

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO MURINO DE TUBERCULOSIS LATENTE

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:

BLANCA ESTELA TOVAR VÁZQUEZ

DIRECTOR

DR. MAURICIO CASTAÑÓN ARREOLA

CODIRECTOR

DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra. Lilia López Cánovas

Secretario: Dr. Mauricio Castañón Arreola

Vocal: Dr. Jorge Alberto Barrios Payán

1er. Suplente: Dra. Helena Solleiro Villavicencio

2do. Suplente: Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTOR

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Profesor Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTOR

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán

Investigador en Ciencias Médicas "C"

Departamento de Patología. Sección de Patología Experimental

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

ASESORES

Dra. Lilia López Cánovas

Profesora Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Máximo Berto Martínez Benítez

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación fue desarrollado bajo la dirección de los Dres.:

- Dr. Mauricio Castañón Arreola en el laboratorio 4 del Posgrado en Ciencias Genómicas en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Plantel del Valle.
- Dr. Jorge Alberto Barrios Payán en el Laboratorio de Patología experimental en el Departamento de Patología. Sección de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

La autora recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para sus estudios de Maestría en el programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) con el número de becario 847372.

Dedicatorias y Agradecimientos

Al Dr. Jorge Alberto Barrios Payán. Por sus enseñanzas, apoyo y confianza de recibirme como su estudiante, le agradezco infinitamente por ser una parte clave de mi formación académica.

Al Dr. Mauricio Castañón Arreola. Por recibirme como su estudiante, por sus consejos y conocimientos compartidos, le agradezco la oportunidad que me dio de trabajar con usted.

A los Doctores Rogelio Hernández Pando, Dulce Adriana Mata Espinosa y Brenda Noemí Marquina Castillo. Por la oportunidad que me dieron de formar parte de su laboratorio, así como por el apoyo y enseñanzas no sólo durante la realización de este trabajo, sino durante el proceso de mi formación.

A los miembros del jurado Dra. Lilia López Cánovas, Dra. Helena Solleiro Villaviencio y Dr. José de Jesús Olivares Trejo. Por su apoyo y disposición a enriquecer con sus comentarios este trabajo.

A los doctores Lilia López Cánovas y Máximo Berto Martínez Benítez. Por haber brindado su asesoría durante la realización de este trabajo.

A cada uno de los profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas. Gracias por las enseñanzas impartidas, les agradezco por ser una parte importante de mi formación.

A cada uno de los miembros del Posgrado en Ciencias Genómicas. Porque de alguna u otra manera han estado implicados en este proceso.

A mis compañeros y amigos de generación, particularmente a Iván Corona, José Caballero, Luis Enrique Soto y Rogelio Coronado. Gracias por haberme acompañado en este proceso, por el apoyo y por todos los momentos que vivimos durante la realización de este posgrado, ha sido un privilegio trabajar a su lado.

A mis amigos incondicionales Jaqueline Rojas, Adriana Rodríguez, Gustavo Jiménez y Brian Guerrero. Por estar en todo momento, por ser mis cómplices, confidentes, motivadores y principalmente, gracias por ser mis compañeros de vida.

A todos los amigos que he encontrado en mi camino y que a pesar del tiempo y la distancia siguen formando parte de mi vida.

A mis compañeros del Laboratorio de Patología Experimental.

Y, por último, pero no menos importante, a mis padres, hermanos y el resto de mi familia. Por estar a mi lado en todo momento, porque de una u otra manera han sido una parte vital no sólo durante este proceso, sino en mi vida.

Índice

Índice de tablas.....	i
Índice de figuras.....	ii
Abreviaturas.....	iv
I. Resumen.....	vi
II. Abstract.....	vii
III. Introducción.....	1
1. Aspectos generales de la tuberculosis.....	1
1.1 Historia.....	1
1.2 Epidemiología.....	3
1.3 Agente causal.....	5
2. Patogénesis de la infección micobacteriana.....	9
2.1 Respuesta inmune contra <i>M. tuberculosis</i> durante la infección primaria.....	11
2.2 Evasión de la respuesta inmune.....	14
3. Infección por tuberculosis latente.....	14
3.1 Nichos del bacilo latente.....	16
3.2 Diagnóstico de la LTBI.....	17
3.3 Alteraciones genéticas en el patógeno durante la latencia.....	18
3.4 Progresión a enfermedad activa.....	21
IV. Antecedentes particulares.....	23
1. Estudio de la LTBI.....	23
1.1 Investigación experimental.....	25
V. Hipótesis.....	34
VI. Justificación.....	35
VII. Objetivos.....	36
VIII. Estrategia experimental.....	37
IX. Materiales y métodos.....	39
1. Preparación del inóculo.....	39
2. Simulación de infección <i>in vitro</i>	39
3. Modelo murino.....	40
3.1 Infección animal.....	40
3.2 Prueba de hipersensibilidad tipo IV (DTH).....	41
3.3 Eutanasia en los días establecidos.....	41
4. Procesamiento de muestras.....	42
4.1 Homogenización de tejido pulmonar.....	42

4.2	Determinación de carga bacilar	43
4.3	Detección de transcritos (mRNA) en tejido pulmonar y extrapulmonar	44
5.	Análisis estadístico.....	48
X.	Resultados	49
1.	Ensayo de simulación de infección	49
2.	Prueba de hipersensibilidad tipo IV (DTH)	49
3.	Determinación de carga bacilar	50
3.1	Conteo de Unidades Formadoras de Colonias	50
3.2	Cuantificación de la secuencia IS6110	52
4.	Detección de mRNA micobacteriano en tejido pulmonar	56
4.1	Cuantificación y cualificación de RNA	56
4.2	Detección de transcritos en tejido pulmonar y extrapulmonar	59
4.3	Detección de transcritos en tejido sanguíneo	68
XI.	Discusión	71
XII.	Conclusiones.....	80
XIII.	Perspectivas	81
XIV.	Bibliografía	82
Anexos	91

Índice de tablas

Tabla I. Clasificación funcional de los genes de <i>M. tuberculosis</i>.....	7
Tabla II. Distribución de genes asociados al estado latente en <i>M. tuberculosis</i>	20
Tabla III. Características esenciales en los modelos <i>in vivo</i> de TB	30
Tabla IV. Clasificación y características de los modelos murinos empleados en el estudio de la LTBI.....	33
Tabla V. Distribución de los animales durante el experimento.....	42
Tabla VI. Delección de animales para procesamiento de muestras.....	52
Tabla VII. Detección de RNA micobacteriano en muestras pulmonares y extrapulmonares	57
Tabla VIII. Detección de dianas de metabolismo activo en muestras pulmonares y extrapulmonares.....	61
Tabla IX. Resultados generales de detección de transcritos de metabolismo latente	66

Índice de figuras

Figura 1. Filogenias de <i>M. tuberculosis</i> y <i>Homo sapiens</i>..	2
Figura 2. Incidencia de TB en el mundo.	4
Figura 3. Filogenia del MTBC.	6
Figura 4. Esquema de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>..	8
Figura 5. Ciclo de vida de <i>M. tuberculosis</i>..	10
Figura 6. Organización y conformación celular del granuloma.	12
Figura 7. Casos de TB extrapulmonar en el mundo.	17
Figura 8. Prueba TST.	18
Figura 9. Proceso de activación del regulón DosR.	20
Figura 10. Número de artículos relacionados a LTBI entre 1995 y 2018.	23
Figura 11. Número de artículos relacionados a LTBI entre 2016 y 2020.	24
Figura 12. Artículos publicados por área de investigación entre 1995 y 2018.	25
Figura 13. Condiciones empleadas en el establecimiento de modelos <i>in vitro</i> de LTBI	27
Figura 14. Modelos animales empleados en la investigación de la TB.	28
Figura 15. Modelos <i>in vivo</i> del ciclo inmunológico de la TB humana.	29
Figura 16. Diseño experimental general del trabajo.	38
Figura 17. Simulación de infección.	40
Figura 18. Induración en cojinete plantar.	41
Figura 19. Procesamiento del tejido pulmonar.	42
Figura 20. Procedimiento de extracción de RNA de tejido pulmonar.	45
Figura 21. Distribución de frecuencias de las dosis de infección.	49
Figura 22. Prueba DTH.	50
Figura 23. Carga bacilar en pulmones de ratones infectados.	51
Figura 24. Porcentaje de animales con UFCs negativas.	51
Figura 25. Concentración de DNA micobacteriano en tejido pulmonar.	53
Figura 26. Curva estándar para IS6110.	54
Figura 27. Determinación de la carga bacteriana por detección de IS6110.	55

Figura 28. Concentración de RNA micobacteriano en tejido pulmonar y extrapulmonar.....	58
Figura 29. Amplicones de los genes del metabolismo activo.....	59
Figura 30. Curva estándar para <i>ftsZ</i>.....	60
Figura 31. Curva estándar para <i>rrna-pcl1</i>.....	60
Figura 32. Amplicones de los genes del metabolismo latente.	61
Figura 33. Curvas estándar para genes de metabolismo latente... ..	62
Figura 34. Positividad al gen <i>dosT</i> en tejido pulmonar y extrapulmonar.	63
Figura 35. Positividad al gen <i>dosR</i> en tejido pulmonar y extrapulmonar.	64
Figura 36. Positividad al gen <i>hspX</i> en tejido pulmonar y extrapulmonar.	65
Figura 37. Positividad al gen <i>icl</i> en tejido pulmonar y extrapulmonar.....	66
Figura 38. Expresión de genes de metabolismo latente por rt-qPCR en tejido pulmonar y extrapulmonar.. ..	67
Figura 39. Detección de material genético del hospedero y la micobacteria en ácidos nucleicos extraídos de sangre periférica.....	68
Figura 40. Positividad a genes de metabolismo activo y latente en sangre.	69
Figura 41. Resumen de los resultados obtenidos.	70

Abreviaturas

- cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario
- DC: Célula dendrítica
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DTH: Hipersensibilidad de tipo retardado
- ETOH: Etanol
- g: gramos
- H₂O: Agua
- IGRA: Ensayo de liberación de INF- γ
- IL: Interleucina
- INF- γ : interferón gamma
- LTBI: Infección por tuberculosis latente
- m: metro
- M: Molar
- mg: miligramo
- min: minuto
- mL: mililitro
- mm: milímetro
- mM: milimolar
- M ϕ : Macrófago
- mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero
- *Mtb*: *Mycobacterium tuberculosis*
- MTBC: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*
- pb: pares de bases
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PE: Familia de proteínas con motivos Prolina-Ácido Glutámico a nivel extremo N-terminal
- pmol: picomolar
- PPE: Familia de proteínas con motivos Prolina-Prolina-Ácido Glutámico a nivel extremo N-terminal
- qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

- RNA: Ácido ribonucleico
- rpm: revoluciones por minuto
- rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal
- RT: Retrotranscripción
- RT-PCR: Retrotranscripción acoplada a la PCR
- s: segundo
- TB: Tuberculosis
- T_m: Temperatura de fusión
- TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa
- TST: Prueba de la tuberculina
- UFC: Unidad Formadora de Colonias
- VBNC: Viable no cultivable
- VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- Vol.: Volumen
- μ g: microgramo
- μ L: microlitro
- μ m: micrómetro

I. Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa de importancia mundial, causada en gran proporción por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Se estima que un cuarto de la población mundial está infectada con el bacilo, manteniendo un estado asintomático denominado tuberculosis latente (LTBI). Esta condición puede mantenerse en el individuo durante toda su vida, y ante un evento de inmunosupresión, puede reactivarse la infección estableciéndose una enfermedad activa. El conocimiento sobre la infección latente es escaso debido especialmente a la carencia de un modelo *in vivo* de infección latente inducida naturalmente.

En el presente estudio, se planteó la caracterización de un modelo murino de tuberculosis latente basado en una dosis baja de infección, que permite establecer un control inmune por parte del hospedero, promoviendo la transición de las micobacterias a un estado de latencia. Se utilizaron ratones macho de la cepa BALB/c, que fueron infectados con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. Se evaluó la carga bacilar en pulmón a los 7, 30, 150 y 210 días post-infección, y se seleccionaron los animales negativos por cultivo, en los cuales fue evaluada la presencia de DNA de *M. tuberculosis* en tejido pulmonar, así como la expresión de genes de la micobacteria asociados al estado latente, tanto en tejido pulmonar como extrapulmonar.

Los resultados obtenidos, revelaron que al infectar intratraquealmente a los ratones con dosis de 10 UFC, se establece un control adecuado de la infección, manifestándose en ellos una infección latente. Esto fue comprobado mediante la detección de micobacterias viables no cultivables en tejido pulmonar y confirmando su diseminación a tejido extrapulmonar, característica de la infección latente en humanos. La viabilidad y el estado metabólico de la micobacteria se determinó mediante la detección de biomarcadores asociados a la latencia micobacteriana como: *dosR*, *dosT*, *icl* y *hspX*.

Se encontró que el número de animales con infección latente aumenta con respecto al tiempo, teniendo a los 210 días post-infección (7 meses) el mayor porcentaje de éstos.

Nuestros resultados sugirieron que si se emplean dosis bajas de micobacterias se puede establecer una infección latente sin necesidad de administrar antibióticos.

II. Abstract

Tuberculosis (TB) is a worldwide infectious disease, which is caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. About a quarter of the world's population is infected with the bacillus, which remains in an asymptomatic state, known as latent tuberculosis infection. This condition can be maintained in the individual for a lifetime; however, latent tuberculosis infection (LTBI) can be reactivated with an immunosuppression event, establishing active disease. Knowledge about this disease stage is poor due to the lack of an *in vivo* model of LTBI naturally induced.

The study aimed to characterize a murine LTBI model, evaluating a low dose of infection, which allowed establishing an immune control by the host, promoting the transition of mycobacteria to a state of latency. Male mice of the BALB / c strain were infected with the *M. tuberculosis* H37Rv strain and sacrifice kinetics was evaluated at 7, 30, 150, and 210 days post-infection. CFUs were determined in the lung to identify animals with negative culture, in which the presence of genetic material of *M. tuberculosis* was evaluated as well as latency genes expression, both in lung tissue and in extrapulmonary tissue.

The results obtained revealed that in mice infected with doses of 10 CFU, adequate control of the infection is established by the immune system of some animals, manifesting in them a latent infection. This was corroborated detecting viable non-cultivable mycobacteria in lung tissue and confirming their spread to extrapulmonary tissue; it is characteristic of LTBI in humans. We confirm the viability besides the metabolic status, by detecting biomarkers expression associated with mycobacterial latency such as *dosR*, *dosT*, *icl*, and *hspX*. The number of animals with latent infection increases over time, being at 210 days post-infection (7 months), detecting the highest percentage.

Our results suggested that establish a model of immunologically induced latent tuberculosis is possible using low doses of *M. tuberculosis*, without the administration of antibiotics to induce LTBI.

III. Introducción

1. Aspectos generales de la tuberculosis

1.1 Historia

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa, principalmente respiratoria, que ha coexistido con los humanos desde el inicio de la historia del hombre (Brites y Gagneux, 2015). Análisis comparativos de filogenias de *Homo sapiens* (*H. sapiens*) y el agente causal de la TB, *Mycobacterium tuberculosis*, han mostrado un patrón de agrupación muy similar (Figura 1), ambas de origen africano, y presentan una posterior distribución geográfica global (Barbier y Wirth, 2017).

Aunado a lo anterior, se han descrito signos de enfermedad tuberculosa en restos momificados egipcios (Zink *et al.*, 2007), además, las descripciones médicas de distintas culturas, que datan de más de 3,000 años de antigüedad, sugieren la presencia de la enfermedad, describiéndola como contagiosa, con afectación pulmonar y mortal (Barberis *et al.*, 2017).

La enfermedad alcanzó su mayor apogeo a finales del siglo XVII y mitad del XIX, presentando una tasa de mortalidad elevada en la población estadounidense y europea, logrando la identificación y aislamiento del agente causal en 1882 por Robert Koch. Este último acontecimiento permitió la mejora de las condiciones sanitarias y sociales de la población, el desarrollo de la vacuna BCG, el descubrimiento de la prueba cutánea de la tuberculina y de fármacos antimicobacterianos, lo cual condujo casi a su erradicación, sin embargo, para el año 1985, se reportó una reemergencia de la enfermedad, asociada principalmente a la pandemia causada por el VIH (Rastogi *et al.*, 2001).

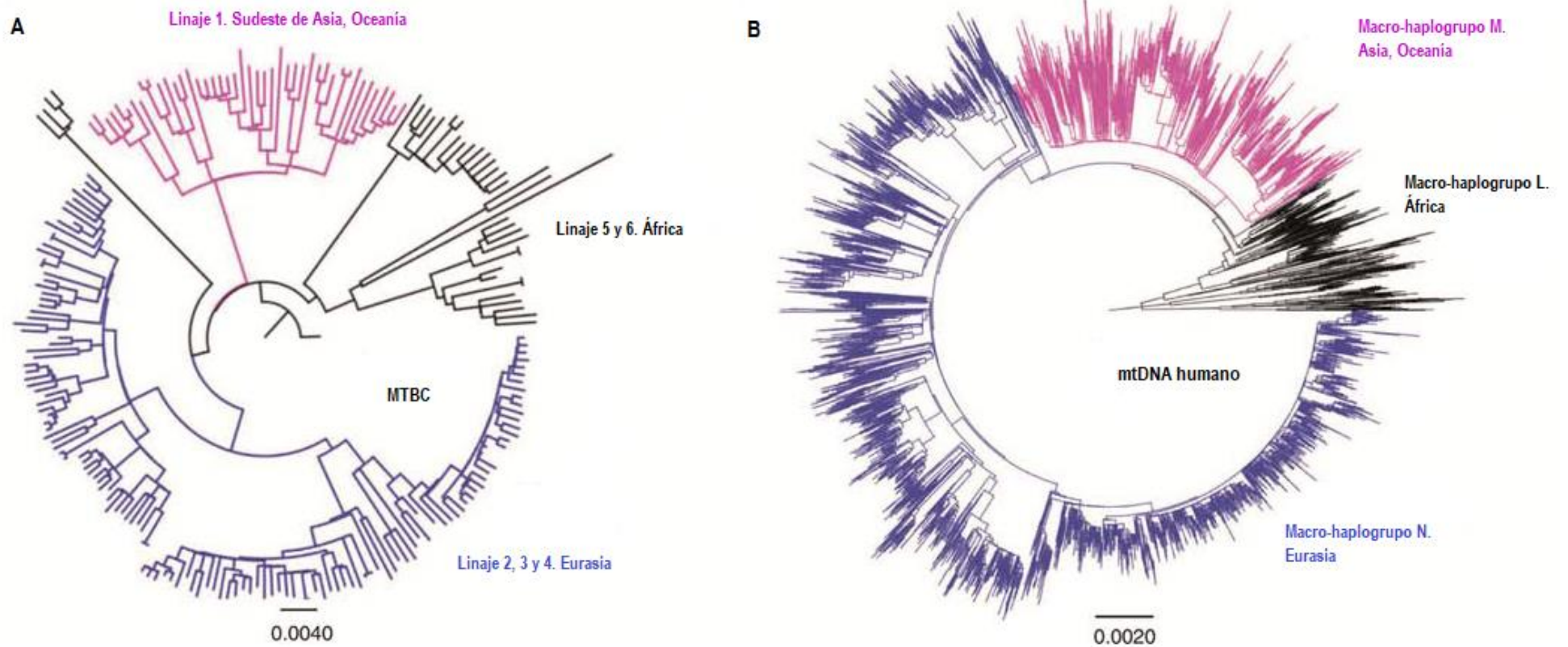


Figura 1. Filogenias de *M. tuberculosis* y *Homo sapiens*. (A) Filogenia de *M. tuberculosis*; (B) Filogenia derivada de genomas mitocondriales representativos de los principales haplogrupos mitocondriales humanos. Modificada de: Barbier y Wirth, 2017.

1.2 Epidemiología

Actualmente, la TB representa un problema de salud pública a nivel mundial, ya que la población se enfrenta a una epidemia que de acuerdo la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente causa 10 millones de nuevos casos y 1.4 millones de muertes, ubicándola como la novena causa de muerte en el mundo y la primera a causa de un solo agente infeccioso (Global tuberculosis report WHO, 2020). La distribución de la enfermedad es global, sin embargo, se reporta una concentración de casos en el Sureste Asiático (44% de los nuevos casos), seguida por la región de África (25%) y el Pacífico Occidental (18%), mientras que en menor proporción se encuentran en América (2.9%) y Europa (2.5%) (Figura 2). Para el año 2019, en México se reportaron 29,000 casos nuevos y 2490 muertes (Perfil de tuberculosis: México, WHO, 2019).

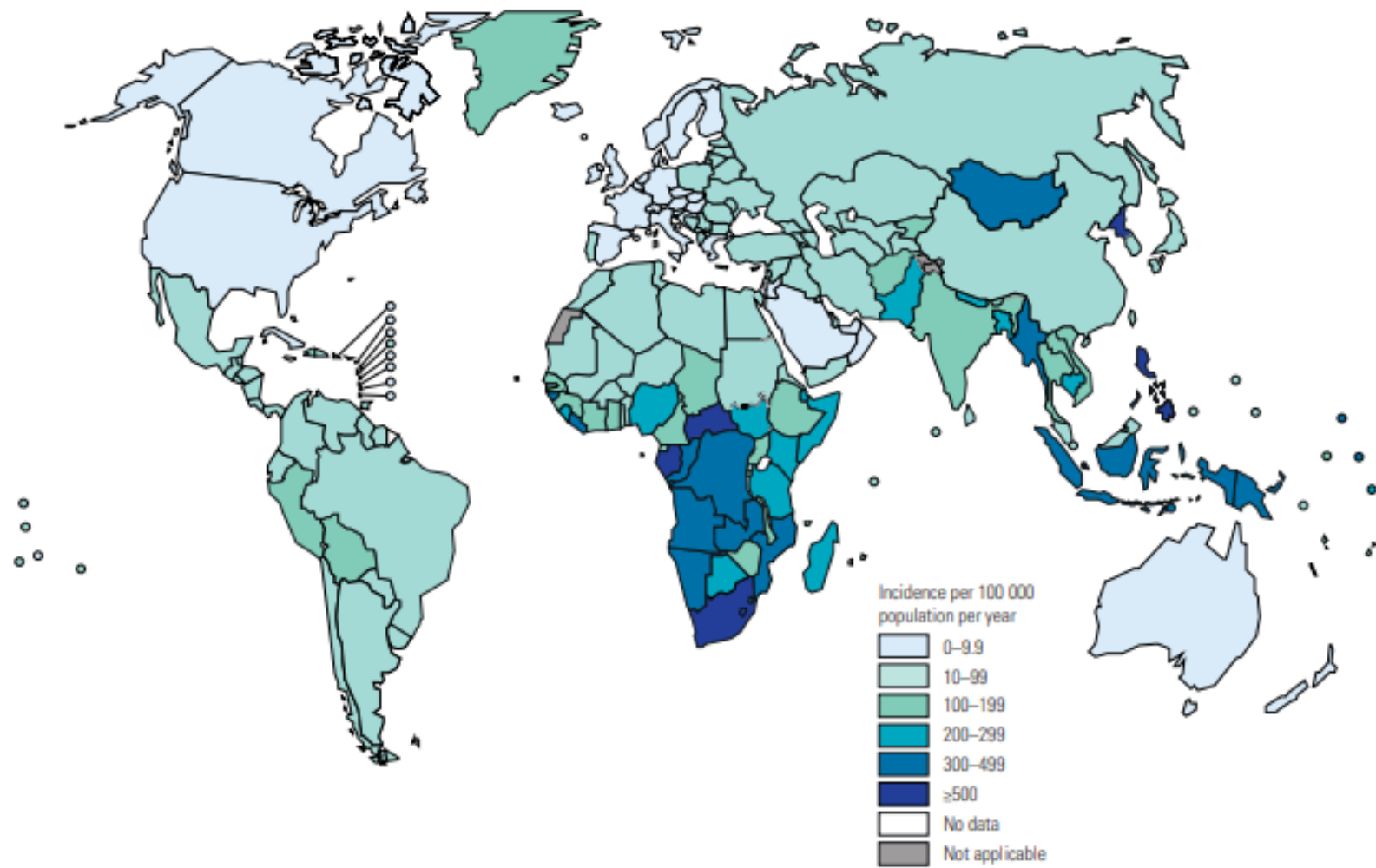


Figura 2. Incidencia de TB en el mundo. Incidencia estimada por cada 100 000 habitantes en el año 2019. *Global tuberculosis report WHO, 2020*

1.3 Agente causal

1.3.1 Clasificación

Las micobacterias se clasifican taxonómicamente de la siguiente manera:

- Phylum: *Actinobacteria*
 - Clase: *Actinobacterias*
 - Subclase: *Actinobacteridae*
 - ❖ Orden: *Actinomycelates*
 - Suborden: *Corynebacterineae*
 - ◆ Familia: *Mycobacteriaceae*
 - Género: *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* engloba a una serie de microorganismos saprófitos ambientales de vida libre, patógenos estrictos y oportunistas, que afectan tanto a humanos como a animales. Entre las especies patógenas se encuentra a: *M. avium*, *M. simiae*, *M. kansasii*, *M. haemophilum*, *M. marinum*, entre otros patógenos oportunistas, y a los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), que son patógenos estrictos (Goodfellow y Magee, 1998).

El MTBC engloba a un grupo de especies que comparten un 99% de identidad de nucleótidos, los cuales afectan a un amplio rango de mamíferos hospederos. Comprende a las especies *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* y *M. tuberculosis*, el principal causante de TB en humanos, su único hospedero y reservorio conocido (Barbier y Wirth, 2017). *M. tuberculosis* y *M. africanum* se han subdividido en siete linajes (Figura 3), los cuales presentan un bajo pero significativo grado de diversidad genómica, así como una distribución geográfica característica (Correa-Macedo *et al.*, 2019):

- Linaje 1: linaje Indo-Oceánico
- Linaje 2: Linaje del Este Asiático
- Linaje 3: Linaje del Este Africano y Asia Central
- Linaje 4: Linaje Euroamericano
- Linaje 5 y 6: Linaje del Oeste Africano
- Linaje 7: Linaje restringido a Etiopía

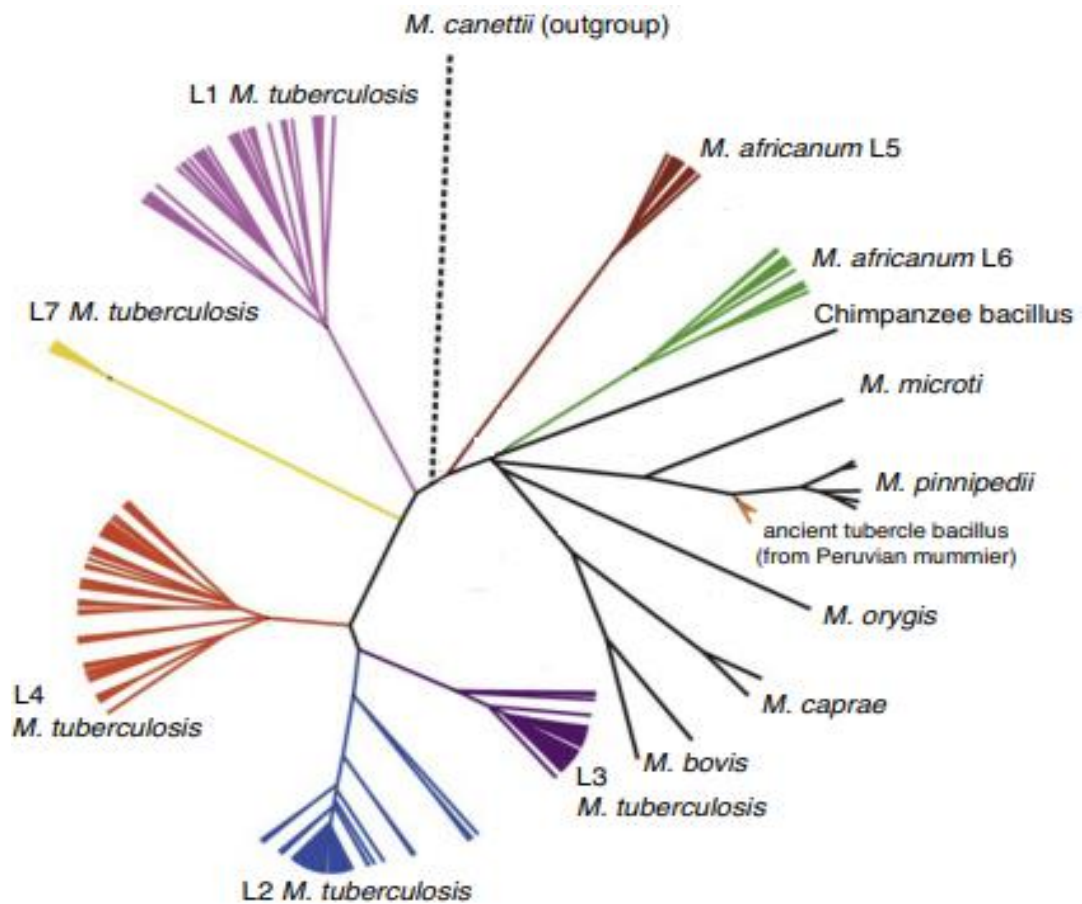


Figura 3. Filogenia del MTBC. Relaciones basadas en polimorfismos de nucleótido único (SNP) de genomas micobacterianos. Tomada de Barbier y Wirth, 2017.

