



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**VIRULENCIA, RESPUESTA INMUNE IN VIVO Y
TRANSCRIPTÓMICA DE *Mycobacterium tuberculosis*
GENOTIPO BEIJING CIRCULANTE EN
COLOMBIA**

María Irene Cerezo Cortés

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogotá, Colombia
2021**

**VIRULENCIA, RESPUESTA INMUNE IN VIVO Y
TRANSCRIPTÓMICA DE *Mycobacterium tuberculosis*
GENOTIPO BEIJING CIRCULANTE EN COLOMBIA**

María Irene Cerezo Cortés

Bacterióloga, M.Sc. Infecciones y Salud en el Trópico

Tesis presentada como requisito parcial para optar por el título de:
Doctora en Ciencias Biomédicas

Directora:

Martha Isabel Murcia Aranguren

Licenciada en Bacteriología, M.Sc. Ph.D.

Departamento de Microbiología

Universidad Nacional de Colombia

Co-Director:

Rogelio Hernández-Pando

Médico., Esp., Ph.D.

Línea de Investigación: Virulencia de *M. tuberculosis*

Grupo de Investigación: MICOBAC-UN

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia

2021

Dedicado

A:

El primer gran regalo que me ha dado Dios y la Vida: Mi hija JULIANA MONROY CEREZO. Gracias por estar en mi vida y ser la principal motivación para emprender este camino, aunque el plan siempre fue estar de la mano contigo emocional y geográficamente, a medida que fueron avanzando los objetivos planteados tuve que separarme forzosamente de ti por un largo periodo de tiempo. Gracias por soportar la separación y la distancia, por amarme estando lejos, por recibirme con esa hermosa sonrisa, por tus brazos abiertos a mi regreso, por no cambiar tu bella esencia, por ser buena y por tu comprensión. Este logro es tan tuyo como mío, es por eso que todo lo que se derive de aquí será siempre por y para ti. Te amo hija Preciosa.

Y...

Para mi segundo gran regalo, mi hijo NICOLÁS MONROY CEREZO, llegaste a completar la felicidad, a enseñarme que se puede amar dos veces con la misma intensidad y por ser otro impulso en la recta final de este trabajo. Te amo hijo Precioso

Agradecimientos

Esta tesis doctoral es el producto de varios años de esfuerzo, no solo a nivel personal sino a nivel familiar e interinstitucional, en la que se han involucrado un número importante de personas. La finalización exitosa de la presente tesis implica hacer un reconocimiento a todos los involucrados en la misma por sus invaluable esfuerzos personales, profesionales, académicos y financieros.

Primero quiero agradecer a todos los miembros de mi familia por su apoyo incondicional en este proceso, sin ellos este objetivo no se habría logrado, cada una de sus acciones han sido indispensables para la obtención de este logro. A mi pareja Nelson Javier Monroy por su soporte y acompañamiento, por incentivar mi crecimiento académico y lo más importante, por cuidar de mi hija en mi ausencia. A mi abuela Blanca Irene Cañón por su apoyo incondicional, a mi Mamá María Mercedes Cortés por su apoyo constante, a mi hermana Laura y mis sobrinos Nathalia y Samuel, a mi tía Chila y tío Tom por su incondicional apoyo y cariño durante mi vida académica y profesional, a mis primos Tony, Jason y David por su ayuda con los artículos y a mis tíos Yolanda, Clavia y Harvey por estar pendientes.

Agradezco infinitamente a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y su decano Dr. José Ricardo Navarro, al Departamento de Microbiología y su directora Dra. Myriam Navarrete, al Doctorado en Ciencias Biomédicas y su director Dr. Jean Paul Vernot, por haberme abierto las puertas para la realización de este programa académico. Agradezco de manera muy especial y sincera a la Dra. Martha Isabel Murcia Aranguren por haber aceptado ser la tutora de este trabajo, que a pesar del gran esfuerzo que ha implicado su realización, estoy segura es una fuente de satisfacción tanto para ella como para mí, mil y mil gracias profesora. Mi más sincero agradecimiento para el Dr. Juan Germán Rodríguez por su incondicional apoyo y soporte constante durante el presente trabajo. Agradezco a mis compañeros de academia en el laboratorio de Micobacterias: Alejandro Vega, Viviana Mape y Magda Beltrán. De la misma manera agradezco a mis compañeros de trabajo en el laboratorio durante esta época de pandemia Cristian Rodríguez, Samanta Aponte, Catherine Aguilar, Johana Hernández, Lorena Argoti, Nina Rodríguez y Myriam Herrera, ya que han ocupado su tiempo liberando un poco del mio para poder finalizar el proceso de escritura de este documento.

De la manera más atenta quiero agradecer al Dr. Rogelio Hernández-Pando de la unidad de Patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, agradezco

desde el corazón haberme abierto las puertas de su laboratorio, por sus invaluable ideas y por su apoyo constante durante la realización de la presente investigación. De la misma manera agradezco a los investigadores del laboratorio, Dra. Estela Bini por su invaluable apoyo y trabajo, Dra. Dulce Mata, Dra. Brenda Marquina y Dr. Jorge Barrios y a Eréndira Ángeles por sus aportes.

Un agradecimiento especial a la corporación CORPOGEN y a la doctora Patricia del Portillo, por colaborar en el desarrollo del presente trabajo junto con el Dr. Juan Manuel Anzola. De igual manera agradezco al Instituto de Biotecnología IBT de la Universidad Nacional Autónoma de México y a sus miembros Dr. Adrian Ochoa Leyva y Fernanda Cornejo por el desarrollo y transferencia de tecnología para la realización del presente trabajo.

Un producto invaluable durante la realización del presente trabajo es, por una parte, haber afianzado la amistad con mis amigos de antaño y, por otra parte, haber conocido personas maravillosas con las que nacieron bonitas amistades. Por lo tanto, quiero agradecer a mis queridos amigos: Bibiana Chavarro, Paola Santos, Iris Paredes, Lucía Zatarain, Octavio Ramos, Manuel López, Mario Zetter, Marco Peralta, Suhey Hernández, Vasti Lozano, Belén Vecchione, Silvia Andrea Moreno, Jackeline Lara, Alejandra Barrera, Ilse Mendoza, Yeisa Espinoza, Audrey Gerena, Carolina Trujillo, Nancy Huérfano, Paola Garzón y Milena Maya por haberme hecho compañía y en muchas ocasiones hacer mi vida más fácil o más feliz en Colombia o en México.

Gracias infinitas a todos.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



María Irene Cerezo Cortés

Fecha 15/03/2021

Resumen

La tuberculosis (TB) continúa siendo un grave problema de salud pública mundial. En Colombia, el linaje mas prevalente es el Euroamericano. El aumento de la circulación del genotipo Beijing en el territorio nacional, el cual se asocia con resistencia a medicamentos e hipervirulencia causando la muerte de los pacientes, es motivo de investigación. La variante Beijing-Like SIT190 es la más prevalente en Colombia, seguido del Beijing-Clásico SIT1. Los mecanismos patogénicos y modulatorios son desconocidos. El presente trabajo comparó el comportamiento de las cepas 323 (Beijing-Like) y 391 (Beijing-Clásico), en un modelo de TB pulmonar en ratones Balb/c. El curso de la enfermedad fue diferente para cada grupo de animales, los infectados con Beijing-Like tuvieron una mortalidad del 100% al día 45 post-infección (PI), con altas cargas bacilares y neumonía masiva, mientras que el total de los infectados con Beijing-Clásico murieron hacia el día 60 PI por neumonía y necrosis. Se realizó RNA-seq dual para determinar el perfil de expresión génica a los días 3, 14, 28 y 60 PI. En los ratones infectados con Beijing-Clásico se sobreexpresaron genes asociados con respuesta proinflamatoria, comparado con los infectados con Beijing-Like que sobreexpresaron genes asociados con respuesta antiinflamatoria; siendo ambas cepas inductoras de respuesta inmune no protectora. El genotipo Beijing-Like causó enfermedad aguda y fulminante y, Beijing-Clásico causó TB crónica pero severa. A nivel bacteriano, con el RNA-seq de Mtb se logró ~33% del transcriptoma completo a los días 3, 14, 28 y 60 PI. El perfil de expresión fue diferente para 323 Beijing-Like y para 391 Beijing Clásico, evidenciando que las variaciones a nivel regulatorio desencadenan un fenotipo diferente en el hospedador.

Palabras clave: Tuberculosis, Genotipo Beijing, Balb/c, Virulencia, Respuesta Inmune

Abstract

Tuberculosis (TB) is a serious global public health problem. In Colombia, the most prevalent lineage is the Euroamerican. The increased circulation of the Beijing genotype which is associated with drug resistance and hypervirulence causing death in patients is intriguing. The Beijing-Like SIT190 variant is the most prevalent in Colombia, followed by the Classical-Beijing SIT1. The pathogenic and modulatory mechanisms triggered by these strains are unknown. In the present work, the course of pulmonary TB was compared in the Balb/c mouse model, in mice infected with Beijing-Like (strain 323) and Classical-Beijing (strain 391). The course of the disease was different for each group of animals, those infected with Beijing-Like had a mortality of 100% by day 45 post-infection (PI), with high bacillary loads and massive pneumonia, and those infected with Classical-Beijing 100% died by day 60 PI from pneumonia and necrosis. Dual RNA-seq was performed to determine the global gene expression profile at days 3, 14, 28 and 60 PI. In mice infected with Classical-Beijing, genes associated with a pro-inflammatory response were overexpressed and in those infected with Beijing-Like, genes associated with an anti-inflammatory response were overexpressed, both strains inducing non-protective immune responses. Beijing-Like caused acute and fulminant disease and Classical-Beijing caused chronic but severe TB. Modulation at the bacterial level was consistent with the type of disease caused in each group of animals, causing the premature death of the animals. At the bacterial level, the RNA-seq of Mtb achieved ~ 33% of the complete transcriptome at days 3, 14, 28 and 60 PI. The expression profile was different for 323 Beijing-Like and for 391 Classic Beijing, showing that variations at the regulatory level trigger a different phenotype in the host.

Keywords: Tuberculosis, Beijing-Genotype, Balb/c, Virulence, Immune Response

Divulgación

Publicaciones

Cerezo-Cortés MI, Rodríguez-Castillo JG, Hernández-Pando R, Murcia MI. Circulation of *M. tuberculosis* Beijing genotype in Latin America and the Caribbean. Pathog Glob Health. 2019;113(8):336-351. doi:10.1080/20477724.2019.1710066.

Cerezo-Cortés María Irene, Rodríguez-Castillo Juan Germán, López-Leal Gamaliel, Mata-Espinosa Dulce Adriana, Bini Estela Isabel, Marquina-Casitllo Brenda Nohemí, Barrios Payan Jorge, Zatarain-Barrón Zyanya Lucía, Bobadilla del Valle Myriam, Cornejo-Granados Fernanda, Ochoa-Leyva Adrian, Murcia Martha Isabel & Hernández-Pando Rogelio (2021) Profiling the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family infection: a perspective from the transcriptome, Virulence, 12:1, 1689-1704, DOI: 10.1080/21505594.2021.1936432.

Cerezo-Cortés María Irene, Rodríguez Juan Germán, Anzola Juan Manuel Mata-Espinosa Dulce Adriana, Bini Estela Isabel, Marquina Castillo Brenda Nohemí, Barrios Payan Jorge, Cornejo-Granados Fernanda, Ochoa-Leyva Adrian, Del-Portillo Patricia, Murcia Martha Isabel, Hernández-Pando Rogelio. Transcriptomic pattern of “Beijing classical” and “Beijing like” isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model of diseases progression (Manuscrito en Preparación)

Eventos Científicos

CEREZO CORTES MI, Mata DA, Bini EI, Murcia Aranguren MI, Marquina-Castillo B and Pando RH. Virulence and immunopathology induced by *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and Beijing like strains isolated from Colombian Patients. Conference Abstract: XII Congress of the Latin American Association of Immunology & XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology ALAI-SMI. 14-18 de mayo Cancún Quintana Roo México.

MI Cerezo, D Mata-Espinosa, E I Bini, B N Marquina-Castillo, J Barrios- Payan, M Bobadilla del Valle, J G Rodríguez-Castillo, A Ochoa-Leyva, G López, M I Murcia, R Hernández-Pando. 'Virulence and immunopathology induced by *Mycobacterium tuberculosis* genotype Beijing and Beijing-like isolated in Colombia. 40th ESM (European Society of Mycobacteriology) Annual Congress. Valencia-Spain 30th -June 3rd July 2019.

M I Cerezo, J C León-Contreras, D Mata-Espinosa, E I Bini, J G Rodríguez-Castillo, M I Murcia, R Hernández-Pando. Ultrastructural comparison by electron microscopy of *M. tuberculosis* Beijing and Beijing-like genotypes isolated from Colombian patients. 40th ESM (European Society of Mycobacteriology) Annual Congress. Valencia-Spain 30th -June 3rd July 2019.

María Irene Cerezo. In-vivo infection of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and Beijing-like isolated in Colombia using the BalB/c mouse model: Insights of host-pathogen interactions determined by RNA-Seq. III Jornadas de Investigación de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia, Asociación de exalumnos de la Universidad Nacional de Colombia 20 noviembre 2019.

Cerezo-Cortés MI, Rodríguez-Castillo JG, Mata-Espinosa D, Bini EI, Marquina-Castillo BN, Barrios- Payan J, Bobadilla del Valle M, Ochoa-Leyva A, López G, Cornejo F, Del Portillo P, Anzola JM, Murcia MI, Hernández-Pando R. General description of gene expression for the Host-pathogen interaction during *M. tuberculosis* in-vivo infection with Beijing-like strain, using a mouse model. X SLAM-TB, X Meeting of the Latin American Society of Tuberculosis and other Mycobacteria. Virtual Meeting. April 28-30 2021.

Rodríguez-Castillo JG, **Cerezo-Cortés MI**, Anzola JM, Mata-Espinosa D, Bini EI, Marquina-Castillo BN, Barrios- Payan J, Ochoa-Leyva A, López G, Cornejo F, Murcia MI, Hernández-Pando R, Del Portillo P. Different transcriptional programs in two closely related *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains from Colombia evidenced in a murine model. X SLAM-TB, X Meeting of the Latin American Society of Tuberculosis and other Mycobacteria. Virtual Meeting. April 28-30 2021.

Reconocimientos

María Irene Cerezo. In-vivo infection of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and Beijing-like isolated in Colombia using the BalB/c mouse model: Insights of host-pathogen interactions determined by RNA-Seq. III Jornadas de Investigación de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. 20 noviembre 2019. **I Puesto presentación resultados tesis de DOCTORADO**

Financiación

La presente tesis doctoral obtuvo financiación de las siguientes entidades:

- Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias-Minciencias), Colombia, Número de contrato: CT-731-2018
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) -México, Número de contrato: 223279
- Sistema de Información de la Investigación, Extensión y Laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia (Hermes), Código del proyecto: 42665

Contenido

	Pág.
Introducción	27
I.I. Datos históricos de la TB	27
I.II. Tuberculosis en el mundo	29
I.II.I. Tuberculosis en Colombia	30
I.III. Taxonomía de la Familia Mycobacteriaceae.....	31
I.IV. Generalidades de la Familia <i>Mycobacteriaceae</i>	32
I.IV. I. Pared celular de las Micobacterias	33
I.V. Complejo <i>M. tuberculosis</i> MTBC	34
I.V. I. Métodos de tipificación molecular, evolución y clasificación del complejo <i>M. tuberculosis</i>	36
I.VI. Genotipo Beijing: origen, descripción, clasificación presencia global	47
I.VI. I. Epidemiología de Genotipo Beijing	51
I.VI.I.I. Genotipo Beijing en el mundo	51
I.VI.I. II. Genotipo Beijing en el continente americano	52
I.VI.I.III. Genotipo Beijing en Colombia.....	55
Planteamiento del problema.....	59
Hipotesis	62
Justificación	65
Objetivos.....	67
Capítulo 1. Aislamientos clínicos colombianos de Mtb y Modelo de TB pulmonar progresiva Crónica Ratón Balb/c.....	69
1.1. Introducción.....	69
1.1.1. Respuesta inmune a Mtb.....	69
1.1.1.1. Respuesta inmune Innata	69
1.1.1.2. Respuesta inmune adaptativa	74
1.1.2. Generalidades de Modelos animales e <i>In-Vitro</i> para el estudio de la virulencia de Mtb	75
1.1.3. Modelos <i>In-Vitro</i> para estudios de virulencia y respuesta inmune	76
1.1.4. Modelos animales para determinación de virulencia y respuesta inmune de Mtb.....	78
1.1.5. Modelo Murino de tuberculosis Pulmonar progresiva Crónica Ratón Balb/c	81
1.2. Materiales y Métodos	83

1.2.1.	Caracterización de aislamientos clínicos de genotipo Beijing aisladas en Colombia	83
1.2.1.1.	Consideraciones Éticas	83
1.2.1.2.	Cepas de Mtb objeto de estudio	84
1.2.1.3.	Caracterización genotípica y fenotípica de cepas de Mtb.....	84
1.2.2.	Materiales & métodos para cumplir con el objetivo específico N° 1 “Evaluar en el modelo animal de tuberculosis progresiva “ratón BALB/c” las bases histopatológicas e inmunológicas de la virulencia in vivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> genotipos Beijing circulante en Colombia”.....	90
1.2.2.1.	Modelo <i>in-vivo</i> de TB pulmonar progresiva crónica ratón Balb/c.....	90
1.2.2.2.	Procedimientos para la obtención de bacterias y estandarización del inóculo bacteriano	94
1.2.2.3.	Inoculación intratraqueal de ratones Balb/c.....	94
1.2.2.4.	Seguimiento y curva de sobrevivencia de ratones Balb/c	94
1.2.2.5.	Cinética de sacrificio	95
1.2.2.6.	Determinación de unidades formadoras de colonia (UFC) en pulmones y bazo de ratones Balb/c.....	95
1.2.2.7.	Procesamiento histológico de tejidos.....	96
1.2.2.8.	Expresión de citoquinas en homogenizados de pulmón por medio de qRT-PCR.	96
1.2.2.9.	Modelo de convivencia de ratones Balb/c	97
1.2.2.10.	Análisis estadístico	97
1.2.2.11.	Análisis de expresión global de genes en pulverizados de pulmón por medio de secuenciación de transcriptoma completo (RNA-seq).	97
1.2.2.12.	Extracción de RNA para secuenciación.....	97
1.2.2.13.	Determinación de cantidad y calidad del RNA previo al proceso de secuenciación.	98
1.2.2.15.	Análisis de resultados de RNA-seq.....	98
1.3.	Resultados.....	99
1.3.1.	Caracterización genotípica y fenotípica de los aislamientos clínicos de mtb	99
1.3.1.1.	Genotipificación de aislamientos clínicos por Spoligotyping y MIRUS-VNTR... ..	99
1.3.1.2.	Determinación genotípica y fenotípica de la resistencia a antibióticos de primera línea para el tratamiento de TB.	100
1.3.1.3.	Caracterización morfológica ultraestructural de cepas Beijing por microscopía electrónica de transmisión (MET).....	101
1.3.1.4.	Infección de macrófagos alveolares de ratón MH-S “KILLING”	107
1.3.1.5.	Cinética de infección con aislamientos clínicos colombianos en el modelo de TB pulmonar progresiva crónica ratón Balb/c.	110
1.3.1.6.	Expresión global de genes ante la infección de ratones Balb/c con aislamientos clínicos colombianos genotipo Beijing	119
1.4.	Discusión	141
1.5.	Conclusiones.....	153

Capítulo 2. Expresión diferencial de genes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a partir de la secuenciación de transcriptoma bacteriano completo (RNA-seq) en pulmones infectados de ratón Balb/c.....	153
2.1. Marco Conceptual.....	155
2.1.1. Factores de Virulencia de Mtb.....	155
2.1.1.1 Sistemas de secreción.....	156
2.1.1.2. <i>RV2031C</i> , <i>HSPX</i> α -Cristalina.....	158
2.1.1.3. Genes asociados a superficie celular.....	158
2.1.1.4. Genes y proteínas asociadas a regulación transcripcional	161
2.1.1.5. Antígeno 85.....	163
2.1.2. Métodos de ultima generación para el estudio de la expresión génica	163
2.2. Materiales & Métodos para cumplir con el objetivo específico N° 2: Evaluar en ratón BALB/c la expresión diferencial de genes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> genotipo Beijing circulante en Colombia, asociados a su virulencia en las fases aguda y crónica de la infección.	166
2.2.1. Infección de animales: Modelo de TB pulmonar progresiva crónica ratón Balb/c.	167
2.2.1.1. Cultivo de bacterias y preparación de inóculo para infección	167
2.2.1.2. Inoculación intratraqueal de ratones Balb/c.....	167
2.2.1.3. Sacrificio de ratones.....	168
2.2.1.4. Extracción y purificación de RNA bacteriano a partir de pulmones infectados con aislamientos clínicos de Mtb.	168
2.2.1.5. Determinación de cantidad y calidad del RNA previo al proceso de secuenciación	169
2.2.1.6. Depleción de subunidades ribosomales	169
2.2.1.7. Construcción de librerías genómicas de secuenciación	169
2.2.1.8. Hibridación in-house con sondas para depleción de subunidades ribosomales de Mtb	170
2.2.1.9. Validación por qPCR de librerías depletadas para subunidades de rRNA de Mtb	170
2.2.1.10. Secuenciación	170
2.2.1.11. Análisis bioinformático.....	170
2.3 Resultados.....	173
2.3.1 Expresión global de genes de Mtb genotipos Beijing y Beijing-Like a partir de ratones Balb/c infectados con aislamientos clínicos colombianos 323 Beijing-Like y 391 Beijing-Clásico.....	173
2.3.1.1. Enriquecimiento bacteriano de pulverizados de pulmónes infectados con Mtb ..	173
2.3.1.2. Control de calidad de RNA para RNA-seq de Mtb.....	175
2.3.1.3. Primera depleción de subunidades ribosomales.....	176
2.3.1.4. Elaboración de librerías genómicas a partir de RNA depletado para subunidades ribosomales.....	178

2.3.1.5. Depleción de subunidades ribosomales de origen procariota por hibridación subtractiva in-house	178
2.3.1.6. Análisis de lecturas y expresión global de genes de Mtb genotipo Beijing a partir pulmones infectados de ratones Balb/c.	181
2.3.1.7. Clasificación funcional de genes DE en pulmones de ratones infectados con 323 Beijing-Like de acuerdo a categorías de TUBERCULIST	182
2.3.1.8. Genes de Mtb 323 Beijing-Like diferencialmente expresados en fase temprana, intermedia y aguda de TB en ratones Balb/c, evaluando la expresión diferencial de genes a lo largo de la infección.	183
2.3.1.9. Genes de Mtb 391 Beijing-Clásico diferencialmente expresados en fase temprana, intermedia y aguda de TB en ratones Balb/c.....	196
2.4. Discusión	206
2.4.1. Genes Diferencialmente expresados en 323 Beijing-Like	208
2.4.2. Genes diferencialmente expresados en 391 Beijing-Clásico	211
3. Conclusiones y recomendaciones	215
3.1. Conclusiones.....	215
3.2. Recomendaciones	216
4. Anexos	219
5. Bibliografía	247

Lista de Figuras

	Pág.
Figura I- 1. Tasas de Incidencia estimadas por la OMS por país a nivel mundial año 2019.	29
Figura I- 2. Incidencia de tuberculosis en Colombia año 2018.	31
Figura I- 3. Esquema de estructura de la pared celular de las Micobacterias	34
Figura I- 4. Cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> con blancos moleculares y métodos de tipificación de cepas y aislamientos clínicos.	39
Figura I- 5. Árbol de mínima expansión basada en SNPs obtenidos de la comparación de secuencia de genoma completo de 220 cepas de MTBC	40
Figura I- 6. Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido a partir de 241 genomas de MTBC mostrando las relaciones evolutivas de los linajes ancestrales y modernos de MTBC.	42
Figura I- 7. Filogenia construida a partir de 424 genomas de <i>M. africanum</i> analizados junto con genomas asociados con animales de referencia.	43
Figura I- 8. Distribución mundial de los complejos del genotipo Beijing.....	50
Figura I- 9. Distribución de genotipos por país en América Latina.....	55
Figura 1- 1. Esquema general de respuesta inmune innata y adaptativa a la infección por <i>M. tuberculosis</i>	75
Figura 1- 2. Ciclo inmunológico de la TB y su correlación entre los diferentes modelos animales y el humano.....	81
Figura 1- 3. Resumen experimental para cumplir el objetivo específico N°1 del presente trabajo	93
Figura 1- 4. Patrones obtenidos por Spoligotyping y MIRUs-VNTR para la confirmación de linaje de las cepas incluidas en el estudio en comparación con la cepa de laboratorio H37Rv.	100
Figura 1- 5. Curvas de crecimiento de cepas Genotipo Beijing.....	101
Figura 1- 6. Fotografías con MET de bacterias de Mtb genotipo Beijing-Like cepa 323.....	103
Figura 1- 7. Fotografías con MET de bacterias de Mtb genotipo Beijing- Clásico cepa 391.....	104
Figura 1- 8. Fotografías con MET de bacterias de Mtb genotipo LAM9 cepa H37Rv..	105
Figura 1- 9. Comparación del espesor de las paredes celulares.....	106
Figura 1- 10. Resultados de infección de macrófagos alveolares de ratón (Balb/c) “Killing”.	109
Figura 1- 11. Cinética infección de ratones Balb/c con aislamientos clínicos colombianos.....	111
Figura 1- 12. Hallazgos histopatológicos en pulmones de ratones infectados con 323 Beijing-Like, tinción H-E.	113
Figura 1- 13. Hallazgos histopatológicos en pulmones de ratones infectados con 391 Beijing-Clásico, Tinción H-E.....	114
Figura 1- 14. Hallazgos histopatológicos en pulmones de ratones infectados con LAM B077bc. Tinción con H-E.....	115
Figura 1- 15. Gráficas de cuantificación de área de granulomas..	116
Figura 1- 16. Medición de la expresión de citoquinas por qRT-PCR.	118
Figura 1- 17. Representación global de la expresión diferencial de genes en pulmones infectados con 323 Beijing-Like a los días 3, 14 y 28 PI.	121

Figura 1- 18. Representación global de la expresión diferencial de genes en pulmones infectados con 391 Beijing-Clásico los días 14, 28 y 60 PI.	122
Figura 1- 19. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 323 Beijing-Like comparando el día 3 PI vs día 14 PI.	123
Figura 1- 20. Análisis de redes de interacción génica en ratones infectados con 323 Beijing-Like al día 3 PI.	124
Figura 1- 21. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 323 Beijing-Like comparando el día 14 PI vs día 3 PI.	126
Figura 1- 22. Análisis de redes de interacción génica en ratones infectados con 323 Beijing-Like al día 14 PI.	127
Figura 1- 23. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 323 Beijing-Like al día 28 vs día 3 PI.	129
Figura 1- 24. Análisis de redes de interacción génica en ratones infectados con 323 Beijing-Like al día 28 PI.	130
Figura 1- 25. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 391 Beijing-Clásico comparando el día 3 PI vs día 14 PI. .	131
Figura 1- 26. Análisis de redes de interacción génica en ratones infectados con 391 Beijing-Clásico al día 3 PI. Las interacciones proteína-proteína se realizaron usando la herramienta NetworkAnalyst en la plataforma InnateDB.	132
Figura 1- 27. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 391 Beijing-Clásico comparando el día 14 PI vs día 3 PI. ..	134
Figura 1- 28. Análisis de redes de interacción génica in ratones infectados con 391 Beijing-Clásico al día 14 PI.	135
Figura 1- 29. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 391 Beijing-clásico al día 28 vs día 3 PI.	137
Figura 1- 30. Análisis de redes de interacción génica in ratones infectados con 391 Beijing-Clásico al día 28 PI.	138
Figura 1- 31. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 391 Beijing-clásico al día 60 vs día 3 PI.	139
Figura 1- 32. Análisis de redes de interacción génica in ratones infectados con 391 Beijing-Clásico al día 60 PI.	140
Figura 1- 33. Modelo de inmunopatogenicidad a lo largo de la infección de pulmones de ratones Balb/c infectados con 323 Beijing-Like.	150
Figura 1- 34. Modelo de inmunopatogenicidad a lo largo de la infección de pulmones de ratones Balb/c infectados con 391 Beijing-Clásico.	151
Figura 2- 1. Resumen metodológico para cumplir el objetivo específico N° 2.	166
Figura 2- 2. Tinción por ZN de muestras de pulverizados pulmonares en solución de lisis sin enriquecer (SE) y enriquecidas (E)	174
Figura 2- 3. Resultados del porcentaje de mapeo de lecturas contra los diferentes tipos de RNA	181
Figura 2- 4. Clasificación de genes diferencialmente expresados a partir de RNA-seq de pulmones de ratón Balb/c infectados con 323 Beijing-Like.	183
Figura 2- 5. Mapa de calor, muestra globalmente la expresión de genes de Mtb 323 Beijing-Like a los 3, 14 y 28 días PI días post-infección.	185
Figura 2- 6. Genes DE en el transcurso de la cinética de infección en ratón Balb/c para 323 Beijing-Like. La determinación de genes DE se realizó al comparar día 14 vs día 3 PI, día 28 vs día 3 PI y día 28 vs día 14 PI.	187
Figura 2- 7. Esquema de niveles de expresión de los genes DE encontrados al comparar día 14 vs día 3 PI de Mtb 323 Beijing-Like, obtenidos al calcular el Fold-Change (FC) $P < 0,005$	188

Figura 2- 8. Análisis ontológico de genes de Mtb 323 Beijing-like al día 14 vs 3 PI.....	189
Figura 2- 9. Genes con expresión compartida al día 14 y 28 PI en 323 Beijing-Like	190
Figura 2- 10. Genes sobreexpresados al día 28 PI con respecto al día 3 PI en 323 Beijing-Like.	191
Figura 2- 11. Esquema de niveles de expresión de los genes DE encontrados al comparar día 3 vs día 28 PI de Mtb 323 Beijing-Like	192
Figura 2- 12. Análisis ontológico de genes de Mtb 323 Beijing-like al día 3 vs 28 PI.....	192
Figura 2- 13. Genes DE para 323 Beijing-Like al día 28 vs día 14 PI.....	193
Figura 2- 14. Esquema de niveles de expresión de los genes DE encontrados al comparar día 14 vs día 28 PI de Mtb 323 Beijing-Like.	194
Figura 2- 15. Análisis ontológico de genes de Mtb 323 Beijing-like al día 14 vs 28 PI.....	194
Figura 2- 16. Línea de tiempo generada a partir de las lecturas mapeadas contra genes para determinar la variación en la expresión génica a lo largo de la cinética de infección en 323 Beijing-Like.	195
Figura 2- 17. Clasificación de genes diferencialmente expresados a partir de RNA-seq de pulmones de ratón Balb/c infectados con 391 Beijing-Clásico.	196
Figura 2- 18. Mapa de calor, muestra globalmente la expresión de genes de Mtb 391 Beijing-clásico a los 3, 14, 28 y 60 días PI	198
Figura 2- 19. Genes DE en el transcurso de la cinética de infección en ratón Balb/c para 391 Beijing-Clásico.	199
Figura 2- 20. Esquema de niveles de expresión de los genes DE encontrados al comparar día 14 vs día 3 PI de Mtb 91 Beijing-Clásico.....	200
Figura 2- 21. Análisis ontológico de genes de Mtb 391 Beijing-Clásico al día 14 vs 3 PI.....	201
Figura 2- 22. Esquema de niveles de expresión de los genes DE encontrados al comparar día 14 vs día 28 PI de Mtb 91 Beijing-Clásico.....	202
Figura 2- 23. Análisis ontológico de genes de Mtb 391 Beijing-Clásico al día 28 vs 14 PI.....	205
Figura 2- 24. Línea de tiempo generada a partir de las lecturas mapeadas contra genes para determinar la variación en la expresión génica a lo largo de la cinética de infección en 391 Beijing-Clásico.....	206

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1- 1. Principales receptores inmunes implicadas en el reconocimiento de antígenos de <i>M. tuberculosis</i>	73
Tabla 1- 2. Principales líneas celulares utilizadas para estudios in-vitro de respuesta inmune generada por cepas de Mtb, estudios de virulencia in-vitro, citotoxicidad, capacidad replicativa, origen, características físicas de la línea celular.	77
Tabla 1- 3. Condiciones de montaje de PCR para amplificación de los DR en cepas de Mtb.....	85
Tabla 1- 4. Condiciones para montaje de PCRs multiplex para MIRU-VNTR.	86
Tabla 1- 5. Protocolo térmico GenoType® MTBDRplus 2.0.....	87
Tabla 1- 6. Concentraciones de antibióticos para el método de detección fenotípica de resistencia a antibióticos BACTEC™ MGIT™ SIRE.	88
Tabla 1- 7. Número de animales a infectar en experimento de inmunopatología.....	91
Tabla 1- 8. Número de ratones a infectar en experimento de co-habitación.....	91
Tabla 1- 9. Número de ratones a infectar en experimento de RNA-seq	91
Tabla 1- 10. Consolidado de número de ratones a infectar en los experimentos por duplicado	91
Tabla 1- 11. Número mínimo de animales requeridos (6 animales) para asegurar la cantidad necesaria de muestras que nos permitan hacer los experimentos.....	92
Tabla 1- 12. Relación de organelos celulares observados por MET para cada aislamiento clínico.	106
Tabla 1- 13. Relación de la cantidad y calidad de las muestras enviadas a RNA-seq del hospedador, ratones Balb/c infectados con cepas Beijing	120
Tabla 1- 14. Genes diferencialmente expresados a los 14 días PI en pulmones de ratones infectados con 323-Beijing-Like.....	128
Tabla 1- 15. Genes diferencialmente expresados a los 14 días PI en pulmones de ratones infectados con 391-Beijing-Clásico.	136
Tabla 2- 1. Relación de la cantidad y calidad de las muestras enviadas a secuenciación de transcriptoma completo para Mtb a partir de pulverizados de pulmones infectados con aislamientos clínicos genotipo Beijing	175
Tabla 2- 2. Relación de resultados de electroforesis capilar para muestras provenientes de ratones infectados con 323 Beijing-Like.	176
Tabla 2- 3. Relación de resultados de electroforesis capilar para muestras provenientes de ratones infectados con 391 Beijing Clásico.....	177
Tabla 2- 4. Tamaño de inserto y concentración de las librerías genómicas obtenidas a partir de RNA de pulmones de ratones infectados con 323 Beijing-Like.	179
Tabla 2- 5. Tamaño de inserto y concentración de las librerías genómicas obtenidas a partir de RNA de pulmones de ratones infectados con 391 Beijing-Clásico.	180
Tabla 2- 6. Listado de genes sobreexpresados de Mtb 323 Beijing-like al día 14 vs 3 PI.....	188

Tabla 2- 7. Listado de genes sobreexpresados de Mtb 391 Beijing- Clásico al día 14 vs 3 PI.	200
Tabla 2- 8. Listado de genes de Mtb 391 Beijing-Clásico sobreexpresados al día 28 vs día 14 PI.	203
Tabla 2- 9. Listado de genes de Mtb 391 Beijing-Clásico expresados negativamente al día 28 vs día 14 PI	204

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
TB	Tuberculosis
MDR	Resistencia Múltiple a medicamentos de primera Línea Isoniacida y Rifampicina
XDR	Resistencia extendida a medicamentos. Resistencia a Isoniacida y Rifampicina y por lo menos a un Aminoglucósido y una Quinolona
X-XDR	Cepas resistentes a todos los medicamentos de primera y segunda línea
INH (H)	Isoniacida
RIF (R)	Rifampicina
FQ	Fluoroquinolonas
AMK	Amikacina
KAN	Kanamicina
CAP	Capreomicina
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida
MTBC	Complejo <i>M. tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
G+C	Guanina + Citocina
CO2	Dióxido de Carbono
RFLP	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
IS6110	Secuencia de Inserción 6110
MIRUS	Unidades Repetitivas Intergénicas de Micobacterias
VNTR	Unidades Variables Repetidas en Tandem
ATCC	American Type Culture Collection
DNA	Desoxirribonucleic Acid
WGS	Whole Genome Sequencing (Secuenciación de Genoma Completo)
NGS	Next Generation Sequencing (Secuenciación de próxima generación)

Abreviatura	Término
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas Regularmente Interespaciadas).
SNPs	Single Nucleotide Polimorphism (Polimorfismos de Único Nucleótido)
Indels	Inserciones/Deleciones
DR	Direct repeats (Repeticiones Directas)
LSP	Long Sequence Polimorphisms (Polimorfismos de Secuencia Larga).
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
TbD1	Tuberculosis Differentiation 1 (Región de diferenciación de Tuberculosis 1)
mmPL7	Mycobacterial Membrane Protein Large 7 (Proteína de Membrana Micobacteriana Larga 7)
PDIM	Ftiocerol Dimicocerosato
RD	Región de Diferenciación
PKS	Policétido Sintasa
Th2	T helper 2 (Respuesta T ayudadora 2)
LAM	Latinoamérica y Mediterráneo
BCG	Bacilo de Calmette Guerin
MNT	Mycobacterias no Tuberculosas
CDC	Centre for Disease Control (Centro de Control de Enfermedades)
NTF	Noise Transfer Function (Función de Transferencia de Ruido)
CC	Clonal Complex (Complejo Clonal)
PE-PPE	Pro-Glu (PE) and Pro-Pro-Glu (PPE)
PE-PGRS	Polymorphic GC-rich sequence
MOI	Multiplicidad de infección
RPMI	Medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute
RPMIc	Medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute completo
MET	Microscopía Electrónica de Transferencia
V	Vacuolas
CW	Pared Celular
M	Mesosomas
R	Ribosomas
S	Septo
PG	Granulos de Polifosfato
N	Nucleoide
MP	Membrana Plasmática
E	Elongación

Abreviatura	Término
MD	Depósitos de metales pesados
P	Polo
IM	Material Intracelular
RAI	Red de Apoyo a la Investigación
RIN	RNA Integrity Number
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
PI	Post-Infección
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
DE	Diferencialmente Expresados

Introducción

La tuberculosis (TB) continúa siendo un grave problema de salud pública a nivel mundial. Es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que frecuentemente causa enfermedad pulmonar, es una enfermedad crónica adquirida principalmente por vía aérea, sin embargo, esta se puede presentar de forma extra pulmonar causando TB en casi todos los órganos del cuerpo, siendo un patógeno altamente exitoso infectando cerca de dos billones de personas a nivel mundial [1]. El bacilo es expulsado al medio ambiente por personas con TB activa en gotas de saliva producidas por tos o estornudos, estas bacterias infectan a nuevas personas a partir de la inhalación de estas y aunque solo del 5 al 10% de los pacientes infectados desarrollan la enfermedad, se estima que cerca de 1,7 millones de personas infectadas con Mtb desarrollan TB en algún momento de su vida. Adicionalmente, existen condiciones asociadas al paciente que se consideran factores de riesgo para la presentación de TB, que hacen que este número se pueda incrementar dadas las comorbilidades que deprimen el sistema inmunitario del hospedador tales como: desnutrición, alcoholismo, tabaquismo y enfermedades como el cáncer, diabetes, VIH-SIDA y otras enfermedades inmunosupresoras; así como condiciones socio-económicas asociadas a la presentación de esta enfermedad tales como: pobreza, hacinamiento, desplazamiento, no acceso a servicios de salud y por ende el no diagnóstico oportuno y el no tratamiento efectivo; todos estos factores configuran el cuadro epidemiológico de esta enfermedad [2,3].

