

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

“Análisis de la presencia de micobacterias en estado latente en muestras de tejido pulmonar y extrapulmonar de humano y ratón”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN

DIRECTOR DE TESIS

DR. MAURICIO CASTAÑÓN ARREOLA

MÉXICO, D.F. JUNIO 2012

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.

COMITÉ TUTORAL

Director de Tesis

Dr. Mauricio Castañón Arreola.
Profesor Investigador Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

ASESORES

Dr. Rogelio Hernández Pando.
Investigador en Ciencias Médicas F
Departamento de Patología, Sección de Patología Experimental
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubiran”

Dra. Elizbeth Álvarez Sánchez.
Profesora investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra. Elisa Azuara Liceaga.
Profesora investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra. Martha Yocupicio Monroy
Profesora investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

El presente proyecto de investigación fue desarrollado en el laboratorio 4 del Posgrado en Ciencias Genómicas. Le agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México el apoyo académico y económico que me otorgó, sin el cual no hubiera sido posible alcanzar esta meta en mi desarrollo profesional.

“...todos los días hay que luchar porque ese amor a la humanidad viviente se transforme en hechos concretos, en actos que sirvan de ejemplo, de movilización.”

Ernesto “Che” Guevara

Dedicatorias

A::L::G::D::G::A::D::U::

A mis padres Jorge y Delfina, por todo el apoyo incondicional que siempre me han brindado, por impulsarme a seguir soñando, por festejar conmigo los pequeños logros y por el consuelo en las derrotas, es mi anhelo lograr que se sientan orgullosos de haber educado a un individuo útil a la sociedad. Han sido, son y serán el centro de mi universo.

A mi esposa Nina, mi amor este logro te pertenece, tú has sido fundamental para alcanzar esta meta en mi vida, gracias por el apoyo que me has brindado, por soportar la ausencia y por impulsarme a alcanzar nuevas metas, gracias por creer en mí, por estar conmigo en las buenas y en las malas, TE AMO.

A mis hermanas Diana e Isis, por el apoyo que me han dado y por el amor que le dan a nuestra familia cada vez que nos reunimos, las extraño mucho.

A mis suegros Juan y Lilia, por todo el cariño que me han brindado desde que tuve la fortuna de conocerlos, por su apoyo y sus buenos deseos.

A mi hermano Manuel y Doña Martha, gracias por acordarse de mí siempre y por tenerme presente en sus plegarias, por el apoyo y los buenos deseos, los queremos mucho.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y al Posgrado en Ciencias Genómicas por permitirme alcanzar esta meta en mi desarrollo profesional.

Dr. Rogelio Hernández Pando

Estimado Dr. Rogelio, le agradezco infinitamente por todas sus enseñanzas, por la confianza que depositó en mí, por la oportunidad de trabajar con Usted. Muchas gracias por apoyarme aun cuando la adversidad quiso frenar este trabajo y por las palabras de aliento que me dio cuando más falta me hacían en mi vida profesional.

Dr. Mauricio Castañón Arreola

“Doc” muchas gracias por tu paciencia, por tus enseñanzas y por compartir tus conocimientos conmigo, por enriquecer este trabajo que ya rinde frutos, gracias por ayudarme a alcanzar esta meta.

A los miembros de mi comité tutorial, por su apoyo y valiosos comentarios

Dra. Martha Yocupicio Monroy

Dra. Elisa Azuara Liceaga

Dra. Elizbeth Álvarez Sánchez

A las Doctoras:

Mavil López Casamichana

Dulce Adriana Mata Espinosa

Por revisar esta tesis y enriquecerla con sus sugerencias y comentarios

Agradecimientos

Dr. Fernando Vargas Romero

Mi hermano, muchas gracias por tu amistad, por tus enseñanzas, por “solucionarme la vida” en el laboratorio. Gracias a ti los días de trabajo aunque largos eran divertidos, siempre será un verdadero honor tener una amistad contigo y tener un digno rival cada vez que se enfrenten el Real Madrid contra el FCBarcelona.

Dra. Areli Cruz Castañeda

Muchas gracias por los consejos, por el apoyo y por el cariño que siempre nos mostraste a los “tuberculosos”, se que estarás bien en cualquier lugar en el que hagas investigación, eres una gran investigadora.

Dra. Itzel López Rosas

Amiga muchas gracias por brindarme tu amistad, tu cariño, tus conocimientos y por darle vida a la “Pau Rubio”, definitivamente nada en el PCG habría sido tan padre si tú no hubieses estado ahí.

Dr. Helios Cárdenas

Mi hermano, gracias por compartir conmigo tus conocimientos, nunca olvidare esas charlas metafísicas que nos aventábamos, el Fer, tú y yo disfrutando de un buen tabaco.

Muchas gracias a todos mis compañeros en el PCG Olga, Elba, Manuel, Miguel del Moral, Marco, Zelene, Isabel, Itzel Quintas, Fernanda, Miguel Fonseca, Brenda Jaqueline por hacer que el tiempo haya sido memorable.

AGRADECIMIENTOS

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno



Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”



Comunidad Europea
PAT-026-02-07-2



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal
PIFUTP08-101

Índice.	Pagina
Resumen.....	1
Abstract.	2
Antecedentes.	3
Infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
Aspectos inmunológicos.....	18
Mecanismos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para evadir la respuesta inmune del hospedero	21
Tuberculosis latente	23
Historia de la tuberculosis latente	24
Localización de los bacilos en estado latente.....	26
Modelos animales de infección latente	27
Diagnóstico de tuberculosis latente	32
Justificación	40
Hipótesis.....	41
Objetivo General.....	42
Objetivos particulares	43
Materiales y Métodos.....	44
Muestras humanas.....	44
Preparación del tejido	44
Extracción de ADN	45
Extracción de ARN	45

Detección de ADN micobacteriano por PCR	48
Detección de ADN de Mycobacterium bovis por PCR	50
Detección de ADN micobacteriano por PCR in-situ.....	50
Detección de Mycobacterium tuberculosis por PCR-Hibridación	52
Espoligotipo	54
Detección de α -Cristalina e isocitrato liasa por PCR en tiempo real	56
Modelo murino de latencia.....	59
Preparación del tejido murino	59
Unidades Formadoras de Colonias	59
Tinción de Ziehl-Neelsen.....	60
Resultados	61
Detección de ADN de Mycobacterium tuberculosis en tejido pulmonar y extrapulmonar por PCR in-situ	71
Detección de ADN de Mycobacterium tuberculosis por hibridación	73
Espoligotipos	77
Detección de transcritos de acr e icl por PCR en tiempo real.....	79
Modelo murino.....	84
Discusión.....	86
Conclusiones	96
Perspectivas	97
Bibliografía	98
Articulo.....	112
Índice de figuras.....	iv

Índice de tablas.....	vi
Índice de cuadros.....	vi
Lista de abreviaturas.....	vii

Índice de figuras

	Página
Figura 1.- Número estimado de nuevos casos de tuberculosis en 2007.....	5
Figura 2.- Incidencia estimada de tuberculosis en 2012.....	6
Figura 3.- Granuloma.....	15
Figura 4.- Ejemplo de espigotipo de <i>M. tuberculosis</i>	55
Figura 5.- Cuantificación de <i>icl</i> y <i>acr</i> por densitometría para Tiempo Real.....	58
Figura 6.- Causa de muerte de los 49 casos de autopsia.....	62
Figura 7.- Curva de sensibilidad para la detección por PCR de IS6110 de ADN de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	62
Figura 8.- Detección de ADN micobacteriano en tejido pulmonar.....	64
Figura 9.- Detección de ADN micobacteriano en tejido renal.....	65
Figura 10.- Detección de ADN micobacteriano en tejido esplénico.....	66
Figura 11.- Detección de ADN micobacteriano en tejido hepático.....	67
Figura 12.- Detección de ADN micobacteriano por PCR convencional en relación al género.....	68
Figura 13.- Relación de tejidos pulmonares y extrapulmonares con positividad para la detección de ADN micobacteriano por PCR convencional.....	68
Figura 14.- Fotografía representativa de los ensayos de PCR para descartar la presencia de ADN de <i>M. bovis</i> en tejido pulmonar positivo a la secuencia de inserción IS6110.....	69

Figura 15.- Fotografía representativa de los ensayos de PCR para descartar la presencia de ADN de <i>M. bovis</i> en los tejidos que dieron positividad a la secuencia de inserción IS6110.....	70
Figura 16.- Relación de tejidos pulmonares y extrapulmonares con positividad para la detección de ADN micobacteriano por PCR <i>in situ</i>	71
Figura 17.- PCR in-situ que muestra la presencia de ADN micobacteriano.....	72
Figura 18.- Purificación de la sonda marcada con biotina.....	74
Figura 19.- Titulación de la sonda IS6110.....	75
Figura 20.- Ejemplo de placa de hibridación de productos de PCR de muestras de autopsias PCR negativas.....	76
Figura 21.- Detección de ARNr 16S micobacteriano por PCR en tiempo real.....	81
Figura 22.- Detección de α -cristalina por PCR en tiempo real.....	82
Figura 23.- Detección de <i>icl</i> por PCR en tiempo real.....	83
Figura 24.- Carga bacilar extrapulmonar, microfotografías representativas de tinción ZN y detección de IS6110 por PCR <i>in-situ</i> en tejido de ratón.....	85
Figura 25.- Imagen que esquematiza la detección de la secuencia de inserción IS6110 por PCR <i>in situ</i> en los tejidos analizados en este trabajo.....	87

Índice de tablas

	Página
Tabla 1.- Incidencia epidemiológica estimada de TB.....	11

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1.- Características, ventajas y desventajas de los modelos experimentales en TB latente.....	31
Cuadro 2.- Métodos Biológicos para la detección de tuberculosis en estado latente.....	39
Cuadro 3.- Espoligotipos obtenidos en muestras de autopsias.....	78
Cuadro 4.- Guía de manejo de muestras y procedimientos para evitar contaminación cruzada.....	95

Lista de abreviaturas

%	por ciento o Porcentual.
°C	grados Celsius
Ab	anticuerpo (del inglés Antibody)
acr	alfa cristalina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
$A_{\lambda Znm}$	valor de absorbancia a una longitud de onda de Z nanómetros
APC	célula presentadora de antígeno
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
β	Beta
BAAR	Bacilos Ácido-Alcohol-Resistentes
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
Br-Et	Bromuro de Etidio
cm	centímetros
CO ₂	dióxido de carbono
DEPC	Di-Etil-Pirocarbonato
DM	Diabetes Mellitus
TAES/DOTS	tratamiento acortado estrictamente supervisado (del inglés Directly Observed Treatment / Short-course Therapy)
DTT	ditiotreitól

EDTA	ácido etildiaminotetracético
EtOH	etanol
fg	femtogramos
g	gramos
H ₂ O _d	agua destilada
HCl	ácido clorhídrico
hrs	horas
icl	isocitrato liasa
IFN- γ	Interferón gamma
IGRA	del inglés Interferon-Gamma Release Assays (Ensayo de liberación de interferón)
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
kDa	kilodaltones
Kg	kilogramos
L	litros
M	MOLARIDAD (MOLES X L) concentración Molar
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MDR-TB	tuberculosis multifármacorresistente (del inglés multidrug-resistant tuberculosis)
μ g	microgramos
mg	miligramos
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio

MHC	complejo principal de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex en inglés)
μJ	microJoules
μL	microlitros
mL	mililitros
μm	micrómetros
mM	milimolar
mm	milímetros
min	minutos
MNTs	micobacterias no tuberculosas
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N_2	Nitrógeno
NaCO_3	carbonato de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	tiosulfato de sodio pentahidratado
ng	nanogramos
nm	nanómetros
OADC	ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa (del inglés oleic acid-albumin-dextrose-catalase)
OMS	Organización mundial de la Salud
ON	Óxido Nítrico
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PFC	proteínas de filtrado de cultivo (del inglés culture filtrate proteins)

pb	pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RT	PCR en tiempo real
pg	picogramos
pH	potencial de hidrógeno
PI	Fosfatidil inositol
PI3P	Fosfatidil inositol-3-Fosfato
pmol	picomoles
pPCR	producto de PCR
PPD	derivado proteico purificado
RFLP	polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción
rpm	revoluciones por minuto
Rpf's	factores promotores de resucitación
seg	segundos
SDS	dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate, en inglés)
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNARE	N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor
SN	sobrenadante
SS	Secretaría de Salud
SyGr	Syber green
TACO	Tryptophan-aspartate-containing-coat
TB	Tuberculosis

TBL	Tuberculosis latente
TB-MFR	Tuberculosis multifármacorresistente
TE	Tris-EDTA
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor alpha en inglés)
UFC	unidades formadoras de colonia
USA	Estados Unidos de América
UT	unidades totales
UV	ultravioleta
V	volts
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
v/v	volumen / volumen
XDR-TB	Tuberculosis con fármacorresistencia extendida (del inglés extensively drug-resistant tuberculosis)
w/v	peso / volumen (del inglés weight / volume)
ZN	Ziehl-Neelsen

Resumen.

Antecedentes: Un tercio de la población mundial tiene infección latente por *Mycobacterium tuberculosis*, una característica importante de esta condición, es la reactivación, ya que del 10-15% de estos casos ocurren en sitios extrapulmonares sin rastros de enfermedad pulmonar activa. **Métodos:** Para establecer la frecuencia y localización del ADN micobacteriano, se estudiaron los órganos (pulmón, hígado, bazo y riñón) de 49 individuos que murieron por causas ajenas a la tuberculosis (PCR/hibridación, PCR *in situ*, PCR en Tiempo Real y espoligotipificación). **Resultados:** Los resultados obtenidos fueron similares, el pulmón (36), el bazo (35), riñón (34) e hígado (33). Utilizando PCR *in situ* se localizó ADN micobacteriano en endotelio pulmonar, neumocitos y macrófagos; en el riñón se detectó en las células parietales de la capsula de Bowman y los túbulos proximales. En bazo, los macrófagos y las células endoteliales de los sinusoides mostraron positividad; en el hígado la positividad fue frecuente en células de Kupffer y en el endotelio de los sinusoides. Se lograron obtener 54 espigotipos en las muestras de 30 sujetos de los cuales 43 genotipos fueron diferentes, incluyendo 36 tipos “huérfanos”. Para confirmar la viabilidad de la micobacteria, se seleccionaron 10 muestras de tejidos positivos para aislar el ARN micobacteriano. En todas las muestras se evidenció la expresión de ARNr 16S, mientras que la expresión de *icl* y *acr* solo se observó en 8 y 4 muestras respectivamente. **Conclusiones.** *M. tuberculosis* persiste en diversos sitios y tipos celulares, los cuales pueden constituir reservorios que pueden reactivarse y producir tuberculosis pulmonar y/o extrapulmonar, esta ultima aun sin enfermedad pulmonar activa.

Abstract.

Background: A third of the world's population has latent infection with *Mycobacterium tuberculosis*, one important characteristic of this condition is the reactivation, 10-15% of the reactivating cases occur at extrapulmonary sites without active pulmonary tuberculosis. **Methods:** To establish the frequency and location of mycobacterial DNA, in individuals who died from causes other than tuberculosis were analyzed (PCR/hybridization, in situ PCR, real time PCR and spoligotyping). **Results:** The results were similar, lung (36), spleen (35), kidney (34) and liver (33). By in-situ PCR mycobacterial DNA was found in lung endothelium, pneumocytes and macrophages; in kidney in Bowman's parietal cells and convoluted proximal tubules. In spleen, macrophages and sinusoidal endothelial cells showed positivity; in liver it was frequent in Kupffer cells and sinusoidal endothelium. Spoligotyping from 54 pulmonary and extrapulmonary positive tissues from 30 subjects showed 43 different genotypes, including 36 orphan types. To confirm the viability of mycobacteria, 10 positive tissue samples were selected to isolate mycobacterial RNA. All the samples showed 16S rRNA expression, while 8 and 4 samples respectively show expression of the latent infection genes isocitrate lyase and α -crystallin. **Conclusions:** *M. tuberculosis* persists in several sites and cell types which might constitute reservoirs that can reactivate producing extrapulmonary tuberculosis without lung involvement.

Antecedentes.

La tuberculosis (TB) es la enfermedad infecciosa que más ha afectado a la humanidad a lo largo la historia [1]. Ha sido causa de enfermedad y muerte durante más de 20,000 años, y por regla general afecta los estratos más pobres de la sociedad [1].

El agente causal, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), es un patógeno intracelular facultativo que puede causar infección después de ser inhalado [2]. La enfermedad se caracteriza por producir granulomas nodulares caseosos que evolucionan en forma fibrosa, ulcerosa o se calcifican [3]; los principales signos y síntomas de la enfermedad son: tos, pérdida de peso y apetito, fiebre, fatiga y dificultad para respirar. Durante las últimas dos décadas, se ha reportado el resurgimiento de la enfermedad tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo [4]. El índice de morbilidad y mortalidad es muy elevado en jóvenes y adultos que representan la población económicamente activa (15-60 años), de ahí la gran repercusión económica que tiene esta enfermedad en los países en desarrollo.

Este patógeno es capaz de causar tanto enfermedad progresiva como infección latente asintomática [5], la cual es, probablemente, el principal problema para la erradicación de la TB [6]. Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial (2000 millones de personas) está infectada pero no enferma, la mayoría de estas infecciones pasan desapercibidas [7].

Mundialmente, la incidencia de la tuberculosis durante el periodo 1990-2001 fue estable; sin embargo, de acuerdo con el reporte de 2003 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de nuevos casos registró un incremento de aproximadamente un 0.4% anual [3]. En el año 2010, la OMS estimó el surgimiento de 8.8 millones de nuevos casos (en un rango de 8.5 a 9.2 millones), 128 por 100,000 hab., comparados con 9.24 millones de nuevos casos (140 por 100,000 hab.) en el 2007. (Figura 1 y 2)

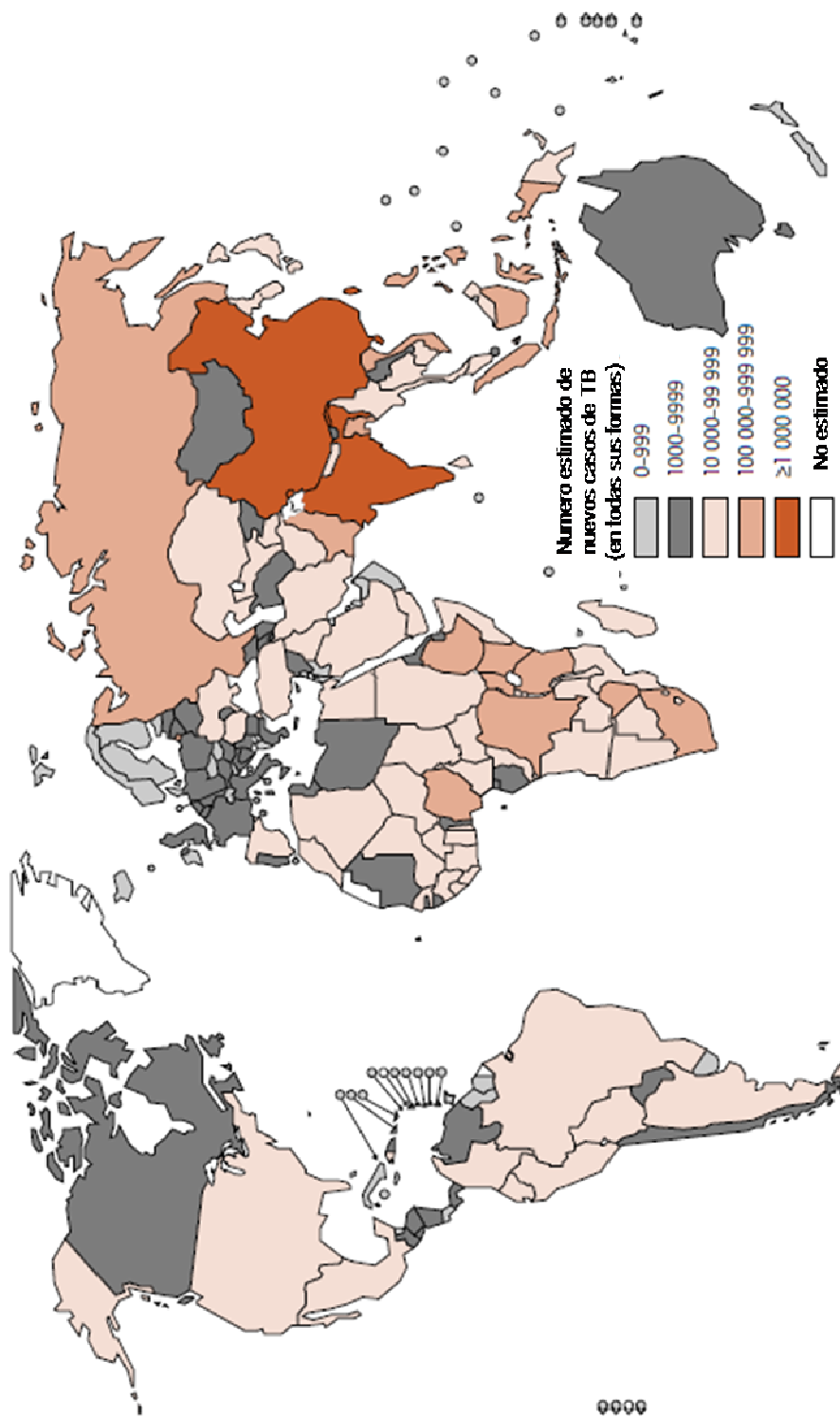


Figura 1.- En el grafico se consideran los casos de TB en todas sus formas reportados a la OMS por países en el 2007. Tomado de WHO Report 2009 [8].

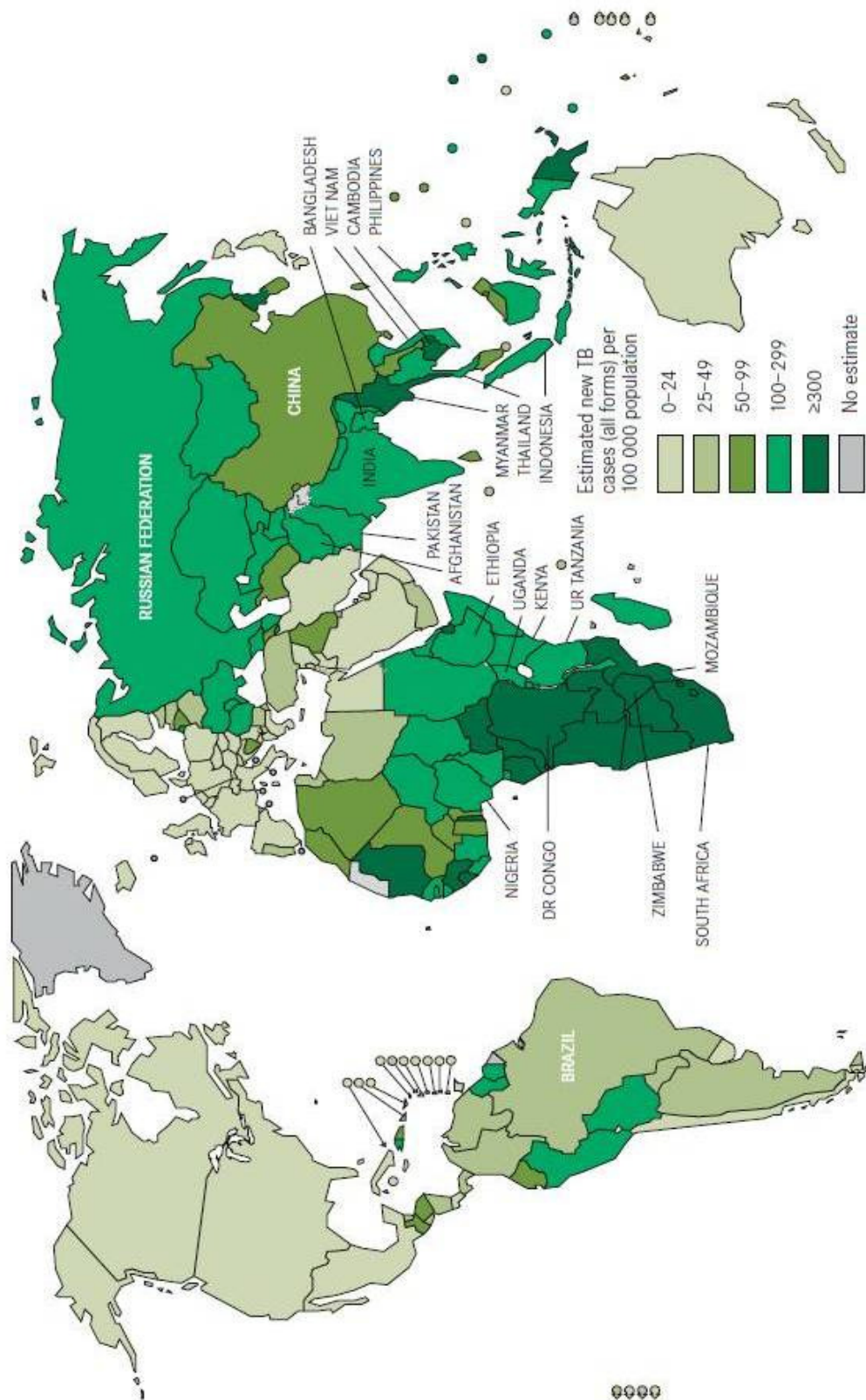


Figura 2.- En el grafico se consideran las tasas de incidencia estimada de tuberculosis en todas sus formas reportadas a la OMS por país. 2010. Tomado de WHO Report 2011 [9].

La TB pulmonar ocupa el quinto lugar como causa de muerte a nivel mundial, ocasionando tres millones de muertes anuales. En nuestro país, durante el 2010 se reportaron 18,848 casos nuevos de TB en todas sus formas, 81.6% pulmonar (15,384 casos), 1.6% meníngea, 5.7% ganglionar y 11.1% en otras formas de tuberculosis (<http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis>). En México, la TB continúa siendo endémica y, aproximadamente, 3,000 personas mueren por esta enfermedad cada año [10]. La incidencia de la TB declinó a finales de la década de los 80's, desde entonces, su incidencia nacional se ha mantenido casi estable con pequeñas variaciones. La incidencia de TB declinó de 16.5 casos en 1984 a 14.3 casos en 1990. De 1991 a 2002, la incidencia se incrementó de 14.4 a 15.1 casos, y finalmente, en 2006 disminuyó a 12.8 casos (<http://www.dgepi.salud.gob.mx>).

En nuestro país la diabetes mellitus (DM) es un factor importante que incrementa el riesgo de desarrollar TB o favorecer un proceso de reactivación. Un estudio sistemático de revisión de casos realizado en 2008, determinó que el riesgo de desarrollar TB es 3 veces mayor en sujetos con DM [11], mientras que un estudio prospectivo realizado en 12 municipios de la jurisdicción sanitaria de Orizaba en el estado de Veracruz, se encontró que la incidencia de TB es 7 veces mayor en los sujetos que padecen DM, lo cual podría deberse tanto a una reactivación como a una infección transmitida recientemente [12].

Del total de casos de TB reportados, aproximadamente el 95% ocurren en países en vías de desarrollo, principalmente en las regiones de Asia y África subsaharianas

aunque esta forma de tuberculosis mostró una tendencia a disminuir durante el siglo XX [13]. Las formas extrapulmonares de la TB representan el 10-20 % de todos los casos. Sin embargo, a partir de la década de los ochenta y hasta la actualidad, el número de casos ha ido en aumento [13], debido a la presencia de factores concomitantes que favorecen la infección y el desarrollo de la enfermedad como son: infección con VIH, diabetes y alcoholismo [10], así como también la desnutrición, que se encuentra estrechamente relacionada con la pobreza.