1.3.2 *Mycobacterium tuberculosis*

1.3.2.1 Características generales

M. tuberculosis es un bacilo intracelular de 2-10 μm de longitud y 0.2-0.6 μm de grosor, de crecimiento lento, con eventos replicativos cada 14 a 24 horas, que desarrolla colonias visibles entre 10 a 28 días (Cook *et al.*, 2009). Generalmente son bacterias aeróbicas obligadas, inmóviles, no productoras de esporas, resistentes a la decoloración con alcohol ácido (BAAR del inglés: bacillus acido-alcohol resistant), debido al alto contenido de lípidos en su pared celular, los cuales representan hasta un 80% del contenido (Caminero Luna, 2003).

Poseen un genoma de 4,411,532 pb con un contenido rico en guanina y citocina (62-70%), en el cual se han identificado más de 4,000 genes codificantes, que se han agrupado en 11 categorías funcionales (Tabla I) (Camus *et al.*, 2002).

Tabla I. Clasificación funcional de los genes de *M. tuberculosis*

Clase	Función	Número de genes
0	Virulencia, adaptación	99
1	Metabolismo de lípidos	233
2	Vías de comunicación	229
3	Procesos celulares y síntesis de pared	708
4	RNAs estables	50
5	Secuencias de inserción	149
6	Proteínas PE y PPE	170
7	Metabolismo intermediario y respiración	894
8	Proteínas con función desconocida	272
9	Proteínas reguladoras	189
10	Proteínas hipotéticas conservadas	1051

1.3.2.2 Pared celular micobacteriana

La principal característica de las micobacterias es su pared celular ya que posee una alta complejidad molecular. Son clasificadas como Gram positivas, a pesar de que su alto contenido de lípidos las hace impermeables a la tinción Gram, pero poseen características de bacterias Gram negativas, presentan una capa de peptidoglicano estructuralmente similar a la presente en bacterias Gram negativas, además de lipoarabinomanano (LAM), análogo al lipopolisacárido que forma la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Ray y Ryan, 2010; Abrahams y Besra, 2018).

La pared celular se compone de tres elementos principales que, en conjunto se denominan micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (AGP), y que se encuentran unidos covalentemente (Figura 4), (Alderwick *et al.*, 2015; Jankute *et al.*, 2015 & Abrahams y Besra, 2018):

- Peptidoglicano: es un polímero reticulado de residuos alternados de N-acetilglucosamina y residuos de ácido N-acetilmurámico.
- Arabinogalactano: es un polisacárido altamente ramificado, compuesto de galactosa y residuos de arabinosa en forma de anillo de furanosa.
- Ácidos micólicos de cadena larga con alto peso molecular (60-90 Carbonos).

Adicionalmente, se encuentran anclados de manera no covalente en la membrana interna y externa, glicolípidos, fosfatidil-myo-inositol (PIM) manósidos, lipomanana (LM) y lipoarabinomanana (LAM).

En conjunto, estos elementos proporcionan forma, rigidez, integridad y permeabilidad a la pared, asimismo, están relacionados con el control de la división celular, y son importantes para la resistencia a agentes físicos y químicos, la modulación de la interacción con el hospedero y la patogenicidad de *M. tuberculosis* (Jankute *et al.*, 2015; Abrahams y Besra, 2018).

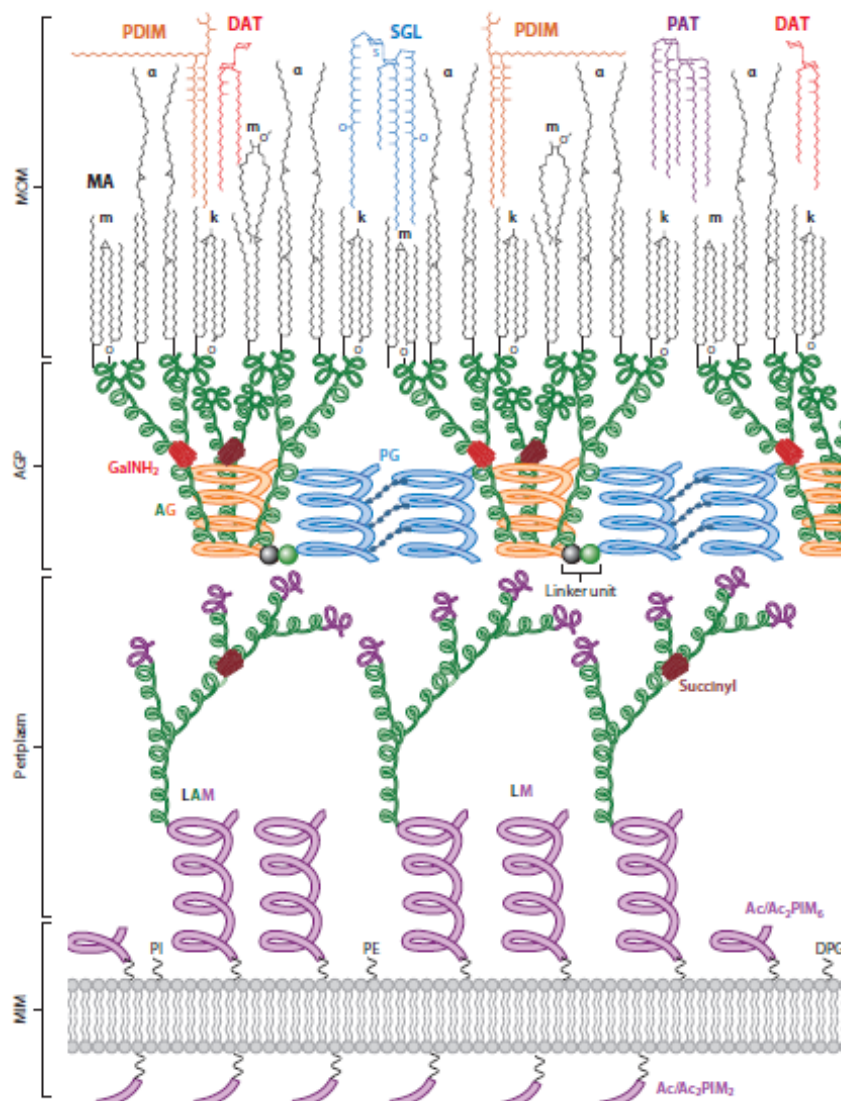


Figura 4. Esquema de la pared celular de *M. tuberculosis*. Ac/Ac₂PIM₂: fosfatidil-myo-inositol-dimanósido tri/tetra-acilado; Ac/Ac₂PIM₆: fosfatidil-myo-inositol-hexamánósido tri-/tetra-acilado; AG: arabinogalactana; AGP: complejo arabinogalactana-peptidoglicano; DAT: diaciltrehalose; DPG: difosfatidilglicerol; GalNH₂: residuos de galactosamina; k: ceto-; LAM: lipoarabinomanana; LM: lipomanana; m: metoxi; MA: ácidos micólicos; MIM: membrana interna micobacteriana; MOM: membrana externa micobacteriana; PAT: poliactiltrehalosa; PDIM: tiocerosol dimicocerosato; PE: fosfatidiletanolamina; PG: peptidoglicano; PI: fosfatidil-myo-inositol; SGL: sulfoglicolípido. Tomada de Jankute *et al.*, 2015.

2. Patogénesis de la infección micobacteriana

La ruta de infección de *M. tuberculosis* es a través de la inhalación de bacilos contenidos en aerosoles expelidos por pacientes con enfermedad activa, al hablar, toser o estornudar, los cuales contienen de 1 a 3 bacilos, suficientes para establecer infección en el hospedero (Arango, 2015). En menos del 25% de los contactos la infección es exitosa, resultando ya sea en TB activa (menos del 10% de estos casos), progresando a enfermedad activa dentro de los primeros dos años posteriores, probablemente debido a un ineficiente control de la infección primaria, o bien, la infección puede permanecer como enfermedad latente (más del 90% de casos), en donde se logra controlar, pero no eliminar la infección inicial, representando un reservorio del patógeno en la población, el cual puede progresar a enfermedad activa en algún momento (Figura 5) (Lin y Flynn, 2019; Luo *et al.*, 2019).

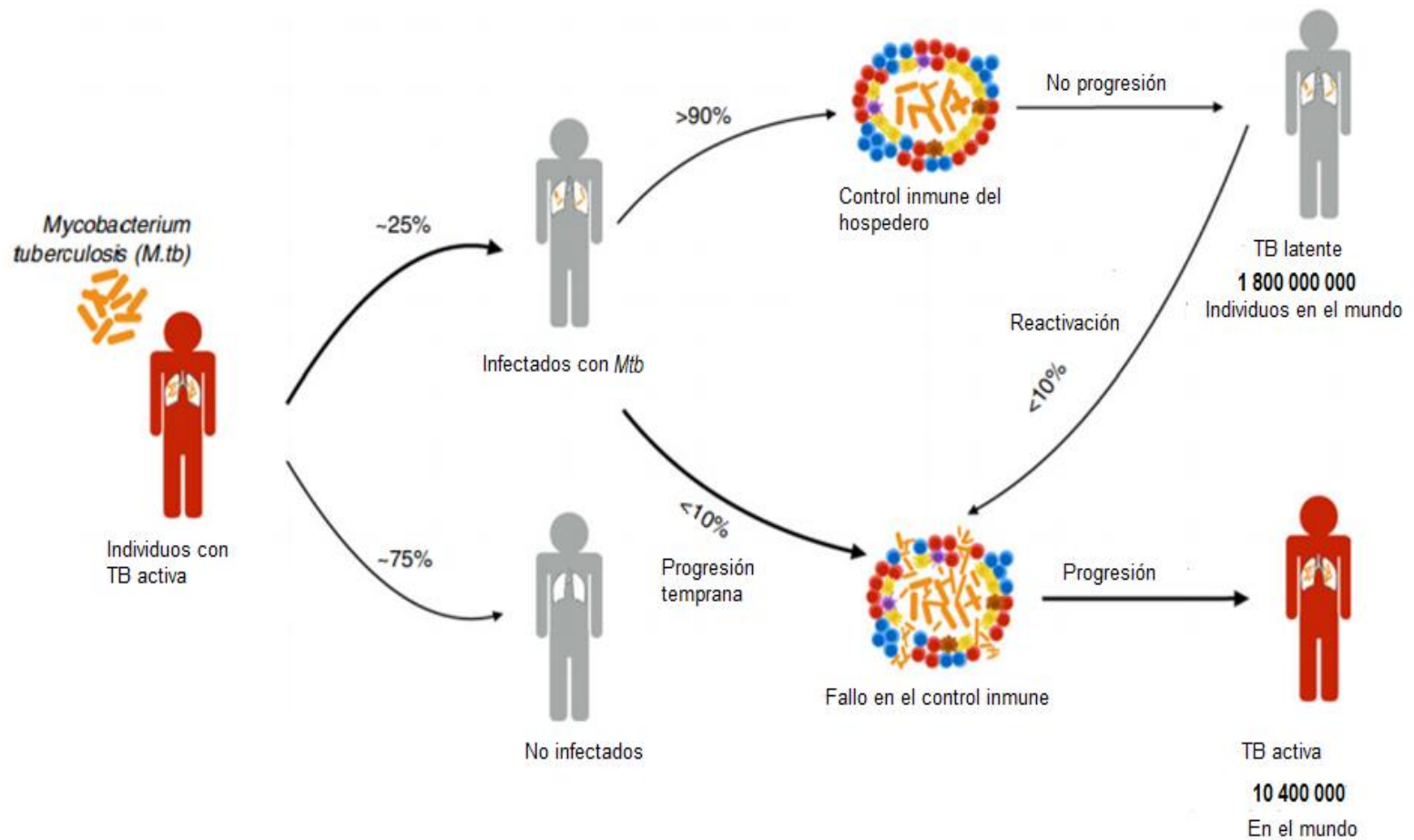
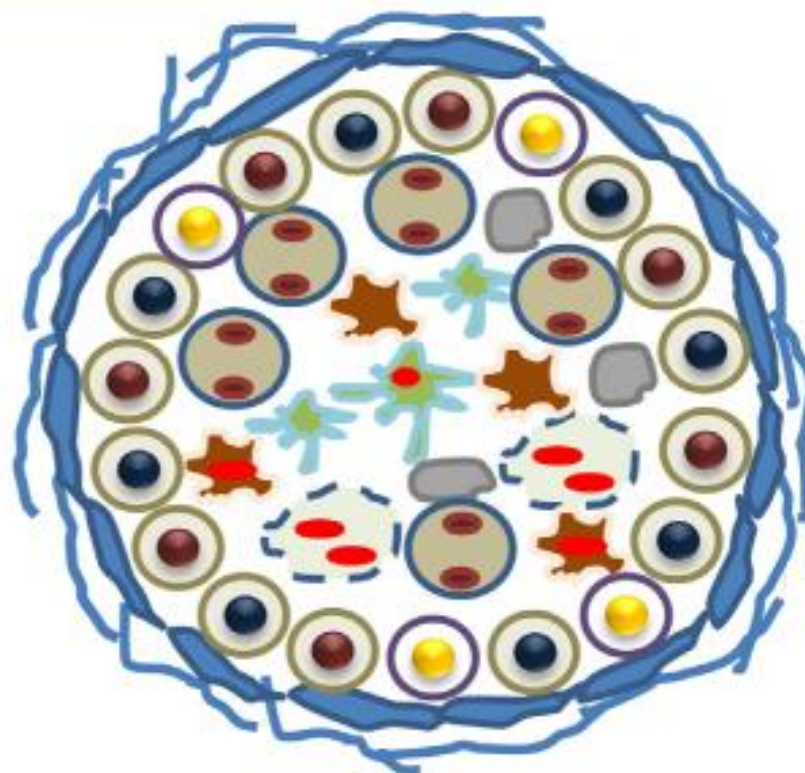


Figura 5. Ciclo de vida de *M. tuberculosis*. La infección por *M. tuberculosis* desencadena una respuesta por parte del sistema inmune del hospedero que deriva en la eliminación, control o progresión de la infección, presentando las dos variantes de la enfermedad en la población: TB activa o LTBI. Tomada y editada de Luo et al., 2019.

2.1 Respuesta inmune contra *M. tuberculosis* durante la infección primaria

Una vez que los bacilos entran a las vías respiratorias, se translocan a la parte inferior del tracto respiratorio, en donde deben ocurrir dos eventos: el establecimiento de la infección y la progresión a enfermedad activa, simultáneamente se establece una respuesta de protección por parte del sistema inmunológico del hospedero, que puede llevar al control temprano de la infección mediante componentes celulares (macrófagos (MØ) alveolares, células T, células natural killer (NK), etc.) y no celulares (péptidos antimicrobianos). Los MØ alveolares, internalizan a la micobacteria mediante fagocitosis mediada por receptores, la interacción con receptores Fc (FcR) y receptores tipo Toll (TLR), estimulan los mecanismos de defensa del hospedero, mientras que la interacción con receptores del complemento promueve la supervivencia de la micobacteria (Kaufmann, 2001). Una vez que los MØ fagocitan a la micobacteria, secretan citocinas y quimiocinas (como IL-1, IL-12, TNF- α) que, en conjunto con componentes estructurales de la pared celular micobacteriana como la LAM, la lipoproteína de 19kDa y glicoproteínas, reclutan a otras células, como neutrófilos, monocitos o células dendríticas (DC) al parénquima pulmonar. Las DC pueden fagocitar a la micobacteria y transportarse a nódulos linfáticos regionales, en donde llevan a cabo la presentación antigénica a linfocitos T vírgenes, promoviendo la diferenciación y proliferación de linfocitos T, éstos regresan al sitio de infección y se organizan alrededor de los MØ infectados iniciando la formación de granulomas (Herrera Barrios *et al*, 2005; Lin y Flynn, 2019).

Los granulomas son hallmarks histopatológicos de la TB, formados en respuesta a un estímulo persistente. Se localizan en el sitio de infección siendo una zona de intercambio entre el hospedero y el patógeno, están organizados en una estructura esférica cuya arquitectura básica está compuesta por un núcleo central necrótico acelular, denominado caseoso, rodeado principalmente por MØ en diversas etapas de activación, neutrófilos, células dendríticas y células epitelioides, que a su vez están sitiados por linfocitos T CD4+ y CD8+ y linfocitos B, contenidos por un borde fibrótico periférico (Figura 6) (O'Garra *et al.*, 2013). Su función es contener y prevenir la diseminación de la infección, proveyendo un microambiente en el que los MØ puedan controlar o eliminar el crecimiento micobacteriano (Peddireddy *et al.*, 2017).



Granuloma

Figura 6. Organización y conformación celular del granuloma. El reconocimiento y la fagocitosis de *M. tuberculosis* por macrófagos inducen la formación del granuloma. Se muestra un esquema representativo de las células inmunes que lo conforman y la organización que adquieren tras su reclutamiento. Modificada de Peddireddy et al., 2017.

2.1.1 Inmunidad innata

Al tratarse de un organismo intracelular, la erradicación de *M. tuberculosis* requiere de la participación de células inmunes (MØ, neutrófilos, DC, células NK, mastocitos) y el complemento, responsables de la respuesta inmunidad innata (de Martino *et al.*, 2019). El DNA micobacteriano presente en el citosol, vesículas secretadas por la micobacteria o bien, componentes de la pared bacteriana como la LAM, la lipoproteína de 19 kDa o glicoproteínas, son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) entre ellos el TLR2 de los MØ, que al ser activado induce una respuesta de interferón tipo I (Abbas *et al.*, 2018). Los MØ, células NK y las DC, secretan citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-15, que favorecen la síntesis de IFN- γ , el cual activa a los MØ favoreciendo la eliminación de las micobacterias localizadas en el fagolisosoma, a través de la producción de sustancias microbicidas como especies reactivas de oxígeno (ROS) e intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) (Sakamoto, 2012; O'Garra *et al.*, 2013).

2.1.2 Inmunidad adaptativa

Los linfocitos T CD4+ al diferenciarse en células T_H1, expresan al ligando CD40 y secretan INF- γ , lo cual estimula la secreción de TNF- α por MØ activados. Esta citocina actúa de manera autocrina, promoviendo que los MØ produzcan elevadas concentraciones de bactericidas, como intermediarios reactivos de oxígeno (RNI), óxido nítrico (NO) y enzimas lisosómicas, lo que resulta en la muerte de las micobacterias fagocitadas que residen dentro de los fagolisosomas. El papel de estos linfocitos es particularmente relevante en las primeras etapas de la infección.

Por otra parte, los linfocitos T CD8+ reconocen los antígenos de *M. tuberculosis* presentados por el Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I (MHC-I), promoviendo la secreción de IL-2, IFN- γ y TNF- α , requeridas para la activación de MØ, además, estos linfocitos secretan perforina y granulosa, proteínas que tienen actividad citolítica contra la micobacteria o bien contra células infectadas, privando a la micobacteria de su principal nicho (Kaufmann, 1993; Sakamoto, 2012; Abbas *et al.*, 2018; de Martino *et al.*, 2019).

2.2 Evasión de la respuesta inmune

Las micobacterias han coevolucionado con el humano a lo largo de miles de años, por lo cual han desarrollado estrategias que le han permitido adaptarse al ambiente intracelular del MØ, creando un nicho para su supervivencia. Una de las estrategias empleadas por este patógeno, es la detención de la maduración de los fagosomas, sin embargo, el cómo lo hace no ha sido totalmente entendido. Se ha reportado que algunos bacilos son capaces de prevenir la fusión fagolisosómica mediante la expresión de productos como ESAT-6 (del inglés: 6 kDa early secretory antigenic target), CFP-10 (del inglés: 10 kDa culture filtrate antigen) y ATP1/2 (del inglés: secretion ATPase1/2), lo cual, además de inhibir la maduración fagocítica, previene la acumulación de ATP vacuolar, impidiendo la acidificación del compartimento fagosómico (Peddireddy et al., 2017; Zhai et al., 2019). La proteína Coronina 1, también conocida como TACO (del inglés: Tryptophan aspartate containing coat), es reclutada a la membrana fagosomal, y el aumento de su expresión y su asociación estable evita la maduración fagosómica (Flynn y Chan, 2003).

Por otra parte, se sabe que la infección por *M. tuberculosis* conduce a la apoptosis, necroptosis y autofagia de células infectadas (particularmente de MØ), sin embargo, el bacilo ha desarrollado mecanismos que previenen estos procesos para favorecer su supervivencia, además, se ha visto que es capaz de inhibir la expresión de genes involucrados en el procesamiento y presentación de antígenos de células presentadoras de antígenos (APC del inglés: antigen-presenting cell); de promover la señalización prolongada por TLR2, incrementando de esta manera la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, IL-4 y TGF- β e inhibidores de INF- γ , bloqueando así la activación de MØ (Peddireddy et al., 2017). Productos micobacterianos como ManLAM se han visto relacionados a la inhibición de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS del inglés: inducible nitric oxide synthase), impidiendo la producción de NO (un potente agente micobactericida), el bloqueo del efecto tóxico en contra de la micobacteria conduce a su supervivencia (Zhai et al., 2019).

3. Infección por tuberculosis latente

A pesar de los esfuerzos para entender cómo es que *M. tuberculosis* permanece viable en un hospedero por tiempos prolongados, no ha sido posible determinarlo. Se cree que una vez que se establece una respuesta contra el patógeno, se alcanza un proceso

de adaptación que permite la supervivencia de la micobacteria, pero hasta ahora esto aún permanece desconocido, por lo que definir a este estadio de la micobacteria ha representado un problema, pues actualmente no existe un término consenso para definirlo.

Se ha denominado a estos bacilos como “*latentes*”, “*persistentes*” y “*durmientes*”, cada uno de estos términos haciendo alusión a alguna de las características que presentan los bacilos durante este estadio de la enfermedad. Independientemente del término que se emplee, tienen puntos en común: un estímulo externo induce al bacilo a entrar en este estadio, y es un estado reversible en el que la micobacteria permanece viable y puede restaurar su habilidad de división. Por lo cual podemos definir al estado latente como: “*un estado reversible de baja actividad metabólica durante el cual las células cesan su división, pero no mueren, previniendo su erradicación del cuerpo infectado y favoreciendo su persistencia por periodos indeterminados*” (Kaprelyants *et al.*, 1993; Batyshina y Schwartz, 2019).

La LTBI se define como: “*un estado de respuesta inmune persistente a M. tuberculosis en ausencia de evidencia clínica o radiológica de la enfermedad*” (Mayito *et al.*, 2019). La OMS estima que el 23% de la población mundial (1 700 millones de personas) tiene LTBI, y una pequeña proporción de estos (5-10% de casos) progresará para desarrollar la enfermedad en algún momento de su vida (Global tuberculosis report WHO, 2020).

Una de las principales características de un bacilo latente es que expresa características de células viables no cultivables (VBNC), un estado en donde las bacterias mantienen su viabilidad, pero no pueden ser cultivadas fácilmente (Barer *et al.*, 1993). Estas células poseen una membrana intacta que protege su material genético, son metabólicamente activas, llevan a cabo procesos vitales como respiración, transcripción y por lo tanto producción de mRNA, lo cual permite su detección de manera indirecta, ya que es posible evaluar su expresión génica mediante RT-PCR, y dado que el mRNA tiene un tiempo de vida muy corto, la detección de una señal positiva nos indicaría la presencia de células viables, sin embargo, a diferencia de una célula cultivable, disminuyen su tamaño, probablemente para minimizar los requerimientos energéticos (Li *et al.*, 2014).

3.1 Nichos del bacilo latente

Algunos estudios sugieren que, durante el estado latente, el bacilo se encuentra confinado en MØ dentro del granuloma quiescente, siendo los MØ alveolares su nicho favorito, ya que presentan una actividad alta de β -oxidación, y un consumo de ácidos grasos elevado, lo cual proporciona un ambiente nutricional más permisivo que otras células (Mayito *et al.*, 2019). Sin embargo, durante el establecimiento de la infección, la replicación del bacilo en MØ y en nódulos linfáticos regionales dirige a la diseminación tanto hematológica como linfática, lo cual promueve la colonización de nichos alternos. Frecuentemente, es posible detectar DNA de *M. tuberculosis* en tejido aparentemente normal sin evidencia visible de lesiones, ubicándolo en diversos órganos y nichos celulares como fagocitos profesionales (DC, neutrófilos), células endoteliales, neumocitos tipo II, fibroblastos, tejido adiposo subcutáneo y pericardial, pulmón, bazo, hígado, riñón, tejido adiposo, entre otros (Barrios-Payán *et al.*, 2012, Mayito *et al.*, 2019, Rodríguez-Takeuchi, 2019).

La TB extrapulmonar, definida como la infección por *M. tuberculosis* que afecta tejidos y órganos fuera del parénquima pulmonar representó el 16% de casos nuevos de TB en 2019, siendo éstos, con frecuencia, los sitios de reactivación de la enfermedad (Figura 7) (Global tuberculosis report WHO, 2020).

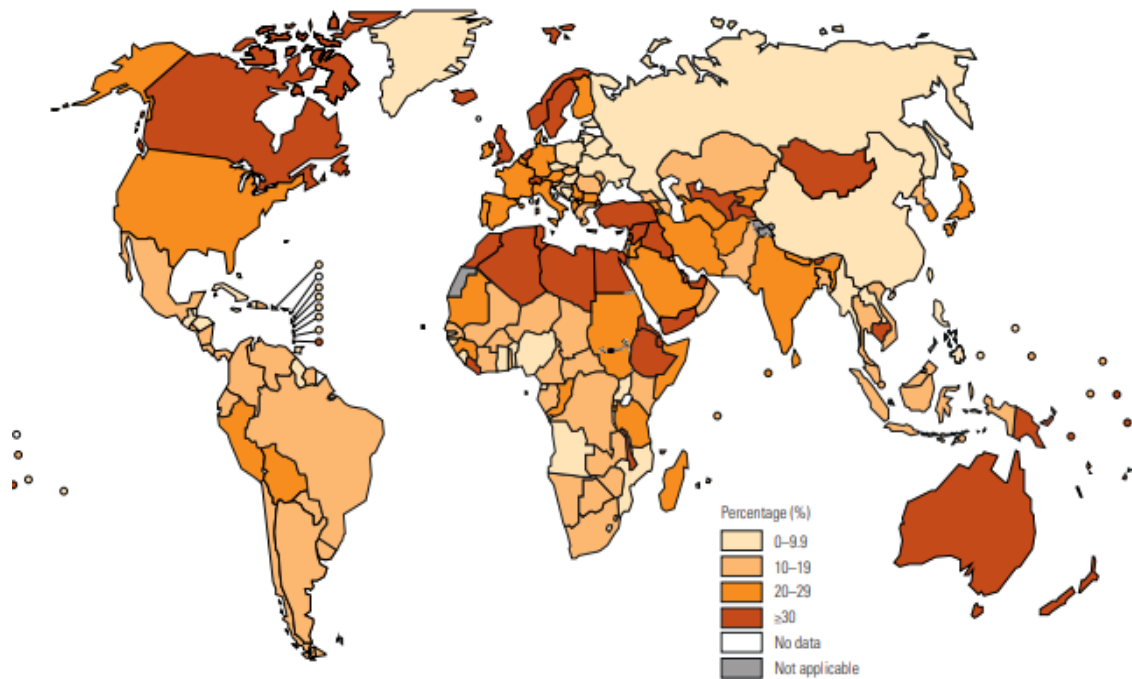


Figura 7. Casos de TB extrapulmonar en el mundo. Se muestra el porcentaje entre casos nuevos y recaídas en el 2019. *Global tuberculosis report WHO, 2020.*

3.2 Diagnóstico de la LTBI

El diagnóstico de la LTBI se basa en la presencia de una respuesta inmune mediada por linfocitos T. Actualmente dos pruebas están disponibles para su detección: TST (del inglés: tuberculin skin test) y los IGRA's (del inglés: interferón-gamma release assay). La TST realizada mediante la técnica de Mantoux, es el principal método empleado en el mundo. Ésta consiste en una inyección intradérmica de derivado proteico purificado (PPD), si una persona tiene inmunidad a estos antígenos, se producirá una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado en un plazo de 48 a 72 horas. La reacción será una induración localizada en el lugar de la inyección, la interpretación de la prueba toma en cuenta el tamaño de la induración (Figura 8). La TST tiene varias ventajas, particularmente en localidades de bajos recursos, ya que se requieren reactivos y equipos de bajo costo, sin embargo, también tiene ciertas limitaciones, ya que pueden presentarse falsos positivos, ya sea por una exposición previa a micobacterias no

tuberculosas (NTM del inglés: nontuberculous mycobacteria), o bien, por vacunación con BCG (Pai *et al.*, 2014).

