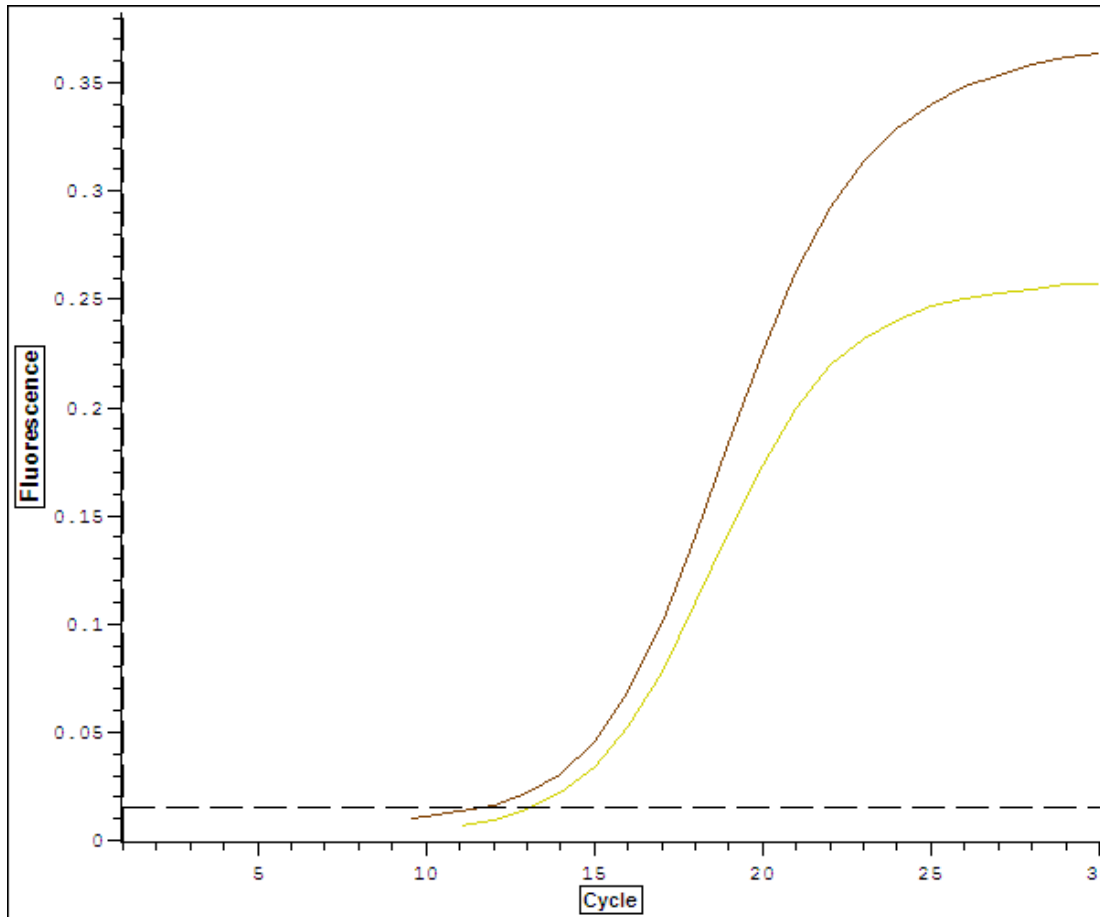


Figura 20. Cinética de amplificación del gen *rpfE*. Se observa un promedio de Ct en 12.36 y una fluorescencia basal de 0.015.

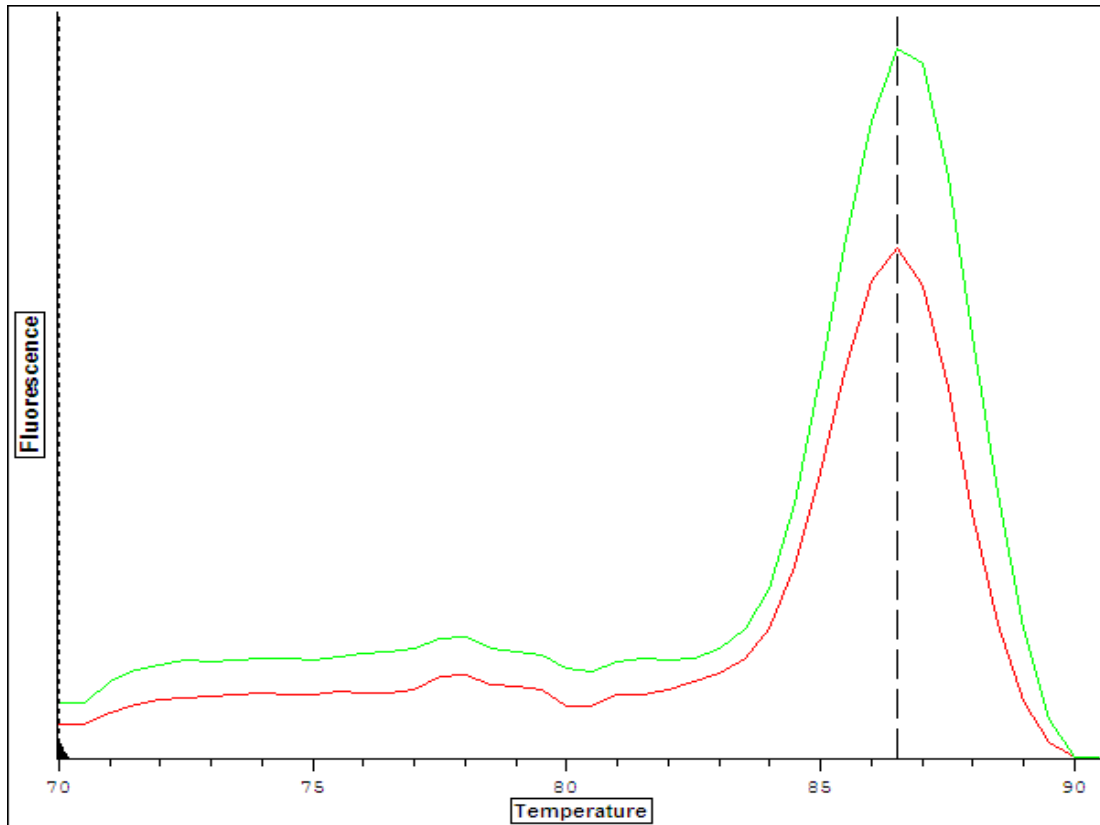


Figura 21. Curva de disociación del amplicón *idsA2*. Se observa una Temperatura de disociación de 86.5°C característico de dicho gen.