El uso inadecuado de los antibióticos antituberculosos, prescripciones incompletas o incorrectas de la quimioterapia, la adición de un fármaco suplementario en caso de fracaso o recaída y el empleo de medicamentos o combinaciones de ellos ha resultado en el surgimiento de cepas multifármacorresistentes (TB-MFR). La emergencia de estas cepas se ha vuelto un problema importante de salud pública y una amenaza para el control de la TB en el mundo [14], ya que los bacilos que han sobrevivido a tratamientos incompletos o no adecuados desarrollan resistencia contra los fármacos empleados haciendo más difícil su eliminación en un segundo tratamiento donde se utilizan los mismos fármacos. Esto es, en parte, consecuencia de que la mayoría de los fármacos antituberculosos actúan sobre los bacilos en replicación activa, pero su efectividad se ve disminuida en aquellos que no se están dividiendo.

La prolongada convivencia de *M. tuberculosis* con los seres humanos ha influido en la capacidad de adaptación del bacilo a distintos ambientes y hospederos. La infección con TB es contenida por el sistema inmunológico; en la mayoría de los casos

solamente el 10% de los individuos que entran en contacto con el bacilo desarrollan la enfermedad. No obstante durante la primoinfección tuberculosa (aunque esta es resuelta en la mayoría de los casos), no todas las bacterias son eliminadas y algunos bacilos pueden permanecer en los tejidos en estado latente por el resto de la vida del individuo, algunos autores han reportado la presencia de ADN de *M. tuberculosis* en macrófagos alveolares, neumocitos tipo II, células endoteliales de vasos sanguíneos, fibroblastos [15] y adipositos [16]

Las razones por las cuales el estado de latencia es importante son: primera, el riesgo de reactivación del bacilo en estado latente [17] y segunda, el estado de latencia le da a los bacilos la capacidad de volverse persistentes ante los agentes quimioterapéuticos y a los periodos prolongados de quimioterapia [15, 18]. Aunque los antibióticos para tratar la TB eliminan eficientemente a los bacilos que se multiplican activamente, los bacilos con baja actividad metabólica y replicativa (como sucede con los que están en estado quiescente), son muy resistentes a la quimioterapia; es por esto que el tratamiento convencional de la tuberculosis activa incluye cuatro fármacos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol) que deben ser administrados al menos por 6 meses [5]. Estos fármacos constituyen la fase inicial del tratamiento; su uso por dos meses permite la rápida eliminación de bacilos con replicación activa, promoviendo la negativización del esputo.

La segunda fase del tratamiento usualmente consiste en la administración de isoniazida y rifampicina por un periodo de 4 ó 7 meses; esta etapa del tratamiento

busca eliminar los bacilos remanentes en estado durmiente o con baja actividad replicativa [5]. La isoniazida requiere ser metabolizada por la *catalasa-peroxidasa* bacteriana para inhibir la biosíntesis de ácidos micólicos, los cuales son componentes esenciales de la pared micobacteriana. La isoniazida tiene efecto bacteriostático contra bacilos quiescentes [12]. Este fármaco es utilizado para dar tratamiento profiláctico durante 6 ó 12 meses, lo cual reduce la tasa de reactivación de la TB en un 65 y 90% respectivamente [19, 20]. La rifampicina presenta poca actividad contra bacilos quiescentes, ya que inhibe la transcripción al interactuar con la subunidad beta de la ARN polimerasa. Por otro lado, la pirazinamida requiere ser convertida a ácido pirazinoico para tener actividad bactericida, la cual actúa contra bacilos persistentes y bacilos que no se están dividiendo, incluso aquellos que se localizan intracelularmente. El etambutol es un fármaco que afecta la biosíntesis de la pared celular y contribuye a incrementar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a otros fármacos [21, 22]. Recientemente se ha reportado que la terapia para Tuberculosis Latente (TBL) con rifampicina por cuatro meses produce menos eventos adversos que la terapia de nueve meses con isoniazida, observándose un menor número de casos de hepatitis y mayor apego al tratamiento [23]. El metronidazol, que no tiene efecto bactericida contra bacilos en crecimiento exponencial, es bactericida para bacterias en fase estacionaria y en estado persistente no replicativo. Este fármaco se ha evaluado de manera individual y en combinación con otros fármacos antituberculosos, sin embargo, se observó que el tratamiento con metronidazol (por seis semanas a 100mg/kg de peso), no tuvo efecto en la reducción de la carga bacilar en los granulomas pulmonares de cobayos infectados y contribuyó significativamente a empeorar la lesión

inflamatoria en los pulmones cuando se combinó con isoniazida rifampicina y pirazinamida [24].

La TB en humanos presenta esencialmente dos manifestaciones: (1) *enfermedad activa*, con signos clínicos y síntomas y, (2) la *infección latente*, donde no hay signos clínicos pero la persona infectada, aparentemente sana, reconoce antígenos del patógeno, lo que indica que el sujeto ha estado en contacto con micobacterias. En relación con la enfermedad activa, las tasas de morbilidad y mortalidad son extremadamente altas, pues a nivel mundial se ha estimado que surgen 9.27 millones de nuevos casos cada año [8, 25] y 2 millones de individuos morirán como consecuencia de esta enfermedad. (Tabla 1).

Carga epidemiológica estimada de TB en 2007

		INCIDENCE ^a						PREVALENCE ^a				MORTALITY				HIV PREV. IN INCIDENT TB CASES ^b %
		ALL FORMS			SMEAR-POSITIVE			ALL FORMS		HIV-NEGATIVE		HIV-POSITIVE				
		POPULATION 1000s	NUMBER 1000s	PER 100 000 POP PER YEAR	NUMBER 1000s	PER 100 000 POP PER YEAR	PER 100 000 POP PER YEAR	NUMBER 1000s	PER 100 000 POP PER YEAR	NUMBER 1000s	PER 100 000 POP PER YEAR	NUMBER 1000s	PER 100 000 POP PER YEAR			
País	1 India	1 160 016	1 962	168	873	75	3 305	283	302	26	30	2.5	5.3			
	2 China	1 328 630	1 306	98	585	44	2 582	194	194	15	6.8	0.5	1.9			
	3 Indonesia	231 627	528	228	236	102	566	244	86	37	5.4	2.4	3.0			
	4 Nigeria	148 093	460	311	195	131	772	521	79	53	59	40	27			
	5 South Africa	48 577	461	948	174	358	336	692	18	38	94	193	73			
	6 Bangladesh	158 665	353	223	159	100	614	387	70	44	0.4	0.3	0.3			
	7 Ethiopia	83 099	314	378	135	163	481	579	53	64	23	28	19			
	8 Pakistan	163 902	297	181	133	81	365	223	46	28	1.4	0.9	2.1			
	9 Philippines	87 960	255	290	115	130	440	500	36	41	0.3	0.3	0.3			
	10 DR Congo	62 636	245	392	109	174	417	666	45	72	6.0	10	5.9			
	11 Russian Federation	142 499	157	110	68	48	164	115	20	14	5.1	3.6	16			
	12 Viet Nam	87 375	150	171	66	76	192	220	18	20	3.1	3.5	8.1			
	13 Kenya	37 538	132	353	53	142	120	319	10	26	15	39	48			
	14 Brazil	191 791	92	48	49	26	114	60	5.9	3.1	2.5	1.3	14			
	15 UR Tanzania	40 454	120	297	49	120	136	337	12	29	20	49	47			
	16 Uganda	30 884	102	330	42	136	132	426	13	41	16	52	39			
	17 Zimbabwe	13 349	104	782	40	298	95	714	6.9	52	28	213	69			
	18 Thailand	63 884	91	142	39	62	123	192	10	15	3.9	6.0	17			
	19 Mozambique	21 397	92	431	37	174	108	504	10	45	17	82	47			
	20 Myanmar	48 798	83	171	37	75	79	162	5.4	11	0.9	1.9	11			
	21 Cambodia	14 444	72	495	32	219	96	664	11	77	1.8	13	7.8			
	22 Afghanistan	27 145	46	168	21	76	65	238	8.2	30	0.0	0	0			
	High-burden countries	4 201 761	7 423	177	3 245	77	11 301	269	1 058	25	339	8.1	14			
Región	AFR	792 378	2 879	363	1 188	150	3 766	475	357	45	378	48	38			
	AMR	909 820	295	32	157	17	348	38	33	3.6	7.9	0.9	11			
	EMR	555 064	583	105	259	47	772	139	97	17	7.7	1.4	3.5			
	EUR	889 278	432	49	190	21	456	51	56	6.3	8.1	0.9	9.8			
	SEAR	1 745 394	3 165	181	1 410	81	4 881	280	497	28	40	2.3	4.6			
	WPR	1 776 440	1 919	108	859	48	3 500	197	276	16	15	0.8	2.7			
	Global	6 668 374	9 273	139	4 062	61	13 723	206	1 316	20	456	6.8	15			

^a Estimado de incidencia y prevalencia incluido la TB en personas con VIH
^b Prevalencia de VIH en casos de TB incidentes en todas las edades

Tabla 1.- En colores sombreados se marcan los países en los que se registra la mayor carga epidemiológica de TB; tomada de WHO Report 2009 [8].

La OMS declaró la TB como un problema en emergencia mundial en el año 1993. Durante las últimas dos décadas, se ha reportado el resurgimiento de la enfermedad tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo [4, 26], debido a que en estos últimos, las condiciones de pobreza y desnutrición incrementan la tasa de reactivación [1], además de que la tuberculosis es la principal infección secundaria en individuos VIH-positivo, (la OMS reportó un estimado de 1.37 millones entre los 9.27 millones de casos en 2007) [8] y el número de muertes por TB entre individuos infectados con VIH fue de 456,000, estos casos ocurren generalmente por la reactivación de una infección latente [27]. La inmunodeficiencia causada por el VIH incrementa el riesgo de desarrollar TB, aproximadamente el 10% de los individuos infectados con VIH y TB desarrollarán la enfermedad activa dentro del primer año de coinfección, comparado con el 10% del riesgo de por vida en individuos infectados únicamente con TB [28].

Infección por *Mycobacterium tuberculosis*

La TB es una enfermedad que se transmite principalmente de persona a persona. Cuando un individuo enfermo de TB pulmonar activa, tose, estornuda o habla, liberando al aire pequeñas partículas que pueden transportar bacilos viables. Las gotas que se generan se evaporan rápidamente y se convierten en aerosoles de pequeñas partículas que, por su tamaño (1 a 5 μm), pueden permanecer en suspensión por varias horas y pueden ser transportadas, según el flujo del aire, a través de la habitación o del inmueble [29]. Cuando esas partículas infecciosas son

inhaladas por un individuo, logran llegar a la superficie de los alveolos pulmonares, principalmente en los lóbulos inferiores de los pulmones, en donde los bacilos se establecen y se multiplican; *M. tuberculosis* es entonces fagocitado por macrófagos alveolares en reposo, los cuales, en su estado de inactivación montan una respuesta tanto en términos de funciones efectoras antimicrobianas como de respuesta pro-inflamatoria. Los neutrófilos se acumulan tempranamente en el sitio de la infección, pero algunos de ellos son incapaces de eliminar al bacilo directamente; no obstante, algunos neutrófilos y macrófagos fagocitan al bacilo y logran eliminarlo; estos antígenos pueden ser colectados por células dendríticas alveolares las cuales migran a los ganglios linfáticos regionales y presentan los antígenos del bacilo [30]. La formación de péptidos asociados al MHC de Clase II a partir de antígenos internalizados por endocitosis requiere la degradación proteolítica de proteínas internalizadas en vesículas endocíticas y la unión de los péptidos a moléculas de clase II del MHC en estas vesículas [31]. La mayoría de los péptidos asociados a moléculas de clase II derivan de antígenos proteicos captados e internalizados en endosomas por células presentadoras de antígeno profesionales (APC).

Los pasos iniciales en la presentación de un antígeno proteico extracelular son la unión del antígeno nativo a una APC y la internalización del antígeno. Las células dendríticas se unen a numerosas proteínas diferentes, aparentemente con escasa o nula especificidad e internalizan los antígenos por pinocitosis. En casos especiales, los receptores de superficie de las APC se unen a antígenos y los internalizan por un proceso de endocitosis mediada por el receptor, por ejemplo: la expresión de

receptores que reconocen residuos de manosa presentes en las paredes bacterianas que intervienen en la internalización de las bacterias [31]. Tras su internalización, los antígenos proteicos quedan localizados en endosomas. Un subgrupo de endosomas ricos en moléculas de clase II del MHC desempeñan un papel especial en el procesamiento y la presentación de antígenos por la vía de clase II. Los microorganismos que han sido particulados son internalizados en fagosomas, que pueden fusionarse con lisosomas induciendo la formación de fagolisosomas o lisosomas secundarios. Algunos microorganismos, como las micobacterias pueden sobrevivir e incluso replicarse dentro de los fagosomas, proporcionando de esta manera una fuente persistente de antígenos en los compartimientos vesiculares [31].

Las proteínas internalizadas son degradadas por enzimas presentes en los endosomas y lisosomas para generar péptidos. Las proteasas más abundantes de los endosomas son las catepsinas, que son tiol y aspartil proteasas con una amplia especificidad de sustrato, las cuales juegan un papel importante en la formación de péptidos para la vía de clase II [31].

La infección por este bacilo es contenida en una estructura perfectamente delimitada denominada granuloma (Figura 3), compuesta principalmente por células inflamatorias, macrófagos activados que continuamente están produciendo IL-12 e iNOS [32]. Estas lesiones histológicas son la característica principal de las infecciones por algunas bacterias intracelulares [31]. Este tipo de reacción inflamatoria puede servir para localizar y evitar la diseminación de los microorganismos, pero también se asocia a un

grave deterioro funcional debido a necrosis y fibrosis tisular [31]. Los granulomas no son estructuras rígidas, son lesiones dinámicas con células que continuamente están muriendo, los detritos celulares son removidos y nuevas células se incorporan a la estructura. Si no se incorporan nuevas células a la estructura del granuloma, ya sea por bloqueo de la expresión de moléculas de adhesión o de las cascadas de citocinas inflamatorias, la estructura del granuloma se desintegra permitiendo la diseminación de su contenido dando lugar a una bacteremia transitoria con la diseminación extrapulmonar de bacilos viables [33].

Es dentro del granuloma donde se asume que existe un equilibrio de micobacterias en un estado activo de replicación y micobacterias adaptadas al estrés generado dentro de los macrófagos activados que no destruyen completamente al bacilo pero previenen su crecimiento [30].

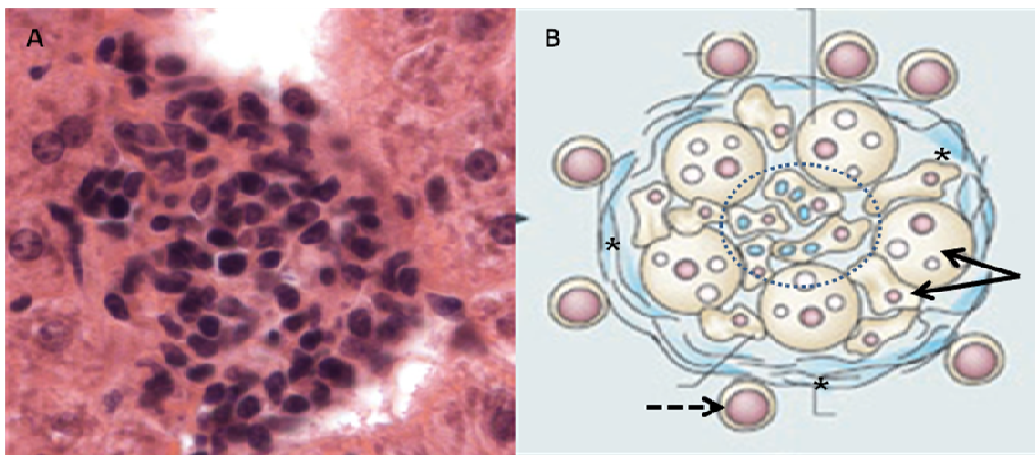


Figura 3.- Imagen ilustrativa de un granuloma, A) Microfotografía de un granuloma en tejido pulmonar de ratón, tinción Hematoxilina-Eosina, B) Dibujo esquemático de un granuloma, la periferia está compuesta principalmente por linfocitos (flecha punteada) y cúmulos de fibrina (asteriscos); en las capas internas del granuloma se encuentra la presencia de macrófagos y macrófagos espumosos (flecha doble), en el centro del granuloma se encuentran los macrófagos infectados (círculo punteado). Los puntos azules simulan la micobacterias, los círculos rojos los núcleos celulares. Tomada de Nat Immunol 2009;10:943-948 [34].

En más del 90% de los casos, de sujetos inmunocompetentes se logra controlar la infección, sin embargo, la eliminación del patógeno es lenta y difícil de llevar a cabo por lo que se estima que puede establecerse la infección latente, pudiendo reactivarse y producir enfermedad progresiva después de años o incluso décadas [35]. Estudios moleculares de análisis de polimorfismos de longitud por fragmentos de restricción (RFLP) de la secuencia de inserción IS6110, sugieren que en el 40% de los sujetos infectados con *M. tuberculosis* la infección primaria nunca es contenida adecuadamente [5]. La probabilidad de desarrollar TB es mayor inmediatamente después de la primoinfección y declina exponencialmente después de ese punto calculándose un riesgo acumulable del 10% durante el tiempo de vida en personas con TBL sin tratamiento, ocurriendo durante los primeros 2 años posteriores a la infección en el 50-80% de los casos. Los estudios epidemiológicos muestran que en pacientes VIH+ se incrementa el riesgo anual de reactivación de la TBL en un 5-10% [36].

Otros autores consideran que el bacilo en estado latente es una consecuencia usual del “ciclo de vida” de *M. tuberculosis*, el cual puede simplemente permanecer en fase estacionaria por muchos años, como se ha demostrado en otras especies bacterianas [37]. Una consecuencia de la fase estacionaria es que las oportunidades de reactivación disminuyen con el paso del tiempo, lo mismo ocurre con el tejido necrótico cuya cantidad disminuye dentro de los granulomas (es importante considerarlo porque es la principal fuente de bacilos latentes). Esta hipótesis coincide con la gran cantidad de datos epidemiológicos disponibles, demostrando que el riesgo de reactivación y la inducción de TB tienen una correlación negativa con el periodo de tiempo posterior a la

infección inicial, y sostiene la teoría que sugiere que la TBL está limitada a un cierto periodo de tiempo, en lugar de “toda la vida” como se ha postulado tradicionalmente [37].

En la mayoría de los individuos inmunocompetentes, se reclutan células T y macrófagos estableciéndose una respuesta secundaria que controla la infección [5, 7], que aunque en la mayoría de los casos es controlada, no todas las bacterias son eliminadas, de manera que algunas permanecen en los tejidos en un estado latente no replicativo o de baja replicación por el resto de la vida del huésped [38].

La condición de latencia puede ser diagnosticada a través de la prueba positiva a la tuberculina en piel o con radiografía que muestre cicatrices o nódulos calcificados (Complejo de Ghon), indicadores de una infección primaria resuelta [5].

Los pacientes con baciloscopía positiva son la principal fuente de infección, sin embargo, los individuos infectados pero negativos a la baciloscopía también juegan un papel importante como fuente infecciosa, como lo reveló un estudio realizado en San Francisco, USA, donde el 17% de los pacientes con baciloscopia negativa aparecen como responsables de las transmisiones de TB [39]. Los aerosoles generados por la respiración o por toser, pueden contener de 1-3 bacilos [29]. La probabilidad de que un individuo sea infectado está asociada con el grado de transmisibilidad, y la cercanía y duración de la exposición a la fuente infecciosa (el riesgo es mayor si el contacto con el enfermo es muy cercano), así como del grado de virulencia de la cepa de *M.*

tuberculosis. Una característica importante de la infección por TB es que los contactos de los casos índice con baciloscopía positiva no únicamente tienen un gran riesgo de transmisión sino también un gran riesgo de desarrollar la enfermedad [40], el riesgo acumulativo de desarrollar TB activa es de 16 a 20 veces más alto que entre contactos de casos con baciloscopía negativa [41].

Aspectos inmunológicos

La fusión del fagosoma, que contiene la bacteria fagocitada, con el compartimiento lisosomal constituye un mecanismo antimicrobiano efectivo mediado por enzimas hidrolíticas intralisosomales que se activan secuencialmente en un pH ácido, esta acidez es producida dentro del lisosoma por la H⁺-ATPasa vacuolar [42]. La fusión del fagosoma con el lisosoma, consiste de una serie de eventos altamente coordinados que involucran interacciones del compartimiento fagosomal con varios miembros de la vía endocítica, resultando en una extensa remodelación de la membrana fagosomal culminando en la formación del fagolisosoma. Para persistir en el hospedero, *M. tuberculosis* ha desarrollado varios mecanismos que evitan la fusión del fagosoma que contiene al bacilo con el lisosoma, como lo han demostrado Russell y cols., y Fratti y cols., [43, 44]. Ellos describen como el bacilo evade la actividad antimicrobiana del lisosoma y mantiene un microambiente intrafagosomal que favorece su permanencia. Una forma en la cual *M. tuberculosis* manipula el fagosoma es excluyendo las H⁺-ATPasas vacuolares, cambiando así la acidez intrafagosomal a un ambiente que no es hostil [43]. Aunque la maduración del fagosoma es detenida, algunas evidencias como

la disminución en la acidificación del fagosoma sugieren una activa interacción entre el compartimiento que contiene al bacilo y otras vesículas intracelulares. Estudios sugieren que el medio ambiente dentro del fagosoma que contiene al bacilo no está totalmente aislado y puede posiblemente ser influenciado por eventos extrafagosomales como proteínas reguladoras del tráfico en la membrana y algunos lípidos como el colesterol [43-45]. Experimentos realizados con microscopia electrónica, utilizando marcadores lisosomales, han mostrado que los fagosomas de macrófagos en reposo infectados no se fusionan con los lisosomas y contienen bacilos vivos [46].

Los lípidos son una pieza clave en un proceso normal de fagocitosis, por lo tanto no es de sorprender que muchos patógenos hayan desarrollado vías que alteran u obstruyen el metabolismo lipídico fagosomal como una estrategia de sobrevivencia [47].

M. tuberculosis, es incapaz de invadir células activamente, pero es fagocitada por macrófagos, inicialmente en un fagosoma convencional. Después de la ingestión la micobacteria desarrolla diversas estrategias que le permiten detener el proceso de maduración en una etapa temprana, evitando que el fagosoma se una al lisosoma. La micobacteria genera un nicho intracelular favorable, en parte para modular la adquisición de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) por parte de la vacuola. Al limitar la producción de este inositol la micobacteria secreta el análogo glicosilado de PI, el lipoarabinomanano, el cual inhibe la producción de Vps34, seguido de esto la micobacteria secreta fosfatasa ácida SapM, la cual defosforila PI3P. La acción

combinada de esos dos efectores disminuye el contenido vacuolar de PI3P, contribuyendo al arresto de la maduración fagosomal en una etapa temprana favoreciendo la sobrevivencia intracelular de la micobacteria [47]. Aunque la maduración del fagosoma que contiene al bacilo de *M. tuberculosis* es detenida, muchas evidencias sugieren una activa interacción entre el compartimiento que contiene al bacilo y otras vesículas intracelulares. Estos hallazgos sugieren que el medio ambiente dentro del fagosoma que contiene al bacilo no está totalmente aislado, y puede ser influenciado por eventos extrafagosomales [43, 45, 48].

Diversos estudios se han enfocado a definir las bases moleculares y la bioquímica de vesículas intracelulares, las cuales han ayudado a descubrir mecanismos a través de los cuales *M. tuberculosis* interfiere con la maduración del fagosoma y su unión con el lisosoma, dichos estudios han identificado los mecanismos de unión y la maquinaria de fusión involucrada en los transportes vesiculares. Las proteínas llamadas SNARE (del inglés **s**oluble **N**-ethylmaleimide-sensitive factor-**a**ttachment protein **r**eceptor) son específicas del compartimiento y constituyen un componente mediador de la fusión de las membranas entre el transportador y las vesículas blanco. La habilidad de *M. tuberculosis* de inhibir la fusión fagolisosomal tiene mucha relevancia, el bacilo interfiere con las moléculas que unen las membranas y con las moléculas involucradas en la maquinaria de fusión en la maduración de los fagosomas [45].

Mecanismos de Mycobacterium tuberculosis para evadir la respuesta inmune del hospedero

Una característica única de *M. tuberculosis* es su capacidad para existir en estado latente en los granulomas de un hospedero sin producir sintomatología alguna y mantener al mismo tiempo la capacidad de reactivarse y causar enfermedad. La infección primaria con *M. tuberculosis* produce enfermedad en aproximadamente del 5 al 10% de los casos de infección, aunque este porcentaje varía según la prevalencia de la enfermedad [49].

La retención en el fagosoma temprano de la proteína de revestimiento que contiene aspartato-triptofano (TACO del inglés: Tryptophan-aspartate-containing coat), también conocida como *coronina-1*. TACO/*coronina-1* es una proteína de unión a actina que se asocia con el colesterol dentro de la membrana plasmática, también está involucrada en la modulación del citoesqueleto, citocinesis y transporte intracelular de membrana.

La preferencia de *M. tuberculosis*, por los dominios ricos en colesterol dentro de la membrana plasmática, asegura que la micobacteria sea fagocitada dentro de un fagosoma revestido con TACO/*coronina-1*, y evitar la fusión lisosomal inhibiendo la liberación de esta proteína [50].

Otros mecanismos que contribuyen a la inhibición de la maduración del fagosoma son la falla en el transporte entre Rab5 y Rab7; exclusión del complejo triptófano adenosina vacuolar responsable de la acidificación, interferencia en la vía de

señalización PI3P y calcio, inhibición en el ensamblaje de actina y secreción de la proteína cinasa G del tipo eucariótico [50].

En modelos murinos se ha establecido que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) juega un papel crítico en la defensa del hospedero contra *M. tuberculosis* durante la infección aguda y la persistencia crónica [51]. Este papel protector puede ser relacionado con la habilidad del TNF- α de regular la formación de los granulomas en la TB al modular la migración de los leucocitos [52]. Se sabe que el TNF- α tiene influencia sobre la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas; esta regulación puede afectar la migración celular dentro de los tejidos y la formación del granuloma. Los efectos sobre la activación de macrófagos y su sobrevivencia sirven para regular la formación y mantenimiento del granuloma. Un granuloma que se ha vuelto desorganizado puede, a la larga, no ser capaz de limitar la inflamación a un medio ambiente localizado, dirigiendo la inflamación a lo largo del pulmón, generando una patología destructiva. Los resultados obtenidos de modelos animales de reactivación de tuberculosis han proporcionado fuerte evidencia de que el TNF- α es requerido para el control de la infección latente en TB [53]. El TNF- α es esencial para el control de la infección por TB, pero también se ha relacionado a esta citocina con la inmunopatología en la TB [54].