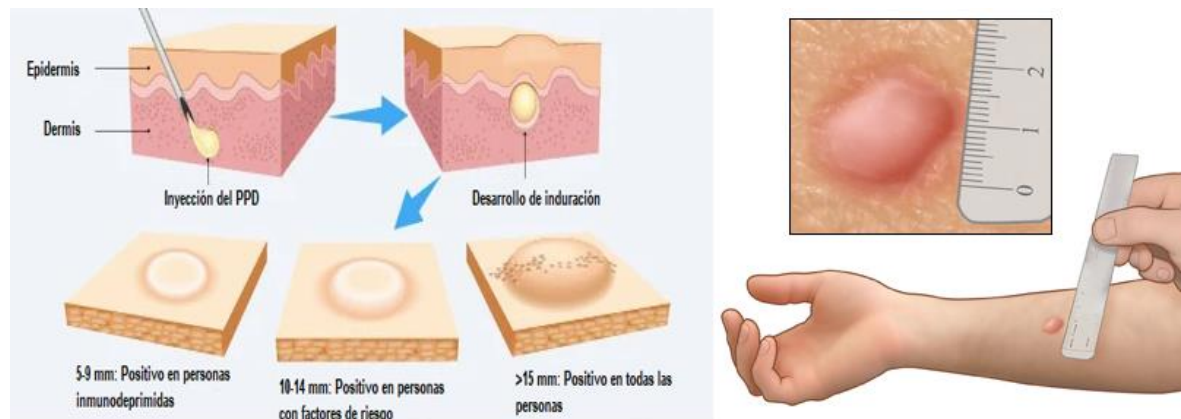


Figura 8. Prueba TST. La interpretación de la prueba se efectúa 48 a 72 horas posteriores a la inyección del PPD, la medición del diámetro de la induración determinará si la respuesta es positiva, ésta dependerá de la historia clínica del paciente y de las medidas estándar del lugar.

Los IGRA's (IGRA's del inglés: Interferon-Gamma Release Assays) por otra parte, son pruebas *in vitro* que miden la liberación de INF- γ por células T después de su estimulación con ESAT-6 y CFP-10, dos antígenos específicos del MTBC que no están codificados en los genomas de la vacuna BCG o de las NTM, lo que los hace más específicos que el PPD. Hay dos IGRA's comerciales disponibles: QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT) (Cellestis / Qiagen, Carnegie, Australia) y el T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Reino Unido). Los resultados se informan como cuantificación de INF- γ o número de células T productoras de INF- γ , respectivamente. Los IGRA's pueden distinguir entre una respuesta producida por una vacunación previa con BCG o una infección por *M. tuberculosis*, sin embargo, ninguna prueba es capaz de diferenciar con precisión entre LTBI y TB activa (Pai *et al.*, 2014).

3.3 Alteraciones genéticas en el patógeno durante la latencia

La fase durmiente implica una serie de alteraciones desencadenadas por señales externas que obligan al patógeno a adoptar un estado no replicante pero viable, en un ambiente hostil. Aunque no son del todo entendidas, se ha visto que las alteraciones en la micobacteria a nivel bioquímico le permiten resistir a los antibióticos, las ROS y las

RNI; a nivel genético, se ha observado la activación de genes asociados al estado latente; esto en conjunto, promueve alteraciones en la respuesta inmune del hospedero, ya que se ve alterada la señalización de TLR's, la expresión de citocinas y la función de células inmunes (Peddireddy *et al.*, 2017).

Uno de los principales sistemas implicados en las alteraciones de la micobacteria durante la LTBI, es el regulón DosR (del inglés Dormancy Survival Regulator), implicado en la transición del estado metabólico activo de la micobacteria a un estadio latente (Chen *et al.*, 2012). DosR es regulado por un sistema regulatorio de dos componentes conformado por dos cinasas sensoras (DosS y DosT), y un regulador de respuesta (DosR). Las cinasas son susceptibles al estado redox y a la concentración de oxígeno del ambiente, y ante condiciones desfavorables, éstas fosforilan a DosR activándolo, lo cual favorece un cambio conformacional que promueve su unión al DNA, actuando como factor transcripcional, resultando en la transcripción de un set de alrededor de 50 genes asociados al estado latente (Figura 9). Estos genes están involucrados en la respuesta al estrés, la activación de vías de transporte de electrones alternativas, síntesis de proteínas y de pared celular, metabolismo de nitratos, síntesis de triacil glicerol, reparación de DNA, balance redox, entre otros (Chen *et al.*, 2012), y se localizan en el genoma distribuidos en nueve bloques (Tabla II), los cuales se encuentran evolutivamente conservados en bacterias patógenas, no patógenas y ambientales, como consecuencia probablemente de transferencia horizontal de genes durante procesos de adaptación a condiciones ambientales desfavorables (Peddireddy *et al.*, 2017). Se ha visto que la expresión de estos genes es inducida por hipoxia y bajo condiciones desfavorables tanto *in vivo* como *in vitro*, sin embargo, mutaciones en el regulón DosR no resultan en la muerte del bacilo, indicando que hay otros factores importantes para la supervivencia y dormancia en el hospedador (Peddireddy *et al.*, 2017).

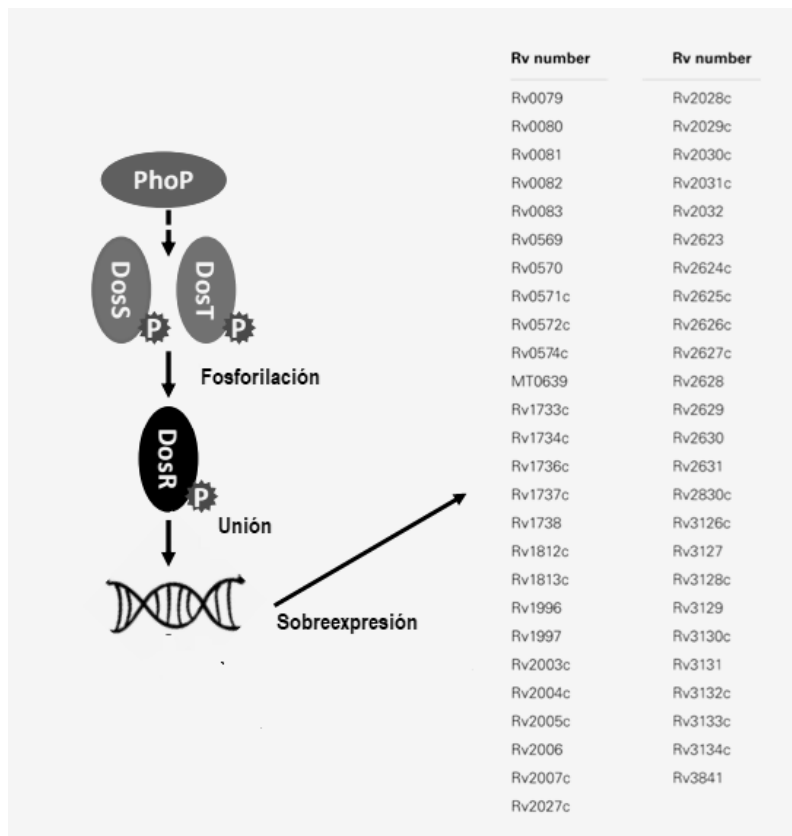


Figura 9. Proceso de activación del Regulón DosR. Las cinasas sensoras *DosS* y *DosT* fosforilan al regulador de respuesta *DosR* promoviendo su activación una vez que se detecta un cambio perjudicial en el ambiente para la micobacteria. La activación de *DosR* favorece su unión al DNA actuando como factor transcripcional, promoviendo la sobreexpresión de genes de supervivencia. (Tomada y editada de Jee et al., 2018).

Tabla II. Distribución de genes asociados al estado latente en *M. tuberculosis*

Bloque	Genes
1	Rv0079 – Rv0081
2	Rv0569 – Rv0574c
3	Rv1733c – Rv1738
4	Rv1812c – Rv1813c
5	Rv1996 – Rv1998c
6	Rv2003c – Rv2007c
7	Rv2028c – Rv2032
8	Rv2623 – Rv2631
9	Rv3126c – Rv3134c

3.4 Progresión a enfermedad activa

La reactivación de la LTBI representa la mayoría de los casos activos en áreas de baja incidencia de la enfermedad, en EE.UU se ha reportado que representa aproximadamente el 80% de los casos de TB (Sterling *et al.*, 2020).

En personas con LTBI, la acción combinada de MØ, DC, y células T es suficiente para mantener una infección controlada y asintomática, sin embargo, en un subconjunto de hospederos, por razones que no son completamente claras, la infección puede progresar a enfermedad clínica, semanas o décadas después. En personas mayores, se ha asociado con una disminución en la capacidad de la respuesta inmune relacionada con la edad, por otra parte, en niños, principalmente se ha atribuido a la desnutrición y en el resto de la población se ha relacionado a algunos factores de riesgo (Ai *et al.*, 2016, Global Tuberculosis Report, WHO, 2020), los cuales se han clasificado como:

- Alto riesgo: Coinfección con VIH (aproximadamente un cuarto de las muertes por VIH, se relacionan a TB), uso de inmunosupresores, tratamiento con bloqueadores de TNF, insuficiencia renal crónica, contactos cercanos con pacientes con TB activa y recientemente, la coinfección con COVID-19, el estudio Stop TB Partnership planteó que la pandemia de COVID-19 podría causar hasta 6.3 millones de casos adicionales de TB a nivel mundial entre 2020 y 2025 (Global Tuberculosis Report, WHO, 2020).
- Riesgo medio: Trabajadores de la salud, inmigrantes de ciudades con alta incidencia de TB, prisioneros, consumidores de drogas e indigentes.
- Riesgo Bajo: Diabetes mellitus, tabaquismo, alcoholismo y uso de corticosteroides.

Se ha reportado que, durante la reactivación de la infección, la micobacteria requiere la eliminación del estrés externo y la presencia de los factores promotores de resucitación (Rpf del inglés Resuscitation-promoting factor). En *M. tuberculosis* se han descrito 5 Rpf distribuidos en su genoma (genes *rpfA-rpfE*). Los mecanismos por los cuales las bacterias reinician su crecimiento aún no se han resuelto, ya que el papel preciso de éstos, aún no es claro. Existen 3 modelos para explicar la resucitación mediada por estos factores (Li *et al.*, 2014, Rosser *et al.*, 2017):

- Los Rpf, actúan como moléculas de señalización que son secretadas por células en crecimiento activo, que se unen a receptores de superficie de VBNC para iniciar su resucitación.
- Los Rpf degradan o remodelan la pared celular de VBNC desencadenando su resucitación.
- Los Rpf cortan la capa de peptidoglicano de su célula productora, y libera pequeños fragmentos de ésta que se unen a receptores de superficie de las VBNC desencadenando su resucitación.

IV. Antecedentes particulares

1. Estudio de la LTBI

Dada la problemática que representa la reactivación de la LTBI, la OMS en su estrategia End TB ha establecido dentro de sus pilares la prevención de la enfermedad, por lo tanto, es vital la detección y el tratamiento de estos casos antes de su progresión a enfermedad activa (Global Tuberculosis Report WHO, 2020). Sin embargo, nos enfrentamos a una falta casi total de conocimiento sobre la biología de la latencia bacilar, por lo que, en los últimos años se han intensificado los esfuerzos para llegar a reducir el reservorio de casos potenciales de TB, y, por ende, contribuir así a la disminución y eventual eliminación de su incidencia (Chaw *et al.*, 2020).

Recientemente, Chaw y *cols.* (2020) identificaron que el estudio tanto de la TB como de la LTBI ha aumentado en los últimos años, sin embargo, aunque el estudio de la LTBI muestra una tendencia a la alza, su proporción sigue siendo muy baja, comparada con el estudio de otros aspectos de la TB (Figura 10). Esta misma tendencia es observada para los años 2019 y 2020 (hasta la 3ra semana de diciembre) en la base de datos de acceso libre pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Figura 11).

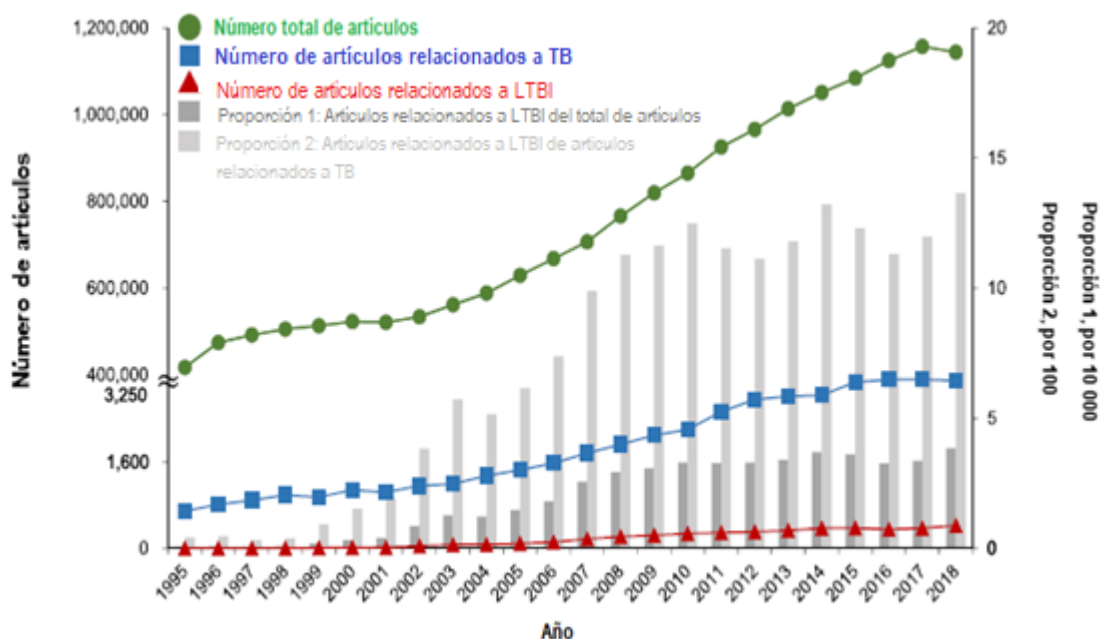


Figura 10. Número de artículos relacionados a LTBI entre 1995 y 2018. Tomada y editada de Chaw et al, 2020.

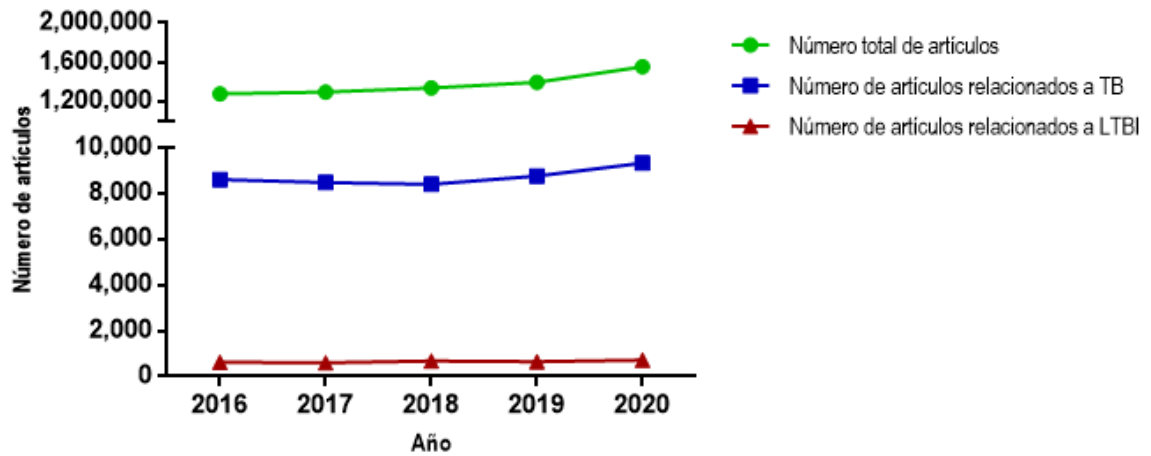


Figura 11. Número de artículos relacionados a LTBI entre 2016 y 2020. Se muestra el gráfico basado en datos recabados de la base de datos pubmed.

Estos estudios se han desarrollado en tres áreas de investigación: investigación de laboratorio, investigación clínica, y salud pública, siendo la primera, la principal área de publicaciones relacionadas a TB (Figura 12a), mientras que, en el estudio de la LTBI, la proporción entre éstas ha fluctuado, hasta el año 2011, la investigación de laboratorio presentó la tendencia más baja, sin embargo, ha crecido a partir de este año, reduciendo la brecha entre las publicaciones de esta área y las otras dos, siendo actualmente el 41.4% estudios de laboratorio, 48.8% investigación clínica y 42.8% salud pública (Figura 12b) (Chaw *et al.*, 2020).

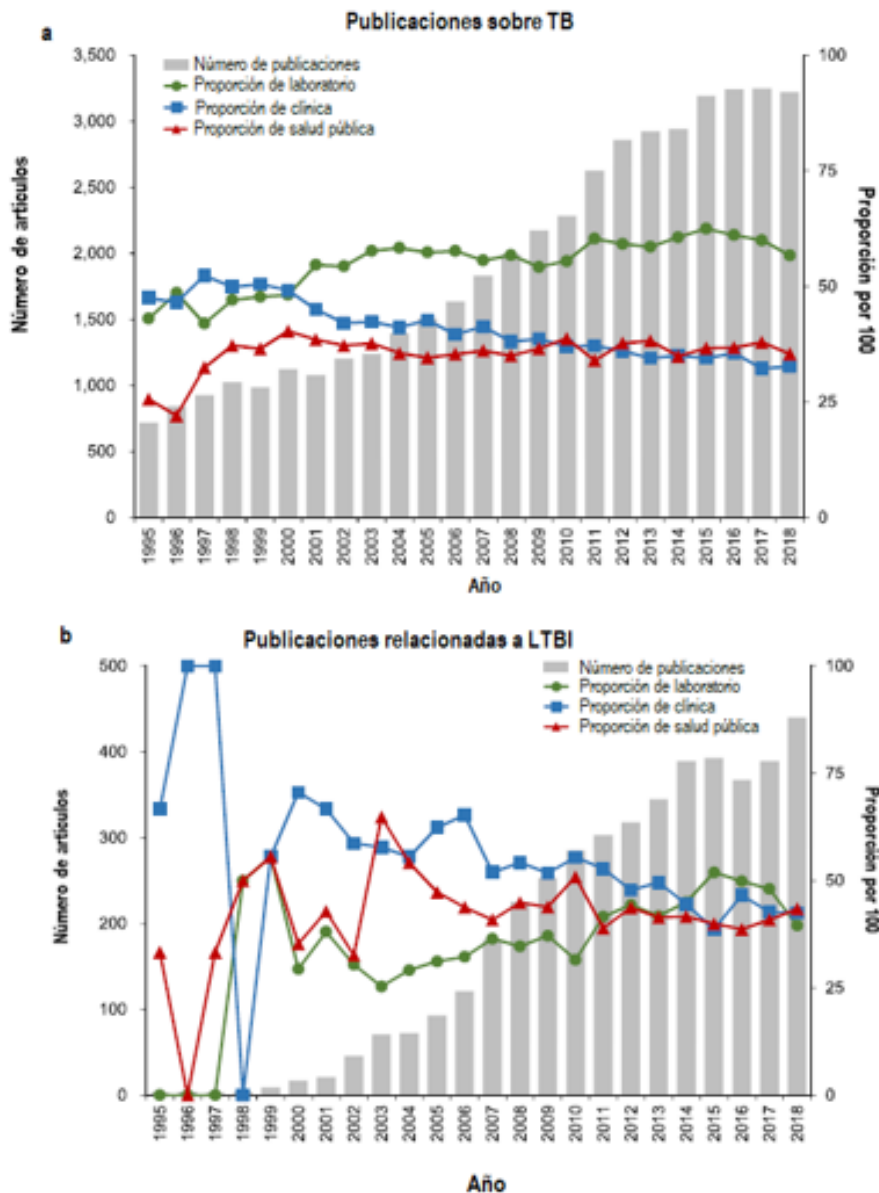


Figura 12. Artículos publicados por área de investigación entre 1995 y 2018. Se muestra la proporción de artículos publicados en los 3 campos de investigación para TB (a) y LTBI (b). Tomada y editada de Chaw et al, 2020.

1.1 Investigación experimental

Uno de los principales problemas en el estudio de la LTBI, es la reproducción fiel de las características de este estado en la micobacteria en modelos experimentales. Durante años, se ha intentado modelar su estado fisiológico tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo, hasta ahora no existe un modelo satisfactorio y rentable de tuberculosis latente.

1.1.1 Modelos *in vitro*

Se cree que los bacilos están expuestos a múltiples tensiones dentro del hospedero que incluyen hipoxia, carencia de nutrientes, estrés oxidativo y nitrosativo, limitación de hierro y exposición a estrés gaseoso como el óxido nítrico y el monóxido de carbono, por lo cual, se han desarrollado modelos de latencia *in vitro* que intentan imitar una o más de estas presuntas tensiones enfrentadas por la micobacteria dentro del granuloma (Figura 13) (Sikri y Tyagi, 2013, Gibson *et al.*, 2018).

La hipoxia fue una de las primeras condiciones identificadas en los granulomas y, por lo tanto, es la mejor caracterizada. En 1976, Wayne observó que mientras se aireaba un cultivo de *M. tuberculosis* el crecimiento aumentaba de forma logarítmica, pero si se detenía la aireación y la concentración de O₂ disminuía, el crecimiento se detenía aparentemente de forma indefinida hasta que se recuperaba la aireación. Apoyado en estas observaciones, en 1996 estableció el *modelo hipóxico*, basado en la disminución gradual de la concentración de oxígeno, describiendo un estado de persistencia no replicante (Wayne y Hayes, 1996).

La falta de nutrientes es una condición ambiental esencial en el granuloma, que ha sido tomada como base en los modelos de inanición, los cuales se basan en la transferencia de cultivos de un medio rico en nutrientes a un medio limitante seguido de una incubación prolongada en estas condiciones, observando una disminución del crecimiento que se reanuda al reintroducir a un medio enriquecido (Betts *et al.*, 2002, Gibson *et al.*, 2018).

Existen condiciones ambientales menos estudiadas en el granuloma, como estrés oxidativo, estrés nitrosativo y pH ácido, los cuales se han asociado a la inhibición respiratoria en la micobacteria (Brown, 2001), sin embargo, éstas son usadas con menor frecuencia en estos modelos (Sikri y Tyagi, 2013).

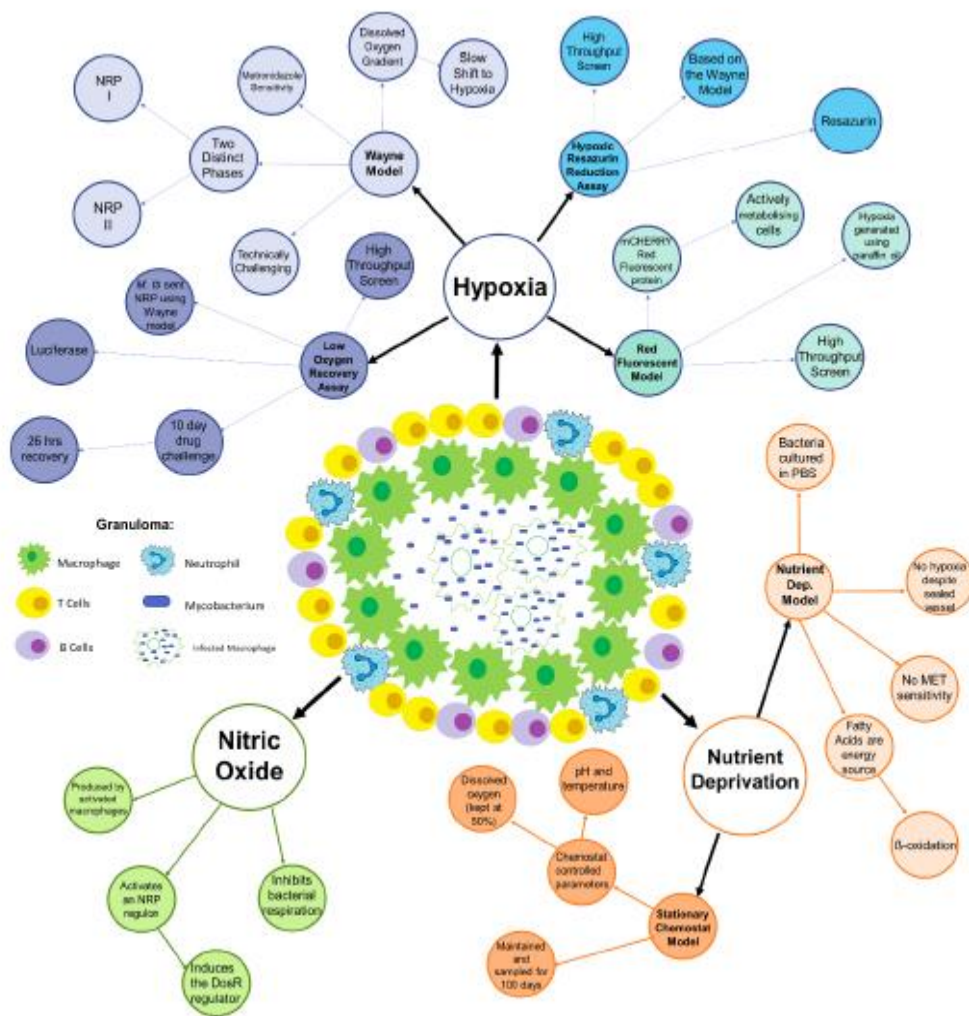


Figura 13. Condiciones empleadas en el establecimiento de modelos *in vitro* de LTBI. Tomada de Gibson et al, 2018.

Los principales problemas de los modelos *in vitro*, son en primer lugar, que no pueden replicar todas las interacciones entre el patógeno y el hospedero, ya que generalmente se emplea sólo una condición estresante para la inducción del estado latente, por lo cual, no consideran la interacciones entre factores que inducen este estadio, y por lo tanto, no se pueden explicar todos los factores asociados a la LTBI; en segundo lugar, existe una amplia heterogeneidad de la población bacteriana, ya que se sabe que en cultivos encontramos células en diferentes estados fisiológicos, no obstante, esto se ha intentado resolver mediante algunas adaptaciones, empleando el uso de fármacos antimicobacterianos que permiten eliminar a todo aquel bacilo que no presente las características del “fenotipo latente”: detención del crecimiento y tolerancia a fármacos (Batyrshtina y Schwartz, 2019).

1.1.2 Modelos *in vivo*

Para estudiar la interacción hospedero-patógeno, la evaluación de nuevos regímenes de tratamiento, el efecto protector de nuevos candidatos a vacunas y los mecanismos durante la LTBI, es necesario un modelo *in vivo*, que replique realmente la latencia humana. Los modelos animales proporcionan el set completo de defensas inmunes del huésped que son fundamentales para el establecimiento de la LTBI en humanos (Singh y Gupta, 2018). Tanto en el estudio de la TB como de la LTBI, se han empleado diversos modelos animales, que van desde el uso de pequeños animales como el pez cebra, hasta mamíferos como los primates no humanos, siendo el ratón el modelo más popular y mejor caracterizado (Figura 14) (Patel *et al.*, 2011; Dube *et al.*, 2014).

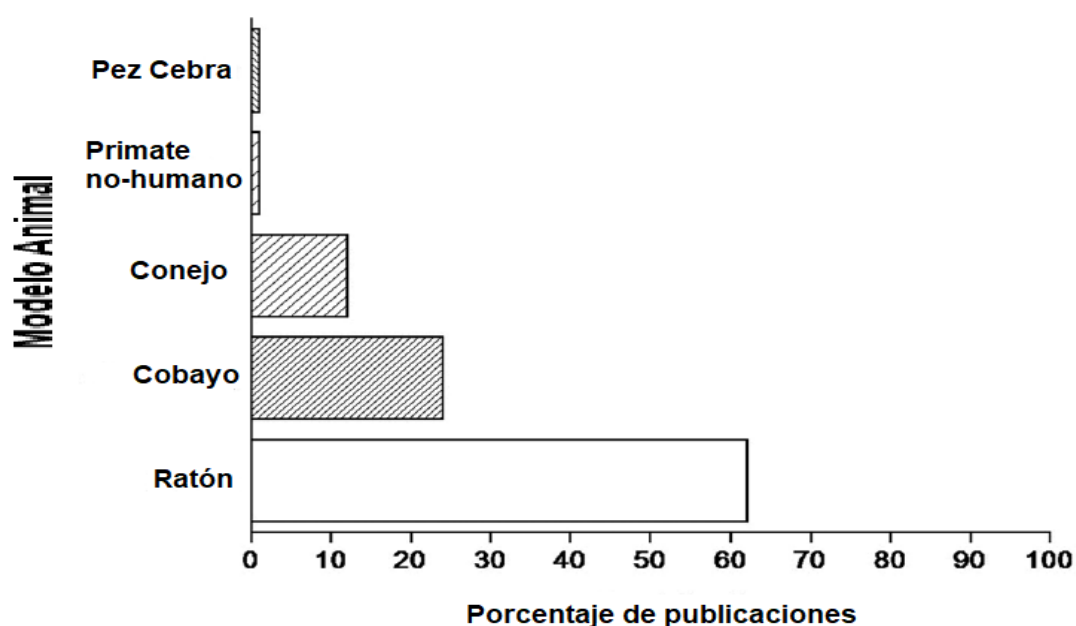


Figura 14. Modelos animales empleados en la investigación de la TB. Tomada y editada de Singh y Gupta, 2018.