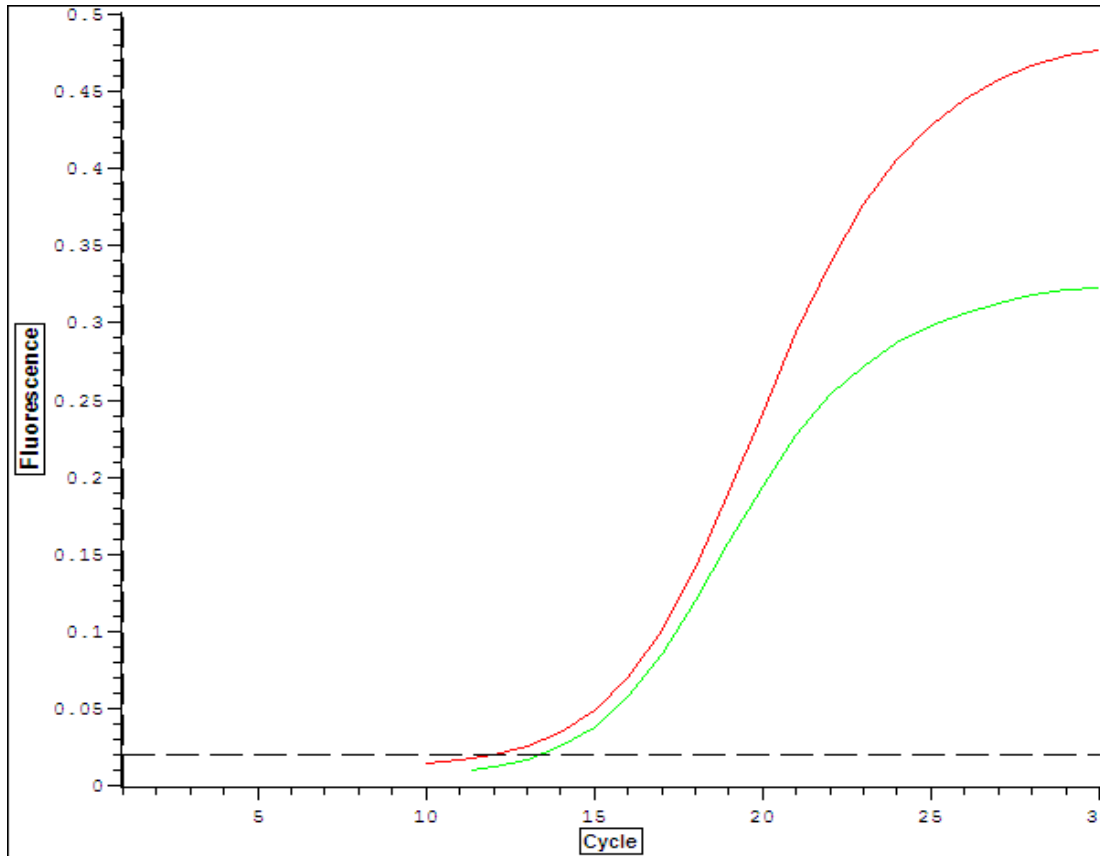


Figura 22. Cinética de amplificación del gen *idsA2*. Se observa un promedio del Ct en 12.43 y una fluorescencia basal de 0.020.

Los resultados muestran que en *M. tuberculosis* la expresión genética de *hspX* en los tratamientos con SDS, DPPC y Survanta fue de -6.23 ± 1.69 , -8.80 ± 1.79 y 0.11 ± 0.92 respectivamente mientras que en *M. bovis* fue de -0.82 ± 6.91 , -2.02 ± 0.02 , 3.24 ± 1.36 (Cuadro 5) Se observa que en *M. tuberculosis* hay disminución de la expresión genética en los tratamientos con DPPC y SDS, resultados estadísticamente significativos ($p=0.012$ y $p=0.050$ respectivamente), mientras que la expresión con Survanta se mantuvo sin cambios significativos. En *M. bovis* BCG se observó una sobreexpresión en Survanta, la cual es estadísticamente significativa. En los tratamientos con DPPC y SDS se observó una baja expresión, estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p=0.050$ en ambos) (Fig. 23). La baja expresión mostrada sugiere que en *M. tuberculosis* se encuentra en un estado activo y que el DPPC es el responsable de la actividad de la micobacteria mientras que en *M. bovis* los datos muestran que entra a un estado de dormancia debido a la elevada expresión con Survanta y la poca represión que muestra con el DPPC y SDS, esto sugiere que el surfactante pulmonar compo tiene un efecto inmunológico sobre esta bacteria, concordando con lo reportado por David R Sherman, Voskuil, Schnappinger, Liao, Harrell, and Schoolnik (2001), Park, et al. (2003) y Hu, Movahedzadeh, Stoker, and Coates (2006), ellos argumentaron que el gen *hspX* se sobreexpresa en microambientes hipóxicos el cual disminuye el metabolismo de *M. tuberculosis* llevándola a un estado inactivo, mientras que los resultado no concuerdan con Schwab, Rohde, Wang, Chess, Notter, and Russell (2009), quienes mencionaron que el extracto lipídico del surfactante pulmonar no reprime los genes de inactividad en *M. tuberculosis*, sin embargo cabe mencionar que ellos no utilizaron el aislado de DPPC y no el conjunto de lípidos de surfactante pulmonar, posiblemente el conjunto de estos lípidos tengan otro efecto en la expresión genética de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. De manera general, se pudo observar una clara diferencia en la expresión del gen entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* con todos los tratamientos, observándose una expresión mayor del gen en *M. bovis*, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.010$).

Cuadro 5. Expresión genética del gen *hspX*. ER (\log_2)= expresión relativa dada en \log_2 . DE=desviación estándar. p =valor p .

Bacteria	Grupo	Media ER (\log_2)	DE	P*
<i>M. tuberculosis</i>	Control	0,00	1,69	
	SDS 0.05%	-6,23	1,48	0,050
	DPPC 10mg	-8,80	1,79	0,012
	Survanta 12.5mg	0,11	0,26	0,921
<i>M. bovis</i>	Control	0,00	0,25	
	SDS 0.05%	-0,82	0,03	0,050
	DPPC 10mg	-2,09	0,67	0,050
	Survanta 12.5mg	3,24	1,36	0,082

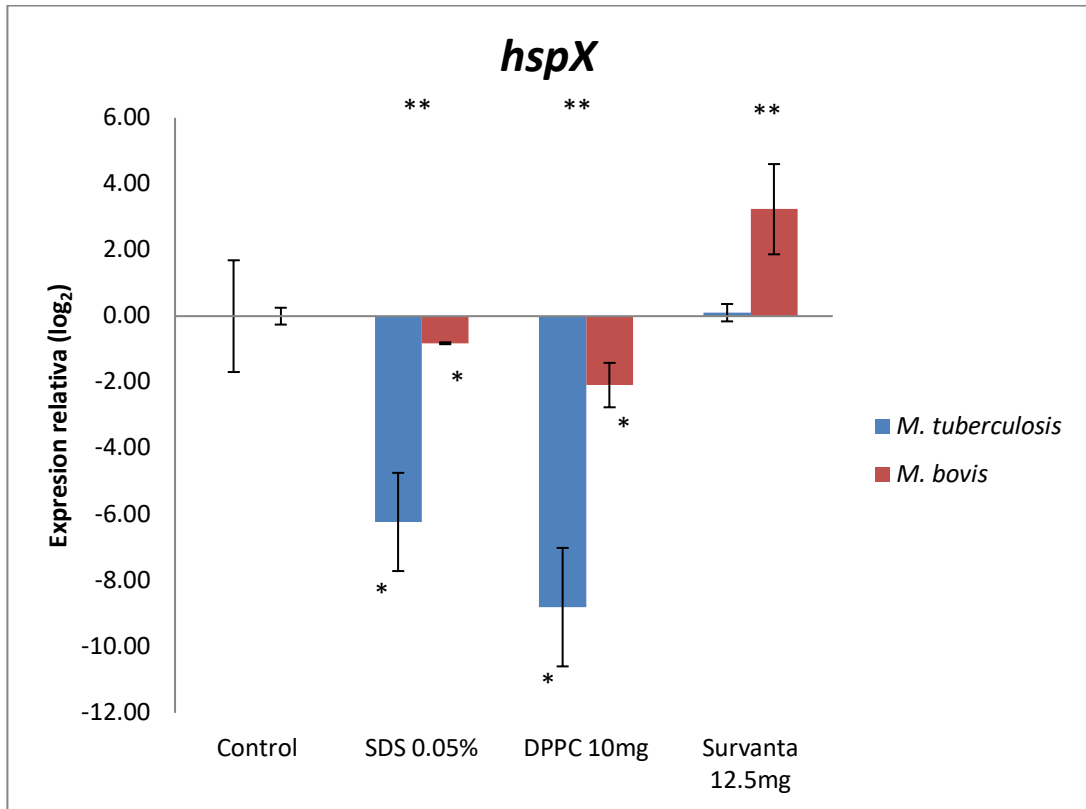


Figura 23. Expresión genética de *hspX*. La expresión relativa está determinada de acuerdo a log₂.