Se ha demostrado que las células T CD4⁺ son esenciales para la defensa contra el bacilo tuberculoso. Paradójicamente, *M. tuberculosis* es capaz de interferir con la vía de procesamiento y presentación de antígenos dependientes de MHC II; esta vía es

crítica para la activación de la respuesta inmune adaptativa antimicobacteriana, [55]. La capacidad de *M. tuberculosis* de interferir con el procesamiento y presentación antigénica en las células presentadoras de antígenos, contribuye a la persistencia del bacilo en el hospedante [53]; esta no está limitada a la fase crónica de infección. Ramachandra y cols. [56] demostraron que el procesamiento de antígenos de *M. tuberculosis* ocurre dentro del fagosoma que contiene al bacilo y forman un complejo péptido-MHC II. Comparado con los organelos que contienen al bacilo muerto, la velocidad del procesamiento de antígenos es disminuida en los fagosomas que contienen al bacilo vivo, como es evidente por los bajos niveles detectados de complejos de péptido-MHC II [56]; además los fagosomas con micobacteria viva muestran un retardo en su maduración; estos estudios sugieren que el disminuir la vía de presentación de antígenos MHC clase II puede ser determinante en la virulencia de *M. tuberculosis* y facilitar su persistencia.

Tuberculosis latente

La TBL se refiere a la condición de un individuo que fue infectado en alguna etapa de su vida con *M. tuberculosis* y que carece de síntomas clínicos de TB, pero que mantiene una respuesta inmune a los antígenos de *M. tuberculosis*. La infección latente es una de las características más notables de *M. tuberculosis*, en ésta condición, la bacteria adapta su metabolismo para mantenerse viva con una baja o nula actividad replicativa. Se ha postulado que el mecanismo por el cual el microorganismo entra en estado de latencia se da una vez que los bacilos entran en

los macrófagos de los alvéolos pulmonares [57], donde la supervivencia intracelular del patógeno es mediada, entre otros factores, por su capacidad para alterar la acidificación del fagosoma y evitar la fusión fagosoma-lisosoma [27]. Una vez que la micobacteria entra en estado de latencia, es muy difícil erradicarla de los tejidos del hospedero mediante fármacos clasificados como de primera línea, ya que éstos sólo son activos contra aquellos microorganismos en fase activa de replicación [58, 59].

Historia de la tuberculosis latente

La latencia se ha definido de varias formas a lo largo de la historia, en 1927 Opie y Aronson, fueron los primeros en reportar que poco más del 10% de lesiones tuberculosas antiguas contenía bacilos vivos [60]. Amberson la definió en 1938 como: “La presencia de cualquier lesión tuberculosa que no produce síntomas por su presencia” [61]. Actualmente, “The Medical Advisory Committee for the Elimination of Tuberculosis” en Estados Unidos la define como: “Un estado asintomático en personas que han sido infectadas con *M. tuberculosis* en las que no hay evidencia clínica o radiológica de la enfermedad activa”. El organismo reside dentro del hospedero en un estado clínicamente inactivo o latente, contenido por el sistema inmune del hospedero [36].

La latencia también puede establecerse por la restricción temprana del crecimiento de *M. tuberculosis* en los pulmones previo al comienzo de la enfermedad, y/o por la resolución espontánea de la TB primaria, lo cual no significa que el bacilo haya sido

eliminado [62]. Mucha gente expuesta a *M. tuberculosis* monta una vigorosa respuesta inmune celular que detiene el progreso de la infección, limitándola al sitio inicial de la invasión en el parénquima pulmonar [34].

En la literatura se utilizan otros términos para describir la TBL, uno de ellos es el término *durmiente*, que hace referencia al estado metabólico del bacilo tuberculoso [35]. Contrario a lo observado en las lesiones de TB activa, en las que generalmente se observan bacterias ácido alcohol resistentes (BAAR) que son fácilmente cultivadas, el estado preciso de los bacilos observados en lesiones antiguas de sujetos curados o con historia de exposición a *M. tuberculosis* aún es incierto [35].

Otro término que ha sido relacionado con el estado de latencia, a pesar de ser una característica de la forma de vida del bacilo, es el de *persistencia*. Como patógeno, *M. tuberculosis* manifiesta una inusual capacidad de persistir de muchas maneras. A nivel celular la micobacteria reside dentro de los macrófagos, células que típicamente funcionan para eliminar patógenos y otros materiales extraños al organismo; a un nivel más sistémico, *M. tuberculosis* es capaz de evitar su eliminación por el hospedante sin importar el desarrollo de una vigorosa respuesta inmunológica mediada por células [35]. Otro aspecto, aunque menos obvio pero muy importante en la persistencia de *M. tuberculosis*, es la velocidad tan lenta a la cual esta micobacteria es eliminada por los fármacos anti-TB, es por eso que se requieren tratamientos de seis meses o más para tratar esta enfermedad. Tomando en consideración los antecedentes existentes acerca de la latencia, para este proyecto se acordó definir la latencia como: “un estado

metabólico de la micobacteria, caracterizado por un grado de baja o nula replicación, que lo hace diferente al estado metabólico de los bacilos en replicación activa”.

Localización de los bacilos en estado latente

El diagnóstico de latencia se puede establecer por evidencias clínicas y de laboratorio, aunque no siempre con absoluta certeza y ha quedado una pregunta importante por contestar: ¿Cuál es la localización tisular de los bacilos latentes? La propuesta más aceptada es que las bacterias en estado latente permanecen en las lesiones granulomatosas antiguas (resultado de la infección primaria), o en los nódulos linfáticos del complejo de Ghon, sin embargo, ésto no explica la tuberculosis extrapulmonar (enfermedad en hueso, cerebro, nódulos linfáticos u otros tejidos) que representa aproximadamente el 15% de los casos de tuberculosis que se detectan; de manera que se ha hipotetizado que en algunos casos la reactivación de la tuberculosis se origina en un sitio extrapulmonar, ya que estos pacientes no presentan enfermedad pulmonar, o bien, la latencia se mantiene en sitios diseminados en los que los bacilos se establecieron durante la fase de bacteremia en la exposición inicial [5]. En los granulomas y en áreas histológicamente normales se ha comprobado la presencia de ADN micobacteriano, indicando que las micobacterias pueden mantener una infección asintomática alojándose en macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, neumocitos tipo II y en el epitelio bronquial [15], así como en tejidos adiposos [16].

El problema con la infección latente radica en la posibilidad de reactivación, la cual puede ocurrir en alguna etapa posterior a lo largo de la vida del individuo. Estudios longitudinales han mostrado que, en personas con prueba de tuberculina positiva (PPD+) y que no tienen ningún otro factor de riesgo, la posibilidad de desarrollar TB activa es de aproximadamente 0.1% al año, mientras que en sus convivientes cercanos que se convirtieron a PPD+, el riesgo de desarrollar TB activa en los siguientes 2-5 años es de 5-10%, y de 5-10% durante el resto de su vida [63]. Otros factores que incrementan el riesgo de reactivación de la TBL, incluyen la infección con VIH, viejas lesiones tuberculosas con cicatrización pulmonar, inmunosupresión, trasplante de órganos, falla renal de etapa terminal y diabetes mellitus [64].

Modelos animales de infección latente

La TBL es muy común en los seres humanos, algunos primates, bovinos y posiblemente otros animales de fauna silvestre, aunque en estos últimos ha sido poco estudiada [65]. Ante este panorama las disyuntivas éticas y las limitantes económicas han impedido investigar los mecanismos que operan, tanto en el huésped como en el hospedero, durante el inicio, mantenimiento y salida del estado quiescente, salvo algunos intentos *in vitro* donde se simulan condiciones aisladas que podría encontrar *M. tuberculosis* durante esta fase. Por ende, para tratar de dilucidar los mecanismos de los cuales se vale el bacilo para sobrevivir en estado de latencia, sus ciclos replicativos, su estado metabólico, su reactivación y la manera como evade la respuesta inmune del hospedero, se han implementado diversos modelos animales

que intentan reproducir las condiciones de la infección latente con la finalidad de estudiar lo anteriormente mencionado y también desarrollar nuevos fármacos e intervenciones inmunológicas efectivas (Cuadro 1) [65]. En general, en los modelos experimentales de latencia se trata de establecer y mantener un número bajo y estable de micobacterias en los órganos de los animales de experimentación, sin signos de enfermedad hasta el momento que se induzca reactivación, generalmente como consecuencia de debilitar su respuesta inmunológica inducida sobre todo con fármacos (glucocorticoides, inhibidores del TNF α o de la enzima óxido nítrico sintetasa) [65].

El modelo de Cornell [66, 67] fue el primer acercamiento experimental encaminado a demostrar la existencia de bacilos en latencia. En este modelo, se inoculan ratones por vía intravenosa (i.v.) con dosis que van de 1×10^6 a 3×10^6 UFC de *M. tuberculosis* H37Rv y 20 minutos después, se inicia tratamiento por 12 semanas con isoniazida y pirazinamida. Noventa días después de terminado el tratamiento se pueden recuperar micobacterias del bazo, hígado y de pulmón en un tercio de los ratones, y al cabo de 12 semanas se obtienen bacilos cultivables en dos tercios de los ratones infectados; este porcentaje se incrementa al 100% cuando se suprime la respuesta inmune [22].

Orme y cols. [68] desarrollaron un modelo en el que los ratones son infectados con aerosoles utilizando dosis bajas de *M. tuberculosis* (5-10 UFC/ratón). Después de la infección y durante los 3 meses posteriores, la carga bacilar en pulmón es de entre 3 a $4 \log_{10}$ y se mantiene así por 15 a 18 meses, después de lo cual se reactiva. Arriaga y

cols. [69] establecieron un modelo experimental utilizando ratones híbridos F1 C57BL/DBA, en el cual la inoculación por vía intratraqueal de una dosis baja (4×10^3 UFC) de *M. tuberculosis* H37Rv permite el establecimiento de una infección persistente, que semeja en algunos aspectos a la TBL, como son cuentas bacilares bajas y estables en los pulmones sin reactivación espontánea o muerte de los animales. Histológicamente se observa la formación de granulomas y pequeños focos de alveolitis, con una elevada expresión de TNF- α , óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), IL-2 e IFN- γ . Es precisamente este tipo de respuesta inmunológica la que se considera que induce y mantiene a la TBL. Sabai Phyu y cols. [65] propusieron otro modelo utilizando ratones B6D2F1 Bom (C57BL/6JBom x DBA/2JBom); estos ratones se inoculan por vía i.v. o intraperitoneal con dosis bajas (4×10^1 y 4×10^3) o moderada (4×10^4 - 4×10^5) de *M. tuberculosis* que son controladas por el sistema inmunológico, obteniéndose ratones que permanecen clínicamente sanos hasta que son inmunosuprimidos con corticosterona. Yukari Manabe y cols. [70] propusieron un modelo en conejos, a los cuales infectan por aerosol con dosis de 3.17 ± 0.21 log UFC a 3.57 ± 0.05 log UFC de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv. En este modelo a partir de la sexta semana de infección el número de bacilos cultivables y las lesiones granulomatosas decrecen gradualmente a lo largo de 36 semanas, sin reactivación espontánea de la enfermedad.

Suely Kashino y cols. [71] propusieron el uso de una cepa mutante denominada 18b, con la cual los ratones infectados vía i.v. desarrollan un proceso infeccioso que semeja la TBL, caracterizada por la inducción de una potente respuesta de células T que

mantiene niveles bajos de bacilos no replicables en los tejidos de los animales por largos periodos de tiempo, además, de que los animales desarrollan resistencia a la reinfección exógena con *M. tuberculosis* H37Rv.

Saverio V. Capuano y cols. [72] desarrollaron un modelo que imita la infección por tuberculosis en humanos, utilizando macacos cynomolgus tipo D-negativo a retrovirus de simio, los cuales fueron infectados con una dosis de aproximadamente 25 UFC de *M. tuberculosis* cepa Erdman. La inoculación se realiza en el caudal del pulmón derecho o en el lóbulo pulmonar medio del mismo pulmón, auxiliado por un broncoscopio. En este modelo solamente el 50-60% de los animales inoculados desarrolló enfermedad activa y, aproximadamente, el 40% del resto de los animales no presentó señales del progreso de la enfermedad en los 15-20 meses que duró el estudio.

Este trabajo presenta una oportunidad para estudiar la patogénesis, enfermedad y patología de *M. tuberculosis* en un hospedero que es muy similar al humano, además de que se observan características clínicas de infección latente como ocurre en humanos.

Modelo	Tipo	Características	Ventajas	Desventajas
Cornell	Murino	Inoculación intravenosa de 1×10^6 a 3×10^6 UFC de <i>M. tb</i> H37Rv. Requiere 12 semanas de tratamiento con isoniazida y pirazinamida.	Reproduce el estado de latencia del bacilo <i>in vivo</i> .	La dosis y la vía de inoculación del bacilo tuberculoso no imitan la vía de infección en el humano.
McCune y Tompsett	Murino Cepa Webster Swiss	Modelo de Cornell modificado. Inmunosupresión: 1 mg/día de Cortisona por 20 días.	Imita el estado de latencia del bacilo en un modelo <i>in vivo</i> , y los efectos de la inmunosupresión en el humano.	La dosis y la vía de inoculación del bacilo tuberculoso no imitan la vía de infección en el humano.
Orme	Murino Cepa C57BL/6	Inoculación por nebulización de 5 a 10 UFC. Latencia por 15 a 18 meses.	Imita el estado natural de latencia, al ser producida por la respuesta inmune del huésped a la carga bacilar.	Reactivación espontánea y muerte de los animales.
A.K. Arriaga, Hernández-Pando y cols.	Murino Cepa C57BL/DBA	Inoculación intratraqueal de 4×10^3 UFC de <i>M. tb</i> H37Rv.	Reproduce fielmente el estado de latencia, se presentan cuentas bacilares bajas y estables, no hay reactivación espontánea o muerte de los animales.	Es dependiente de la dosis infectante de bacilos. Después de 7 meses hay incremento lento y progresivo de la carga bacilar.
Sabai Phyu y cols.	Murino Cepa B62DF1	Inoculación intravenosa e intraperitoneal de 4×10^1 y 4×10^3 (dosis baja) ó 4×10^4 y 4×10^5 (dosis moderada) Inmunosupresión inducida con corticosterona.	La dosis baja por cualquiera de las 2 vías imita el estado de latencia. La dosis moderada i.p. (4×10^4) imita el estado de latencia, la misma dosis i.v. desarrolla enfermedad clínica.	Las vías de inoculación del bacilo tuberculoso no imitan la vía de infección en el humano.
Suely Casino y cols.	Murino Cepa Balb/c	Inoculación intravenosa de 1×10^6 y 2×10^6 de la cepa mutante única de <i>M. tuberculosis</i> 18b. Reto con aerosol con 100-200 UFC de la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .	Permite estudiar la respuesta inmune durante el proceso infeccioso inicial y la fase de latencia, caracterizada por la presencia de bacilos viables no replicativos en los tejidos del huésped.	La dosis y la vía de inoculación del bacilo tuberculoso no imitan la vía de infección en el humano.
Yukari Manabe y cols.	Conejos Cepa New Zealand White	Infección por nebulización con 10^6 UFC. Dosis inhalada de 3.57 ± 0.05 log UFC dosis alta y 3.17 ± 0.21 log UFC dosis baja. Cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .	Reproduce el estado de latencia. Las cargas bacilares y las lesiones granulomatosas decrecen gradualmente a lo largo de 36 semanas y no presenta reactivación espontánea.	Es difícil manejar números grandes de animales por experimento.
Wayne	<i>In vitro</i> Cepa <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Disminución gradual en la concentración de oxígeno hasta llegar a una microanaerobiosis (0.06% de saturación).	Permite el estudio de genes expresados a causa de la microanaerobiosis. Permite el estudio de 2 estados de la micobacteria conocidos como Persistencia No Replicativa (NRP) 1 y 2.	Solamente permite estudiar el comportamiento del bacilo en condiciones establecidas no es posible evaluar la interacción con el hospedero.
John Joe MacFadden	<i>In vitro</i> Cepa <i>M. bovis</i> ATCC 35748	Cultivo Chemostat: técnica diseñada específicamente para el crecimiento de microbios bajo condiciones constantes y cuidadosamente controladas a una sola tasa de crecimiento	Provee un medio ambiente ideal para estudios genómicos funcionales, las células pueden ser obtenidas reproduciblemente en condiciones altamente definidas.	Implementar esta técnica tiene un costo elevado.

Cuadro 1.- Características, ventajas y desventajas de los modelos experimentales en TB latente. Tomado de Barrios-Payán JA y cols. Salud Publica de México 2010;52:72-80

Diagnóstico de tuberculosis latente

El estándar de oro para el diagnóstico de la TB es la demostración de la presencia de la bacteria en varios fluidos corporales, aunque esto no siempre es posible, debido a la naturaleza paucibacilar de la enfermedad en algunos casos, y principalmente en niños. Por otra parte, la identificación microscópica y el cultivo de la micobacteria en el esputo son los métodos más comunes para el diagnóstico de enfermedad pulmonar; el número mínimo de bacilos necesarios para detectar su presencia en la baciloscopía ha sido estimado entre 5000-10000 ml de esputo [32], pero la detección de TB extrapulmonar es mucho más difícil [73]. En la búsqueda de métodos diagnósticos rápidos y efectivos se ha considerado al inmunodiagnóstico como una opción atractiva. Básicamente éste utiliza la respuesta inmune celular y humoral específica del huésped para inferir la presencia de infección o enfermedad. La prueba de la tuberculina (TST por sus siglas en inglés) o prueba cutánea de hipersensibilidad retardada al Derivado Proteico Purificado (PPD por sus siglas en inglés) y, más recientemente, la inducción *ex vivo* antígeno específica de producción de INF- γ se han utilizado para detectar una infección con *M. tuberculosis* [73, 74].

La prueba PPD ha sido utilizada para identificar pacientes con TB activa, para medir la prevalencia de infección en una comunidad y seleccionar pacientes susceptibles o de alto riesgo para vacunación con BCG. Esta prueba existe desde hace más de 100 años y ha permanecido más o menos sin cambios por los últimos 60 años [75, 76]. El PPD es una mezcla cruda de antígenos, muchos de las cuales forman parte de la

estructura antigénica de *M. tuberculosis*, *M. bovis* bacilo de Calmete-Guérin (BCG) y diversas micobacterias no tuberculosas (MNT) [77].

La prueba de la tuberculina se hace por inyección intradérmica de 5 UT (unidades de tuberculina) en la parte interna del brazo. Se examina después de 48-72 horas, y una reacción positiva es indicada por eritema e induración >10 mm de diámetro. El eritema (caracterizado por un enrojecimiento) por sí solo no se considera una reacción positiva, ya que todas las personas con un contacto previo con el bacilo tuberculoso u otras micobacterias ambientales pueden montar una respuesta inmune a las proteínas del bacilo [76]. Se estima que al menos un tercio de la población positiva a la prueba de la tuberculina en realidad no tiene infección tuberculosa [32]. Esta situación se presenta frecuentemente debido a que el ingrediente activo utilizado en la prueba de la tuberculina contiene una serie de proteínas que son compartidas con la vacuna BCG y otras micobacterias comunes en el medio ambiente; por estas circunstancias la prueba puede ser falsamente positiva. La sensibilidad de la prueba es estimada en aproximadamente 70% en casos de TB activa; por lo tanto cerca del 30% de personas que están infectadas no son detectadas con esta prueba y además se pierde alrededor del 30% de sensibilidad en personas inmunocomprometidas [32].

Uno de los problemas de esta prueba es su vía de administración, ya que pequeñas variaciones en la forma en la que se administra pueden cambiar cantidad de PPD depositado dentro de la piel, afectando directamente el tamaño de la induración. Por otra parte, la lectura de la induración es altamente subjetiva ya que se han

documentado las variaciones en el diagnóstico basadas en diferentes médicos que toman lectura de la misma induración [32].

El PPD es el principal método utilizado en México para identificar la exposición a *M. tuberculosis* en personas que no tienen la enfermedad activa, desafortunadamente esta prueba no es específica de infección con *M. tuberculosis*.

Los avances en las técnicas de inmunodetección han permitido el desarrollo del ELISPOT, basado en la producción y liberación de IFN- γ por células T que son estimuladas con ESAT-6 y CFP-10, dos antígenos que se encuentran, casi exclusivamente, en miembros del complejo *M. tuberculosis* [73]. Estas proteínas están codificadas dentro de la región de diferenciación 1 (RD1) del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, la cual se perdió en la vacuna BCG durante su atenuación y no se encuentra en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas [78].

El ELISPOT ha demostrado tener una sensibilidad entre 92 y 96% en pacientes con TB confirmada por cultivo, incluyendo pacientes VIH+ [79]. Al comparar la sensibilidad y especificidad de la prueba en contactos de pacientes con TB se encontró que el 53% de los contactos PPD+ fueron negativos por ELISPOT y el 7% de los ELISPOT positivos fueron PPD-, lo que sugiere que muchos de ellos fueron vacunados con BCG o estuvieron expuestos a MNT [73]. En un estudio realizado en Zambia se demostró por ELISPOT que la prevalencia de TB asintomática era del 69% (37/54) en sujetos VIH-, mientras que en los VIH+ era del 90% (35/39) [80]. Este estudio mostró que

ELISPOT tiene mayor especificidad para identificar individuos con TBL en comparación con el PPD [73, 80]. No obstante, aún se ha cuestionado el uso de ESAT-6 y CFP-10 como marcadores de latencia, toda vez que estas proteínas se expresan durante la fase activa de crecimiento microbiano. En el mejor de los casos, la reactividad hacia ESAT-6 y CFP-10 constituye de momento un indicador de infección tuberculosa [81].

Los ensayos de liberación de interferón gamma (IGRAs por sus siglas en inglés *interferon- γ -release assays*) han surgido como una alternativa para la detección de TB. Actualmente existen versiones comerciales como el QuantiFERON-TB Gold (Cellestis, Carnegie, Australia) y el T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, United Kingdom), que consisten en la cuantificación del IFN γ producido por leucocitos de sangre total estimulados con los antígenos PPD, ESAT-6, CFP-10 y TB 7.7 en el kit QuantiFERON-IT de tercera generación [36, 82]. Estas pruebas de diagnóstico tienen mayor especificidad, especialmente en población vacunada con BCG [83]. Diversos estudios han demostrado que el QuantiFERON-TB no presenta interferencia por la vacunación con BCG y puede diferenciar la infección con *M. tuberculosis* de la sensibilización con MNT (Cuadro 2) [84, 85].

Uno de los primeros hallazgos en el camino del desarrollo de una técnica de PCR que permitió la detección de *M. tuberculosis* fue un elemento de inserción IS6110, que está presente en múltiples copias (desde 4 a 20) en más del 95% de las cepas de *M. tuberculosis* y tiene el potencial de aumentar la sensibilidad de detección [32]. En los

años 90's muchos laboratorios desarrollaron varios protocolos que hoy se conocen como PCR "anidada". En este procedimiento, la amplificación de una larga región de ADN es seguida por una segunda amplificación dirigida a una región interna más corta. Muchos de estos protocolos "caseros" presentaron una elevada tasa de falsos positivos y de contaminaciones cruzadas [32].

Sin lugar a duda, la expresión de genes durante la latencia es una de las preguntas más intrigantes en la biología de *M. tuberculosis*. El esclarecimiento de los mecanismos moleculares que favorecen la supervivencia de la micobacteria durante periodos prolongados, así como las señales que le indican cuando puede reactivarse son fundamentales para el desarrollo de estrategias que permitan el control y erradicación de la TB. Sin embargo, por las limitantes tecnológicas se ha logrado obtener pocos avances en las investigaciones enfocadas a conocer la regulación genética de *M. tuberculosis* durante la infección latente. Se han estudiado algunos factores transcripcionales que, se especula, pueden estar involucrados en la regulación genética durante el estado de latencia, algunos por su homología con factores transcripcionales de otras bacterias y su relación con la esporulación o la fase estacionaria.

En los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* se han identificado 13 posibles factores sigma (*sigA*, *sigB*, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigF*, *sigG*, *sigH*, *sigI*, *sigJ*, *sigK*, *sigL* y *sigM*) [79]. Los que hasta el momento se han relacionado con el estado de latencia son: *sigB*, que se activa en respuesta a varios estímulos ambientales, entre los que está la

disminución en la tensión de oxígeno [86]; *sigE*, cuya transcripción ocurre durante el crecimiento exponencial y en condiciones de choque térmico, baja aireación y durante la entrada del microorganismo a la fase estacionaria [87] y *sigF* ó Rv3286c (también conocido como *mysB* ó *katF*), que sólo se encuentra en micobacterias patógenas de crecimiento lento y cuya transcripción aumenta después de la fagocitosis de la micobacteria, ayuno de nutrientes y en respuesta al tratamiento con antibióticos [88].

Recientemente se caracterizó la proteína codificada por el gen Rv3133, ahora denominado *dosR* (del inglés dormancy survival regulator), la cual activa la transcripción de genes en respuesta a la reducción de la tensión de oxígeno en *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG [89].

El Dos regulón (DosR) juega un papel crucial para que se establezca una infección persistente, especialmente cuando se da una disminución en la tensión de oxígeno. Se ha demostrado que una rápida disminución de oxígeno es letal para *M. tuberculosis*, mientras que una disminución gradual le proporciona el tiempo necesario para la adaptación y su supervivencia. La micobacteria utiliza un sistema de dos componentes para poder censar el medio ambiente en el que se encuentra y poder adaptarse para asegurar su supervivencia. Este sistema consta de dos sensores cinasas de histidina, DosS y DosT y un regulador de respuesta, DosR, que facilita la transición a la forma latente de la infección al regular positivamente cerca de 30 genes y negativamente aproximadamente 68, muchos de ellos durante la hipoxia, por ejemplo: Rv1733c, Rv1738, Rv2029c (*pfkB*), Rv2031c/*hspX* (*acr*), Rv2032 (*acg*), Rv2626c, Rv2627c, y

Rv2628 entre otros [90, 91]. No obstante, aún no se ha demostrado formalmente que las proteínas codificadas por estos genes sean necesarias para la sobrevivencia de *M. tuberculosis* durante la fase latente de la infección; un ejemplo claro de esta situación es el gen *hspX* (Rv2031c) que contribuye al estado de latencia. Se ha reportado que Rv2031c se requiere para el crecimiento “*in vitro*” en macrófagos, pero “*in vivo*” la eliminación de este gen causa un incremento en el crecimiento bacteriano [91]. McKinney y cols. en el año 2000 sugieren un papel para *icl* en relación a la sobrevivencia de MTB en macrófagos, al demostrar que la eliminación del gen de *icl* inhibe la persistencia de MTB en macrófagos de ratones [92]; estudios bioquímicos sugieren que en tejidos de pulmón crónicamente infectados, los ácidos grasos pueden funcionar como la principal fuente de carbono [93].

Métodos Biológicos para la detección de TBL

PPD

Único método aprobado para detectar exposición al bacilo, no es específico para detectar *M. tuberculosis* al presentar reacción cruzada con MNT.

**en sujetos PPD+ que presentan sintomatología se complementa el diagnóstico con la radiografía de tórax.*

QuantiFERON-TB

Ensayo realizado con sangre total, se basa en la cuantificación del INF- γ producido por linfocitos después de ser estimulados con las proteínas ESAT-6, CFP-10 y TB-7.7 (kit de 3ª generación QFT-IT). La vacunación con BCG y la sensibilización con MNT no interfieren con el resultado. El resultado es dado en unidades de INF- γ .

ELISpot

Se basa en la detección de las células mononucleares de sangre periférica que producen INF- γ después de ser estimuladas con péptidos sintéticos de las proteínas ESAT-6 y CFP-10. Es específico para identificar sujetos con infección latente. El resultado es dado en Unidades Formadoras de Spot (UFS).

Cuadro 2.- Métodos Biológicos para la detección de tuberculosis en estado latente.