Cada uno de estos modelos muestra características particulares que han permitido modelar diversas etapas del ciclo de vida de *M. tuberculosis*, aportando conocimientos en la comprensión de la biología del bacilo (Figura 15).

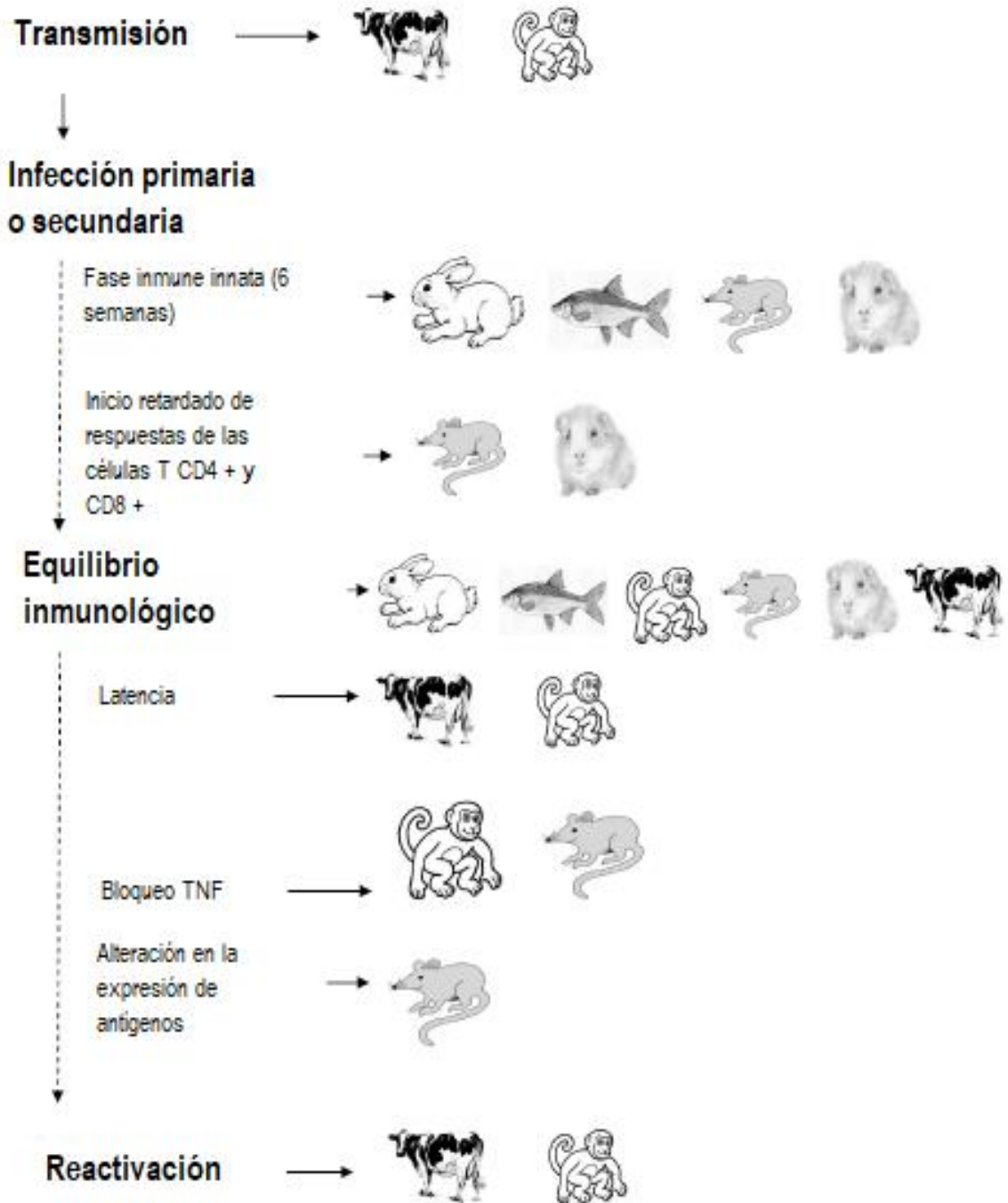


Figura 15. Modelos in vivo del ciclo inmunológico de la TB humana. Se muestran las etapas del ciclo inmunológico de *M. tuberculosis* que actualmente pueden modelarse en animales de experimentación. Tomada y editada de Dube et al., 2014.

1.1.2.1 Modelos murinos en el estudio de la LTBI

Entre los años 1960 y 1970 se empezaron a realizar los primeros estudios sobre tuberculosis en el ratón (Mackanness, 1968). Los ratones poseen una naturaleza resistente para desarrollar TB, lo cual ha sido aprovechado por los investigadores para el establecimiento de LTBI (Patel *et al.*, 2011), al mismo tiempo, las lesiones inducidas durante su infección son similares a las de los humanos, aunado a esto, el 99% de los genes del ratón posee un homólogo humano, y tienen la ventaja de representar bajos costos para los laboratorios comparados con otros modelos, y existe una amplia variedad de knock-outs genéticos disponibles para estudios inmunológicos, lo cual es útil para identificar mecanismos inmunitarios clave responsables del control de la TB. Algunas de las características que debe presentar un buen modelo de TB se presentan en la tabla III (Bucsan *et al.*, 2019).

Tabla III. Características esenciales en los modelos in vivo de TB

Características de los modelos de TB
<ul style="list-style-type: none">• La infección debe imitar una enfermedad natural• La infección debe ser resultado del reto con dosis bajas• La ruta de exposición debe simular la exposición natural• Se debe presentar patología en órganos diana relevantes• Se deben presentar lesiones análogas a las que se encuentran en huéspedes infectados naturalmente• El espectro de la enfermedad debe ser equivalente al del huésped susceptible

Se han desarrollado diversos modelos murinos para el estudio de la LTBI, empleando una gran diversidad de cepas de ratón y de *M. tuberculosis*, así como diversas rutas y dosis de infección, ya que se ha demostrado que es importante en el establecimiento de la LTBI. Sin embargo, dados sus resultados, se ha discutido su capacidad y reproducibilidad como modelos, ya que, los mecanismos de inducción de la latencia han sido controversiales, pues en muchas ocasiones no es natural, por lo cual, estos modelos se pueden clasificar en las siguientes 4 categorías (Tabla IV):

a) Modelos de persistencia

Son los más usados, y se basan en el uso de fármacos antimicobacterianos. El más famoso es el llamado "Modelo de Cornell", establecido por McCune y cols., en la década de 1950, quienes establecieron un modelo de infección paucibacilar en el que los ratones son infectados por vía intravenosa con una dosis alta de una cepa virulenta de *M. tuberculosis*, para posteriormente ser tratados con isoniazida y pirazinamida, y de esta forma eliminar a la micobacteria hasta obtener cultivos negativos; después del cese de la terapia o mediante la administración de corticosteroides, se observa una recaída de la enfermedad, demostrándose la presencia de "*bacilos persistentes*" (McCune *et al.*, 1966).

Este modelo es interesante debido a que la baja carga bacteriana en los ratones es similar a LTBI humana, sin embargo, la introducción de antibióticos para inducir la reducción de la carga micobacteriana no imita la latencia natural de la TB, dada por mecanismos de control inmunológico, lo que lo convierte en un modelo discutible. A pesar de esto, ha sido tomado como base para el establecimiento de nuevos modelos con algunas variaciones como la vía de infección y combinación de fármacos (McCune *et al.*, 1966, Scanga *et al.*, 1999, Jeon *et al.*, 2012, Hu *et al.*, 2016, Hu y Coates, 2018).

b) Modelos de latencia inducida por restricción de nutrientes

Estos modelos, aunque imitan el curso natural de la LTBI ya que evita el uso de medicamentos antimicrobianos, se basan en principios empleados en algunos modelos *in vitro*, ya que es necesaria la restricción de nutrientes esenciales para el crecimiento de la micobacteria. Cuando los ratones son infectados vía intraperitoneal e intravenosa con una cepa de *M. tuberculosis* dependiente de estreptomina, al no existir ésta en el medio, la micobacteria entra en un estado de latencia, en el cual no es posible cultivarla, sin embargo, cuando los animales son tratados con este fármaco, se induce la reactivación de la bacteria.

Este modelo permite realizar un seguimiento de los ratones infectados durante más de 100 semanas sin observar reactivación espontánea, por lo tanto, imita la latencia natural en humanos, en donde los bacilos pueden permanecer latentes durante tiempos prolongados antes de reactivarse, sin embargo, la dosis y vía de infección no cumple con las características requeridas para el establecimiento de un buen modelo (Tabla III) (Kashino *et al.*, 2006).

c) Modelos de cronicidad

Estos modelos se basan en la aplicación de dosis mínimas de *M. tuberculosis*, a través de aerosoles, vía intravenosa o vía intratraqueal, lo cual da como resultado un aumento lento pero constante en el número de bacterias en los órganos blanco.

Estos modelos se caracterizan por presentar cargas bacilares bajas y estables sin causar la muerte del animal infectado (Arriaga *et al.*, 2002, Kupz *et al.*, 2016, Nemeth *et al.*, 2019). Sin embargo, aunque se logra establecer una infección controlada mediada por el sistema inmunológico, sin reactivación espontánea de la enfermedad, los bacilos son cultivables durante el experimento, por lo cual, el estado de latencia no es representado fielmente.

d) Modelos de latencia inducida inmunológicamente

En estos modelos, la latencia es inducida naturalmente por mecanismos de control inmunológico, y no por factores externos. Se ha evaluado la infección de ratones vía intratraqueal con dosis bajas de UFCs, 10, 100, 250 y 500, en una cinética de sacrificio a los días 7, 14, 21, 28, 60, 150 y 210 post infección, determinando que la dosis de 10 UFCs era la adecuada para el establecimiento del modelo, ya que se observaron cargas bacilares bajas, incluso identificando a lo largo del experimento algunos animales con UFCs negativas, detectando el mayor porcentaje de éstos sobre el final del experimento, al día 210. Al realizar análisis molecular en muestras de estos animales, se detectó la presencia de material genético micobacteriano, así como la sobreexpresión de biomarcadores de latencia como la enzima isocitrato liasa (Tovar Vázquez, 2017).

Este conjunto de observaciones cumple con varios de los puntos establecidos en la tabla III, sin embargo, el modelo carece de algunos puntos importantes a considerar para un modelo de infección latente, entre ellos: en el modelo no se evaluó la homogeneidad en la administración de la dosis de infección, no se corroboró la infección de los animales mediante un método diagnóstico como lo es la prueba de la tuberculina en humanos, no se evaluó un método no invasivo de monitoreo de la infección en los animales, no se contó con un grupo control sin infección para la evaluación, además de que, en el caso de la infección latente, se debe evaluar la diseminación extrapulmonar de la micobacteria, observada en la infección en humanos. No obstante, este primer acercamiento, ha demostrado que el establecimiento de un modelo de latencia inducida natural es posible.

Tabla IV. Clasificación y características de los modelos murinos empleados en el estudio de la LTBI

	Modelo de persistencia	Modelos de cronicidad	Modelos de latencia inducida por restricción de nutrientes	Modelos de latencia inducida inmunológicamente
Vía de inoculación	Intravenosa	Intratraqueal, intravenosa, aerosoles	Intravenosa, intraperitoneal	Intratraqueal
Dosis de infección	5x10 ⁵ – 2x10 ⁶ UFC	4x10 ³ – 1x10 ⁶	1 x 10 ⁶ – 2x10 ⁶	10 – 500 UFC
Cepa de <i>M. tuberculosis</i>	H37Rv	H37Rv	18b	H37Rv
Cepa de ratón	Webster suizos	B6D2F1	B6D2F1Bom	BALB/c
Uso de factores productores de estrés	Sí, antibióticos	No	Sí, restricción de nutrientes	No
Resultados	<ul style="list-style-type: none"> ♦ UFCs negativas ♦ reactivación inducible 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ UFCs bajas y constantes ♦ Sin reactivación espontánea 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ UFCs negativas ♦ Reactivación inducible 	<ul style="list-style-type: none"> ♦ UFCs negativas ♦ Sin reactivación espontánea ♦ Detección de biomarcadores de latencia

V. Hipótesis

La infección intratraqueal de ratones BALB/c con 10 UFCs de *Mycobacterium tuberculosis*, generará una infección latente, caracterizada por el aumento en la expresión de biomarcadores de latencia, y la disminución en la expresión de los de metabolismo activo, tanto en tejido pulmonar como extrapulmonar.

VI. Justificación

La problemática que representa la reactivación de la LTBI ha propiciado que su estudio se haya incrementado en los últimos años, con el fin de comprender la biología de los bacilos latentes, caracterizados por ser viables no cultivables y por expresar biomarcadores que favorecen su supervivencia durante tiempos prolongados. Sin embargo, la carencia de un modelo *in vivo* de LTBI, limita estos estudios.

El establecimiento de un modelo que nos permita obtener nuevos conocimientos, sobre los mecanismos moleculares e inmunológicos de la latencia, sentaría las bases de las estrategias de control de la enfermedad, mediante el establecimiento de modelos predictivos que contribuyan a evitar la reactivación de la infección, así como, propicien la búsqueda de tratamientos y vacunas.

VII. Objetivos

General

- ▶ Caracterizar un modelo murino de infección latente con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Particulares

- Determinar la carga bacilar durante una cinética de sacrificio en los días 7, 30, 150 y 210 post-infección.
- Evaluar la expresión de biomarcadores de latencia y genes implicados en metabolismo activo en tejido pulmonar y extrapulmonar, para detectar los animales con tuberculosis latente.
- Evaluar el potencial de la detección de bacilos latentes en sangre periférica, como un método de monitoreo de la infección latente.

VIII. Estrategia experimental

El proyecto fue realizado tanto en las instalaciones de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), Plantel del Valle, como en las instalaciones del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Departamento de Patología. Sección de Patología Experimental, en donde se cuenta con las instalaciones de bioseguridad adecuadas (ABSL3) para el manejo de animales infectados.

Este protocolo fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto (Protocolo número PAT-1889-17 / 20-1).

Todos los procedimientos del experimento se realizaron en una campana de flujo laminar nivel de bioseguridad III.

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo, se planteó el siguiente diseño experimental general (Figura 16):

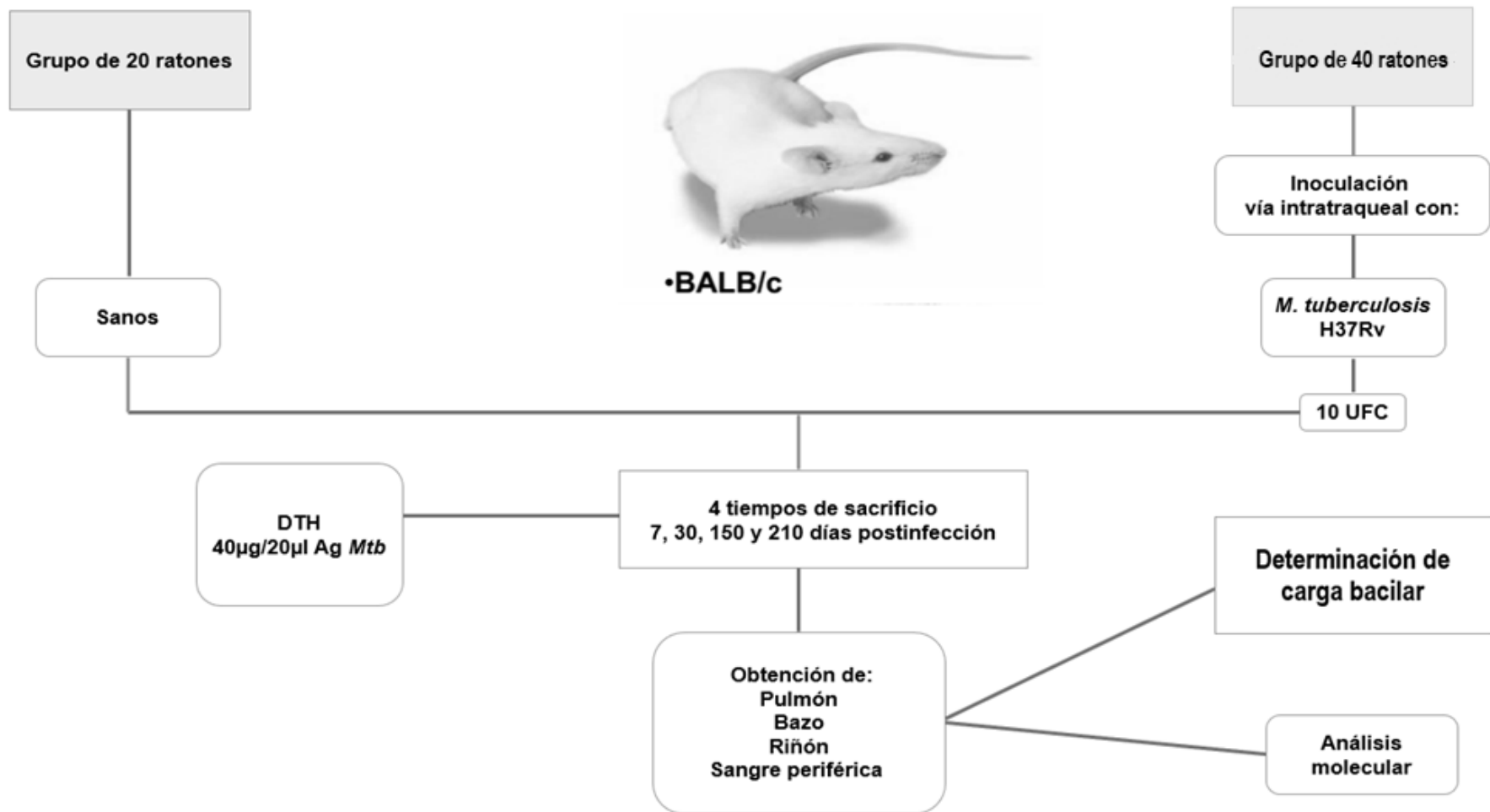


Figura 16. Diseño experimental general del trabajo.

IX. Materiales y métodos

1. Preparación del inóculo

Se empleó la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC No. 27294), la cual fue crecida en medio líquido Middlebrook 7H9 (Laboratorios Difco, Detroit, MI, USA) adicionado con glicerol, tween 80 y enriquecido con albumina, dextrosa y catalasa (ADC) (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) a 37°C en agitación constante. Se monitoreó el crecimiento mediante densidad óptica (DO) realizando lecturas a 600 nm. Una vez alcanzada la fase exponencial ($DO_{600}=0.6$), las bacterias fueron recuperadas por centrifugación y almacenadas en alícuotas a -70°C.

La pureza del cultivo fue evaluada mediante la tinción Ziehl Neelsen, la cual es una técnica de tinción diferencial para la identificación de bacterias BAAR; brevemente, esta consistió en la toma de una muestra del cultivo, la cual se colocó en un portaobjetos, fijándola posteriormente con fenol al 5% en metanol, se dejó secar, se irradió con UV y se fijó con calor, finalmente se tiñó colocándola 15 minutos en fucsina fenicada, se lavó con agua corriente, se adicionó alcohol-ácido eliminando el exceso de colorante, y se contrastó con azul de metileno. Finalmente se dejó secar, se montó el cubreobjetos y se observó al microscopio.

Una vez corroborada la pureza del cultivo, se realizaron diluciones seriadas de una alícuota el cultivo, sembrando cada una por duplicado en placas con medio sólido Middlebrook 7H10 (Laboratorios Difco, Detroit, MI, USA) enriquecido con ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa (OADC) (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD), incubándolas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. A los 21 días post-incubación se realizó el conteo de UFC y se ajustó el número de bacterias mediante diluciones a una concentración de 10 UFC en 100 µL de buffer de fosfatos (PBS).

2. Simulación de infección *in vitro*

Para corroborar que la infección de los animales se llevara a cabo con una concentración de aproximadamente 10 UFCs en 100 µL de suspensión, se realizó un ensayo en el cual se hizo una simulación de la infección, este consistió en sembrar la dosis infectante en placas de agar 7H10 adicionado con OADC (Figura 17), administrándola con una cánula de calibre 22G x 1.0" con punta roma de 1.25 mm

empleada para la infección de los animales. Entre cada siembra se consideró un tiempo de espera correspondiente al periodo de anestesia, el procedimiento se realizó simulando la infección de 40 animales.

Las cajas fueron incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, realizando el conteo de UFC a los 14 y 21 días posteriores a la inoculación.

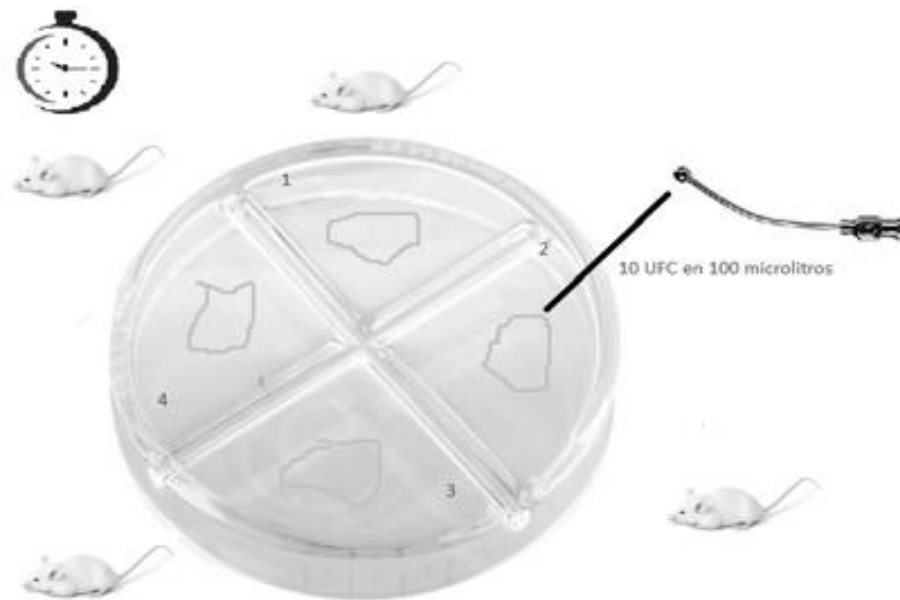


Figura 17. Simulación de infección.

3. Modelo murino

3.1 Infección animal

Un grupo de 40 ratones macho de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad, proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ, fueron anestesiados con vapor de sevoflurano (100 µL por ratón), e inoculados vía intratraqueal administrando 10 UFCs suspendidas en 100 µl de PBS, introduciendo por la tráquea la cánula descrita previamente. Adicionalmente se contó con un grupo de 20 ratones sanos como control.

Los ratones fueron mantenidos en grupos de 10 animales, en microaisladores conectados a un sistema de presión positiva (Allenton, USA), administrándoles agua y comida *ad libitum*.

3.2 Prueba de hipersensibilidad tipo IV (DTH)

Se realizó una prueba DTH para corroborar que la infección de los animales se hubiera realizado correctamente. Ésta consistió en la inoculación de 40 μg de una mezcla de antígenos de secreción micobacterianos (20 μl), en el cojinete plantar de la pata trasera izquierda, realizando la medición del grosor del cojinete con un calibrador micrométrico Mitutoyo (Figura 18), previo al inóculo y 24 horas posteriores a la inoculación. La medición se realizó por triplicado en 5 animales del grupo, seleccionados al azar.

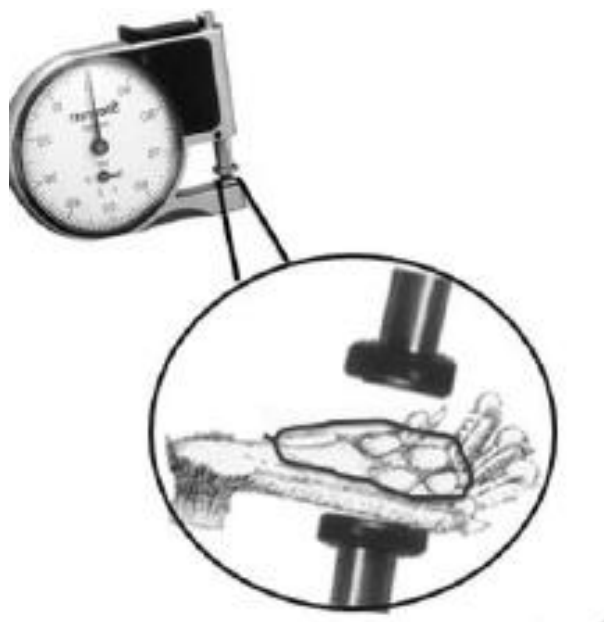


Figura 18. Induración en cojinete plantar. Se muestra la zona analizada y el procedimiento de medición empleado. Tomada de Beldaña Piñeiro, 2018.

3.3 Eutanasia en los días establecidos

Grupos de 10 ratones infectados y 5 ratones sanos, fueron anestesiados con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal con una dosis de 210 mg/kg y sacrificados por exanguinación a los 7, 30, 150 y 210 días post-infección. Aproximadamente, 50 μl de sangre de cada animal fueron depositados en aproximadamente 1cm² de tarjeta Whatman® protein saver cards 903 (Thermo Fisher Scientific Inc), conservándola a -70°C hasta su procesamiento.

Por disección se obtuvo tejido pulmonar, hepático, renal y el bazo de cada uno de los animales (Tabla V), congelándolos inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenándolos a -70°C.

Tabla V. Distribución de los animales durante el experimento

Grupo de ratones	Dosis de infección	Cinética de sacrificio	Muestras obtenidas	Ratones por tiempo de sacrificio
Infectados	10 UFC de <i>Mtb</i> H37Rv	7, 30, 150 y 210 días post-infección	Tejido pulmonar, hepático, renal, sanguíneo y bazo	10
Sanos	-		Tejido pulmonar, hepático, renal y bazo	5

4. Procesamiento de muestras

4.1 Homogenización de tejido pulmonar

El tejido pulmonar congelado se pulverizó en un mortero con pistilo, utilizando N₂ líquido y hielo seco para mantener la temperatura de congelación (estos no entran en contacto con la muestra), hasta obtener un polvo fino, el cual fue distribuido en microtubos de propileno de 2 mL (determinando previamente su peso), para evaluar la carga bacilar por conteo de UFC, por detección de la secuencia IS6110 y para la extracción de RNA y posterior análisis de estudios moleculares (Figura 19).

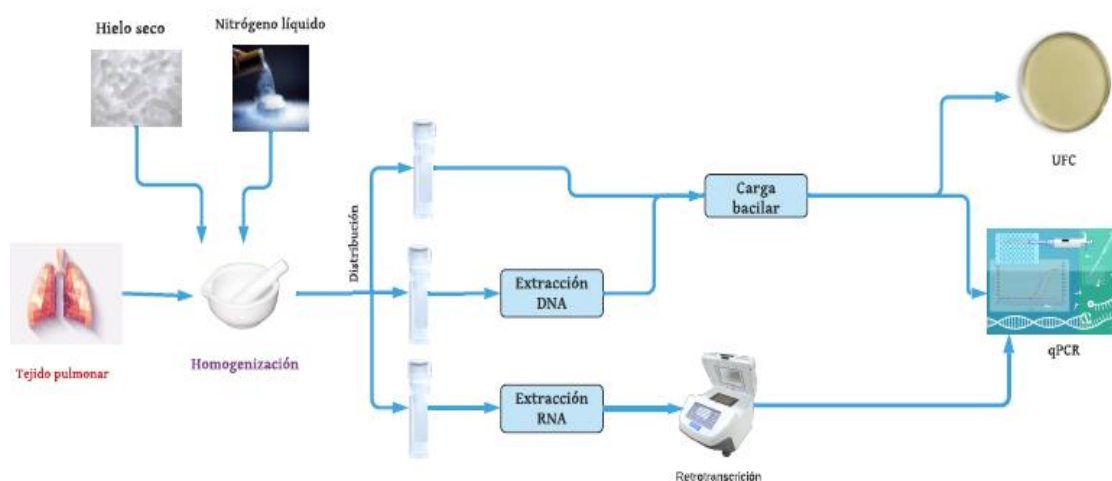


Figura 19. Procesamiento del tejido pulmonar.

4.2 Determinación de carga bacilar

4.2.1 Conteo de Unidades Formadoras de Colonias

Se determinó el peso del tubo de propileno con tapón rosca con el material destinado para la determinación de la cantidad de bacterias vivas por conteo de UFCs, y se le restó el peso inicial del tubo, para determinar los gramos de pulmón contenidos.