*=Diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento.

**=diferencia estadísticamente significativa entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

Los resultados en el gen *tgs1* mostraron que la expresión genética de *M. tuberculosis* en los tratamientos con SDS, DPPC y Survanta fue de -14.80 ± 0.64 , -15.41 ± 0.62 , -14.69 ± 0.14 respectivamente, en *M. bovis* la expresión genética fue de 1.30 ± 0.82 , 5.47 ± 0.19 , 6.85 ± 1.14 (Cuadro 6). Se puede apreciar que en *M. tuberculosis* hay una baja expresión en todos los tratamientos (SDS, DPPC y Survanta), mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.011$, $p=0.013$ y $p=0.012$ respectivamente), mientras que en *M. bovis* hay un sobreexpresión en los tratamientos con DPPC y Survanta estadísticamente significativas ($p=0.032$ y $p=0.031$) pero con el SDS no se observaron cambios en la expresión genética (Fig. 24), por lo que la baja expresión mostrada en *M. tuberculosis* indica que se encuentra metabólicamente activa, además los datos muestran que el DPPC es el responsable de la actividad de la micobacteria, mientras que en *M. bovis* los datos muestran que entra a un estado de dormancia debido a la elevada expresión con el DPPC Y Survanta, sin embargo existe una mayor expresión con el Survanta, lo que sugiere que el conjunto de otras macromoléculas con el DPPC sobreexpresan dicho gen, estos resultados concuerdan con Daniel, Maamar, Deb, Sirakova, and Kolattukudy (2011) demostraron que en *M. tuberculosis* existe una sobreexpresión del gen *tgs1* en condiciones hipóxicas, explican que *M. tuberculosis* necesita de ácidos grasos en su membrana para sobrevivir en un microambiente adverso sugiriendo que en *M. bovis* el contacto con el DPPC dará inicio al estado de dormancia para poder resistir a los mecanismos inmunológicos del hospedero, además, se puede apreciar que hay una diferencia de la expresión genética entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* estadísticamente significativa ($p=0.012$).

Cuadro 6. Expresión del gen *tgs1*. ER (\log_2)= expresión relativa dada en \log_2 . DE=desviación estándar, *p*=valor *p*.

Bacteria	Grupo	Media ER (\log_2)	DE	P
<i>M. tuberculosis</i>	Control	0,00	0,38	
	SDS 0.05%	-14,80	0,64	0,011
	DPPC 10mg	-15,41	0,62	0,013
	Survanta 12.5mg	-14,69	0,14	0,012
<i>M. bovis</i>	Control	0,00	1,30	
	SDS 0.05%	1,30	0,82	0,350
	DPPC 10mg	5,47	0,19	0,032
	Survanta 12.5mg	6,85	1,14	0,031

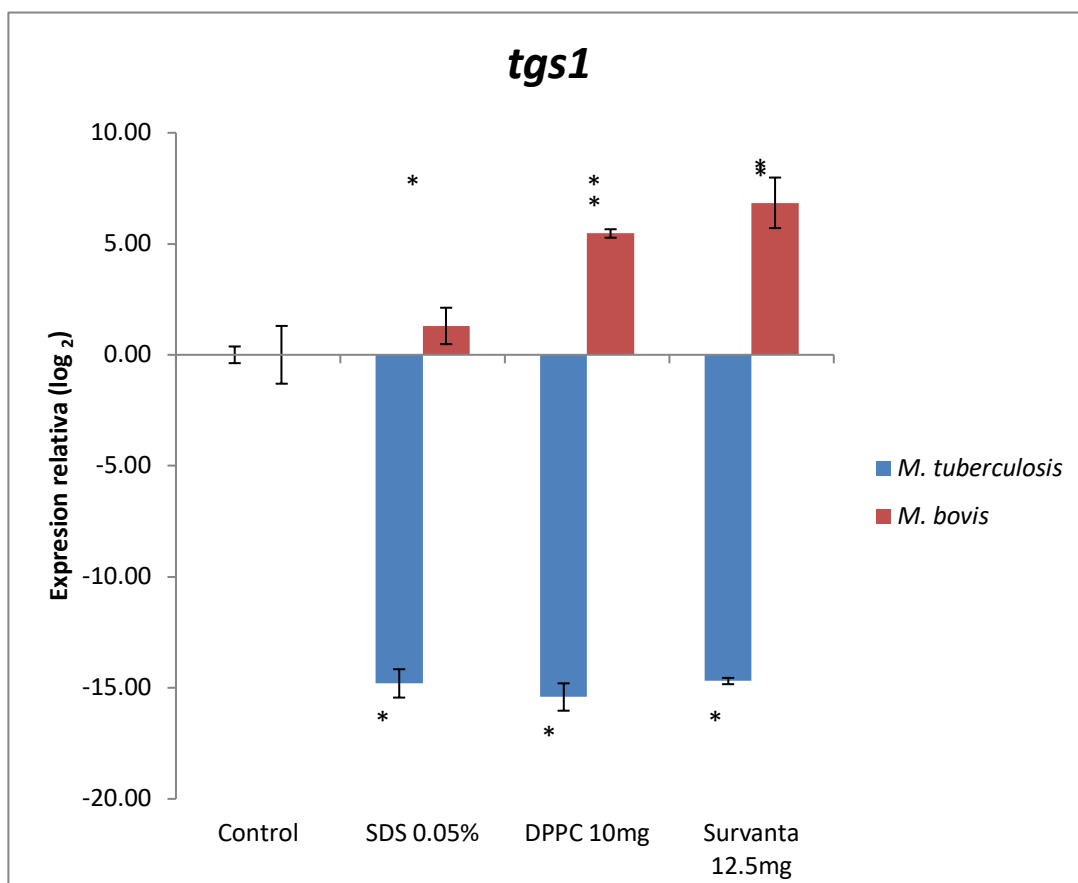


Figura 24. Expresión genética de *tgs1*. La expresión relativa fue determinada de acuerdo a log₂