Justificación

La infección latente se caracteriza por la presencia de bacilos en tejidos del huésped, sin sintomatología aparente durante la que la micobacteria adapta su metabolismo para mantenerse viva con baja o nula replicación, dificultando su eliminación de los tejidos por el sistema inmunológico del hospedero. La latencia es uno de los estadios menos estudiados en la biología de *M. tuberculosis* y, aunque se estima que representa alrededor del 90% de los casos de infección, aún se desconoce la prevalencia real de la infección, así como la localización tisular extrapulmonar y el estado metabólico del bacilo en el organismo.

Hipótesis

Mycobacterium tuberculosis reside en tejidos pulmonares y extrapulmonares macroscópicamente normales, manteniéndose viable durante la infección latente.

Objetivo General

Determinar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en sujetos que murieron por causas diferentes a la tuberculosis evidenciando, la presencia de bacilos en tejido pulmonar y extrapulmonar.

Objetivos particulares

- 1.- Identificar el ADN de *M. tuberculosis* en tejido pulmonar y extrapulmonar de sujetos que murieron por causas ajenas a la tuberculosis.
- 2.- Determinar el genotipo de las micobacterias.
- 3.- Determinar la viabilidad de *M. tuberculosis* en los casos positivos de infección latente.
- 4.- Confirmar la colonización extrapulmonar durante la infección latente utilizando un modelo murino.

Materiales y Métodos

Muestras humanas.

Para demostrar la presencia de *M. tuberculosis* en tejido extrapulmonar en sujetos sin antecedentes conocidos de TB, se estudiaron biopsias de 49 individuos que murieron por causas ajenas a la TB. Las autopsias incluidas en el estudio corresponden a sujetos de entre 14 y 93 años de edad que fallecieron en el Hospital General de México. Las biopsias fueron colectadas en el Departamento de Patología de dicho hospital. Ninguno de los expedientes clínicos correspondientes a las autopsias que se colectaron tenía registro de enfermedad por TB activa o vacunación reciente con BCG. Los criterios de exclusión fueron el presentar infección por VIH, hepatitis C, o tratamiento inmunosupresor. Todas las muestras fueron tomadas previa autorización del familiar responsable del paciente fallecido y con la aprobación del Comité de Ética del Hospital General de México (Número de registro: DI/11/310/03/083).

Preparación del tejido

Tan pronto como fue posible, (una media de 4-6 h después de la muerte del paciente) se tomó una muestra de 2 x 2cm de: pulmón, hígado, bazo y riñón. Posteriormente, las muestras se dividieron en dos, un fragmento fue congelado por inmersión en nitrógeno líquido para realizar extracción de ADN, ARN, espoligotipificación y cultivo, el otro fragmento fue fijado en formaldehído al 10% disuelto en PBS. Después de la fijación, los tejidos fueron deshidratados, incrementando gradualmente la concentración de alcohol etílico y posteriormente fueron embebidos en parafina. Los bloques de parafina

fueron usados para obtener cortes seriados y realizar la localización de ADN micobacteriano por PCR *in-situ*.

Extracción de ADN

La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo a partir de secciones de tejido de aproximadamente 2 x 2 mm, que fueron inmersas en solución salina y homogenizadas con perlas de vidrio en un Mini-Bead Beater Blender (Digger, USA) por lapsos de 15 s/ 2000 rpm/ 7 veces, el sobrenadante (SN) se colectó en un tubo eppendorf nuevo y estéril al que se le adicionaron 500 µL de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (25:24:1); se mezcló por inversión 5 min, se recuperó en un tubo nuevo donde se le adicionaron 500 µL de Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). A la fase acuosa obtenida después de este paso se le agregaron 700 µL de isopropanol-acetato de sodio 3M a pH 5.2, se incubó la mezcla 30 min a -20°C y el botón de ADN se lavó tres veces con etanol al 70%, se dejó secar y fue resuspendido en 50 µl de agua para PCR. La integridad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1.2% teñido con Bromuro de Etidio (Br-ET), se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Extracción de ARN

Este protocolo comprende dos etapas, la primera consiste en la extracción del ARN total, en la cual el tejido se transfiere a un mortero estéril y tratado con RNase AWAY™ (Invitrogen, USA) y se homogeniza inmerso en N₂. El tejido homogenizado se

divide en dos porciones de 5 mg, las cuales se colocan en un tubo eppendorf previamente congelado en N₂, al que se le agrega 1 mL de reactivo RNeasy Lysis Buffer (RLT), (RNeasy Qiagen[®], USA) y se sonica dando tres pulsos de 30 seg a nivel 6 de potencia; es importante colocar el tubo en hielo entre cada ciclo. Posteriormente se centrifuga a 4000 rpm por 10 min a 20 °C y se transfiere el SN que contiene al ARN del hospedero a un tubo nuevo y se procesa la pastilla en la segunda etapa.

La segunda etapa se compone de 4 extracciones, en la primera se aísla el ARN micobacteriano, para lo cual la pastilla se resuspende en 1mL de TRIZOL[®] (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), y se transfiere a un criotubo de 2 mL que contiene 500 µL de perlas de vidrio de 0.1 mm. El tubo es colocado en el equipo Mini-Bead Beater blender (Daigger, USA) para lisar a los bacilos aplicando 7 ciclos de 30 seg a velocidad 6, manteniendo el tubo en hielo entre cada ciclo. Una vez terminado este proceso el tubo se centrifuga por 1 min a 14,000 rpm y el SN se transfiere a un tubo de 2 mL con 300 µL de Cloroformo, se homogeniza vigorosamente por 15 seg en vortex y se agita por inversión por 2 min, después se centrifuga 10 min a 14,000 rpm y la fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo. Al tubo que contiene la fase acuosa se le adicionan 10 µL de glicógeno, ½ volumen de acetato de amonio 5M y 1 volumen de alcohol isopropílico, esta mezcla se homogeniza por inversión y se incuba 20 min a -20 °C. Pasada la incubación se centrifuga por 10 min a 4 °C a 14,000 rpm, se decanta el SN y se lava con etanol al 70%, se centrifuga 5 min a 14,000 rpm a 4 °C y se elimina el SN, esta operación se repite dos veces.

Terminada esta etapa se procede a la segunda extracción, para lo cual se eliminan los restos de ET-OH y reconstituye con 100 µL de agua libre de RNAsas, se agregan 350 µL de RLT (RNeasy Qiagen®, USA), 10 µL de β-mercaptoetanol y 250 µL de ET-OH absoluto, esta mezcla se homogeniza con una micropipeta y se transfiere a una columna del kit de extracción de RNeasy Qiagen® (USA), se centrifuga por 30 seg a 14,000 rpm, después de centrifugar, la columna es transferida a un tubo nuevo de recolección y se centrifuga 1 min a 14,000 rpm, nuevamente es trasferida la columna a un tubo eppendorf nuevo estéril de 1.5 mL, y se eluye el ARN agregando 50 µL de agua, se centrifuga 2 min a 14,000 rpm y se agregan otros 34 µL de agua y se centrifuga nuevamente. El ARN es tratado con DNAsa para eliminar los remanentes del ADN genómico de la micobacteria, se agregan 2.5 µL de DNAsa, 2.5 µL de Buffer 10x, 20 µL de H₂O y esta mezcla se incuba a 37°C por 15 min, terminada la incubación se agrega 1.0 µL de EDTA 25 mM y se incuba a 65°C por 10 min para inactivar la DNAsa, posteriormente se coloca en hielo.

Para la tercera extracción, al tubo se le adicionan 350 µL de RLT (RNeasy Qiagen®, USA) 10 µL de β-mercaptoetanol y 250 µL de ETOH absoluto, esta mezcla se transfiere a una columna nueva y se centrifuga 1 min a 14,000 rpm, la columna se lava dos veces con 700 µL de buffer RW1 (RNeasy Qiagen®, USA) y se centrifuga 1 min a 14,000 rpm y nuevamente se transfiere la columna a un tubo nuevo de recolección, se centrifuga y se eluye con 84 µL de H₂O libre de RNAsa y DNAsa al igual que en la segunda extracción y es tratado nuevamente con DNAsa. La cuarta extracción es igual que la tercera con la excepción de que después de lavar 2 veces con RW1, la columna

se lava 2 veces con RPE (RNeasy Qiagen[®], USA), se transfiere a un tubo nuevo y se centrifuga 2 min a 14,000 rpm. Finalmente la columna se transfiere a un tubo eppendorf nuevo y el ARN se eluye de la columna con 50 µL de H₂O libre de RNAsa y DNAsa. Inmediatamente después de la extracción se sintetiza el cDNA. Para eso utilizamos la **RT-Invitrogen[®]** (Invitrogen[®], USA), utilizamos 1 µL de random primers (Promega[®], USA), 2 µL de dNTP's 10mM, 11 µL de agua, se incuba 5 min a 65 °C, se agregan 8 µL de buffer 5x, 4 µL de DTT 0.1M, 2 µL de RNAsa OUT (Invitrogen[®], USA), se incuba nuevamente la mezcla a 37 °C por 2 min y se agregan 0.5 µL de retrotranscriptasa (Qiagen[®], USA) y se incuba 25 °C por 10 min, después a 37 °C por 50 min y por último a 70 °C por 15 min después se mantiene en congelación hasta su uso. Para cada tubo de cDNA se uso como control un tubo con la misma mezcla pero sin retrotranscriptasa.

Detección de ADN micobacteriano por PCR

Todas las muestras fueron analizadas por PCR convencional; se buscó la presencia de ADN micobacteriano amplificando la secuencia de inserción IS6110 presente en el genoma de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. Se seleccionó esta secuencia porque se encuentran múltiples copias de ella (de 4 a 20) en más del 95% de las cepas de *M. tuberculosis* [32]. La PCR convencional fue realizada con los iniciadores para la secuencia de inserción IS6110, descritos previamente [15]. La secuencia de los oligos utilizados es: 5-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG-3

(sentido) y 5-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3 (anti-sentido), el producto de PCR obtenido es de 123 pb.

Para realizar este ensayo, primero fue necesario determinar la sensibilidad de esta técnica, por lo que se realizó una curva con diferentes diluciones de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv (de 100 ng a 1 fg). Para este ensayo utilizamos como control negativo ADN de *Homo sapiens* y como control negativo de reacción la mezcla de PCR sin ADN (Figura 7).

La mezcla de PCR se realizó con Buffer de reacción de PCR 10x, adicionado con $MgCl_2$ 50 mM a una concentración final de 2.5 mM, dNTP's y 20 pmol/ μ L de los iniciadores descritos previamente, su utilizó 1 U de *Taq DNA polimerasa recombinant* (Invitrogen®, USA) y 1 μ g de ADN total extraído de los tejidos de autopsia. La reacción de PCR se llevo a cabo de la siguiente manera: desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación a 70°C por 1 min y extensión 72°C por 1 min, por 35 ciclos. Una vez establecido el umbral de detección por medio de la curva, se realizó la amplificación en las muestras de autopsia, ADN de *M. tuberculosis* de la cepa H37Rv como control positivo, como control negativo se utilizo ADN de dos organismos que no contienen la secuencia de inserción IS6110 como *Homo sapiens* (HS) y *Entamoeba hystolitica*, como control negativo (-) de reacción se utilizó la mezcla de PCR sin ADN.

Detección de ADN de *Mycobacterium bovis* por PCR

Estos ensayos se llevaron a cabo con la finalidad de descartar posibles casos de infección por *Mycobacterium bovis* en la PCR-IS6110. Debido a que la secuencia de inserción IS6110 también está presente en *M. bovis* se realizó una PCR para detectar ADN de *M. bovis* utilizando los oligos (JB21 5'-TCG TCC GCT GAT GCA AGT GC-3' sentido, JB22 5'-CGT CCG CTG ACC TCA AGA AG-3' anti-sentido) para amplificar una región de 500 pb muy específica de esta especie [94, 95]. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 62°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, por 30 ciclos. Para estos ensayos se utilizó como control negativo ADN de *M. tuberculosis* H37Rv y ADN de *Homo sapiens*, y la mezcla de PCR sin ADN y como control positivo se utilizó ADN de *M. bovis*.

Detección de ADN micobacteriano por PCR in-situ

El objetivo de este ensayo fue determinar si el ADN de *M. tuberculosis* se encontraba en tejidos sin señales de inflamación o daño histopatológico, así como para evaluar su localización celular. Para llevar a cabo este experimento se hicieron cortes histológicos de 5 micras que fueron montados en laminillas de vidrio silanizadas, los tejidos se desparafinaron por 18 h a 60°C, posteriormente fueron sumergidos en xilol (30 min a 37°C) y subsecuentemente en etanol absoluto, etanol al 75%, etanol 50%, etanol al 25% y agua. Las células de los cortes histológicos fueron permeabilizadas por incubación a temperatura ambiente en 0.02 M de HCl por 10 min. Las proteínas fueron degradadas por incubación con proteinasa K (Gibco, Paisley, UK) por 30 min a 37°C.

La proteinasa K fue inactivada por calentamiento en un horno microondas por 15 seg, después las laminillas fueron sumergidas inmediatamente en ácido acético al 20% por 15 seg para inactivar la fosfatasa alcalina endógena. La PCR se realizó incubando los tejidos con 50 µL de buffer de reacción (Gibco, BRL, UK), 1.5 U Taq polimerasa, 2 mM/L MgCl₂, 40mM/L dNTP, 0.2 mM/L dUTP marcado con digoxigenina (Boehringer Mannheim, Lewes, UK) y 60 pg de los iniciadores (5'- CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG- 3' sentido, 5'- CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG- 3' antisentido).

Las laminillas fueron selladas con el Assembly tool (Perkin Elmer, Cambridge, UK) y colocadas en un termociclador Touch Down (Hybaid, Ashford, UK). La amplificación consistió de: desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación a 70°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, por 35 ciclos. Al finalizar la reacción de PCR los productos fueron detectados con un anticuerpo de cabra anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim, Lewes, UK) diluido 1/500. El cromógeno fue 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato y nitro azul de tetrazolio (Boehringer Mannheim, Lewes, UK) diluido 1/50. Los tejidos fueron contrateñidos con *nuclear fast red* para evitar cualquier interferencia con la señal azul generada por el ADN micobacteriano en la PCR *in-situ*.

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad en la detección de ADN de *M. tuberculosis*, los productos de PCR (pPCR) que no presentaron una positividad clara fueron hibridados con una sonda específica, para lo cual se utilizó una membrana de nylon cargada positivamente *Hybond N+* (GE Healthcare). La membrana fue hidratada

en TE pH 8.0, y fue colocada posteriormente en un *BIO-DOT™ APPARATUS* (BIO-RAD, USA). Todos los pPCR para IS6110 (30 µL) de las autopsias con un resultado positivo poco apreciable o resultado negativo fueron aforadas con agua para PCR a un volumen de 100 µL, desnaturalizadas en un baño de agua hirviendo y posteriormente colocadas en hielo. Las muestras fueron colocadas en la membrana utilizando vacío y fueron sometidas a un proceso de entrecruzamiento por radiación UV a 1200 µJx100 por 1:05 min en un Stratalinker® 1800 (STRATAGENE®, USA). Posteriormente la membrana fue almacenada en TE pH 8.0 en una bolsa de plástico a 4 °C hasta su uso.

Detección de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR-Hibridación

Para la elaboración de la sonda IS6110-Biot, nosotros iniciamos con una reacción de PCR de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv para amplificar la secuencia de inserción IS6110, utilizando los oligos previamente descritos. La reacción de PCR se elaboró con 5 µL de Buffer de reacción de PCR 10x (-MgCl₂), 2 µL de MgCl₂ 50 mM, 1.6 µL de dNTP's y 1 µL a una concentración de 20 pmol/µL de c/u de los iniciadores descritos previamente, 0.2 µL de *Taq DNA polimerasa* (Invitrogen®, USA), se utilizó como templado 3 µL (100 ng/µL) de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv y agua de PCR a un volumen final de 50 µL. Las condiciones de PCR para este experimento fueron las siguientes: desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineación a 70 °C por 1 min y extensión 72 °C por 1 min, por 35 ciclos. El producto de PCR fue verificado en un gel de agarosa al 2% (Invitrogen®, USA) teñido con Br-Et, una vez verificada la longitud del amplificado, este fue purificado con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up

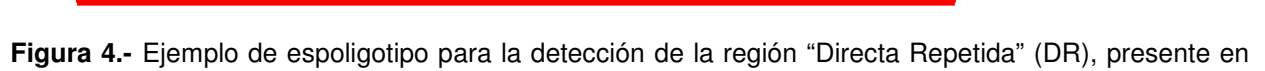
System (Promega[®], USA) y resuspendido en 50 µL de agua libre de nucleasas. Para la obtención de la sonda, se tomaron 3 µL del producto purificado de PCR de IS6110, y la reacción de PCR se realizó con las mismas condiciones descritas previamente, con dos variaciones, primera: el primer sentido fue marcado con Biotina en el extremo 5', segundo: el número de ciclos se aumentó a 40. El producto de esta reacción también fue verificado en un gel de agarosa al 2% teñido con Br-Et, purificado con el kit mencionado anteriormente y posteriormente se tituló la sonda y se almacenó a -20 °C hasta su uso (Figuras 17 y 18). La sonda se tituló utilizando diluciones seriales para establecer la concentración de trabajo con la sonda y se verificó que no tuviese un reconocimiento cruzado con otros ADN's. Este procedimiento se realizó cada vez que fue sintetizada sonda nueva.

Antes de hacer el ensayo, se preparó la membrana *HybondTM N+* de la siguiente manera: se bloqueó por 2 hrs con Reactivo de Bloqueo (*Roche Applied Science*) en buffer de ácido maléico 0.1 M a un pH de 7.5 (SIGMA, USA), seguido de un lavado con buffer 2xSSPE/0.5% SDS a 60°C por 10 min. Previo a su uso la sonda fue desnaturalizada en un baño de agua hirviendo por 10 min y colocada inmediatamente en hielo, y se dejó hibridando con la membrana a 60°C toda la noche. Seguido de la incubación, la membrana se lavó dos veces con 2xSSPE/0.5% SDS a 42°C por 15 min y se incubó 1 hr con *Streptavidin HRPO Conjugated* (Invitrogen[®], USA) a una dilución 1:20,000 en buffer 2xSSPE/0.5% SDS, posterior a la incubación se lavó la membrana 3 veces con 2xSSPE/0.5% SDS a 42°C por 15 min y 3 veces con 2xSSPE a temperatura ambiente por 5 min. Para el proceso de revelado la membrana se incubó

por 2 min con el reactivo Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 U.S.A), posteriormente se cubrió con un acetato transparente y se expuso una placa autoradiográfica Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare, UK), que se reveló por inmersión en el reactivo de revelado Kodak GBX *developer and replenisher* seguido por un baño en agua corriente y finalmente en el reactivo de fijación Kodak GBX *fixer and replenisher*.

Espoligotipo

Para la espoligotipificación se utilizó el kit spoligotyping kit (Ocimum Biosolutions Ltd, India) siguiendo las instrucciones del fabricante. La espoligotipificación se hizo solo para los casos positivos por PCR a la secuencia de inserción IS6110. La amplificación de los espaciadores se realizó con los primers DRa-biot y DRb, los cuales permiten amplificar completamente la región DR. Se utilizaron como controles positivos el ADN de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG 19210, y como control negativo se utilizó agua. La reacción de PCR se preparó con 4µL de primer DRa (20pmol), 4µL de primer DRb (20pmol), 4µL de dNTP's, 5µL de 10x Buffer de Reacción de PCR (-MgCl₂), 2 µL MgCl₂ 50mM, 0.2 µl de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen®, USA), 1 µg de ADN total como templado y 100 ng de ADN del control positivo y agua DEPC a un volumen final de 50 µL. Los tubos se colocaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem) y se establecieron las siguientes condiciones para la PCR: la muestra se calentó por 3 min a 96°C, seguido por 20 ciclos de desnaturalización por 1 min a 96°C, alineación 1 min 55°C y extensión 72°C. Para la



55

Detección de α -Cristalina e isocitrato liasa por PCR en tiempo real

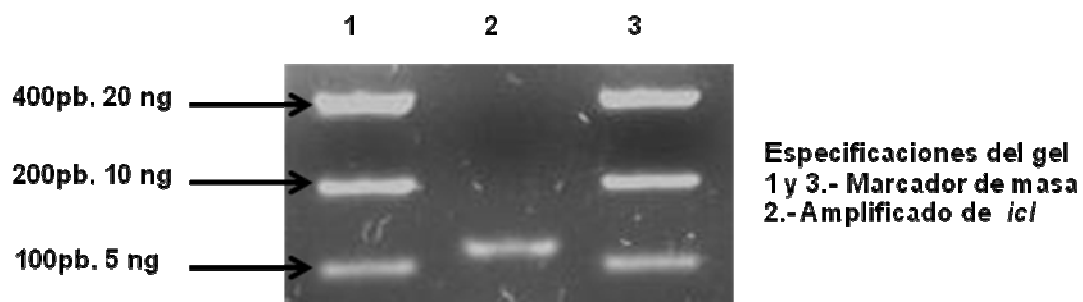
Una vez extraído el ARN de los tejidos de autopsia y sintetizado el ADNc, se procedió a la detección de los ARNm de genes relacionados a la latencia en *M. tuberculosis*; para este experimento se seleccionaron los tejidos que fueron positivos a la detección de la secuencia de inserción IS6110 por PCR convencional, debido a que los tejidos de las autopsias han permanecido muchos años en congelación y la carga bacilar disminuye con el paso del tiempo aun cuando se encuentran congelados los tejidos.

Previo a este ensayo se hizo una PCR convencional para analizar las muestras seleccionadas y ver si era posible detectar el ARNr 16S; la mezcla de PCR se preparó de la siguiente manera: Master Mix (PCR QIAGEN®) 12.5 μ l, H₂O para PCR 10.5 μ l, P₁ ARN 16s (5' -ATG ACG GCC CTC GGG TTG TAA- 3' sentido) 0.5 μ l, P₂ ARN 16s (5' -CGG CTG CTG GCA CGT AGT TG- 3' antisentido) 0.5 μ l y ADNc 1.0 μ l. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C 30 seg, alineación a 60°C por 30 seg y extensión a 72°C por 45 seg, por 35 ciclos. Como controles se utilizaron las mezclas RT- de cada una de las muestras, un tejido pulmonar de ratón sano, un tejido pulmonar de una autopsia humana, negativa para TB, y como control positivo el bazo de un ratón con 4 meses de infección.

Por PCR convencional se amplificó *acr* e *icl*. Los productos de la reacción se corrieron en un gel de agarosa al 2% teñido con Syber Green. Se agregaron 2 μ L de marcador de masa a ambos lados del carril que contiene el producto de PCR. Se tomaron las lecturas con un analizador de imágenes (Alpha Innotech Chemilmager®, USA), para

realizar un análisis densitométrico y determinar la concentración de los productos de PCR obtenidos. Una vez determinada la concentración se hicieron diluciones seriadas 1:10 que van desde 1×10^9 hasta 1×10^2 , para construir la curva de concentración con la cual se determinó la concentración de los mensajeros en cada una de las muestras y para cada uno de los genes. (Figura 5).

Los iniciadores y las condiciones para estas reacciones se enlistan a continuación: para *icl* se preparó de la siguiente manera: Hot Star Master Mix 12.5 μL , H_2O para PCR 10.5 μL , *icl* (5'-ACA CCT ACC CCG ACC AGA G-3' sentido) 0.5 μL , *icl* (5'-TGC AGC TCG TAG ACG TTG AG-3' antisentido) 0.5 μL y cDNA 1.0 μL y se amplificó con los siguientes parámetros: desnaturalización a 95°C 30 seg, alineación a 60°C por 30 seg y extensión a 72°C por 45 seg, por 40 ciclos. La mezcla de PCR para *acr* se preparó de la siguiente manera: Hot Star Master Mix 12.5 μL , H_2O para PCR 10.5 μL , *acr* (5'-CGA GAA GGA CGT CGA CAT TA-3' sentido) 0.5 μL , *acr* (5'-CCT TGT CGT AGG TGG CCT TA-3' antisentido) 0.5 μL y cDNA 1.0 μL . y las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C 30 seg, alineación a 58°C por 30 seg y extensión a 72°C por 45 seg, por 40 ciclos.



Análisis por densitometría

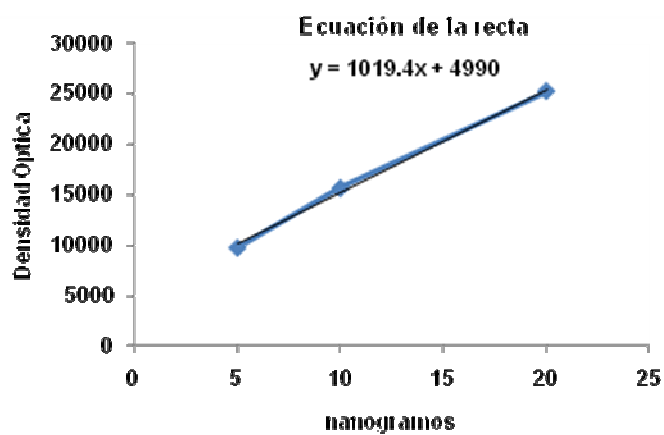


Figura 5.- Una vez amplificado el producto de PCR del gen de interés, se corrió en un gel de agarosa al 2% + SyGr junto con 2 µL de marcador de masa a ambos lados del carril que contiene el producto de PCR de *icl* para calcular la cantidad de ng depositados en el gel en un volumen conocido.

Modelo murino de latencia

Se utilizaron ratones F1 híbridos C57BL/DBA, a los cuales se les inoculó por vía intratraqueal 4000 UFC's de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Este modelo imita perfectamente el estado de latencia que ocurre en el humano, ya que la carga bacilar se mantiene constante a lo largo del tiempo y no hay reactivación espontánea o muerte de los animales a los 30, 90, 150 y 210 días post-infección [69]. En cada uno de los tiempos se sacrificaron 5 ratones a los cuales se les extrajo el bazo, hígado, riñón, cerebro y ganglios.

Preparación del tejido murino

Los tejidos colectados del modelo murino se trataron de la misma manera que los tejidos obtenidos de las autopsias de humano. Para los ensayos de detección y conteo de UFC se utilizaron fragmentos de los tejidos congelados, los cuales se pesaron antes de homogeneizarse para poder calcular la carga bacteriana por gramo de peso.

Unidades Formadoras de Colonias

Los tejidos colectados del modelo murino de latencia se utilizaron para determinar las UFC presentes en hígado, bazo, riñón, ganglios y cerebro en los días de sacrificio anteriormente mencionados. Los tejidos se homogenizaron con un Polytron y se cultivaron por duplicado en diluciones seriadas (1:10) en cajas petri con medio de cultivo Middlebrok 7H10 (Difco™) enriquecido con OADC y glicerol. Posteriormente

las cajas de cultivo se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ por 21 días, se procedió a contar las colonias desarrolladas en los días 14 y 21.

Tinción de Ziehl-Neelsen

Para detectar la presencia de BAAR en el tejido de las biopsias, se hicieron cortes histológicos de 4 micras de grosor de cada uno de los tejidos embebidos en parafina. Los tejidos se desparafinaron a través de dos lavados de Xilol (JT Baker, USA), posteriormente se hidratan pasándolos a través de etanol absoluto, etanol al 95%, etanol al 75% y finalizando con agua destilada. Los tejidos se tiñeron con carbol fucsina por 10 min, se enjuagaron en agua destilada y se decoloraron con alcohol ácido al 1%, hasta que presentaron una coloración rosa pálido. Posteriormente se lavó con agua por 8 min y se contrastó con azul de metileno. Los tejidos adquirieron un color azul pálido y se lavaron con agua destilada. Finalmente se deshidrataron en la estufa y posteriormente con 2 cambios de alcohol al 95% y alcohol absoluto. Los remanentes de alcohol se eliminaron con 2-3 cambios de xilol y se montó la laminilla para su análisis.