En el inicio de la década de los 90s, la TB se declaró como una emergencia sanitaria mundial por la OMS y es la única emergencia mundial que permanece vigente, debido a la circulación de cepas multidrogorresistentes (MDR), resistentes a rifampicina (R) e isoniazida (H), principales medicamentos de primera línea; cepas extremadamente o extensivamente resistentes (XDR), que además de ser resistentes a R e H, también son resistentes a cualquier fluoroquinolona y al menos un fármaco adicional del grupo A (Fluoroquinolonas, Bedaquilina y Linezolid) [4] medicamentos de segunda línea; cepas totalmente resistentes o ultrarresistentes (XXDR), que son resistentes a todos los medicamentos antituberculosos conocidos. Además la aparición de la pandemia del VIH-SIDA ha empeorado la situación, por lo que la TB continua como una de las principales enfermedades infecciosas que causa una alta morbilidad y la más alta mortalidad a nivel mundial debida a un solo agente infeccioso [5,6].

I.I. Datos históricos de la TB

De acuerdo con los resultados de la búsqueda de material genético de Mtb, en restos óseos momificados de personas pertenecientes a diferentes culturas antiguas, se han logrado hacer inferencias sobre los orígenes de Mtb y su asociación con TB en humanos y animales. Se cree que

esta bacteria se encuentra en la tierra desde hace más de 150 millones de años y se postula que el ancestro de Mtb co-evolucionó con los primeros homínidos hace alrededor de tres millones de años [7,8]. Se han identificado ácidos nucleicos del patógeno en momias provenientes de diferentes culturas con antigüedades de 2000 a 5000 años [9]; en Colombia se han identificado ácidos nucleicos de Mtb en huesos y dientes de cadáveres prehispánicos que datan de los años 1200 a 1600 DC. Como hallazgo interesante, los restos de estas personas presentaban lesiones típicas de TB en los huesos o mal de Pott [7,10].

Cuando se inició la descripción de la TB en la antigüedad, esta se llamó “tisis” y fue descrita por Hipócrates quien describió la enfermedad como fatal, fácil de contagiarse y que ocurría en personas de entre 18 y 35 años, la creencia era que esta enfermedad era de origen genético, sin embargo, Aristóteles consideraba la enfermedad como contagiosa. Posteriormente el mismo Hipócrates hizo una descripción más precisa en la que observó que la “tisis” causaba ulceraciones en los pulmones causando dolor de pecho, tos, fiebre y expectoración con pus [11]. A inicios del siglo XVII se presentó un brote epidémico en Europa “La gran plaga Blanca” y tuvo una duración de cerca de 200 años y se constituyó como la principal causa de muerte de la época en dicho continente. La mayor tasa en la mortalidad por TB en el continente americano fue de 9000 muertes/100.000 habitantes en población nativa americana hacia 1886, gracias a que fueron obligados a vivir en confinamiento, superando con creces las tasas epidémicas en el continente europeo [12]. Aunque inicialmente se creyó que la TB fue introducida al continente americano con la llegada de los conquistadores europeos, hoy se sabe que la enfermedad se encontraba en el continente mucho antes gracias a la presencia de DNA del patógeno encontrada en restos óseos de poblaciones nativas del continente [13,14].

También en el siglo XVII se hacen las primeras descripciones patológicas y anatómicas de la TB, se señala la presencia de tubérculos o granulomas en los pulmones y se nombra la enfermedad oficialmente como “Tuberculosis” describiendo además tres fases de la enfermedad, las cuales se denominaron en su momento como: (i): Inflamación, (ii): Ulceración y (iii): Tisis [15]. Robert Koch en 1882 hizo la descripción etiológica de la TB en su más famosa presentación en Berlín (Die aetiologie der Tuberculose). Cultivó la bacteria en un medio de cultivo de papa y agar, desarrolló nuevas tinciones bacterianas basadas en azul de metileno [16,17]; logró reproducir la enfermedad en cobayos y gracias a esto pudo establecer sus clásicos postulados que permiten implicar el origen infeccioso de las enfermedades, los publicó en 1890 [18]. Koch ganó el premio nobel de medicina en 1905 [19]. Después de establecer el origen infeccioso de la TB, en 1921 se realizó la primera aplicación de la vacuna BCG gracias a la atenuación de la virulencia de *Mycobacterium bovis* realizada por Calmette y Guérin en Francia [20], la cual hace parte de los esquemas actuales de inmunización en niños, esta vacuna evita la presentación de formas graves de la enfermedad como la TB meníngea. En 1943 inicia la era de la quimioterapia, a partir de la purificación de la estreptomycinina obtenida de cultivos del hongo *Streptomyces griseus*, posteriormente se desarrollaron otros antibióticos como el ácido p-aminosalicílico en 1949, isoniazida en 1952, pirazinamida en 1954, cicloserina en 1955, etambutol en 1962 y rifampicina en 1963 [21].

I.II. Tuberculosis en el mundo

Para el 2019 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que se presentaron en el mundo 10.0 millones de casos incidentes de TB y 1.2 millones de muertes debidas a la enfermedad en pacientes VIH negativos y 250.000 adicionales en pacientes VIH positivos, haciendo de esta enfermedad un grave problema de salud pública a nivel mundial, situación que se empeora por el aumento de la circulación de bacterias resistentes a antimicrobianos de primera y segunda línea. Para este mismo año se estimó que 500.000 personas con TB se encontraban infectadas con bacterias monorresistentes a la rifampicina y el 78% de estos pacientes estaban infectados por cepas con cepas (MDR), entre los casos de MDR-TB, se estimó que el 8.5% de estos pacientes estaban infectados con cepas XDR-TB [22]. En la **Figura I-1.**, se muestra el mapa mundial de incidencia de TB para el 2019 en el que se observa que los países con mayores tasas de incidencia se encuentran en el África subsahariana con incidencias de más de 300 casos/100.000 habitantes en algunos países, así como en países del pacífico occidental; en América latina, para este año, los países con mayores incidencias fueron Perú y Ecuador con incidencias de 100-299/100.000 habitantes, Colombia se mantiene como un país de incidencia media de TB con 25-99 casos/100.000 habitantes [23].

Estimated TB incidence rates, 2019

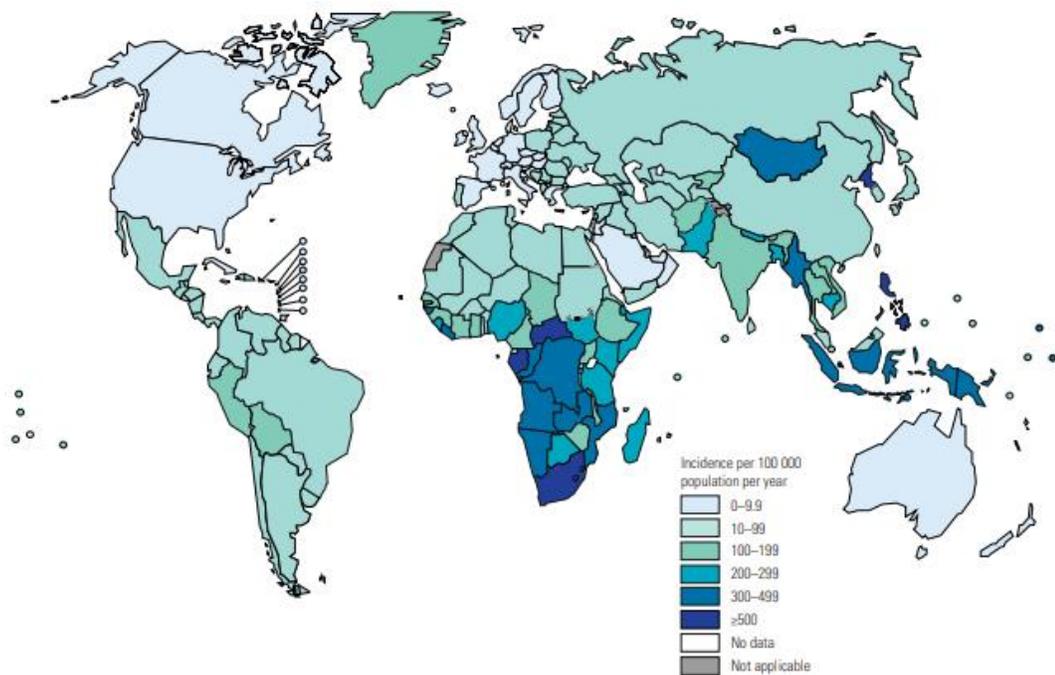


Figura I- 1. Tasas de Incidencia estimadas por la OMS por país a nivel mundial año 2019. Tomado de WHO TB report 2020 [22].

I.II.I. Tuberculosis en Colombia

De acuerdo con los datos de la OMS, Colombia es considerado un país con carga media alta de la enfermedad. Del año 2013 al año 2019, se ha evidenciado un aumento en la tasa de incidencia de 24.46 casos /100.000 habitantes en 2013 a 27.7 en 2019. En el año 2019 se notificaron al sistema de vigilancia en salud pública (Sivigila) 15.034 casos de TB de todas las formas, de los cuales 13947 fueron casos nuevos, para una incidencia nacional de 27.7 casos /100.000 habitantes. Las tasas de incidencia más altas se presentaron en: Amazonas (66,47), Risaralda (53,75), Meta (46,56), Barranquilla (44,09) y Buenaventura (43,70). Mientras que los departamentos con mayor carga de la enfermedad para 2019 fueron: Antioquia (2587 casos), Valle del Cauca (1816 casos) y Bogotá D.C. (1140 casos) [24].

El 64.79% de los casos se presentaron en el sexo masculino. El mayor número de casos se presentó en el grupo entre 25 a 34 años (3254 casos), seguido por el grupo de 65 y más años (3090 casos). Según el tipo de TB predomina la forma pulmonar con el 83.3% de los casos, mientras que la forma de TB extrapulmonar mas frecuente fue la TB pleural (44%). La coinfección TB-VIH fue del 11.9% [24] .

Al año en Colombia mueren alrededor de 1000 personas por TB; se estima que muchos de los casos de la enfermedad se concentran en población vulnerable: Pacientes VIH+ (11 de cada 100), indígenas (5 de cada 100), habitantes de calle (4 de cada 100) y reclusos (6 de cada 100) [25]. La tasa de incidencia nacional pasó de ser 25/100.000 habitantes en 2010 a ser de 26/100.000 habitantes en 2019, en la **Figura I-2.** se muestra el mapa de las tasas de incidencia de los departamentos para el 2018 [26].

En cuanto a la resistencia a medicamentos, la OMS estimó que para el 2017 se reportaron en el país 420 casos de MDR-TB, pero se diagnosticaron menos del 60% de los casos, teniendo así un grave problema de subregistro en el país. Se estima que para el 2050 el 25% de las muertes causadas por bacterias resistentes a antibióticos serán ocasionadas por Mtb, pues es el agente etiológico causante de enfermedades respiratorias con mayores tasas de resistencia [27].

Tasa de incidencia de tuberculosis por entidad territorial,
Colombia, 2018



Figura I- 2. Incidencia de tuberculosis en Colombia año 2018. Fuente Sivigila [28]

I.III. Taxonomía de la Familia Mycobacteriaceae

El género *Mycobacterium* se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma: Dominio: Bacteria, Filo: *Actinobacteria*, Orden: *Corynebacteriales*, Sub-Orden: *Corynebacterineae*, Familia: *Mycobacteriaceae*. El filo *Actinobacteria*, está compuesto principalmente por bacterias Gram-positivas con alto contenido de G+C en sus genomas [29]. Una forma clásica de hacer la clasificación de las especies de este género es por las tasas de crecimiento de las bacterias dividiéndolas en: i) Rápidas crecedoras (Requieren menos de 7 días para formar colonias visibles) y ii) Lentas crecedoras: (Requieren más de 7 días para formar colonias visibles) [30].

Clásicamente, la clasificación de especies del género *Mycobacterium* se basaba en las diferencias en la secuencia de la subunidad ribosomal *16S*, sin embargo, este marcador genético confiere poca variabilidad entre las especies, es un gen pequeño de aproximadamente 1500 pb y contiene las regiones hipervariables A y B ubicadas en el primer tercio del gen, sin embargo la región que confiere mayor variabilidad es la región hipervariable A, gracias a la cual se han clasificado la mayoría de las especies [31]. En la región hipervariable B se pueden presentar tres tipos principales de variaciones: en la hélice 18 (i): Una inserción de 14 nucleótidos, (ii): Una inserción de 12 nucleótidos o (iii): Ninguna Inserción [32]. Gracias a este blanco molecular, se lograron diferenciar muy bien las bacterias lentas crecedoras de las rápidas crecedoras, la mayoría de las rápidas crecedoras tienen una

hélice 18 muy corta sin secuencias de inserción, mientras que las lentas crecedoras poseen una inserción de 12 nucleótidos en la región hipervariable B, algunas especies lentas crecedoras como *M. terrae* y *M. nonchromogenicus* tienen una inserción de 14 nucleótidos [33,34].

En resumen, usando el gen 16S como marcador polimórfico para clasificación de especies tenemos que: (i): Una hélice 18 corta es marcador genético de las bacterias rápidas crecedoras. (ii): Hay un pequeño grupo de especies lentas crecedoras que están relacionadas con el complejo *M. simiae* las cuales comparten la misma secuencia en la región hipervariable B con una secuencia corta en esta región. (iii): La región hipervariable B con una inserción de 12 nucleótidos es característico de las Micobacterias lentas crecedoras. (iv): Un pequeño grupo de bacterias lentas crecedoras relacionadas con el complejo *M. terrae* tienen una inserción más larga de 14 nucleótidos en la región hipervariable B [34,35].

Es importante resaltar que la clasificación taxonómica de este y muchos otros géneros de organismos eucariotas y procariotas está en constante cambio de acuerdo con el análisis de nuevos blancos moleculares y con el refinamiento de las técnicas de secuenciación y análisis de genomas; en la actualidad y según la más reciente clasificación taxonómica del género basada en la secuenciación de 150 cepas del género en donde se analizaron 1941 proteínas core (nucleares o centrales) específicas del género *Mycobacterium* y 136 proteínas core del filo Actinobacteria; se logró establecer que este género está constituido por cinco grupos monofiléticos o clados principales: “*Tuberculosis-Simiae*,” “*Terrae*,” “*Triviale*,” “*Fortuitum-Vaccae*,” y “*Abscessus-Chelonae*” y cuatro nuevos miembros *Mycolicibacter* gen. nov. (clado “*Terrae*”), *Mycolicibacillus* gen. nov. (clado “*Triviale*”); *Mycolicibacterium* gen. nov. (clado “*Fortuitum-Vaccae*”), y *Mycobacteroides* gen. nov. (clado “*Abscessus-Chelonae*”). Adicionalmente el género *Mycobacterium* es el género tipo de la familia Mycobacteriaceae y a él pertenecen las principales especies causantes de enfermedad en el ser humano tales como *M. tuberculosis* y *M. leprae*. [29].

Estos a su vez se siguen agrupando en LENTOS CRECEDORES (*Mycolicibacter* gen. Nov. Clado “*Terrae*”, *Mycolicibacillus* gen. Nov. Clado “*Triviale*” y el género enmendado *Mycobacterium* clado “*Tuberculosis-simiae*”) y RÁPIDOS CRECEDORES (*Mycobacteroides* gen. Nov. Clado *Abscessus-chelonae* y *Mycolicibacterium* gen. Nov. Clado “*Fortuitum-Vaccae*”).

I.IV. Generalidades de la Familia *Mycobacteriaceae*

La Familia *Mycobacteriaceae* está conformada por los géneros: *Mycobacterium*, *Mycolicibacter* gen. nov., *Mycolicibacterium* gen. nov., *Mycolicibacillus* gen. nov., *Mycobacteroides* gen. nov. y *Amycolicoccus* [29].

Esta familia está constituida por bacilos rectos o ligeramente curvos ácido alcohol resistentes, aerobios o microaerófilos, tienen un tamaño de 0.2-0.6 x 1 -10 uM, pertenecen al filum Actinobacteria y las especies patógenas representativas del género son *M. tuberculosis* y *M. leprae*

[29]. No poseen pilis ni flagelos, lo que hace que sean inmóviles, no tienen esporas, pero tienen un alto número de gránulos citoplasmáticos; no se colorean con la coloración de Gram, aunque pueden ser considerados como Gram positivos, tienen alto contenido de lípidos y ácidos micólicos en la pared celular, se consideran bacilos ácido alcohol resistentes [26]. Son aerobios o microaerófilos (requieren oxígeno para sobrevivir), si se someten a crecimiento en presencia de 5-10% de CO₂ su crecimiento se ve favorecido y la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C [36,37]. Mtb es una especie de crecimiento lento, crece después de 7 días de incubación, debido a que su tiempo de generación o de duplicación es de 24 a 48 horas, por lo que para observar colonias visibles en medios de cultivo sólidos se debe esperar de dos a ocho semanas [38].

I.IV. I. Pared celular de las Micobacterias

La pared celular de las micobacterias es una de las más complejas. Se caracteriza por tener en su estructura de dentro hacia afuera: (i): una capa de peptidoglicano (formada por cadenas de N-acetilglucosamina, y residuos de N-glicosilmurámico), (ii): Arabinogalactano; (iii): Ácidos micólicos, que conforman la micomembrana o membrana externa de los ácido alcohol resistentes y (iv) cápsula presente en las micobacterias patógenas [39]. El peptidoglicano está unido covalentemente al Arabinogalactano el cual actúa como único sitio de unión de los ácidos micólicos formando el core o centro de la pared celular formada por el complejo ácido micólico-arabinogalactano-peptidoglicano; entretejidos en esta estructura se unen diferentes lípidos libres como los fosfatidil inositol manosidos, los lipomananos, y los lipoarabinomananos. Se conectan capas adyacentes de cadenas de glicano conectadas por péptidos pequeños con la secuencia l-alanil-d-isoglutamil-meso-diaminopimelato-d-alanil-d-alanina y se unen al residuo d-lactoil de cada ácido N-acetilmurámico, los péptidos que salen de las cadenas de glicano, se entrecruzan con el grupo carboxilo de los d-Ala en la cuarta posición y en el extremo del grupo amino del mesodiaminopimelato en la tercera posición, en la **Figura I-3** se muestra esquemáticamente la estructura de la pared celular micobacteriana con la descripción de los lípidos que la conforman [40]. Además, entre la membrana citoplasmática y la pared bacteriana se ha podido visualizar el periplasma y porinas en la membrana externa, por lo que la pared de las bacterias ácido alcohol resistentes es más gram negativa que gram positiva.

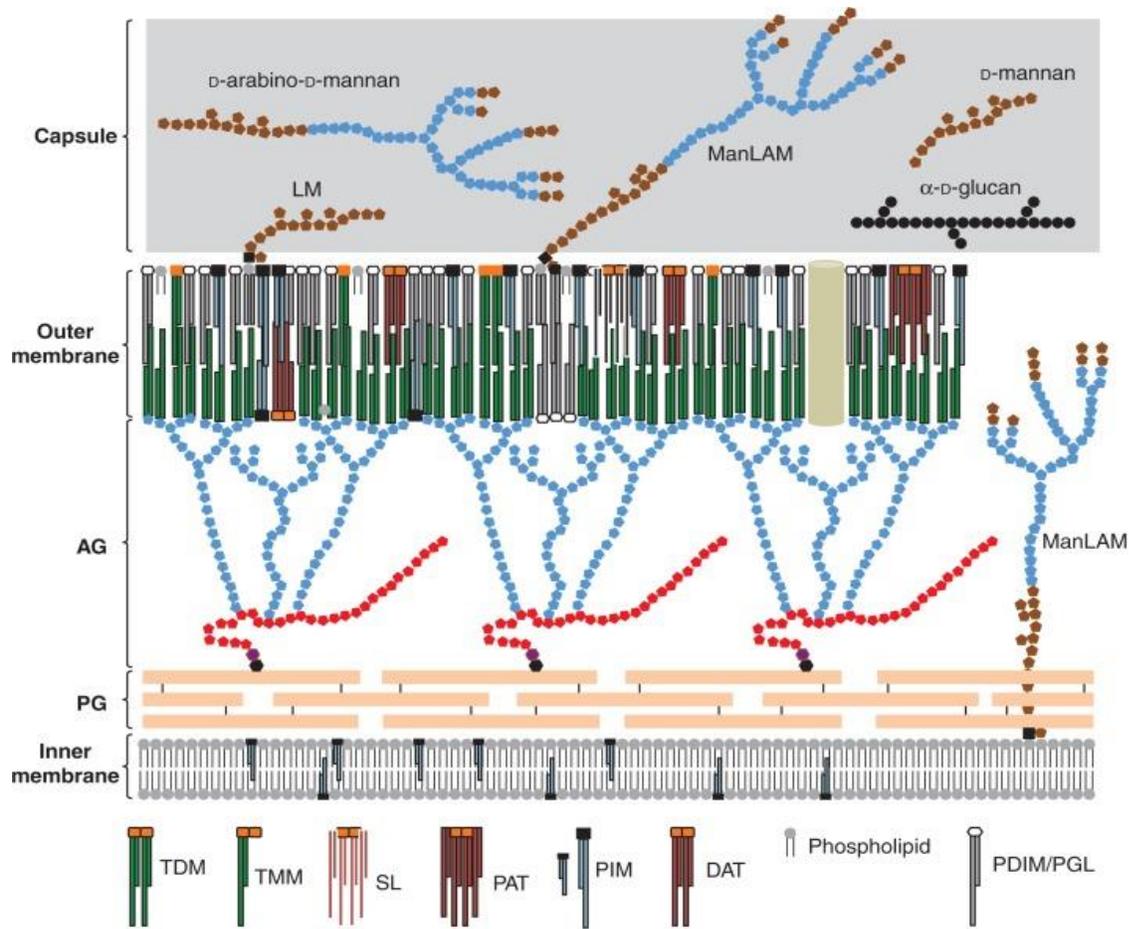


Figura I- 3. Esquema de estructura de la pared celular de las Micobacterias. Los símbolos azul claro representan residuos de arabinosa, los símbolos rojos representan residuos de galactosa, los símbolos cafés representan residuos de manosa y los círculos negros representan residuos de glucosa. El d-arabino-d-mannano, el d-glucano y el d-mannano son polisacáridos capsulares. Las cadenas de ácido micólico se muestran en verde oscuro. LM: lipomanano; ManLAM: lipoarabinomanano protegido con manosa; AG: arabinogalactano; PG: peptidoglicano, TDM: Trealosa Dimicolatos, TMM: Trealosa Monomicolatos, SL: Sulfolípidos, PAT: Poliactilrealosa, PIM: Fosfatidil Inositol Manosidos, DAT: 2,3 di-O-aciltrealosa, PDIM: Ftiocerol dimicocerosatos, PGL: Glucolípidos fenólicos, MPM: Manosil- β -1-fosfomicocétido. Tomado de Jackson M., 2014 [41].

I.V. Complejo *M. tuberculosis* MTBC

La TB es causada por los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), la especie Mtb es la que se aísla con mayor frecuencia en humanos. Por mucho tiempo se creyó que esta enfermedad era causada por un patógeno de características únicas, ya que su genoma era reconocido como altamente conservado y sin evidencia de transferencia horizontal de genes; sin embargo, actualmente se sabe que la variante lisa de MTBC *M. canetti*, considerada como el miembro más ancestral del complejo, lleva a cabo procesos de transferencia horizontal de genes y procesos de recombinación entre cepas diferentes, confiriéndole una mayor variabilidad genética con respecto a los demás miembros del complejo. Hasta el momento, no hay evidencia de transmisión humano-

humano de esta bacteria, de hecho, solo se han reportado alrededor de 60 casos únicamente en el continente africano, sugiriendo que el origen de esta bacteria es ambiental, aunque aún no se ha logrado identificar un reservorio específico. A pesar de que *M. canetti* tiene la facultad de llevar a cabo la transferencia horizontal de genes, no se ha encontrado evidencia que lo puedan hacer otros miembros del MTBC, lo que impide que esta sea una fuente de variabilidad genética para los miembros de este complejo [42,43].

Los miembros del complejo MTBC pueden ser clasificadas en dos grupos: (i) Los adaptados a humanos tales como *Mtb sensu stricto*, cuya diferenciación entre aislamientos clínicos está dado por sutiles diferencias genómicas que dan origen a los linajes y *M. africanum* [44], que circula únicamente en el continente africano, y este a su vez se divide en dos grupos de acuerdo con sus características bioquímicas y geográficas, *M. africanum* subtipo I con propiedades similares a *M. bovis* y *M. africanum* subtipo II, con propiedades similares a *M. tuberculosis* [45] y (ii) Miembros adaptados a animales tales como: *M. microti* [46], *M. bovis* [47], *M. pinnipedi* [48], “*M. mungi*” [49], “*M. orygis*” [50], “*M. suricattae*” [51], “Chimpanzee bacillus” [52], *M. caprae* [53] y “*M. canetti*” [54] de vida libre. Todas estas especies conforman el llamado MTBC. Las especies adaptadas a animales pueden causar enfermedad en los humanos a partir de transmisión zoonótica. Sin embargo, en general la clasificación taxonómica de las especies del género *Mycobacterium* está sometida a constantes modificaciones y actualizaciones, de acuerdo con los análisis genéticos y la variación en sus hallazgos. La más reciente publicación de Riojas MA y cols., en 2018 en la *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [55], en la cual, basados en la secuenciación de genomas completos de cepas ATCC de cada especie del complejo y posteriores ensayos de hibridación digital DNA-DNA para la determinación de identidad de Nucleótidos Promedio y cálculo de distancias filogenómicas entre otros análisis, propusieron la unión de las especies del MTBC *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. pinnipedii* como sinónimos heterotípicos de *Mtb* y, recomiendan el uso del término *var* para diferenciarlas, mientras que las especies “*M. canetti*”, “*M. mungi*”, y “*M. orygis*” se deben considerar como cepas de la especie *Mtb* pero denominadas de la misma forma, ya que estas tres últimas no han sido publicadas adecuadamente para su validación. Por lo tanto, se propone nombrar los miembros del complejo MTBC de la siguiente manera: *M. tuberculosis* var. *Tuberculosis*, *M. tuberculosis* var *africanum*, *M. tuberculosis* var *bovis*, *M. tuberculosis* var *BCG*, *M. tuberculosis* var *caprae*, *M. tuberculosis* var *microti*, *M. tuberculosis* var *pinnipedii*, *M. tuberculosis* var *canettii*, *M. tuberculosis* var *mungi*, *M. tuberculosis* var *orygis*, *M. tuberculosis* var *uricattae*, *M. tuberculosis* var *dasie*, *M. tuberculosis* var *chinnazee* [55].

El patógeno *Mtb* inició su expansión clonal en el continente africano y co-evolucionó con el hombre [42,56]. Inicialmente se creyó que MTBC se originó en hospederos animales, sin embargo, con la disponibilidad de metodologías de secuenciación de nueva generación (NGS) y la secuenciación de genomas completos (WGS), se ha logrado determinar que las cepas ancestrales de MTBC, se separaron filogenéticamente de las cepas adaptadas a animales antes de la transición demográfica

neolítica, es decir, antes del inicio de las migraciones humanas desde el continente africano a otros continentes [57], dando como resultado la dispersión de algunos miembros del MTBC y la adquisición de cierta especificidad en cuanto al predominio de determinados genotipos en determinadas regiones geográficas; sin embargo, este fenómeno se ha visto alterado por la capacidad de las personas para navegar y comerciar, estrategias que les ha permitido interactuar, con poblaciones distantes, lo que se ve reflejado en la adaptación bacteriana a grupos poblacionales, dando paso a la diferenciación de las cepas bacterianas en grupos que dan origen a los linajes, sublinajes, familias y genotipos [58,59]. De hecho, la presencia de material genético de MTBC, en lesiones óseas de momias pertenecientes a diferentes culturas, que datan de siglos de antigüedad y que provienen de civilizaciones egipcias, europeas, asiáticas, africanas y precolombinas en el continente americano, soportan esta observación que ha sido ampliamente descrita en la literatura [60] indicando una posible co-evolución con el hombre [14,61,62].

A pesar de la estabilidad del genoma de Mtb debido, entre otras razones, a la muy baja capacidad de intercambio de material genético intra-especie e inter-especie [63] y a la limitación en el proceso de transducción, debido a que el locus CRISPR (*Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas*) restringe la adquisición de DNA a partir de bacteriófagos [64]. Llama la atención la evidencia existente que indica que pequeñas variaciones como mutaciones (SNPs, deleciones e inserciones principalmente) y cambios a nivel regulatorio, muchas veces inducidos por presiones selectivas ambientales o inducidas por los mismos humanos, se produzcan grandes variaciones en el fenotipo bacteriano. Gracias a las observaciones realizadas a partir de diversos estudios en animales [65,66], en modelos celulares [67,68] y en estudios en humanos [69,70], se ha podido evidenciar la variabilidad en el fenotipo de la enfermedad, mostrando la existencias de cepas hiper, hipo y normovirulentas [65,71] variabilidad en el perfil de resistencia a antibióticos aun en cepas del mismo genotipo y presencia de las mismas en una población circunscrita [72,73], se concluye que a pesar de la alta conservación en los genomas de las distintas cepas, los cambios puntuales que se producen impactan significativamente el fenotipo de la bacteria y de la enfermedad en los modelos evaluados.

Diferencias en la virulencia y en el perfil de resistencia, impactan negativamente en la eficacia del tratamiento, lo que obstaculiza alcanzar la meta de la disminución del número de casos incidentes y prevalentes de TB en el mundo y por ende las muertes por esta enfermedad, que son desencadenadas por los diferentes genotipos de Mtb anteriormente mencionados [56].

I.V. I. Métodos de tipificación molecular, evolución y clasificación del complejo *M. tuberculosis*

La Epidemiología Molecular de Mtb, ha sido útil para establecer diferencias a nivel genético y determinar así la dinámica de transmisión de la enfermedad. Las técnicas de epidemiología molecular permiten establecer transmisión reciente de cepas de Mtb, reactivaciones endógenas y reinfecciones, pseudoinfecciones, brotes, evaluación de los programas de TB y georreferenciación

de linajes. El conocimiento generado a partir de este campo, ha sido muy útil en los programas de salud pública sobre todo en países desarrollados [74].

Las técnicas de tipificación de Mtb más usadas a nivel mundial son: RFLP-*IS6110* “Restriction fragment Length Polymorphism” (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción), Spoligotyping (espoligotipado) y MIRUS-VNTR “Mycobacteria Intergenic Repetitive Units - Variable Number Tandem Repeats” (Unidades Repetitivas Intergénicas de Micobacterias - Unidades Variables Repetidas en Tandem). El nivel de resolución de cada metodología va a depender de la región genómica a tipificar y de la cobertura del genoma por cada una de ellas.

RFLP-*IS6110*: esta técnica se basa en el polimorfismo generado por la diferencia en la longitud de los fragmentos de ADN digeridos con una enzima de restricción. En el caso de *M. tuberculosis*, su aplicación en tipia utiliza la detección de la secuencia *IS6110*. Hasta hace poco tiempo fue considerada como el método estándar o prueba de referencia para la tipia del complejo Mtb, cuya metodología fue estandarizada por Van Embden JD, 1993 [75]. La variabilidad en el número de copias de *IS6110*, así como su localización en el cromosoma de Mtb, genera un alto polimorfismo entre las cepas de diferentes orígenes, lo cual posibilita la diferenciación [76]. El polimorfismo encontrado entre las diferentes cepas puede explicarse por la capacidad de transposición del elemento, se asume que una transposición “natural” ocurre raramente, lo que confiere estabilidad a un determinado patrón. Las características de especificidad de especie, estabilidad en el tiempo y alto grado de polimorfismo son las 3 características requeridas para permitir su utilización en Epidemiología. Se han descrito cepas de Mtb carentes de *IS6110*. y también una baja proporción de aislados con escasas copias de *IS6110*. En ambos casos el poder discriminatorio del método disminuye por lo que se recomienda utilizar otros métodos para la diferenciación de estos aislados [77,78].

Las principales desventajas de esta metodología son: la gran cantidad de DNA requerido, la dificultad en su realización, la baja capacidad de comparación inter-laboratorios y el bajo poder discriminatorio en aislamientos clínicos con pocas copias de la *IS6110* [79].

Spoligotyping y MIRUS-VNTR son dos métodos de tipificación basados en PCR, por lo que requieren poca cantidad de DNA genómico. La región polimórfica que se tipifica con spoligotyping es el locus DR (Direct Repeats) descrito por Kamerbeek y cols., en 1997 [79]. Actualmente sabemos que el locus DR en Mtb pertenece a los Locus CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) [80], la presencia de estos locus en los genomas bacterianos fue descrito por Ishino y cols., en 1987 en *E. coli* a partir de la clonación y la secuenciación del gen *iap* responsable de la conversión de las isoformas de la enzima fosfatasa alcalina [81], al realizar el anterior proceso notaron la presencia de regiones repetidas de 29 nucleótidos espaciadas por regiones no repetidas y, gracias a la subsecuente secuenciación de varios genomas bacterianos, estas estructuras fueron reconocidas como regiones CRISPR. Al determinar su estructura y función, concluyeron que estas

regiones genómicas se encuentran en número variable dependiendo la especie y que esta región actúa como una especie de sistema inmune bacteriano, ya que una vez un fago infecta una bacteria, se incorporan los ácidos nucleicos de dicho fago al locus como región no repetida o espaciador e impide una nueva infección actuando como un “sistema inmune de memoria” bacteriano [64]. La tipificación del locus DR se lleva a cabo a partir de la amplificación por PCR y posterior hibridación con sondas complementarias de las secuencias espaciadoras fijadas en una membrana de nylon por medio de una hibridación reversa, lo que permite identificar la presencia o ausencia de los espaciadores 1 a 43 del locus. Estos resultados pueden ser fácilmente digitalizados con códigos binarios lo que facilita la comparación de resultados entre laboratorios y su principal beneficio es la clasificación en linajes y familias de aislados de Mtb. Sin embargo, es el método de tipificación de mas bajo poder discriminatorio, por lo que es necesario realizar otro método como MIRUS-VNTR [82]. Con respecto a la construcción de filogenias y a la determinación de relaciones evolutivas, este en un marcador muy poco robusto, ya que solo se analiza una pequeña región genómica, dando como posible resultado, la evolución convergente en las cepas analizadas, como se evidenció en un estudio que utilizó los patrones existentes de la base de datos SpolDB4 [83].

El método MIRUS-VNTR fue descrito por Supply y cols., en 1997 [84] y consiste en determinar el número de VNTRs en cada locus MIRUS. En el genoma de Mtb, existen 41 de estos locus, de los cuales 24 son los más polimórficos, inicialmente solo se utilizaba un set de 12 o 15 locus para esta metodología [84,85].