Se adicionó 1 mL de PBS-tween al 0.05% a la muestra. Los tubos fueron colocados en un homogeneizador de tejidos (Fast-Prep 24 versión 6004.3), durante un ciclo de 20 s. Posteriormente las muestras fueron sonicadas y vortexeadas durante 45 s y 20 s respectivamente, para finalmente realizar diluciones 1:2, 1:5 y 1:10.

Se sembraron por duplicado 50 μ L del concentrado y cada dilución en placas de agar 7H10 adicionado con OADC. Las cajas fueron incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, realizando el conteo de UFCs a los 14 y 21 días posteriores, reportándolo como número de UFCs por gramo de pulmón.

4.2.2 Detección de la secuencia IS6110

4.2.2.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo en tejido pulmonar de las muestras que fueron negativas por cultivo. Se realizó la extracción empleando el kit ZR Soil Microbe DNA MicroPrep (Zymo Research) a través de columnas, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

- Se adicionó un volumen de 700 μ L de solución de lisis del kit al tejido, aplicando dos ciclos de 20 s en un homogeneizador de tejidos Precellys evolution (Bertin Technologies), manteniéndolo a 10°C, para lisar las células totalmente. Posteriormente se centrifugó a 10,000g durante 1 min.
- 400 μ L del sobrenadante fueron transferidos a una columna Zymo-spin IV spin filter, centrifugando a 7,000 g durante 1 min.
- Se añadieron 1,200 μ L de buffer de unión de DNA al filtrado, y se transfirió la mezcla inmediatamente a una columna Zymo-Spin IIC Column y centrifugando a 10,000g por 1min.
- Se realizaron lavados con 200 μ L de Pre-wash buffer y 500 μ L de Soil DNA wash buffer y centrifugaciones a 10,000 g durante 1min.

- Finalmente, se eluyó la columna con 100 μ L de buffer de elución, para obtener el DNA.

La calidad y cantidad del DNA obtenido, se determinó empleando un espectrofotómetro de Microplaca Epoch 2 (BioTek Instruments, Inc, USA).

La cuantificación de DNA se realizó a través de la medición de la absorbancia a 260 nm. Asimismo, mediante la relación de absorbancias (A260/280) se evaluó la pureza de las muestras. Una relación de A260/280 de 1.7 - 2 se consideró como indicador de pureza óptima (Boletín técnico NanoDrop Lite).

4.2.2.2 Cuantificación de la secuencia IS6110

Se llevó a cabo la detección de la secuencia de 123 pb, IS6110, en el DNA extraído, un componente específico del MTBC, que se encuentra usualmente repetido a lo largo del cromosoma bacteriano. La cuantificación se realizó mediante qPCR, empleando el kit Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen, USA). Los reactivos y volúmenes empleados se especifican en el Anexo A. Tabla I, y los primers empleados se especifican en el Anexo A. Tabla II.

Se utilizó el equipo 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, USA). Las condiciones usadas fueron: Desnaturalización inicial 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 s, 68°C durante 20 s y por último 72°C por 35 s. La cuantificación se realizó empleando curvas estándar, utilizando diluciones seriadas de DNA de concentración conocida, preparadas mediante la amplificación por PCR. La cuantificación se realizó por duplicado.

4.3 Detección de transcritos (mRNA) en tejido pulmonar y extrapulmonar

4.3.1 Extracción de RNA

4.3.1.1 RNA de tejido pulmonar

Se realizó la extracción de RNA a partir de pulmón de ratones infectados, usando el kit Quick RNA mini prep Zymo, a través de columnas de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

Se adicionaron 600 μ l de RLT + β -mercaptoetanol a la muestra, homogenizándola totalmente. Posteriormente se realizó una separación diferencial, basada en las

propiedades de las membranas celulares y el tamaño de las células, centrifugando la muestra a 14,000 rpm durante 5 min, que permitió enriquecer el sobrenadante con el RNA del hospedero, el cual se conservó a -70°C , y el pellet con el RNA de la micobacteria. El proceso de extracción continuó empleando el kit (Figura 20), como se describe a continuación.

- Se adicionaron 600 μL de buffer de lisis al pellet, homogenizando, colocando en un Spin-Away™ Filter centrifugando a 10,000 g durante 1 min.
- Se conservó el filtrado y se le adicionaron 600 μL de ETOH al 100%. Mezclando perfectamente, transfiriendo a una columna Zymo-Spin™ IICG Column previamente tratada con DNasa I, centrifugando a 10,000g por 1 min.
- Al RNA adherido en la columna se le realizaron lavados con 400 μL de prep-buffer, y 1100 μL de wash buffer y cada lavado se centrifugó a 10,000g durante 1 min en cada lavado.
- Finalmente, se eluyó el RNA con 35 μL de agua libre de Rnasas.

La calidad y cantidad del RNA obtenido fue cuantificada empleando un espectrofotómetro de Microplaca Epoch 2 (BioTek Instruments, Inc, USA) y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

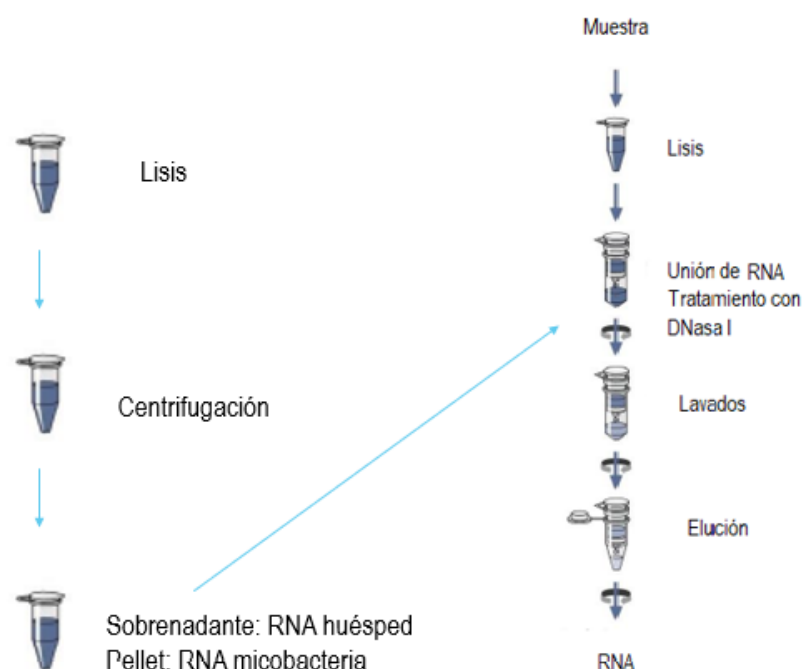


Figura 20. Procedimiento de extracción de RNA de tejido pulmonar.

4.3.1.2 RNA de tejido extrapulmonar

La extracción de RNA a partir de hígado, bazo y riñón, se realizó empleando el Minikit Rneasy (Qiagen, Hilden Alemania) a través de columnas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante:

- Los tejidos fueron homogenizados una vez con una perla de sílice y zirconia en un homogeneizador de tejidos Fast-Prep 24, posteriormente, se les añadió un volumen de 1 mL de RLT plus + β -mercaptoetanol, dando 3 pulsos más.
- Se tomaron 100 μ L de la muestra y se añadieron 250 μ L más de buffer RLT plus, la mezcla fue transferida a una columna de eliminación de DNA genómico, y posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min.
- Se adicionaron 350 μ L de etanol al 70%, se mezcló por pipeteo, transfiriendo la mezcla a una Rneasy spin columna. Centrifugando a 10,000 rpm por 1 min.
- Se realizaron lavados a la columna con 700 μ L de buffer RW1 y 500 μ L de buffer RPE.
- Finalmente, se eluyó el RNA de la columna con 50 μ L de agua libre de Rnasas.

La calidad y cantidad del RNA obtenido fue cuantificada empleando un espectrofotómetro de Microplaca Epoch 2 (BioTek Instruments, Inc, USA) y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

4.3.1.3 Extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre periférica

Se aislaron ácidos nucleicos totales, a partir de sangre del hospedero depositada en Filtros 903 Protein Saver Card Whatman, de acuerdo con las recomendaciones proporcionadas por Cubero y cols. (2002):

- Se adicionaron a la muestra glass beads y 500 μ l de buffer de lisis (EDTA 0,1mM pH 8, Tris 10mM pH 8, DTT 2mM y 800u/ml de inhibidor de ribonucleasas), sometiéndola a lisis mecánica mediante 7 pulsos de 4 m/s durante 45 s en un Fast-Prep 24, manteniendo la muestra durante 5 min en hielo entre cada uno.
- Los ácidos nucleicos fueron recolectados por centrifugación a 12,000 rpm durante 5 min y precipitados con 15 μ L de Acetato sódico 3M pH 5.2 y 150 μ L de Isopropanol al 100% durante una noche.

- Al día siguiente, los ácidos nucleicos fueron recolectados tras 20 minutos a 12,000 rpm, lavados con 500 µl de ETOH al 70% y resuspendidos en 40 µl de agua DEPC.

4.3.2 Síntesis de cDNA

Se emplearon 100 ng de RNA, para la síntesis de cDNA, mediante retrotranscripción, empleando el kit Omniscript RT (Qiagen, Hilden Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando los reactivos especificados en el Anexo A. Tabla III.

4.3.2.1 Síntesis de cDNA en ácidos nucleicos

La síntesis de cDNA a partir de ácidos nucleicos extraídos de sangre, se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones proporcionadas por Cubero y cols. (2012).

Se emplearon 10 µL de ácidos nucleicos totales, a los cuales se le adicionó la mix 1 (Anexo A. Tabla IV), incubando durante 5 min a 65°C, posteriormente la mezcla se colocó 1 min en hielo, para finalmente adicionar la mix 2 (Anexo A. Tabla V), llevando a cabo el proceso de transcripción siguiendo las siguientes condiciones: 5 min a 25°C, 60 min a 50°C y 15 min a 70°C.

4.3.3 Generación de curvas estándar

Se realizó una PCR punto final para la amplificación de los genes de interés (los reactivos se especifican en el Anexo A. Tabla VI). Se empleó el kit HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Alemania) y cDNA obtenido a partir de un cultivo sometido a depleción de nutrientes durante tres meses para la inducción del estado latente, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 s, T_m específica para cada gen por 30 s, 72°C por 60 s y una extensión final a 72°C por 10 min. Se utilizaron primers para amplificar los fragmentos de los genes *rrnA-pcl1*, *ftsZ*, *dosT*, *dosR*, *hspX* e *icl* (Anexo A. Tabla II).

Los resultados obtenidos se representaron gráficamente, los Ct en el eje de ordenadas y la concentración de DNA de las diluciones en el eje de abscisas.

Para el análisis de los productos obtenidos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, analizando por densitometría en el equipo Alpha-innotech Chemilmager 4400 Gel Imaging (Cambridge Scientific, Watertown, Massachusetts, EE. UU.). La

concentración de los fragmentos fue determinada mediante el análisis de la intensidad de fluorescencia de cada fragmento, comparando con un marcador de concentración conocida.

Una vez determinada la concentración de los productos, se elaboró una curva estándar mediante diluciones seriadas.

4.3.4 Detección de genes por PCR tiempo real

Se realizó una RT-qPCR con el fin de determinar la presencia o ausencia de material genético de *M. tuberculosis* mediante el método SYBR Green utilizando el kit Quantitect SYBR Green PCR kit (Qiagen, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo A. Tabla I).

La reacción de amplificación fue realizada en placas de reacción ópticas transparentes de 96 pocillos (Applied Biosystems™), ésta se llevó a cabo en un termociclador 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, USA). Las condiciones usadas fueron: Desnaturalización inicial 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 s, T_m específica para el gen analizado (Anexo A: Tabla II) durante 20 s y por último 72°C por 35 s.

5. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron como porcentajes, los cuales se graficaron en histogramas de frecuencias o gráficos de barra o pastel, o como medias y desviación estándar. Para el análisis de la prueba DTH se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y prueba de Tukey. Para ajustar las curvas de concentración se realizó un análisis de regresión lineal y se calcularon los correspondientes coeficientes de correlación. Todos los análisis se realizaron a un nivel de significación de 0.05. Para el análisis se empleó el software GraphPad Prism v6.0 (San Diego, CA, USA).

X. Resultados

1. Ensayo de simulación de infección

Para determinar si la dosis de infección y la vía de administración eran adecuadas, se realizó la simulación de infección de 40 animales con una dosis de aproximadamente 10 UFCs. En la figura 21 se observa la distribución de las dosis de infección administradas, la cuales oscilaron entre las 2 y 11 UFCs. Se observó que las dosis más comúnmente administradas contenían entre 2 y 5 UFCs, siendo la más frecuente 4 UFCs, mientras que las menos frecuentes fueron las que contenían 10 y 11 UFCs.

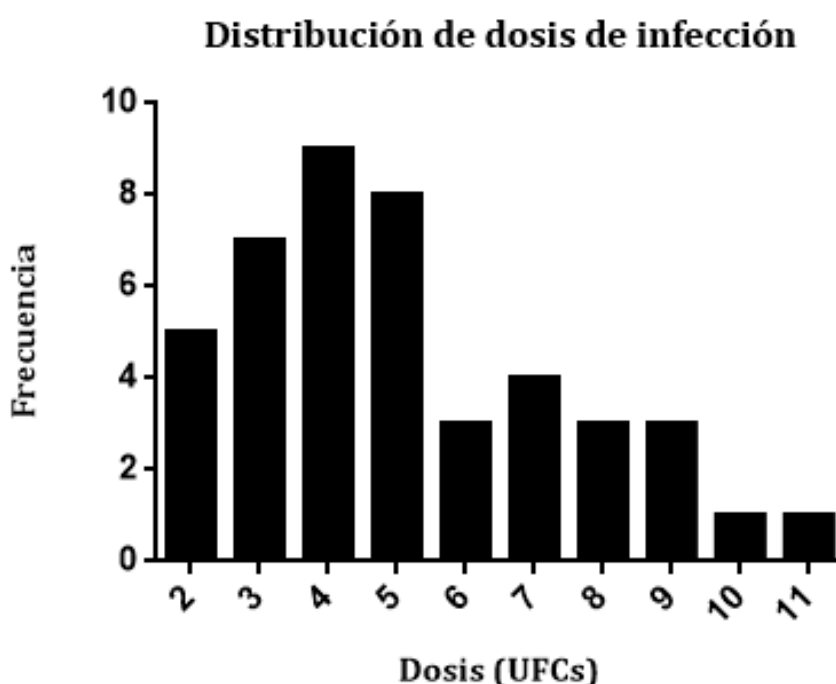


Figura 21. Distribución de frecuencias de las dosis de infección. Se muestran las dosis de infección del simulacro de infección empleadas y su frecuencia de administración. $n=40$.

2. Prueba de hipersensibilidad tipo IV (DTH)

Una manera de comprobar que el sistema inmunológico del animal estuvo en contacto con las micobacterias, fue evaluar la respuesta inmune ante un estímulo con antígenos micobacterianos, midiendo la inflamación en el cojinete plantar. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta entre los ratones infectados y el grupo control sano desde los 30 días post-infección, esta respuesta fue mantenida hasta el final del experimento (210 días post-infección) confirmando con esto, una exposición a la micobacteria (figura 22).

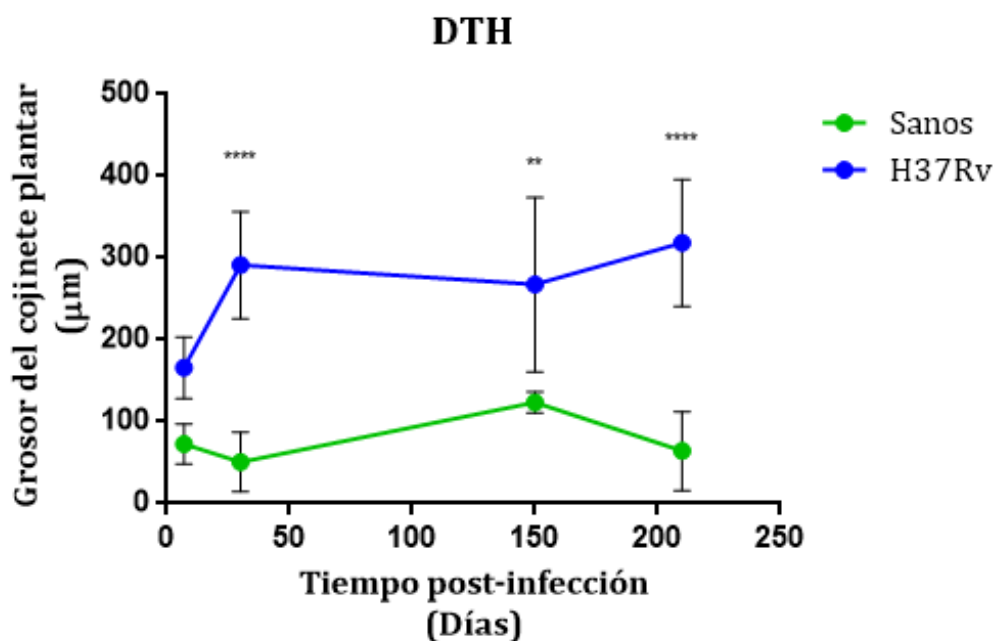


Figura 22. Prueba DTH. En el gráfico se muestra el promedio de medición de la inflamación del cojinete plantar a las 24 horas post-estimulación con antígenos micobacterianos. Se muestra el promedio de 5 animales por grupo. Análisis por ANOVA de 2 vías y prueba de Tukey con nivel de significancia $p < 0.05$.

3. Determinación de carga bacilar

3.1 Conteo de Unidades Formadoras de Colonias

Se determinó la carga bacilar mediante el conteo de UFC en cada uno de los tiempos establecidos en el protocolo, esto se muestra en la figura 23. Al día 7 post-infección, ninguno de los animales fue positivo por cultivo, sin embargo, al día 30 se observó un aumento en la carga bacilar, las cuales oscilaron desde las 1700 UFCs hasta las 33,200, manteniéndose 3 animales con cultivo negativo. A los 150 días, se observó una ligera disminución en la carga bacilar, contabilizando un máximo de 25,172 UFCs, además de 4 animales con resultado negativo. Por otra parte, para el día 210 se observó una disminución considerable en la carga bacilar, obteniendo un conteo máximo de 1728 UFCs, y 5 animales negativos, los cuales representaron el 71% del grupo (figura 24).

3.2 Cuantificación de la secuencia IS6110

De los 22 animales negativos por cultivo, se seleccionaron tres de cada uno de los tiempos de sacrificio para realizar la detección de las micobacterias y de biomarcadores de metabolismo activo y latencia, priorizando la selección de aquellos con un resultado positivo a la prueba DTH (marcados en amarillo en la Tabla VI). Se incluyó un animal al cual no se le realizó la prueba DTH (Tabla VI, azul), ya que ésta sólo fue aplicada a 5 animales seleccionados al azar en cada grupo.

Tabla VI. Selección de animales para procesamiento de muestras.

Día post-infección	Ratón	UFC	DTH
7	1	-	+
7	2	-	+
7	3	-	+
7	4	-	+
7	5	-	+
7	6	-	D
7	7	-	D
7	8	-	D
7	9	-	D
7	10	-	D
30	1	-	+
30	5		+
30	7	-	D
150	3	-	+
150	4	-	+
150	5	-	+
150	7	-	D
210	3	-	+
210	4	-	+
210	5	-	+
210	6	-	D
210	7	-	D

En la tabla se muestran todos los animales con UFC negativas detectados.

+: Positivo; -: Negativo; D: Desconocido

Se obtuvo DNA de pureza optima en el total de muestras (9/9), mostrando relaciones de absorbancia entre 1.8 y 2.0. En cuanto a la concentración de DNA obtenido, se obtuvieron concentraciones superiores a los 1000 ng/ μ L de DNA a los 7, 30 y 150 días post-infección, mientras que al día 210, se observó una considerable disminución, cuantificando en promedio 100 ng/ μ L (Figura 25).

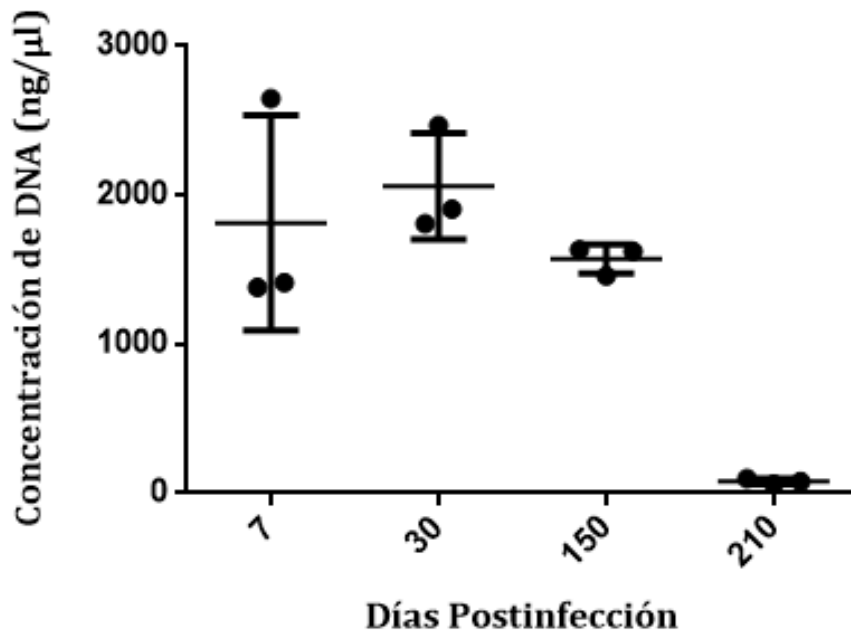


Figura 25. Concentración de DNA micobacteriano en tejido pulmonar. Se muestra la concentración de DNA en pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. Los valores son expresados como la media y desviación estándar de tres ratones por grupo en cada tiempo de sacrificio.

Para determinar la presencia de bacilos en la muestra, se detectó y cuantificó la secuencia IS6110, para ello se estandarizó una curva estándar de concentración (Figura 26). Esta curva fue construida empleando concentraciones dentro del rango 10^2 a 10^6 copias del gen (Figura 26a), la especificidad del ensayo se corroboró al observar sólo un pico de fluorescencia en la curva de fusión (Figura 26b).

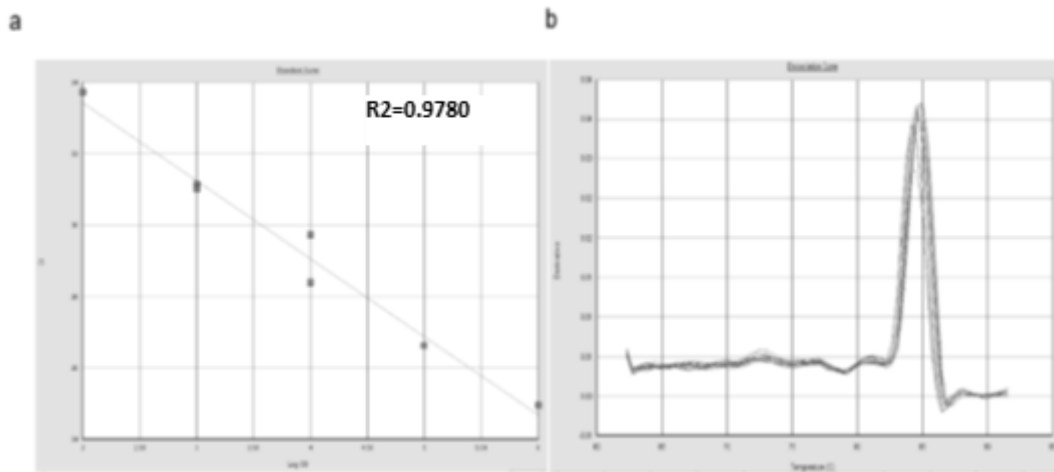


Figura 26. Curva estándar para IS6110. a) Curva estándar de concentración dentro del rango $10^2 - 10^6$; b) el gráfico muestra la especificidad del ensayo observando sólo un pico en la curva de fusión del amplicón.

Se analizaron un total de 9 muestras, en las cuales fue detectado DNA micobacteriano. En la figura 27a, se muestra el número de copias detectadas en cada una de las muestras. Al día 30, se detectó la mayor cantidad, en promedio 2000 copias del gen, disminuyendo en los tiempos posteriores hasta un promedio de 250 copias para los días 150 y 210. Para determinar el número de bacilos presentes en las muestras se tuvo en cuenta que *M. tuberculosis* H37Rv posee 16 copias de IS6110 en su genoma (Loerger *et al.*, 2010), por lo cual, esta cantidad fue tomada para realizar los cálculos.

A los 7 días post-infección, se detectaron hasta 33 bacilos, aumentando hasta 186 para el día 30, posteriormente, se observó una disminución, detectando un promedio de 25 bacilos al día 150 y 16 para el día 210 (Figura 27b).

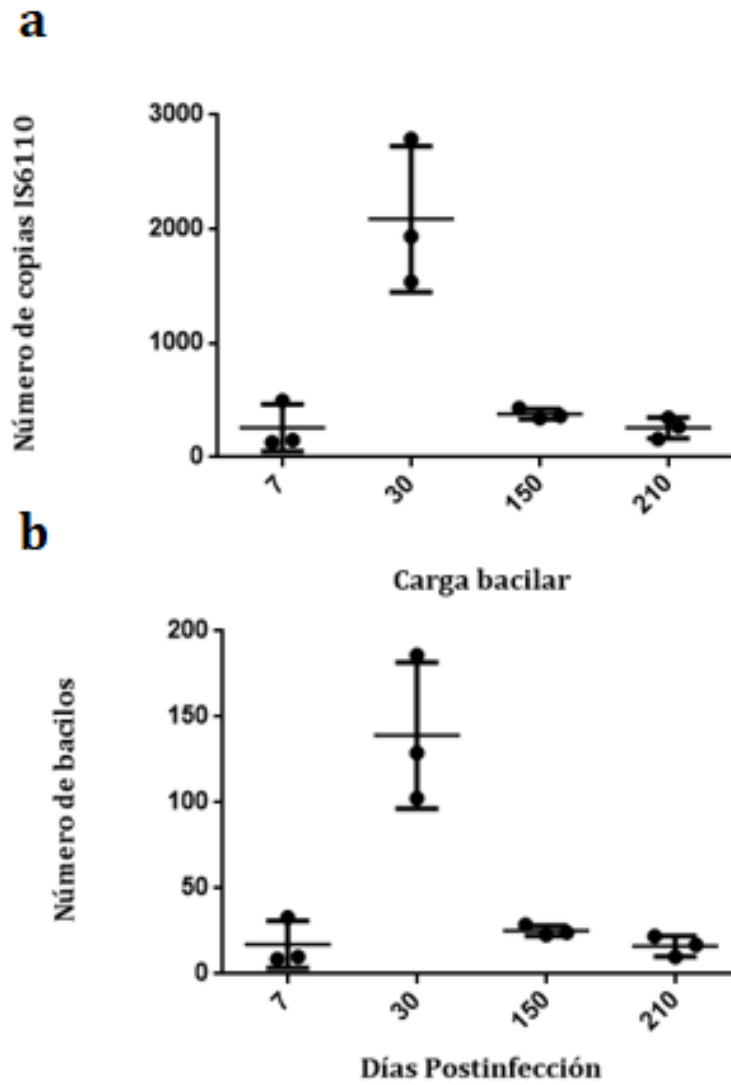


Figura 27. Determinación de la carga bacteriana por detección de IS6110. Detección por qPCR en tejido pulmonar con cultivo negativo. a) Número de copias del gen b) Cálculo de carga bacilar en las muestras. . Los valores son expresados como la media y desviación estándar de tres ratones por grupo en cada tiempo de sacrificio.

4. Detección de mRNA micobacteriano en tejido pulmonar

4.1 Cuantificación y cualificación de RNA

Una vez determinada la presencia de material genético (DNA) de la micobacteria en el tejido pulmonar de los animales, se realizó la extracción de RNA a partir de pulmón, bazo, riñón e hígado de cada uno de los animales seleccionados, obteniendo RNA en las 12 muestras de tejido pulmonar y renal, en 11/12 muestras de bazo, y en 10/12 muestras de tejido hepático. Mediante la relación de absorbancias A260/280, se determinó su calidad, obteniendo valores dentro del rango 1.8-2.2, valores considerados dentro del criterio de pureza óptima (Tabla VII) (Boletín técnico NanoDrop Lite).