Resultados

Las autopsias recolectadas para este estudio, no presentaron infección por TB o indicios de vacunación reciente con BCG, según los registros llevados en los expedientes de los sujetos al momento de la autopsia. La causa de muerte de los 49 individuos incluidos en el estudio se clasificó de la siguiente manera (Figura 6): hipertensión arterial sistémica (8), sepsis (6), insuficiencia renal crónica (4), riñones terminales, tabaquismo, diabetes mellitus, choque hipovolémico, neumonía y hemorragia cerebral (2 pacientes c/u respectivamente), gastroenteritis aguda, lupus eritematoso sistémico, leucemia linfoblástica L2, leucemia linfoblástica aguda, coagulación intravascular diseminada, leucemia aguda mieloblástica, leucemia aguda mieloblástica M6, sarcoma fusocelular, pancreatitis aguda necrohemorrágica, mieloma múltiple, cáncer de ovario/pulmón/riñón/seno, adenocarcinoma de vías biliares, malformación cardíaca, pancreatitis, insuficiencia cardíaca global e infarto agudo al miocardio (1 paciente c/u respectivamente).

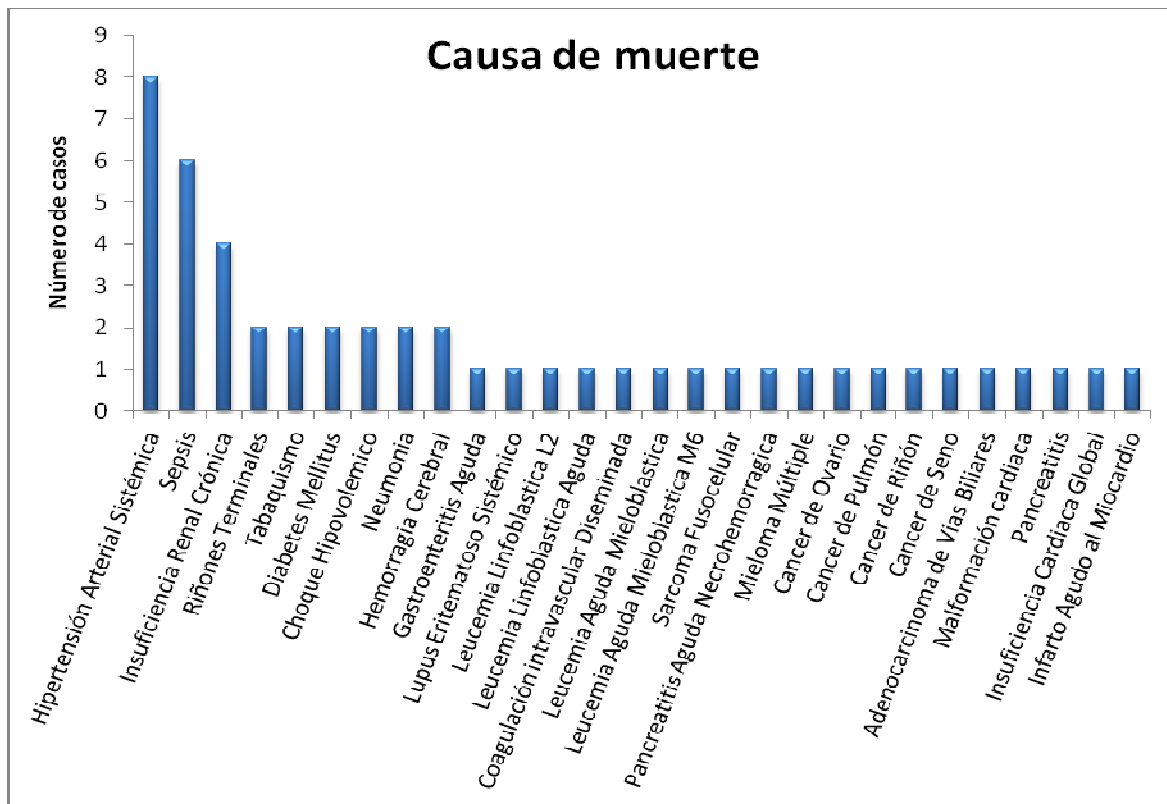


Figura. 6.- Este grafico nos muestra la causa de muerte de los 49 casos de autopsia colectados para el presente estudio

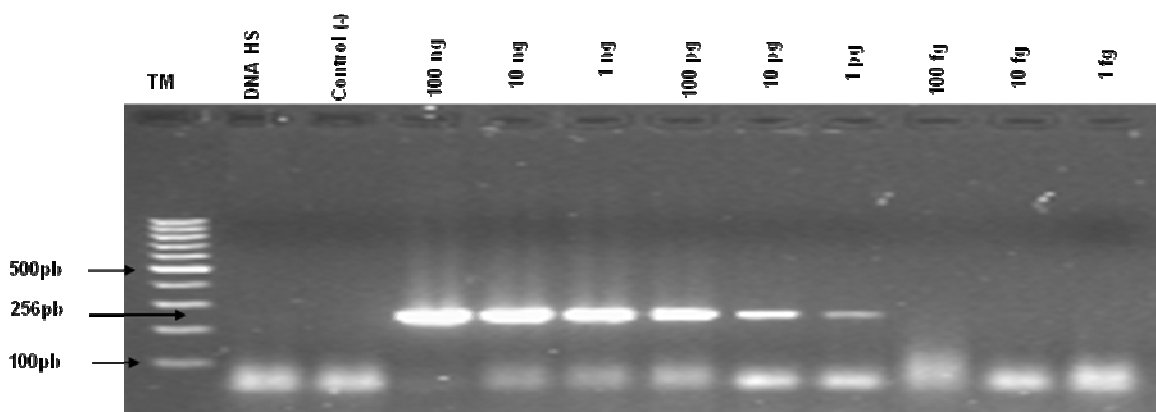


Figura. 7.- Sensibilidad de detección de IS6110 en ADN de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* por PCR convencional. Carril 1: TM (Marcador de Tamaño Molecular), Carril 2: ADN de HS (*Homo sapiens*), Carril 3: Control negativo, Carriles 4-12: ADN de *M. tb* en diluciones de 100ng a 1 fg. Imagen representativa de dos experimentos independientes

Mediante PCR convencional pudimos identificar la presencia de ADN de *M. tuberculosis* en pulmón y tejido extrapulmonar (Figuras 8, 9, 10 y 11) mediante la amplificación de un fragmento de 123 pb correspondiente a la secuencia de inserción IS6110 en 43/49 (88%) autopsias analizadas 19/23 de sexo masculino (82.6%) y 24/26 de sexo femenino (92.3%). Es importante mencionar que si una autopsia tenía varios órganos positivos para la secuencia de inserción IS6110, nosotros únicamente consideramos positiva la autopsia en su conjunto (Figura 12). En las 43 autopsias analizadas, en las que al menos un órgano fue positivo, encontramos positividad en 31 biopsias de pulmón, 31 biopsias de riñón, 18 biopsias de bazo y 17 biopsias de hígado (Figura 13). Para descartar que el ADN detectado no fuera producto de una infección con una micobacteria ambiental, remanentes de vacunación con BCG, o infección con *M. bovis*, se hizo una PCR al ADN de todos los órganos con resultado positivo para IS6110, utilizando oligos específicos para *M. bovis*. Todas las muestras analizadas en este ensayo tuvieron un resultado negativo (Figura 14).

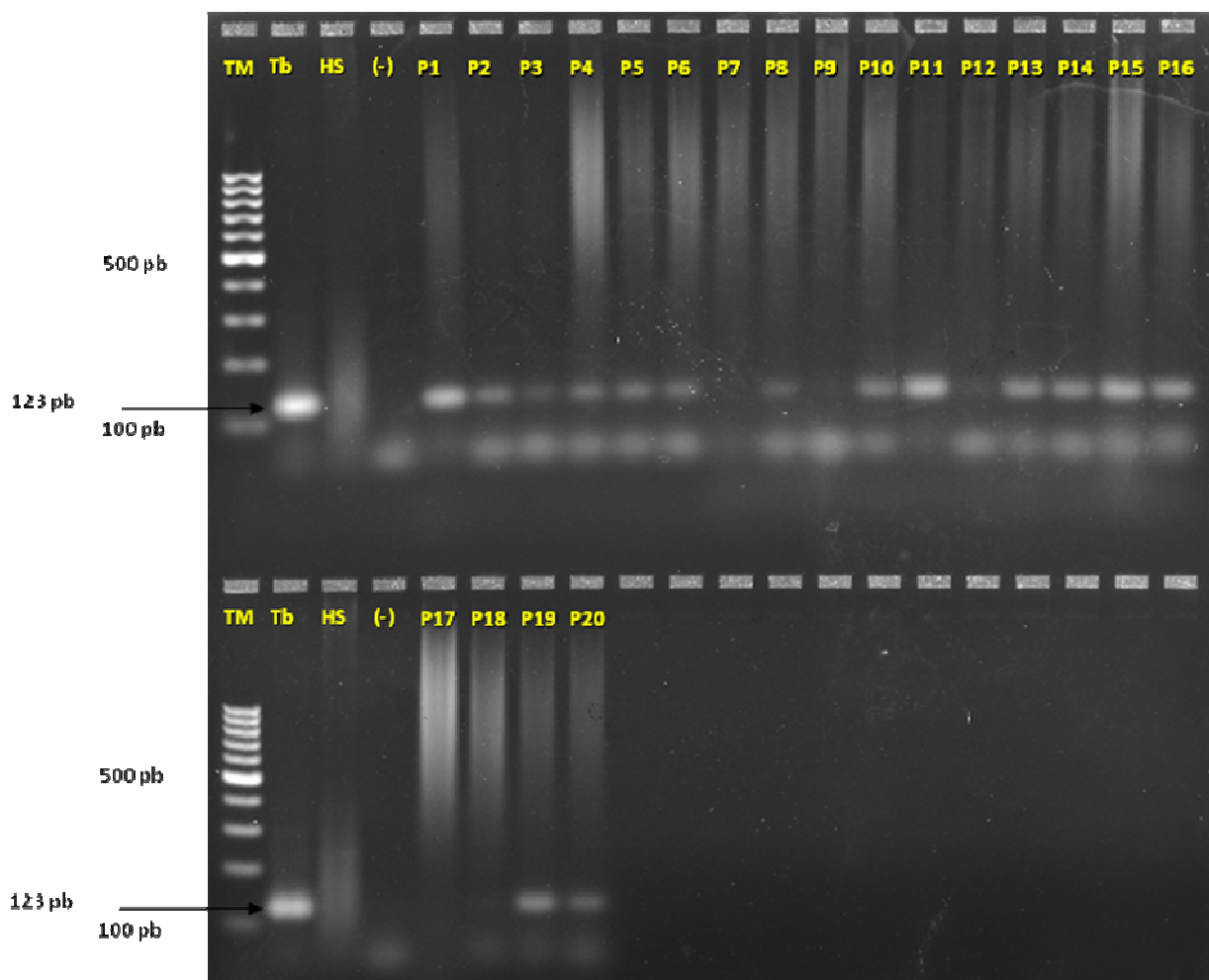


Figura 8.- Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se muestra la detección de ADN micobacteriano a través de la amplificación de la secuencia de inserción IS6110 en 20 muestras (P1-20) de tejido pulmonar. Los tejidos de pulmón utilizados son la mezcla de 2 regiones ápice y base. La flecha señala la banda esperada en la amplificación. Carril 1: TM (Marcador de Tamaño Molecular), Carril 2: ADN de *Mycobacterium tuberculosis* 100 ng, Carril 3: ADN de HS (*Homo sapiens*) 100 ng, Carril 4: Control negativo. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

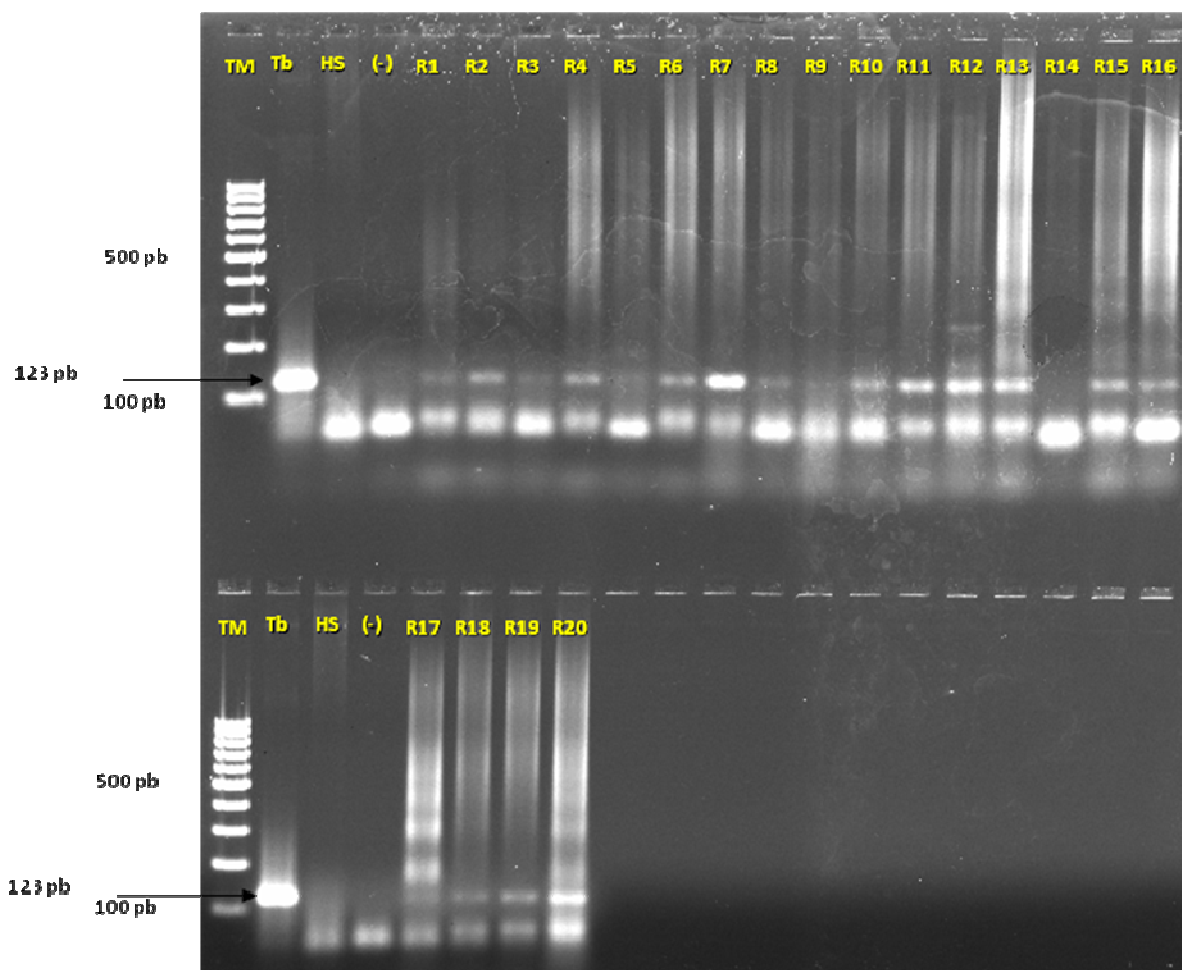


Figura 9.- Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se muestra la detección de ADN micobacteriano a través de la amplificación de la secuencia de inserción IS6110 en 20 muestras (R1-20) de tejido renal. La flecha señala la banda esperada en la amplificación. Carril 1: TM (Marcador de Tamaño Molecular), Carril 2: ADN de *Mycobacterium tuberculosis* 100 ng, Carril 3: ADN de HS (*Homo sapiens*) 100 ng, Carril 4: Control negativo. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

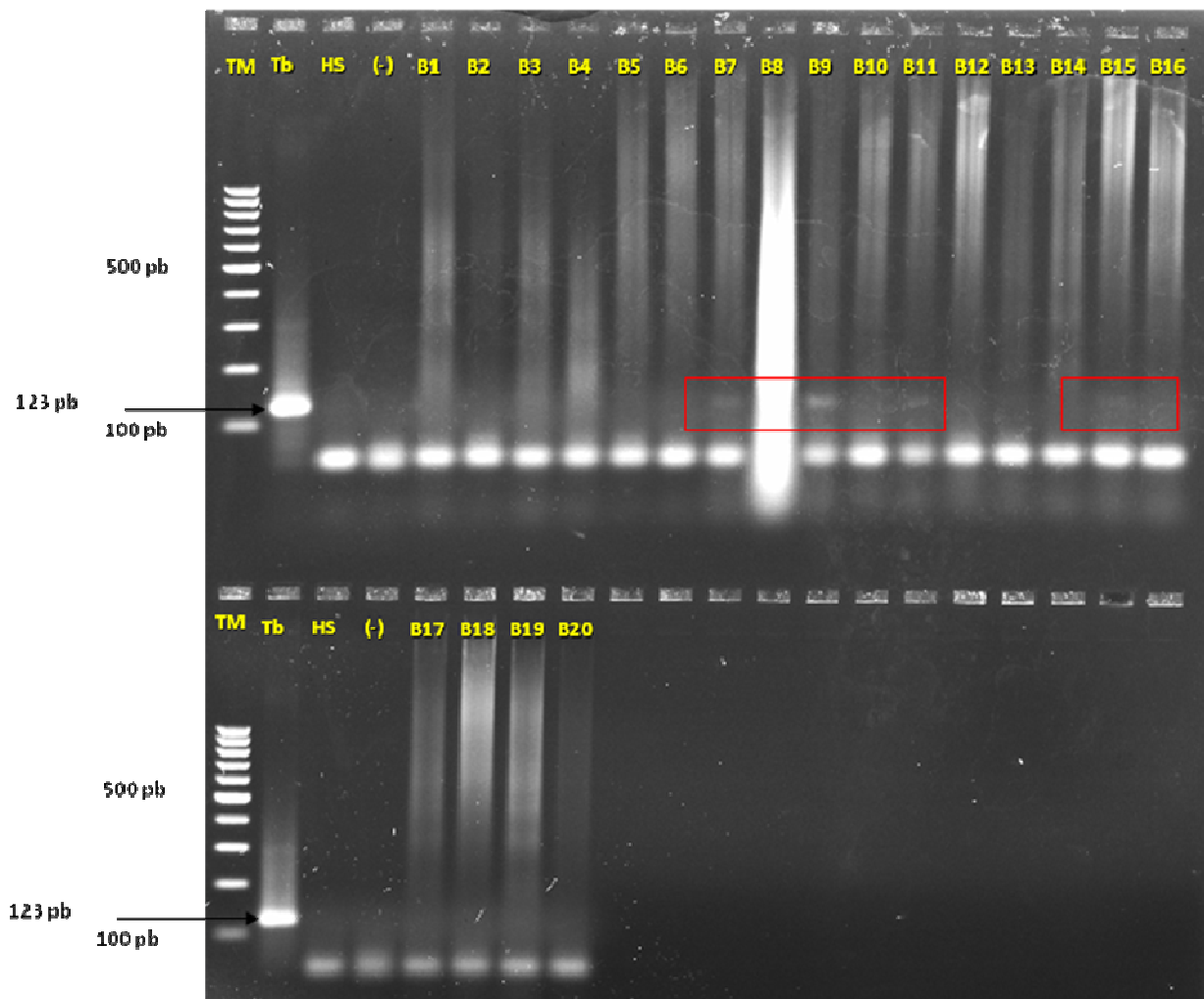


Figura 10.- Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se muestra la detección de ADN micobacteriano a través de la amplificación de la secuencia de inserción IS6110 en 20 muestras (B1-20) de tejido esplénico. Carril 1: TM (Marcador de Tamaño Molecular), Carril 2: ADN de *M. tb* 100 ng, Carril 3: ADN de HS (*Homo sapiens*) 100 ng, Carril 4: Control negativo. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

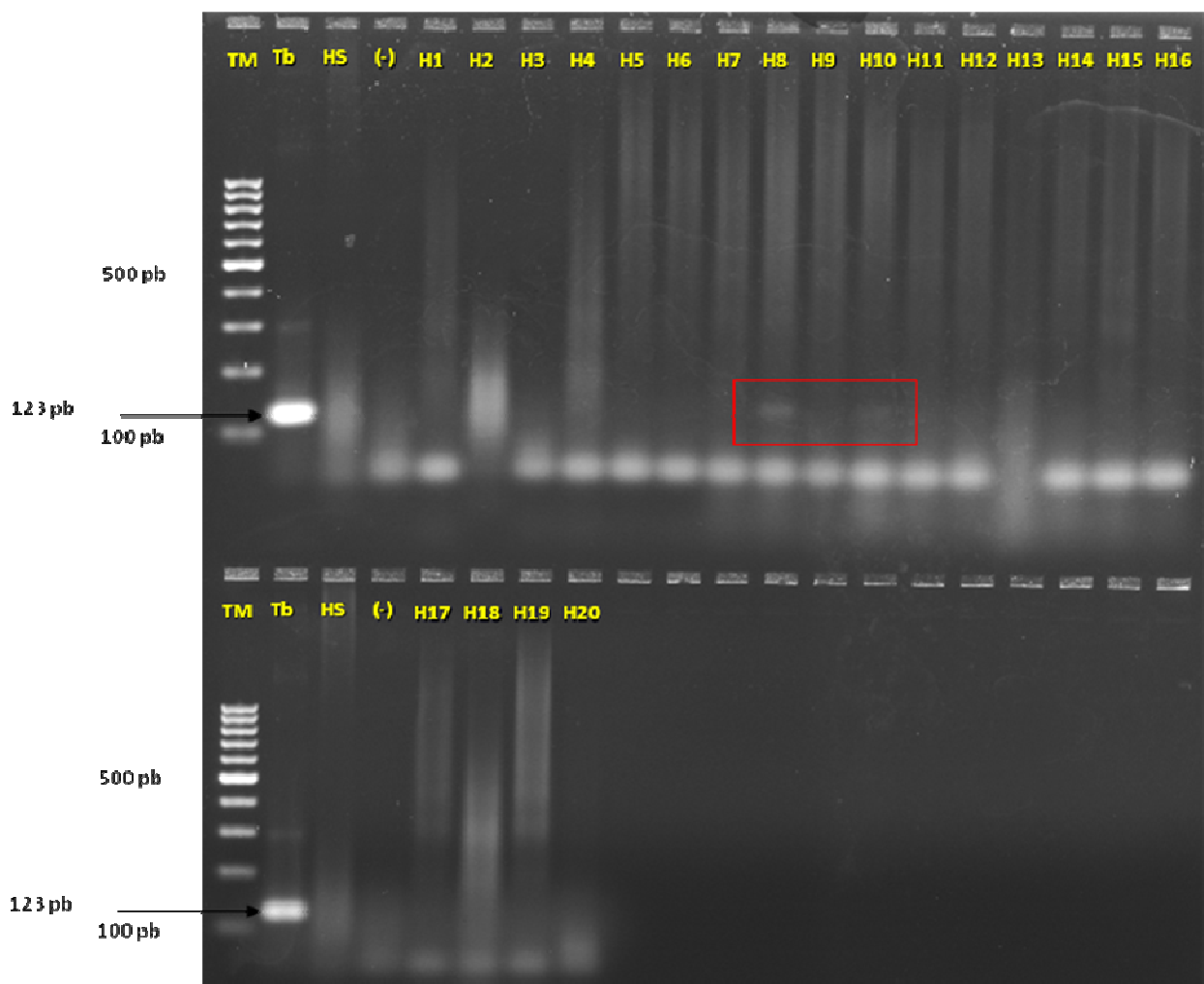


Figura 11.- Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se muestra la detección de ADN micobacteriano a través de la amplificación de la secuencia de inserción IS6110 en 20 muestras (H1-20) de tejido hepático. Carril 1: TM (Marcador de Tamaño Molecular), Carril 2: ADN de *M. tb* 100 ng, Carril 3: ADN de HS (*Homo sapiens*) 100 ng, Carril 4: Control negativo. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

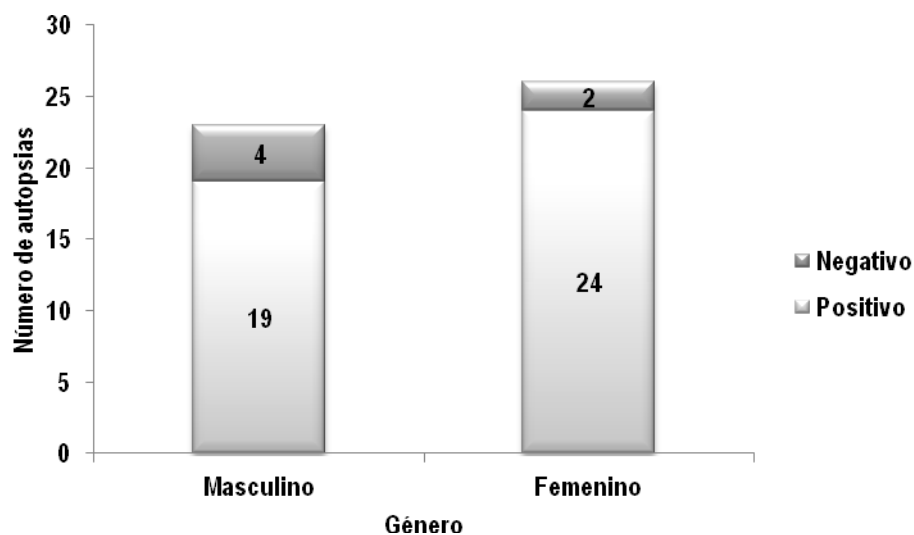


Figura 12.- Detección de ADN micobacteriano en relación al género. Número de autopsias positivas y negativas a la detección de ADN micobacteriano por PCR convencional, en relación al género de los individuos estudiados.

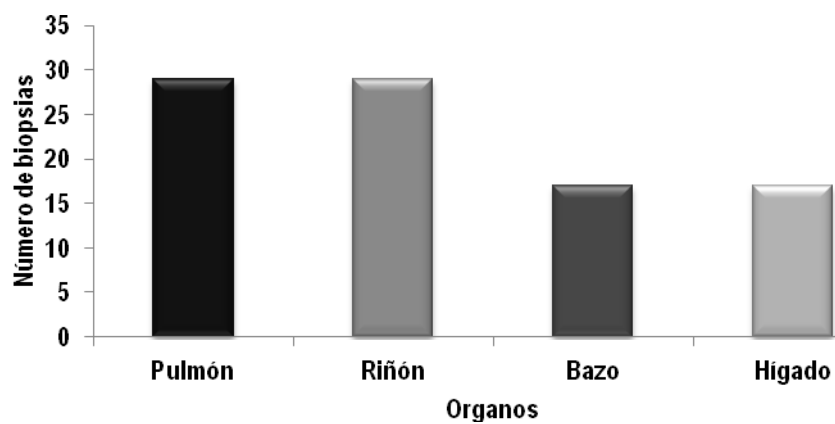


Figura 13.- Tejido pulmonar y extrapulmonar con positividad para ADN micobacteriano. Relación de tejido pulmonar y extrapulmonar con positividad para la detección de ADN micobacteriano por PCR convencional.