El Spolygotyping, junto con MIRUS-VNTR son las metodologías utilizadas actualmente para genotipificación. Aunque estos métodos de Epidemiología Molecular son muy útiles a nivel epidemiológico y estudios de brotes; es necesario el uso de otros marcadores genéticos para estudios de relaciones evolutivas, ya que estos generan el fenómeno de convergencia genética, ya que se basan en pequeñas regiones del genoma de Mtb, que son altamente polimórficas con altas tasas de cambio. En la **Figura I-4.**, se esquematizan los diferentes blancos moleculares usados en los métodos de epidemiología molecular para tipificación de Mtb [86].

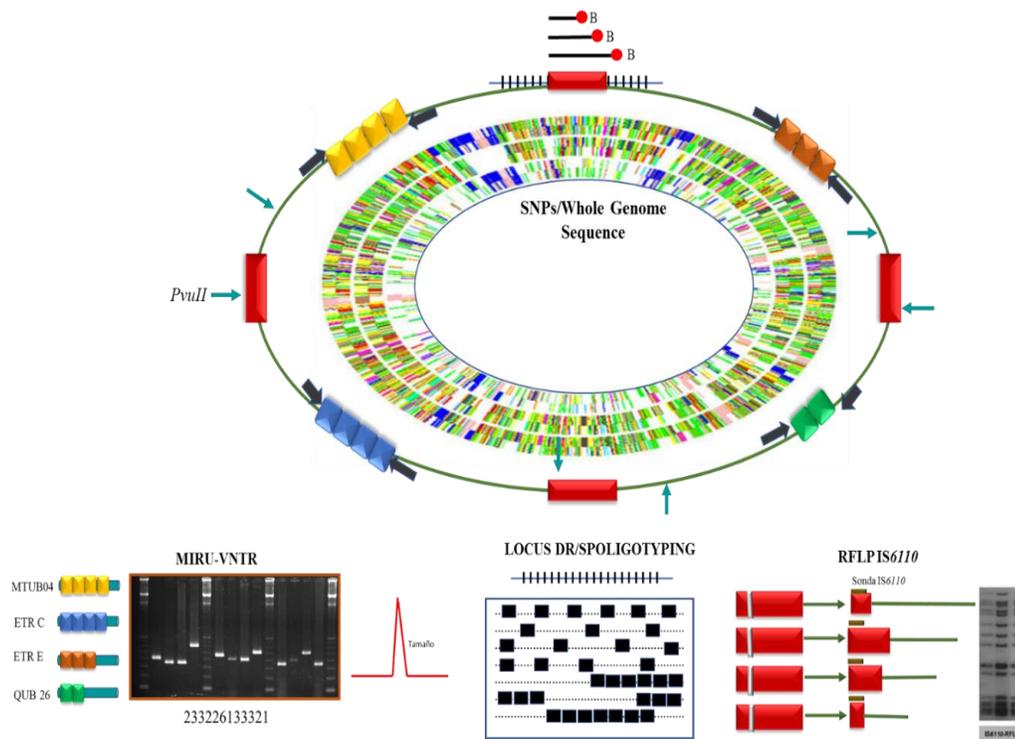


Figura I- 4. Cromosoma de *M. tuberculosis* con blancos moleculares y métodos de tipificación de cepas y aislamientos clínicos. MIRUs-VNTR, Spoligotyping, RFLPIS6110, identificación de SNPs en genomas parciales o completos. Autoría propia

Las relaciones evolutivas de MTBC han sido estudiadas y abordadas desde diferentes perspectivas y marcadores moleculares, gracias a esto, se ha logrado establecer que *Mtb* es un patógeno con una reducida variabilidad genética, y estas diferencias solo pueden ser determinadas usando métodos de diferenciación de alta resolución tales como LSP “Large Sequence Polymorphism” (Polimorfismos de secuencia larga), detectados a partir de la hibridación con un set de arreglos de DNA o por PCR, identificando deleciones largas en el genoma. Sin embargo, a pesar de la robustez de este marcador a nivel epidemiológico, no posee suficiente resolución para la diferenciación entre cepas estrechamente relacionadas. La metodología más robusta para la reconstrucción de filogenias es la tipificación de SNPs (Single nucleotide Polimorphisms) en secuencias de genomas completos, actual prueba de oro, o la identificación de SNPs en secuencias multilocus [87,88].

Actualmente se sabe que MTBC se divide en dos grandes grupos de linajes denominados “ancestrales” y “modernos”; los linajes ancestrales, no poseen una deleción genómica específica en la región *TbD1*, mientras que los modernos si poseen esta deleción [89]. En la región *TbD1* de los genomas de linajes ancestrales, se encuentra un número importante de genes de la familia *mmpL7* (Mycobacterial Membrane Protein Large 7), que codifican para proteínas micobacterianas de membrana, implicadas en el transporte de componentes de la pared celular como PDIM (Ftiocero

dimicocerosato) y policétidos específicos, como también en la expulsión de medicamentos antituberculosos al exterior de la célula, por lo que están implicadas en la resistencia a antibióticos, de tal manera que los linajes modernos pierden esta capacidad, en la **Figura I-5.**, se muestra la más reciente reconstrucción filogenética de MTBC [42].

Basándose en la reconstrucción filogenética de MTBC por SNPs, en genomas completos se determinó que existen 9 linajes filogeográficos, denominados del 1-9. Los linajes modernos, son monofiléticos, es decir que todos comparten un único ancestro común a diferencia de los linajes ancestrales. A este grupo pertenecen los siguientes linajes: **Linaje 2** (Oriente Asiático) el cual comprende el genotipo Beijing; **Linaje 3** (Oriente Africano y Centro de Asia) y el **Linaje 4** (Euro Americano). Por el contrario los linajes ancestrales son parafiléticos, a este grupo pertenecen: el **Linaje 1** (Oriente Africano, Filipinas y Borde del Océano Índico); **Linaje 5** (Occidente Africano 1); **Linaje 6** (Oeste Africano 2); **Linaje 7** (**Etiopia**) Anteriormente, usando LSPs y secuenciación multilocus, no se había logrado identificar el **Linaje 7** [42,74].

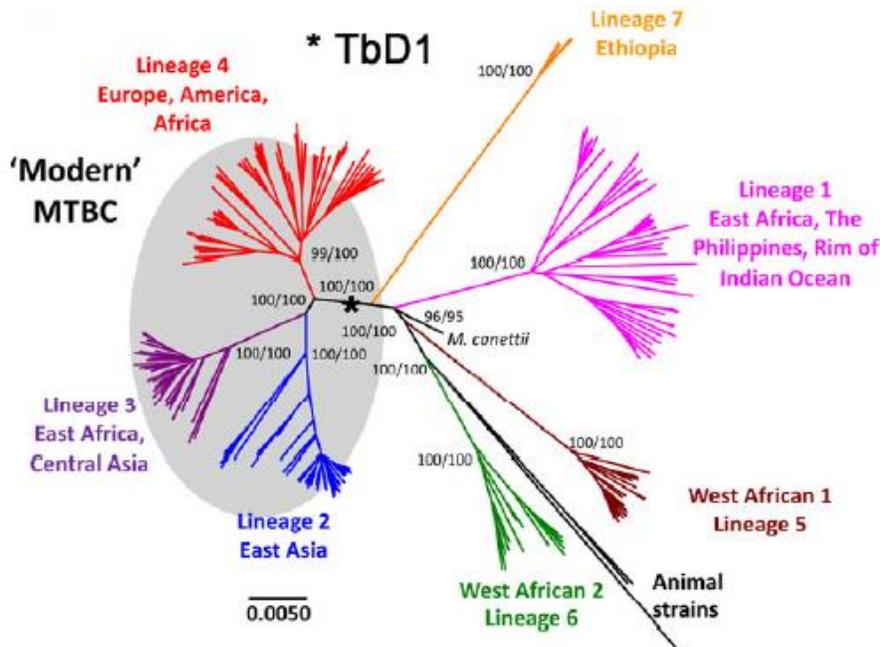


Figura I- 5. Árbol de mínima expansión basada en SNPs obtenidos de la comparación de secuencia de genoma completo de 220 cepas de MTBC [38].

Más recientemente, se logró identificar la presencia de un linaje adicional que circula exclusivamente en la región de los grandes lagos del continente africano, conocido como “**Linaje 8 Ruanda-Uganda**”, el cual se obtuvo a partir de un paciente masculino de 77 años, quien provenía de Uganda, pero vivía en Ruanda [90]. Usando el test DeepLec® Myc-TB en el cual se determina el genotipo (spoligotyping), detección simultánea de resistencia bacteriana a 15 fármacos, determinación de especie (evalúa ~100 especies del género Mycobacterium), se determinó que el aislamiento bacteriano era resistente a rifampicina (Mutación Asp435Tyr en *rpoβ*) y recibió tratamiento de

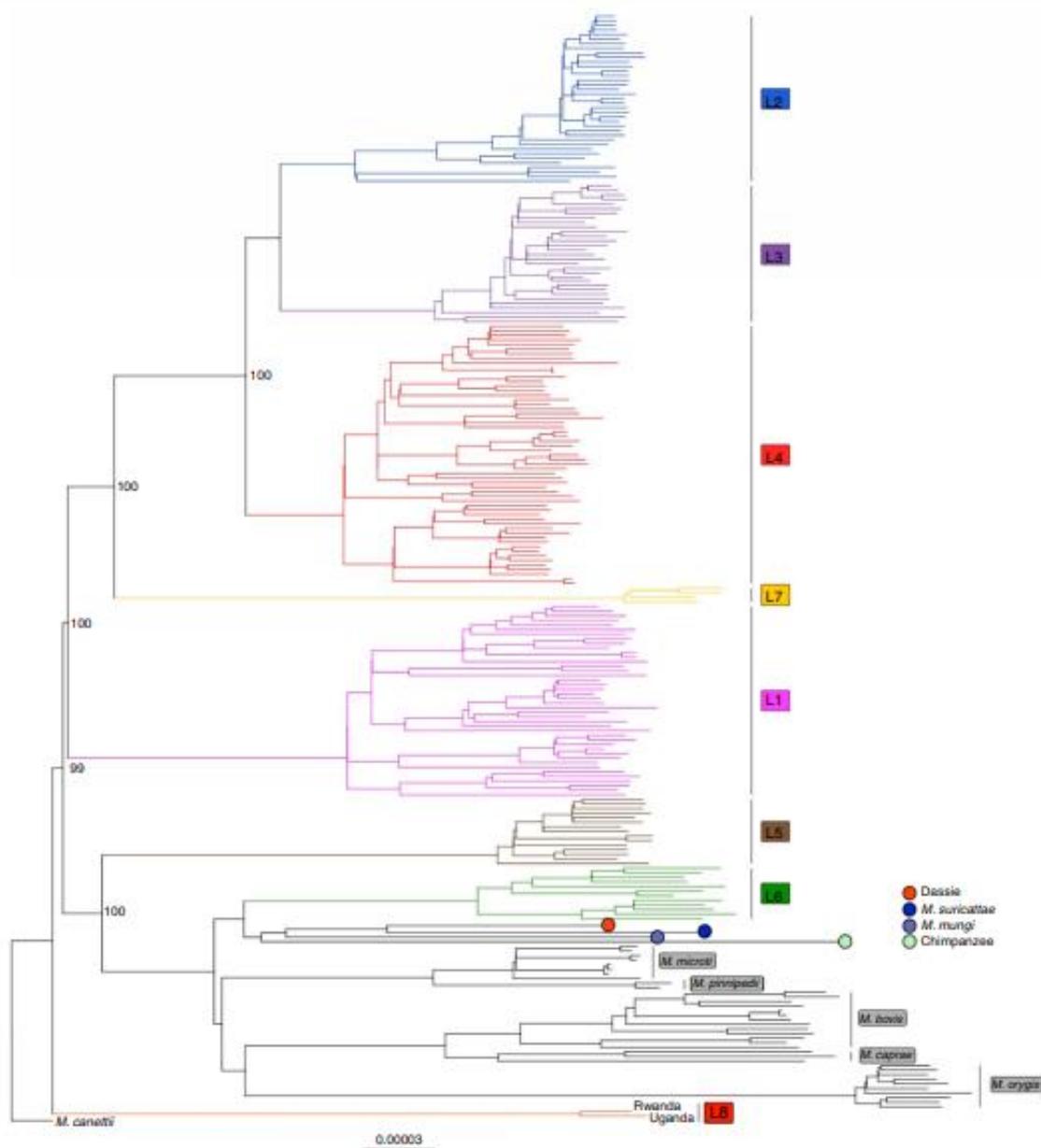


Figura I- 6. Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido a partir de 241 genomas de MTBC mostrando las relaciones evolutivas de los linajes ancestrales y modernos de MTBC [81].

El **Linaje 9** del complejo MTBC, se describió a partir de un estudio de genómica comparativa de 696 genomas de los cuales el 95% se aislaron de pacientes provenientes de África subsahariana y, 5% de los genomas de pacientes de origen no africano. 365 genomas correspondían al Linaje 5, 326 genomas correspondieron al linaje 6 y 5 genomas no pudieron ser clasificados en ninguno de estos dos linajes. Al contruir la filogenia, se encontró que los 5 aislamientos no clasificados, formaron un clado hermano al linaje 6; los pacientes de los que se aislaron estas bacterias provenían del oriente africano (Djibuti, Somalia y un paciente de origen europeo), mientras que los aislamientos del linaje 5 y 6 provenían del occidente africano del centro del continente. Los 5 genomas no clasificados

presentaron una distancia de 1,191 SNPs al linaje 6, 1.632 SNPs al linaje 5 y 1.491 SNPs a los genomas asociados a animales, clasificando estos 5 aislamientos como Linaje 9 [91]. En la **figura I-7** se muestra la filogenia construida con 424 genomas de *M. africanum*, demostrando la formación del clado hermano al linaje 6 denominado como **Linaje 9**.

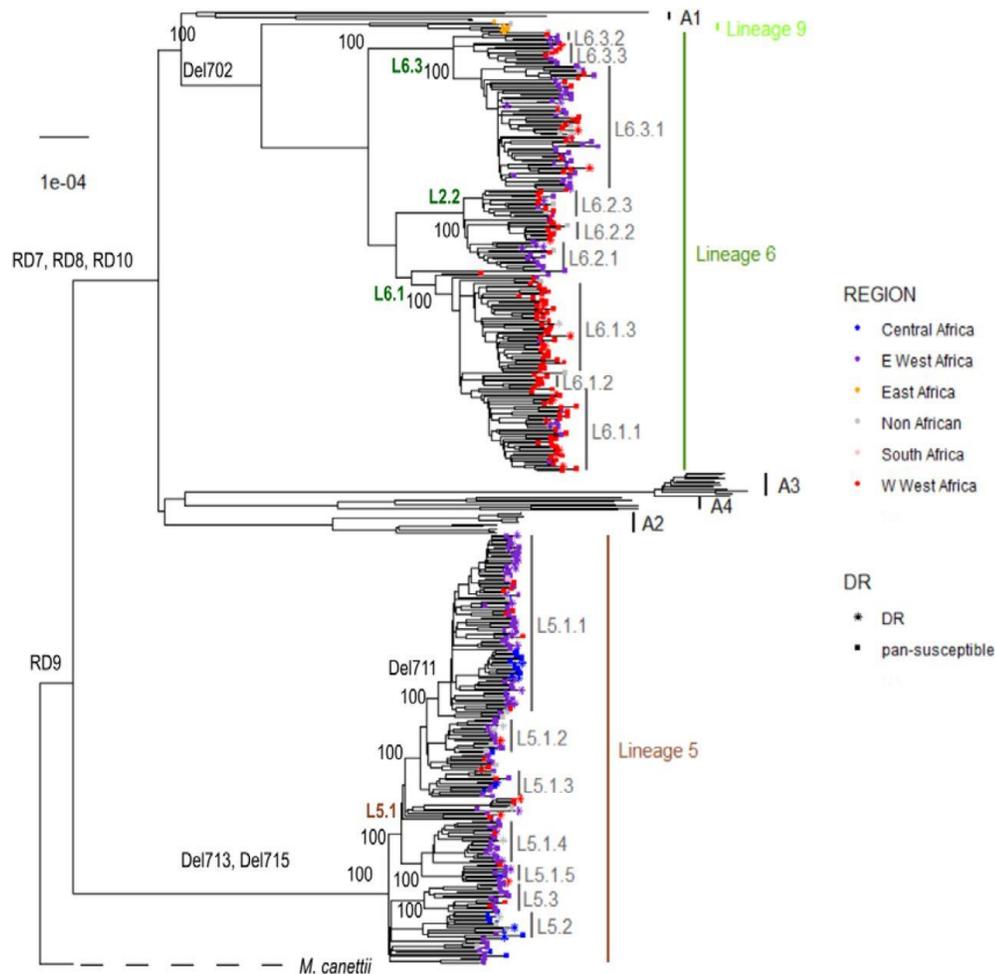


Figura I- 7. Filogenia construida a partir de 424 genomas de *M. africanum* analizados junto con genomas asociados con animales de referencia. Tomado de Coscolla M y cols.,[91]

En cuanto a las diferencias entre los primeros 7 linajes, se han logrado establecer marcadores para cada uno, de acuerdo a LSPs, así por ejemplo el linaje del Occidente Africano 1 “linaje 5” posee la deleción en RD9 y en RD711; el linaje Occidente Africano 2 “linaje 6” posee deleción en RD9 y RD702; el linaje Indo-Oceánico “ Linaje 1” posee deleción en RD9 y RD239; el linaje del Oriente Africano y centro de Asia “Linaje 3” posee deleciones en TbD1 y RD750; el linaje del Oriente Asiático posee deleciones en TbD1, RD105, RD181, RD150 y RD142 y algunas familias de este linaje poseen deleciones en RD207 (responsable de la perdida de los primeros 34 espaciadores en el locus DR del genotipo Beijing) [92].

El linaje Euroamericano “Linaje 4”, comprende 10 sub-linajes determinados por deleciones en las regiones RD115, RD122, RD174 (Diferencia el sub-linaje RD rio), RD182, RD183, RD193, RD219, RD726 y RD761 [93]. Adicionalmente, las cepas de este linaje presentan una deleción de 7 pb en el gen *pks1/15* que codifica para PDIM, que es el lípido más apolar y más importante de Mtb. El linaje 4 se caracteriza por presentar deleciones en *pks1/15*, 122, 115, 182, 183, 193, 219, las que son más frecuentes en cepas provenientes de los continentes americano y europeo, mientras que las deleciones 174, 726 se encuentran con mayor frecuencia en cepas de África Occidental. La deleción 761 en cepas de África del sur y la 724 en África central, además la identificación de las cepas de este linaje se puede realizar por la identificación de SNPs en *katG 463/gyrA 95* [94].

La secuenciación de genoma completo (WGS) es el método más robusto para la construcción de filogenias, basado en la identificación de todos los SNPs presentes en los genomas a estudiar. Esta metodología permite determinar *in silico* los MIRUS, patrones de Spoligotyping, IS6110, LSPs, y detecta además mutaciones y tipos de mutaciones presentes en el genoma. Por las razones expuestas esta metodología se convierte en la herramienta de elección tanto para epidemiología molecular como para el estudio de relaciones evolutivas [95].

Los primeros estudios de identificación de SNPs, se llevaron a cabo a partir de la secuenciación multilocus, usando un set de genes implicados en diferentes procesos metabólicos de la bacteria. Estos análisis se realizan a partir del alineamiento de las secuencias de dichos genes, para identificar mutaciones puntuales entre cepas y luego se establece si dicha mutación produce o no cambio en el aminoácido codificado. Las mutaciones a nivel de SNPs e indels, pueden tener efectos a nivel de la síntesis de proteínas y expresión génica. Los SNPs de mayor importancia son los no sinónimos, ya que cambian el marco de lectura de las proteínas, produciendo cambios funcionales importantes, estas mutaciones confieren un impacto importante en el fenotipo, linaje y resistencia a medicamentos, por mutaciones de novo en MTBC [96]. Entre mayor número de SNPs no sinónimos, mayor es el cambio evolutivo de la cepa, por ejemplo, Gutacker y col., establecieron las relaciones evolutivas de Mtb analizando 5069 cepas, comparando la secuencias de 7 genes con las secuencias de los genomas de las cepas H37Rv y CDC1551, permitiendo identificar nueve clusters o grupos genéticos y 227 SNPs no sinónimos [97]. Sin embargo, a pesar que se analizaron un gran número de cepas, las filogenias reportadas son sesgadas y convergentes, debido a la pobre cobertura del genoma [98].

En el 2009 Comas y cols., analizaron los SNPs de 97 cepas de Mtb, a partir de la secuenciación directa de una región de 70 kbp, que corresponde a 89 genes, encontrando 339 SNPs que determinaron una filogenia congruente con las correspondientes filogenias obtenidas por MIRUS-VNTR, Spoligotyping y LSP. A pesar de la concordancia encontrada en las filogenias determinadas por las diferentes metodologías, el Spoligotyping fue el método menos adecuado para las inferencias evolutivas, ya que aunque infiere resultados evolutivamente importantes, las cepas son agrupadas en grandes grupos, por lo que la información a nivel de clados y familias no es confiable; en cuanto a

MIRUS-VNTR la información es mucho más confiable si se usa el set de 24 locus, puesto que clasifica las cepas de Mtb mejor y proporciona información evolutiva importante, por lo que la secuenciación multilocus es el método más robusto para definir grupos filogenéticos de bacterias genéticamente monomórficas como Mtb [92].

Se han identificado sets de SNPs que son informativos de cada linaje; el estudio de 259 cepas de Mtb provenientes de diferentes partes del mundo, identificó 34.127 SNPs obteniendo los 7 linajes existentes [98]. El máximo número de SNPs encontrado en este estudio al comparar dos cepas, una adaptada a humanos y otra a animales fue de 2.188 SNPs, mientras que al comparar cepas adaptadas a humanos el resultado fue 1856 SNPs, de los cuales 387 SNPs fueron homoplásicos (convergentes). Su aparición está dada por: (i) adición incorrecta de bases durante la secuenciación, (ii) mutaciones recurrentes y (iii) selección positiva. De acuerdo a estos resultados, en Mtb son pocas las posiciones variables, lo que confirma la teoría de la expansión clonal de este microorganismo [42,99].

En un trabajo realizado en el 2013 por Rose y cols., se identificaron los SNPs con información filogenética importante para cada linaje, en cepas adaptadas a humanos y se obtuvieron 13.086 SNPs, estudiando 28 cepas de MTBC procedentes de diferentes orígenes geográficos y pertenecientes a los linajes 1-6. En este estudio se analizaron los SNPs no sinónimos y sinónimos conservados en esta población, los que son específicos de cada linaje y están relacionados con cambios evolutivos tempranos [100]. Los SNPs generados de novo, se han encontrado en genes que producen resistencia a antimicobacterianos y que están relacionados con cambios evolutivos recientes, aunque existe la hipótesis que los cambios evolutivos tempranos de los patógenos disminuyen el fitness del microorganismo. Sin embargo, se ha probado que es un patógeno con alto fitness a pesar de la frecuencia de mutaciones en genes de resistencia [42]. En MTBC, se presenta el fenómeno de las mutaciones compensatorias; en las regiones determinantes de resistencia a medicamentos, en regiones promotoras o en otros genes que confieren virulencia, lo que hace que ciertos linajes de MTBC tengan mayor circulación que otros a nivel mundial [101,102].

Se han encontrado 319 SNPs específicos en los linajes modernos (Linajes 2, 3, y 4); para el linaje 1 se identificaron 463 SNPs; Linaje 2: 124 SNPs; Linaje 3: 353 SNPs; Linaje 4: 163 SNPs; Linaje 5: 698 SNPs y linaje 6: 674 SNPs. La mayoría de mutaciones puntuales que se encontraron en este estudio fueron no sinónimas, por lo que se categorizaron funcionalmente y la mayoría de ellas se encontraron en genes regulatorios (*NarL*, *Rv0275KdpD*, *BlaI*, *SirR*, *VirS*, *Rv3167c* y *Rv3830c*) [100].

Los trabajos mencionados anteriormente, indican que el análisis de SNPs a partir de la secuenciación de genoma completo, es la forma más robusta de construir filogenias, indicando que la tuberculosis se originó en el continente Africano, co-evolucionando con el *Homo-sapiens*, que dispersó la enfermedad gracias a las migraciones humanas, al establecimiento de rutas de comercio y a que este patógeno sufrió un proceso de adaptación a determinadas poblaciones humanas, por lo que cepas de MTBC de los linajes 5 (Occidente Africano I), 6 (Occidente Africano II) y 7 (Etiopia), hasta hace

poco se creía, estaban adaptados únicamente a habitantes de dichas zonas geográficas y a dichas razas, siendo los linajes 2 (este asiático) y 4 (Euroamericano), los de mayor capacidad de adaptación, dispersión y circulación a nivel mundial, están asociados con alta virulencia y resistencia a antibióticos. Sin embargo, recientemente se ha reportado la presencia de *M. tuberculosis* var Africanum en Brasil, a partir de un aislamiento clínico obtenido a partir de una paciente con TB pulmonar; la identificación se realizó por secuenciación del gen *I6S* y secuenciación parcial del gen *Hsp65* [103]. Por otra parte, en 2016 se hizo el primer reporte de *M. tuberculosis* var Africanum en Colombia, a partir de la secuenciación por Illumina de un aislamiento clínico obtenido en el país [104].

El genotipo Beijing, perteneciente al linaje 2 (Este asiático), se originó en la provincia de Beijing en China, de allí se dispersó a los países asiáticos vecinos (Mongolia, Corea del Norte y Vietnam), siendo el responsable del mayor número de casos de TB en el oriente asiático [105]. Este genotipo está asociado a alta virulencia y resistencia a medicamentos de primera y segunda línea, siendo MDR) o XDR, este es un patógeno exitoso en términos evolutivos, puesto que, a diferencia de otros genotipos, causa tuberculosis en personas de todas las razas. Posee una copia intacta del gen *pks1/15*, que le permite producir PDIM, el cual es un importante factor de virulencia, asociado a alteración en la modulación de la respuesta inmune del huésped, produciendo una respuesta tipo Th2 no protectora. Sin embargo, el perfil de resistencia a antibióticos, la expresión de genes de virulencia y la modulación de la respuesta inmune, son variables entre los aislamientos clínicos de este genotipo [106].

El segundo linaje más disperso a nivel mundial es el Linaje 4 Euroamericano, se pueden encontrar aislamientos clínicos de este linaje en cualquier país del mundo, aunque como su nombre lo dice, es más prevalente en Europa y las Américas, la diferenciación de este linaje está dado principalmente por las regiones de diferenciación, la delección en *pks1/15* e identificación por Spoligotyping. Este linaje se caracteriza por la ausencia de los espaciadores 33-36 y sus sublinajes más importantes son HARLEM, LAM, T, S y X [107]. Aunque este linaje está ampliamente diseminado a nivel mundial, la virulencia de los aislamientos clínicos es variable, así como el perfil de resistencia a antibióticos [108].

Los linajes con mayor restricción en su localización geográfica son los linajes Occidente Africano 1, Occidente africano 2 y el linaje de Etiopia, Mtb co-evolucionó con el Homo Sapiens originándose estos 2 linajes en el continente africano, las cepas de estos linajes, se separaron del ancestro común de Mtb casi simultáneamente con las cepas adaptadas a animales (*M. bovis* y *M. canetti*), y de acuerdo con estudios genómicos, se sabe que la adquisición de esta bacteria no fue a partir de animales domésticos, sino por un proceso de especiación, lo cual dio origen a los diferentes linajes filogeográficos [42].

I.VI. Genotipo Beijing: origen, descripción, clasificación presencia global

El genotipo Beijing, perteneciente al linaje 2 o del Este asiático de *Mtb* es un grupo filogeográfico responsable de TB en por lo menos un cuarto del total de casos a nivel global [109]. fue descrito en 1995 por Dick Van Soolingen y cols., a partir de un análisis poblacional de aislamientos clínicos circulantes en China entre 1992 y 1994, que se caracterizaron por compartir el mismo patrón RFLP-IS6110, con 15 a 20 copias de esta secuencia de inserción y, en el estudio del locus polimórfico DR estas cepas mostraron un espilogotipo significativamente diferente a los aislamientos de otras regiones del mundo, caracterizado por poseer únicamente los espaciadores 35 a 43 [105]. Las cepas con estas características genotípicas son conocidas como Beijing típicas o clásicas, sin embargo, se pueden encontrar aislamientos clínicos con diferencias en los patrones de bandeo por RFLP-IS6110 y con ausencia de espaciadores diferentes entre los espaciadores 35 a 43, dichas cepas son conocidas como Beijing Atípicas o Beijing-like [110]. Por otra parte, hay otro grupo de cepas que se han denominado como “Pseudo-Beijing”, las cuales se caracterizan por tener un espilogotipo típico de este linaje, pero al indagar sobre deleciones en las regiones de diferenciación (RD) específicamente RD207 y RD105 se observa que estas cepas tienen una deleción más corta (más o menos 100 pb menos) a la deleción presente en las cepas Beijing típicas [111]. Adicionalmente, cepas de este genotipo fueron identificadas en la década de los 90s en la ciudad de Nueva York en pacientes VIH+ en brotes en hospitales y cárceles, en ese momento fueron denominadas como MDR “W”, pero posteriormente se identificó que estas hacían parte de un pequeño sublinaje de la familia Beijing, por lo que es común encontrar en la literatura la denominación de W/Beijing [112,113].

Se cree que el éxito del genotipo Beijing para mantenerse en circulación a nivel global está determinado por varias causas; una de ellas, la vacunación con el bacilo atenuado de *M. bovis* Calmette Guerin (BCG) [114], ya que la inmunización con esta vacuna ha sido ampliamente utilizada en la región asiática en donde este predomina; esta hipótesis ha sido formulada a partir de varios estudios en los que se ha determinado que, por lo general a los pacientes a los que se les aísla han sido vacunados previamente, mientras que en pacientes infectados con otros genotipos bacterianos, pueden o no estar vacunados, por lo que se postula que la presencia de cicatriz de la vacuna BCG, es un factor de riesgo para contraer tuberculosis causada por el genotipo Beijing, especialmente en áreas en las que este es endémico [105,115].

Las cepas del genotipo Beijing, se han asociado con brotes de tuberculosis multirresistente (TB-MDR) a nivel global, causados por migraciones poblacionales, comercio entre países y facilidad en el desplazamiento alrededor del mundo. El linaje Beijing posee ventajas selectivas, en comparación con otros linajes del MTBC tales como: (i): aumento en la capacidad de adquirir resistencia a medicamentos, (ii): alta capacidad mutagénica y aumento en la transmisibilidad e (iii): hipervirulencia [116]; estas dos últimas características se observan más frecuentemente, en las cepas de evolución reciente, principalmente las encontradas en países latinoamericanos, países del sur de

África y Europa Oriental, a diferencia de las cepas ancestrales, las cuales en su área de influencia principal Este asiático, presentan perfiles de susceptibilidad a antibióticos variables y virulencia disminuida [109].

Genotípicamente y basándose en la identificación o tipificación de polimorfismos de secuencia larga (LSP), cuyo tamaño varía entre 224 y 11.985 pb, el Linaje 2 se caracteriza por la presencia o delección de diferentes LSP que clasifican este genotipo; por ejemplo; todas las cepas hasta ahora estudiadas tienen la delección RD105 y la delección RD207, este último responsable de la pérdida de los primeros 34 espaciadores en el locus DR Direct Repeats presente en todos los miembros del MTBC [117]. La RD181 es característica de casi todas las cepas de la familia Beijing y es un marcador de evolución temprana mientras que las RD150 y RD142 pueden o no estar presentes en dichas cepas siendo así característicos de cepas de evolución más reciente [118].

El análisis de los LSP se ha logrado a partir de la amplificación por PCR de estos, secuenciación parcial, total o a partir de la detección por hibridación de sondas. Como se trata de grandes deleciones genómicas, estas son responsables de la delección parcial o total de genes de *Mycobacterium*, característica que influencia las variaciones en la virulencia de este linaje [119].

Los hallazgos de estas deleciones genómicas principales son: RD 105 de 4267 pb, que deleciona por completo los genes *Rv0072* que codifican parte de una proteína transportadora permeasa no caracterizada tipo ABC [120] y *Rv0073* que codifica para una proteína de unión a ATP transportadora de glutamina tipo ABC y deleciona parcialmente los genes *Rv0071* que codifican para una posible madurasa intrónica de tipo II, gen no esencial para el crecimiento *in vitro* de la bacteria [121] y *Rv0074* que codifica para una proteína hipotética conservada, encontrada en la fracción membranal de la bacteria por espectrometría de masas, no esencial para el crecimiento *in vitro* [122].

La delección RD207 de 7399 pb, es la principal responsable de la pérdida de espaciadores en el locus DR (Direct Repeats) de este genotipo, es evidenciada en el espoligotipo característico de 9 espaciadores 35 a 43 y a su vez es la responsable de la delección parcial de 7 genes y la pérdida de la secuencia de inserción IS6110. Los genes delecionados por este RD son: *Rv2814c* subunidad de transposasa requerida para la transposición de IS6110; *Rv2815c* Transposasa putativa para IS6110 que se fusiona con *Rv2814c* posible responsable del cambio en el marco de lectura durante la traducción [123]; *Rv2816c*, *Rv2817c*, *Rv2818c*, *Rv2819c* y *Rv2820c*, codifican para proteínas hipotéticas conservadas, que corresponden a posibles islas genómicas específicas de *M. tuberculosis* [124,125]. Por otra parte, la RD181 es una delección genómica de 711 pb, que deleciona dos genes: el *Rv2262c* que codifica para una proteína hipotética conservada de función desconocida y *Rv2263* que codifica para una posible enzima oxidoreductasa [125]. La RD142 es una delección de 2851 pb, región en la que se encuentran ubicados 4 genes: el *Rv1190* y *Rv1191*, que codifican para proteínas hipotéticas; *Rv1192* proteína de función desconocida y *sigI* posible factor sigma alternativo de la RNA polimerasa *sigL* [126,127]. La RD 152 es una delección de 11985 pb, responsable de la pérdida

de 12 genes *cutl*, *picD*, y *wag22* que son miembros antigénicos pertenecientes a la familia de proteínas PE-PGRS; *Rv1754c* proteína conservada rica en prolina; *Rv1756c*, *Rv1757c* subunidades transposasas putativas para IS6110; *Rv1760* posible triacilglicerol sintetasa, responsable de la acumulación de lípidos de pared celular; *Rv1761c* posible proteína transportadora de extremo hidrofóbico involucrada en procesos de metabolismo lipídico de pared celular; *Rv1762c* proteína de función desconocida; *Rv1763* y *Rv1764* transposasas putativas para la inserción de IS6110 y, *Rv1765c* proteína hipotética conservada del citosol de *M. tuberculosis* [67,69].

Otro marcador importante para la clasificación del genotipo Beijing es la presencia de una copia intacta del gen *pks15/1*, el cual es un marcador genético comúnmente detectado en las cepas Beijing de origen asiático (81); este gen codifica para un factor de virulencia lipídico de la pared celular denominado Ftiocerol Dimicoserosato (PDIM) [128,129], es el más apolar de la pared de la bacteria, relacionado estructuralmente con el glicolípido fenólico y su estructura es tan densa, que ha sido denominada la CERA de la pared celular [127]. EL PDIM se encuentra presente en todas las especies del complejo Mtb y en algunas micobacterias no tuberculosas (MNT), siempre y cuando sean patógenas para humanos y animales. Todas las cepas que producen ptiocerol dimicoserosatos o ptiocerol ptioceranatos, también sintetizan sustancias estructuralmente relacionadas como los fenolfiocerolos [130]. En teoría las cepas de Mtb virulentas poseen una copia completa de este gen y producen PDIM, sin embargo, cepas de como H37Rv y CDC1551, poseen una delección de 7 pares de bases en este gen que afecta la producción tanto de PDIM como del Peptido PGLs; las cepas del linaje 2 producen estos dos lípidos, lo que posiblemente está relacionado con su exacerbada virulencia sobre todo en las cepas de evolución moderna, esto ha sido comprobado en estudios en modelos animales (Ratón y Cobayo) y celulares (Macrófagos) usando cepas virulentas (HN878) deficientes en *pks15/1* o cepas transfectadas con este gen (CDC1551, H37Rv, Erdman), cuyo fenotipo resulta en cepas con mayor virulencia con respecto a su contraparte silvestre [131,132].

Otros marcadores genéticos para la clasificación de las cepas Beijing en sublinajes ancestrales o modernos como la presencia de un locus NTF (Noise Transfer Function) intacto con la RD181 intacta es característica de las cepas más antiguas o ancestrales “atípicas” de ese genotipo, si esta se encuentra delecionada las cepas son clasificadas como “ancestrales” o “ancestrales clásicas” [133]. Las cepas más modernas de la familia Beijing se caracterizan por la presencia de 1 o 2 copias de la IS6110 en la región cromosomal NTF y por la presencia de mutaciones de único nucleótido (SNPs) en los genes que codifican para enzimas de reparación de DNA que son exclusivos del genotipo Beijing *Mut2* y *Mut4* [134]; en *Mut2* se produce una mutación en el codón 58 produciendo el cambio de glicina por arginina GGA (Gly) por CGA (Arg), y en el gen *Mut4* se produce un cambio de Arginina por Glicina en el codón 48 CGG (Arg) por GGG (Gly). Las cepas que no presentan SNPs en estos genes, son denominadas como cepas modernas [135,136].