Tabla VII. Detección de RNA micobacteriano en muestras pulmonares y extrapulmonares

Día	Muestra	Obtención de RNA	Relación (A260/280)	Día	Muestra	Detección de RNA	Relación (A260/280)
7	Pulmón	P	1.97	150	Pulmón	P	1.954
7	Pulmón	P	2.012	150	Pulmón	P	1.999
7	Pulmón	P	2.059	150	Pulmón	P	2.03
7	Bazo	P	2.022	150	Bazo	N	-
7	Bazo	P	1.996	150	Bazo	P	2.034
7	Bazo	P	2.035	150	Bazo	P	2.018
7	Riñón	P	1.927	150	Riñón	P	1.949
7	Riñón	P	1.967	150	Riñón	P	1.913
7	Riñón	P	1.97	150	Riñón	P	2.016
7	Hígado	P	2.09	150	Hígado	P	2.032
7	Hígado	N	-	150	Hígado	P	2.048
7	Hígado	P	2.029	150	Hígado	P	2.046
30	Pulmón	P	1.958	210	Pulmón	P	2.037
30	Pulmón	P	2.062	210	Pulmón	P	2.049
30	Pulmón	P	1.964	210	Pulmón	P	2.307
30	Bazo	P	2.05	210	Bazo	P	1.978
30	Bazo	P	2.029	210	Bazo	P	1.928
30	Bazo	P	2.079	210	Bazo	P	1.923
30	Riñón	P	1.97	210	Riñón	P	2.046
30	Riñón	P	1.884	210	Riñón	P	2.054
30	Riñón	P	2.051	210	Riñón	P	2.016
30	Hígado	P	2.07	210	Hígado	P	1.964
30	Hígado	P	2.044	210	Hígado	P	2.134
30	Hígado	P	2.175	210	Hígado	N	-

En la tabla se muestran los resultados en la obtención de RNA y las lecturas de absorbancia 260/280 de 48 muestras. P: Positivo, N: Negativo, -: Sin dato

Se cuantificó la cantidad de RNA obtenido en cada una de las muestras, obteniendo en bazo la mayor concentración, cuantificando al día 7 post-infección en promedio 200 ng/ μ L, aumentando en los días posteriores hasta los 600 ng/ μ L al día 210. Por otra parte, en tejido pulmonar, renal y hepático se obtuvieron concentraciones menores a los 200 ng/ μ L en los 4 tiempos de evaluación (Figura 28).

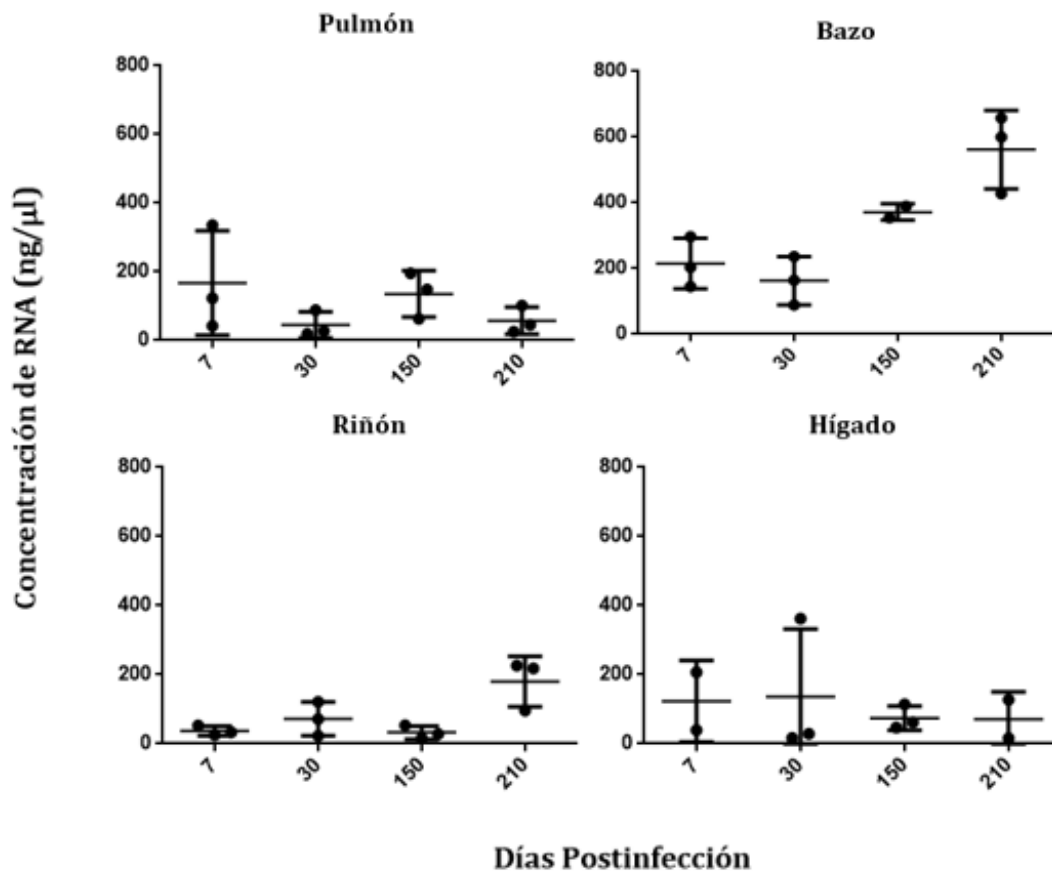


Figura 28. Concentración de RNA micobacteriano en tejido pulmonar y extrapulmonar. Se muestra la concentración de RNA obtenida. Los valores son expresados como la media y desviación estándar de tres ratones por grupo en cada tiempo de sacrificio.

4.2 Detección de transcritos en tejido pulmonar y extrapulmonar

Para comprobar la viabilidad de las micobacterias presentes en la muestra, así como su estado metabólico, se evaluó mediante RT-qPCR la expresión de un set de seis genes asociados al metabolismo micobacteriano, dos de estos asociados al metabolismo activo característico de las micobacterias en la TB, y el resto asociados al metabolismo latente, propio de micobacterias de LTBI. Estableciendo las curvas estándar correspondientes para esta metodología.

4.2.1 Metabolismo activo

Se evaluó la expresión de *ftsZ* y *rrnA-pcl1*, genes asociados al estado activo en la micobacteria, el primero codificante para la proteína FtsZ, clave durante la división celular bacteriana, el segundo, codificante para PCL1, el promotor más activo del operón codificante para RNA ribosómico.

Para la generación de curvas estándar se amplificaron mediante PCR fragmentos de los genes *IS6110*, *ftsZ* y *rrnA-pcl1* (Figura 29), determinando el número de copias presente, y la posterior obtención de una curva de concentraciones en el rango 10^1 a 10^6 (Figuras 30 y 31).

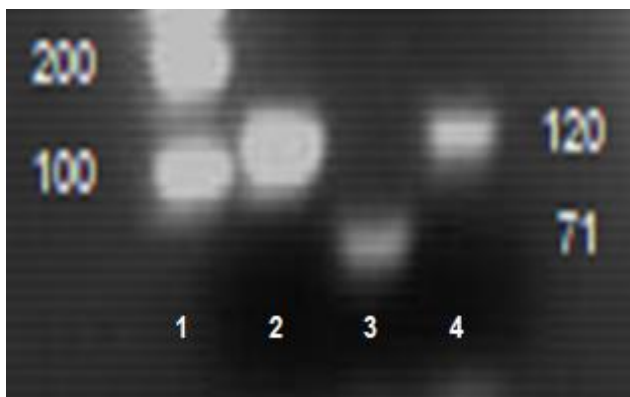


Figura 29. Amplicones de los genes del metabolismo activo. En el carril 1 se observa el marcador de talla molecular de 100 pb. El carril 2 corresponde al gen de 123 pb *is6110*, el carril 3 muestra al gen *ftsZ* de 71 pb y el carril 4 corresponde al fragmento de 120 pb del gen *rrnA-pcl1*.

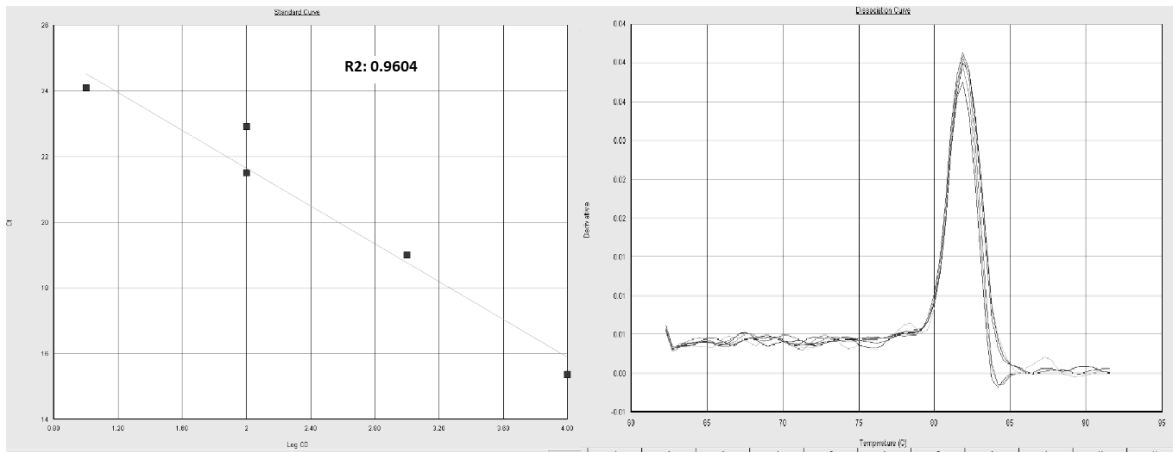


Figura 30. Curva estándar para *ftsZ*. Curva estándar de concentración dentro del rango $10^1 - 10^6$ (izquierda); curva de fusión del amplicón, muestra la especificidad del ensayo observando sólo un pico de fluorescencia.

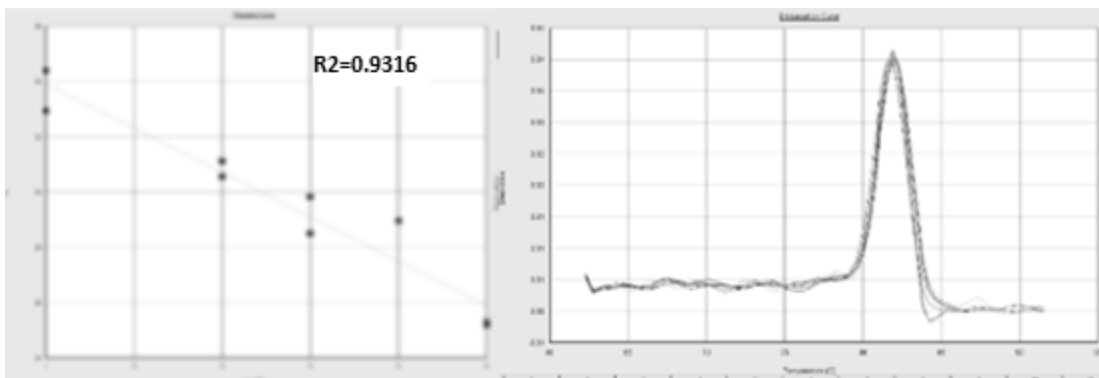


Figura 31. Curva estándar para *rrnA-pcl1*. Curva estándar de concentración dentro del rango $10^1 - 10^5$ (izquierda); curva de fusión del amplicón, muestra la especificidad del ensayo observando sólo un pico de fluorescencia.

A pesar de haberse confirmado la presencia de DNA micobacteriano en las muestras de tejido pulmonar de todos los animales analizados, éstas fueron negativas para los genes analizados. Además de las 12 muestras pulmonares, las 36 extrapulmonares fueron negativas para ambas dianas (*ftsZ* y *rrnA-pcl1*) (Tabla VIII).

Tabla VIII. Detección de dianas de metabolismo activo en muestras pulmonares y extrapulmonares.

Tejido	Número de muestras	DNA	cDNA
		<i>ftsZ</i>	<i>rrnA-pcl1</i>
Pulmón	12	0/12	0/12
Bazo	11	0/11	0/11
Riñón	12	0/12	0/12
Hígado	10	0/10	0/10

Se indica el número de muestras positivas para los genes de metabolismo activo evaluados

4.2.2 Metabolismo latente

Se seleccionaron dianas asociadas al metabolismo latente en la micobacteria, se evaluó la expresión de *dosT* y *dosR*, genes codificantes para componentes del regulón DosR (una cinasa sensora y el regulador de respuesta), implicado en el cambio de metabolismo en la micobacteria, además de los genes *hspX* e *icl*, codificantes para la proteína α -cristalina y la enzima isocitrato liasa respectivamente, implicadas en la respuesta micobacteriana a condiciones adversas para su supervivencia en estado de latencia. En la figura 32 se muestran los fragmentos de los genes amplificados por PCR punto final, y en la figura 33 se muestran las curvas estándar creadas para la PCR tiempo real.

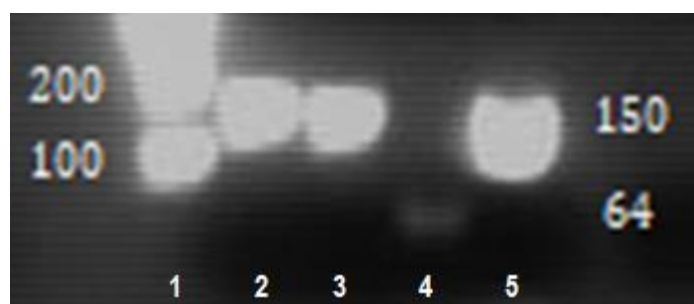


Figura 32. Amplicones de los genes del metabolismo latente. En el carril 1 se observa el marcador de talla molecular 100 pb. El carril 2 corresponde al gen de 150 pb *dosT*, el carril 3 muestra al gen *dosR* de 145 pb, el carril 4 al fragmento de 64 pb del gen *hspX*, y el carril 5 al gen de 146 pb *icl*.

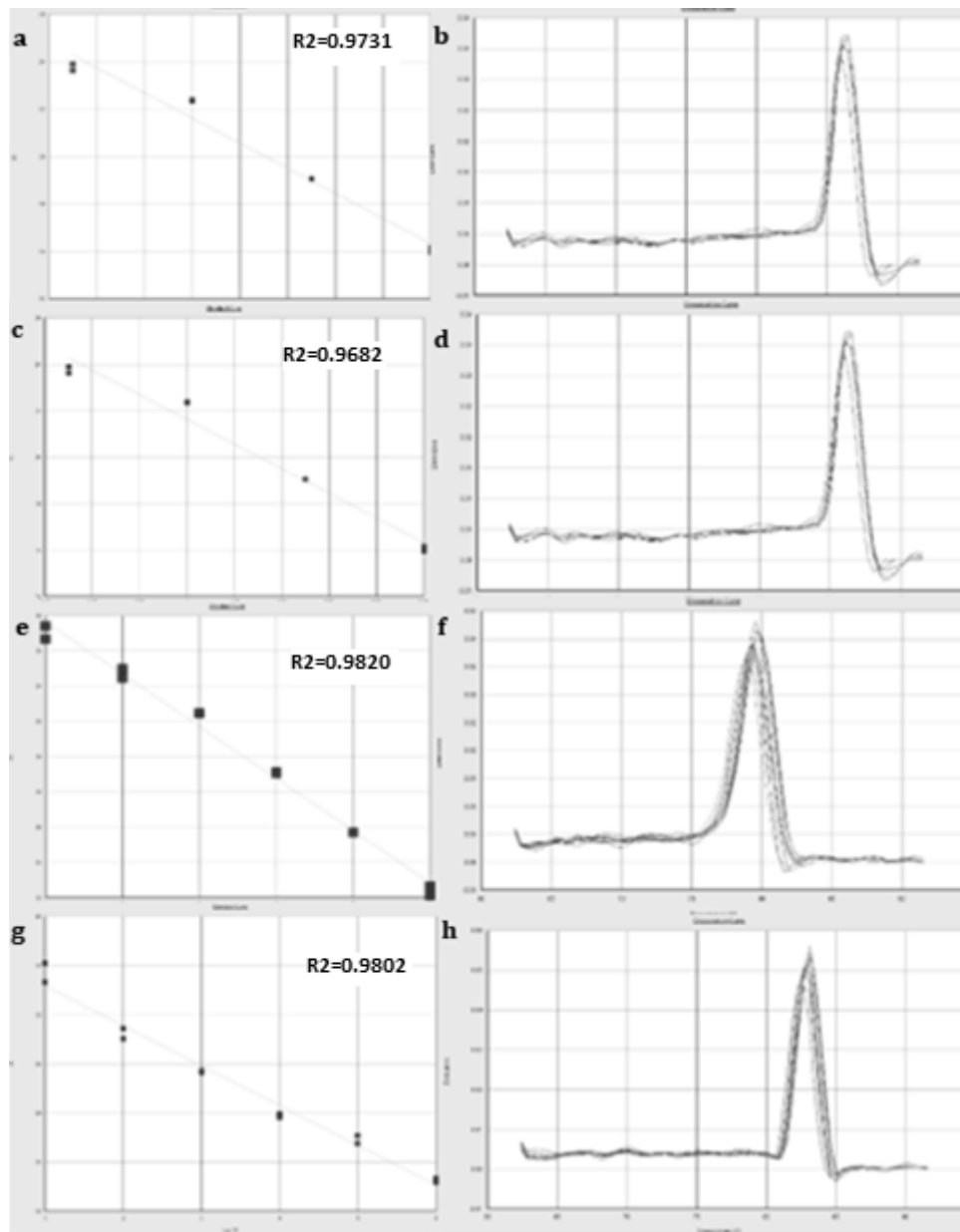


Figura 33. Curvas estándar para genes de metabolismo latente. Curva estándar de concentración dentro del rango $10^1 - 10^6$ y curva de fusión de los amplicones *dosT* (a y b); *dosR* (c y d); del *hspX* (e y f) e *icl* (g y h). En todos los genes se muestra la especificidad del ensayo observando sólo un pico de fluorescencia en la curva de fusión.

En las muestras pulmonares analizadas, los resultados mostraron que *dosT* codificante para la cinasa sensora del regulón DosR, fue detectada en 3/12 muestras, correspondientes al día 210 (100% de muestras). En el caso de las muestras extrapulmonares, *dosT* fue detectado en 8/33 muestras y, al igual que las muestras pulmonares, estas muestran también corresponden al día 210 post-infección, representando el 100% de las muestras. (Figura 34).

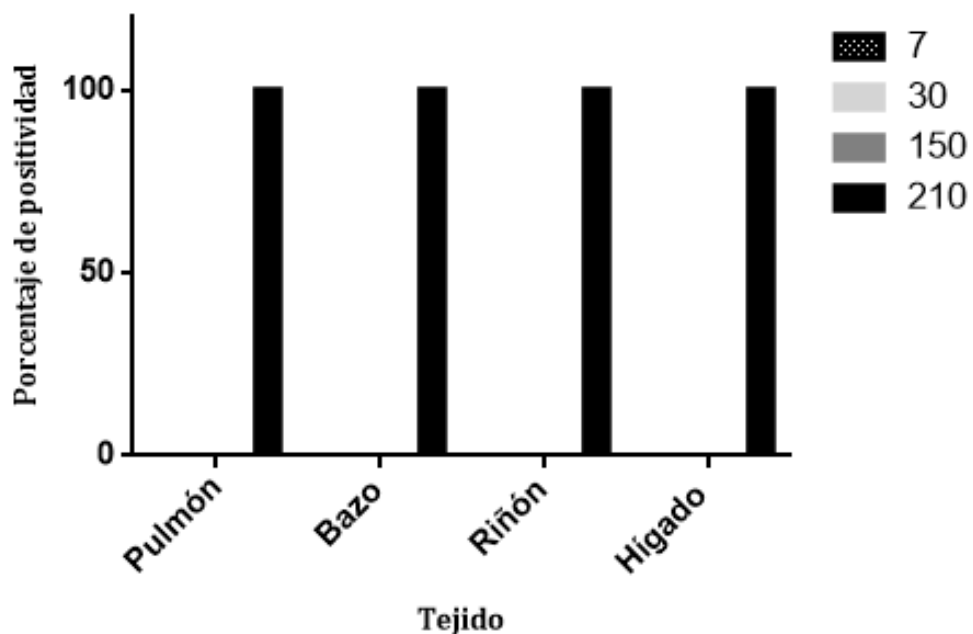


Figura 34. Positividad al gen *dosT* en tejido pulmonar y extrapulmonar. Se muestra el porcentaje de positividad en las muestras analizadas en cada uno de los tiempos evaluados.

El gen *dosR* mostró positividad en los 4 tejidos analizados, encontrando 43 muestras positivas de las 45 analizadas. El 100% de las muestras de tejido pulmonar fueron positivas a los 7 y 150 días post-infección; en bazo al día 210; en riñón a los días 7 y 210, finalmente en hígado a los 7 y 30 días post-infección (Figura 35).

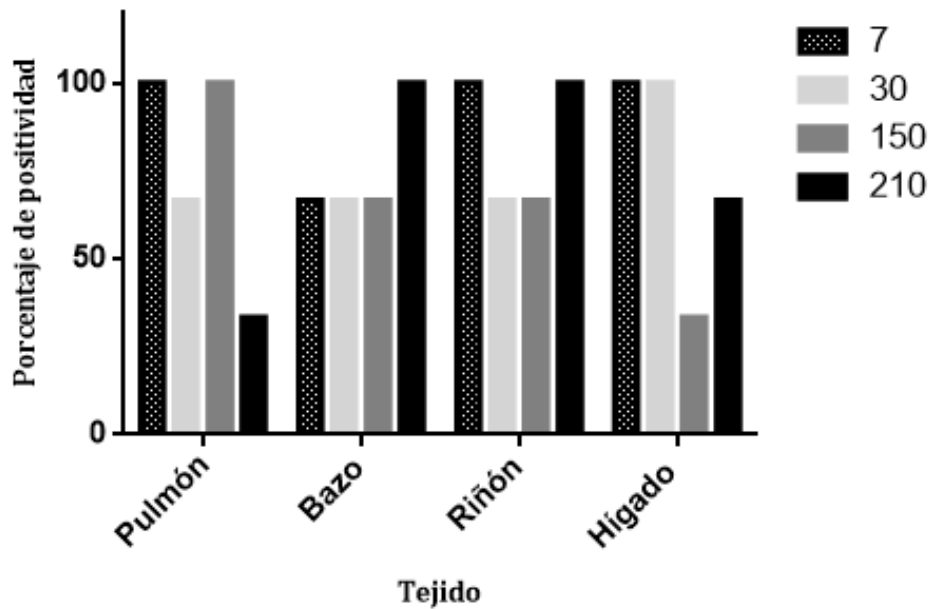


Figura 35. Positividad al gen *dosR* en tejido pulmonar y extrapulmonar. Se muestra el porcentaje de positividad en las muestras analizadas en cada uno de los tiempos evaluados.

Una vez corroborada la expresión de genes del regulón *DosR*, se evaluó la expresión de los genes *hspX* e *icl*, asociados a la supervivencia de la micobacteria durante el estado de latencia. La menor positividad se observó para el gen *hspX*, detectando sólo 12/45 muestras positivas, 6/12 de tejido pulmonar (50%), y 6/33 de tejido extrapulmonar (16.66%). En el tejido pulmonar, la mayor positividad fue detectada a los 7 días post-infección (100%). Con respecto al tejido extrapulmonar, sólo se observó positividad en los 3 tejidos evaluados: bazo, riñón e hígado al día 210, mostrando este último 100% de positividad (Figura 36).

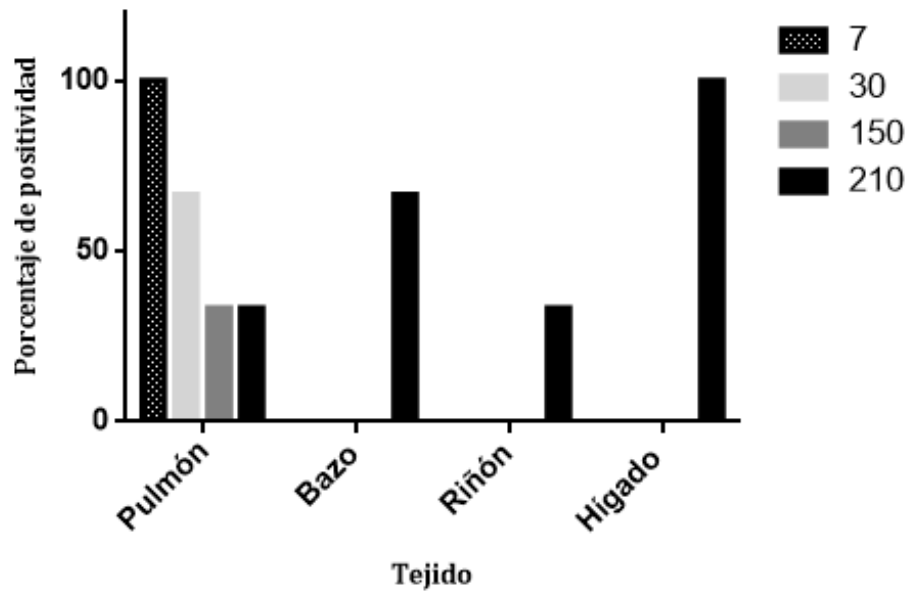


Figura 36. Positividad al gen hspX en tejido pulmonar y extrapulmonar. Se muestra el porcentaje de positividad en las muestras analizadas en cada uno de los tiempos evaluados.

Finalmente, en el caso de *icl*, se observó positividad en el 100% de muestras analizadas (45/45) (Figura 37),

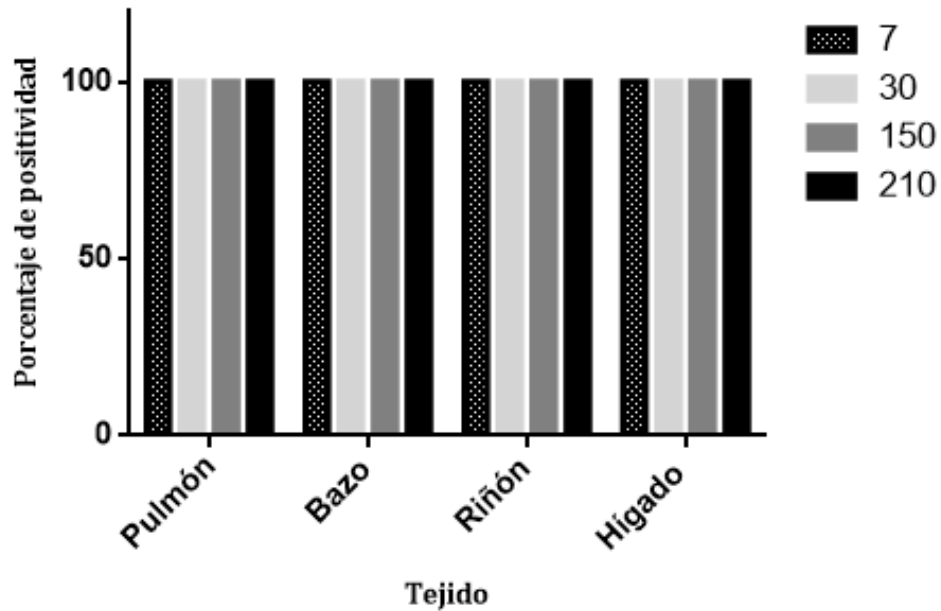


Figura 37. Positividad al gen *icl* en tejido pulmonar y extrapulmonar. Se muestra el porcentaje de positividad en las muestras analizadas en cada uno de los tiempos evaluados.

En resumen, la diana detectada con menor frecuencia fue *dosT* (11/45), seguida de *hspX* (12/45), *dosR* (36/45) e *icl* (45/45). Siendo el pulmón el órgano con mayor positividad a éstas, seguido de hígado, bazo y riñón (Tabla IX).

Tabla IX. Resultados generales de detección de transcritos de metabolismo latente

Tejido	<i>dosT</i>	<i>dosR</i>	<i>hspX</i>	<i>icl</i>	Positividad
Pulmón	3	9	6	12	30/48 (62.5%)
Bazo	3	9	2	1	25/44 (56.81%)
Riñón	3	10	1	12	26/48 (54.16%)
Hígado	2	8	3	10	23/40 (57.5%)
Total	11/45	36/45	12/45	45/45	

En la tabla se muestran los resultados generales de la RT-qPCR, se indica el número de muestras positivas para cada diana en cada uno de los tejidos evaluados.

En la figura 38 se muestra la cuantificación de estas dianas, los resultados obtenidos permiten observar que la expresión de *dosT* ocurre hacia el final del experimento, ya que al día 210 se observa expresión en los 4 tejidos analizados, siendo el hígado el sitio de mayor expresión. Por otra parte, *dosR* se expresó desde el inicio del experimento, manteniéndose los niveles a lo largo del experimento. Los niveles de *hspX* mostraron una expresión constante en tejido pulmonar en los 4 tiempos de evaluación, mientras que, en el tejido extrapulmonar se observó su expresión al día 210, siendo significativa esta diferencia con respecto a la expresión en tejido pulmonar. Por último, al igual que *dosR*, la expresión de *icl*, fue constante en los 4 tiempos de evaluación.