*=Diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento

**=diferencia estadísticamente significativa entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*

Los resultados en el gen *rpfE* mostraron que la expresión genética de *M. tuberculosis* en los tratamientos con SDS, DPPC y Survanta fue de 1.24 ± 0.61 , 1.45 ± 0.54 , 3.02 ± 0.62 , y la de *M. bovis* fueron de -0.73 ± 0.83 , -2.24 ± 0.41 , -0.54 ± 0.65 (Cuadro 7), observándose que en *M. tuberculosis* existe una sobreexpresión con todos los tratamientos, sin embargo solamente con el tratamiento con el Survanta fue estadísticamente significativo ($p=0.043$). En el caso de *M. bovis* se observa que la expresión genética está disminuida con todos los tratamientos pero solo con DPPC la diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.012$) (Fig. 25). Se observó en *M. tuberculosis* una sobreexpresión del gen *rpfE* en todos los tratamientos, esto concuerda con Kana, et al. (2008), mencionan que el gen *rpfE* se sobreexpresará en condiciones favorables cuando esta provenga de un estado de estrés, dicho gen es necesario para la reanimación de la bacteria, dicho esto en nuestro experimento *M. tuberculosis* no proviene de un estado de estrés, sin embargo cuando las condiciones del microambiente cambian la micobacteria tiende a entrar en los primeros 30 min en un estado de estrés posteriormente entra en un estado de readaptación y por lo tanto tiende a codificar la lisosima necesaria para replicarse en las condiciones nuevas que está expuesta. En *M. bovis* la represión del gen muestra la inactivación de la bacteria sugiriendo que esta no tenderá a proliferar en el humano. Podemos observar que la expresión del gen entre ambas micobacterias es diferente con todos los tratamientos, sin embargo solo con DPPC y Survanta es estadísticamente significativo ($p=0.013$).

Por último, los resultados en el gen *idsA2* muestran que la expresión genética en *M. tuberculosis* fue de -0.64 ± 0.64 , -0.69 ± 0.15 , -2.96 ± 0.96 y en *M. bovis* fue de -14.33 ± 0.19 , -15.01 ± 0.19 , -2.28 ± 0.06 (ver cuadro 8), se puede observar que la expresión genética en *M. tuberculosis* disminuyó durante el tratamiento con Survanta, sin embargo no es estadísticamente significativa. En *M. bovis*, la expresión genética disminuyó

Cuadro 7. Expresión del gen *rpfE*. ER (\log_2)= expresión relativa dada en \log_2 . DE=desviación estándar, *p*=valor *p*.

Bacteria	Grupo	Media ER (\log_2)	SD	P*
<i>M. tuberculosis</i>	Control	0,00	0,62	
	SDS 0.05%	1,24	0,61	0,182
	DPPC 10mg	1,45	0,54	0,131
	Survanta 12.5mg	3,02	0,62	0,043
<i>M. bovis</i>	Control	0,00	0,25	
	SDS 0.05%	-0,73	0,83	0,334
	DPPC 10mg	-2,24	0,41	0,012
	Survanta 12.5mg	-0,54	0,65	0,392

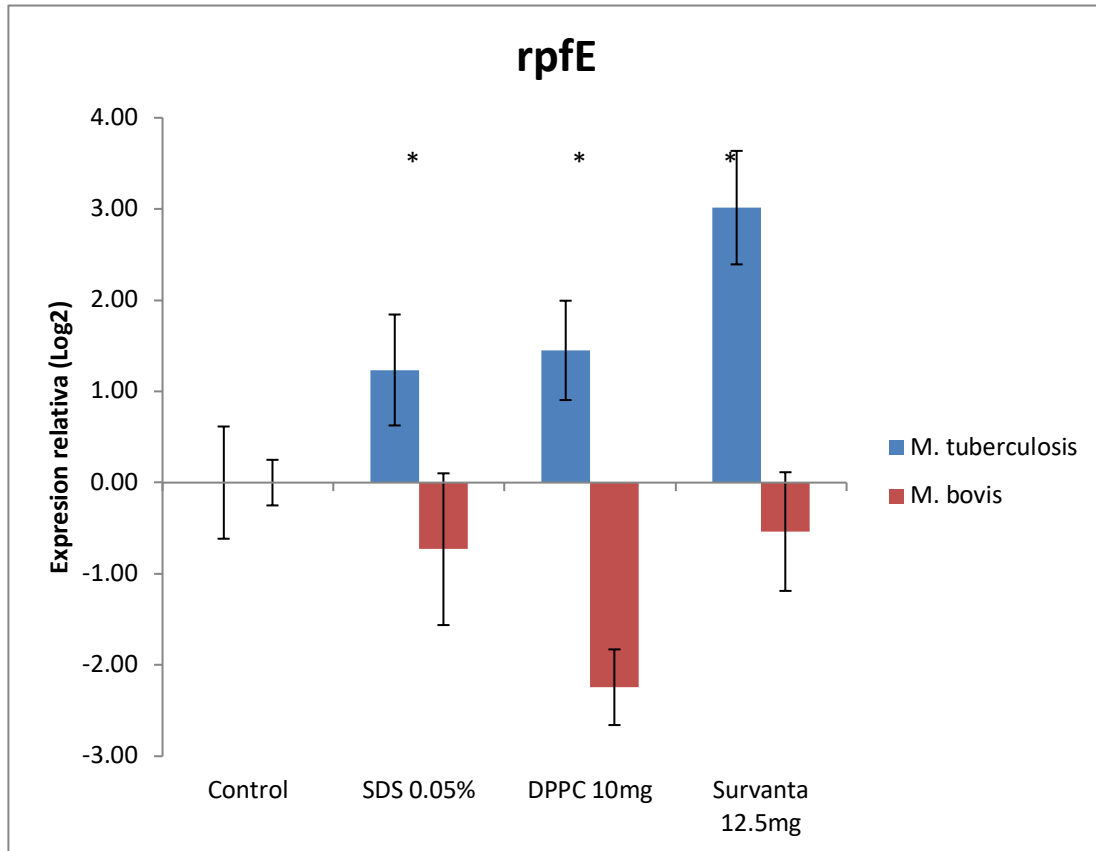


Figura 25. Expresión genética de *rpfE*. La expresión relativa está determinada de acuerdo a \log_2

*=Diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento

**=diferencia estadísticamente significativa entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*

Cuadro 8. Expresión del gen *idsA2*. ER (\log_2)= expresión relativa dada en \log_2 . DE=desviación estándar, *p*=valor *p*.

Bacteria	Grupo	Media ER (\log_2)	DE	P*
<i>M. tuberculosis</i>	Control	0,00	0,36	
	SDS 0.05%	-0,64	0,64	0,346
	DPPC 10mg	-0,69	0,15	0,062
	Survanta 12.5mg	-2,96	0,96	0,063
<i>M. bovis</i>	Control	0,00	0,78	
	SDS 0.05%	-14,33	0,19	0,003
	DPPC 10mg	-15,01	0,19	0,001
	Survanta 12.5mg	-2,28	0,06	0,050