De acuerdo a estudios filogeográficos recientes, a partir de análisis de MIRU-VNTR e identificación de SNPs en secuencias de genomas completos de 4987 cepas pertenecientes al genotipo Beijing

provenientes de 99 países [116] se sugirió que este linaje se originó en la zona nororiental del este Asiático en el norte de China, Corea y Japón, hace aproximadamente 6600 años y se determinó que este genotipo se divide en 6 sublinajes o grupos principales o complejos clonales (CC): CC1, CC2, CC3, CC4, CC5 y CC6 y un sublinaje basal BL7. Con estos 7 sublinajes se construyó un árbol filogenético de mínima expansión (MStree), que los agrupó en 3 brazos principales. Posteriormente, se indagó por la presencia de la *IS6110*, en la región NTF estudiando un subgrupo de 337 aislamientos y se determinó que los complejos clonales 1 a 5 (CC1-CC5), se clasificaron como cepas modernas típicas por la presencia de esta secuencia de inserción y, que las cepas pertenecientes al CC6 y BL7 se clasificaron como variantes Beijing Ancestrales Atípicas, por la ausencia de una o dos copias de la *IS6110* en esta región [116]. Además, estos sublinajes tienen distintos patrones de dispersión a nivel mundial, CC1 (Asia central alrededor del mar negro), CC2 (Rusia y Oriente Europeo), CC3 (Oriente Asiático, Océano Pacífico y Américas), CC4 (África oriental y sur y océano Pacífico), CC5 (Dispersión hacia el océano pacífico Micronesia y Polinesia) y CC6 y BL7 (oriente asiático, Norte América y México). En la **Figura I-7.**, se muestra se muestra la distribución mundial de los complejos clonales del genotipo Beijing [137].

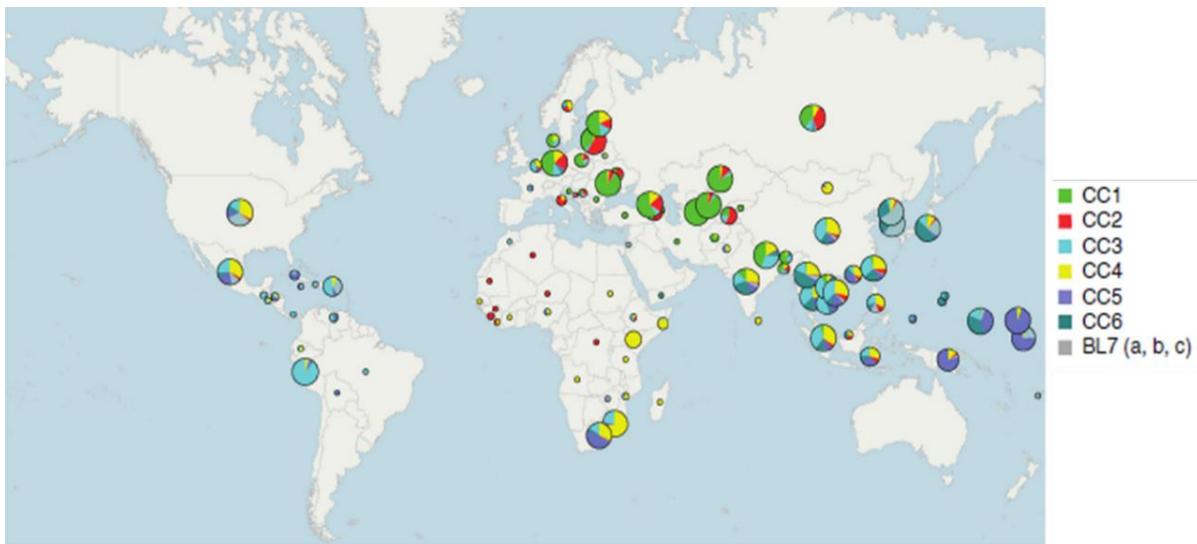


Figura I- 8. Distribución mundial de los complejos clonales y el linaje basal del genotipo Beijing en donde cada círculo corresponde a un país y el tamaño del círculo corresponde a la cantidad de aislados clínicos. Tomado de Merker M. y cols 2015 [104].

Como se puede evidenciar, dependiendo de los marcadores empleados, se obtienen resultados diferentes de filogenia del linaje 2, por lo que no hay un consenso con respecto a la caracterización del mismo. Con el ánimo de unificar la clasificación de este linaje, recientemente se realizó un análisis evolutivo y comparativo con todos los marcadores empleados por los diferentes estudios [138]. En esta investigación, se analizó el genoma de 1.398 cepas del linaje 2 provenientes de 32 países y adicionalmente se incluyeron los datos de 13 estudios independientes. Después de excluir regiones repetitivas, elementos móviles, genes de la familia PE-PPE, genes asociados a resistencia a

medicamentos y SNPs artefactuales asociados a indels, se emplearon 39.786 SNPs para reconstruir la filogenia de máxima verosimilitud; los resultados obtenidos dividen el linaje 2 en dos clados filogenéticos: proto-Beijing y Beijing “Clásico”. Las cepas del clado proto-Beijing se caracterizan por la delección RD105 y un patrón spoligotyping atípico para Beijing, conteniendo espaciadores entre los espaciadores 1-43[138].

Las cepas del clado Beijing “clásico” se caracterizan por la delección RD207, una rama temprana dentro del clado contiene los genes *mutT2*, *mutT4* y *ogt* intactos. Pasos evolutivos subsiguientes consistieron en adquirir la delección RD181 y una mutación en el gen *mutT4* (codón 48). Otro grupo monofilético importante lo constituyen cepas con mutaciones en los genes *mutT4* (codón 48) y *ogt* (codón 37). Todas estas ramas son consideradas Beijing “ancestral”, dentro del clado Beijing. El grupo monofilético mayoritario (1212 cepas del estudio mencionado), contiene cepas con las mutaciones en *mutT2* (codón 58), *mutT4* (codón 48), *ogt* (codón 12) y la presencia de la secuencia de inserción IS6110 en la región NTF; estas cepas son consideradas Beijing “modernas” dentro del clado Beijing. Finalmente; el clado Beijing es dividido en 8 grupos de dos a 5 subgrupos dependiendo del estudio.

Por tal motivo, Shitikov y cols, proponen un método para la clasificación del linaje 2, el cual incluye los clados proto-Beijing y Beijing, y tiene un mayor poder discriminatorio mayor, comparado con los otros métodos de genotipificación. Este método clasifica 10 grupos dentro del clado Beijing, donde tres de ellos pertenecen al grupo Beijing “ancestral” (Asia Ancestral 1, Asia Ancestral 2, Asia Ancestral 3) y siete pertenecen al grupo Beijing “moderno” (Asian African 1, Asian African 2, Asian African 2/RD142, Asian African 3, Pacific RD150, Europe/Russia B0/W148 outbreak y Central Asia) [138].

I.VI. I. Epidemiología de Genotipo Beijing

I.VI.I.I. Genotipo Beijing en el mundo

El genotipo Beijing del Este asiático de Mtb es uno de los más exitosos a nivel mundial junto con cepas del linaje Euroamericano. Aunque como se discutió anteriormente su origen es asiático, hoy lo encontramos en casi todo el mundo y más de un cuarto de la epidemia global de TB es causada por cepas de esta familia. Aunque hay países en los que aún no se reporta, muy seguramente en muchos de ellos es porque no se busca, si bien es difícil establecer una prevalencia o incidencia mundial de este genotipo, por la no vigilancia epidemiológica de genotipos de Mtb por país como se hace en la mayoría de los eventos de interés en Salud pública, si se encuentran diversos estudios en los que se reporta Beijing en todos los continentes [109].

Además de ser un exitoso patógeno emergente por su capacidad de infectar personas sin distinción de nación o raza como ocurre con otros genotipos [139], por ejemplo los del Occidente Africano y Etiopía (Linajes 5, 6, 7, 8 y 9) los cuales están limitados geográficamente; el genotipo Beijing frecuentemente se encuentra en Brotes de TB, causando TB resistente a medicamentos y casi siempre

se presenta como un patógeno con alta virulencia causando cuadros graves de la enfermedad [112,113], que en muchos de los casos el desenlace es fatal [140].

Según la “Acción Europea Concertada en Marcadores genéticos de nueva generación y técnicas para la epidemiología y control de Tuberculosis”, el genotipo Beijing tiene cuatro tipos de comportamiento o patrones de presentación mundial: *(i)*: Endémico sin resistencia a medicamentos, que predomina en el Oriente Asiático; *(ii)*: Epidémico resistente a medicamentos que circula en su mayoría en la antigua Unión Soviética, Cuba, Vietnam y Sur África y con circulación poco frecuente en Europa Occidental; *(iii)*: Epidémico pero sensible a medicamentos antituberculosos circulando en su mayoría en Argentina y Malawi y *(iv)*: Muy poca o infrecuente circulación en algunos países del continente Africano y continente Europeo [141].

La asociación de MDR-TB y genotipo Beijing es variable ya que no solo depende de la población de estudio, sino del origen de los pacientes, el tamaño de la muestra etc., [142,143] y así como hay estudios en los que no se encuentra asociación entre resistencia a medicamentos y TB, otros estudios si han logrado establecer dicha asociación [144,145] aunque como se mencionó anteriormente ya están establecidos los patrones de circulación, dependiendo del estudio, se pueden presentar cualquiera de los patrones antes mencionados en cualquier lugar [146].

En Asia, es el genotipo más prevalente, hay estudios que reportan genotipo Beijing en más del 50% de los pacientes o cepas incluidas en los estudios, llegando incluso al 90% de los casos de TB con este genotipo en países como China [105,147], Mongolia [148], Vietnam [149–151] e India [152].

En Europa la presencia de cepas genotipo W/Beijing es variable, en la Antigua Unión Soviética la circulación de estas es alta con el 45%-56% de los aislamientos, mientras que en Europa Occidental la proporción es bastante baja <6% de los aislamientos. En el continente africano el genotipo Beijing es poco frecuente, sin embargo, en la capital de Sur África, la proporción es significativamente mayor [141], estudios reportan prevalencias de genotipo Beijing de menos del 10% y en algunos estudios asociados a pacientes VIH+ como por ejemplo en Mozambique [153].

I.VI.I. II. Genotipo Beijing en el continente americano

Los países que conforman América Latina o “Nuevo Mundo”, como se denominó inicialmente a esta región del mundo, por los colonizadores europeos provenientes de España, Francia, Portugal, Inglaterra y Holanda, gracias a las ambiciones expansionistas del imperio francés dirigido por Napoleón III, America, se divide en tres regiones principales: América del Norte, América Central y América del Sur, pero la región Latinoamericana, que en su mayoría fue denominada como tal por el colonialismo español está dividida en: América central (México, Guatemala, Belice, El salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá), América del sur (Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador, Bolivia, Paraguay, Uruguay, Chile, Argentina, Brasil, Guayana, Guyana y Surinam) y las islas del caribe en las cuales hay variabilidad de idiomas siendo las islas más representativas: Las Antillas

mayores (Cuba, Isla de la Española (República Dominicana y Haití) y Puerto Rico), Antillas Francesas y Holandesas, Trinidad y Tobago entre otras [154].

Debido al proceso de colonialismo europeo, no solo llegaron al continente americano las costumbres sociales, religiosas e idiomáticas del viejo continente, también llegaron diferentes enfermedades que fueron transmitidas a la población nativa americana e incluso fueron las responsables de diezmar dicha población en su momento con enfermedades como la viruela y el sarampión [155] y, posiblemente la tuberculosis. Sin embargo, sabemos que la TB estaba presente en el continente antes de la invasión europea, gracias a los registros que se conocen actualmente de presencia de DNA de *Mtb* en restos momificados precolombinos [13]. Es lógico pensar, que la variedad de genotipos que hoy conocemos en el continente, son producto no solo del colonialismo europeo, sino de la llegada de esclavos africanos, trayendo consigo sus respectivos genotipos de *Mtb*, dando como resultado una amplia variabilidad genética.

Datos estimados por la OMS en el año 2019, muestran que el continente americano aportó cerca del 3% de la carga mundial de TB, que corresponde a alrededor de 300.000 casos al año. Los países con mayor tasa de incidencia son Haití, Perú y Bolivia con 100-199 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que el resto de los países del subcontinente tienen tasas de incidencia media de 25-99 casos por 100.000 habitantes a excepción de Chile que se sitúa como país de incidencia baja con 0-24 casos por 100.000 habitantes [23].

En Canadá la mayoría de los reportes implican población migrante. En un estudio en Alberta se reportó que el 21% de las cepas de pacientes con TB correspondían a genotipo Beijing las cuales en su mayoría presentaban algún grado de resistencia a antibióticos [156][157]; en un estudio de cohortes de pacientes con TB en su mayoría migrantes se determinó que el 19% de ellos estaba infectado con cepas de genotipo Beijing [158]. Canadá es un país caracterizado por recibir una gran cantidad de población extranjera para ocupar su territorio y dada la alta calidad de vida de este país se considera que es un país con baja incidencia de TB junto con Estados Unidos, en estos países la TB por genotipo Beijing se presenta en 19-27% de los casos [157,158].

En Estados Unidos, el reporte de este genotipo se ha realizado a partir de brotes, por lo que la proporción es alta; uno de ellos en la ciudad de Nueva York en donde se aislaron cepas MDR en el 22% de los pacientes con diagnóstico de TB, posteriormente con la tipificación con RFLP-*IS6110* se demostró que estas cepas pertenecían al genotipo Beijing y se denominaron W/Beijing [159]. En otro brote en Houston Texas en el 25% de los pacientes estudiados 326 de 1283 pacientes estaban infectados por este genotipo [160], a pesar que el reporte de este genotipo en USA es en brotes epidémicos, se ha comprobado la circulación nacional de Genotipo Beijing en población migrante y no migrante [161].

Hasta hace pocos años, se pesaba que la circulación del genotipo Beijing en América Latina era infrecuente, sin embargo, con la realización creciente de estudios de tipificación de cepas de Mtb usando técnicas de epidemiología molecular clásica o secuenciación masiva, se ha evidenciado un aumento significativo en el reporte de este genotipo en los distintos países de la plataforma continental y las islas del caribe [162].

Los estudios que se han llevado a cabo en América Latina son dispersos y se han realizado por lo general en grupos específicos de población. En una revisión de tema, realizada con el fin de obtener información sobre la presencia del genotipo Beijing en América Latina, se obtuvo que: Solo el 3.9% (980/25.184) de las cepas tipificadas por distintos métodos pertenecían a genotipo Beijing [163]. Los países con mayor predominio del genotipo Beijing son Cuba (17.26%, n=112), Perú (16%, n=634) y Colombia (5%, n=100). Los genotipos presentes en Cuba son SIT1/Beijing clásico, y solamente una cepa es SIT190/Beijing-like [164]. A pesar de que Cuba tiene una de las incidencias de TB más bajas de América Latina [165], es el país con más presencia del genotipo Beijing con respecto a los otros países de la región y ha sido reportado desde el año 1995, en este país se ha incrementado significativamente la presencia de genotipo Beijing de un 11.3% en el año 1995 a un 25.6% en 2010 [166] y además presenta alta resistencia a los antibióticos de primera línea, en especial a estreptomycin [141]. La asociación existente entre resistencia a antibióticos y el genotipo Beijing, surgió a partir de la falla en los programas nacionales de control de TB, en la extinta Unión soviética y se cree que la aparición de estas cepas en América Latina, se deba a un efecto fundador gracias a las relaciones diplomáticas entre los ex países soviéticos y la isla [167].

Perú es el siguiente país con mayor proporción de genotipo Beijing en América Latina, con un 16% correspondiente a 634/25123 cepas, todas obtenidas de pacientes de la ciudad de Lima y alrededores (29.4% según censo 2018). Colombia es el tercer país con mayor carga de genotipo Beijing 5% (100/1989) [163], el cual fue reportado circulando en el país desde 1997, específicamente encontrado en la ciudad portuaria de Buenaventura sobre el Pacífico Colombiano [168].

Ecuador tiene una prevalencia baja del genotipo Beijing con 1.17% , a pesar de ser un país limítrofe y de fronteras abiertas con países con predominancia alta del genotipo Beijing, como son Perú con 16% y Colombia con 5% y al igual que en Cuba y Colombia, las cepas Beijing del Ecuador tienen una fuerte asociación con resistencia a los antimicrobianos [169].

El resto de los países de la región, (México, Guatemala, Panamá) presentan una prevalencia por debajo del 1%, también países con gran población como Brasil. Los países del cono sur (Chile, Argentina y Paraguay) históricamente han tenido prevalencias muy bajas de Beijing, sugiriendo la ausencia de migraciones importantes de población asiática o de Europa Oriental. Las islas del Caribe Oriental, tienen un comportamiento diferente a Cuba, posiblemente influenciado por el tipo de migrantes provenientes de Holanda y Francia principalmente [170–173].

Finalmente, hay que mencionar que la información es muy escasa con respecto al genotipo Beijing en Honduras, Haití, Bolivia y Paraguay en la **Figura I-8.**, se muestra la distribución en América Latina del genotipo Beijing en comparación con los demás linajes que circulan en cada país del continente [163].

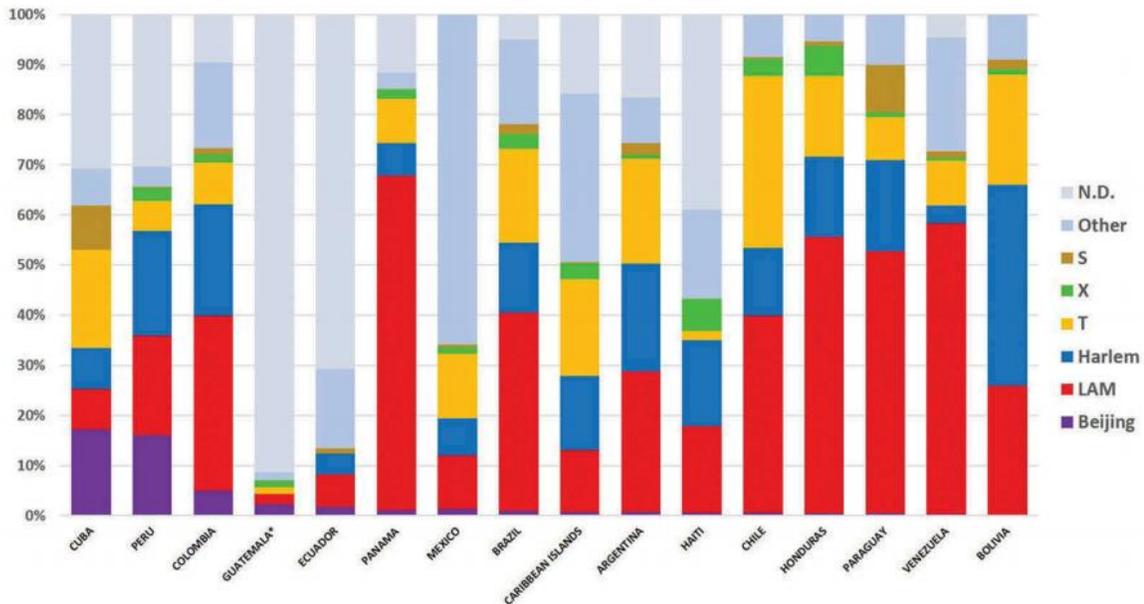


Figura I- 9. Distribución de genotipos por país en América Latina. Tomado de Cerezo-Cortés MI y cols., 2020 [163].

I.VI.I.III. Genotipo Beijing en Colombia

Los estudios de epidemiología molecular describiendo la circulación de genotipos de Mtb en Colombia corresponden a estudios que involucran varias regiones del país, sin embargo, el genotipo Beijing está geo-referenciado principalmente en la ciudad de Buenaventura y por el momento no existe reporte de la presencia de este genotipo en el resto del país. El genotipo predominante, a diferencia del encontrado en los otros países de la región antes mencionados, es el SIT190/Beijing-like con el 79% de las cepas Beijing y es casi exclusivo de Colombia, con la excepción de Cuba, que reportó solo un caso causado por este genotipo. El primer estudio que detectó la presencia del genotipo Beijing en Colombia se realizó en 1998, basado en patrones RFLP y encontró que 11/34 (32.4%) de los casos que tenían falla en el tratamiento correspondieron a la Familia Beijing [174]. En 2010 Murcia y col., reportaron en Bogotá el primer caso mortal de TB causado por el genotipo “Beijing-like” (SIT190) [140][175], la bacteria se aisló de esputo y de muestras de necropsia; todos los aislamientos, tuvieron un patrón RFLP *IS6110* idéntico, por Spoligotyping, estas cepas se caracterizaron por la ausencia de los espaciadores 1-34 y 40 y por MIRUS-VNTR (Mycobacterial Intersperced Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats) se obtuvo el patrón huérfano 224326153223, de acuerdo a la base de datos del Institut Pasteur de La Guadeloupe (SITVIT2) [175].

Estudios posteriores realizados en Cali encontraron también cepas pertenecientes al genotipo Beijing-like, SIT190, asociados a TB-MDR/XDR [176,177]. En el año 2012, Cerezo y cols., realizaron un estudio de genotipificación en aislamientos clínicos obtenidos en Bogotá, encontrando los siguientes genotipos: LAM/SIT42 (49.34%), Harlem/SIT62 (38.25%), T/SIT53 (13.82%) y Beijing-like (1.06%) [178].

Puerto G y cols., genotipificaron 51 aislados de Mtb, obtenidos también de pacientes en Buenaventura, encontrando una prevalencia de 41% de cepas de la familia Beijing [179], este estudio refirió que el 81% de aislamientos TB-MDR correspondió a pacientes previamente tratados, mientras que en pacientes no tratados se recuperaron 5 aislados TB-MDR, no hubo ningún aislamiento sensible [180]. Llerena P y cols., analizaron por spoligotyping 201 aislados clínicos colombianos asociados a MDR-TB y se encontró que el 36,3% de los aislados pertenecían al linaje LAM 26.9% al linaje Haarlem y el 11% al linaje Beijing [181].

Otro genotipo Beijing-like encontrado recientemente en el país es el SIT406/Beijing-like en un paciente indígena del departamento del Cauca que también pertenece a la región pacífica del país [182]. genotipo que también se encontró en un paciente de Guadalajara, México [183]. Todas las cepas Beijing-like tienen todo el espectro de resistencia, desde cepas monoresistentes hasta extensivamente resistentes (XDR), a diferencia del fenotipo reportado en otros países, en los que no hay asociación a resistencia, excepto en Cuba donde también se encontró esta asociación [164].

En otro estudio reciente realizado por Nieto-Ramírez y cols., en el que se estudiaron aislamientos clínicos enviados al CIDEIM entre 2002 al 2010 para la realización de pruebas de susceptibilidad a medicamentos, se logró establecer a partir del análisis 37 cepas de genotipo Beijing que estas presentaban un alto grado de resistencia antibióticos, sobre todo aquellas con SIT 190, los resultados de la evaluación de susceptibilidad a medicamentos mostraron que 30 de los 37 aislamientos tipificados en el estudio eran MDR, 6 fueron XDR y 1 fue sensible a medicamentos antituberculosis, 36 aislamientos clínicos pertenecían al genotipo Beijing-Like SIT 190 y 1 aislamiento clínico pertenecía al genotipo Beijing Clásico SIT 1, se determinó que todas las cepas Beijing tenían la delección en la región de diferenciación RD105 y adicionalmente se estableció que estos aislamientos clínicos eran sublinajes modernos del genotipo Beijing a partir de la confirmación de la presencia de las delecciones en las regiones de diferenciación RD207 y RD131 [184].

La mayoría de los aislados Beijing recuperados en el país pertenecen al genotipo “Beijing-like [174–176,179,180] sin embargo, poco se sabe de la enfermedad causada por este genotipo, que difiere del genotipo “Beijing Clásico” en el patrón que presenta en la tipificación por spoligotyping [83].

Los datos de los estudios mencionados ratifican la aparición de Mtb genotipo Beijing en nuestro país como un nuevo patógeno emergente asociado a TB-MDR / XDR. Las actividades comerciales, el turismo y la movilidad de la población de la ciudad de Buenaventura al resto del país pueden contribuir a la difusión del genotipo Beijing [116].

Las cepa “Beijing-Like” 323 SIT 190 objeto de este estudio fue secuenciada utilizando la plataforma PacBio; las características encontradas para este genoma fueron: (i) tamaño 4.411.216 bp; (ii) contenido G+C: 65.6%; (iii) regiones codificantes para proteínas: 4.237; (iv) genes codificantes para tRNA: 45; (v) genes codificantes para rRNA: 3; (vi) SNPs (Polimorfismos de único nucleótido): 2.143.1787 se encontraron en regiones codificantes, 743 fueron mutaciones sinónimas, 1026 fueron de pérdida de sentido o missense y 18 de ellas fueron sustituciones sin sentido; (vii) inserciones: 588 y deleciones: 569. Posteriormente, la anterior cepa junto con la cepa 391 [185].

La mayoría de trabajos de investigación de las variables fenotípicas en virulencia se han llevado a cabo en el modelo murino, utilizando los diferentes linajes de *M. tuberculosis*. El Ratón (*Mus musculus*) es el principal modelo animal utilizado para estos estudios, ofrece diferentes ventajas con respecto a los demás animales de laboratorio, entre ellas están: la facilidad de su manejo, el costo respecto a los demás modelos y la respuesta inmune uniforme. A pesar de que la inmunopatología que se desarrolla en estos animales no es igual a la que se desarrolla en humanos, lo que se constituye en la principal desventaja de su uso, este modelo ha ayudado a entender las características patológicas desencadenadas por las diferentes cepas de Mtb, lo cual ha contribuido a la identificación de blancos terapéuticos, a la evaluación de la actividad de diversos antibióticos y a la identificación de cepas virulentas de diferentes especies bacterianas, entre muchas otras aplicaciones [186].

Planteamiento del problema

A partir del primer reporte de pacientes con tuberculosis causada por el genotipo Beijing en la ciudad portuaria de Buenaventura en 1998 [174], así como en un estudio posterior que utilizó además de RFLP, MIRUs-VNTR y Spoligotyping para tipificar varios aislados clínicos de diferentes muestras obtenidos de una paciente proveniente del mismo puerto, se pudo determinar que pertenecían al genotipo Beijing-Like SIT190, que se diferencia del genotipo Beijing clásico (SIT 1) por la ausencia del espaciador número 40 entre los espaciadores 35 a 45 del locus DR [140].

La aparición de estudios posteriores que reportan la presencia y su asociación con resistencia a antibióticos en casi todas las cepas de este genotipo, corroboran la alta asociación de genotipo Beijing-Like con resistencia múltiple y extendida (MDR/XDR) a medicamentos para el tratamiento de TB [146,163,174] y probablemente la hipervirulencia de este patógeno el cual actualmente es considerado emergente en nuestro país. El genotipo Beijing se está constituyendo en un grave problema de salud pública en el país debido a su alta resistencia y según proyecciones de la OMS, hacia el 2050 van a ser las “Superbacterias” (SuperBugs) resistentes, las principales causantes de muerte a nivel mundial [187,188] [189,190]. En el caso de TB, se cree que cerca del 20% de los pacientes previamente tratados con los medicamentos antituberculosos de primera línea son MDR y el 9.7% de estos son XDR [191].

Si bien no existen estudios a nivel nacional para conocer la situación real de la circulación del Genotipo Beijing en el país, en los estudios publicados hasta el momento no se han reportado casos fuera de la ciudad Portuaria de Buenaventura y no se reporta la circulación del genotipo con SIT190 en países vecinos como Ecuador y Perú que tienen circulación de Beijing [163], adicionalmente, aún no se tiene una explicación precisa de las particularidades de esta bacteria en el país, la principal hipótesis es que debido a que en el pacífico colombiano se encuentra uno de los principales puertos comerciales en la ciudad de Buenaventura, este puede ser la puerta de entrada de estas cepas provenientes de Asia.

Dado que de estas bacterias solo se conoce su genotipo y su perfil de resistencia a antibióticos y de acuerdo con los escasos reportes que se tienen, la mayoría de los pacientes infectados con Beijing-Like mueren de la enfermedad, tal como sucedió con el primer caso encontrado en la ciudad de Bogotá de la paciente proveniente del puerto de Buenaventura [140,168,174].

Hasta el momento no se han reportado en el mundo estudios referentes a la interacción huésped patógeno (en modelos animales ni celulares) del genotipo Beijing-Like, cuya presencia en pacientes colombianos se encuentra en aumento. En este estudio se propone ampliar el conocimiento existente de este genotipo emergente, de tal manera que los resultados obtenidos con respecto a la virulencia, respuesta inmune y expresión diferencial de genes en el análisis de transcriptoma a partir de tejidos infectados en el ratón (*Mus musculus*) BALB/c, permitirá generar el conocimiento necesario de la biología de este genotipo en este modelo animal que, aunque los resultados que se obtengan no serán 100% extrapolables al humano, por sus diferencias en inmunopatogenicidad, si permitirán disponer de herramientas útiles para generar intervenciones que permitan el control de esta peligrosa bacteria, que circula en América: en Estados Unidos, Cuba y Colombia, siendo este último el país con el mayor número de casos reportados [175].

Hipotesis

Mycobacterium tuberculosis genotipo Beijing-like es más virulento en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva murino comparado con las cepas de referencia y con el genotipo Beijing clásico circulante en Colombia. Adicionalmente, los genes del patógeno presentan una expresión diferencial que favorece el establecimiento y rápida progresión de la patología pulmonar y extrapulmonar produciendo enfermedad grave en los animales y posteriormente la muerte.

Justificación

En el inicio de la década de los 90, la TB se declaró como una emergencia sanitaria mundial por la OMS, y aún permanece vigente. El genotipo Beijing es uno de los genotipos más virulentos que circulan en el mundo, se le atribuye alta capacidad de virulencia, resistencia múltiple y extendida a medicamentos, está asociado con fallas en los tratamientos, brotes de tuberculosis multirresistente (TB-MDR), hipermutabilidad y aumento de la transmisibilidad.

Varios estudios experimentales han proporcionado evidencia de que las cepas clínicas de MTBC difieren en su capacidad de virulencia. Teniendo en cuenta que se desconocen los factores determinantes de virulencia en el hospedador humano infectado con cepas del genotipo Beijing-Like, así como la respuesta inmune del mismo y la modulación de la expresión génica de la bacteria y el hospedador durante la infección, el presente estudio brinda la posibilidad de determinar estos factores en el modelo murino, conocimiento que es de gran importancia para comprender la biología de la infección de este importante patógeno emergente en el país. Por estas razones consideramos el presente trabajo pionero en Colombia y esperamos proporcione importantes bases fundamentales para el control de cepas con el genotipo Beijing-Like en Colombia.

Objetivos

Objetivo General

Caracterizar la virulencia y la respuesta inmune in vivo de *Mycobacterium tuberculosis* genotipo Beijing a partir de la infección del modelo de tuberculosis pulmonar progresiva “ratón BALB/c” y analizar la expresión diferencial de genes determinantes de virulencia en fase aguda y crónica de la enfermedad en el animal.

Objetivos Específicos

- Evaluar en el modelo animal de tuberculosis progresiva “ratón BALB/c” las bases histopatológicas e inmunológicas de la virulencia in vivo de *Mycobacterium tuberculosis* genotipos Beijing circulante en Colombia.
- Evaluar en ratón BALB/c la expresión diferencial de genes de *Mycobacterium tuberculosis* genotipo Beijing circulante en Colombia, asociados a su virulencia en las fases aguda y crónica de la infección.

Capítulo 1. Aislamientos clínicos colombianos de Mtb y Modelo de TB pulmonar progresiva Crónica Ratón Balb/c.

1.1. Introducción

1.1.1. Respuesta inmune a Mtb

1.1.1.1. Respuesta inmune Innata

El proceso de infección por Mtb ocurre cuando cualquier hospedador infectado expulsa los bacilos a través de la saliva al toser o estornudar, estas gotas de saliva con bacterias pueden permanecer en el aire por largos periodos de tiempo, así como son capaces de sobrevivir en superficies, favoreciendo la infección de nuevos hospedadores los cuales inhalan los bacilos, los cuales llegan a los alvéolos pulmonares para establecer la infección. Se sabe de numerosas variables que favorecen la infección y posterior enfermedad por Mtb, se conocen entre ellas, variables genéticas y ambientales, así como distintos mediadores del huésped y del microorganismo, implicados en la resistencia o susceptibilidad a la infección por lo que incrementan el riesgo de la progresión hacia un estadio activo de la enfermedad. Entender como estos distintos factores interactúan determinando el desenlace de la infección es fundamental para el diseño de nuevas y más eficientes terapias contra esta enfermedad [192].

Una vez entran los bacilos al microambiente pulmonar, inicia una interesante interacción entre los efectores inmunológicos del nuevo hospedador infectado y la bacteria. Mtb es un patógeno que ha incorporado a su estructura genética mecanismos para evadir el sistema inmune de la persona infectada, a través de estrategias sofisticadas y efectores moleculares que favorecen el proceso infeccioso y que bien podrían servir como blancos moleculares útiles para el desarrollo de vacunas y nuevos tratamientos antituberculosis (Antibióticos, inmunoterapia, terapia génica dirigida etc.,) [193].

Las células dendríticas y los macrófagos alveolares residentes, son las células encargadas de realizar el proceso inicial de fagocitosis y procesamiento de antígenos. El reconocimiento se da a partir del receptor de fagocitosis ubicado en la membrana de las células presentadoras de antígenos

profesionales (CPA) que son las encargadas de reconocer los antígenos del patógeno. Luego, las proteínas de superficie del bacilo, activan las proteínas del complemento. La otra ruta que puede tomar la respuesta de las células fagocíticas, es reconocer los residuos de manosa del lipoarabinomano (LAM) por medio de los receptores de manosa. Si la fagocitosis se realiza por medio de los receptores de complemento, se produce una cantidad limitada de especies reactivas de oxígeno para mediar la muerte de la bacteria, pero si la fagocitosis, es mediada por los receptores de manosa, el bacilo es dirigido al compartimento fagosomal, el cual al unirse con el lisosoma, tiene la capacidad de madurar y acidificarse para matar la bacteria, este proceso es mediado por proteínas bacterianas que le permiten evadir la acción de las células presentadoras de antígeno [194–196].

Existen muchos otros receptores involucrados en el reconocimiento de antígenos bacterianos, que van a cumplir diferentes funciones inmunes para el control de la infección, estos receptores, pueden estar ubicados en la superficie o en el citoplasma de las células y son los que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), entre los que se encuentran: Receptores de superficie celular: TLRs (Toll like receptors), CRs (Receptores de complemento), MR (Receptores de manosa) y DC-SIGN (Señalización por Células dendríticas); entre los antígenos que estos receptores reconocen están: LM (Lipomano), lipoproteínas, y trehalosa dimicolatos. Los receptores intracelulares tales como: NOD, TLR9, DAI, cGAS, AIM2, NLRP3, IFI16, STING, DDX41 y RNA Pol III, se encargan del reconocimiento de ácidos nucleicos y peptidoglicano [195,197,198].

Luego de todo este proceso de reconocimiento, entra en acción una respuesta inmune innata proinflamatoria, caracterizada por la producción de las citoquinas TNF- α , IL-1 β e IL-12 entre otras, que producen la quimiotaxis de más macrófagos al sitio de infección y desencadenan la migración al sitio de infección de células Natural Killer (NK) y neutrófilos, activando el sistema de complemento para mediar la muerte del bacilo fagocitado; por otra parte, los macrófagos producen la molécula efectora Interferón γ (IFN- γ) que además de ayudar en el control de la infección, facilita la producción de interleuquinas tales como: IL-12, IL-15 e IL-18 y la quimiotaxis de LT vírgenes, LT $\gamma\delta$ que se encuentran en las mucosas reconociendo epitopes bacterianos no mediados por moléculas de MHC y permitiendo así el aumento de células TCD8+, que posteriormente formarán el granuloma para contener la infección [193].

Dado que la mayoría de las veces, la respuesta inmune innata es insuficiente para el control de la infección, a medida que aumentan la concentración de Ags en las células, se activa la respuesta inmune adaptativa, mediada por linfocitos B (Inmunidad humoral) y linfocitos T (Inmunidad Celular); estos dos tipos de inmunidad, son activados en los órganos linfoides periféricos y una vez el antígeno está procesado por las CPA, este es presentado por medio de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a las células B y células T [199,200].