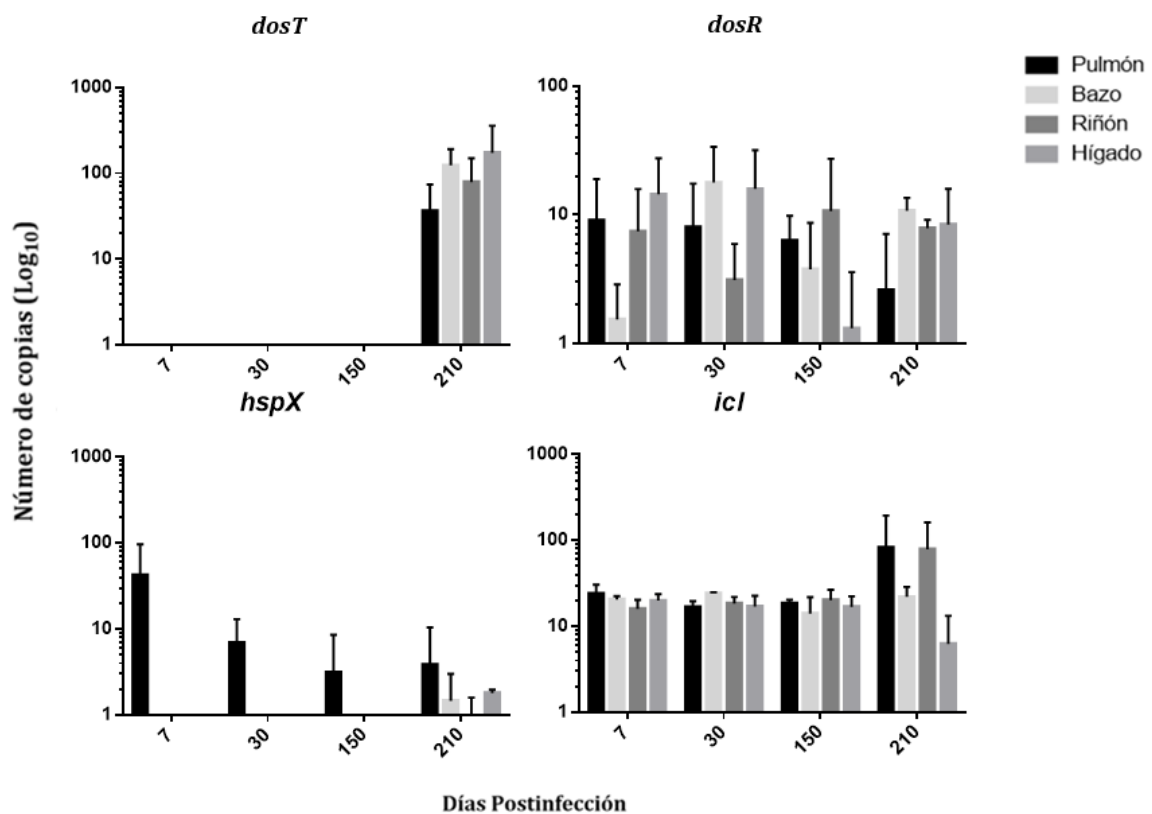


Figura 38. Expresión de genes de metabolismo latente por RT-qPCR en tejido pulmonar y extrapulmonar. Se presenta el promedio y desviación estándar de la expresión en las muestras del grupo en cada tiempo de evaluación. En pulmón y riñón $n=3$ en cada tiempo de evaluación, bazo $n=3$ al día 7, 30 y 210, $n=2$ al día 150, hígado $n=3$ al día 30 y 150, $n=2$ al día 7 y 210.

4.3 Detección de transcritos en tejido sanguíneo

Se sabe que las micobacterias son capaces de diseminarse a través de la vía hematológica, por lo cual, se evaluó la detección de éstas en sangre periférica. Para ello a partir de una muestra de sangre, se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales determinando en primer lugar, la presencia de material genético del hospedero y, posteriormente, la presencia de la secuencia de inserción IS6110 de la micobacteria. En los ensayos se amplificó GAPDH como control. Como se observa en la figura 39a, no se detectó a la secuencia IS6110 en ninguna de las muestras evaluadas, mientras que, se corroboró la presencia de GAPDH en muestras del día 150 post-infección (Figura 39b).



Figura 39. Detección de material genético del hospedero y la micobacteria en ácidos nucleicos extraídos de sangre periférica. a) Detección de la secuencia IS6110 de *M. tuberculosis* por PCR en ácidos nucleicos totales de animales con UFC negativo. (Carriles 1-6 muestras del día 30 post-infección; Carriles 7-12 muestras del día 150 post-infección); b) Detección de la secuencia GAPDH de ratón por PCR en ácidos nucleicos totales de animales con UFC negativo (Carriles 1-3 muestras del día 30 post-infección; Carriles 4-9 muestras del día 150 post-infección). Electroforesis en gel de agarosa al 2%. MP: marcador de talla molecular 100pb; Ctrl+: Cultivo celular; Ctrl-: Control negativo.

Para corroborar la ausencia de material genético micobacteriano, mediante RT-qPCR se evaluó la detección de transcritos tanto de los genes asociados al estado activo como al estado latente. Los resultados muestran positividad sólo en 2 de las 6 dianas evaluadas (*hspX* e *icl*), siendo el día 30 y 150 los puntos de detección. La positividad para *hspX* fue del 33.33% en ambos días, mientras que para *icl* se observó una positividad del 66.66% al día 30, aumentando al 100% para el día 150 (Figura 40).

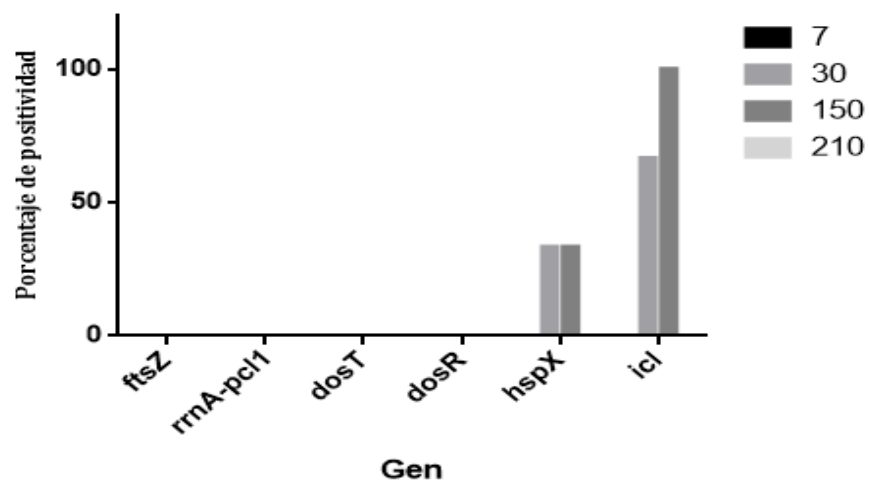


Figura 40. Positividad a genes de metabolismo activo y latente en sangre. Se muestra el porcentaje de positividad en las muestras analizadas en cada uno de los tiempos evaluados.

En la figura 41 se muestra un resumen de los hallazgos obtenidos en este trabajo.

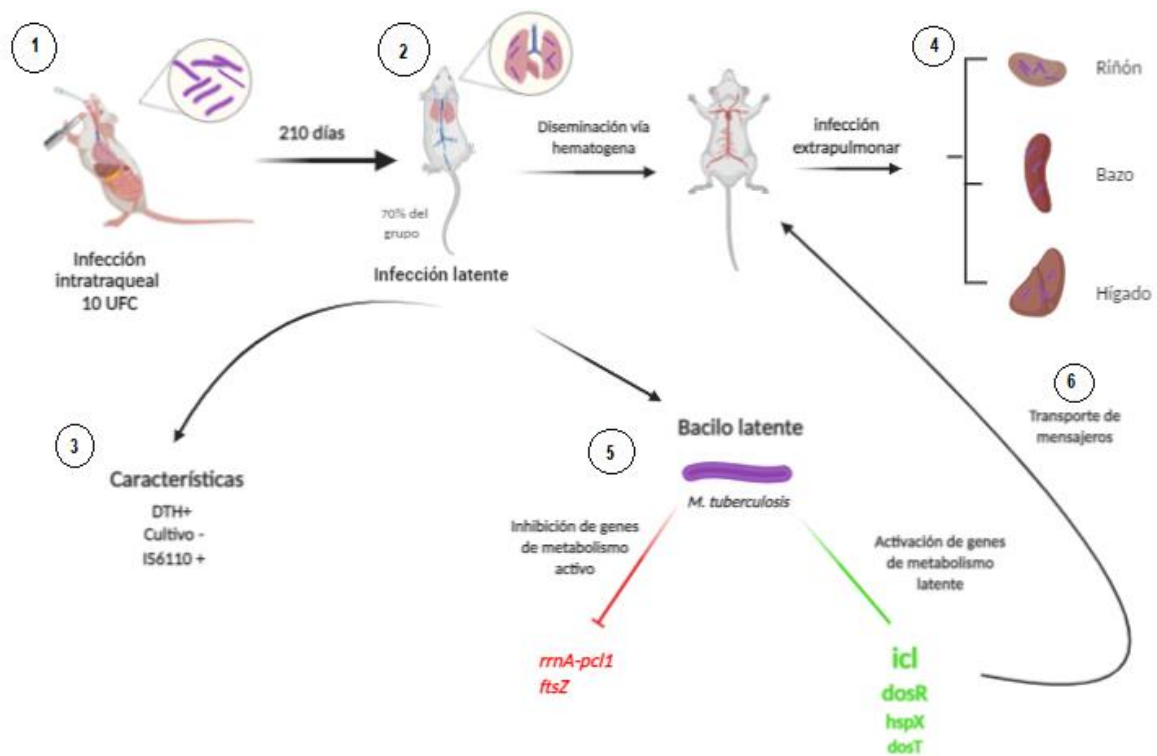


Figura 41. Resumen de resultados. La infección con dosis bajas de *M. tuberculosis* (10 UFC) (1), favorece el establecimiento de una infección latente a los 210 días post-infección en el 70% de los animales evaluados (2). Estos animales presentan una prueba DTH positiva, cultivo de micobacterias negativo y PCR positiva para la detección de la secuencia de inserción IS6110 en tejido pulmonar (3). Se determinó la diseminación micobacteriana a tejido extrapulmonar, principalmente a riñón, seguido de bazo e hígado (4). Los bacilos latentes se caracterizan por inhibir la expresión de genes de metabolismo activo y promover la expresión de genes asociados al metabolismo latente para promover su supervivencia en el hospedero (5), siendo *icl* el principal biomarcador del estado latente. *icl* es detectado en sangre circulante, pero se desconoce la función que realiza en este tejido, una sugerencia es que podría estar indicando la presencia de micobacterias en tránsito, probablemente encontradas en células fagocíticas infectadas (6). Creado en biorender.com

XI. Discusión

La TB sigue siendo un problema de salud importante a nivel mundial. A pesar de los avances tecnológicos y científicos actuales, las tasas de incidencia y mortalidad anual de la enfermedad siguen siendo elevadas, esto en gran parte debido al amplio reservorio de *M. tuberculosis* en la población humana, su capacidad de evasión de la respuesta inmune y a su habilidad para persistir por periodos prolongados dentro del hospedero en un estado de infección latente. Como consecuencia, se genera un gran número de casos nuevos de la enfermedad debido a reactivación endógena de la micobacteria (Lillebaek *et al.*, 2002, Yang y Gao, 2018), lo cual puede representar hasta el 81% de los casos en regiones donde la enfermedad no es endémica, según se ha reportado en algunos estudios (Batyshina y Schwartz, 2019).

El diagnóstico de la LTBI es incierto, dado que no es posible diferenciar entre un estado de infección activa y uno de infección latente, ya que es poco el conocimiento que se tiene acerca de este estadio de la enfermedad, obtenido principalmente a partir del uso de modelos *in vitro* que simulan las condiciones adversas a las que se sugiere se enfrenta la micobacteria dentro del hospedero, estimulando de esta manera un periodo de latencia, sin embargo, hasta ahora no ha sido posible demostrar estos resultados en un modelo *in vivo* adecuado.

A pesar de la existencia de diversos modelos animales de LTBI, el desarrollo de un método diagnóstico económico y eficaz que logre diferenciar a la TB activa de la LTBI, y el establecimiento de estrategias terapéuticas para la prevención de la reactivación de la enfermedad, no han sido posibles. La naturaleza resistente de los ratones a la infección por *M. tuberculosis*, ha permitido el desarrollo de algunos modelos de infección latente (Patel *et al.*, 2011), no obstante, uno de los mayores problemas que han presentado, son la incapacidad de controlar la carga bacilar y la posterior eliminación del patógeno por parte de algunos animales (Cosma *et al.*, 2003).

En estudios previos se ha planteado que la infección de ratones con dosis bajas de micobacterias es adecuada para el establecimiento de un modelo de latencia, ya que esto permite a los animales controlar la enfermedad.

Recientemente, se ha demostrado que la infección de ratones con dosis bajas de micobacterias (10 UFCs), es adecuada para el establecimiento de un modelo de latencia, ya que los ratones son capaces de controlar la enfermedad, llegando a un

punto en donde no se logra cultivar a la micobacteria, sin embargo, se detecta la expresión de biomarcadores indicadores de su viabilidad en tejido pulmonar del hospedero (Tovar Vázquez, 2017).

En el presente estudio, se planteó caracterizar un modelo murino de LTBI, para ello, ratones macho de la cepa BALB/c fueron inoculados con una dosis de aproximadamente 10 UFCs, administrándola mediante la vía intratraqueal. Se sabe que es difícil obtener un control sobre la dosis deseada durante la infección de los animales, y que éste es uno de los factores que influyen en el curso que tomará la infección, por lo cual, para confirmar que la administración de las dosis de infección en el modelo era adecuada y reproducible, previo a la infección de los animales se realizó una simulación de infección *in vitro*, con el fin de descartar que existieran variaciones entre la infección de los animales por factores derivados de los materiales de administración, el manejo del personal o el tiempo de la infección. Se determinó que la metodología empleada en la infección era adecuada y reproducible, ya que en todos los animales se inoculaban micobacterias suficientes para iniciar el proceso de infección, observando que las dosis administradas se encontraban dentro del rango de 2-11 UFCs (figura 21), contabilizando con mayor frecuencia 4 UFCs. Siendo esta dosis adecuada para el establecimiento del modelo, ya que se estima que el rango mínimo de infección en humanos es de 1-10 UFCs (Lewis, 2007).

Una vez realizada la infección de los animales, se realizó una prueba de hipersensibilidad retardada, también conocida como prueba de la tuberculina o DTH, que tuvo como objetivo exhibir una exposición previa a antígenos micobacterianos, ya que es incapaz de diferenciar entre una respuesta producida por una infección activa, infección latente o entre infección reciente y pasada, pues puede permanecer una respuesta positiva aún después de la eliminación de la micobacteria (Yang *et al.*, 2011). Los resultados observados en la figura 22, resaltan que a los 7 días post-infección, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los ratones infectados y el grupo control sano. Se ha reportado que tras la infección por *M. tuberculosis*, hay una sensibilización y proliferación de linfocitos T específicos para antígenos contenidos en la tuberculina, los cuales, al reconocerlos, se acumulan en el sitio de inyección, dando como resultado una induración palpable. En humanos se requieren al menos dos semanas para que los linfocitos T sensibilizados pasen al torrente circulatorio y adquieran la capacidad de reconocer estos Ag micobacterianos depositados en la dermis, por lo cual, durante este tiempo, aunque exista una infección, no se obtiene

respuesta a la prueba (Jensen *et al.*, 2005, Calvo Bonachera y Bernal Rosique, 2018). Esto fue corroborado al día 30 post-infección, ya que fue a partir de este tiempo, que se observó una respuesta significativamente mayor entre los grupos, permaneciendo constante en los tiempos posteriores de evaluación, 150 y 210 días post-infección, confirmando una respuesta inmune positiva en todos los animales evaluados indicativa de la correcta inoculación de la dosis de infección.

Una de las características primordiales de las micobacterias en estado latente, es la pérdida de la capacidad de crecimiento en cultivos comunes, por lo cual, se determinó la carga bacteriana en pulmón de los animales infectados por conteo de UFCs para identificar animales con cultivo negativo. Como se muestra en la figura 23, al día 7 post-infección, no se observó crecimiento bacteriano en el 100% de los animales evaluados, sin embargo, en los tiempos posteriores de evaluación, se observó un aumento en la carga bacilar, identificando al día 30 el pico máximo del crecimiento bacteriano. Se ha reportado, que es justo dentro de este tiempo, que se establece una fase protectora vital para el control de la infección, de acuerdo con el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva, (Hernández Pando *et al.*, 1996) y, por lo tanto, esta fase corresponde también al periodo de adaptación de la micobacteria. La disminución considerable de la carga bacilar observada en los tiempos posteriores, indicó el éxito de la respuesta del hospedero establecida en contra del patógeno para un adecuado control y/o eliminación de la infección, llegando a encontrar a los 210 días post-infección, poco más del 70% de los animales negativos por cultivo (Figura 24).

Se detectaron un total de 22 animales con cultivo negativo, los cuales podrían corresponder a animales no infectados, animales que lograron eliminar completamente a los bacilos, o bien, animales que lograron contener, pero no eliminar la infección, presentando una infección latente. Se descartó que los animales no hubieran sido infectados, ya que la mayoría de éstos presentaron una respuesta positiva a la prueba DTH. Para determinar si los animales habían eliminado la infección o presentaban una infección latente, en primer lugar, se determinó la presencia de material genético de la micobacteria en la muestra, pues, a pesar de que el cultivo bacteriano es el estándar de oro en el diagnóstico de enfermedades bacterianas, en muchas ocasiones no permite identificar bacterias viables no cultivables, que no pueden crecer en los medios de cultivo de rutina, pero están vivas y son capaces de renovar su actividad metabólica en algún momento (Dong *et al.*, 2020, Truchado *et al.*, 2020). Como se ha mencionado anteriormente, durante la latencia *M. tuberculosis*

adquiere características de bacilo viable no cultivable, por lo cual, el empleo de métodos diagnósticos complementarios es requerido para su correcta identificación.

La detección de DNA micobacteriano por PCR es una técnica muy sensible y específica para detectar a la micobacteria, por lo cual, fue empleada para determinar la presencia de micobacterias en el tejido pulmonar. Se utilizó el elemento de inserción IS6110, reportado como una secuencia presente en un número variable de copias en el genoma de miembros del MTBC. Los resultados mostrados en la figura 27 revelan presencia de DNA micobacteriano en todas las muestras evaluadas (12/12), la qPCR permitió determinar el número de copias de IS6110 presentes en las muestras, con lo cual se realizó un estimado del número de bacilos contenido en las muestras. Se comprobó la presencia de *M. tuberculosis* en todos los animales que fueron negativos por cultivo (Figura 27), además, se observó una tendencia similar a la identificada mediante cultivo, siendo el día 30 post-infección el de mayor carga bacilar (186 bacilos), la cual disminuyó en los tiempos de evaluación posteriores, contabilizando 16 bacilos en promedio para el día 210 (Figura 27b). Interesantemente, cuando se evaluó la concentración de DNA presente en las muestras (figura 25), al día 210, que es el momento en el que se obtiene la carga bacilar más baja, se presentó la menor concentración de DNA, de forma semejante a lo reportado previamente por Sharma y cols. (2006) en pulmones de cobayos infectados, el cual observó una reducción del 70% en los niveles de DNA a las 44 semanas.

La detección de DNA no es un indicativo de la viabilidad de la micobacteria, por lo cual, para determinar si las micobacterias estaban vivas o no, así como para determinar su estado metabólico, se comprobó la presencia de mRNA micobacteriano mediante RT-qPCR. La vida media del mRNA bacteriano puede variar de segundos a más de una hora, aunque generalmente se reportan vidas medias de 2-4 min (Laalami *et al.*, 2014), por lo cual una señal positiva a éste ha sido considerada como indicativo de viabilidad (Del Mar Lleó *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2014).

Se ha sugerido que, durante la latencia, las micobacterias disminuyen o detienen por completo su replicación (Muñoz-Elías *et al.*, 2005), por lo cual, en primer lugar, se evaluó la expresión de los genes *ftsZ* y *rrnA-pcl1*, implicados en la división celular y en la síntesis de RNA ribosomal, eventos esencialmente activos en las micobacterias durante la fase activa de la enfermedad. En las 12 muestras de pulmón evaluadas, se determinó la ausencia de ambas dianas (Tabla VIII), lo cual, podría ser indicativo de la

no viabilidad de las micobacterias, o bien, un soporte a la hipótesis acerca del arresto de la replicación bacteriana en el estado latente. FTSZ es considerada la principal proteína iniciadora del proceso de división (Hong *et al.*, 2013), por lo tanto, su ausencia indicaría que la micobacteria no se encuentra en un proceso de replicación activo. Además, se sabe que, durante el estado latente, las micobacterias adquieren un fenotipo farmacorresistente (Peddireddy *et al.*, 2017), la ausencia de *rrnA-pcl1*, evidencia de la detención del proceso de síntesis de RNA ribosomal, y, por lo tanto, de la síntesis proteica, lo que explicaría la nula eficiencia de fármacos como la rifampicina y la estreptomycin, dirigidos a la inhibición de estos procesos, durante el tratamiento de la LTBI.

Para comprobar si la micobacteria se encontraba en un estado latente, se evaluó la expresión de las dianas, *dosT*, *dosR*, *hspX* e *icl* asociadas a éste. Los resultados mostraron positividad de todas las muestras al menos a una de las cuatro dianas evaluadas (Anexo B. Tabla I), detectando con mayor frecuencia a las dianas *dosR* (9/12) e *icl* (12/12) (Figuras 35 y 37), estando esta última presente en todas las muestras analizadas, *dosT* y *hspX* se detectaron en menor proporción, encontrando que *dosT* solo estaba presente al día 210 post-infección (Figuras 34 y 36).

Estos resultados permitieron corroborar, en primera instancia, la viabilidad de las micobacterias, además, sugirieron que éstas se encontraban en un ambiente desfavorable, que estimulaba su transformación metabólica, adquiriendo características de bacilos latentes, ya que se sabe que *dosR* es el componente regulador de respuesta del regulón del mismo nombre y, que éste ante condiciones adversas promueve la expresión de genes alternos que favorecen la supervivencia bacteriana (Chen *et al.*, 2013). Varios estudios han sugerido que *dosR* juega un papel fundamental en la infección latente y en la persistencia tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Dhingra *et al.*, 2012, Gautam *et al.*, 2015), esto ha sido corroborado mediante la delección del gen o la inhibición de la unión de DosR al DNA, observando una regulación negativa en la transcripción de genes de latencia, interviniendo en la supervivencia de bacterias latentes (Gupta *et al.*, 2009). Este papel protagónico durante la latencia se ha corroborado en humanos infectados de forma latente, ya que se ha visto, que éstos tienen mayor probabilidad de portar células T específicas para antígenos del regulón que pacientes con TB activa (Leyten *et al.*, 2006, Leistikow *et al.*, 2010).

A pesar de que se observó la expresión de *dosR*, el gen que codifica para la proteína sensora DosT, fue detectado en un número limitado de muestras (3/12), correspondientes principalmente al día 210 post-infección. Este resultado destaca, ya que podría estar indicando que la hipoxia no es el principal factor inductor del estado latente *in vivo*, a diferencia de lo observado en modelos *in vitro*, pues se sabe que *dosT* sensa y responde a los cambios drásticos en la concentración de oxígeno (Kumar *et al.*, 2007), por lo tanto, su detección al día 210 podría ser un indicio de que la hipoxia no es uno de los principales factores inductores de latencia durante las primeras etapas de transición, sino que existen otros factores y elementos que intervienen en esta etapa.

Además de la expresión del gen *dosR*, se comprobó la presencia de los genes *hspX* e *icl*, codificantes para la proteína alfa cristalina y la enzima isocitrato liasa, respectivamente; ambas ampliamente asociadas al periodo de latencia. Los resultados obtenidos mostraron una disminución en la positividad a *hspX* a través del tiempo, un dato interesante, ya que se ha reportado que la expresión de *hspX* está directamente relacionada con la expresión de *dosR* (Sharma *et al.*, 2006), observando precisamente el mismo comportamiento en esta diana (Figuras 35 y 36). Sin embargo, en la expresión se observaron diferencias, ya que *hspX* presentó un ligero aumento en el día 210 post-infección, mientras que se observó una disminución de la expresión en *dosR* (Figura 38). A pesar de que *hspX* es considerada uno de los principales biomarcadores del estado latente (Silva *et al.*, 2014), no se le conoce alguna función específica durante la latencia. A pesar de esto, *hspX* es una de las proteínas mayormente empleadas en el desarrollo de nuevas vacunas en contra de la TB (Geluk *et al.*, 2007). Hu y cols. (2006), han atribuido a la expresión constitutiva de *hspX* la disminución del crecimiento bacteriano *in vitro* e *in vivo*, lo cual en el modelo es corroborado por la disminución en la concentración de DNA y de la carga bacilar, así como por la ausencia de los biomarcadores de replicación

Por otra parte, otro de los biomarcadores por excelencia de la latencia en *M. tuberculosis*, es la enzima isocitrato liasa, una de las enzimas principales del ciclo del glioxilato, la cual transforma el isocitrato a succinato, permitiendo a la micobacteria crecer en ambientes en donde la única fuente de carbono son acetato y ácidos grasos, como lo es dentro del fagosoma en los MØ's (Micklinghoff, 2009). Esta enzima se ha visto sobre expresada cuando las bacterias entran en fase estacionaria, relacionándose con la necesidad de obtener fuentes alternas de carbono ante la disminución de

nutrientes (McKinney *et al.*, 2000). La constante expresión de esta diana en las muestras, indican que la carencia de nutrientes en el ambiente es probablemente el principal factor inductor de la transformación micobacteriana, para su persistencia.

La patología causada por *M. tuberculosis*, afecta principalmente a los pulmones, ya que su vía de transmisión es aérea, por lo cual, se ha asumido que es en este sitio, en donde se encuentra durante su estado latente, sin embargo, se sabe que tiene la capacidad de diseminarse a sitios extrapulmonares. En este estudio se evaluó la diseminación de la micobacteria a órganos extrapulmonares, mediante la detección de los biomarcadores evaluados en tejido pulmonar. Tal como fue reportado previamente por Barrios-Payán y cols. (2012), se detectaron bacilos en pulmón, hígado, bazo y riñón, siendo el tejido pulmonar el único positivo para biomarcadores del estado latente. *dosR* e *icl*, fueron detectados con mayor frecuencia en todos los tiempos evaluados (Figuras 35 y 37). La expresión de *icl* fue constante desde los 7 hasta los 150 días post-infección, sin embargo, al día 210 se observó una ligera variación en la expresión aumentando en riñón y disminuyendo en hígado (Figura 38). Interesantemente, a diferencia de la expresión de *dosR* en pulmón, en tejido extrapulmonar se observaron variaciones constantes en sus niveles de expresión en cada uno de los tejidos evaluados, siendo el riñón, el tejido con la menor variación (Figura 38). Por otra parte, *dosT* y *hspX*, sólo estuvieron presentes al día 210 post-infección (Figuras 34 y 36), la expresión de *dosT* fue homogénea en los tejidos y equivalente a la expresión en pulmón, mientras que, la expresión de *hspX* fue considerablemente menor en tejido extrapulmonar que en pulmón (Figura 38).

Durante los primeros días de infección y durante la etapa activa de la enfermedad, se ha visto que existe diseminación hematológica de la micobacteria, esto se ha comprobado mediante el aislamiento de bacilos en sangre, principalmente de pacientes inmunocomprometidos (Clark *et al.*, 1991). Interesantemente, hay evidencia de que *M. tuberculosis* induce angiogénesis, favoreciendo de esta manera su diseminación (Polena *et al.*, 2016). En este estudio se detectaron bacilos viables en pulmón, riñón, hígado y bazo, curiosamente estos son órganos que se encuentran ampliamente vascularizados (Sharma *et al.*, 2005).

El proceso de diseminación de *M. tuberculosis* en el organismo es algo poco explorado durante la infección latente, como se ha mencionado anteriormente. La capacidad de *M. tuberculosis* para poblar nichos extracelulares le permite permanecer en el

hospedero sin ser detectada, pues el diagnóstico de la TB extrapulmonar no es posible directamente. Se ha evaluado la detección indirecta de la micobacteria mediante el estudio de la respuesta inmune del hospedero, por lo cual, se planteó evaluar una estrategia de detección directa del bacilo en sangre mediante técnicas moleculares, lo que permitiría establecer no sólo un método diagnóstico, sino también, un método de monitoreo de la enfermedad.

Se evaluó la presencia de biomarcadores indicativos de la presencia de bacilos en la sangre de ratones infectados que fueron negativos por cultivo. En primer lugar, se evaluó mediante PCR punto final la presencia de material genético micobacteriano, determinando sólo presencia de genoma del hospedero en algunas muestras (Figura 39b). Para descartar que la ausencia de material genético micobacteriano fuera producto de la baja sensibilidad de la técnica empleada, mediante RT-qPCR, se valoró la presencia de las 6 dianas evaluadas en tejido pulmonar y extrapulmonar, siendo identificada sólo la presencia de *hspX* e *icl*, mostrando esta última la mayor positividad como había sido observado en los tejidos evaluados previamente (Figura 40).