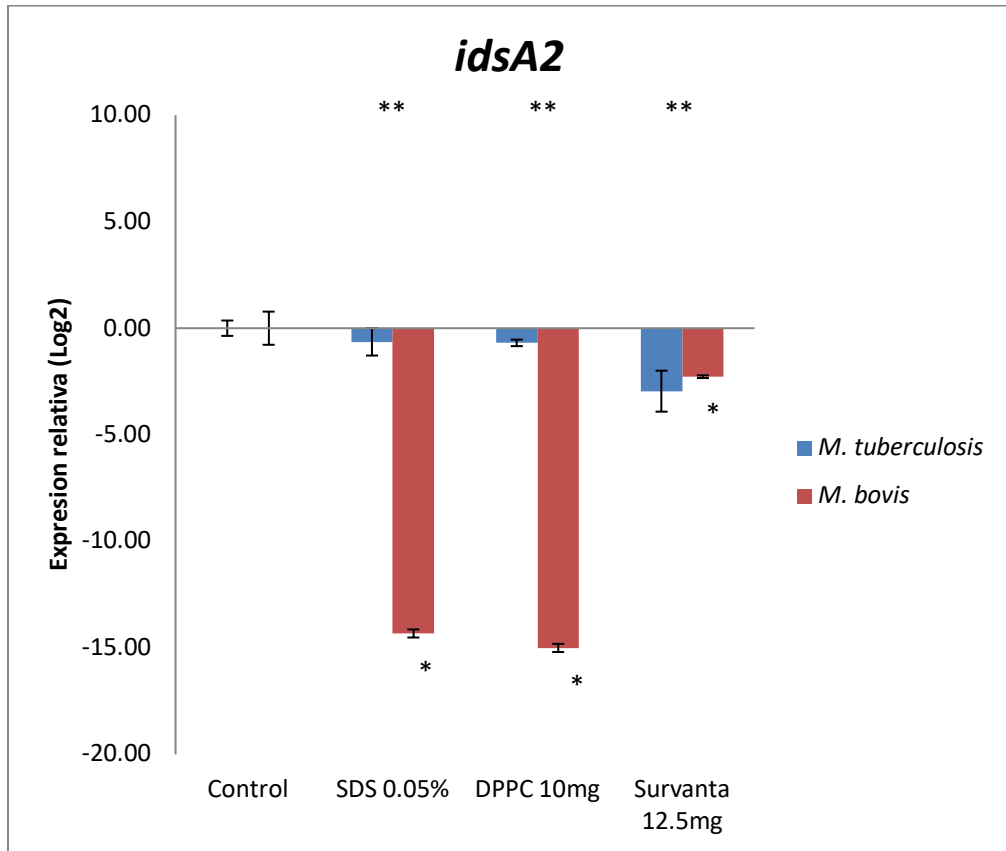


Figura 26. Expresión genética de *idsA2*. La expresión relativa está determinada de acuerdo a log₂

*=Diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento

**=diferencia estadísticamente significativa entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*

considerablemente con SDS y DPPC y mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.001$ y 0.050 respectivamente) (Fig. 26). En este gen se encuentra en ambas bacterias a una baja expresión en el surfactante pulmonar entérico sin embargo en el DPPC se observa una notable represión de este gen en *M. tuberculosis*, esto concuerda con lo reportado por Griffin, Gawronski, Dejesus, Ioerger, Akerley, and Sasseti (2011) determinaron los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y colesterol en condiciones adversas (hipoxia, pH bajo e inanición) encontraron que entre los genes que se sobreexpresaron se encontraba el gen *idsA2* el cual está involucrado en la ruta de la síntesis de colesterol el cual es necesario para la supervivencia de *M. tuberculosis*. Mientras que la diferencia que hay en la expresión del gen entre bacterias en los tratamientos con SDS y DPPC hay una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.01$).

Por otro lado Schwab, Rohde, Wang, Chess, Notter, and Russell (2009), mencionan que hay más genes sobreexpresados en *M. tuberculosis* en contacto con el surfactante pulmonar completo que con extracto de lípidos del surfactante pulmonar, esto sugiere que el surfactante pulmonar entero estimulara más genes de *M. tuberculosis* que el extracto de lípidos, esto concuerda con lo observado en nuestros experimentos ya que en el Survanta hay más expresión genética en los genes de inactividad (*hspX*, *tgs1* e *idsA2*) que el DPPC, sin embargo esta diferencia está por debajo de la expresión normal. Lo anteriormente expuesto podría explicar que el conjunto de moléculas que tiene el surfactante pulmonar (lípidos, proteínas y carbohidratos etc.) tienen la capacidad de reconocer y activar genes con mayor intensidad a *M. tuberculosis* sin embargo esta activación no es suficiente para que *M. tuberculosis* entre en un estado inactivo, por otro lado se observa una sobreexpresión mediada por el Survanta de *M. bovis* en los genes de inactividad puede deberse a que el conjunto de moléculas tengan una respuesta inmunológica hacia la micobacteria y esta tienda a resistir los mecanismos tóxicos con la represión de su metabolismo normal.

Cuadro 9. Expresión del gen *idsA2*. ER (\log_2)= expresión relativa dada en \log_2 . DE=desviación estándar, *p*=valor *p*.

Bacteria	Grupo	Media ER (\log_2)	DE	P*
<i>M. tuberculosis</i>	Control	0,00	0,36	
	SDS 0.05%	-0,64	0,64	0,346
	DPPC 10mg	-0,69	0,15	0,062
	Survanta 12.5mg	-2,96	0,96	0,063
<i>M. bovis</i>	Control	0,00	0,78	
	SDS 0.05%	-14,33	0,19	0,003
	DPPC 10mg	-15,01	0,19	0,001
	Survanta 12.5mg	-2,28	0,06	0,050

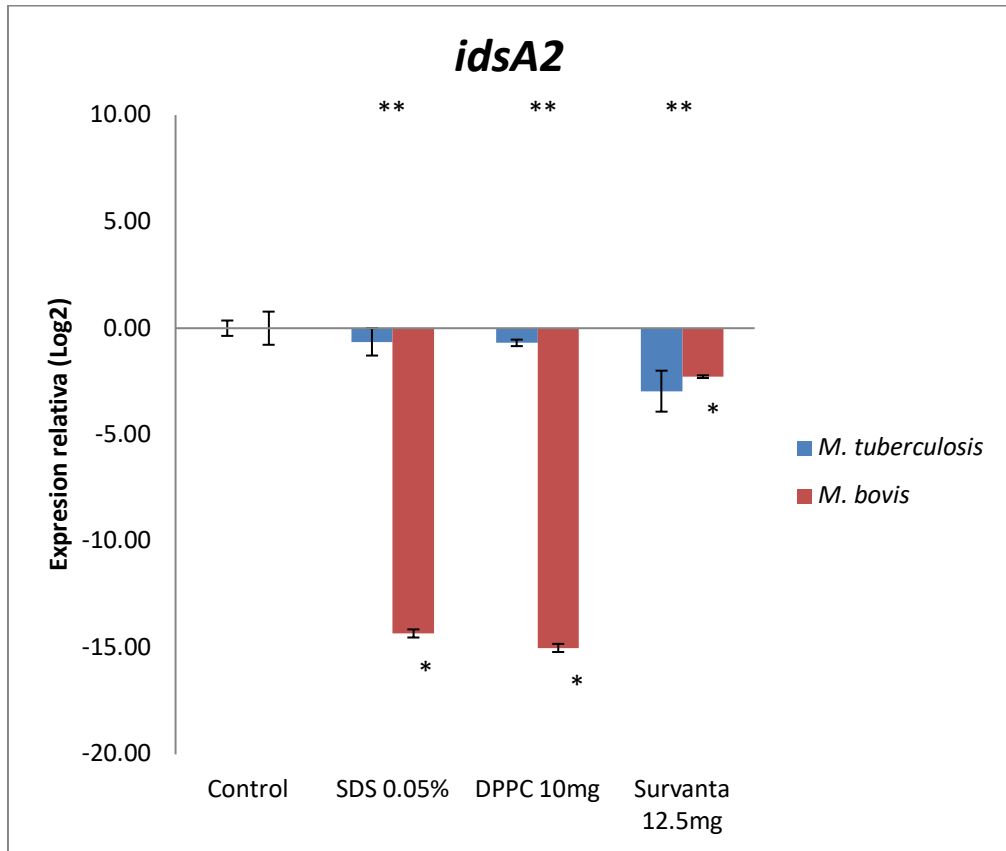


Figura 27. Expresión genética de *idsA2*. La expresión relativa está determinada de acuerdo a log₂

*=Diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento

**=diferencia estadísticamente significativa entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*

León Solís (2004) realizaron microarreglos para determinar los genes transcritos en *M. tuberculosis* expuesta al DPPC, mencionaron que encontraron sobreexpresados los genes *hspX*, *tgs1* y *idsA2*, datos que contrastan nuestros resultados, esto pueda deberse a que ellos utilizaron otra metodología en el procesamiento de las muestras.