La respuesta inflamatoria constituye un mecanismo fundamental en el control y la eliminación de muchos patógenos, resultando claramente beneficiosa cuando es auto-limitada. La IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria importante en este proceso. La transcripción del gen que codifica el

precursor pro-IL-1 β es inducido por PRRs (Patrones de reconocimiento de Receptores) como los TLRs (Toll like receptors) y el procesamiento del péptido precursor entra en su forma activa, gracias a un complejo multiprotéico conocido como inflamosoma, en este caso el inflamosoma NLRP3, activa la caspasa-1 que conduce a la maduración y secreción de IL-1 β e IL-18, las dos citoquinas pro-inflatorias más potentes para el control de la infección por esta vía. La producción de IL-1 β es controlada a través de señales derivadas de la colonización microbiana y/o señales del tejido inflamado derivados de daños inducidos por este patógeno [201].

Claramente, la infección por Mtb, cuya principal célula hospedera es el macrófago [202–204] desencadena una potente producción de IL-1 β [205] e IL-12 [206]. La IL-12 es primordial para el establecimiento del otro componente de la respuesta, la inmunidad adaptativa, a través de la inducción de los linfocitos Th1 productores de IFN- γ [207], siendo citoquina primordial para el control del bacilo [208,209], ya que actúa sobre los macrófagos infectados activando su función bactericida y por ende la liberación de enzimas hidrolíticas y especies reactivas de oxígeno tóxicas para las bacterias; sin embargo, el daño ocasionado al bacilo por estos efectores inmunes resulta igualmente dañino para las células y el tejido del huésped [210,211]. El IFN- γ también induce la producción de NO (Óxido Nítrico) producto de la actividad de la Óxido Nítrico Sintasa (iNOS), el cual inhibe el crecimiento bacteriano [212] y a su vez favorece la liberación de IL-12 [213][214]. En los casos en que el control de la infección no es efectivo (5% de individuos infectados) las evidencias sugieren que la respuesta inflamatoria se perpetúa en parte a expensas de un “feedback” positivo del inflamosoma que al parecer se controla en individuos con infección latente – pero que persiste en sujetos con enfermedad activa. No obstante, este escenario ha sido descrito desde hace varios años, actualmente se desconocen detalles acerca de los mecanismos homeostáticos responsables de los distintos tipos del devenir de la infección. Estudios recientes han sugerido un rol inhibitorio del IFN- γ sobre la liberación de IL-1 β por el macrófago, en respuesta a la infección por Mtb que es mediado por la inactivación del inflamosoma por NO [215].

Mediadores importantes de este proceso son los Interferones de tipo I que son esenciales para la defensa del huésped contra agentes virales, que en las fases iniciales de la infección favorecen la respuesta anti-viral incluida la formación del inflamosoma; pero que cuando sus niveles prevalecen como en el caso de la infección por Mtb este tipo de respuesta al parecer resulta deletérea para el hospedador. En distintos estudios tanto en animales como en humanos, el IFN- β ha sido asociado con tuberculosis exacerbada que cursa con niveles persistentes de este IFN en las primeras semanas de la infección [216–218]. Se ha observado que la infección pulmonar inducida por cepas hipervirulentas de Mtb está asociada a altos niveles de IFN tipo I que comprende la respuesta Th1 [219].

El IFN- β previene la expresión de pro-IL-1 β y la secreción de IL-10, una citoquina anti-inflatoria cuya producción es dependiente de la activación autocrina de STAT3 que modula la liberación de IL-1 β [220]. Estos fenómenos han sido demostrados tanto en modelos animales in vivo, como en

monocitos humanos *in vitro* [221]. Otros estudios sugieren que la inhibición de IL-1 β en su mayoría es independiente de IL-10 [217]. Los interferones de tipo I exógenos y la IL-10, también son capaces de inhibir otras citoquinas protectoras del huésped como IL-12 y TNF- α , mecanismo que parece estar mediado por la IL-10 [222]. Por su parte la IL-10 inhibe la respuesta Th1 desencadenada por Mtb a través de distintos mecanismos [223,224]. Adicionalmente, el IFN- β antagoniza la señalización del IFN- γ regulando a la baja la expresión de su receptor y comprometiendo la activación de los macrófagos [225]. Sin embargo, las acciones de los IFN tipo I parecen ser más complejas, evidenciado en acciones que en ocasiones son opuestas y distintas a las previamente descritas [216]. Tanto el IFN- β como IFN- γ activan la caspasa 11, que es pro-inflamatoria y favorece la activación del NLRP3 [216,219] y se ha observado que su secreción autocrina es requerida parcialmente para una producción óptima de IL-12, por estimulación de TLR [217,219] y TNF- α . Estas acciones contradictorias parecen estar explicadas por los hallazgos de McNab y col., quienes realizaron un estudio de la cinética de la acción de los IFN tipo I sobre los macrófagos infectados con Mtb, cuando están presentes pronto, después o previo a la infección.

En términos generales fue posible establecer que la acción inhibitoria de la respuesta inmune del macrófago por el IFN- β , es a expensas de la inhibición de los efectos del IFN- γ en los macrófagos infectados. Este estudio también sugiere que más allá de la acción del IFN tipo I o IL-10, los macrófagos raramente producen grandes cantidades de la forma activa de IL-12, la IL-12p70, lo cual sugiere que en el contexto de la infección por Mtb existen una variedad de mecanismos relacionados con la regulación a la baja de esta citoquina importante para la diferenciación Th1 de la respuesta celular [217].

La Prostaglandina E2 (PGE2) también constituye un mediador importante en la regulación de la infección por Mtb. Es inducida por la IL-1, mejora la actividad antimicrobiana de los macrófagos, bloquea la acción de los IFN tipo I e inhibe el crecimiento bacteriano, pero este último mecanismo no se conoce del todo. Se cree que está relacionado con la inhibición de la muerte por necrosis del macrófago. De manera importante el eje IL-1- PGE2 IFN tipo I está asociado con una presentación más severa de la enfermedad en los humanos [226,227].

Existen variaciones genéticas entre los individuos que tienen roles significativos en esta compleja red, por ejemplo, variaciones en la biosíntesis de eicosanoides [228] y polimorfismos de la IL-1 β , que se asocian con la predisposición a TB [229]. Lo anterior abre la posibilidad de que individuos que son capaces de mantener la infección controlada pero presentan un incremento en la vía de los IFN tipo I, por una infección viral por ejemplo, pasaran de infección pasiva a tuberculosis activa [230]. En la **Tabla 1-1.**, se relacionan los principales receptores inmunes involucrados en el reconocimiento de antígeno y las principales citoquinas involucradas en la respuesta pro-inflamatoria a Mtb

Tabla 1- 1. Principales receptores inmunes implicadas en el reconocimiento de antígenos de *M. tuberculosis*

MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA A Mtb			
RECEPTORES EN SUPERFICIE DE MACRÓFAGOS	MOLÉCULA	FUNCIÓN	CÉLULAS EN LAS QUE SE EXPRESA O SE INDUCE
Receptores de Manosa (Proteína transmembranal tipo I)	MR, CD206	Fagocitosis, Unión a superficie de Mtb (ManLAM), sobrerregulación de PPAR- γ y receptor Nuclear del peroxisoma	Macrófagos, Células dendríticas
capturadora de ICAM-3 de células dendríticas No Integrina (Proteína Transmembranal tipo II)	DC-SIGN, CD-209	Mediador de fagocitosis en CDs, unión de ligandos y receptores, Fagocitosis, tráfico intracelular de partículas ligando	Células dendríticas
Dectina-1 (Proteína Transmembranal tipo II)	β -glucan PRR	Regulador de respuesta Pro-inflamatoria, coestimula la producción de TNF- α e IL-12p4	Macrófagos, Células Dendríticas, neutrófilos
Receptores tipo Toll (TLRs)	Superficie (TLR2 y 4), Intracelulares (TLR8 y 9)	Inducción de una fuerte respuesta pro-inflamatoria a mtb mediada por TLR-2 y las proteínas adaptadoras Myd88 y TIRAP.	Células Inmunes
Receptor de Complemento Tipo 3 CR1 (CD35) y CR4 (CD11c/CD18)	CR3, CD11b/CD18	Oponización, fagocitosis	Monocitos y Macrófagos
RECEPTORES CITOSÓLICOS INTRACELULARES			
Dominio 1 y 2 de oligomerización de nucleótidos NOD1, NOD2	CARD4 y CARD15	Regulación de respuesta pro-inflamatoria, sobrevivencia intracelular de Mtb en macrófagos	Células Epiteliales tipo II y MLB en células hepáticas
Lectinas Solubles de tipo C o Colectinas	SP-A, SP-D y lectinas de unión a manosa-MBL	Sistema inmune innato en pulmón, modulan fagocitosis, favorecen fusión fagolisosomal, MLB reconoce carbohidratos de superficie actuando como opsonina y promueve inflamación	
CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS			
Factor de Necrosis Tumoral	TNF- α	Respuesta proinflamatoria protectora, Involucrada en la formación y mantenimiento de granulomas.	Monocitos, Macrófagos y Células Dendríticas
Interleuquina 1 Beta	IL-1 β	Mediador en la sobre regulación de moléculas necesarias para el control del Mtb	Células Inmunes en forma inactiva ro-IL-1 β
Interleuquina 6	IL-6	Propiedades pro inflamatorias y anti inflamatorias, inducción de LT citotóxicos y diferenciación de Macrófagos	Células inmunes
Interleuquina 8	IL-8 o CXCL-8	Reclutamiento de Células Inflamatorias al sitio de infección, Niveles incrementados de esta quimioquina está asociado con mortalidad.	Células fagocíticas
Interleuquina 10	IL-10	Citoquina inactivadora de macrófagos, promueve la reactivación de la TB en ratones, inhibe maduración fagolisosomal favoreciendo la persistencia intracelular de Mtb.	Monocitos, Macrófagos, Células Dendríticas, Linfocitos B, Linfocitos T
Interleuquina 12	IL-12	Induce la Producción de IFN- γ por LT, promueve la diferenciación de LT a Th1.	Monocitos, Macrófagos, Células Dendríticas, Linfocitos B, Linfocitos T
Interleuquina 18	IL-18	Citoquina pro-inflamatoria, induce producción de IFN- γ , ejerce un rol protector durante la infección con Mtb	
Proteína quimioattractante de Monocitos-1	MCP-1 o CCL2	Involucrada en el reclutamiento de monocitos y formación de granuloma	Monocitos y Macrófagos
RANTES	CCL5	Promueve la formación de granulomas	Células T, monocitos, macrófagos, eosinófilos y basófilos
Óxido Nítrico Sintetasa inducible	iNOS o NOS2	Molécula efectora con actividad bactericida	Macrófagos y Células Epiteliales

1.1.1.2. Respuesta inmune adaptativa

Posterior al control inicial de la TB por parte del sistema inmune innato, cobran importancia los linfocitos T CD4+ de memoria que son los responsables de generar una memoria inmunológica de tipo celular ante la presencia de bacterias del MTBC, esto ocurre una vez los bacilos migran hacia los nódulos linfoides, allí los linfocitos son activados y sufren un proceso de expansión ante la presencia de antígenos micobacterianos. La actividad protectora de los LT CD4+ puede iniciar tan temprano como a los 5 días de la infección primaria, sin embargo, el establecimiento completo de la respuesta ocurre entre las 2 y las 6 semanas posteriores a la infección primaria y tanto LT CD4+ y LT CD8+, pueden proteger contra nuevas infecciones por Mtb.

A medida que aumentan la concentración de Ags en las células, se activa la respuesta inmune adaptativa, mediada por linfocitos B (Inmunidad humoral) y linfocitos T (Inmunidad Celular); estos dos tipos de inmunidad, son activados en los órganos linfoides periféricos y una vez el antígeno está procesado por las CPA, este es presentado por medio de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a las células B y T [199,200].

Las células responsables de la iniciación de la respuesta inmune adaptativa para la generación de memoria inmunológica contra el bacilo, son las células dendríticas (CDs), estas células presentadoras de antígeno profesionales, son las encargadas del procesamiento de antígenos, o en su defecto el transporte de bacterias viables a los nódulos linfoides que drenan a pulmón, para presentar allí los antígenos que activan a las células T, o se presentan los antígenos procesados a las células T vírgenes por vía Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC-II) [231]. Para que la generación de respuesta inmune de memoria efectiva contra Mtb sea generada, se requiere de la biodisponibilidad de las moléculas necesarias para el funcionamiento adecuado de este proceso, sin embargo, se ha evidenciado que diferentes genotipos de Mtb pueden alterar el funcionamiento normal de este proceso. Por ejemplo, fracciones lipídicas de cepas de genotipo Beijing, regulan negativamente la expresión de moléculas de MHC-II, impidiendo el procesamiento antigénico y el desarrollo de una respuesta inmune celular de memoria mediada por linfocitos T ayudadores [232]. En un modelo de infección in vitro en macrófagos derivados de médula ósea, estimulados con extractos solubles de diferentes genotipos de Mtb, se determinó que a diferencia de la cepa de laboratorio H37Rv y *M. bovis* BCG, las células estimuladas con genotipo Beijing, fueron incapaces de producir la maduración de CD por medio de la inhibición en la expresión de moléculas asociadas a MHC-II, además de la inhibición en la producción de IL-12 y TNF- α [232]. En general el éxito de una respuesta inmune celular de memoria contra Mtb, radica en la inducción de una respuesta potente y sostenida de los linfocitos T, que esté caracterizada por la Inducción de Células T Helper CD4+, las cuales promueven la proliferación de LT citotóxicos CD8+, este balance es interrumpido por cepas genotipo Beijing, desencadenando al final TB complicada en el hospedador [233,234]. En la **Figura 1-1.**, se esquematiza globalmente la intervención del sistema inmune innato y adaptativo, ante el reconocimiento de Mtb por células inmunes y la infección de células fagocíticas para el control y/o progresión de la TB.

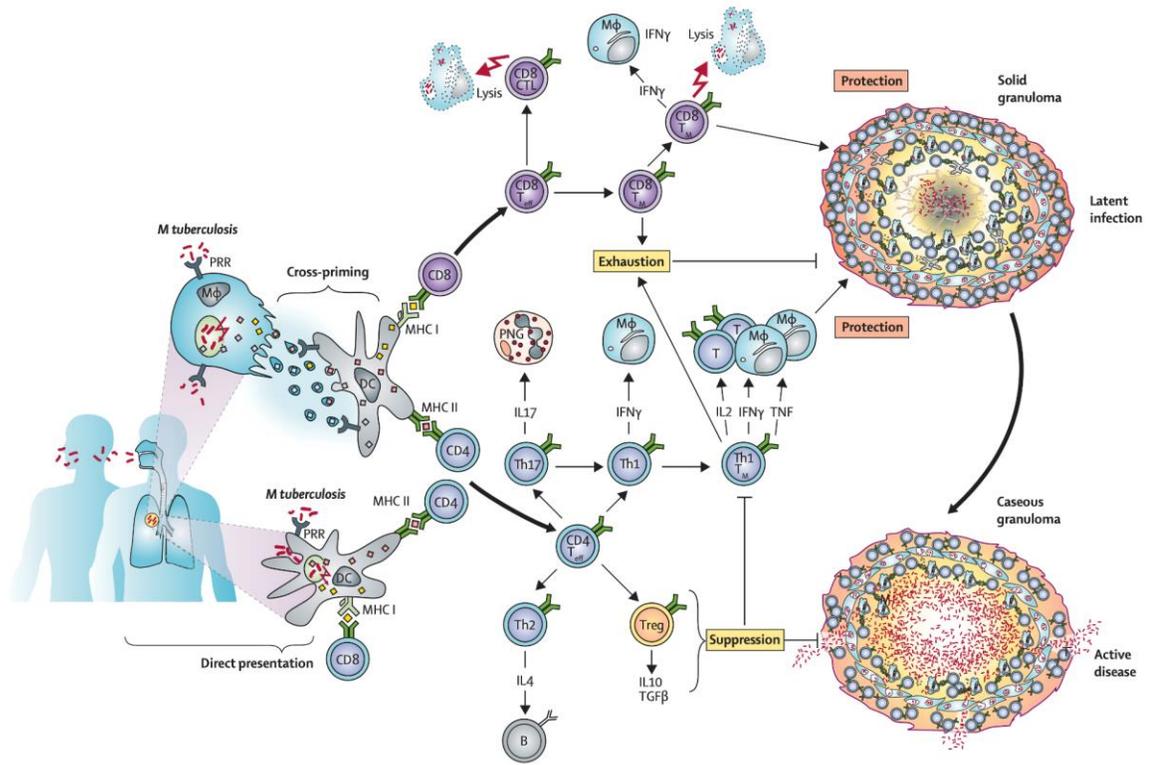


Figura 1- 1. Esquema general de respuesta inmune innata y adaptativa a la infección por *M. tuberculosis*
 Tomado de: New vaccines for tuberculosis Kaufmann y cols., [224]

1.1.2. Generalidades de Modelos animales e *In-Vitro* para el estudio de la virulencia de Mtb

La virulencia de Mtb se define como “la capacidad que tienen las diferentes cepas de: invadir, sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del hospedero, la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria granulomatosa, la capacidad de superar las defensas del huésped y persistir en el tejido del huésped en un estado latente (incluso por años) [106,235]. Con el fin de indagar sobre los diferentes sucesos bioquímicos que ocurren durante el proceso de infección y enfermedad, se han utilizado diferentes modelos in-vitro e in-vivo, para simular los procesos de infección e indagar sobre los actores génicos y protéicos involucrados.

La virulencia de Mtb se puede cuantificar en el laboratorio utilizando modelos celulares y Modelos animales (Ratón, Rata, Cobayo, Conejo, Primates no humanos, otros modelos animales). El principal criterio para la elección de un modelo animal es principalmente la similitud en el desarrollo de la patología y en la respuesta inmune a la del humano [65].

1.1.3. Modelos *In-Vitro* para estudios de virulencia y respuesta inmune

El primer modelo que se contempla para evaluar hipótesis planteadas sobre la infección y respuesta inmune generada por Mtb, es el modelo celular *in vitro*. Existe una variedad de líneas celulares de referencia de macrófagos, las cuales son infectadas por las bacterias, y además poseen la capacidad de establecer un nicho infeccioso intracelular, evadiendo su actividad inmune protectora en el hospedador infectado. Los modelos *in vitro* de infección son claves para comprender los mecanismos patogénicos desencadenados por Mtb y la patología que desencadenan diferentes cepas, observables la mayoría de las veces, por el tipo de citoquinas que se producen durante la infección de estas células [236].

Las infecciones en células *in vitro* se vienen realizando desde los años 50, usando cepas con diferentes niveles de virulencia, en fagocitos presentes en exudados peritoneales de cobayos sanos [237]. Hoy en día, se tienen líneas celulares de referencia de monocitos y macrófagos que han permitido dilucidar la capacidad replicativa y los mecanismos inmunes desencadenados por Mtb. La mayoría de las líneas celulares de monocitos y macrófagos provienen de ratones, primates y humanos [236]. En la **Tabla 1-2.**, se relacionan las principales líneas celulares utilizadas para estudios de respuesta inmune *in vitro* y virulencia de Mtb.

Son numerosas las ventajas de trabajar con cultivos celulares, la principal de ellas, los bajos costos en el mantenimiento de las líneas celulares (con respecto a los modelos animales), la disponibilidad en relativamente poco tiempo de una gran y homogénea población celular, disponibilidad de reactivos y anticuerpos, realizar estudios de tamizaje a gran escala, diferenciación de las células con una variedad de citoquinas, investigación del rol de la respuesta inmune desencadenada por las cepas de Mtb, inducción y activación de inflammasoma, generación de células mutantes, múltiples manipulaciones genéticas, relativa facilidad en la obtención de líneas celulares y cultivos primarios provenientes de cualquier especie animal [236].

Tabla 1- 2. Principales líneas celulares utilizadas para estudios in-vitro de respuesta inmune generada por cepas de Mtb, estudios de virulencia in-vitro, citotoxicidad, capacidad replicativa, origen, características físicas de la línea celular.

LÍNEA CELULAR	ESPECIE DE ORIGEN	FENOTIPO CELULAR	ORGANO – ORIGEN	USOS Y PROPIEDADES
RAW 67.4	BALB/c	Monocitos/Macrófagos Transformados por el virus de Leucemia Murina	Líquido Ascítico. Tumor inducido por virus de la Leucemia Murina de Abelson	Células Adherentes. Pinocitosis, fagocitosis, citotoxicidad
J 774	BALB/c	Macrófagos	Células reticulares de Sarcoma	Células Adherentes. Fagocitosis, síntesis de IL-1 β , productoras de Lisozima.
MH-S	BALB/c	Macrófagos alveolares transformados con virus SV40	Alvéolos Pulmonares	Células adherentes y en suspensión. Actividad fagocítica, Productoras de IL-1 β
AMJ2-C11	C57BL/6	Macrófagos Alveolares	Alvéolos Pulmonares	Células en suspensión. Actividad Fagocítica, expresión constitutiva de MHC-II,

Los principales parámetros evaluados en estudios in- vitro son:

- **Determinación de UFCs:** Determinación de la capacidad replicativa de las cepas bacterianas y determinación de la capacidad fagocítica y bactericida de las células a partir de la siembra en placa y cuantificación de la carga bacteriana.
- **Medición de citoquinas:** Cuantificando la concentración de citoquinas por ELISA, Citometría de Flujo, Elispot, etc., o cuantificación de la expresión de citoquinas y otros genes por qRT-PCR o RNA-seq
- **Evaluación de alteraciones Morfológicas:** Con preparaciones para Microscopía electrónica de transferencia, o coloraciones básicas como Giemsa.
- **Viabilidad Celular:** Usando coloraciones supravitales como Azul de tripán.

1.1.4. Modelos animales para determinación de virulencia y respuesta inmune de Mtb

El estudio de las manifestaciones clínicas asociadas a virulencia en animales, se ha convertido en una herramienta muy útil para evaluar todo el espectro clínico de las enfermedades infecciosas además de otros campos de investigación en salud humana. Existen diferentes modelos animales en los que cepas o aislamientos clínicos de Mtb pueden ser estudiadas, entre ellos tenemos: Ratón, Rata, Cobayo, Conejo, peces e inclusive, animales grandes como el ganado vacuno, porcino y los primates no humanos [238]. La selección de la especie animal va a depender de diversos factores: el más importante como se mencionó antes es la patología pulmonar, que debe ser lo más parecido a la del humano. Otro criterio muy importante es la infraestructura para el mantenimiento de los animales, entre más grande sea el animal, mayor espacio necesitará y por lo tanto se incrementan los costos de mantenimiento, además hay modelos que ofrecen mayores ventajas para trabajar en ellos, por otra parte, la bioseguridad de las instalaciones en las cuales se mantendrán los animales deben garantizar que no se presentaran infecciones en investigadores y mucho menos en la comunidad que rodee dichas instalaciones [239].

Básicamente, los animales de laboratorio, pueden clasificarse en dos grupos: Los animales **ENDOCRIADOS** y los animales **EXOCRIADOS**. Los animales endocriados son aquellos que son cruzados entre hermanos, por lo cual también se les conoce como animales consanguíneos o isogénicos (Inbred), su estatus genotípico, consiste en que los locus de todos los individuos son homocigotos para el mismo alelo de un locus determinado y su descendencia posee el mismo alelo idéntico, estos animales se obtienen después del cruce consecutivo por 20 o más generaciones y todos provienen de la misma pareja reproductora inicial, reduciendo en teoría en menos del 2% la variabilidad genética (Heterocigosis residual). Por otra parte, los animales exocriados son aquellos que son cruzados al azar (Random bred) de tal manera que el grado de consanguinidad sea lo más alejada posible. Aunque las cepas de animales endocriados tiene la bondad de reducir al máximo la variación de los resultados experimentales por variaciones intrínsecas del animal, la investigación en animales exocriados reproduce el tipo de reproducción humana, por lo que antes de elegir el tipo de animal más conveniente para la aproximación experimental que se quiera llevar a cabo, es necesario tener conocimiento sobre el background genético del animal y el tipo de crianza [240,241].

El inicio de la generación de cepas de animales endocriados se desarrolló hacia 1906 por *G. M. Rommel* quien llevó a cabo los experimentos de cruce entre hermanos en *Cavia porcellus* (Cobayo). A partir de estos experimentos, se empezaron a generar un gran número de cepas endocriadas en diferentes especies animales de mamíferos, anfibios, peces e invertebrados [240,241]. La primera cepa endocriada de ratón fue generada por C. C. Little in 1909, quien desarrolló la línea de ratones DBA (diluida, marrón y no agutí), otras líneas de ratones endocriados ampliamente utilizados en investigación son A/J, BALBc, C3H, C57BL/6 entre otros [240,242].

En cuanto a la nomenclatura, las líneas de consanguinidad de los animales se designan en letras mayúsculas, minúsculas o en combinación y también pueden ser denominados con números y las

sublíneas son los números que se encuentran después de la barra (/), que por lo general es un número o código o una letra, es importante tener en cuenta que aunque los animales endocriados poseen una alta homogeneidad genética entre individuos, se pueden inducir fuentes potenciales de variabilidad como los son la contaminación involuntaria (apareamiento entre cepas diferentes), las mutaciones aleatorias espontáneas (σm^2) y la selección heterocigota (Se involucra más de una pareja por generación en el stock de cría, los individuos con alta heterocigosidad con mayor fitness reproductivo contribuyendo más a la siguiente generación), por lo que en realidad no se dispone de cepas de animales completamente homocigotos, cualquiera de las anteriores causas de variabilidad genética puede tener implicaciones muy importantes en los resultados obtenidos, poniendo en tela de juicio su veracidad [240,242].

Ratón: Es el modelo que se usa más comúnmente para estudios de virulencia y desarrollo de vacunas, el ratón posee un 95% de homología en su genoma al del humano, por lo que es usado para el estudio de diferentes enfermedades que no pueden ser realizados en personas. Este modelo ofrece grandes ventajas para su uso: (i): es un modelo muy económico y no requiere una infraestructura muy compleja para su mantenimiento, (ii): existe una amplia disponibilidad comercial de anticuerpos y reactivos, (iii): los ratones pueden ser manipulados genéticamente para simular diferentes condiciones en humanos, (iv): se pueden obtener cepas de ratones endocriadas, lo que reduce la variabilidad en los experimentos, (v): La esperanza de vida de estos animales es acelerada, cada año de ratón equivale a 30 años humanos, lo que permite hacer el estudio de enfermedades crónicas en todo su espectro como TB. El mayor inconveniente que presenta este modelo es que la patología pulmonar no es igual a la del humano a pesar de su homogeneidad, en ellos MTB no induce la producción de granulomas estructurados, cuya formación, está mediada por el intercambio en la producción de citoquinas T helper 1 y T helper 2 (Th1 y Th2) en fase aguda y latente de la enfermedad. Sin embargo, es el modelo del cual se tiene más información en cuanto a la investigación de patogenicidad y respuesta inmune, lo que permite tener puntos de referencia para poder comparar los hallazgos obtenidos de estudios de aislamientos clínicos determinados [186,238].

Quizá el laboratorio con la mayor colección de cepas de ratones es el The Jackson Laboratories en Estados Unidos, los grupos de cepas de ratones más comúnmente pedidos a este laboratorio constan de 8 cepas de ratones inmunodeficientes, 20 cepas de ratones endocriados, 7 cepas de ratones híbridos, 1 cepa de ratones exocriados y 17 cepas de ratones mutantes en diferentes genes. Los ratones de este laboratorio son usados principalmente para la investigación en Alzheimer y Cáncer, sin embargo, las cepas BALB/c y C56Bl/6 son ampliamente utilizados para la investigación en enfermedades infecciosas [243].

La cepa de ratón BALB/c es utilizada para la producción de anticuerpos monoclonales, esta característica es medida por la formación de plasmacitomas después de la inyección de aceite mineral. Como características físicas del animal, encontramos que es un ratón albino, genotipo H1d/H1d BALB/cByJ o BALB/cJ, la vida media del animal es de 18 meses. Es susceptible a la

formación de diferentes tipos de cáncer, así como también es susceptible a la infección por Mtb, desarrollando una enfermedad progresiva, por lo que es ampliamente utilizado para el estudio y caracterización de las fases de la enfermedad [243]. La primera cepa de este modelo fue criada por Bagg en 1913 obtenido de un stock del distribuidor de mascotas Ohio, la cual fue subsecuentemente endocriada por MacDowell en 1923; en 1932 este entregó la cepa endocriada a Snell y este la entregó a Andervont quien mantuvo la cepa a partir de 1935, luego Andervont entregó la generación 72(F72) de la cepa en 1951 a NIH, quien en 1974 la entregó a Charles River. La cepa de ratón BALB/c además puede ser utilizada para investigación en: Inmunología, estudios comportamentales y parasitología [243].

Cobayo: Es un modelo muy sensible a la infección por Mtb y es muy útil para estudios de virulencia, desarrollo de vacunas y evaluación de antibióticos. Es un modelo relativamente económico, pero más costoso que el ratón, sin embargo, la conformación de granuloma y la patología pulmonar es muy similar a la del humano. La principal desventaja de este modelo, es la poca disponibilidad comercial de anticuerpos y reactivos, por lo que hay que realizar metodologías para evaluar los genes asociados a virulencia y respuesta inmune que no implique el uso de estos [66,238,244,245].

Conejo: Es un modelo naturalmente resistente a la infección con Mtb, pero con el uso de animales endocriados (Cruce entre padres e hijos) aumenta la susceptibilidad a la enfermedad. Aunque su uso hoy en día es limitado, este fue usado para la evaluación de diferencias en la patología y virulencia entre Mtb y *M. bovis* y estudios de virulencia de asilamientos clínicos y cepas de referencia de Mtb. Uno de los grandes beneficios del uso de este modelo es el amplio espectro de la enfermedad que ellos desarrollan, además la patología pulmonar es la más similar a la del humano fuera del modelo primate. Los principales inconvenientes del uso de este modelo son: La no disponibilidad de reactivos y anticuerpos comercialmente, requiere una infraestructura más compleja para su mantenimiento aumentando los costos, y no hay mucha disponibilidad de animales endocriados, por lo que se obliga al uso de los exocriados produciendo una amplia variabilidad en los resultados [196,238,238].

Primates no humanos: aunque genéticamente es el animal más similar al humano y desarrolla la enfermedad progresiva con las características clínicas iguales a las del humano, es un modelo muy costoso, por lo que pocas instituciones pueden trabajar en este. El mecanismo de infección, la eficacia de la vacunación con BCG y el tratamiento son iguales al humano, convirtiéndolo en el modelo más robusto para estudio de virulencia, desarrollo de nuevos antibióticos, análisis de nuevos blancos terapéuticos y desarrollo de vacunas. Sin embargo, además del costo de mantenimiento, la probabilidad de contaminación del personal de laboratorio es mayor que con los otros animales, puesto que los primates expectoran y expulsan bacilos. Se requiere de grandes inóculos para poder inocular y los dispositivos para la infección experimental de estos animales son costosos y complejos. Las principales especies de primates usadas para estos estudios son: *Macaca mulata* (Rhesus) y *Macaca fascicularis* (Cinomologus) siendo esta última por su susceptibilidad más semejante a la del humano, la más usada (*M. mulata* es muy susceptible) [195–197,246]. En la

Figura 1-2 se muestra un esquema de la correlación entre las diferentes fases de la enfermedad en distintos modelos animales en comparación con el humano.

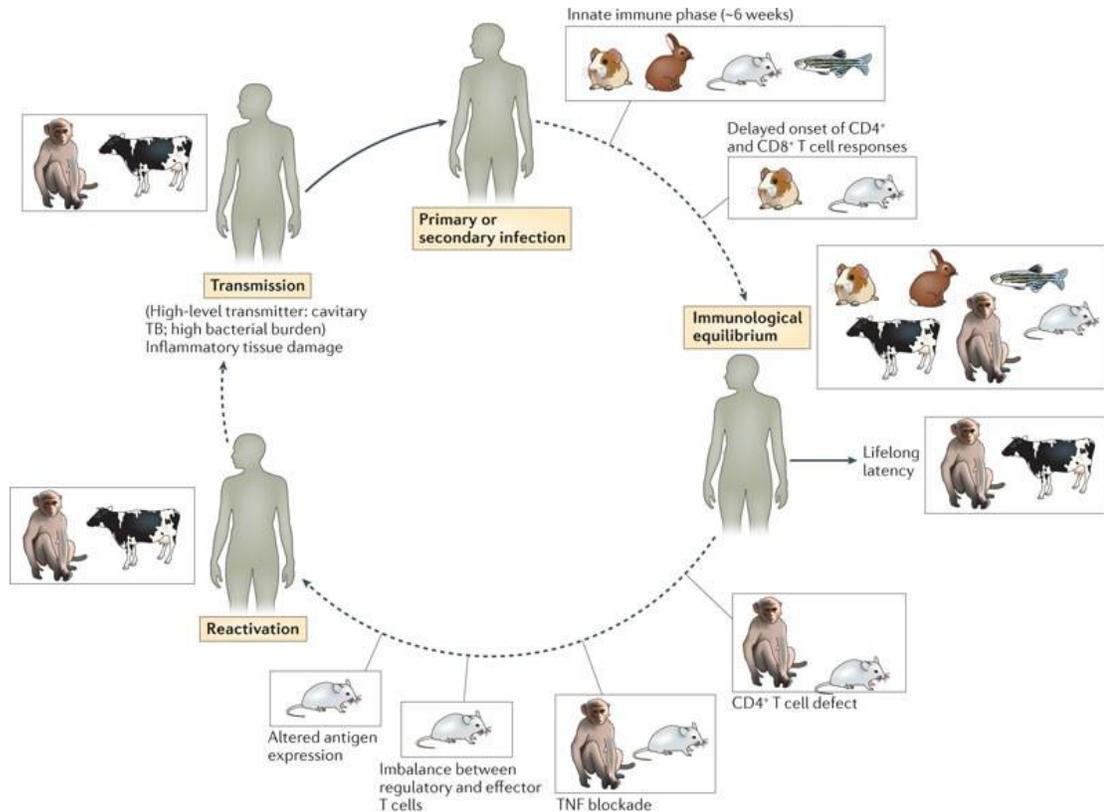


Figura 1- 2. Ciclo inmunológico de la TB y su correlación entre los diferentes modelos animales y el humano Tomado de Ernst JD., 2012 [247].

1.1.5. Modelo Murino de tuberculosis Pulmonar progresiva Crónica Ratón Balb/c

El modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva crónica (ratón Balb/c), fue diseñado con el fin de tratar de simular en un organismo vivo la historia natural de la TB como ocurre en el humano. Esta cepa de ratón es naturalmente resistente a la infección por Mtb, esta característica permite que el animal muestre unas fases de la enfermedad, las cuales están determinadas por el perfil de secreción de citoquinas determinadas no solo por las características del animal si no por la virulencia de las cepas con las que se realiza la infección.

Como punto de partida, se requiere que los animales a infectar sean machos jóvenes, los cuales no poseen los ciclos hormonales presentados por las hembras relacionados con la reproducción y las bacterias son inoculadas intratraquealmente con altas dosis de Mtb para lograr establecer la infección

controlando el número de bacterias que ingresan a los pulmones, así esta no sea la vía natural de infección [248].

En este modelo se establecieron dos fases claras en la progresión de TB (usando la cepa de referencia H37Rv):

Fase Aguda (Días 1 a 28 pos-infección): Caracterizada por la producción de citoquinas pro-inflamatorias tipo Th1 como IL-2, IL-12 e IFN- γ ; estas citoquinas inducen la activación de los macrófagos, desencadenando un alto flujo celular al sitio de infección, cuyo fin es contener y/o eliminar los bacilos por la inducción de la formación de granulomas y la presentación de antígenos Micobacterianos por la inducción del MHC gracias al alto grado de diferenciación de los LT a LT-CD4. Por otra parte, en los días más tempranos de la infección se induce la producción de un alto número de LT $\gamma\delta$, los cuales disminuyen rápidamente y vuelven a presentar un segundo pico de producción hacia el día 120 pos-infección [249].

Fase Crónica o avanzada (Día 20 a >120 pos-infección):

Esta fase se caracteriza por la presentación de signos, síntomas y hallazgos concordantes con TB Activa, caracterizada por la disociación de las estructuras tipo granuloma que contenían la multiplicación de los bacilos y la aparición de zonas de neumonía, en algunos casos y dependiendo de la cepa, necrosis tisular y fibrosis pulmonar. Este cambio en el fenotipo de la enfermedad esta desencadenado por un cambio en el perfil de expresión de citoquinas, pudiendose observar un balance tipo Th0 (producción de cantidades iguales de IL-2 e IL-4 con alta producción de IFN- γ) o una polarización hacia una respuesta inmune tipo Th2 caracterizada por la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-6, IL-10 y TGF- β . La producción de las citoquinas antes mencionadas inducen un aumento en la producción de LTCD8, desencadenando una respuesta no efectiva contra la TB, ocasionando daño tisular y por lo tanto antagonizando la respuesta inmune celular de memoria [250,251].