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la infección de ratones con una dosis de <10 UFCs de *M. tuberculosis*, permite el establecimiento de una infección latente, que en humanos se caracteriza por la ausencia de síntomas clínicos y una respuesta positiva a la prueba PPD. Estas características fueron observadas en el modelo, ya que no se observó la presencia de signos clínicos de la enfermedad en los animales como pérdida de peso, disminución de actividad o espalda encorvada, sin embargo, se corroboró la correcta exposición de los animales a la micobacteria mediante una respuesta positiva a la prueba DTH.

Se observó un control adecuado de la infección por parte del sistema inmune del hospedero, lo que fue demostrado al detectar animales con bacilos no cultivables, en los 4 tiempos evaluados en el experimento, siendo a los 210 días post-infección, cuando se detectó el mayor número de animales negativos por cultivo, resultado similar a lo descrito previamente por Tovar Vázquez (2017).

Las micobacterias en estado latente, presentan características de células viables no cultivables (VBNC), al ser bacterias que mantienen su viabilidad, a pesar de no ser cultivables. La viabilidad de estas micobacterias en este modelo se demostró mediante la detección de mRNA por RT-qPCR, encontrando positividad para genes asociados al estado de latencia (*dosT*, *dosR*, *hspX* e *icl*), mientras que la expresión de genes asociados

a metabolismo activo no fue detectada, lo cual proporciona indicios de la transición de la micobacteria de un estado activo a un estado latente. En los últimos años se han buscado blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la LTBI y la prevención de la reactivación de la enfermedad, los resultados obtenidos en este modelo, proponen a la enzima isocitrato liasa como un blanco potencial, ya que se encuentra expresada tanto en tejido pulmonar como extrapulmonar, incluso llegando a detectarla en sangre, además de que es detectada desde el inicio de la transición al estado latente, aumentando hacia el último día de evaluación, lo cual revela un papel protagónico durante la persistencia micobacteriana. Al tratarse de una enzima ausente en las células humanas, se presenta un blanco atractivo para la terapia dirigida específicamente en contra de las micobacterias latentes.

Otra de las características fundamentales de la infección latente, es la diseminación de la micobacteria a órganos extrapulmonares, esto fue demostrado en el modelo, al detectar cDNA micobacteriano en un elevado porcentaje de muestras de tejido extrapulmonar, además de la detección de biomarcadores en tejido sanguíneo, lo que corrobora la diseminación de las micobacterias por la vía hematogena a órganos ampliamente vascularizados. Sin embargo, esto debe estudiarse con mayor profundidad, para corroborar si esta detección corresponde directamente a la micobacteria, o bien, corresponde a material genético liberado por la micobacteria, como un posible mecanismo de señalización y/o comunicación intracelular o intercelular, aunque ésta última no ha sido descrita en micobacterias.

XII. Conclusiones

- Los resultados muestran el establecimiento de un modelo murino de tuberculosis latente, caracterizado por la detección de animales con bacilos viables no cultivables.
- La infección latente, se evidenció en este modelo al comprobar, mediante la detección de RNA micobacteriano en tejido extrapulmonar, diseminación extrapulmonar de la infección, característica de la infección latente en humanos.
- La evaluación de la expresión de genes asociados al metabolismo latente, mostró que *icl* es el gen que más se asoció a este estadio, ya que fue detectado en todas las muestras evaluadas, mostrando una tendencia al aumento en su expresión con respecto al tiempo.
- La expresión de *icl* en las muestras permite proponer este gen como un potencial blanco terapéutico, ya que éste no se encuentra codificado en el genoma de los mamíferos (incluido el humano), lo cual favorecería el establecimiento de una terapia dirigida hacia los bacilos latentes sin presentar algún riesgo para el hospedero.
- Usando una dosis de 10 UFCs se pudieron detectar animales con LTBI a partir de los 30 días post-infección, y su frecuencia aumentó respecto al tiempo, siendo a los 210 días, el tiempo ideal de evaluación.
- Este trabajo marca una pauta para el estudio de la biología del bacilo latente, así como, de la infección latente en el hospedero, lo que contribuirá a establecer terapias preventivas de la reactivación de la infección.

XIII. Perspectivas

- Incrementar el periodo de evaluación del modelo para determinar si el 100% de los animales establecen una infección latente.
- Validar el modelo, mediante inmunosupresión de los animales, para inducir la reactivación de la enfermedad.
- Evaluar el modelo mediante la infección de animales con aislados clínicos de *M. tuberculosis* de pacientes con evidencia o sospecha de reactivación de la enfermedad.
- Evaluar la búsqueda de un biomarcador específico que permita diferenciar animales con enfermedad activa de aquellos con enfermedad latente.
- Caracterizar la respuesta inmune del hospedero durante la infección latente.

XIV. Bibliografía

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier.
- Abrahams, K. A., & Besra, G. S. (2018). Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology*, 145(2), 116-133.
- Ai, J. W., Ruan, Q. L., Liu, Q. H., & Zhang, W. H. (2016). Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. *Emerging microbes & infections*, 5(1), 1-8.
- Alderwick, L. J., Harrison, J., Lloyd, G. S., & Birch, H. L. (2015). The mycobacterial cell wall—peptidoglycan and arabinogalactan. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(8), a021113.
- Arango, M. (2015). Historia natural de la tuberculosis. Fisiopatogenia de la infección y la enfermedad en el niño. *NEUMOLOGIA PEDIÁTRICA*.
- Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD *et al*. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2002; 128:229–37.
- Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., & Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 58(1), E9
- Barbier, M., & Wirth, T. (2017). The evolutionary history, demography, and spread of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, 453-473.
- Barer, M. R., Gribbon, L. T., Harwood, C. R., & Nwoguh, C. E. (1993). The viable but non-culturable hypothesis and medical bacteriology. *Reviews in Medical Microbiology*, 4(4), 183-191.
- Barrios-Payán, J., Saqui-Salces, M., Jeyanathan, M., Alcántara-Vazquez, A., Castañon-Arreola, M., Rook, G., & Hernandez-Pando, R. (2012). Extrapulmonary locations of Mycobacterium tuberculosis DNA during latent infection. *The Journal of infectious diseases*, 206(8), 1194-1205.
- Batyrshina, Y. R., & Schwartz, Y. S. (2019). Modeling of Mycobacterium tuberculosis dormancy in bacterial cultures. *Tuberculosis*, 117, 7-17.

- Beldaña Piñeiro, A. E. (2018). evaluación de la delección del gen *mmpL4b* de *Mycobacterium abscessus* en cojinetes plantares. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Betts, J.; Lukey, P.; Robb, L.; McAdam, R.; Duncan, K. Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling. *Mol. Microbiol.* 2002, 43, 717–731.
- Boletín técnico NanoDrop Lite. Consultado en línea el 20 de noviembre de 2020 en [<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>].
- Brites, D., & Gagneux, S. (2015). Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. *Immunological reviews*, 264(1), 6-24.
- Brown, G.C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* 2001, 1504, 46–57
- Bucsan, A. N., Mehra, S., Khader, S. A., & Kaushal, D. (2019). The current state of animal models and genomic approaches towards identifying and validating molecular determinants of Mycobacterium tuberculosis infection and tuberculosis disease. *Pathogens and disease*, 77(4), ftz037.
- Calvo Bonachera, J., & Bernal Rosique, M. (2018). Tuberculosis. Diagnóstico y tratamiento. *Revista Española de Patología Torácica [revista en internet]*, 487-497.
- Caminero Luna, J. A., & UITER. (2003). Epidemiología de la tuberculosis. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. París: Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), 25-51.
- 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.
- Chaw, L., Chien, L. C., Wong, J., Takahashi, K., Koh, D., & Lin, R. T. (2020). Global trends and gaps in research related to latent tuberculosis infection. *BMC public health*, 20(1), 1-10.
- Chen, T., He, L., Deng, W., & Xie, J. (2013). The Mycobacterium DosR regulon structure and diversity revealed by comparative genomic analysis. *Journal of cellular biochemistry*, 114(1), 1-6.

- Clark, R. A., Blakley, S. L., Greer, D., Smith, M. H., Brandon, W., & Wisniewski, T. L. (1991). Hematogenous dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with AIDS. *Reviews of infectious diseases*, *13*(6), 1089-1092.
- Cook, G. M., Berney, M., Gebhard, S., Heinemann, M., Cox, R. A., Danilchanka, O., & Niederweis, M. (2009). Physiology of mycobacteria. *Advances in microbial physiology*, *55*, 81-319.
- Correa-Macedo, W., Cambri, G., & Schurr, E. (2019). The interplay of human and *Mycobacterium tuberculosis* Genomic Variability. *Frontiers in Genetics*, *10*, 865.
- Cosma, C. L., Sherman, D. R., & Ramakrishnan, L. (2003). The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, *57*(1), 641-676.
- Cubero, N., Esteban, J., Palenque, E., Rosell, A., & Garcia, M. J. (2012). Evaluation of the detection of *Mycobacterium tuberculosis* with metabolic activity in culture-negative human clinical samples. *Clinical Microbiology and Infection*, *19*(3), 273-278.
- de Martino, M., Lodi, L., Galli, L., & Chiappini, E. (2019). Immune response to *Mycobacterium tuberculosis*: a narrative review. *Frontiers in Pediatrics*, *7*, 350.
- Dhingra, S., Kaur, K., Taneja, N. K., & Tyagi, J. S. (2012). DevR (DosR) binding peptide inhibits adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* under hypoxia. *FEMS microbiology letters*, *330*(1), 66-71.
- Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. (2020). Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(1), 149-183.
- Dube, D., Gupta, M., Agrawal, U., & Vyas, S. P. (2014). Animal Models of Tuberculosis. In *Animal Biotechnology* (pp. 21-37). Academic Press.
- Flynn, J. L., & Chan, J. (2003). Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Current opinion in immunology*, *15*(4), 450-455.
- Gautam, U. S., McGillivray, A., Mehra, S., Didier, P. J., Midkiff, C. C., Kisse, R. S., & Sherman, D. R. (2015). DosS is required for the complete virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice with classical granulomatous lesions. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *52*(6), 708-716.
- Geluk, A., Lin, M. Y., van Meijgaarden, K. E., Leyten, E. M., Franken, K. L., Ottenhoff, T. H., & Klein, M. R. (2007). T-cell recognition of the HspX protein of

Mycobacterium tuberculosis correlates with latent M. tuberculosis infection but not with M. bovis BCG vaccination. *Infection and immunity*, 75(6), 2914-2921.

- Gibson, S. E., Harrison, J., & Cox, J. A. (2018). Modelling a silent epidemic: a review of the in vitro models of latent tuberculosis. *Pathogens*, 7(4), 88.
- Gibson, S. E., Harrison, J., & Cox, J. A. (2018). Modelling a silent epidemic: a review of the in vitro models of latent tuberculosis. *Pathogens*, 7(4), 88.
- Global Tuberculosis Report 2020. Consultado en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf?ua=1>
- Goodfellow, M., & Magee, J. G. (1998). Taxonomy of mycobacteria. In *Mycobacteria* (pp. 1-71). Springer, Boston, MA.
- Gupta, R. K., Thakur, T. S., Desiraju, G. R., & Tyagi, J. S. (2009). Structure-based design of DevR inhibitor active against nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. *Journal of medicinal chemistry*, 52(20), 6324-6334.
- Hernandez-Pando, R., Orozco, H., Sampieri, A., Pavon, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., & Madrid, M. V. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 89(1), 26.
- Herrera Barrios, M. T., Torres Rojas, M., Juárez Carvajal, E., & Sada Díaz, E. (2005). Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(4), 327-336.
- Hong, W., Deng, W., & Xie, J. (2013). The structure, function, and regulation of Mycobacterium FtsZ. *Cell biochemistry and biophysics*, 65(2), 97-105.
- Hu, Y., & Coates, A. (2018). A method to evaluate persistent Mycobacterium tuberculosis in vitro and in the Cornell mouse model of tuberculosis. In *Antibiotic Resistance Protocols* (pp. 157-166). Humana Press, New York, NY.
- Hu, Y., Movahedzadeh, F., Stoker, N. G., & Coates, A. R. (2006). Deletion of the Mycobacterium tuberculosis α -crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo. *Infection and immunity*, 74(2), 861-868.
- Hu, Y., Pertinez, H., Ortega-Muro, F., Alameda-Martin, L., Liu, Y., Schipani, A., Davies, G. & Coates, A. (2016). Investigation of elimination rate, persistent subpopulation removal, and relapse rates of Mycobacterium tuberculosis by

using combinations of first-line drugs in a modified Cornell mouse model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(8), 4778-4785.

- Jankute, M., Cox, J. A., Harrison, J., & Besra, G. S. (2015). Assembly of the mycobacterial cell wall. *Annual review of microbiology*, 69, 405-423.
- Jee, B., Singh, Y., Yadav, R., & Lang, F. (2018). Small heat shock Protein16.3 of *Mycobacterium tuberculosis*: after Two decades of functional characterization. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(1), 368-380.
- Jensen, P. A., Lambert, L. A., Iademarco, M. F., & Ridzon, R. (2005). Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings, 2005.
- Jeon, B. Y., Kwak, J., Hahn, M. Y., Eum, S. Y., Yang, J., Kim, S. C., & Cho, S. N. (2012). In vivo characteristics of Korean Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strain K1 in an aerosol challenge model and in the Cornell latent tuberculosis model. *Journal of medical microbiology*, 61(10), 1373-1379.
- Kaprelyants, A. S., Gottschal, J. C., & Kell, D. B. (1993). Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS microbiology letters*, 104(3-4), 271-285.
- Kaufmann, S. H. (1993). Immunity to intracellular bacteria. *Annual review of immunology*, 11(1), 129-163
- Kaufmann, S. H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology*, 1(1), 20-30.
- Kumar, A., Toledo, J. C., Patel, R. P., Lancaster, J. R., & Steyn, A. J. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(28), 11568-11573.
- Kupz, A., Zedler, U., Stäber, M., & Kaufmann, S. H. (2016). A mouse model of latent tuberculosis infection to study intervention strategies to prevent reactivation. *PLoS One*, 11(7), e0158849.
- Laalami, S., Zig, L., & Putzer, H. (2014). Initiation of mRNA decay in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(10), 1799-1828.
- Leistikow, R. L., Morton, R. A., Bartek, I. L., Frimpong, I., Wagner, K., & Voskuil, M. I. (2010). The *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. *Journal of bacteriology*, 192(6), 1662-1670.
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5(1), 48-56

- Leyten, E. M., Lin, M. Y., Franken, K. L., Friggen, A. H., Prins, C., van Meijgaarden, K. E., ... & Arend, S. M. (2006). Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*, *8*(8), 2052-2060.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, *5*, 258.
- Lillebaek, T., Dirksen, A., Baess, I., Strunge, B., Thomsen, V. Ø., & Andersen, Å. B. (2002). Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. *The Journal of infectious diseases*, *185*(3), 401-404
- Lin, P. L., & Flynn, J. L. (2018). The end of the binary era: revisiting the spectrum of tuberculosis. *The Journal of Immunology*, *201*(9), 2541-2548.
- Loerger, T. R., Feng, Y., Ganesula, K., Chen, X., Dobos, K. M., Fortune, S., & Sasseti, C. (2010). Variation among genome sequences of H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis* from multiple laboratories. *Journal of bacteriology*, *192*(14), 3645-3653.
- Luo, Y., Suliman, S., Asgari, S., Amariuta, T., Baglaenko, Y., Martínez-Bonet, M., & León, S. R. (2019). Early progression to active tuberculosis is a highly heritable trait driven by 3q23 in Peruvians. *Nature communications*, *10*(1), 1-10.
- Mackaness, George B. "The immunology of antituberculous immunity." (1968): 337-344.
- Mayito, J., Andia, I., Belay, M., Jolliffe, D. A., Kateete, D. P., Reece, S. T., & Martineau, A. R. (2019). Anatomic and cellular niches for *Mycobacterium tuberculosis* in latent tuberculosis infection. *The Journal of infectious diseases*, *219*(5), 685-694.
- McCUNE, R. M., Feldmann, F. M., Lambert, H. P., & McDermott, W. (1966). Microbial persistence: I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. *The Journal of experimental medicine*, *123*(3), 445-468.
- McKinney, J. D., Zu Bentrup, K. H., Muñoz-Elías, E. J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., ... & Russell, D. G. (2000). Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, *406*(6797), 735-738.

- Micklinghoff, J. C., Breitinger, K. J., Schmidt, M., Geffers, R., Eikmanns, B. J., & Bange, F. C. (2009). Role of the transcriptional regulator RamB (Rv0465c) in the control of the glyoxylate cycle in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 191(23), 7260-7269.
- Muñoz-Elías, E. J., Timm, J., Botha, T., Chan, W. T., Gomez, J. E., & McKinney, J. D. (2005). Replication dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in chronically infected mice. *Infection and immunity*, 73(1), 546-551.
- Nemeth, J., Olson, G. S., Rothchild, A., Jahn, A., Mai, D., Duffy, F., Delahaye, J., Srivatsan, S., Plumlee, C., Urdahl, K., Diercks, A., Aderem, A. & Gold, E. (2019). Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection provides protection for the host by changing the activation state of the innate immune system. *bioRxiv*, 561126.
- O'Garra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., & Berry, M. P. (2013). The immune response in tuberculosis. *Annual review of immunology*, 31, 475-527.
- Pai, M., Denkinger, C. M., Kik, S. V., Rangaka, M. X., Zwerling, A., Oxlade, O., Metcalfe, J. Z., Cattamanchi, A., Dowdy, D. W., Dheda, K. & Banaei, N. (2014). Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical microbiology reviews*, 27(1), 3-20.
- Patel, K., Jhamb, S. S., & Singh, P. P. (2011). Models of latent tuberculosis: their salient features, limitations, and development. *Journal of laboratory physicians*, 3(2), 75.
- Peddireddy, V., Doddam, S. N., & Ahmed, N. (2017). Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis. *Frontiers in immunology*, 8, 84
- Perfil de tuberculosis: México, Generado el 22-05-2020 por la Organización Mundial de la Salud, Consultado en: [https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_&lan=%22ES%22&iso2=%22MX%22&main_tabs=%22est_tab%22]
- Kashino, S. S., Owendale, P., Izzo, A., & Campos-Neto, A. (2006). Unique model of dormant infection for tuberculosis vaccine development. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(9), 1014-1021.
- Polena, H., Boudou, F., Tilleul, S., Dubois-Colas, N., Lecointe, C., Rakotosamimanana, N., & Herrmann, J. L. (2016). *Mycobacterium tuberculosis* exploits the formation of new blood vessels for its dissemination. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.

- Rastogi, N., Legrand, E., & Sola, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 20(1), 21-54.
- Ray, C. G., & Ryan, K. J. (2010). *Sherris medical microbiology* (Vol. 6). United States of America. McGraw-Hill.
- Rodriguez-Takeuchi, S. Y., Renjifo, M. E., & Medina, F. J. (2019). Extrapulmonary tuberculosis: pathophysiology and imaging findings. *RadioGraphics*, 39(7), 2023-2037.
- Rosser, A., Stover, C., Pareek, M., & Mukamolova, G. V. (2017). Resuscitation-promoting factors are important determinants of the pathophysiology in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Critical reviews in microbiology*, 43(5), 621-630.
- Sakamoto, K. (2012). The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Veterinary pathology*, 49(3), 423-439.
- Scanga, C. A., Mohan, V. P., Joseph, H., Yu, K., Chan, J., & Flynn, J. L. (1999). Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model. *Infection and immunity*, 67(9), 4531-4538.
- Sharma, D., Bose, A., Shakila, H., Das, T. K., Tyagi, J. S., & Ramanathan, V. D. (2006). Expression of mycobacterial cell division protein, FtsZ, and dormancy proteins, DevR and Acr, within lung granulomas throughout guinea pig infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48(3), 329-336.
- Sharma, S. K., Mohan, A., Sharma, A., & Mitra, D. K. (2005). Miliary tuberculosis: new insights into an old disease. *The Lancet infectious diseases*, 5(7), 415-430.
- Shi, C., Shi, J., & Xu, Z. (2011). A review of murine models of latent tuberculosis infection. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 43(11-12), 848-856.
- Sikri, K., & Tyagi, J. S. (2013). The evolution of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy models. *Current science*, 607-616.
- Silva, B. D. S., Tannus-Silva, D. G. S., Rabahi, M. F., Kipnis, A., & Junqueira-Kipnis, A. P. (2014). The use of *Mycobacterium tuberculosis* HspX and GlcB proteins to identify latent tuberculosis in rheumatoid arthritis patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(1), 29-37.
- Singh, A. K., & Gupta, U. D. (2018). Animal models of tuberculosis: lesson learnt. *The Indian journal of medical research*, 147(5), 456.

- Sterling, T. R., Njie, G., Zenner, D., Cohn, D. L., Reves, R., Ahmed, A., Menzies, D., Horsburgh, R., Crane, C. M., Burgos, M., & LoBue, P., Winston, C. A. & Belknap, R. (2020). Guidelines for the treatment of latent tuberculosis infection: recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2020. *American Journal of Transplantation*, 20(4), 1196-1206.
- Tovar Vázquez, B. E. (2017). *Estandarización De Un Modelo De Tuberculosis Latente En Ratones Balb/C*. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Truchado, P., Gil, M. I., Larrosa, M., & Allende, A. (2020). Detection and quantification methods for viable but non-culturable (VBNC) cells in process wash water of fresh-cut produce: Industrial validation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 673.
- Wayne, L.G. & Hayes, L.G. An in vitro model for sequential study of shutdown of Mycobacterium tuberculosis through two stages of nonreplicating persistence. *Infect. Immun.* 1996, 64, 2062–2069.
- Wayne, L.G. Dynamics of submerged growth of Mycobacterium tuberculosis under aerobic and microaerophilic conditions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1976, 114, 807–811
- Yang, C., & Gao, Q. (2018). Recent transmission of Mycobacterium tuberculosis in China: the implication of molecular epidemiology for tuberculosis control. *Frontiers of Medicine*, 12(1), 76-83.
- Yang, Z., Rosenthal, M., Rosenberg, N. A., Talarico, S., Zhang, L., Marrs, C., & Andersen, A. B. (2011). How dormant is Mycobacterium tuberculosis during latency? A study integrating genomics and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 1164-1167.
- Zhai, W., Wu, F., Zhang, Y., Fu, Y., & Liu, Z. (2019). The immune escape mechanisms of Mycobacterium tuberculosis. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 340.
- Zink, A. R., Molnár, E., Motamedi, N., Pálffy, G., Marcsik, A., & Nerlich, A. G. (2007). Molecular history of tuberculosis from ancient mummies and skeletons. *International Journal of Osteoarchaeology*, 17(4), 380-391.

Anexos

Anexo A. Mix empleadas en el estudio

Tabla I. Componentes de la mezcla de reacción para la qPCR

Reactivo	Volumen por reacción
Quantitect SYBER Green PCR Buffer	12.5 µl
Primer Fw (50pmol)	1 µl
Primer Rv (50 pmol)	1 µl
DNA	1 000 ng
H ₂ O	La necesaria para un volumen final de 25 µl

Tabla II. Secuencias de primers empleadas en el estudio

Gen	Secuencias	Longitud de producto amplificado	
		Tm (°C)	(pb)
IS6110	5'CCTGCGAGCGTAGGCCGTCGG ³ 5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG ³	68	123
<i>ftsZ</i>	5'GCAGCGACTTGGGCTTGTTTC _{3'} 5'GGGTGAGCGGCGTCTTGTAC _{3'}	62	71
<i>rrnA-PCL1</i>	5'TGTGTTTGGTGGTTTCACATT _{3'} 5'GGAAAAGGGAGCCAAAGGTA _{3'}	60	120
<i>dos-T</i>	5'CCATCTTGGGGATCACATC _{3'} 5'CGATCCCCTCGTAGACGAAT _{3'}	56	150
<i>dos-R</i>	5'CATCAAGGGAATGGAGTTGG _{3'} 5'CTGGTCGGTAAGGCCTGATA _{3'}	56	145
<i>icl</i>	5'TTCCTGCACTTCGACATACG _{3'} 5'CCAAGTTCCAGAAGGAGCTG _{3'}	58	146
<i>hspX</i>	5'AGCAGAAGGACTTCGACGGTC _{3'} 5'GTGCGAACGAAGGAACCGTA _{3'}	64	60

Tabla III. Componentes de la mezcla de reacción para la RT-PCR

Master Mix	Volumen por reacción
Buffer RT 10x	2.5 µl
dNTP Mix (5mM c/u)	2.5 µl
Oligo dT Primer (10 µM)	2.5 µl
Rnase inhibitor (10 U/ µl)	1 µl
Omniscript Reverse Transcriptase	1 µl
RNA	100 ng/ µl
Agua libre de RNAsas	La necesaria para un volumen final de 25 µl

Tabla IV. Componentes de la mix 1 de reacción para la RT-PCR de ácidos nucleicos.

Mix	Volumen por reacción
Random primers	2 µL
dNTPs 10 mM	2 µL
Agua DEPC	12.5 µL
Muestra	10 µL

Tabla V. Componentes de la mix 1 de reacción para la RT-PCR de ácidos nucleicos.

Mix	Volumen por reacción
Buffer RT 5x	8 µL
Rnase H	2 µL
DTT 0.1 M	2 µL
Retrotranscriptasa SuperScript III	1.5 µL

Tabla VI. Componentes de la mezcla de reacción de la PCR punto final

Master Mix	Volumen por reacción
Hotstar	12.5 µl
Fw primer	0.5 µl
Rv primer	0.5 µl
cDNA	1 µl
Agua libre de RNAsas	10.5 µl

Anexo B. Resultados globales del estudio

Tabla I. Detección de DNA y cDNA en tejido pulmonar y extrapulmonar

Día	Ratón	Tejido	IS6110	<i>ftsZ</i>	<i>rrna-PCL1</i>	<i>dosT</i>	<i>dosR</i>	<i>hspX</i>	<i>icl</i>	cDNA positivas
7	R3	Pulmón	+	-	-	-	+	+	+	3
7	R4	Pulmón	+	-	-	-	+	+	+	3
7	R5	Pulmón	+	-	-	-	+	+	+	3
30	R1	Pulmón	+	-	-	-	+	+	+	3
30	R5	Pulmón	+	-	-	-	+	-	+	2
30	R7	Pulmón	+	-	-		-	+	+	2
150	R4	Pulmón	+	-	-	-	+	+	+	3
150	R5	Pulmón	+	-	-	-	+	-	+	2
150	R6	Pulmón	+	-	-	-	+	-	+	2
210	R3	Pulmón	+	-	-	+	-	-	+	2
210	R4	Pulmón	+	-	-	+	+	+	+	4
210	R5	Pulmón	+	-	-	+	-	-	+	2
7	R3	Bazo		-	-	-	+	-	+	2
7	R4	Bazo		-	-	-	+	-	+	2
7	R5	Bazo		-	-	-	-	-	+	1
30	R1	Bazo		-	-	-	+	-	+	2
30	R5	Bazo		-	-	-	+	-	+	2
30	R7	Bazo		-	-	-	-	-	+	1
150	R4	Bazo								
150	R5	Bazo		-	-	-	+	-	+	2
150	R6	Bazo		-	-	-	+	-	+	2
210	R3	Bazo		-	-	+	+	+	+	4
210	R4	Bazo		-	-	+	+	+	+	4
210	R5	Bazo		-	-	+	+	-	+	3
7	R3	Riñón		-	-	-	+	-	+	2
7	R4	Riñón		-	-	-	+	-	+	2
7	R5	Riñón		-	-	-	+	-	+	2
30	R1	Riñón		-	-	-	+	-	+	2
30	R5	Riñón		-	-	-	+	-	+	2
30	R7	Riñón		-	-	-	-	-	+	1
150	R4	Riñón		-	-	-	+	-	+	2
150	R5	Riñón		-	-	-	+	-	+	2
150	R6	Riñón		-	-	-	-	-	+	1
210	R3	Riñón		-	-	+	+	-	+	3
210	R4	Riñón		-	-	+	+	+	+	4
210	R5	Riñón		-	-	+	+	-	+	3
7	R3	Hígado		-	-	-	+	-	+	2
7	R4	Hígado								

7	R5	Hígado		-	-	-	+	-	+	2
30	R1	Hígado		-	-	-	+	-	+	2
30	R5	Hígado		-	-	-	+	-	+	2
30	R7	Hígado		-	-	-	+	-	+	2
150	R4	Hígado		-	-	-	+	-	+	2
150	R5	Hígado		-	-	-	-	-	+	1
150	R6	Hígado		-	-	-	-	-	+	1
210	R3	Hígado		-	-	+	+	+	+	4
210	R4	Hígado		-	-	+	+	+	+	4
210	R5	Hígado		-	-	+		+		
30	R1	Sangre		-	-	-	-	-	-	0
30	R5	Sangre		-	-	-	-	+	+	2
30	R7	Sangre		-	-	-	-	-	+	1
150	R4	Sangre		-	-	-	-	-	+	1
150	R5	Sangre		-	-	-	-	+	+	2
150	R6	Sangre		-	-	-	-	-	+	1