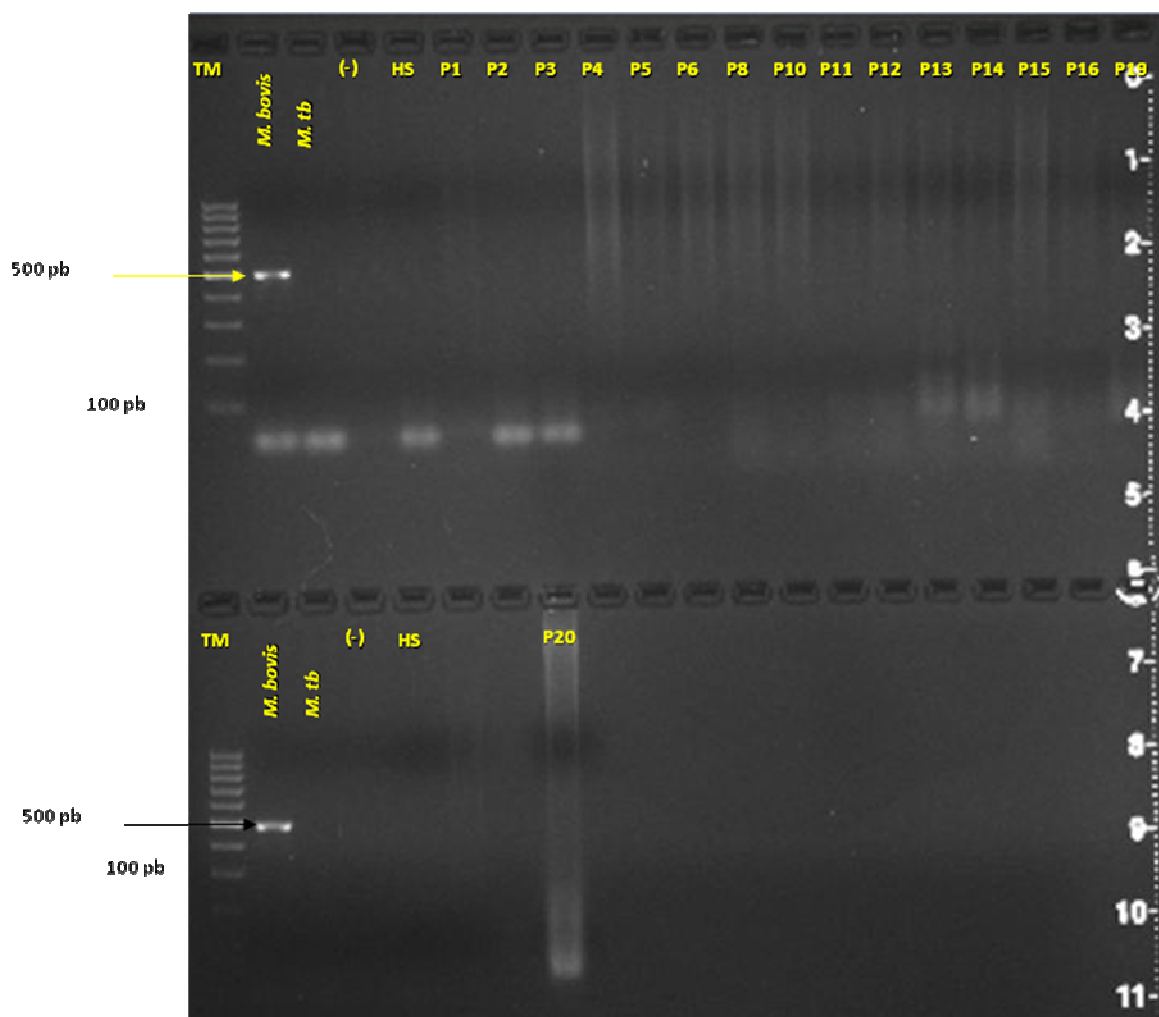


Figura 14.- PCR para descartar la presencia de *Mycobacterium bovis* o *M. bovis* BCG. Electroforesis en gel de agarosa al 2% representativa de los ensayos de PCR para descartar la presencia de ADN de *M. bovis* en los tejidos que dieron positividad a la secuencia de inserción IS6110. P: Pulmón El número corresponde al número de autopsia, según el registro llevado por los autores. Carril 1: TM (Marcador de Tamaño Molecular), Carril 2: ADN de *M. bovis* 100 ng, Carril 3: ADN de *Mycobacterium tuberculosis* 100 ng, Carril 4: ADN de HS (*Homo sapiens*) 100 ng, Carril 4: Control negativo. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

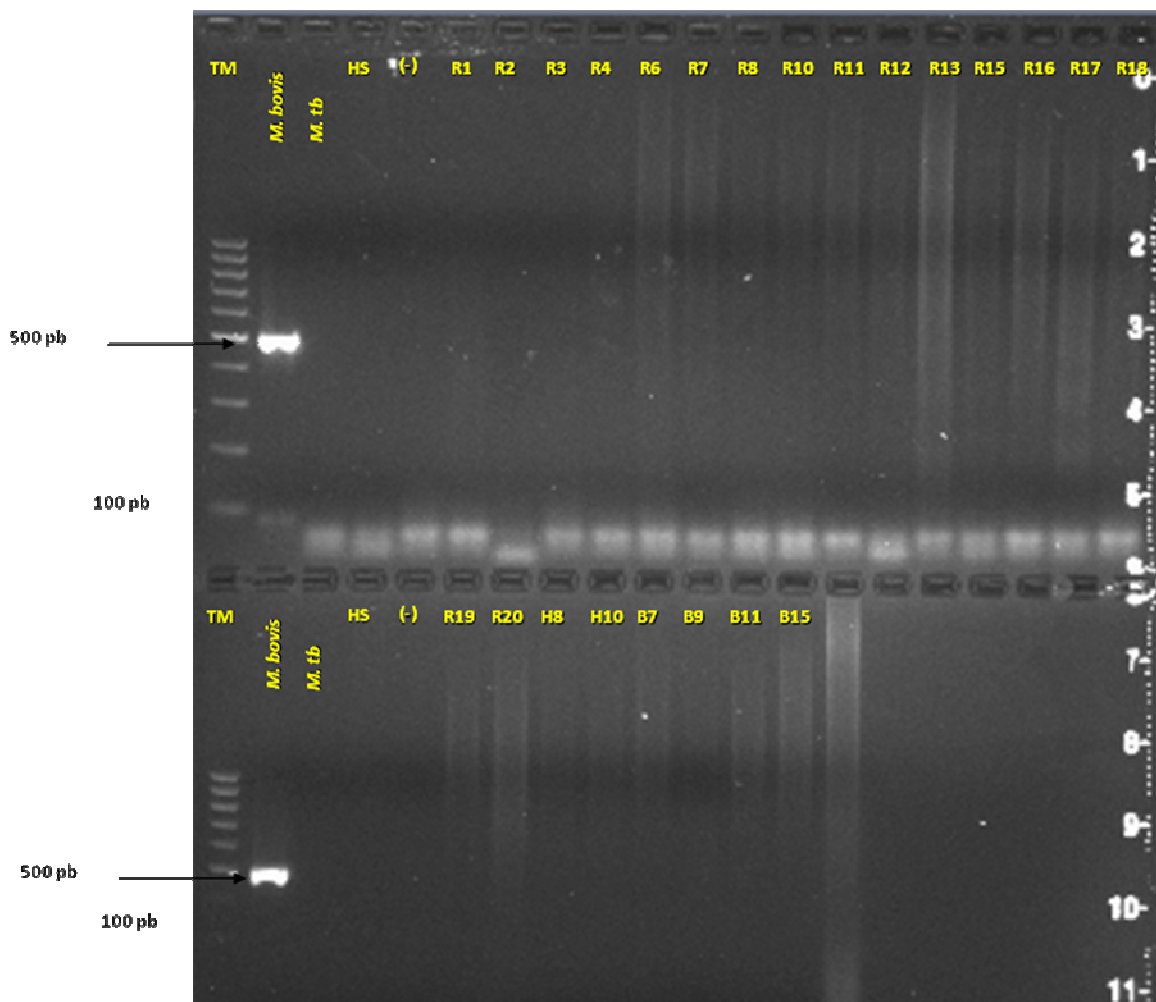


Figura 15.- PCR para descartar la presencia de *Mycobacterium bovis* o *M. bovis* BCG. Electroforesis en gel de agarosa al 2% representativa de los ensayos de PCR para descartar la presencia de ADN de *M. bovis* en los tejidos que dieron positividad a la secuencia de inserción IS6110. R: Riñón, H: Hígado, B: Bazo. El número corresponde al número de autopsia, según el registro llevado por los autores. Carril 1: TM (Marcador de Tamaño Molecular), Carril 2: ADN de *M. bovis* 100 ng, Carril 3: ADN de *M. tb* 100 ng, Carril 4: ADN de HS (*Homo sapiens*) 100 ng, Carril 4: Control negativo. Imagen representativa de dos experimentos independientes.

Detección de ADN de Mycobacterium tuberculosis en tejido pulmonar y extrapulmonar por PCR in-situ

Por *PCR in-situ* se detectó la presencia de ADN micobacteriano en pulmón y tejido extrapulmonar en 14 de los 49 casos analizados. Los órganos infectados con mayor frecuencia fueron, además del pulmón: riñón, bazo e hígado (Figura 16). Con esta metodología se identificaron los tipos celulares en los cuales se detectó la presencia de ADN de *M. tuberculosis*, lo que sugiere infección latente en los órganos analizados. En pulmón se observó infección en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, los neumocitos tipo II y los macrófagos alveolares, lo que coincide con lo publicado previamente por Hernández-Pando y cols. [15]. En el riñón las células infectadas fueron las células parietales de la cápsula de Bowman, así como los túbulos proximales y las células epiteliales. En bazo, los bacilos se encontraron en macrófagos y las células endoteliales, mientras que en hígado se albergaron en hepatocitos y células de Kupffer de los sinusoides hepáticos (Figura 17).

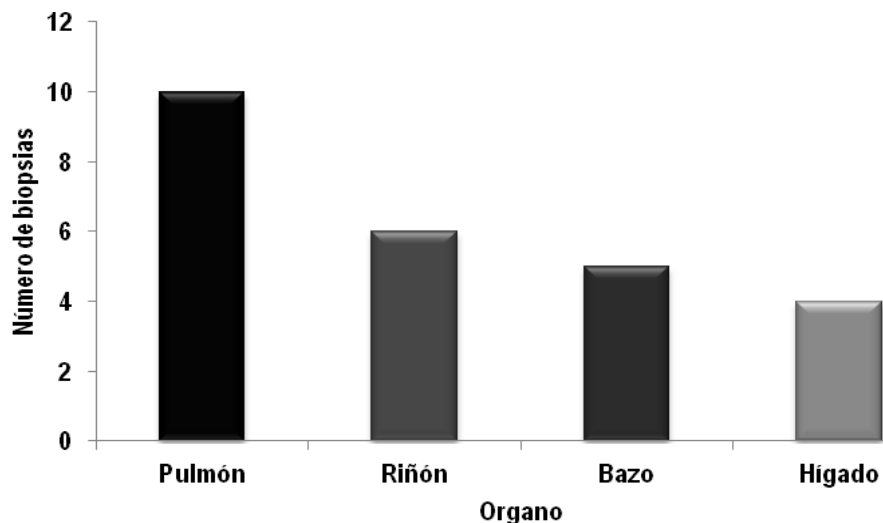


Figura 16.- Relación de tejidos pulmonares y extrapulmonares con positividad por *PCR in situ* para la detección de ADN micobacteriano.

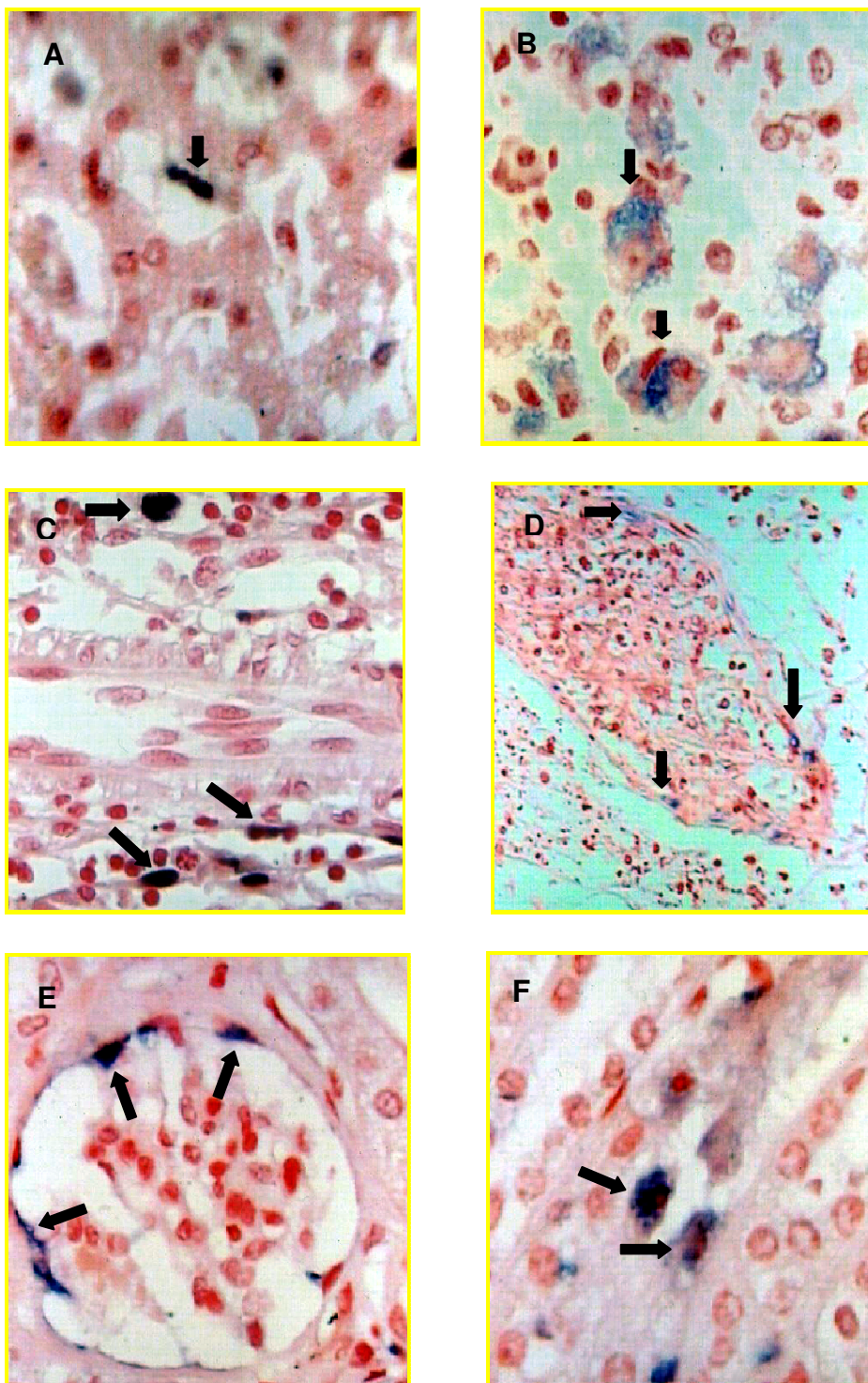


Figura 17.- PCR in-situ que señala con flechas la presencia de ADN micobacteriano en Hígado (A) en las células endoteliales y sinusoides hepáticos, (B) en células de Kupffer. En Bazo (C) en macrófagos y (D) células endoteliales. En Riñón (E) en las células endoteliales de la cápsula de Bowman y (F) en los túbulos contorneados proximales.

Detección de ADN de Mycobacterium tuberculosis por hibridación

Todas las muestras con resultados negativos o con una amplificación dudosa para la secuencia de inserción IS6110 fueron sometidos a un segundo análisis, en el cual el producto de PCR analizado se desnaturalizó por calor y se adhirió a una membrana de nylon cargada positivamente, posteriormente se hibridó con una sonda específica para la secuencia de inserción IS6110 marcada con biotina en el extremo 5'. La especificidad de la sonda obtenida se corroboró contra un Ab marcado con biotina de concentración conocida, y se hicieron varias diluciones para poder conocer el límite de detección de nuestra sonda. Posteriormente se tituló utilizando diluciones seriadas para poder establecer la concentración a la que se trabajara con la sonda, estableciendo que para nuestro experimento se utilizaría a una dilución 1:1500. Por último se verificó que la sonda no tenía un reconocimiento cruzado con otros ADN's, principalmente de humano ya que el ADN micobacteriano buscado en estos ensayos fue extraído de necropsias (Figuras 17 y 18). En todas las muestras que se analizaron por este método se confirmó su positividad o negatividad, pero 34 muestras que se consideraban negativas por PCR resultaron positivas por hibridación; los tejidos fueron: 3 tejidos pulmonares, 13 tejidos hepáticos, 16 tejidos de bazo y 2 de riñón (Figura 19).

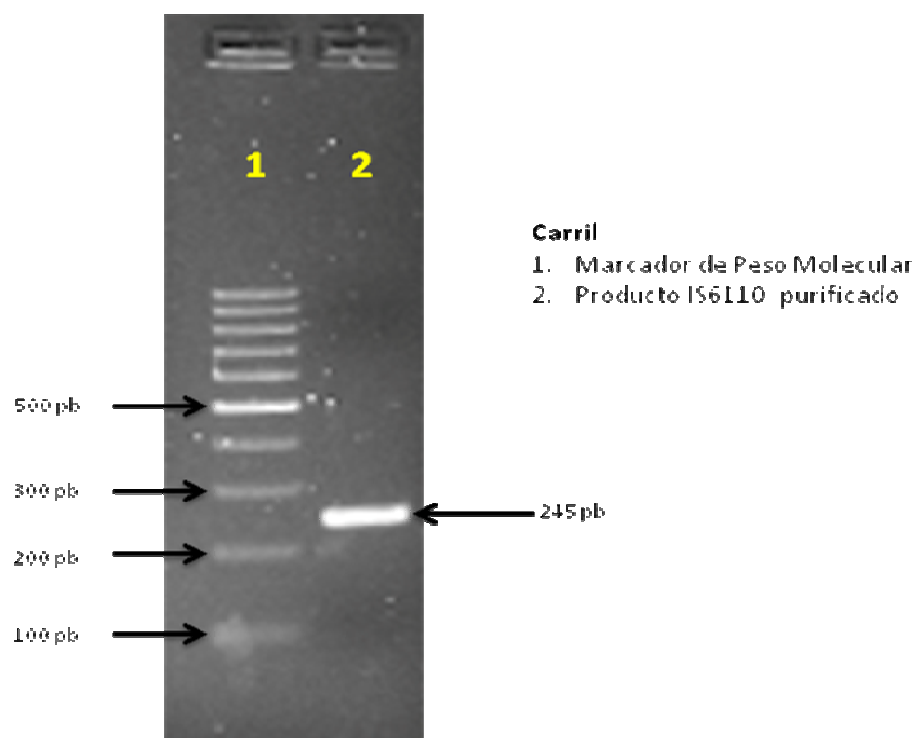


Figura 18.- Electroforesis en gel de agarosa al 2% para corroborar el tamaño molecular de la sonda biotinilada purificada.

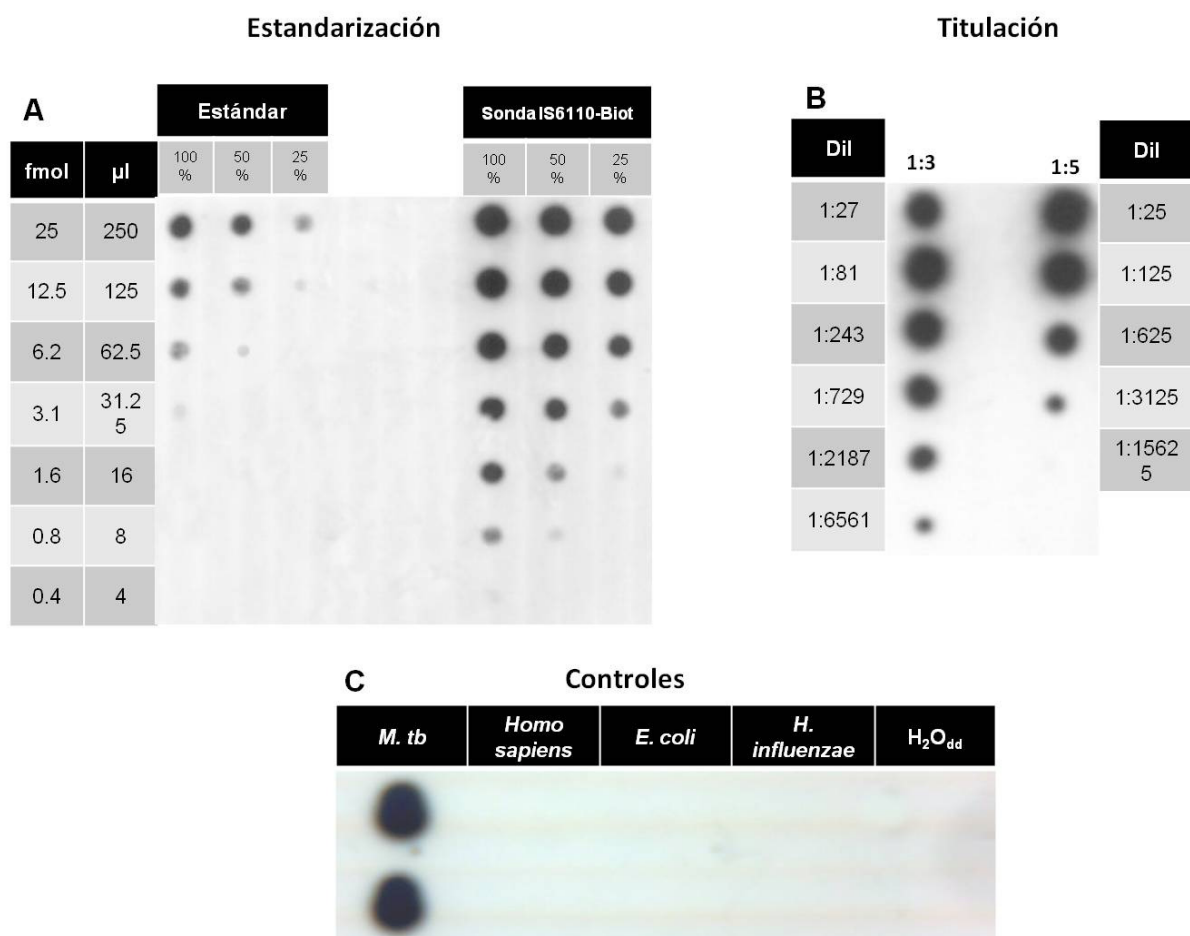


Figura 19.- Estrategia de estandarización y titulación de la sonda biotinilada, A) Estandarización de la sonda obtenida contra un Ab biotinilado de concentración conocida, para determinar el límite de detección, B) ensayo de titulación utilizando diluciones seriadas para poder establecer la concentración de trabajo, C) evaluación de la especificidad de la sonda contra otros ADN's.

Resultados de Hibridación de Autopsias

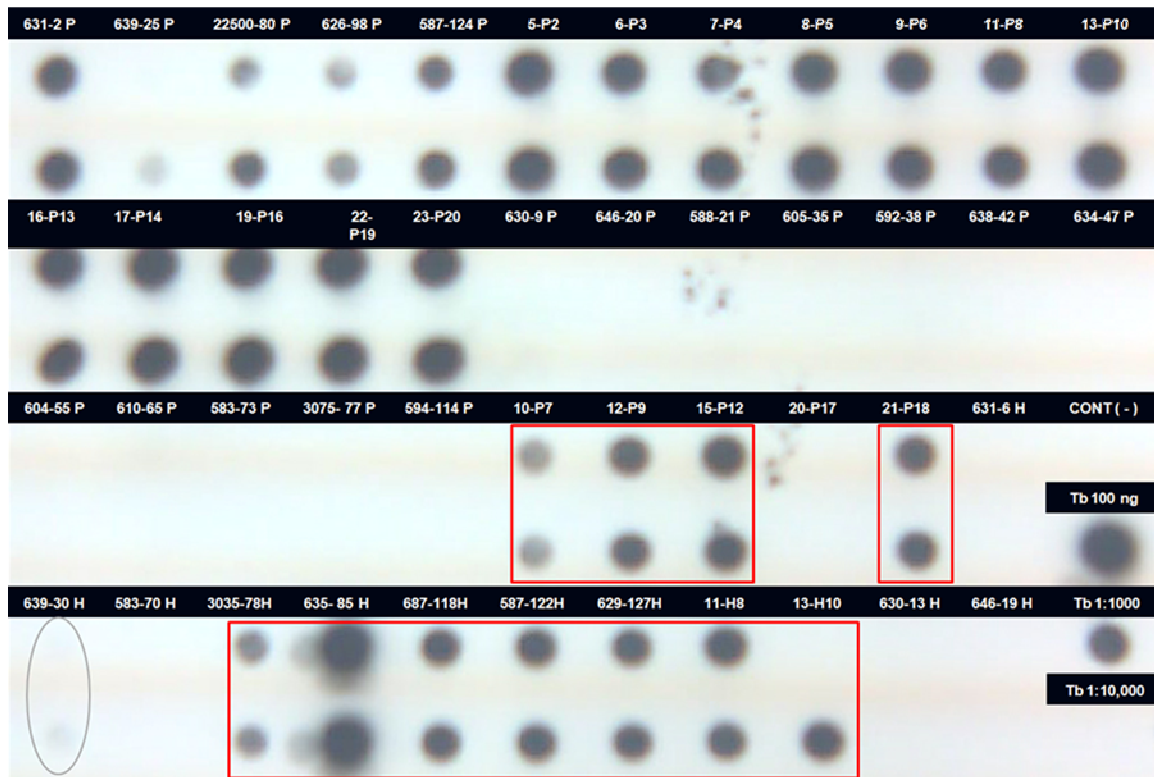


Figura 20.- Placa de hibridación de productos de PCR de muestras de autopsias PCR negativas. Esta fotografía nos muestra la positividad en algunos tejidos que, por PCR convencional no fue claro. Las muestras ubicadas dentro de los cuadros rojos tenían resultado negativo por PCR, la muestra ubicada dentro del óvalo nos muestra la sensibilidad que puede tener este método ya que dicha muestra fue negativa en todos los estudios previos realizados.

Espoligotipos

Todas las autopsias con un resultado positivo para la detección de ADN micobacteriano fueron sometidas a espoligotipificación. En 43 de las 49 necropsias analizadas se obtuvo su espoligotipo (en 54 tejidos, pertenecientes a 30 sujetos), de los cuales 42 genotipos fueron únicos, 8 que ya habían sido reportados en la base de datos SPOLDB4.0 (www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html). En el resto de los sujetos no se pudo detectar ningún patrón de espoligotipo a pesar de que al menos un tejido fue positivo para IS6110. El genotipo identificado con mayor frecuencia corresponde al Shared International Type (SIT) 53 (detectado en 7 muestras de 6 sujetos). Este perfil ha sido reportado 2380 veces en la base de datos SITVIT (54 de ellas en México). Otros perfiles encontrados fueron el SIT 523 (en 3 muestras), SIT 291 (2 muestras) y SIT's 245, 521, 1166, 1196 y 1690, cada uno detectado una vez. Con la excepción del SIT 53, ninguno de los otros perfiles encontrados ha sido previamente reportado en México. También encontramos 34 genotipos "huérfanos" cuyos códigos no tienen registro en la base de datos, en diferentes órganos. En 15/30 sujetos, se identificó un genotipo; en 9/30 sujetos se identificó la presencia de 2 genotipos y en 6/30 sujetos se logró identificar la presencia de 3 o más genotipos (Cuadro 3).