Como se muestra existe una diferencia significativa entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, esto demuestra que en *M. tuberculosis* se encuentra metabólicamente activa en contacto con el DPPC y surfactante pulmonar completo, esta bacteria necesita los mecanismos inmunológicos (fagocitosis, opsonización, radicales libres etc.) del hospedero para entrar en un estado inactivo, mientras que *M. bovis* solo con el contacto con el surfactante pulmonar entra en una estado de dormancia , se ha reportado que el estado de dormancia es necesario para resistir los mecanismos del sistema inmunológico.

IX CONCLUSIONES

Existe una baja expresión de los genes *hspX*, *tgs1* e *idsA2* en *M. tuberculosis* cuando se trataron con SDS, DPPC y Survanta.

En *M. bovis* hay sobreexpresión de los genes *hspX* y *tgs1* en cultivo con SDS, DPPC y Survanta, sin embargo esta no fue mayor que la observada en *M. tuberculosis*. En el caso de *IdsA2* hay una baja expresión en todos los tratamientos.

En *M. tuberculosis* se observa una mayor expresión de *idsA2* con el tratamiento de Survanta que el DPPC.

El gen *rpfE* esta sobreexpresado en *M. tuberculosis* con todos los tratamientos.

El gen *rpfE* esta reprimido en *M. bovis* con todos los tratamientos.

Existen diferencias en la expresión de los genes *hspX*, *tgs1*, *rpfE* e *idsA2* entre la especie de micobacteria patógena y la no patógena.

X BIBLIOGRAFÍA

- Abuhammad, A. (2016). Cholesterol metabolism: a potential therapeutic target in Mycobacteria. *Br J Pharmacol*.
- Aguilar-Medina, M., Ramos-Payan, R., Arambula-Meraz, E., Sanchez-Torres, L., & Favila-Castillo, L. (2010). Parasitaemia levels in Plasmodium chabaudi infected-mice modify IFN-gamma and IL-10 expression after a homologous or heterologous challenge. *Parasite Immunol*, 32(4), 267-274.
- Akaki, T., Tomioka, H., Shimizu, T., Dekio, S., & Sato, K. (2000). Comparative roles of free fatty acids with reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates in expression of the anti-microbial activity of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, 121(2), 302-310.
- Anthony, R. M. (2017). Sputum microscopy and tuberculosis infectiousness. *J Infect Dis*.
- Bagchi, G., Das, T. K., & Tyagi, J. S. (2002). Molecular analysis of the dormancy response in Mycobacterium smegmatis: expression analysis of genes encoding the DevR–DevS two-component system, Rv3134c and chaperone α -crystallin homologues. *FEMS microbiology letters*, 211(2), 231-237.
- Báguena Cervellera, M. J. (1992). La Tuberculosis y su historia. *Fundación Uriach.*, ISBN 84-87452-12-4.
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271(5 Pt 1), C1424-1437.
- Bloom, B. R., & Murray, C. J. (1992). Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science(Washington)*, 257(5073), 1055-1064.
- Bodmer, T., Miltner, E., & Bermudez, L. E. (2000). Mycobacterium avium resists exposure to the acidic conditions of the stomach. *FEMS microbiology letters*, 182(1), 45-49.

- Brandsma, J., & Postle, A. D. (2017). Analysis of the regulation of surfactant phosphatidylcholine metabolism using stable isotopes. *Ann Anat*, 211, 176-183.
- Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83(1), 91-97.
- Britton, W. J., Roche, P. W., & Winter, N. (1994). Mechanisms of persistence of mycobacteria. *Trends Microbiol*, 2(8), 284-288.
- Brock, T. D. M., & Michael, T. (1993). *Microbiología*: Prentice-Hall Hispanoamericana.
- Brodin, P., Majlessi, L., Marsollier, L., de Jonge, M. I., Bottai, D., Demangel, C., Hinds, J., Neyrolles, O., Butcher, P. D., & Leclerc, C. (2006). Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infection and immunity*, 74(1), 88-98.
- Bryk, R., Griffin, P., & Nathan, C. (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*, 407(6801), 211-215.
- Caminero, J. (2003). Tuberculosis y diabetes: epidemiología de la tuberculosis. *Guía de la tuberculosis para médicos especialistas, paris, UICTEC*, 30-31, 264.
- Camus, J.-C., Pryor, M. J., Médigue, C., & Cole, S. T. (2002). Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*, 148(10), 2967-2973.
- Caruso, A. M., Serbina, N., Klein, E., Triebold, K., Bloom, B. R., & Flynn, J. L. (1999). Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol*, 162(9), 5407-5416.
- CDC, C. f. d. c. a. p. (2015). Division of tuberculosis elimination. *core curriculum on tuberculosis: what the clinician should know, 4th edition*
- Clemens, D. L., Lee, B. Y., & Horwitz, M. A. (2000a). Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* is associated with altered phagosomal fate. *Infect Immun*, 68(5), 2671-2684.

- Clemens, D. L., Lee, B. Y., & Horwitz, M. A. (2000b). Mycobacterium tuberculosis and Legionella pneumophila phagosomes exhibit arrested maturation despite acquisition of Rab7. *Infect Immun*, 68(9), 5154-5166.
- Cohen-Gonsaud, M., Keep, N. H., Davies, A. P., Ward, J., Henderson, B., & Labesse, G. (2004). Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain. *Trends Biochem Sci*, 29(1), 7-10.
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S., Eiglmeier, K., Gas, S., & II III, C. B. (1998). Erratum: Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, 396(6707), 190.
- Cole, S., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K., Thomson, N., Wheeler, P., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C., & Harris, D. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409(6823), 1007-1011.
- Colston, M. J., Cox, R. A., Ratledge, C., & Dale, J. (1999). Mycobacterial growth and dormancy. *Mycobacteria: molecular biology and virulence*, 198-219.
- Collins, H. L., & Kaufmann, S. H. (2001). The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology*, 103(1), 1-9.
- Cooper, A. M., Pearl, J. E., Brooks, J. V., Ehlers, S., & Orme, I. M. (2000). Expression of the nitric oxide synthase 2 gene is not essential for early control of Mycobacterium tuberculosis in the murine lung. *Infect Immun*, 68(12), 6879-6882.
- Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 429-453.
- Crick, D. C., Mahapatra, S., & Brennan, P. J. (2001). Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of Mycobacterium tuberculosis. *Glycobiology*, 11(9), 107R-118R.
- Cunningham, A. F., & Spreadbury, C. L. (1998). Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and