Parámetros para la determinación de la virulencia in-vivo de cepas de Mtb

Experimentalmente, se han definido y elegido los siguientes criterios para la evaluación de la virulencia de los aislamientos clínicos de Mtb:

- **Sobrevivencia:** Se define por el tiempo en que tarda un animal en morir a causa de la enfermedad, aunque actualmente se practica eutanasia antes que el animal muera, atendiendo a signos clínicos sustitutos de desenlace por mortalidad.
- **Patología pulmonar:** Medición de área de neumonía, porcentaje de necrosis tisular, infiltrados celulares, área de granulomas y demás hallazgos patológicos de la enfermedad.
- **Carga bacteriana:** Para medir que tanto se multiplica la bacteria en el huésped vivo, en general, a mayor carga bacteriana, mayor virulencia, aunque pueden presentarse excepciones en cepas muy inmunogénicas y por ende multiplicación más rápida del bacilo, sin que desencadene signos clínicos tempranos ni produzca mortalidad en el animal, esta medición se realiza haciendo el

recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de la bacteria en medios de cultivo sólidos [238,245].

- **Medición de citoquinas:** Medición de citoquinas de tipo Th1, Th2 y T reg, la expresión de estas citoquinas es variable entre aislamientos, por lo que es necesario hacer la medición de todas para definir el tipo de respuesta de cada aislamiento clínico. En todos los modelos *in vivo* se usan estos criterios para los estudios de virulencia; el método de cuantificación de la expresión o cuantificación de las proteínas dependerá del diseño del trabajo y la disponibilidad de metodologías y recursos [186,249].

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Caracterización de aislamientos clínicos de genotipo Beijing aisladas en Colombia

Antes de empezar con las actividades relacionadas específicamente con el cumplimiento de los objetivos planteados en el presente trabajo, se realizaron diferentes actividades y experimentos encaminados a la caracterización completa de las cepas incluidas en este estudio. Para la confirmación de genotipo bacteriano se realizó: Spoligotyping y MIRUs-VNTR, para la determinación de la susceptibilidad de las bacterias a antibióticos de primera línea se realizó SIRE BACTEC™-MGIT™ 960 y, para la detección genotípica de la susceptibilidad a antimicrobianos se realizó Genotype® MTBDR*Plus* 2.0.

Por otra parte, y con el fin de tener una visión inicial de la virulencia (Capacidad replicativa y secreción de citoquinas generadas por la infección) de las cepas Beijing en un modelo *in-vitro*, se realizó un experimento de infección en macrófagos alveolares de ratón MH-S “KILLING”.

Como producto de la pasantía internacional en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en la Ciudad de México, se realizó la caracterización morfológica de las cepas Beijing y Beijing-Like por microscopía electrónica (MET). A continuación, se describen las actividades que se llevaron a cabo para la fase inicial del presente trabajo.

1.2.1.1. Consideraciones Éticas

El protocolo de investigación para el desarrollo del presente trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia bajo el acta de aprobación N° 011-104-15.

Adicionalmente fue presentado bajo la ley mexicana NOM 061-Z00-1999 al Comité Interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y aprobado bajo el protocolo N° PAT-1846-16 / 20.

1.2.1.2. Cepas de Mtb objeto de estudio

Las cepas de Mtb utilizadas en el presente estudio pertenecen a la familia Beijing Linaje 2 o del este asiático, de acuerdo con la clasificación de linajes basados en SNPs. Se utilizó el primer aislamiento clínico colombiano reportado en Bogotá y tipificado como Beijing-Like SIT 190 cepa 323, aislado de una paciente de sexo femenino proveniente del puerto de Buenaventura reportado por Murcia y cols., [175] y un aislamiento Colombiano Beijing Clásico SIT 1 cepa 391 también aislada del puerto de Buenaventura proveniente de un paciente de género masculino de 52 años de origen afrocolombiano quien padecía de TB pulmonar, este aislamiento clínico fue gentilmente donado por el grupo de Micobacterias de la Red Nacional de Laboratorios, del Instituto Nacional de Salud [185]. Por último se utilizó un aislamiento clínico colombiano con el genotipo más prevalente en el país genotipo LAM9 código B077bc SIT 150 como control, [252] sensible a todos los medicamentos antituberculosis, obtenida de un paciente de 22 años habitante de calle VIH+. Debido a la optimización de recursos y al amplio reporte de la virulencia *in-vivo* generada por la cepa de laboratorio H37Rv en la literatura, no se incluyó esta cepa en la cinética de infección para este trabajo. Por otra parte, dado que el principal interés del presente trabajo es determinar la virulencia y el perfil de expresión de genes de las cepas colombianas de genotipo Beijing y por los altos costos del uso de herramientas de secuenciación de nueva generación (NGS), solo se realizó transcriptómica y microscopía electrónica de las dos cepas Beijing 323 y 391.

1.2.1.3. Caracterización genotípica y fenotípica de cepas de Mtb

▪ SPOLIGOTYPING

La tipificación de oligonucleótidos espaciadores entre repeticiones directas (DR) está basada en amplificación del locus DR e hibridación reversa con sondas complementarias a regiones espaciadoras para determinar su presencia o ausencia en cepas de Mtb, es una metodología útil para la identificación de linajes y familias a las que pertenecen aislamientos clínicos y cepas de Mtb descrita por Kamerbeek y cols., en 1997 [79]. La región DR está compuesta por múltiples copias conservadas de 36 pares de bases (repeticiones directas) separadas por espaciadores únicos, para esta metodología solo se tipifican 43 espaciadores.

- **Extracción de DNA.**

Para la obtención de DNA de las cepas de estudio se utilizó el kit de extracción rápida de DNA genómico GenoLyse®. Brevemente, a 200 µl de buffer de Lisis (A-Lys) se le agregan entre 1 y 5 colonias de un cultivo puro y se coloca en termobloque agitador a 95°C por mínimo 10 minutos, posteriormente se adicionan 200 µl de buffer de purificación (A-NB) y se centrifuga a 10.000 rpm por 10 minutos. Se tomaron 200 µl del sobrenadante en donde se encuentran los ácidos nucleicos libres de detritos celulares, en el **Anexo A-2** se detalla el protocolo para hibridación y detección y en la **Tabla 1-3.**, se relacionan las condiciones de PCR para amplificación del Locus DR.

- **Amplificación por PCR del locus DR.**

Tabla 1- 3. Condiciones de montaje de PCR para amplificación de los DR en cepas de Mtb

Primers		
DRa : 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3'+ biotina		
DRb : 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3'		
PROTOCOLO DE PCR		
Reactivo	Concentración final	Volumen 1X
Agua		14,2 µl
Buffer 10X	1X	2,5 µl
MgCl ₂	1,5 mM	0,75 µl
dNTPs	2,5 mM	2 µl
Primer DRa	20 pmolar	2µl
Primer DRb	20 pmolar	2µl
Taq polimerasa	0,04 unidades	0,05 µl
DNA Blanco		1,5 µl
Volumen final		25 µl
PROTOCOLO TÉRMICO		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
96°C	3 min	1X
96°C	1 min	20 X
55°C	1 min	
72°C	30 seg	
72°C	5 min	1X

▪ **MIRUs-VNTR**

La tipificación de cepas por el método Mycobacterial Intersperced Repetitive Units-Variable Number in Tandem Repeats descrito originalmente por Supply y cols., [253], que consiste en amplificar por PCR 24 de los 41 loci MIRU presentes en el cromosoma de Mtb y de acuerdo al peso molecular, al comparar el tamaño del amplicón comparando con un patrón de peso molecular en geles de agarosa después del corrido electroforético de dichos productos, determinar el número de repeticiones en tándem de cada loci MIRU. En el presente estudio se utilizó el método automatizado de alta resolución que se basa en PCR multiplex y electroforesis capilar, para la detección y cálculo de productos de amplificación en un software automatizado.

- **Extracción de DNA**

Los ácidos nucleicos no purificados se obtuvieron a partir de un hervido de colonias en un buffer de lisis compuesto por Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM. Las colonias resuspendidas en 200 ul de esta solución se colocaron en un vaso de precipitado con agua destilada a temperatura de ebullición sobre plancha de calentamiento por 10 minutos, posteriormente los tubos se llevaron a centrifugar a 14.000 rpm por 2 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio previamente marcado y se almacenó a -70°C hasta su uso.

- PCR Multiplex de los 24 Loci MIRU

A continuación, se muestran las condiciones para el montaje de PCR con 8 mezclas múltiples: **Tabla 1-4.**

Tabla 1- 4. Condiciones para montaje de PCRs multiplex para MIRU-VNTR.

Número de mezcla	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4	Mezcla 5	Mezcla 6	Mezcla 7	Mezcla 8
Loci	4-26-40	10-16-31	0424- 0577- 2165	2401-3690- 4156	2163b- 1955- 4052	2-23-39	20-24-27	2347-2461- 3171
MgCl ₂ [C final]	3 mM	2mM	1.5 mM	3 mM	1.5 mM	2.5 mM	1.5 mM	2mM
H ₂ O µl	7.5	8.3	8.7	7.5	8.7	7.9	8.7	8.3
Buffer 10X (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2
Sln Q 5X (µl)	4	4	4	4	4	4	4	4
MgCl ₂ 25 mM (µl)	1.2	0.4	0	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
DNTPs 5 mM (µl)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9
Primer F (µl)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Primer R (µl)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Hot Start Taq (µl)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
DNA (µl)	2							
Volumen final (µl)	18							
Protocolo térmico								
Temperatura	Tiempo			N° Ciclos				
95°C	15 min			1 X				
94°C	1 min			30X para Mezclas 1, 2, 4, 6, 7 y 8				
59°C	1 min							
72°C	1.5 min							
72°C	10 min			1 X				
4°C	Forever			1 X				

- Electroforesis Capilar

Para determinar el tamaño de los fragmentos de amplificación de los diferentes Loci MIRU se utilizó un secuenciador ABI 3100, 3100 Avant.

Se preparó el patrón de peso molecular 0.2 µl de MapMarker 1000 marcado con ROX™ en 10 µl de formamida.

Se agregó 1µl de producto de PCR por cada pozo de una placa de lectura en el equipo antes mencionado, se centrifugó la placa para eliminar las burbujas presentes y se llevó al módulo de lectura.

Los resultados fueron exportados en un archivo de Excel y posteriormente se hizo el análisis de las cepas para confirmación de linaje, familia y relación filogenética usando el portal <https://miru-vntrplus.org/MIRU/miruinfo.faces>.

▪ Genotype® MTBDRPlus 2.0

El GenoType® MTBDRplus 2.0 es un método molecular basado en PCR e hibridación reversa en membranas de nitrocelulosa con sonda lineal de productos de amplificación biotinilados, utilizado para la detección de resistencia a los antibióticos de primera línea Isoniazida y Rifampicina de aislamientos clínicos de Mtb. La identificación de cepas resistentes por este método se basa en la

identificación de las mutaciones más frecuentes ubicadas en los genes determinantes de resistencia a estos dos antibióticos. La resistencia a H se detecta en los genes *KatG* (codificante para Catalasa-Peroxidasa) posición 315 y en el promotor del gen *inhA* (codificante para enoil ACP reductasa) y la resistencia a Rifampicina se detecta por mutaciones presentes en la región central de 81 pb del gen *rpoβ* (Codificante para la subunidad β de la ARN polimerasa bacteriana). El kit viene provisto con los reactivos para la amplificación y la hibridación. La extracción de DNA a partir de los cultivos de MTB se realizó con el kit Genolyse® siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada muestra se hace una mezcla maestra compuesta por: 10uL de AM-A, 35 uL de AM-B y 5 uL de DNA en solución y se llevó al equipo de PCR convencional utilizando el protocolo térmico relacionado en la **Tabla 1-5**.

Tabla 1- 5. Protocolo térmico GenoType® MTBDRplus 2.0

Temperatura °C	Tiempo	Número de Ciclos
95	15 min	1X
95	30 seg	10X
65	2 min	
95	25 seg	20 X
50	40 seg	
70	40 seg	
70	8 min	1X

Los productos de amplificación se sometieron al proceso de hibridación siguiendo las instrucciones del fabricante (**VER ANEXO A-3**).

▪ **SIRE BACTEC™-MGIT™ 960**

Para la determinación fenotípica de resistencia se utilizó el método automatizado MGIT sigla en inglés de Tubo Indicador de Crecimiento Bacteriano (Beckton Dickinson, Maryland USA). Es un método cualitativo en el que se evalúan los antibióticos Estreptomycin (STR), Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF) y Etambutol (EMB). En la **Tabla 1-6.**, se muestran las concentraciones críticas y las concentraciones de trabajo de cada antibiótico evaluado. Brevemente; este método consiste en el crecimiento de aislados clínicos de Mtb en un tubo de medio de cultivo Middlebrook 7H9 que contiene al final del tubo un compuesto fluorescente en parafina, indicador del consumo de oxígeno en presencia de metabolismo bacteriano y que además contiene o no una concentración conocida de antibiótico. Para el montaje de la prueba se realizó una suspensión de colonias bacterianas puras a partir de un cultivo en medio LJ (Lowenstein Jensesn) en agua destilada estéril en un frasco con perlas de vidrio, se mezcló mediante vórtex por dos minutos para disgregar los grumos bacterianos, posteriormente en esterilidad se ajusta al tubo 1 de la escala de McFarland (3×10^8 células), se dejó reposar la suspensión y se llevó el sobrenadante a un nuevo tubo estéril, se ajustó la concentración

al tubo 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 células), posteriormente se realizó una dilución 1:5 de la suspensión en agua destilada estéril, a partir de esta dilución 1:5 se realizó una dilución 1:100. Los tubos MGIT™ con antibiótico previamente suplementados con 800 uL de OADC (Albúmina, Ácido Oléico, Dextrosa, Catalasa), se inocularon con 500uL de la suspensión 1:5 y el tubo control sin antibiótico se inoculó con 500uL de la dilución 1:100. Los tubos MGIT™ inoculados se incubaron en el equipo BD BACTEC MGIT 960 SIRE (Tubo 1: Control de Crecimiento, Tubo 2: Estreptomizina, Tubo 3: Isoniazida, Tubo 4: Rifampicina, Tubo 5: Etambutol) los resultados se obtuvieron después de entre 4 y 13 días de incubación en donde se observan las gráficas de crecimiento de las bacterias de cada tubo, cuando una cepa es resistente la curva de crecimiento del tubo con el antibiótico correspondiente muestra crecimiento antes que el tubo control de crecimiento.

Tabla 1- 6. Concentraciones de antibióticos para el método de detección fenotípica de resistencia a antibióticos BACTEC™ MGIT™ SIRE.

CONCENTRACIONES DE LOS ANTIBIÓTICOS PARA BACTECTM MGIT™ SIRE			
Antibiótico	Concentración Inicial del Antibiótico	Volumen de antibiótico adicionado a cada tubo MGIT™	Concentración final de antibiótico en cada tubo de MGIT™
<i>Estreptomizina</i>	83 µg/mL	100 µL	1.0 µg/mL
<i>Isoniazida</i>	1.0 µg/mL	100 µL	0.1 µg/mL
<i>Rifampicina</i>	83 µg/mL	100 µL	1.0 µg/mL
<i>Etambutol</i>	415 µg/mL	100 µL	5.0 µg/mL

▪ **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA PARA EL ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE CEPAS BEIJING AISLADAS EN COLOMBIA.**

La microscopía Electrónica de Transmisión (MET) es una técnica de alta definición encaminada al estudio detallado de la morfología de diferentes clases de células y tejidos. En esta técnica, una sonda enfocada en electrones es escaneada sobre la superficie de un espécimen (muestra), formándose una imagen de alta resolución a partir de los electrones transmitidos. El escaneo con un microscopio electrónico permite obtener imágenes con calidad tridimensional y de gran profundidad. El estudio ultraestructural de Mtb ha permitido identificar diferentes organelos a los cuales se les ha adjudicado una variedad de funciones.

- **Obtención de bacterias**

Las cepas criopreservadas en glicerol a -70°C fueron descongeladas subiendo la temperatura progresivamente, 1 hora a -20°C y 1 hora a 4 °C, una vez se descongelaron se tomaron 100 uL de las bacterias suspendidas en glicerol y se inocularon en 10 ml de medio líquido 7H9 (Ver Anexo A-4 de preparación de medios de cultivo) suplementado con OADC y se llevaron a incubación a 37°C

por 72 horas, al obtener evidencia visual de crecimiento bacteriano, se escaló el cultivo a 60 ml de medio 7H9 y se midió el porcentaje de transmitancia cada 24 horas para determinar el inicio y el final de la fase logarítmica de cada bacteria (**Anexo A-5, Anexo A-6**). La cinética de crecimiento bacteriano fue graficada con los puntos de la medición diaria. Una vez establecida la fase logarítmica, se repitió el experimento y se tomaron las bacterias en la mitad de la fase logarítmica de crecimiento al día 14. Una vez se obtuvieron las bacterias en fase logarítmica de crecimiento se llevaron a la preparación de muestras para microscopía electrónica (Ver **Anexo A-7**). Una vez procesadas las muestras se observaron en el microscopio electrónico FEI Tecnai G2 Spirit Transmission Electron Microscope Hillsboro, OR, USA.

▪ **Caracterización in-vitro de la virulencia de las cepas de estudio de Mtb (KILLING).**

Un día antes de la infección, las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 1×10^5 células por pozo y se incubaron durante toda la noche a 37°C con 5% de CO_2 . Las células MH-S adheridas fueron infectadas con 5×10^6 bacterias por pozo (MOI 1:5) e incubadas 3 horas a 37°C . Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces con RPMIc (Medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute completo) con 1% de estreptomina para eliminar las micobacterias libres y posteriormente se agregaron 200 μl de medio RPMIc suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y se incubó a 37°C por 1 hora (Día 0), 24 horas (Día 1), 48 horas (Día 2), 72 horas (Día 3) o 96 horas (Día 4). Después de cada periodo de incubación, los sobrenadantes de los pozos se recuperaron en pools y posteriormente, los macrófagos infectados se lisaron con 100 μl de 7H9 con SDS al 0.1% mezclando vigorosamente y raspando en cruz el fondo de la placa durante 10 min a temperatura ambiente. Las diluciones seriadas del producto de lisis en medio 7H9, fueron plaqueadas en placas de agar 7H10 y se realizó recuento de UFC a los 14 y 21 días de incubación.

Para la medición de las citoquinas (IL-1 β , IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-12p70), se recuperaron los sobrenadantes de los macrófagos infectados a los siguientes tiempos: 1 hora (Día 0), 24 horas (Día 1), 48 horas (Día 2), 72 horas (Día 3) o 96 horas (Día 4), los sobrenadantes recuperados fueron filtrados y congelados a -80°C hasta su procesamiento. La medición de citoquinas se hizo usando la técnica de ELISA tipo sándwich usando los estuches comerciales disponibles Mouse TNF- α (Mono/Mono) ELISA Set Cat. No. 555268 (BD OptEIA™); Mouse IFN- γ ELISA Set Cat. No. 555138 (BD OptEIA™); Mouse IL-12 (p70) ELISA Set (BD OptEIA™); Mouse IL-10 ELISA Set Cat. No. 555252 (BD OptEIA™); Mouse IL-1 β ELISA Set Cat. No. 559603 (BD OptEIA™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Ver protocolo completo en **Anexo A-9**.

1.2.2. **Materiales & métodos para cumplir con el objetivo específico N° 1** “Evaluar en el modelo animal de tuberculosis progresiva “ratón BALB/c” las bases histopatológicas e inmunológicas de la virulencia *in vivo* de *Mycobacterium tuberculosis* genotipos Beijing circulante en Colombia”

1.2.2.1. Modelo *in-vivo* de TB pulmonar progresiva crónica ratón Balb/c

El uso de modelos animales para el estudio de la fisiopatología pulmonar de la tuberculosis, es una invaluable herramienta que ha permitido dilucidar los mecanismos utilizados por las diferentes cepas de *M. tuberculosis* para causar la enfermedad. Las características que se tienen en cuenta para los estudios de virulencia en un modelo animal son: *i*) El recuento de UFC, *ii*) Patología (Histología) Pulmonar, *iii*) Sobrevida, *iv*) Determinación de la expresión de genes que codifican para proteínas asociadas a la respuesta inmune desencadenada en el ratón ante la infección con Mtb (qRT-PCR, Transcriptómica). El modelo de tuberculosis pulmonar progresiva crónica ratón Balb/c es un modelo que permite evidenciar el progreso de la TB pulmonar a partir de la velocidad de replicación de las bacterias, la sobrevivencia de los animales, el estudio de los cambios tisulares de los órganos afectados y la determinación del tipo de respuesta celular generado por los animales que desencadenan o no una enfermedad complicada. A continuación, se describen los procedimientos y experimentos llevados a cabo para la infección y seguimiento de animales con las cepas de estudio, para la determinación de la virulencia y respuesta inmune *in-vivo* en este modelo animal.

Para el presente trabajo se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c de 6 a 8 semanas de edad y 22 gramos de peso. Esta cepa de ratón es producida y mantenida en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. En la **Figura 1-3.**, se muestra el resumen experimental y relación de las actividades para la determinación de virulencia *in-vivo* en ratones infectados con las cepas de estudio y en las **Tablas 1-7 a 1-11** se muestra la relación del número de animales a utilizar en cada experimento.

Cálculo de la muestra.

El cálculo de la N por experimento para el presente trabajo se realizó mediante una fórmula establecida basada en las incidencias seriadas de los procedimientos, es decir, cuantos animales se requieren para llevar a cabo los procedimientos experimentales que brinden la suficiente información sobre la virulencia de cepas de Mtb en el animal y así poder determinar el número de ratones necesarios por tiempo de sacrificio.

$$X=N/((A/100) \times (B/100) \times (C/100))$$

Donde:

X= Número final de animales necesarios o número de animales del cual debemos partir.

N= Número mínimo estadístico que permite concluir los objetivos propuestos en el proyecto

A= 100 - b% de incidencia 2 (p.ej.: muertes por enfermedad, sx humanitario)

D= 100 - d% de incidencia 4 (p.ej.: muertes por anestesia en la infección)

Tabla 1- 7. Número de animales a infectar en experimento de inmunopatología

INMUNOPATOLOGÍA			
Grupo/Cepa	Cinética de sacrificio días post infección	Ratones/grupo	Total
-Beijing-Like 323	1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120	7 por cepa por tiempo de sacrificio	168
-Beijing Clásico 391			
-LAM B077bc			

Tabla 1- 8. Número de ratones a infectar en experimento de co-habitación

EXPERIMENTO DE CO-HABITACIÓN (CONVIVENCIA)				
	Grupo/Cepa	Cinética de sacrificio días pos-infección	Ratones/grupo	Total
Modelo de convivencia para la evaluación de transmisibilidad.	-Beijing Like 323	30 y 60 días	14 por grupo por cepa	84
	-Beijing Clásico 391			
	-Cepa LAM B077bc			

Tabla 1- 9. Número de ratones a infectar en experimento de RNA-seq

SECUENCIACIÓN DE TRANSCRIPTOMA COMPLETO				
Grupos	Grupo/Cepa	Cinética de sacrificio días postinfección	Ratones/grupo	Total
Secuenciación de transcriptoma de cada uno de los aislamientos clínicos	- Beijing Like 323 - Beijing Clásico 391 -Cepa LAM B077bc	Día 3, 21 y 60	7 ratones por tiempo de sacrificio por cepa	63

Tabla 1- 10. Consolidado de número de ratones a infectar en los experimentos por duplicado

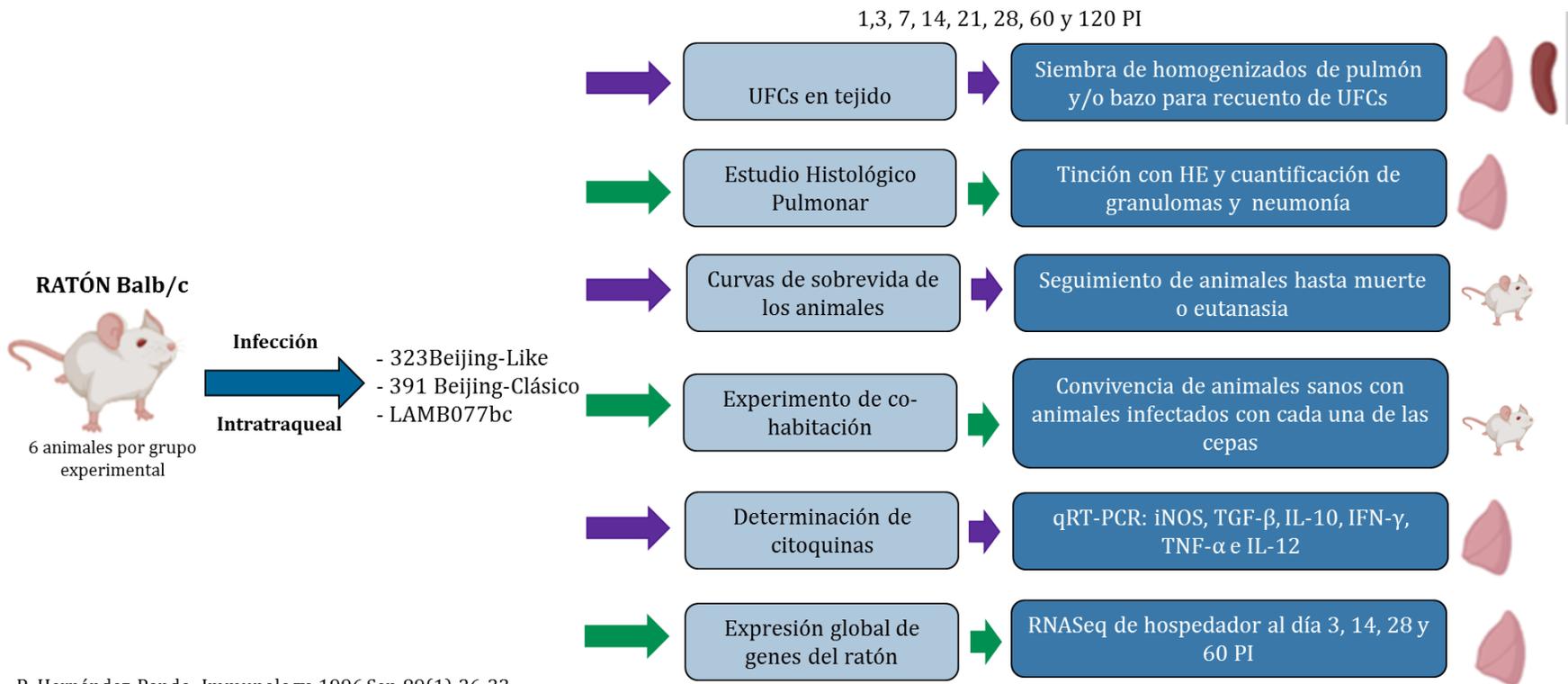
Nº De Experimentos	Número de ratones
Experimento	315
Repetición	315
Total 2 experimentos	630

Tabla 1- 11. Número mínimo de animales requeridos (6 animales) para asegurar la cantidad necesaria de muestras que nos permitan hacer los experimentos

Distribución de muestras por tiempo de sacrificio cinética Inmunopatología			
Ratón	PD	P Izq	BAZO
1	UFC	HIST	SI
2	UFC	HIST	
3	UFC	BM	
4	UFC	BM	NO
5	UFC	HIST	
6	UFC	UFC	
7	BM	BM	
Distribución de muestras por tiempo de sacrificio Convivencia			
Ratón	PD	P Izq	BAZO
1	UFC	HIST	SI
2	UFC	HIST	
3	UFC	HIST	
4	UFC	HIST	NO
5	UFC	HIST	
6	UFC	HIST	
7	UFC	HIST	
Distribución de muestras por tiempo de sacrificio Transcriptómica			
Ratón	PD	P Izq	BAZO
1	BM	BM	NO
2	BM	BM	
3	BM	BM	
4	BM	BM	
5	BM	BM	
6	BM	BM	
7	BM	BM	

PD: Pulmón derecho, PI: Pulmón izquierdo, UFC: Unidades Formadoras de Colonias, HIST: Histología, BM: Biología Molecular, BAZ: Bazo.

Resumen experimental objetivo N° 1. Evaluar en el modelo animal de tuberculosis progresiva “ratón BALB/c” las bases histopatológicas e inmunológicas de la virulencia in vivo de *Mycobacterium tuberculosis* genotipos Beijing circulante en Colombia



R. Hernández-Pando. Immunology. 1996 Sep;89(1):26-33.

Figura 1- 3. Resumen experimental para cumplir el objetivo específico N°1 del presente trabajo

1.2.2.2. Procedimientos para la obtención de bacterias y estandarización del inóculo bacteriano

Las cepas de Mtb se encontraban criopreservadas en glicerol a -70°C . Para la recuperación de las cepas en cultivo, se sacaron del ultracongelador y se colocaron a -20°C por 1 hora y luego se dejaron a -4°C hasta su descongelación.

Una vez descongeladas, se tomaron 100 μl de la suspensión descongelada de bacterias y se inocularon en 10 ml de medio de cultivo 7H9 suplementado con Tyloxapol Premium (Ver **Anexo A-4** de preparación de medios de cultivo) y se llevó a incubar con agitación a 37°C con 5% de CO_2 por 48 horas. Una vez pasadas las 48 horas de incubación, el cultivo se escaló a 65 ml de medio de cultivo 7H9 suplementado con Tyloxapol Premium, y se llevó a incubación a 37°C al 5% de CO_2 en agitación. Las cepas se recuperaron en la mitad de la fase logarítmica de crecimiento (Ver **Anexo A-5**) y se hicieron alícuotas del cultivo que se congeló a -70°C por 72 horas, posteriormente se descongelaron 3 alícuotas para verificar la concentración de las mismas haciendo diluciones seriadas de la suspensión bacteriana, posteriormente las diluciones se sembraron en placas de agar 7H10, se incubaron a 37°C por 14 a 21 días y se realizó recuento de UFCs, de acuerdo a la dilución sembrada, las UFCs se multiplicaron por un factor de dilución y se calculó la cantidad de bacterias (Ver **Anexo A-6**).

1.2.2.3. Inoculación intratraqueal de ratones Balb/c

El día de la infección, se calcula el número de dosis necesarias para (Número de animales) las infecciones de acuerdo con la concentración de los stocks bacterianos de manera tal que se obtengan 250.000 bacterias en cada 100 μl de solución salina suplementada con Tyloxapol Premium de cada cepa bacteriana.

Una vez se tiene ajustada la concentración de las bacterias, estas se envían refrigeradas al bioterio en donde se realiza la infección para que las suspensiones bacterianas no pierdan la cadena de frío. En el bioterio los animales se anestesiaron con vapor de sevoflurano (100 uL por ratón) dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm, para su inoculación intratraqueal (v.it.) los animales se colocaron sobre una placa de icopor revestida con papel aluminio y se les sujetaron los incisivos con una banda de caucho, se introdujo una cánula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea y se infectaron con 250.000 UFC de las cepas de Mtb 391 Beijing Clásico, 323 Beijing-Like y LAM B077bc. Los animales utilizados para los estudios relacionados con Micobacterias se alojaron en cajas ventiladas bajo presión negativa y aire suministrado a través de filtros HEPA y manipulados bajo Bioseguridad Animal Nivel 3.

1.2.2.4. Seguimiento y curva de sobrevida de ratones Balb/c

La sobrevida de los animales se llevó sobre la totalidad de los animales infectados para los tres experimentos (Cinética, Transcriptómica, Convivencia), el sacrificio programado de acuerdo a la cinética de sacrificio en los días patognomónicos establecidos se llevó a cabo, pero estos decesos no se contaban en la sobrevida. A partir de la infección se hizo seguimiento diario del estado de salud

de los animales, si se observaba deterior en el estado de salud de los animales (Disminución de >20% del peso corporal, piloerección, distanciamiento social, disminución en la movilidad, fiebre) se hacía sacrificio humanitario y se registraba el deceso para ese día. Usando el programa estadístico GraphPad Prism 8 se construyó un archivo de sobrevida; si no se encontraba ningún deceso, se ingresaba un cero y si se encontraban animales muertos o se hacía eutanasia humanitaria se colocaba el número de animales fallecidos en la columna de cada cepa.

1.2.2.5. Cinética de sacrificio

Grupos de 6 animales para el experimento de Inmunopatología se sacrificaron a los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, y 60 pos-infección y se sacrificaron grupos de 6 animales para el experimento de Secuenciación de Transcriptoma completo a los días 3, 14 y 28 pos-infección.

Para la eutanasia de los animales estos se inyectaron con Pentobarbital 210 mg/kg intraperitoneal. Se sacrificaron por exanguinación, posteriormente se expuso la cavidad peritoneal y torácica haciendo disección del animal haciendo colgajos de la piel de dicha zona teniendo la precaución de no cortar el peritoneo, luego se corta el peritoneo y se abre la caja torácica de manera tal que queden expuestos los pulmones, la tráquea y los órganos abdominales. Se pinzó con una Pinza de Kelly el bronquio derecho y se cortó el pulmón derecho el cual se colocó en criotubo de 2 ml previamente identificado con la fecha, cepa y ratón e inmediatamente almacenó temporalmente en un contenedor con nitrógeno líquido; posteriormente se perfundió con una jeringa de 5 ml con aguja el pulmón izquierdo con etanol absoluto a través de la tráquea del animal teniendo cuidado de no cortarla ni perforarla con la aguja, una vez perfundido, se cortó el pulmón y se colocó inmediatamente en un tubo Falcon con etanol absoluto (se realizó este procedimiento en 3 animales de cada grupo, para el procesamiento histológico) se fijaron en etanol absoluto por lo menos 72 horas, los pulmones derechos no perfundidos de los otros 3 animales se colocaron en criotubos previamente identificados y se almacenaron en nitrógeno líquido para su transporte. Para diferenciar los pulmones para histología pulmonar de cada ratón 1, 2 y 3 de cada punto de sacrificio se cortó: (i) R1 solo el pulmón, (ii) R2 Pulmón y corazón, (iii) R3 pulmón, corazón y tráquea ya que todos los órganos van al mismo Falcon con etanol. Después de recolectar los pulmones se procedió a recolectar el bazo el cual fue colocado en criotubos individuales de 2 ml y almacenados inmediatamente en nitrógeno líquido.

Para el almacenamiento permanente de los órganos, los tubos se organizaron en crio cajas las cuales se guardaron a -70°C hasta el procesamiento de los mismos, UFCs y experimentos de biología molecular.

1.2.2.6. Determinación de unidades formadoras de colonia (UFC) en pulmones y bazos de ratones Balb/c.

Los órganos almacenados a -70°C (Pulmones y bazos), se sacaron del ultracongelador y se colocaron en tina de hielo antes de comenzar su procesamiento. A cada tubo con cada órgano se le agregó una perla de Sílice y Zirconio con filo y se les agregó PBS 1x-Tween 0.05% y se homogenizaron tres

veces consecutivas en el equipo FasTPrep™ por 20 segundos cada vez con intervalos de 3 minutos, posteriormente se llevaron a sonicar por 45 segundos a 20kHz para disgregar los cúmulos bacterianos, una vez se homogenizaron los tejidos, se realizaron diluciones en base 10 del homogenizado usando PBS 1x-Tween 0,05% (desde 10^{-1} hasta 10^{-5}) en una microplaca de Elisa, cada dilución fue sembrada posteriormente en placas de agar 7H10 y se incubaron a 37°C durante 14 y 21 días para el recuento de UFCs, para el cálculo de las colonias, se multiplicó el número de UFCs contadas por el factor de conversión de cada dilución. Ver protocolo completo en **Anexo A-10**.

1.2.2.7. Procesamiento histológico de tejidos

Para el estudio histológico, tres pulmones izquierdos fueron previamente perfundidos vía IT con etanol absoluto y almacenado por 72 horas. Se realizaron cortes parasagittales a nivel del hilio pulmonar y los tejidos fueron colocados en cassettes de plástico en un procesador de tejidos Spin Tissue Processor Microm STP 120 (ThermoFisher Scientific). Los cassettes son embebidos en parafina en la estación de inclusión HistoStar Embedding Workstation (ThermoFisher Scientific), posteriormente los bloques son cortados en micrótopo (Leica RM2135) en secciones de 4µm y colocados en portaobjetos. Los tejidos son desparafinados y teñidos en un tren de hematoxilina-eosina. El proceso se concluye colocando una gota de resina y un cubreobjetos en el tejido.

El área de neumonía y granulomas fue determinada en micras cuadradas mediante un analizador de imágenes (Q Win Leica, Milton Keynes). Adicionalmente se obtuvieron cortes de hígados con la misma metodología para realizar la medición de la inflamación inducida por la administración de los adenovirus recombinantes. Las mediciones fueron tomadas a ciego y los datos fueron reportados como la media y la desviación estándar de 3 ratones diferentes de cada tiempo en 2 experimentos diferentes.

1.2.2.8. Expresión de citoquinas en homogenizados de pulmón por medio de qRT-PCR.

Se midió la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias, en pulmones pulverizados con nitrógeno líquido, de ratones infectados con 323 Beijing-Like, 391 Beijing-Clásico y con la cepa LAMB077bc a los días 3, 14, 28 para todas las cepas y al día 60 PI para 391 Beijing-Clásico. La medición de expresión de citoquinas en estos tiempos, se realizó con base en el análisis histológico de los pulmones basándose en los cambios en el progreso de la patología pulmonar y de las UFCs para las tres cepas. Se realizó extracción de RNA a partir de pulverizados de pulmón con nitrógeno líquido, usando el kit Quick RNA mini prep Zymo. Cat. R1055, siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones (Ver protocolo completo en **Anexo A-11**). Posteriormente, se hizo la síntesis del cDNA (**Anexo A-12**) y se amplificaron las citoquinas: IL-10, TNF- α , TGF- β , IFN- γ , iNOS e IL-12 de acuerdo con las condiciones mencionadas en el **Anexo A-12**.