*Detección de transcritos de *acr* e *icl* por PCR en tiempo real*

Para confirmar la viabilidad de la micobacteria, se seleccionaron 10 muestras de tejido (4 pulmones, 4 riñones y 2 bazos de 8 sujetos) con una elevada positividad a la detección de IS6110 por PCR convencional, debido a que consideramos que estas muestras contenían un mayor número de bacilos y, por lo tanto, eran las más adecuadas para buscar ARN micobacteriano. Como control positivo se utilizó el bazo de un ratón infectado en fase crónica. Se eligió el ARNr 16S como un marcador de viabilidad debido a que este gen es expresado en todas las etapas del crecimiento bacteriano [62]; se buscó α -cristalina (*acr*) porque la expresión de este gen sugiere que los bacilos, se encuentran en condiciones que los obligaron a regular positivamente este gen, el cual se ha encontrado relacionado con el adelgazamiento de la pared de la micobacteria en condiciones estresantes como las que induce la respuesta inmunológica del hospedero. Por otro lado usamos isocitrato liasa (*icl*) como marcador para latencia, debido a que se ha reportado que *M. tuberculosis* utiliza esta enzima en el metabolismo de los ácidos grasos durante los periodos de estrés [62] o en modelos que emulan las condiciones de latencia [6]. Detectar la expresión de este gen sugiere que los bacilos se encuentran en condiciones de falta de nutrientes. Diversos estudios bioquímicos sugieren que en tejidos de crónicamente infectados, los ácidos grasos pueden funcionar como la principal fuente de carbono y este gen es clave para poder utilizar estas fuentes de energía [62].

En las 10 muestras analizadas se logró detectar el ARNr 16S (Figura 20), lo que nos indica que los bacilos estaban vivos al momento en que se tomaron las muestras, sin

embargo no nos es posible definir si los bacilos se encontraban en fase de latencia o bajo condiciones estresantes. Debido a ello se buscarón los transcritos de *acr* e *icl*. El transcrito de *icl* fue detectado en 4 riñones, 3 pulmones y 1 bazo. En 4 de estas muestras también se observó la expresión de *acr* (2 riñones, 1 pulmón y 1 bazo). La expresión de *acr* en todos los casos fue más alta que la de *icl* (Figura 21 y 22).

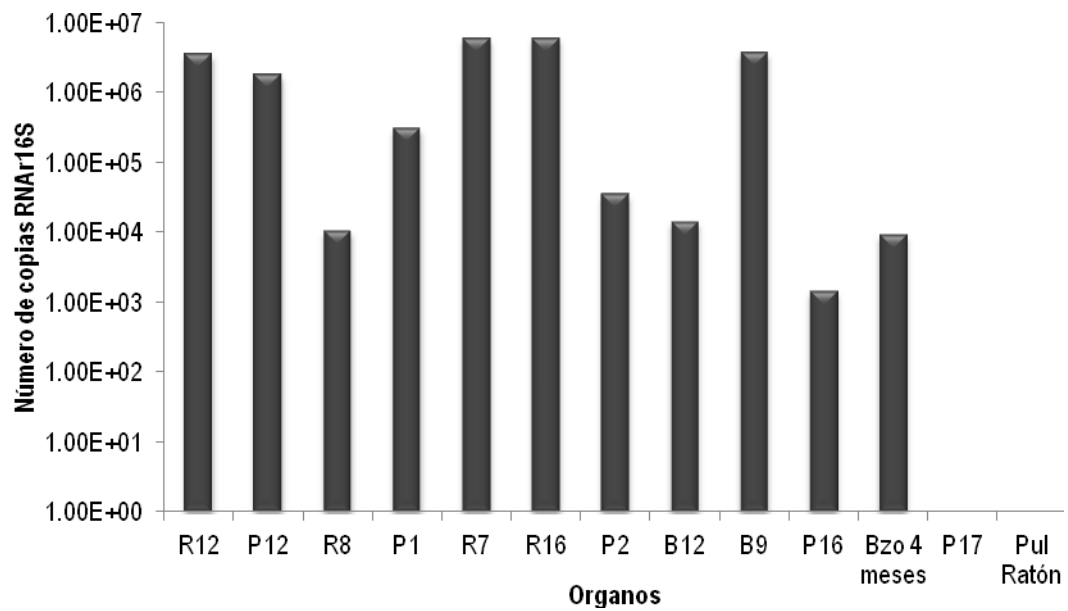


Figura 21.- Expresión de ARNr 16S en necropsias de sujetos que murieron por causas ajenas a TB. Número de copias de ARNr 16S micobacteriano, detectadas por PCR en tiempo real en los tejidos de autopsia seleccionados por su positividad a la secuencia de inserción IS6110. R= Riñón, P= Pulmón, B= Bazo, Pul= Pulmón de ratón.

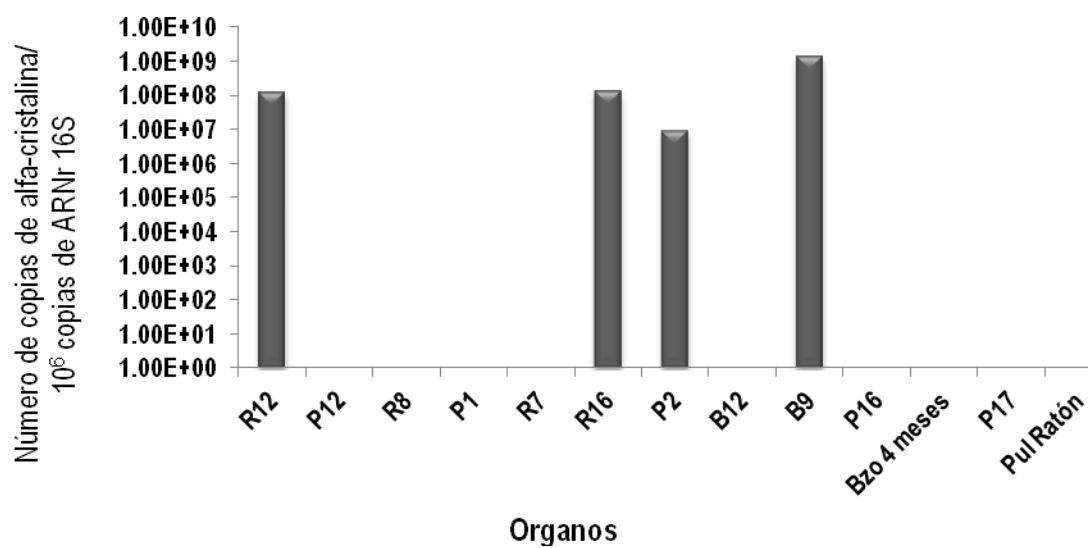


Figura 22.- Expresión de alfa-cristalina en necropsias de sujetos que murieron por causas ajenas a TB. Número de copias de α -cristalina, detectadas por PCR en tiempo real, en los tejidos de autopsias seleccionadas por su positividad a la secuencia IS6110. R= Riñón, P= Pulmón, B= Bazo, Pul= Pulmón de ratón.

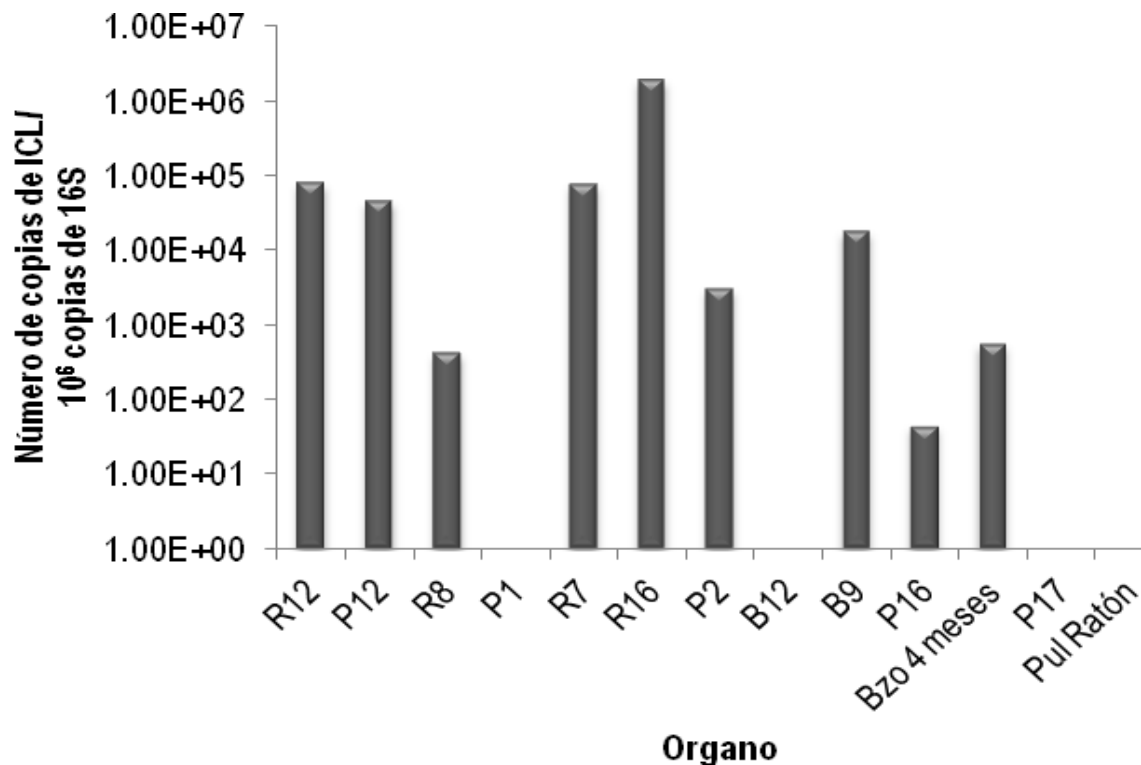


Figura 23.- Expresión de isocitratoliasa en necropsias de sujetos que murieron por causas ajenas a la TB. Número de copias de *icl*, detectadas por PCR en tiempo real, en los tejidos de autopsias seleccionadas por su positividad a la secuencia IS6110. R= Riñón, P= Pulmón, B= Bazo, Pul= Pulmón de ratón.

En diversos trabajos se ha reportado la expresión de *acr* después de la exposición de las micobacterias a óxido nítrico (ON), situación que emula el microambiente generado en el fago-lisosoma cuando éste es activado por la respuesta inmune del hospedero [96], por lo que la elevada cantidad de copias encontradas en este ensayo nos sugiere que esos bacilos se encontraban en condiciones de estrés al momento en que se colectaron las muestras.

Modelo murino

Para determinar si *M. tuberculosis* se aloja naturalmente en tejidos extrapulmonares, evaluamos la carga bacilar en hígado, bazo y riñón a los días 30, 90, 150 y 210 después de la infección en un modelo murino de latencia. Los resultados mostraron cuentas de UFC's bajas y estables únicamente en hígado y bazo, mientras que por tinción de Ziehl-Neelsen observamos la presencia de bacilos en secciones de tejido de hígado y bazo, específicamente en macrófagos, hepatocitos y células endoteliales de tejido aparentemente normal. La PCR *in-situ* mostró positividad en las mismas células que en los tejidos humanos (Figura 23).

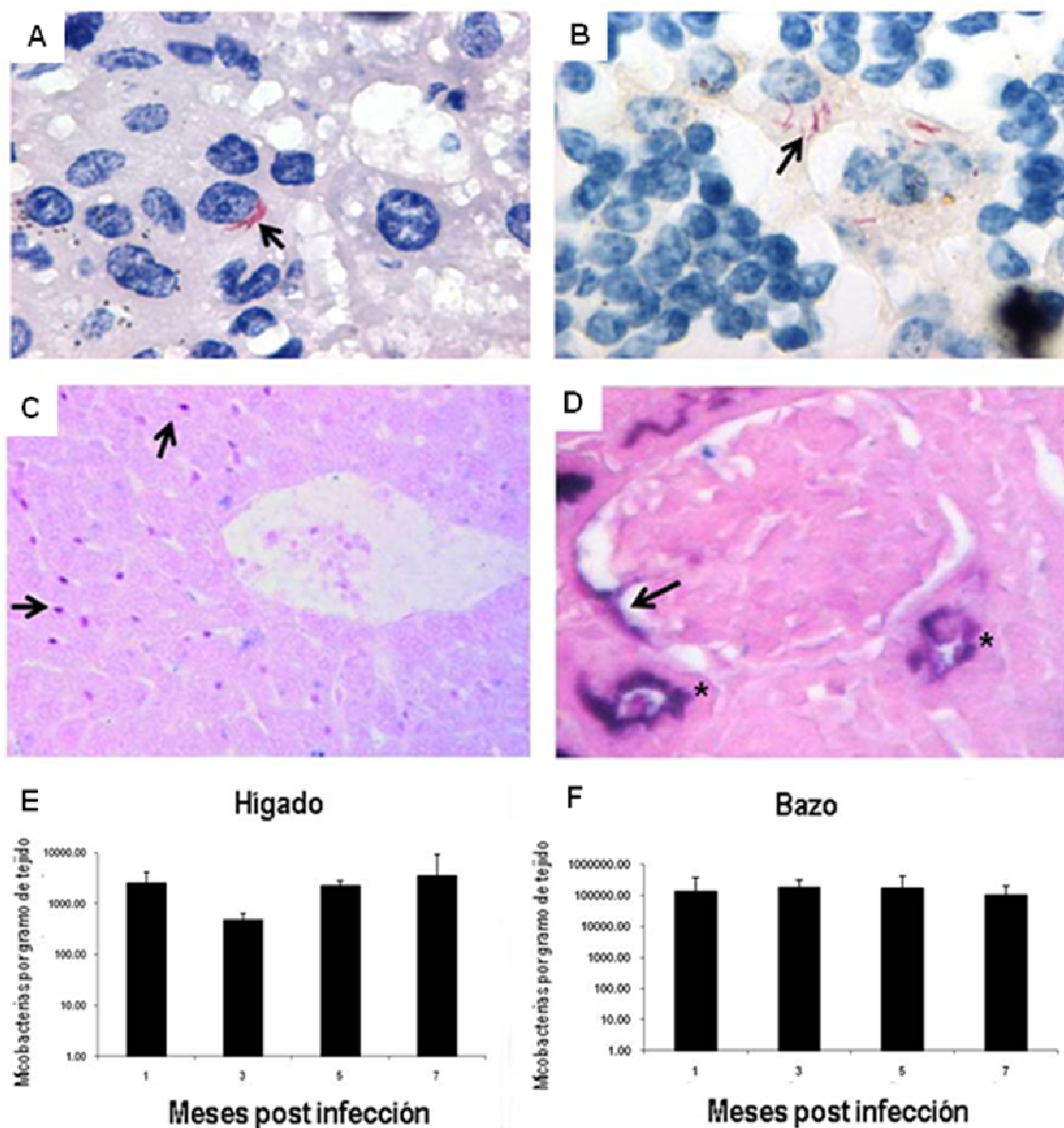


Figura 24.- Localización extrapulmonar de *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo de latencia. Las microfotografías son representativas de tinción ZN y detección de la secuencia IS6110 por PCR *in-situ* en órganos de ratones después de 5 meses de infección con *M. tuberculosis*. (A) Bacilo ácido alcohol resistente en el citoplasma de un hepatocito (flecha). (B) Bacilo ZN positivo en macrófagos de la pulpa roja del bazo (flecha). (C) Microfotografía de baja resolución del hígado mostrando numerosas células de Kupffer y células endoteliales positivas a la secuencia de inserción IS6110 (flechas), (D) Intensa positividad de IS6110 en células parietales de la capsula de Bowman (flecha) y epitelio de los túbulos contorneados proximales (asteriscos). Determinación de carga bacilar extrapulmonar (E) Unidades Formadoras de Colonias por gramo de tejido en hígado y bazo (F) a diferentes puntos de tiempo durante la infección. Las barras representan la media y las desviaciones estándar de 5 ratones por punto de tiempo.

Discusión

La TBL ocurre como consecuencia de la respuesta inmunológica que se genera durante la primoinfección para contener la infección, en la que el bacilo adopta un estado quiescente, sin embargo, con la evidencia existente de que las micobacterias pueden alojarse en células no fagocíticas en diversos tejidos, no se puede descartar la posibilidad de que las micobacterias infecten estas células durante la primoinfección y se mantengan en ellas en estado latente. Es importante considerar que las personas inmunocompetentes pueden prevenir la reactivación de la TBL y no transmiten la enfermedad, pero conllevan un riesgo de reactivación del 5-10% [97] lo cual es relevante, si se considera que un individuo que ha reactivado la enfermedad puede transmitirla y contagiar a otras personas [27].

La condición de latencia sigue siendo un problema para el control de la TB a nivel mundial, ya que el bacilo puede persistir en los tejidos de un sujeto clínicamente sano, sin despertar la respuesta inmunológica del hospedero, y en un nicho que además le puede servir como una barrera muy efectiva contra la acción bactericida de los fármacos, ya que algunos de éstos como la isoniazida no alcanzan las concentraciones adecuadas en ambientes hidrofóbicos tales como los adipocitos [16]. En el 50-80% de las personas con infección latente que no reciben tratamiento, el evento de reactivación puede ocurrir en algún momento en los 2 años siguientes a la infección [36].

Estudios previos han demostrado la presencia de ADN micobacteriano en tejido pulmonar macroscópicamente normal [27] y en el tejido adiposo que rodea a los nódulos linfáticos de sujetos que murieron por causas ajenas a la TB [16]. Lo anterior concuerda con diversos reportes de detección de ADN de *M. tuberculosis* en muestras de tejido extrapulmonar de pacientes teóricamente sin enfermedad, de diferentes zonas geográficas [98-101].

Nuestro trabajo muestra avances sustanciales en cuanto a los nichos celulares que puede alcanzar el bacilo tuberculoso, no sólo en el pulmón, por ser el órgano blanco, sino también en los diferentes órganos del cuerpo donde este patógeno puede permanecer por años e incluso décadas (Figura 24).

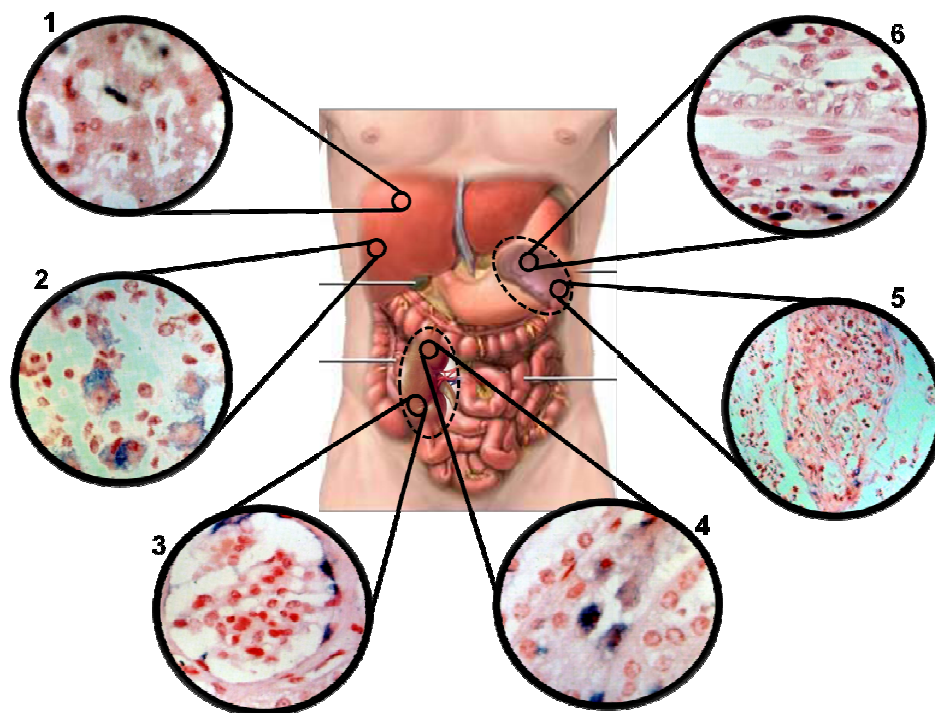


Figura 25.- Imagen que esquematiza la detección de la secuencias de inserción IS6110 por PCR *in situ* en los tejidos analizados en este trabajo. 1.- Células endoteliales, sinusoides hepáticos (Hígado), 2.- Células de Kupffer (Hígado), 3.- Células endoteliales de la capsula de Bowman (Riñón), 4.- Túbulos proximales (Riñón), 5.- Células endoteliales (Bazo) y 6.- Macrófagos (Bazo).

Estos hallazgos demuestran la necesidad de desarrollar alternativas terapéuticas más eficientes que garanticen la eliminación de los bacilos en todos los tejidos que puede colonizar la micobacteria. Comparativamente a lo reportado en estudios previos [15] nosotros encontramos un elevado porcentaje de positividad tanto en tejido pulmonar, como en tejido extrapulmonar. Esta diferencia puede ser explicada por la sensibilidad de las técnicas empleadas, dado que casi el 50% de las muestras resultaron negativas o débilmente positivas por PCR convencional y gracias a la hibridación del ADN muchas se diagnosticaron positivas. Este procedimiento incrementó enormemente la detección de ADN micobacteriano tanto en tejido pulmonar como extrapulmonar en un 84% de los casos estudiados, y exclusivamente en los sitios extrapulmonares en un 14%. Como se esperaba, el órgano con mayor número de casos positivos fue el pulmón (72%), seguido de bazo (70%), riñón (68%) e hígado (66%).

Dichos órganos tienen una elevada circulación sanguínea que facilita la infección, lo cual coincide con los estudios de PCR *in situ* en las que encontraron ADN micobacteriano en células de Kupffer y macrófagos de la pulpa roja del bazo. Posiblemente, *M. tuberculosis* es fagocitado durante la diseminación hematógica por células del sistema fagocítico mononuclear, así como por células fagocíticas no profesionales tales como células endoteliales, en las que frecuentemente se detectó la presencia de ADN. Las células endoteliales son fácilmente infectadas por *M. tuberculosis in vitro*, y un estudio reciente de microarreglos muestra una extensa regulación negativa de diversos genes relacionados con síntesis de proteínas,

metabolismo energético y otras vías metabólicas, lo cual sugiere un estado de latencia por parte del bacilo, o al menos una actividad significativamente reducida [102].

En las muestras de tejido renal también se encontró un elevado porcentaje de positividad (68%). El estudio de PCR *in situ* mostró positividad en células epiteliales, siendo las células parietales de la capsula de Bowman las más frecuentemente infectadas, seguidas por las células endoteliales de los túbulos renales proximales. Estos resultados sugieren que por su tamaño, la micobacteria puede pasar a través de las paredes capilares e infectar las células epiteliales del glomérulo y túbulos proximales ya que el glomérulo renal filtra un gran volumen de sangre por lo que la célula parietal de la cápsula de Bowman está expuesta al filtrado glomerular. Interesantemente, no había presencia de anomalías histológicas en ninguno de esos tejidos extrapulmonares, como se había reportado previamente en el pulmón [15]. Considerando que todas las estirpes celulares positivas están expuestas a la circulación sanguínea, la hipoxia no debe ser un factor significativo en la inducción del estado quiescente en la micobacteria. Por otro lado, el óxido nítrico (ON) podría participar en la inducción de la latencia en esas células, ya que es producido por células endoteliales y macrófagos, y el tratamiento con fármacos bloqueadores del ON en modelos animales provoca la reactivación de *M. tuberculosis* [103].

El uso de métodos de genotipificación basados en PCR, como el espoligotipo, ha demostrado la presencia de múltiples cepas en un solo paciente en diversas áreas geográficas, tanto en pacientes VIH positivos como negativos [104-106]. Este método

es muy efectivo ya que amplifica una región polimórfica presente en un locus cromosomal particular del genoma del bacilo que solo se encuentra en el complejo *M. tuberculosis*. Esos estudios se han realizado en pacientes con enfermedad activa y generalmente a partir de aislados clínicos. En este trabajo encontramos 42 genotipos diferentes en 30 individuos. Esta amplia variabilidad sugiere infección esporádica crónica, ya que ninguno de los sujetos tenía indicios de enfermedad activa. Algo notorio fue el hecho de que el 50% de los individuos estudiados mostraron solamente un genotipo, mientras el otro 50% mostró 2 o 3 genotipos. Al parecer estas multi-infecciones son una condición común en la infección latente. Ninguna muestra fue positiva para *M. bovis*, lo cual es importante considerando las campañas masivas de vacunación con BCG, práctica prevalente en México, ya que se ha notificado de forma repetida que la TB en seres humanos por *M. bovis* en países en desarrollo es relevante, no obstante, dichas cifras rara vez están sustentadas. Estudios realizados en la frontera sur de Estados Unidos de América señalan que casi el 70% de los casos producidos por *M. bovis* se presentaron en migrantes mexicanos [107].

Como la detección de ADN micobacteriano no es indicativo de que los bacilos estén vivos, diversos estudios se han enfocado al entendimiento de las señales de *quórum sensing* usadas por *M. tuberculosis* para salir del estado “no cultivable”. Durante el crecimiento activo *M. tuberculosis* produce factores que promueven la resucitación (Rpf) los cuales son proteínas de aproximadamente 16-17 kDa, originalmente descubiertas como factores de secreción de *Micrococcus luteus*, las cuales promueven la resucitación y crecimiento de células durmientes en concentraciones picomolares

[108], además de que estimulan el crecimiento de otras especies como *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis*. En algunas bacterias gram positivas también se encuentran genes homólogos a los que codifican estas proteínas. *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* contienen 5 genes (*rpfA-E*) cuyos productos se asemejan a los Rpf's producidos por *Micrococcus luteus* y son secretados en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano [109]. En la literatura se ha reportado que estas proteínas favorecen el crecimiento *in vitro* de bacilos a los que se les indujo el estado vegetativo por inanición e inducen la resucitación de células a las que se indujo el estado durmiente por la depleción gradual de oxígeno [108, 109]. Durante la infección latente, *M. tuberculosis* tiene un metabolismo extremadamente bajo y necesita Rpf's y requerimientos especiales para promover su resucitación. Sin embargo, en un intento de aislar a *M. tuberculosis* de las biopsias, estas se cultivaron con Rpf's de acuerdo a las condiciones descritas por Mukamolova y cols. (Datos no mostrados), sin embargo, no se logró el aislamiento de ninguna.