- localization of the 16-kilodalton α -crystallin homolog. *Journal of bacteriology*, 180(4), 801-808.
- Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S. C., Waterfield, M. D., Backer, J. M., & Zerial, M. (1999). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol*, 1(4), 249-252.
- Daffe, M., & Etienne, G. (1999). The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease*, 79(3), 153-169.
- Daniel, J., Maamar, H., Deb, C., Sirakova, T. D., & Kolattukudy, P. E. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathog*, 7(6), e1002093.
- Dannenberrg Jr, A. M., & Rook, G. A. (1994). Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses—dual mechanisms that control bacillary multiplication. In *Tuberculosis*, (pp. 459-483): American Society of Microbiology.
- Dheda, K., Gumbo, T., Maartens, G., Dooley, K. E., McNerney, R., Murray, M., Furin, J., Nardell, E. A., London, L., Lessem, E., Theron, G., van Helden, P., Niemann, S., Merker, M., Dowdy, D., Van Rie, A., Siu, G. K., Pasipanodya, J. G., Rodrigues, C., Clark, T. G., Sirgel, F. A., Esmail, A., Lin, H. H., Atre, S. R., Schaaf, H. S., Chang, K. C., Lange, C., Nahid, P., Udwadia, Z. F., Horsburgh, C. R., Jr., Churchyard, G. J., Menzies, D., Hesselning, A. C., Nuermberger, E., McIlleron, H., Fennelly, K. P., Goemaere, E., Jaramillo, E., Low, M., Jara, C. M., Padayatchi, N., & Warren, R. M. (2017). The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *Lancet Respir Med*.
- Dieli, F., Troye-Blomberg, M., Ivanyi, J., Fournié, J. J., Krensky, A. M., Bonneville, M., Peyrat, M. A., Caccamo, N., Sireci, G., & Salerno, A. (2001). Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular

- Mycobacterium tuberculosis by V γ 9/V δ 2 T lymphocytes. *Journal of Infectious Diseases*, 184(8), 1082-1085.
- Donoghue, H. D., Spigelman, M., Greenblatt, C. L., Lev-Maor, G., Bar-Gal, G. K., Matheson, C., Vernon, K., Nerlich, A. G., & Zink, A. R. (2004). Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *The Lancet infectious diseases*, 4(9), 584-592.
- Downing, K. J., Betts, J. C., Young, D. I., McAdam, R. A., Kelly, F., Young, M., & Mizrahi, V. (2004). Global expression profiling of strains harbouring null mutations reveals that the five rpf-like genes of Mycobacterium tuberculosis show functional redundancy. *Tuberculosis (Edinb)*, 84(3-4), 167-179.
- Draper, P. (1998). The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front Biosci*, 3, D1253-D1261.
- Dye, C. (2014). After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1645), 20130426.
- Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., & Raviglione, M. C. (1999). Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *Jama*, 282(7), 677-686.
- Ehlers, M. R., & Daffé, M. (1998). Interactions between Mycobacterium tuberculosis and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol*, 6(8), 328-335.
- Ferguson, J., & Schlesinger, L. (2000). Pulmonary surfactant in innate immunity and the pathogenesis of tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease*, 80(4-5), 173-184.
- Fisher, M. A., Plikaytis, B. B., & Shinnick, T. M. (2002). Microarray analysis of the Mycobacterium tuberculosis transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *Journal of bacteriology*, 184(14), 4025-4032.
- Flesselles, B., Anand, N. N., Remani, J., Loosmore, S. M., & Klein, M. H. (1999). Disruption of the mycobacterial cell entry gene of Mycobacterium bovis BCG results in a mutant that exhibits a reduced

- invasiveness for epithelial cells. *FEMS microbiology letters*, 177(2), 237-242.
- Fratti, R. A., Backer, J. M., Gruenberg, J., Corvera, S., & Deretic, V. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol*, 154(3), 631-644.
- Fratti, R. A., Chua, J., Vergne, I., & Deretic, V. (2003). Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5437-5442.
- Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M. d. C., Garfias, Y., Sada, I., & Lascurain, R. (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(2), 142-153.
- Griffin, J. E., Gawronski, J. D., Dejesus, M. A., Ioerger, T. R., Akerley, B. J., & Sasseti, C. M. (2011). High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog*, 7(9), e1002251.
- Griffith, D. E., & Kerr, C. M. (1996). Tuberculosis: disease of the past, disease of the present. *Journal of Perianesthesia Nursing*, 11(4), 240-245.
- Gupta, R. K., Srivastava, B. S., & Srivastava, R. (2010). Comparative expression analysis of rpf-like genes of Mycobacterium tuberculosis H37Rv under different physiological stress and growth conditions. *Microbiology*, 156(Pt 9), 2714-2722.
- Gupta, R. K., & Srivastava, R. (2012). Resuscitation promoting factors: a family of microbial proteins in survival and resuscitation of dormant mycobacteria. *Indian J Microbiol*, 52(2), 114-121.
- Gutierrez, M. C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omaïs, B., Marmiesse, M., Supply, P., & Vincent, V. (2005). Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog*, 1(1), e5.
- Haley, C. A. (2017). Treatment of Latent Tuberculosis Infection. *Microbiol Spectr*, 5(2).

- Hay, J. C. (2001). SNARE complex structure and function. *Exp Cell Res*, 271(1), 10-21.
- Henderson, R. A., Watkins, S. C., & Flynn, J. L. (1997). Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 159(2), 635-643.
- Hertz, C. J., Kiertscher, S. M., Godowski, P. J., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Roth, M. D., & Modlin, R. L. (2001). Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol*, 166(4), 2444-2450.
- Hett, E. C., Chao, M. C., Deng, L. L., & Rubin, E. J. (2008). A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor. *PLoS Pathog*, 4(2), e1000001.
- Hu, Y., Movahedzadeh, F., Stoker, N. G., & Coates, A. R. (2006). Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* alpha-crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo. *Infect Immun*, 74(2), 861-868.
- Huebner, R. E., & Castro, K. G. (1994). The changing face of tuberculosis. *Annual review of medicine*, 46, 47-55.
- James, B., Williams, A., & Marsh, P. (2000). The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium. *Journal of applied microbiology*, 88(4), 669-677.
- Joglekar, A. P., & Hay, J. C. (2005). Evidence for regulation of ER/Golgi SNARE complex formation by hsc70 chaperones. *Eur J Cell Biol*, 84(5), 529-542.
- Johansson, J., & Curstedt, T. (1997). Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *The FEBS Journal*, 244(3), 675-693.
- Kana, B. D., Gordhan, B. G., Downing, K. J., Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E. E., Tsenova, L., Young, M., Kaprelyants, A., Kaplan, G., & Mizrahi, V. (2008). The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Mol Microbiol*, 67(3), 672-684.