1.2.2.9. Modelo de convivencia de ratones Balb/c

Para determinar la capacidad de las cepas de Mtb de infectar animales sanos, se utilizó el modelo de co-habitación o convivencia previamente descrito por Marquina-Castillo y cols., [254] que consiste en poner a convivir ratones sanos y enfermos en proporciones iguales durante el tiempo que duren vivos los animales enfermos. Para este experimento se infectaron 14 ratones por cepa y se pusieron a convivir el mismo número de ratones sanos en cajas ventiladas bajo presión negativa y aire suministrado a través de filtros HEPA. Para distinguir los animales infectados de los sanos sobre todo en las fases iniciales del experimento, se hizo una marca en la cola de los animales sanos con marcador de tinta indeleble, a los 60 días y 90 días de convivencia, se hizo sacrificio de los ratones sanos y se recuperaron los pulmones para la realización de UFCs (Ver **Anexo A-10**) e histología pulmonar. Como la mayoría de los animales infectados fallecieron antes del día 60 post infección, se iba tratando de mantener la proporción de animales sanos y enfermos completando las cajas con los ratones infectados para los otros experimentos.

1.2.2.10. Análisis estadístico

En general los resultados se reportaron como la media \pm desviación estándar. La significancia estadística se determinó a partir de la aplicación de análisis de varianza de múltiples mediciones (ANOVA). *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.005; ****P < 0.001, cada observación se analizó por triplicado. Todos los experimentos de la cinética *in-vivo* y el experimento *in-vitro* se hicieron por duplicado.

1.2.2.11. Análisis de expresión global de genes en pulverizados de pulmón por medio de secuenciación de transcriptoma completo (RNA-seq).

Al observar los hallazgos de los experimentos de UFCs y la histología pulmonar de los ratones infectados con las cepas 323 Beijing-Like y 391 Beijing-Clásico y dado que para el momento se encontraba activa la línea de investigación en NGS en el Departamento de Patología Experimental del INCMNSZ, se decidió hacer secuenciación de transcriptoma completo (RNA-seq) del hospedador murino Balb/c en ratones infectados con estas dos cepas. De acuerdo con los hallazgos de la histología pulmonar y del recuento de UFCs en pulmones para cada cepa, se decidió secuenciar el transcriptoma completo de cada cepa de Mtb genotipo Beijing a un día temprano post-infección (D3), un día intermedio (D14) y un día tardío (D28).

1.2.2.12. Extracción de RNA para secuenciación

Se sacrificaron 6 ratones (solo infectados con cepas Beijing) por cepa y se extrajeron los pulmones, los cuales fueron almacenados inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron permanentemente a -70°C . Brevemente, para la extracción de RNA se maceraron en un mortero y pistilo previamente enfriados con nitrógeno líquido los dos pulmones de cada ratón (R1-R6) en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, posteriormente se hicieron alícuotas de dicho pulverizado en tubos eppendorf previamente enfriados y se almacenaron en nitrógeno líquido y posteriormente a -70°C teniendo mucho cuidado de no dejar aumentar la

temperatura de los pulverizados y evitar de este modo la degradación del RNA, posteriormente se realizó extracción de RNA usando una o dos alícuotas de pulmón cada vez siguiendo el protocolo detallado en el **Anexo A-11**.

1.2.2.13. Determinación de cantidad y calidad del RNA previo al proceso de secuenciación.

Una vez obtenido el RNA, se hicieron 3 alícuotas de 5 µl en tubos de PCR (0,2 ml). Una alícuota se utilizó para medir la concentración y la relación 260/280 por espectrofotometría en el equipo EPOCH™, la segunda alícuota fue utilizada para realizar electroforesis en agarosa al 2% con el fin de evidenciar la integridad de las subunidades ribosomales, si las extracciones tenían relaciones 260/280 cercanas a 2.0 y en el gel de agarosa se observaban claramente las subunidades ribosomales sin signos de degradación, se enviaron a la Red de Apoyo a la Investigación (RAI) para la medición de RIN (RNA Integrity Number) por medio de electroforesis capilar usando los Nanochips RNA 6000 en el equipo 2100 Bioanalyzer. Si el RIN de cada muestra extraída era 7.0 o superior, estas muestras eran seleccionadas para el proceso de RNA-seq. Para cada tratamiento, se secuenciaron 3 ratones independientes.

1.2.2.14. Envío de muestras a secuenciación.

Una vez se obtuvieron todas las muestras que cumplieron las condiciones para el proceso de secuenciación, se enviaron a la RAI, en donde se elaboraron las librerías utilizando el kit TruSeq® Stranded mRNA de Illumina siguiendo las instrucciones del fabricante; posteriormente estas librerías fueron cuantificadas por Fluorometría usando el Qubit dsDNA HS de ThermoFisher cat. Q32851; posteriormente se evaluó el tamaño de los fragmentos de las librerías construidas usando el equipo 2100 Bioanalyzer y el kit High sensitivity DNA Kit Agilent, Cat 50674626; una vez verificadas las condiciones de las librerías construidas se secuenciaron las cepas utilizando el sistema Illumina HiSeq 2500 a partir de la preparación de una mezcla equimolar de las librerías a una profundidad de 100x, secuenciando tanto la hebra forward como la reverse siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.2.2.15. Análisis de resultados de RNA-seq

Los resultados de las secuencias, fueron entregados digitalmente en formato FastQ y compartidos en la nube del sistema Illumina BaseSpace, en una cuenta creada específicamente para este proyecto. A las lecturas o secuencias, se les hizo control de calidad (>20Q) usando el programa Trim_Galore https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore/blob/master/Docs/Trim_Galore_User_Guide.md versión 0.6.4 y FastQC Version 0.11.9. Posteriormente, las lecturas obtenidas del control de calidad se mapearon contra el genoma de referencia de *Mus musculus* reportado en el NCBI (assembly GRCm38.p6) usando el software BWA_MEM [255] con los parámetros establecidos por defecto para el software. El conteo de lecturas se realizó usando el software Htseq-count versión 0.11.1 [256] y posteriormente a expresión diferencial de genes se obtuvo usando el programa bioconductor DESeq2 (versión 3.7) [257] y considerando como genes diferencialmente expresados aquellos con

un valor de $p < 0.01$, el listado de genes diferencialmente expresados se digitalizó en un archivo de Excel.

Con el listado de genes diferencialmente expresados, se realizaron análisis de enriquecimiento a través del análisis de ontologías con los genes regulados diferencialmente, usando el portal gratuito en línea Gene Ontology (GO) <http://geneontology.org/>, este análisis se realizó con el fin de clasificar funcional y jerárquicamente los genes diferencialmente expresados.

Se realizaron análisis de enriquecimiento usando el portal en línea KEGG <https://www.genome.jp/kegg/> usando WebGestalt (WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit) [258], con el fin de analizar las vías metabólicas a las que estaban asociados los genes diferencialmente expresados. Tanto para los análisis de enriquecimiento en KEGG y GO, se utilizó un punto de corte de valor de p de 0.01.

Por otra parte, se realizaron análisis de sobrerrepresentación (ORA), usando la plataforma InnateDB <https://www.innatedb.com/>. Por último, se realizó un análisis de interacción por redes biológicas usando la plataforma NetworkAnalyst <https://www.networkanalyst.ca/>. Los datos crudos de secuenciación se depositaron en el repositorio gratuito del NCBI bajo el bioproyecto PRJNA635984. Ver protocolo de análisis en el **Anexo A-13**.

1.3. Resultados

1.3.1. Caracterización genotípica y fenotípica de los aislamientos clínicos de mtb

1.3.1.1. Genotipificación de aislamientos clínicos por Spoligotyping y MIRUS-VNTR

Los ensayos de tipificación se realizaron con el fin de confirmar el genotipo de los aislamientos clínicos objeto del presente trabajo.

Por Spoligotyping se confirmó que el aislamiento 323 pertenece al Linaje 2 (Este asiático) genotipo Beijing SIT 190 denominado en la base de datos internacional SITVIT2 como Beijing-like, caracterizado por la ausencia de los espaciadores 1-34 y 40 de los 43 analizados por esta metodología.

El aislamiento clínico 391 pertenece al linaje 2 (Este asiático) genotipo Beijing SIT 1 caracterizado por la ausencia de los espaciadores 1-34 denominado en la base de datos internacional SITVIT2 como Beijing-Clásico.

1.3.1.3. Caracterización morfológica ultraestructural de cepas Beijing por microscopía electrónica de transmisión (MET).

Antes de realizar el procedimiento, se realizó una curva de crecimiento para cada cepa, midiendo cada 24 horas el porcentaje de transmitancia con un nefelómetro análogo con el fin de determinar la fase logarítmica de crecimiento de las bacterias. En la **Figura 1-5** se muestran las curvas de crecimiento para las cepas Beijing. Para el procesamiento de las cepas para MET se recuperaron las bacterias el día 12 después de la detección de crecimiento, las mediciones iniciaron el día 12 porque a partir de ese día que se presentaron cambios en el porcentaje (%) de transmitancia, la medición de cada punto se realizó cada 24 horas. Para graficar los resultados, se obtuvieron los valores de absorbancia, calculando el Log_{10} de la transmitancia, con los puntos de tiempo que comprenden la fase logarítmica de crecimiento, se calculó el tiempo de generación de cada cepa a partir de la regresión lineal y pendiente con los puntos de la fase log de la curva de crecimiento.

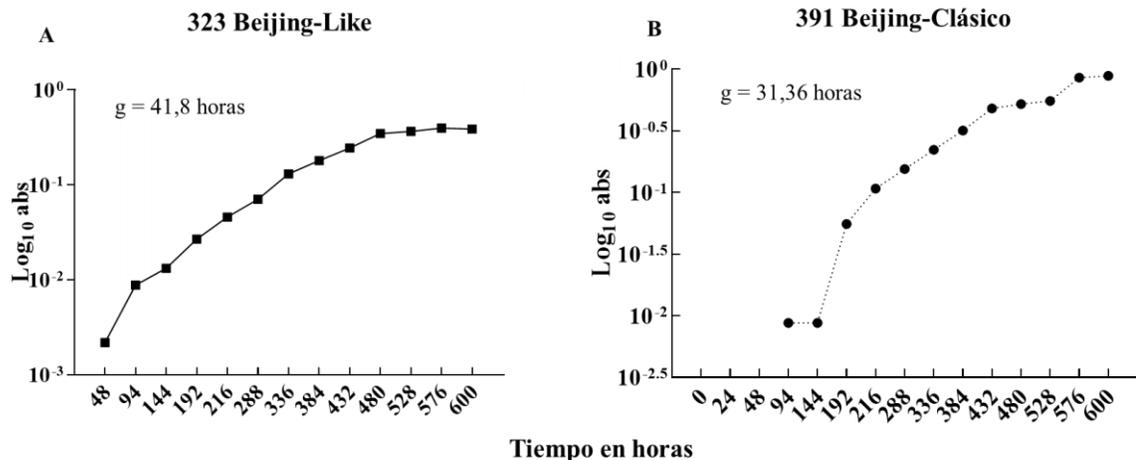


Figura 1- 5. Curvas de crecimiento de cepas Genotipo Beijing. A) 323 Beijing-Like, B) 391 Beijing Clásico. El crecimiento de las cepas fué seguido cada 24 horas por 21 días, midiendo el % de Transmitancia, estos valores fueron convertidos a absorbancia para obtener las gráficas de crecimiento y cálculo del tiempo de generación (g) de cada cepa.

Las dos cepas fueron recuperadas al día 12 de crecimiento, tiempo aproximado en que las bacterias se encontraban en la mitad de la fase logarítmica de crecimiento (Metabólicamente activas) para realizar las preparaciones para MET. Debido a que el genotipo Beijing de Mtb es un genotipo emergente en Colombia, y el conocimiento de estas cepas es reducido y, dado que en el INCMNSZ se dispone de un microscopio electrónico de transmisión, se decidió ahondar en el proceso de caracterización, en este caso sobre las bacterias en cultivo para determinar sus características ultraestructurales. En las **Figuras 1-6 y 1-7.**, se observan las capturas fotográficas para las cepas 323 y 391 y en la **Figura 1-8.**, se observan capturas fotográficas de la cepa de laboratorio H37Rv (Imágenes cedidas por el Laboratorio de Patología experimental del INCMNSZ).

Adicionalmente en la **Tabla 1-12** se hace una comparación en cuanto a la presencia o ausencia de organelos bacterianos entre las cepas Beijing y H37Rv. En la cepa 323, es evidente la presencia de vacuolas lipídicas grandes, lo que sugiere la presencia de depósitos de reserva de lípidos, posiblemente utilizados para su metabolismo durante los procesos metabólicos que realice la bacteria o involucrados en mecanismos de evasión de respuesta inmune y por lo tanto podrían actuar como posibles factores de virulencia, las vacuolas lipídicas son más pequeñas en la cepa 391 y prácticamente inexistentes en H37Rv. Otro elemento que llama visiblemente la atención es la gran cantidad de depósitos de metales pesados (posiblemente Hierro), que podrían actuar como cofactores de procesos metabólicos de la bacteria, estos depósitos de metales son menos evidentes en la cepa 391 y aún más escasos en H37Rv.

Se evidenció la estructura de la envoltura celular, compuesta por una membrana celular seguida de varias capas de peptidoglicano, rodeada de una pared celular, formando una estructura similar a cápsula de Mtb. La pared celular consistió en la presencia de dos capas distintas visibles, un interior electrón densa y una capa exterior electrón transparente que se cree está compuesto por el complejo Micolil-arabinogalactano unido covalentemente a peptidoglicano. Se hicieron mediciones del grosor de las mismas a las tres cepas, y a pesar de presentar diferentes perfiles en cuanto a la susceptibilidad a antibióticos, solo hubo una diferencia significativa en la comparación de medias en nanómetros de la pared celular entre H37Rv y la cepa Beijing-Clásica 391 MDR, la cual es una bacteria MDR (resistente a H, R y S). Llama la atención que la pared celular de 323-Beijing-like presenta un grosor normal, casi igual al de H37Rv, a pesar de ser un aislamiento clínico XDR. (**Figura 1-9**).

El citoplasma está compuesto por una red compleja de sistemas membranosos, a este sistema se le ha adjudicado el nombre de mesosomas, los cuales se forman por la invaginación y bifurcación de la membrana citoplasmática y se observan únicamente en bacilos Gram positivos, estas estructuras se observan como elementos laminares tubulares o vesiculares cubiertos por una membrana que las envuelve. La función de estas estructuras es servir como potenciadores de la actividad metabólica de la micobacteria; esta estructura puede variar en forma, estructura y localización dependiendo del estadio metabólico bacteriano [259]. Sin embargo, hay autores que afirman que esta estructura de forma artefactualmente por el procesamiento de las muestras para MET por la fijación química y el proceso de deshidratación [260], estas estructuras se observan claramente tanto en los aislamientos clínicos genotipo Beijing como en H37Rv (**Figuras 1-6 A, 1-7 I y 1-8 B**).

Es interesante resaltar la fase de actividad metabólica en la que se recuperaron las bacterias, pues, tanto para la cepa 323 como la 391 se observa un patrón de agrupamiento o formación de filas de bacterias con septos visibles y bacilos en elongación, que indican que las cepas se encuentran en una fase de replicación activa. En las fotografías (**Figuras 1-6, 1-7 y 1-8**) se observa claramente el material genético de los bacilos, dependiendo la forma en la que se visualizó, se nombró como cromosoma o nucleoide en las tres cepas.

En la **Tabla 1-12** se relacionan los organelos intracelulares observados en los aislamientos clínicos analizados por MET y su representatividad dentro de la célula.

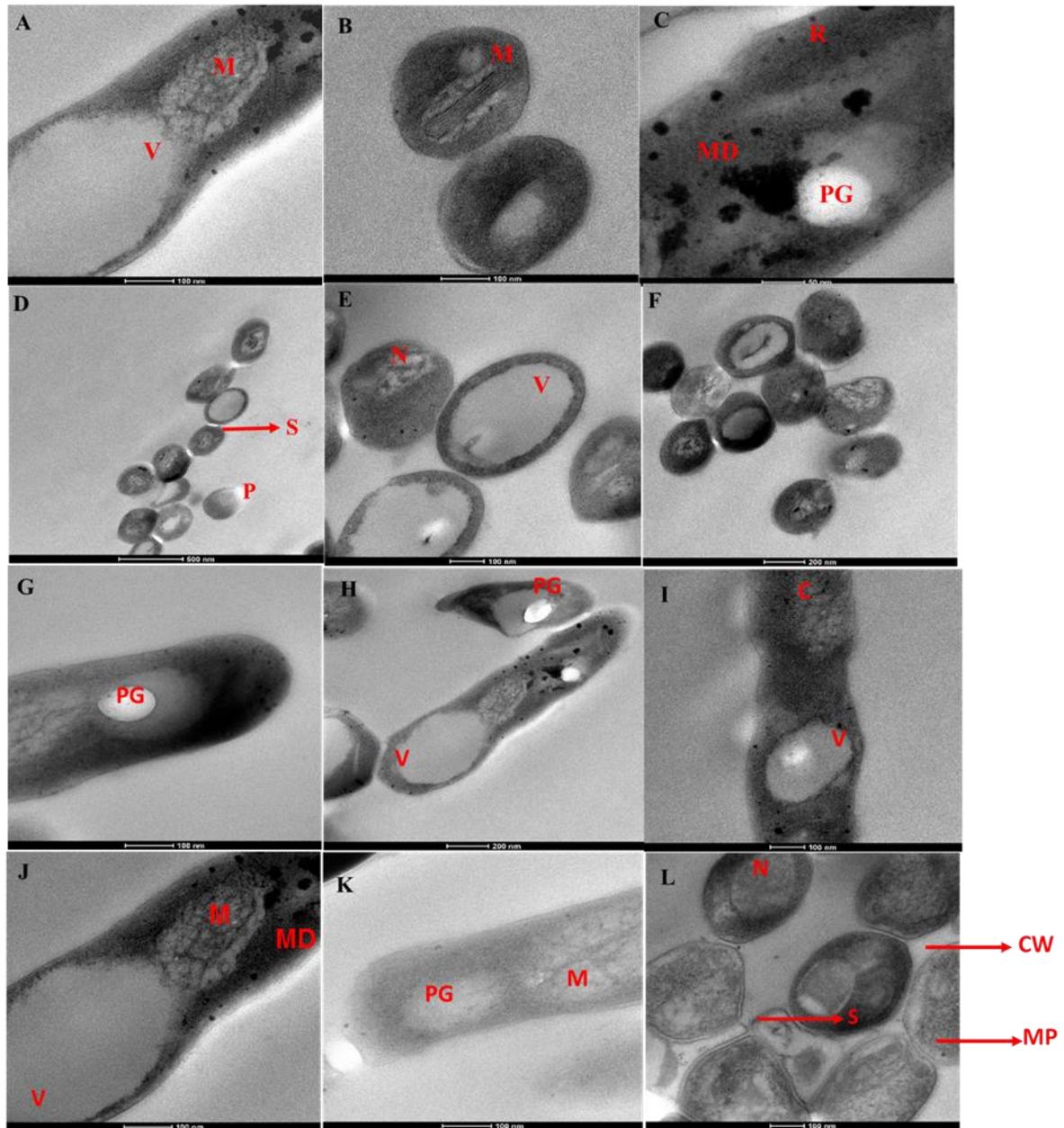


Figura 1- 6. Fotografías con MET de bacterias de Mtb genotipo Beijing-Like cepa 323. **A).** Se observan las grandes vacuolas (V) y el mesosoma (M). **B).** Mesosoma (M), **C).** Ribosomas (R), depósitos de metales pesados (MD) y gránulos de polifosfato (PG), **D).** Septo, y polos celulares **E).** Vacuolas (V) y Nucleoide (N), **F).** Agrupamiento de las bacterias. **G-H).** Gránulos de polifosfato (PG) y vacuolas (V), **I).** Cromosoma (C) o nucleoide (N), vacuolas (V), **J).** Vacuola (V), Mesosoma (M) y depósitos de metales (MD), **K).** Gránulos de polifosfato (PG) y Mesosoma (M), **L).** Nucleoide (N), Septo (S), Pared celular (CW) y membrana plasmática (MP).

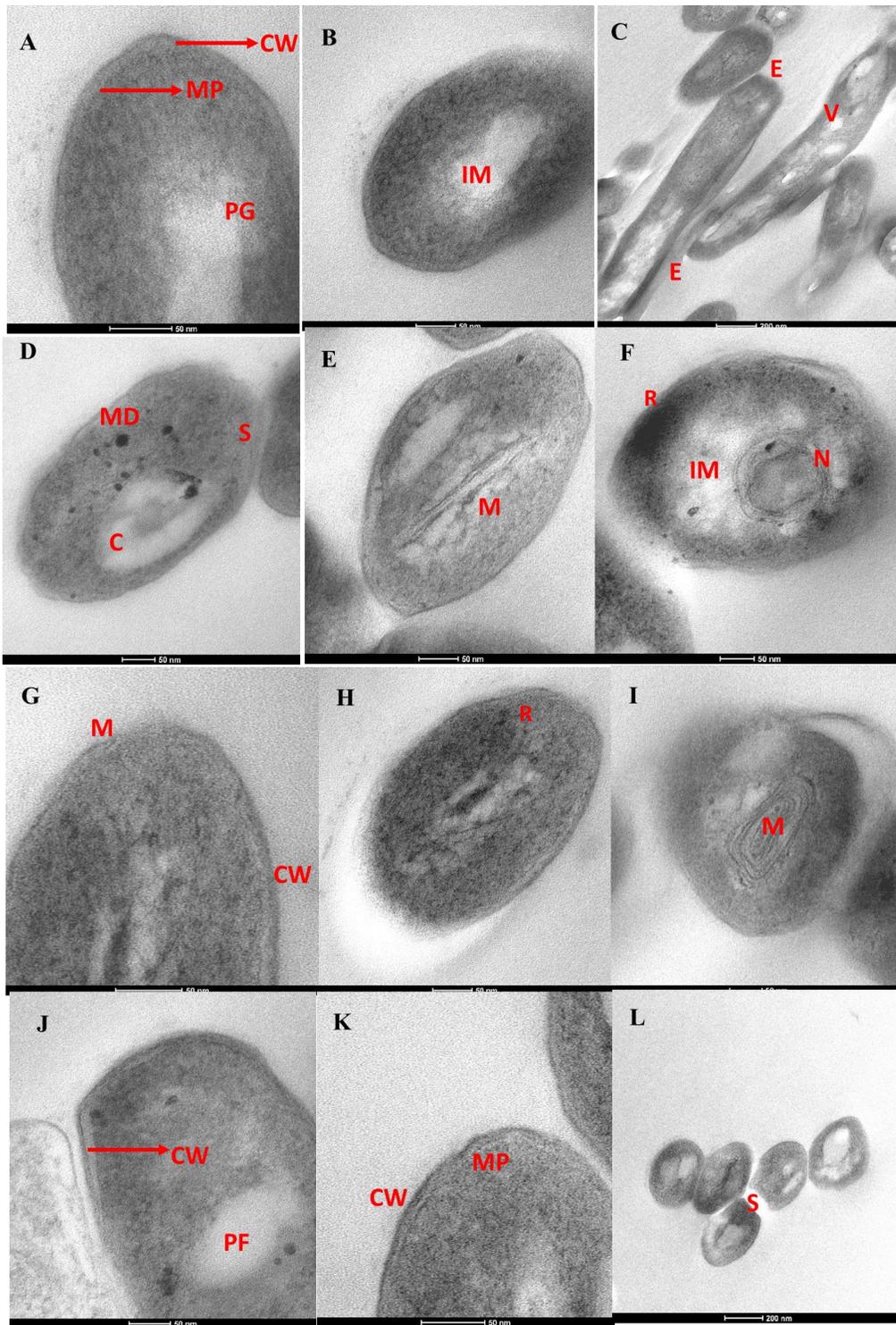


Figura 1- 7. Fotografías con MET de bacterias de Mtb genotipo Beijing- Clásico cepa 391. **A).** Pared celular (CW), Membrana Plasmática (MP), Gránulos de Polifosfato (PG). **B).** Material Intracelular (IM), **C).** Elongación Bacteriana (E) y vacuolas (V), **D).** Septo (S), **E).** Mesosoma (M), **F).** Ribosomas (R), Nucleoide (N) y Material intracelular (MI). **G).** Membrana (M) y pared celular (CW) **H).** Ribosomas (R), **I).** Mesosoma (M), **J).** Pared Celular (CW) y Gránulos de Polifosfato (PG) **K).** Pared Celular (CW) y membrana Plasmática (MP) **L).** Septo (S).

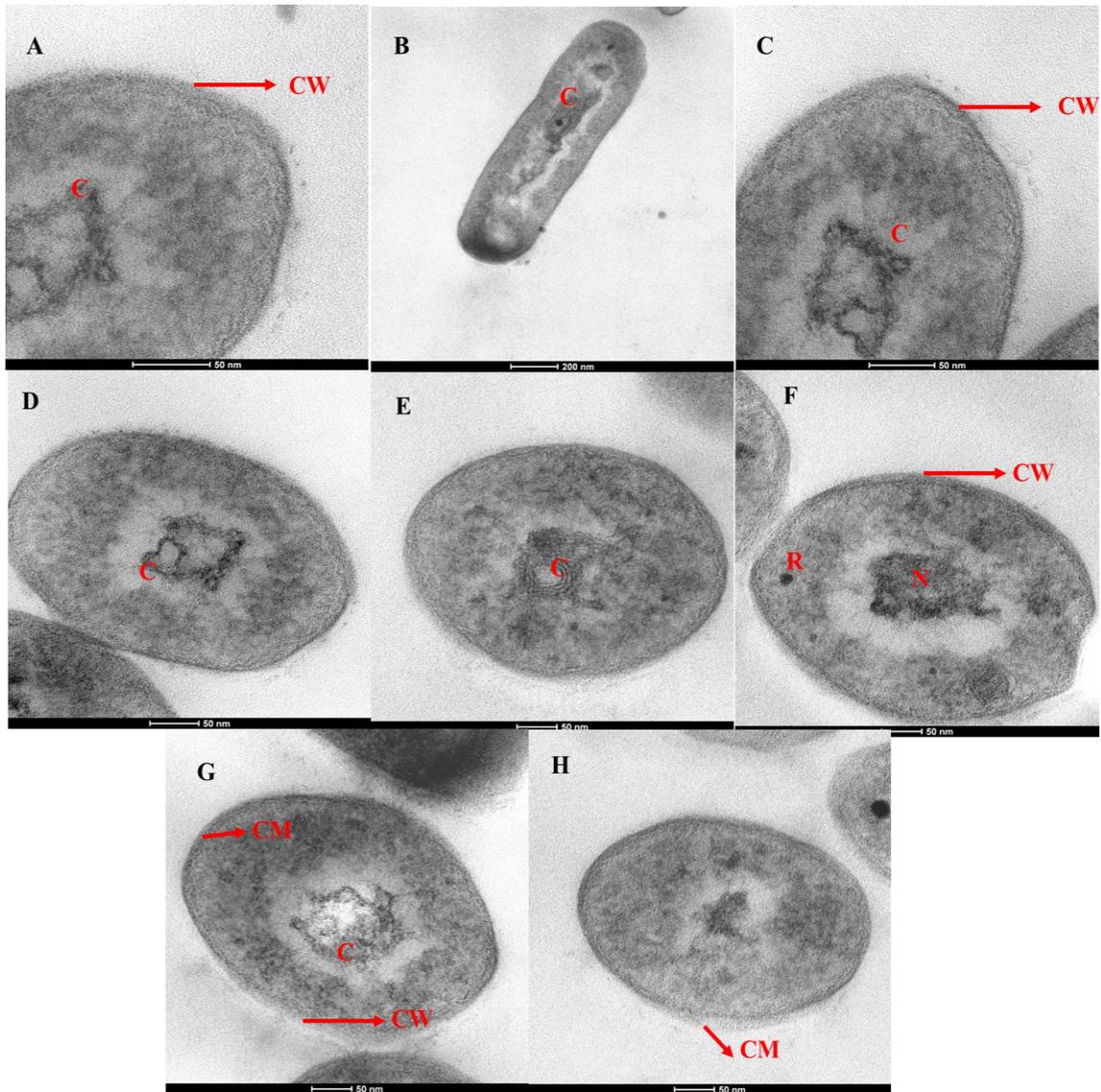
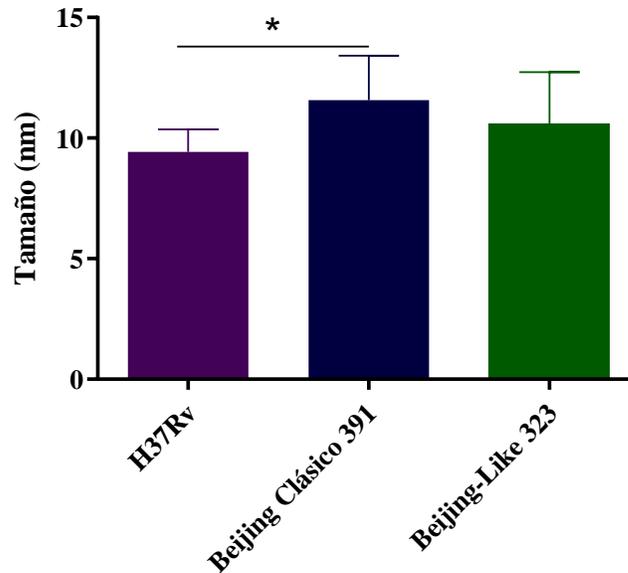


Figura 1- 8. Fotografías con MET de bacterias de Mtb cepa H37Rv. **A).** Cromosoma (C), Pared celular (CW) **B).** Fotografía de un bacilo en el que se observa claramente el material genético, Cromosoma (C). **C).** Pared Celular (CW) y Cromosoma (C) **D).** Cromosoma (C) **E).** Cromosoma (C), **F).** Ribosoma (R), Nucleoide (N), Pared Celular (CW), **G).** Membrana (CM), Pared celular (CW), Cromosoma (C) **H).** Membrana Celular (CM).

Tabla 1- 12. Relación de organelos celulares observados por MET para cada aislamiento clínico.

ESTRUCTURA	H37Rv	391	323
C: Cromosoma	Presente	Presente	Presente
N: Nucleoide	Presente	Presente	Presente
R: Ribosomas	Normal	Normal	Abundante
S: Septo	Presente	Presente	Presente
M: Mesosoma	Escasa	Estructura Grande	Estructura Grande
PG: Gránulos de Polifosfato	Escasos	Presentes	Grandes y Abundantes
V: Vacuolas	Escasas	Vacuolas Pequeñas	Estructuras Grandes y Deformantes
MD: Depósitos de Metales	Ausentes	Presentes	Abundantes
E: Elongación	Presente	Presente	Presente
IC: Material intracelular	Normal	Abundante	Abundante
CW: Pared Celular	Evidente y de tamaño Normal	Evidente y de tamaño Normal	Evidente y de tamaño Normal
PM: Membrana Plasmática	Evidente y de tamaño Normal	Evidente y de tamaño Normal	Evidente y de tamaño Normal

Grosor de paredes celulares

**Figura 1- 9.** Comparación del espesor de las paredes celulares

1.3.1.4. Infección de macrófagos alveolares de ratón MH-S “KILLING”

Con el fin de obtener un acercamiento inicial sobre el comportamiento de los aislamientos clínicos del estudio en un modelo de infección (en este caso *in-vitro*) se utilizó una línea de macrófagos alveolares adherentes de ratón (Balb/c) MH-S (ATCC® CRL-2019™), esta línea celular es ampliamente utilizada para estudios de replicación y secreción de citoquinas. Las células se infectaron con los aislamientos clínicos 323, 391 y LAM-B077bc, se realizó el Killing (Lisis) de las células con SDS 0.1% y UFCs a los días: 0, 2, 3 y 4 post infección con cada una de las cepas.

En los días tempranos post-infección D0 y D2, se observa la capacidad fagocítica de los macrófagos, la cual está determinada no solo por el tipo de respuesta inmune generada por la célula sino de la modulación de la misma por parte de las bacterias infectantes.

Al D0 post-infección, no se observó diferencia en la cantidad de bacterias fagocitadas, tendencia que se mantuvo hasta el día 2 post-Infección. Al día 3 post-infección se empezó a observar diferencias en el número de UFCs entre las cepas. El objetivo en esta etapa del ensayo es determinar cuál es la capacidad de sobrevivencia y capacidad de replicación de las bacterias, dentro de una célula que tiene la capacidad de producir su muerte.

En la **Figura 1-10 A.**, se observan gráficamente los resultados obtenidos a partir de las UFCs al D0, D2, D3 y D4 post-infección. La Cepa 323 Beijing-Like mostró la más alta capacidad de multiplicación intracelular, desencadenada posiblemente por la regulación de factores de virulencia propios de la cepa, que le permiten evadir los mecanismos de muerte y el procesamiento de antígenos de los macrófagos en cultivo. El objetivo de incluir un aislamiento clínico LAM9 que es el genotipo más prevalente en el país, era disponer de un control clínico “Normovirulento” y sensible a medicamentos para comparar su comportamiento con el de las cepas Beijing, sin embargo, con estos resultados se observa que después de 323 Beijing-Like, el aislamiento clínico B077bc muestra un fenotipo virulento, con una alta capacidad de multiplicación intracelular, a diferencia de la cepa H37Rv y el aislamiento clínico 391 Beijing-Clásico; siendo H37Rv la cepa con menor virulencia (inferida por la capacidad replicativa intracelular).

Para determinar la respuesta inmune generada por los macrófagos MH-S después de la infección con las diferentes bacterias, se midieron las citoquinas pro-inflamatorias IL-12p70, IFN- γ y TNF- α y la citoquina antiinflamatoria IL-10 por ELISA (**Figura 1-10 B-E**) en pools de sobrenadantes obtenidos antes de realizar el proceso de Killing en día tiempo post-infección, dado que el volumen de sobrenadante era muy bajo no se pudieron hacer réplicas del experimento y se interpreta cualitativamente la producción de citoquinas.

En cuanto a la secreción de IL-1 β , se observa que se produce en muy bajas cantidades por parte de las células infectadas con todas las bacterias, siendo indetectable la presencia de esta citoquina en los sobrenadantes (no se muestran datos), sin embargo, las células infectadas con el aislamiento clínico LAM-B077bc, producen una cantidad superior de IL-12p70 comparado con las otras

bacterias al D0 post-infección, seguido de una cantidad importante de las citoquinas protectoras IFN- γ y TNF- α a los días 3 y 4 post-infección, la cual es una respuesta inmune protectora o benéfica para las células infectadas; sin embargo, la presencia de estas citoquinas no neutraliza la alta capacidad replicativa de esta cepa. La producción de la citoquina TNF- α es tardía ante la infección con el aislamiento clínico 323 Beijing-Like y su efecto no se ve reflejado en la carga bacteriana al D4 post-infección, demostrando que esta bacteria tiene la habilidad de evadir el efecto de esta citoquina.

Llama la atención que al día 4 post-infección todas las bacterias producen la citoquina anti-inflamatoria (respuesta no protectora) IL-10, excepto 391 Beijing-Clásico, y aunque esta bacteria muestra una carga bacteriana más baja que las cepas más virulentas de este ensayo (323 y B077bc) y pese a la baja cantidad de citoquinas protectoras producidas por las células infectadas con esta cepa, esta bacteria no es tan veloz en su replicación, a pesar de inducir la producción de una baja concentración de todas las citoquinas aquí evaluadas (**Figura 1-10 B-E**).