En la actualidad el estándar de oro para el diagnóstico de la tuberculosis es el aislamiento de *M. tuberculosis*, sin embargo, ésta no es una condición para la TBL debido a que desconocíamos la carga bacilar en los tejidos colectados, así como también el tiempo que llevaban las bacterias en esos tejidos, por lo cual para identificar la presencia de las micobacterias nosotros utilizamos una metodología recientemente reportada que es útil para aislar ARN micobacteriano de tejidos infectados [109-111]. En todas las muestras que se analizaron para determinar la viabilidad de los bacilos se

detectó la expresión del gen 16S ARNr, lo que sugiere la viabilidad de los bacilos en un estado “no cultivable”, lo cual se entiende como la incapacidad de recuperar a la micobacteria en medio sólido o líquido [109, 112]. Posteriormente evaluamos la expresión de factores asociados al estado durmiente, tal como *acr* e *icl* [113, 114]. La proteína *acr* es una de las mayoritariamente expresadas por *M. tuberculosis* en la fase estacionaria en el hospedero humano durante la infección [5, 96]. Esta es regulada positivamente *in vitro* después de la exposición del bacilo a la hipoxia o precursores del ON, y también durante el tratamiento con rifampicina o estreptomicina [6, 115]. Nosotros únicamente detectamos la expresión de *acr* en 4 muestras, pero el alto número de copias presentes sugiere que el bacilo se encontraba en condiciones de estrés. Estudios bioquímicos indican que en tejido pulmonar crónicamente infectado los ácidos grasos son la principal fuente de carbono para *M. tuberculosis* [116]. En la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, la actividad de *icl* se incrementa continuamente en proporción a la edad del cultivo, pero esto no se ha visto en cultivos de *M. tuberculosis* H37Ra (no virulenta) o *M. smegmatis*, debido a que durante la infección la micobacteria tiene que utilizar los ácidos grasos que están disponibles dentro de los fagosomas de los macrófagos, o en los almacenes de triacilglicerol de los macrófagos [114]. La isocitrato liasa juega un papel importante en el metabolismo de *M. tuberculosis*, promueve la persistencia aumentando la sobrevivencia bacteriana dentro de macrófagos [35]. Nosotros detectamos la expresión de *icl* en 8 de los 10 tejidos analizados.

Utilizando un modelo murino de infección crónica, el cual es similar a la infección latente, confirmamos los datos encontrados en las necropsias humanas. Este modelo se caracteriza por cuentas bajas y estables de bacilos sin pérdida de peso o muerte espontánea de los animales [69]. Histológica e inmunológicamente el estudio mostró granulomas con una elevada expresión de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), óxido nítrico sintetasa e interferón gamma (INF γ) [69]. En contraste con la infección latente en humanos, en el modelo murino el bacilo no se encuentra en un verdadero estado durmiente debido a que esos bacilos si crecen en cultivo. No obstante, se ha visto la diseminación hematogena del bacilo y la infección de células fagocíticas no profesionales en tejidos sin inflamación o daño histopatológico. En este estudio detectamos bacilos ácido alcohol resistentes en macrófagos esplénicos y hepatocitos, y la localización celular del ADN micobacteriano en tejidos murinos fue la misma que en tejidos humanos. Para descartar contaminación cruzada, durante todos los procedimientos se minimizó la posibilidad de contaminación de las biopsias, especialmente si consideramos que las condiciones de la sala de autopsias no eran las ideales. Tanto como fue posible, realizamos la recolección de las muestras y el desarrollo de las metodologías con procedimientos estrictos para evitar contaminación (Cuadro 4), haciendo particular énfasis en los siguientes factores: 1) contaminación originada por otras actividades en el laboratorio, lo cual originaría la aparición de espoligotipos característicos de BCG y de H37Rv, que no fueron encontrados. 2) El ensayo de PCR *in situ* mostró ADN en fagocitos profesionales y no profesionales, mientras que la contaminación nos daría una distribución aleatoria, por lo que consideramos que estos resultados son confiables. El hallazgo más significativo es la

presencia de micobacterias persistentes dentro de células de tejidos extrapulmonares con una limitada habilidad de presentar antígenos, como las células epiteliales. Esto puede ser una gran ventaja para el bacilo tuberculoso, y constituir un reto significativo en el diseño de futuras vacunas y fármacos para combatir micobacterias persistentes y prevenir la reactivación de la tuberculosis.

En este trabajo se logró determinar que el ADN encontrado corresponde a *M. tuberculosis* y no a infecciones con otras cepas como *M. bovis* o micobacterias saprófitas (micobacterias no tuberculosas). Los resultados nos muestran la capacidad que tiene *M. tuberculosis* no sólo de alcanzar tejidos extrapulmonares durante la primoinfección tuberculosa, sino también de infectar células no fagocíticas, como neumocitos tipo II en pulmón, células endoteliales en los sinusoides hepáticos, células endoteliales de la cápsula de Bowman y células de los tubulos contorneados proximales del riñón, también en células endoteliales del bazo.

Se ha propuesto que los eventos de resucitación del bacilo pueden ocurrir en lapsos de tiempo cortos y espaciados en nichos pequeños, lo que resulta en una infección persistente totalmente asintomática, la cual puede ser evidenciada por los métodos de diagnóstico basado en la liberación de INF- γ como el ELISpot TB y QuiantiFERON-TB, pero también es posible que la micobacteria pueda permanecer en un estado quiescente por varias décadas [30].

Proceso	Guía relacionada al manejo de laboratorio y calidad de los métodos utilizados para prevenir la contaminación de muestras.
Recolección de muestras	Uso de material quirúrgico aséptico (hojas de bisturí nuevas, guantes estériles) y técnicas quirúrgicas para evitar la contaminación microbiológica de las muestras y la contaminación cruzada entre las muestras.
Extracción estandarizada de ADN Fenol/cloroformo[14]	ADN de cada muestra fue extraído en diferentes días utilizando materiales estériles y reactivos de grado biología molecular. Para evitar la contaminación cruzada, las muestras fueron manipuladas en una campana de bioseguridad nivel II hasta el paso de precipitación con alcohol, realizadas en un laboratorio donde el ADN micobacteriano nunca había sido aislado. El ADN de tejidos, bacteria y líneas celulares utilizados como controles negativos fue extraído bajo las mismas condiciones.
Amplificación de IS6110[71]	La detección específica de ADN del “Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>” por el método basado en una amplificación directa por PCR de la secuencia de inserción IS6110 (1>25 copias en el genoma) IS6110 es un método altamente específico para el diagnóstico de <i>M. tuberculosis</i> capaz de detectar 1 fg de ADN de H37Rv (correspondiente a un genoma). La sensibilidad del método ha sido reportada con un 100% en muestras clínicas con baciloscopias positivas y al menos un 59% para muestras con baciloscopia negativa y muestras clínicas extrapulmonares. Todos nuestros controles negativos (ADN humano, ADN de otros organismos no relacionados) fueron negativos para PCR-IS6110. La infección por <i>M. bovis</i> fue descartada por la amplificación por PCR del gen <i>oxyR</i>, el cual es específico para <i>M. bovis</i> y cepas atenuadas de BCG[95].
IS6110-Hibridación	La hibridación de la secuencia específica IS6110 con una sonda de cadena sencilla generada por PCR incrementó el umbral de detección y pudo reducir los resultados falsos negativos (muestras débilmente positivas o negativas) obtenidas por IS6110-PCR. Las elevadas condiciones astringentes disminuyeron la oportunidad de uniones no específicas de la sonda con ADN humano, bacteriano tal como <i>E. coli</i> e <i>H. influenzae</i> o los oligonucleótidos utilizados para el ensayo de PCR-IS6110.
PCR IS6110 <i>in situ</i>	Presenta menor sensibilidad que la PCR convencional para IS6110, pero la localización intracelular de la señal de ADN representada por pequeños puntos en fagocitos profesionales y no profesionales en muestras positivas con los controles positivos y negativos adecuados refutan directamente una contaminación cruzada, la cual proporcionaría una distribución aleatoria de positividad.
Espoligotipificación	Es el método de genotipificación utilizado para simultáneamente detectar y tipificar bacterias del complejo <i>M. tuberculosis</i> . Los SIT obtenidos no corresponden a patrones de espoligotipo de las cepas de referencia utilizadas comúnmente en el laboratorio como <i>M. tuberculosis</i> H37Rv o la vacuna común <i>M. bovis</i> BCG. El ADN humano no mostró ninguna marca.

Cuadro 4.- Guía relacionada al manejo de laboratorio y calidad de los métodos para evitar la contaminación de las muestras. Tomada de Barrios-Payán y cols. *Jour Infect Diseases* en prensa.

Conclusiones

Nuestros resultados demuestran la presencia de micobacterias viables en estado latente en pulmón y tejido extrapulmonar, dentro de macrófagos y células carentes de capacidad fagocítica. Estas últimas le proporcionan un ambiente seguro lejos de la actividad bactericida de los macrófagos, además de pasar inadvertidas para el sistema inmune, debido a que estas células no son presentadoras de antígenos profesionales. Este trabajo permite definir una pauta a seguir, ya que una vez que se han identificado las células donde se albergan los bacilos, se pueden realizar más estudios para entender cómo sobrevive el bacilo, y así desarrollar mejores estrategias para su eliminación, incluyendo tantos métodos de diagnóstico como fármacos terapéuticos y profilácticos más efectivos. Otro aspecto importante a considerar es investigar acerca de las vías metabólicas de las que se vale el bacilo para mantenerse dentro de esas células y poder alcanzar ese estado tan característico de infección (TBL), de esta manera se puede contribuir al diseño y desarrollo de biomarcadores que faciliten la detección del bacilo en estado latente y de tratamientos más exitosos que, no únicamente actúen contra bacilos en replicación activa, sino también contra bacilos que presenten esta condición de latencia, disminuyendo la toxicidad para el individuo, particularmente en aquellos que padecen alguna inmunosupresión, coinfección u otra enfermedad concomitante.

Perspectivas

El tratamiento de la TBL es un componente vital en la eliminación de la TB, pero no puede implementarse eficazmente con los métodos diagnósticos y tratamientos disponibles en la actualidad. La prueba de la tuberculina y los ensayos de liberación de INF- γ nos indican que el hospedero ha tenido contacto con micobacterias en el pasado, pero no proporcionan información sobre si estas micobacterias aún persisten en el hospedero. La terapia de TBL con isoniazida, que es efectiva contra los bacilos en replicación activa pero no contra los bacilos en un estado no replicativo, prolonga la duración de los tratamientos y el abandono de los mismos favoreciendo la aparición de cepas MDR o XDR.

El desarrollo de pruebas diagnósticas más predictivas y tratamientos de una duración más corta requieren de un mayor entendimiento de las interacciones biológicas de la TBL desde ambas perspectivas, tanto del huésped como del hospedero.

Bibliografía

1. Daniel TM. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:395-400
2. Chaparas SD. Immunity in tuberculosis. *Bull World Health Organ* 1982;60:18
3. Ruíz MV, Núñez LR, Lezama MÁS and Valle FC. Costos de atención de la tuberculosis: Caso del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). *REVISTA INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS* 2003;16:8
4. Kochi A. Tuberculosis distribution, risk factors, mortality. *Immunobiology* 1994;191:12
5. Parrish NM, Dick JD and Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998;6:107-12
6. Gordillo S, Guirado E, O. Gil JD, et al. Usefulness of *acr* Expression for Monitoring Latent *Mycobacterium tuberculosis* Bacilli in 'In Vitro' and 'In Vivo' Experimental Models. *Scandinavian Journal of Immunology* 2006;64:30-39
7. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991;72:6
8. Organization WH. Global Tuberculosis Control
EPIDEMIOLOGY, STRATEGY, FINANCING. In: Rachel Bauquerez LB, Ana Bierrenbach, Annemieke Brands, Karen Ciceri, Dennis Falzon, Katherine Floyd, Philippe Glaziou, Christian Gunneberg, Tom Hiatt, Mehran Hosseini, Andrea Pantoja, Mukund Uplekar, Catherine Watt and Abigail Wright, ed. Vol. 13. Switzerland: World Health Organization, 2009:314

9. Organization WH. WHO REPORT 2011 GLOBAL TUBERCULOSIS CONTROL. Vol. 16. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2011:258
10. Zazueta-Beltran J, León-Sicaire C and Canizalez-Roman A. Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico *J Infect Developing Countries* 2009;3:7
11. Jeon CY, Murray MB. Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies. *PLoS Med* 2008;5:e152
12. Ponce-de-Leon A, Garcia-Garcia MdL, Garcia-Sancho MC, et al. Tuberculosis and Diabetes in Southern Mexico. *Diabetes Care* 2004;27:1584-1590
13. Almaguer-Chávez J, Ocampo-Candiani J and Rendón A. Current Panorama in the Diagnosis of Cutaneous Tuberculosis *Actas Dermosifiliogr* 2009;100:9
14. Araújo-Filho JAd, Vasconcelos-Jr AC, Sousa EMd, et al. Multidrug-resistant tuberculosis: case reports study in a central state of Brazil. *Braz J Infect Dis* 2008;12:94-98
15. Hernandez-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, et al. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* 2000;356:2133-8
16. Neyrolles O, Hernández-Pando R, Pietri-Rouxel F, et al. Is Adipose Tissue a Place for *Mycobacterium tuberculosis* Persistence? *PLoS ONE* 2006;1:1-9
17. Drumm JE, Mi K, Bilder P, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Universal Stress Protein Rv2623 Regulates Bacillary Growth by ATP-Binding: Requirement for Establishing Chronic Persistent Infection. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000460

18. Cardona PJ, Ruiz-Manzano J. On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*-latent bacilli. *Eur Respir J* 2004;24:1044-51
19. Comstock GW, Baum C and Snider DE, Jr. Isoniazid prophylaxis among Alaskan Eskimos: a final report of the bethel isoniazid studies. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:827-30
20. Comstock GW, Woolpert SF. Preventive treatment of untreated, nonactive tuberculosis in an Eskimo population. *Arch Environ Health* 1972;25:333-7
21. McCune RM, Feldmann FM, Lambert HP and McDermott W. Microbial persistence. I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. *J Exp Med* 1966;123:445-68
22. McCune RM, Feldmann FM and McDermott W. Microbial persistence. II. Characteristics of the sterile state of tubercle bacilli. *J Exp Med* 1966;123:469-86
23. Menzies D, Long R, Trajman A, et al. Adverse Events with 4 Months of Rifampin Therapy or 9 Months of Isoniazid Therapy for Latent Tuberculosis Infection: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2008;149:689-697
24. Hoff DR, Caraway ML, Brooks EJ, et al. Metronidazole Lacks Antibacterial Activity in Guinea Pigs Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52:4137-4140
25. Young DB, Gideon HP and Wilkinson RJ. Eliminating latent tuberculosis. *Trends in Microbiology* 2009;17:6
26. Murray C, Styblo K and Rovillon A. Tuberculosis in developing countries:burden, intervention and cost. *Bull Int Union Tuberc* 1990;65:19

27. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, et al. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. Science 1994;263:678-81
28. Kaufmann SHE, McMichael AJ. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. Nature Medicine 2005;11:12
29. Fica C A, Cifuentes D M, Ajenjo H MC, et al. Tuberculosis en el personal de salud. Revista chilena de infectología 2008;25:243-255
30. Mack U, Migliori GB, Sester M, et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement. Eur Respir J 2009;33:956-973
31. Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS. Inmunología Celular y Molecular. Cuarta Edición ed.: McGraw-Hill Interamericana, 2000
32. Palomino JC, Leão SC and Ritacco V. Tuberculosis 2007 from Basic Science to Patient Care. First Edition ed. Germany: Publisher Amedeo Challenge, 2007
33. Bloom BR. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. illustrated ed. Washington D. C.: ASM Press, 1994
34. Russell DG, Cardona P-J, Kim M-J, Allain S and Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. Nat Immunol 2009;10:943-948
35. Gomez JE, McKinney JD. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. Tuberculosis (Edinb) 2004;84:29-44
36. Tuberculosis TMAP. Latent Tuberculosis Infection: A Guide for Massachusetts Providers. Massachusetts, USA: The Medical Advisory Committee for the Elimination of Tuberculosis, 2005

37. Cardona P-J. New Insights on the Nature of Latent Tuberculosis Infection and its Treatment. *Inflammation & allergy - Drug Targets* 2007;6:27-39
38. Wayne L. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:7
39. Behr MA, Warren SA, Salamon H, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999;353:444-9
40. Hopewell PC. Translating discoveries into control of tuberculosis in HIV-infected persons. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:S82-7
41. Organization WH. Global tuberculosis control: Surveillance, planning, financing.: World Health Organization, 2004
42. Mellman I, Fuchs R and Helenius A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 1986;55:663-700
43. Fratti RA, Vergne I, Chua J, Skidmore J and Deretic V. Regulators of membrane trafficking and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation block. *Electrophoresis* 2000;21:3378-85
44. Russell DG, Mwandumba HC and Rhoades EE. *Mycobacterium* and the coat of many lipids. *J. Cell Biol.* 2002;158:421-426
45. Deretic V, Fratti RA. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol Microbiol* 1999;31:1603-9
46. Armstrong JA, Hart PD. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 1971;134:713-40

47. Steinberg BE, Grinstein S. Pathogen destruction versus intracellular survival: the role of lipids as phagosomal fate determinants. *The Journal of Clinical Investigation* 2008;118:10
48. Russell DG, Mwandumba HC and Rhoades EE. Mycobacterium and the coat of many lipids. *J Cell Biol* 2002;158:421-6
49. Committee TMA, (MACET) ftEoT. Latent Tuberculosis Infection: A Guide for Massachusetts Providers. Massachusetts, 2005 Latent Tuberculosis Infection)
50. Anand PK, Kaul D and Sharma M. Synergistic action of vitamin D and retinoic acid restricts invasion of macrophages by pathogenic mycobacteria. *J Microbiol Immunol Infect* 2008;42:9
51. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* 1995;2:561-72
52. Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG and Korner H. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today* 2000;21:110-3
53. Chan J, Flynn J. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin Immunol* 2004;110:2-12
54. Rook GA. Mycobacteria, cytokines and antibiotics. *Pathol Biol (Paris)* 1990;38:276-80
55. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129
56. Ramachandra L, Noss E, Boom WH and Harding CV. Processing of Mycobacterium tuberculosis antigen 85B involves intraphagosomal formation of

peptide-major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation. *J Exp Med* 2001;194:1421-32

57. Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 1996;64:683-90

58. Demissie A, Leyten EM, Abebe M, et al. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:179-86

59. Leyten EM, Lin MY, Franken KL, et al. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 2006;8:2052-60

60. Opie E, Aronson J. Tubercle bacilli in latent tuberculous lesions and in lung tissue without tuberculous lesions. *Arch Pathol Lab Med* 1927;4:21

61. Amberson J. The significance of latent forms of tuberculosis. *New En J Med* 1938;219:5

62. Shi L, Jung Y-J, Tyagi S, Gennaro ML and North RJ. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:241-246

63. Al-Orainey I. Diagnosis of latent tuberculosis: Can we do better? Vol. 4. 2009

64. Society AT. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161

65. Phyu S, Mustafa T, Hofstad T, Nilsen R, Fosse R and Bjune G. A mouse model for latent tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 1998;30:59-68

66. McCune RM, Jr., McDermott W and Tompsett R. The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J Exp Med* 1956;104:763-802
67. McCune RM, Jr., Tompsett R. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. I. The persistence of drug-susceptible tubercle bacilli in the tissues despite prolonged antimicrobial therapy. *J Exp Med* 1956;104:737-62
68. Orme IM. A mouse model of the recrudescence of latent tuberculosis in the elderly. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:716-8
69. Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook GA and Hernandez Pando R. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2002;128:229-37
70. Manabe YC, Kesavan AK, Lopez-Molina J, et al. The aerosol rabbit model of TB latency, reactivation and immune reconstitution inflammatory syndrome. *Tuberculosis (Edinb)* 2008;88:187-96
71. Kashino SS, Ovendale P, Izzo A and Campos-Neto A. Unique model of dormant infection for tuberculosis vaccine development. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1014-21
72. Capuano SV, III, Croix DA, Pawar S, et al. Experimental *Mycobacterium tuberculosis* Infection of *Cynomolgus* Macaques Closely Resembles the Various Manifestations of Human *M. tuberculosis* Infection. *Infect. Immun.* 2003;71:5831-5844

73. Codecasa L, Mantegani P, Galli L, Lazzarin A, Scarpellini P and Fortis C. An in-house RD1-based enzyme-linked immunospot-gamma interferon assay instead of the tuberculin skin test for diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* 2006;44:1944-50
74. Pai M, Riley L and (Jr) JC. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004;4:761-76
75. Huebner RE, Schein MF and Bass JB, Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 1993;17:968-75
76. Curley C. New guidelines: what to do about an unexpected positive tuberculin skin test. *Cleve Clin J Med* 2003;70:49-55
77. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. American Thoracic Society. *MMWR Recomm Rep* 2000;49:1-51
78. Goletti D, Vincenti D, Carrara S, et al. Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and an enzyme-linked immunospot assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:1311-6
79. Richeldi L, Ewer K, Losi M, et al. Early diagnosis of subclinical multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med* 2004;140:709-13
80. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. *Aids* 2002;16:2285-93

81. Shi L, North R and Gennaro ML. Effect of Growth State on Transcription Levels of Genes Encoding Major Secreted Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in the Mouse Lung. *Infect. Immun.* 2004;72:2420-2424
82. Connell TG, Ritz N, Paxton GA, Buttery JP, Curtis N and Ranganathan SC. A Three-Way Comparison of Tuberculin Skin Testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.<italic>TB</italic> in Children. *PLoS ONE* 2008;3:e2624
83. Pai M, Zwerling A and Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 2008;149:177-84
84. Pottumarthy S, Morris AJ, Harrison AC and Wells VC. Evaluation of the Tuberculin Gamma Interferon Assay: Potential To Replace the Mantoux Skin Test. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37:3229-3232
85. van Pinxteren LAH, Ravn P, Agger EM, Pollock J and Andersen P. Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000;7:155-160
86. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44
87. Wayne LG, Hayes LG. An in vitro model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun* 1996;64:2062-9
88. Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, Liao R, Harrell MI and Schoolnik GK. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha -crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7534-9

89. Park HD, Guinn KM, Harrell MI, et al. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2003;48:833-43
90. Kumar A, Toledo JC, Patel RP, Jack R, Lancaster J and Steyn AJC. *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *PNAS* 2007;104:6
91. Roupie V, Romano M, Zhang L, et al. Immunogenicity of Eight Dormancy Regulon-Encoded Proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-Vaccinated and Tuberculosis-Infected Mice. *Infect. Immun.* 2007;75:941-949
92. McKinney JD, zu Bentrup KH, Munoz-Elias EJ, et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000;406:735-738
93. Sassetti CM, Rubin EJ. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003;100:12989-12994
94. Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME and Murillo LA. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* 1995;141:2131-2138
95. Rodriguez JG, Fissanoti JC, Del Portillo P, Patarroyo ME, Romano MI and Cataldi A. Amplification of a 500-Base-Pair Fragment from Cultured Isolates of *Mycobacterium bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37:2330-2332
96. Scanga CA, Mohan VP, Joseph H, Yu K, Chan J and Flynn JL. Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model. *Infect Immun* 1999;67:4531-8

97. Diedrich CR, Mattila JT, Klein E, et al. Reactivation of Latent Tuberculosis in Cynomolgus Macaques Infected with SIV Is Associated with Early Peripheral T Cell Depletion and Not Virus Load. PLoS ONE;5:e9611
98. Shah S, Miller A and Mastellone A. Rapid Diagnosis of Tuberculosis in various Biopsy and Body Fluid Specimens by AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Polymerase Chain Reaction Test. Chest 1998;113:1190-1194
99. Gomez-Pastrana D, Torronteras R, Caro P, et al. Comparison of amplicor, in-house polymerase chain reaction, and conventional culture for the diagnosis of tuberculosis in children. Clin Infect Dis 2001;32:17-22
100. Honore-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH and Herrmann JL. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. J Clin Microbiol 2003;41:2323-9
101. Chakravorty S, Sen MK and Tyagi JS. Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by Smear, Culture, and PCR Using Universal Sample Processing Technology. Journal of Clinical Microbiology 2005;43:4357-62
102. Jain S, Paul-Satyassela M, Lamichhane G, Kim K and Bishai W. Mycobacterium tuberculosis invasion and traversal across an in vitro human blood-brain barrier as a pathogenic mechanism for central nervous system tuberculosis. J Infect Dis 2006;193:1287-95
103. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS and Bloom BR. Killing of Virulent Mycobacterium tuberculosis by Reactive Nitrogen Intermediates Produced by Activated Murine Macrophages J. Exp. Med. 1992;175:1111-32

104. Richardson M, Carroll NM, Engelke E, et al. Multiple *Mycobacterium tuberculosis* strains in early cultures from patients in a high-incidence community setting. *J Clin Microbiol* 2002;40:2750-4
105. Pavlic M, Allerberger F, Dierich MP and Prodinge WM. Simultaneous infection with two drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains in an immunocompetent host. *J Clin Microbiol* 1999;37:4156-7
106. Mallard K, McNerney R, Crampin AC, et al. Molecular detection of mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* strains in sputum samples from patients in Karonga District, Malawi. *J Clin Microbiol*;48:4512-8
107. Perez-Guerrero L, Milian-Suazo F, Arriaga-Díaz C, Romero-Torres C and Escartan-Chavez M. Epidemiologia molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endemica de Queretaro, México. *Salud Publica de Mexico* 2008;50:286-291
108. Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, Young M and Kell DB. A bacterial cytokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:8916-8921
109. Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, Kaprelyants AS, Kell DB and Young M. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* 2002;46:623-635
110. Souza GAd, Fortuin S, Aguilar D, et al. Using a Label-free Proteomics Method to Identify Differentially Abundant Proteins in Closely Related Hypo- and Hypervirulent Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Isolates. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:2414-

111. Campuzano J, Aguilar D, Merchant JG-y, Salas P, Espitia C and Hernandez-Pando R. The PGRS domain of *Mycobacterium tuberculosis*. PE-PGRS-Rv1759 is an efficient subunit vaccine to prevent reactivation in a murine model of chronic tuberculosis. . *Vaccine* 2007;25:3722-29
112. Shleeve M, Mukamolova GV, Young M, Williams HD and Kaprelyants AS. Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation *Microbiology* 2004;150:1687-1697
113. Dusthacker A, Kumar V, Subbian S, et al. Construction and evaluation of luciferase reporter phages for the detection of active and non-replicating tubercle bacilli. *J Microbiol Methods* 2008;73:18-25
114. Micklinghoff JC, Breiting KJ, Schmidt M, Geffers R, Eikmanns BJ and Bange F-C. Role of the Transcriptional Regulator RamB (Rv0465c) in the Control of the Glyoxylate Cycle in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 2009;191:7260-7269
115. DesJardin LE, Hayes LG, Sohaskey CD, Wayne LG and Eisenach KD. Microaerophilic Induction of the Alpha-Crystallin Chaperone Protein Homologue (hspX) mRNA of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 2001;183:5311-5316
116. Jun-ming L, Na L, Dao-yin Z, La-gen W, Yong-lin H and Chun Y. Isocitrate lyase from *Mycobacterium tuberculosis* promotes survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophage by suppressing cell apoptosis *Chin Med J* 2008;1221:1114-1119

Artículo

Major Article

Extrapulmonary Location of *Mycobacterium tuberculosis* DNA During Latent Infection.

Jorge Barrios-Payán^{1 2}, Milena Saqui-Salces², Mangalakumari Jeyanathan³, Avissai Alcántara Vazquez⁴, Mauricio Castañón Arreola¹, Graham Rook³, Rogelio Hernandez-Pando²

1 Autonomous University of Mexico City, Genomic Science Program, Mexico City, Mexico, **2** Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition “Salvador Zubiran”, Mexico City, Mexico, **3** Department of Infection, University College London (UCL), London, NW3P 2F, United Kingdom, **4** Pathology Unit, General Hospital of México.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 15 de junio del 2012, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Doctor en Ciencias Genómicas, al M. en C. Jorge Alberto Barrios Payán

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Dra. Martha Yocupicio Monroy

Dr. Rogelio Hernández Pando

Dra. Dulce Adriana Mata Espinosa

Dr. Mabil López Casamichana