- Kaufmann, S. H. (2000). Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med*, 6(9), 955-960.
- Kaufmann, S. H. (2006). Tuberculosis: back on the immunologists' agenda. *Immunity*, 24(4), 351-357.
- Kaufmann, S. H., & Winau, F. (2005). From bacteriology to immunology: the dualism of specificity. *Nature immunology*, 6(11), 1063-1067.
- Kaur, K., Kumari, P., Sharma, S., Sehgal, S., & Tyagi, J. S. (2016). DevS/DosS sensor is bifunctional and its phosphatase activity precludes aerobic DevR/DosR regulon expression in Mycobacterium tuberculosis. *Febs j*, 283(15), 2949-2962.
- Konomi, N., Lebwohl, E., Mowbray, K., Tattersall, I., & Zhang, D. (2002). Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4738-4740.
- Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L. (2008). *Patología humana*: Elsevier Health Sciences.
- León Solís, L. E. (2004). *Efecto de un Surfactante Pulmonal sobre la expresión Genética de Mycobacterium tuberculosis*. Insitute Politécnico Nacional, Mexico.
- M.D. Rossman, & MacGregor, R. R. (1996). Tuberculosis : asistencia clínica y nuevos desafíos. *graw-hill, mexico*, 190-193.
- MacMicking, J. D., North, R. J., LaCourse, R., Mudgett, J. S., Shah, S. K., & Nathan, C. F. (1997). Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10), 5243-5248.
- Manganelli, R., Dubnau, E., Tyagi, S., Kramer, F. R., & Smith, I. (1999). Differential expression of 10 sigma factor genes in Mycobacterium tuberculosis. *Molecular microbiology*, 31(2), 715-724.
- Manganelli, R., Proveddi, R., Rodrigue, S., Beaucher, J., Gaudreau, L., & Smith, I. (2004). σ factors and global gene regulation in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of bacteriology*, 186(4), 895-902.

- Mathema, B., Kurepina, N. E., Bifani, P. J., & Kreiswirth, B. N. (2006). Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clinical microbiology reviews*, 19(4), 658-685.
- Mukamolova, G. V., Kaprelyants, A. S., Young, D. I., Young, M., & Kell, D. B. (1998). A bacterial cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15), 8916-8921.
- Murray, C. J., Styblo, K., & Rouillon, A. (1990). Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis*, 65(1), 6-24.
- Murray, P., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015). *Microbiología médica*: Elsevier Brasil.
- Nathan, C., & Shiloh, M. U. (2000). Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8841-8848.
- OMS. (2015). Tuberculosis.
- palmero, D. (2007). in tuberculosis 2007 from basic science to patient care. *Chaptas 17: Tuberculosis and HIV/AIDS*, www.tuberculosisistextbook.com
- Park, H. D., Guinn, K. M., Harrell, M. I., Liao, R., Voskuil, M. I., Tompa, M., Schoolnik, G. K., & Sherman, D. R. (2003). Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 48(3), 833-843.
- Pelham, H. R. (2001). SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol*, 11(3), 99-101.
- Piddington, D. L., Kashkouli, A., & Buchmeier, N. A. (2000). Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg²⁺ levels. *Infection and immunity*, 68(8), 4518-4522.
- Primm, T. P., Andersen, S. J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., & Barry, C. E. (2000). The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is

- required for long-term survival. *Journal of bacteriology*, 182(17), 4889-4898.
- Ramakrishnan, L., Federspiel, N. A., & Falkow, S. (2000). Granuloma-specific expression of Mycobacterium virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. *Science*, 288(5470), 1436-1439.
- Raviglione, M. C., Snider, D. E., & Kochi, A. (1995). Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *Jama*, 273(3), 220-226.
- Salo, W. L., Aufderheide, A. C., Buikstra, J., & Holcomb, T. A. (1994). Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(6), 2091-2094.
- Santha, T., Garg, R., Subramani, R., Chandrasekaran, V., Selvakumar, N., Sisodia, R., Perumal, M., Sinha, S., Singh, R., & Chavan, R. (2005). Comparison of cough of 2 and 3 weeks to improve detection of smear-positive tuberculosis cases among out-patients in India. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 9(1), 61-68.
- Saviola, B., Woolwine, S. C., & Bishai, W. R. (2003). Isolation of acid-inducible genes of Mycobacterium tuberculosis with the use of recombinase-based in vivo expression technology. *Infection and immunity*, 71(3), 1379-1388.
- Schabbing, R. W., Garcia, A., & Hunter, R. L. (1994). Characterization of the trehalose 6, 6'-dimycolate surface monolayer by scanning tunneling microscopy. *Infection and immunity*, 62(2), 754-756.
- Schatz, A., & Waksman, S. A. (1944). Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon Mycobacterium tuberculosis and Related Organisms. *Experimental Biology and Medicine*, 57(2), 244-248.
- Schmitz, G., & Müller, G. (1991). Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *Journal of lipid research*, 32(10), 1539-1570.

- Schwab, U., Rohde, K. H., Wang, Z., Chess, P. R., Notter, R. H., & Russell, D. G. (2009). Transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to lung surfactant. *Microb Pathog*, 46(4), 185-193.
- Selwyn, P. A., Hartel, D., Lewis, V. A., Schoenbaum, E. E., Vermund, S. H., Klein, R. S., Walker, A. T., & Friedland, G. H. (1989). A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*, 320(9), 545-550.
- Shepherd, V. L., & Lopez, J. P. (2001). The role of surfactant-associated protein A in pulmonary host defense. *Immunol Res*, 23(2-3), 111-120.
- Sherman, D. R., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Arain, T. M., Mahairas, G. G., Yuan, Y., Barry, C. E., 3rd, & Stover, C. K. (1995). Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(14), 6625-6629.
- Sherman, D. R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M. I., & Schoolnik, G. K. (2001). Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding α -crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7534-7539.
- Silver, R. F., Walrath, J., Lee, H., Jacobson, B. A., Horton, H., Bowman, M. R., Nocka, K., & Sypek, J. P. (2009). Human alveolar macrophage gene responses to *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Ra and H37Rv. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40(4), 491-504.
- Sivaramakrishnan, S., & de Montellano, P. R. (2013). The DosS-DosT/DosR Mycobacterial Sensor System. *Biosensors (Basel)*, 3(3), 259-282.
- SSA, S. d. s. (2015). Datos epidemiológicos de tuberculosis.
- St John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H., & Nathan, C. (2001). Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(17), 9901-9906.
- Storz, G., & Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol*, 2(2), 188-194.

- Susilovic-Grabovac, Z., Banfi, C., Brusoni, D., Mapelli, M., Ghilardi, S., Obad, A., Bakovic-Kramaric, D., Dujic, Z., & Agostoni, P. (2017). Diving and pulmonary physiology: surfactant binding protein, lung fluid and cardiopulmonary test changes in professional divers. *Respir Physiol Neurobiol*.
- Tascon, R. E., Stavropoulos, E., Lukacs, K. V., & Colston, M. J. (1998). Protection against Mycobacterium tuberculosis infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon. *Infect Immun*, 66(2), 830-834.
- Torrelles, J. B., & Schlesinger, L. S. (2017). Integrating Lung Physiology, Immunology, and Tuberculosis. *Trends Microbiol*.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2014). *Principles of anatomy and physiology. Hauptbd. Hauptbd.* Hoboken, N.J: Wiley.
- Tufariello, J. M., Chan, J., & Flynn, J. L. (2003). Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis*, 3(9), 578-590.
- Vergne, I., & Daffé, M. (1998). Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells. *Front. Biosci*, 3, d865-d876.
- Wayne, L. G. (1974). The Genus Mycobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24(2), 308-308.
- Young, D. B., & Robertson, B. D. (1999). TB vaccines: global solutions for global problems. *Science*, 284(5419), 1479-1480.
- Yu, K., Mitchell, C., Xing, Y., Magliozzo, R. S., Bloom, B. R., & Chan, J. (1999). Toxicity of nitrogen oxides and related oxidants on mycobacteria: M. tuberculosis is resistant to peroxynitrite anion. *Tuber Lung Dis*, 79(4), 191-198.
- Zahrt, T. C., & Deretic, V. (2002). Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses: unusual adaptations in Mycobacterium tuberculosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, 4(1), 141-159.