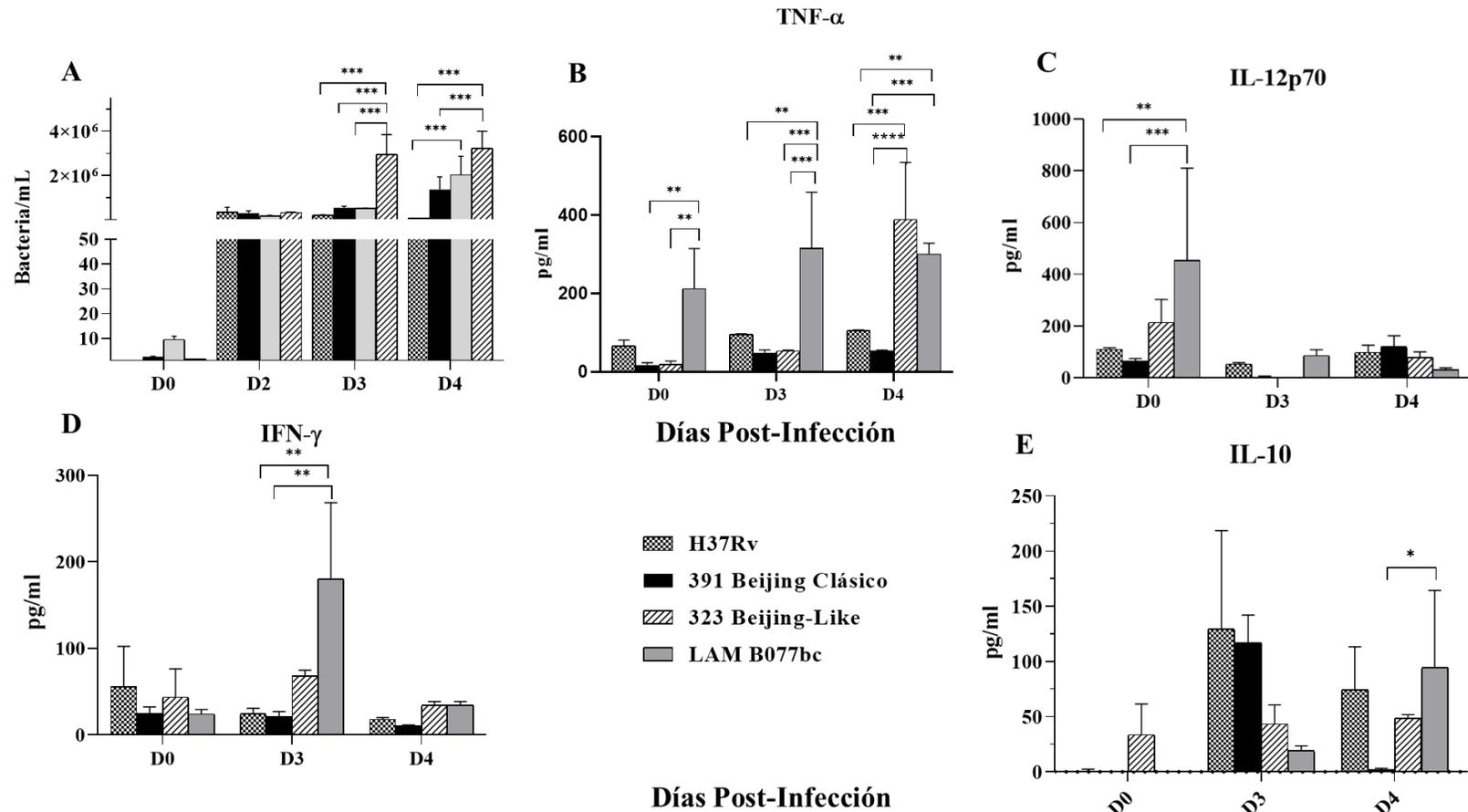


Figura 1- 10. Resultados de infección de macrófagos alveolares de ratón (Balb/c) “Killing”. **A)** UFCs a partir del killing al Día 0 Post-infección, Día 2 Post Infección, Día 3 Post Infección y Día 4 Post-Infección. * **B)** Medición de citoquinas en pools de sobrenadantes obtenidos a partir del cultivo de MHS-Infectados con las diferentes cepas en estudio días 0, 3 y 4 post Infección- **TNF- α** **C)** IL-12p70, **D)** IFN- γ , **E)** IL-10. P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.005; ****P < 0.001

1.3.1.5. Cinética de infección con aislamientos clínicos colombianos en el modelo de TB pulmonar progresiva crónica ratón Balb/c.

▪ Sobrevida

Se hizo seguimiento del estado de salud y se documentaron las muertes espontáneas y/o sacrificios humanitarios de los grupos experimentales de ratones infectados (323 Beijing-Like, 391 Beijing-Clásico y LAM B077bc). El aislamiento clínico 323 Beijing-Like indujo prematuramente la muerte de los animales, al día 42 PI habían fallecido la totalidad de los animales; el estado de salud de este grupo de animales era bueno y estable hasta el día 21 PI, pero a partir del día 28 PI se observó un marcado deterioro del estado de salud, induciendo caquexia, limitación en el movimiento y piloerección disminuyendo aceleradamente la población de ratones sobrevivientes. Los animales infectados con el aislamiento clínico LAM B077bc presentaron deterioro en el estado de salud desde el día 21 PI, sin embargo la sobrevida se extendió hasta el día 60 PI cuando fallecieron los últimos ratones. Por último los animales infectados con el aislamiento clínico 391 Beijing-Clásico, comenaron a morir después del día 45 post infección, día a partir del cual se observó el deterioro en el estado de salud, estos animales a pesar de no presentar signos marcados de enfermedad fallecían súbitamente hasta el día 63 en el que falleció el último animal, en la **Figura 1-11 A** se observa la gráfica de sobrevida, en donde se observan diferencias estadísticamente significativas en la sobrevida entre los aislamientos 323 y B077bc y 323 y 391.

▪ Carga bacilar en homogenizados de pulmón y bazo

Entre el día 7 y 14 PI, se produjo el crecimiento marcado en el número de bacterias del aislamiento clínico 323 Beijing-Like seguido de LAM B077bc, al igual que en el experimento in vitro estas dos bacterias fueron capaces de sobrepasar los mecanismos inmunes del hospedador y multiplicarse. Aunque el crecimiento bacteriano del aislamiento 391 Beijing clásico no fue tan acelerado, esta bacteria también produjo una alta carga bacteriana en las UFCs, el crecimiento acelerado a partir del día 14 PI se correlaciona con la muerte de los animales, ya que posiblemente al día 28 PI la carga bacteriana estaba causando afectaciones orgánicas determinantes de muerte prematura (**Figura 1-11B**). La presencia de bacterias en bazo indica que los aislamientos de Mtb tienen la capacidad de causar TB extrapulmonar, en este caso se encontraron bacterias en bazo a partir del día 14 PI, de nuevo 323 y B077bc produjeron la mayor cantidad de bacterias en este órgano (**Figura 1-11 C**), sin embargo hacia el día 28 PI la cepa LAM B077bc produjo una mayor carga bacilar extrapulmonar.

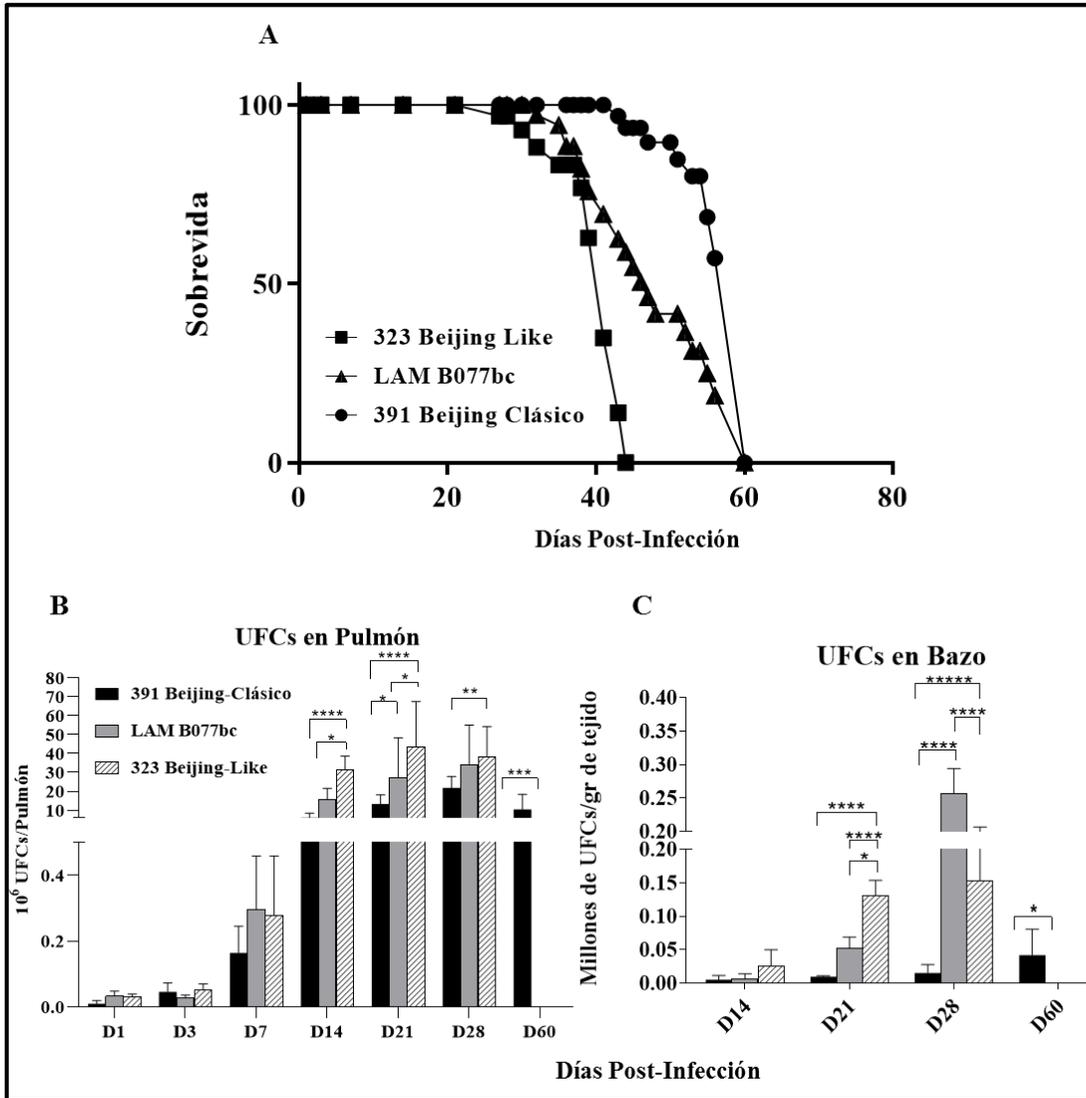


Figura 1- 11. Cinética infección de ratones Balb/c con aislamientos clínicos colombianos. **A)** Porcentaje de supervivencia **B)** Recuento de unidades formadoras de colonia en homogenizados de pulmón *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.005; ****P < 0.001 **C).** Recuento de unidades formadoras de colonia en homogenizados de Bazo *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.005; ****P < 0.001.

▪ **Histología y morfometría de pulmones de ratones infectados con aislamientos clínicos colombianos.**

Se procesaron histológicamente 3 pulmones derechos perfundidos con etanol absoluto, de 3 ratones distintos de cada punto de sacrificio (Día 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 PI), con el fin de observar el progreso de la patología pulmonar desarrollada por los animales a días de infección tempranos, intermedios y tardíos. En las **Figuras 1-12 a 1-14** se observan los principales hallazgos y cambios patognomónicos en los días claves de la cinética. **Figura 1-12.** Progreso del daño histológico desencadenado en animales infectados con aislamiento 323 Beijing-Like: A partir del día 14 PI se observa la presencia

de granulomas numerosos **Figura 1-12 A**. Otro hallazgo histológico es la presencia de Alveolitis (flecha en **Figura 1-12 B**) e inflamación perivascular (**Figura 1-12 C**) caracterizada por la presencia de células inflamatorias alrededor de la luz vascular. Hacia el día 21 PI los granulomas aumentan en número y tamaño en coexistencia con parches de neumonía (**Figura 1-12 D**), en los que se evidencia la presencia de macrófagos espumosos produciendo un cambio ya notorio en la arquitectura pulmonar (**Figura 1-12 F**). Hacia el día 28 PI, predomina la inflamación tisular con áreas extensas de neumonía, hallazgo bien correlacionado con la disminución en la sobrevivencia de los animales y las altas cargas bacterianas en este día. En la **Figura 1-15 A y B** se grafica el área de granulomas y porcentaje de neumonía.

En los ratones infectados con la cepa 391 Beijing clásico, fueron los únicos en los cuales fue posible hacer la cinética hasta el día 60 PI. Histológicamente, el progreso del daño tisular fue más lento que con los demás aislamientos clínicos, formando estructuras granulomatosas a partir del día 14 PI (**Figura 1-13 A y B**) así como alveolitis (**Figura 1-13 C**) conservando la arquitectura pulmonar. Hacia el día 21 PI se observaron granulomas grandes y en mayor cantidad (**Figura 1-13 D,F**), sin embargo, la mayoría de estas estructuras fue inexistente hacia el día 28 PI, momento en el cual se empezó a observar la presencia de parches neumónicos (**Figura 1-13 G-I**), caracterizados por presentar un gran número de macrófagos espumosos, aunque estos hallazgos indican que hay una TB activa, los ratones no estaban visiblemente enfermos; ya en el día 60 PI, en el último grupo de ratones sobrevivientes, se observó la presencia de necrosis tisular, cambiando por completo la arquitectura pulmonar y correlacionada con la muerte de los animales. En la **Figura 1-15 A y B** se grafica el área de granulomas y porcentaje de neumonía.

En pulmones de ratones infectados con LAM B077bc se encontró un hallazgo poco común y es la formación temprana de estructuras granulomatosas a partir del día 7 PI (**Figura 1-14 A-C**), los cuales aumentaron en número y tamaño al día 14 PI sin formación de parches de neumonía (**Figura 1-14 D-F**), sin embargo, aunque hacia el día 21 PI aún se observaban granulomas bien conformados (**Figura 1-14 G**), se empezaron a formar parches de neumonía (**Figura 1-14 H-I**), la cual se extendió rápidamente hacia el día 28 PI (**Figura 1-14 J-K**) produciendo la pérdida en la arquitectura pulmonar (**Figura 1-14 L**). En la **Figura 1-15 A y B** se grafica el área de granulomas y porcentaje de neumonía. En este caso se logró analizar el pulmón del último animal sobreviviente al día 60 PI, en el que se observó una neumonía masiva.

▪ **Transmisibilidad de Mtb por medio del uso del modelo experimental de transmisibilidad o convivencia de animales sanos con animales infectados con aislamientos clínicos de Mtb.**

Se usó el modelo de transmisibilidad para determinar qué tan infecciosas son los aislamientos clínicos evaluados en el presente estudio, colocando igual número de animales sanos y animales infectados cada uno con 2.5×10^5 bacterias en la misma caja aisladora para convivir. Luego de 60 y 90 días de convivencia, se realizó el sacrificio de los animales sanos para realización de UFCs (**Ver anexo A-10**) e histología pulmonar. No se obtuvo crecimiento bacteriano ni a los 60 ni 90 días de

sacrificio. Como se observó en los resultados de sobrevida, los ratones infectados con los aislamientos clínicos de este estudio, sobrevivieron máximo 60 días; después de los 30 días para el caso del aislamiento clínico 323 Beijing-Like y aproximadamente después de 45 días para los otros dos aislamientos clínicos, fue imposible mantener la proporción de animales sanos y animales infectados debido a la rápida disminución en la sobrevida, lo que pudo influir en la no transmisión de las bacterias. A pesar de no obtener crecimiento bacteriano en el experimento de UFCs, se realizó el procesamiento histológico de los pulmones perfundidos con etanol absoluto sin observar cambios sugerentes de infección con Mtb.

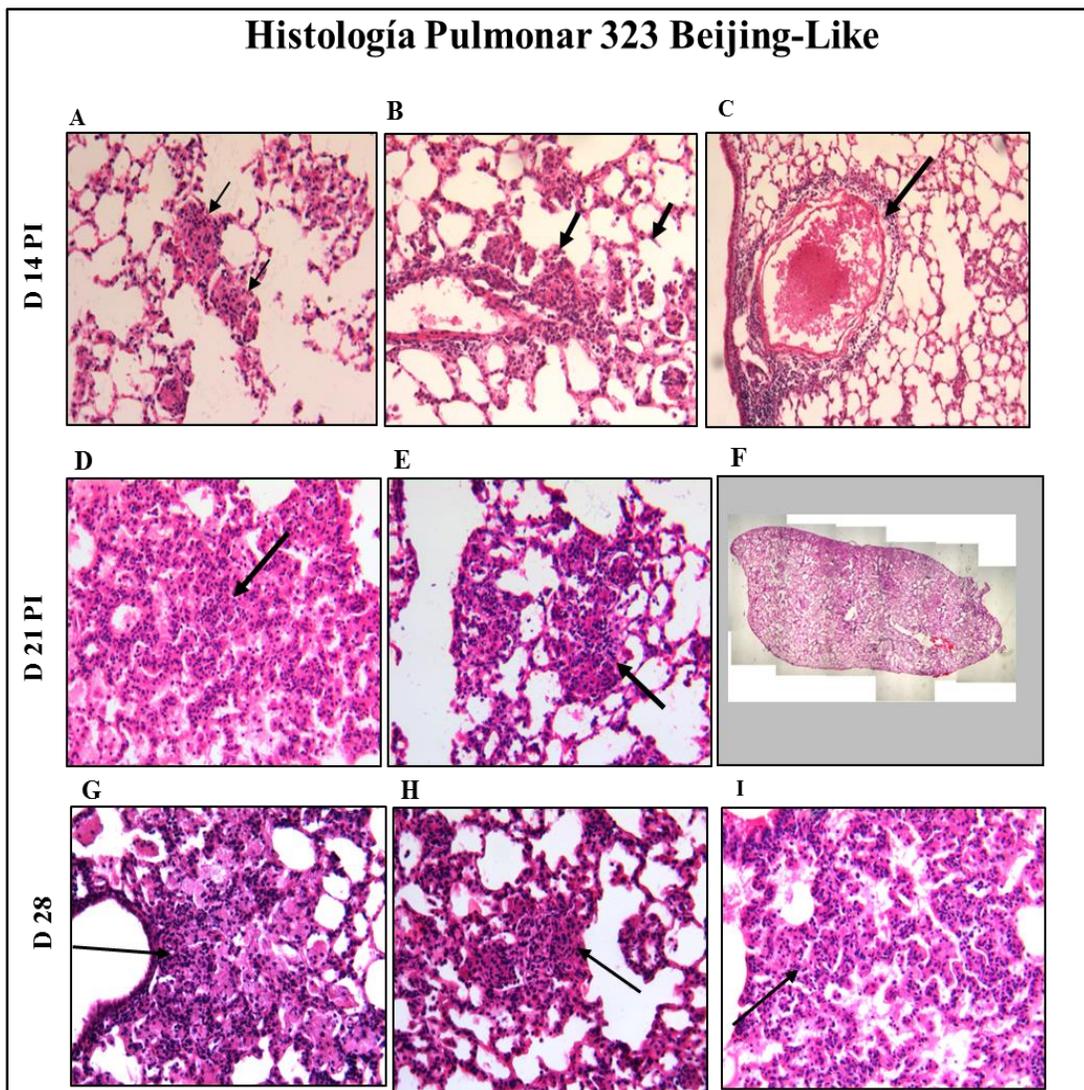


Figura 1- 12. Hallazgos histopatológicos en pulmones de ratones infectados con 323 Beijing-Like, tinción H-E. **A-B).** Las flechas muestran estructuras granulomatosas al día 14 PI, **C).** Inflamación perivascular, **D).** Parche de neumonía, **E).** Granuloma grande día 21 PI, **F).** Panorámica pulmonar con arquitectura conservada, pero con parches de neumonía **G).** Neumonía y presencia de macrófagos espumosos (flecha), **H-I).** grandes áreas de neumonía.

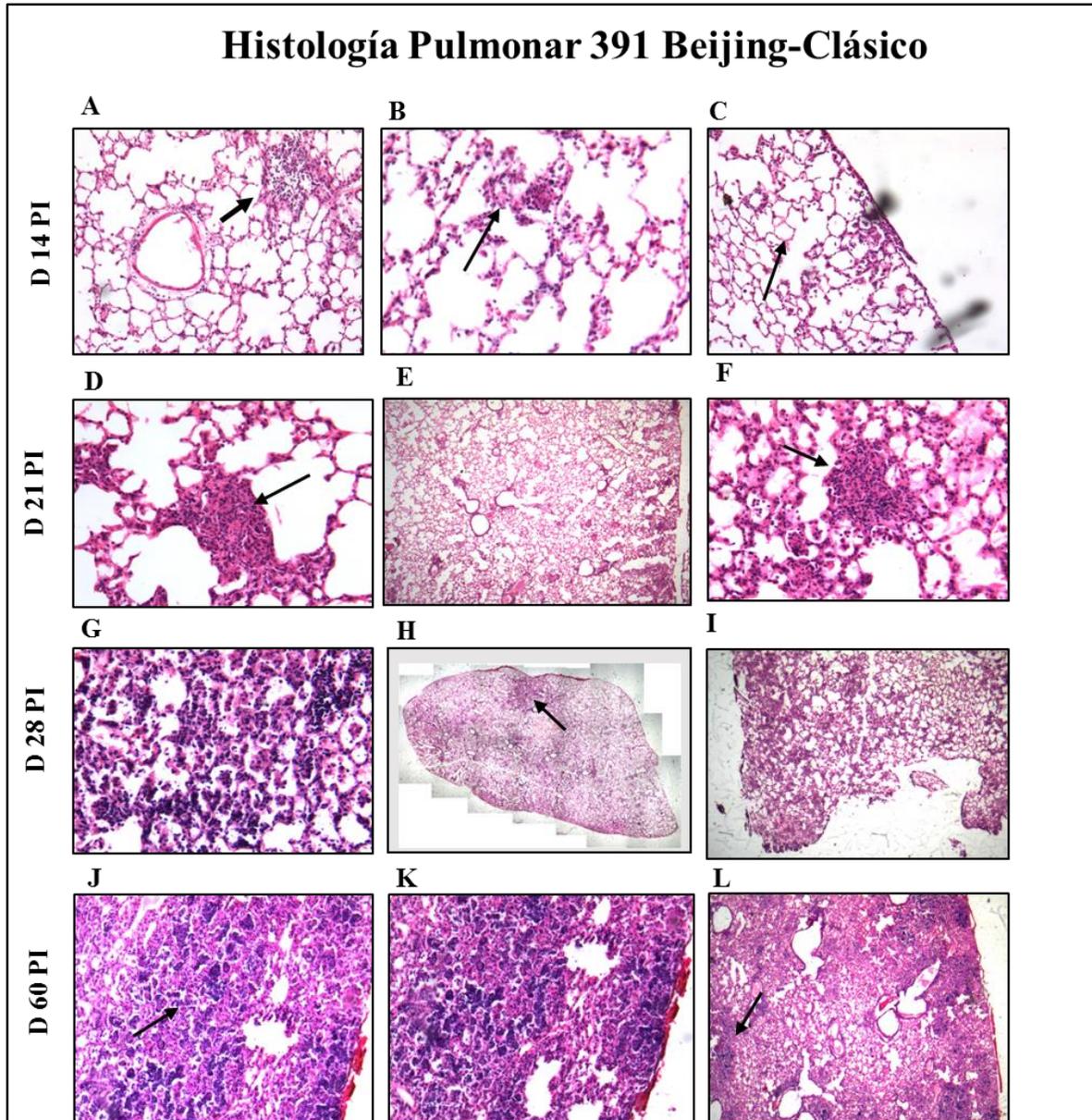


Figura 1- 13. Hallazgos histopatológicos en pulmones de ratones infectados con 391 Beijing-Clásico, Tinción H-E. **A-B).** Las flechas muestran estructuras granulomatosas pequeñas y en baja cantidad al día 14 PI, **C).** Inflamación peribronquial, **D).** Granuloma grande día 21 PI, **E).** Vista de numerosos granulomas **F).** granuloma grande, inflamación peribronquial y alto flujo de células inflamatorias **G).** Neumonía y presencia de macrófagos espumosos **H-I).** grandes áreas de neumonía. **J-L).** Extensas áreas de neumonía con presencia de necrosis tisular y pérdida de arquitectura pulmonar.

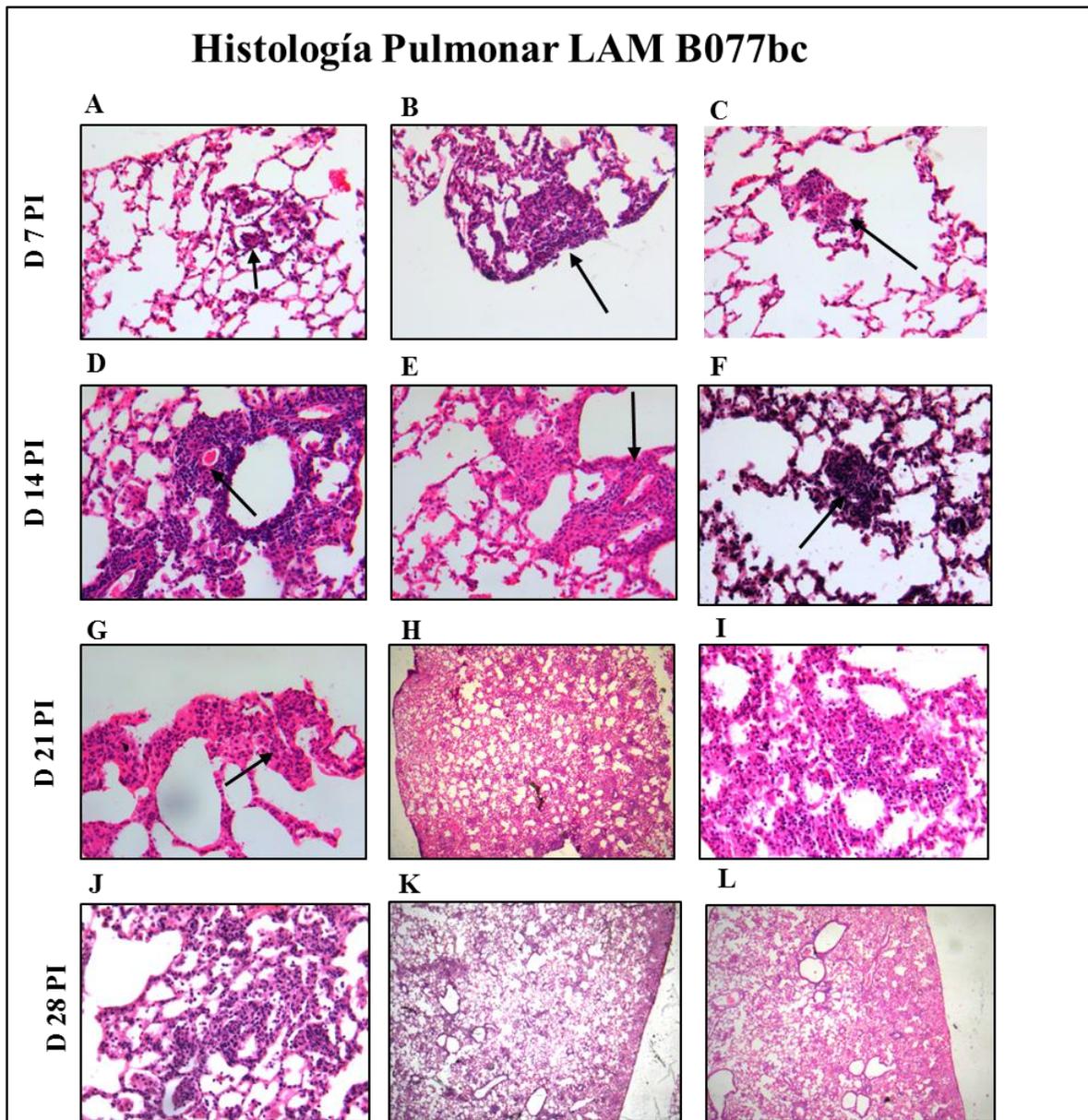


Figura 1- 14. Hallazgos histopatológicos en pulmones de ratones infectados con LAM B077bc. Tinción con H-E. **A-C).** Formación temprana de numerosos granulomas. **D).** Inflamación perivascular 14 PI, **E).** Vista de numerosos granulomas **F).** granuloma grande, inflamación peribronquial y alto flujo de células inflamatorias **G)** Neumonía **H-I).** grandes áreas de neumonía. **J-L).** Extensas áreas de neumonía y pérdida de arquitectura pulmonar.

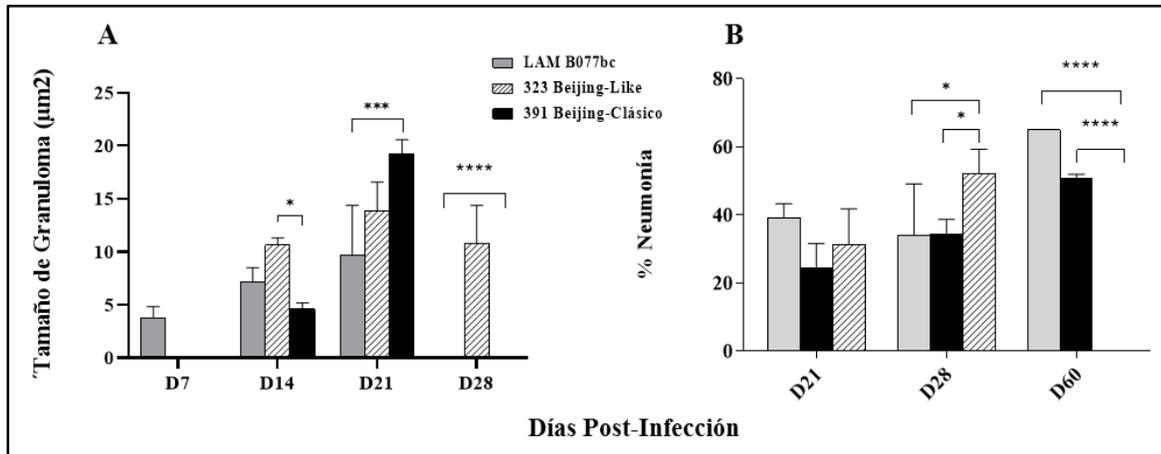


Figura 1- 15. Gráficas de cuantificación de área de granulomas **A)**, y porcentaje de neumonía **B)**, en pulmones infectados con los aislamientos clínicos colombianos. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$; **** $P < 0.001$.

▪ **Cuantificación de citoquinas en pulverizados de pulmones de ratones infectados con aislamientos clínicos colombianos de Mtb.**

Con el fin de determinar qué tipo de respuesta inmunológica se indujo a partir de la infección con los aislamientos clínicos de Mtb, se cuantificó la expresión de citoquinas pro y anti-inflamatorias por qRT-PCR y el análisis de resultados se realizó por cuantificación relativa usando como gen de referencia *Rplp0*.

Se cuantificó iNOS, una enzima de producción temprana durante la infección con Mtb cuya función es la de activar los macrófagos para que se produzca la fagocitosis de bacterias y actúa sinérgicamente con $IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$, produciendo una respuesta inmune pro inflamatoria benéfica para el hospedador infectado, a lo largo de la cinética de infección se expresó iNOS en bajas cantidades, la mayor expresión de esta se dio al día 7 PI por parte del aislamiento 323 Beijing-Like (**Figura 1-16 A**). Al día 3 PI hubo una expresión importante de IL-12 por parte de los animales infectados con los aislamientos clínicos Beijing, sin embargo, la producción de esta citoquina no se mantuvo a lo largo del tiempo, por lo que la activación de los macrófagos en las fases iniciales de la infección pudo ser transitoria (**Figura 1-16 B**).

La otra citoquina pro-inflamatoria de expresión temprana fue la IL-12, siendo el mayor pico de producción de la misma al día 7 PI por parte del aislamiento 323 seguido del 391, en general, esta citoquina junto con iNOS se producen en respuesta a la infección por Mtb con el fin de activar los macrófagos para favorecer el proceso de fagocitosis, pero al observar los niveles de expresión así se alcanzan a observar diferencias significativas entre las bacterias, en general los niveles de expresión de estas es bajo, sin embargo, llama la atención que el aislamiento clínico 391 Beijing-clásico, mantiene los niveles de expresión de estas hasta el día 60 PI (**Figura 1-16 A y B**).

La mayor expresión de TNF- α se dio por parte de los animales infectados con el aislamiento LAM B077bc, siendo el día 28 PI el de mayor expresión de la misma (**Figura 1-16 C**), los aislamientos clínicos Beijing expresaron la mayor cantidad de esta citoquina al día 7 PI. la expresión de esta citoquina es crucial para la formación de granulomas, estas estructuras fueron observables tempranamente al día 7 PI, correlacionándose con la producción de esta citoquina e IFN- γ (**Figura 1-16 C y D**). El aislamiento B077bc mantuvo altos niveles de expresión de esta citoquina a lo largo de la cinética, sin embargo, la expresión de estas no evitó el rápido progreso de la patología pulmonar y la muerte prematura de los animales infectados con este aislamiento clínico.

Por otra parte, la medición de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β , permite determinar el perfil de la respuesta inmune desencadenada por las bacterias utilizadas en la infección, los aislamientos clínicos que hasta el momento han mostrado un fenotipo más virulento 323 y LAM B077bc mostraron un alto nivel de expresión de estas citoquinas en los días tempranos PI (Día 3 y 7) (**Figura 1-16 E y F**), contrarrestando el efecto inflamatorio que pudiera tener la baja expresión de enzimas y citoquinas de fase aguda (IL-12 e iNOS), B077bc y 323 mostraron mayor expresión de TGF- β (**Figura 1-16 F**) y 391 Beijing clásico, expresó tempranamente en mayor cantidad IL-10 (**Figura 1-16 E**).

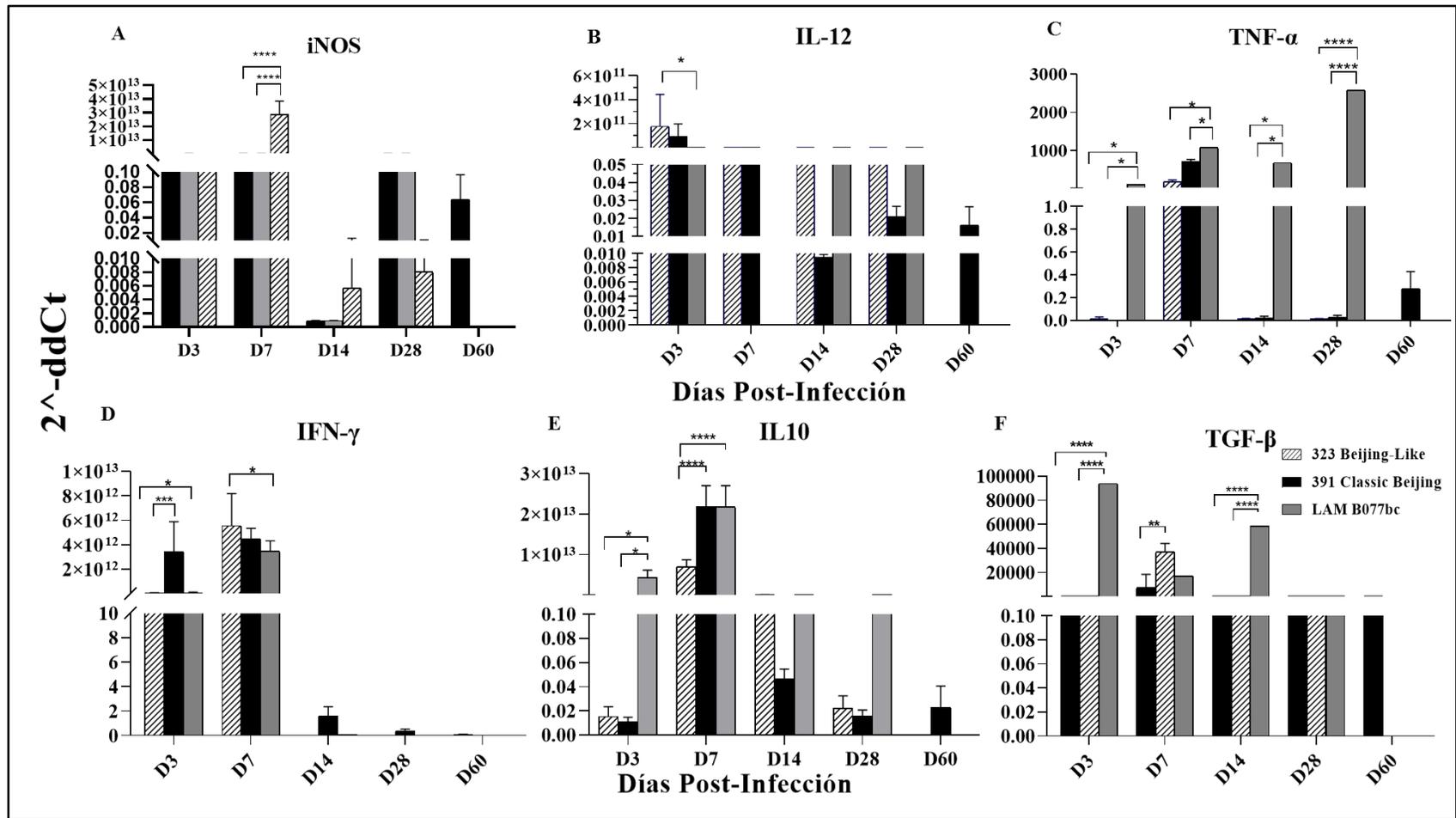


Figura 1- 16. Medición de la expresión de citoquinas por qRT-PCR. **A)** iNOS y las citoquinas **B)** IL-12, **C)** TNF-α, **D)** IFN-γ, **E)** IL-10 y **F)** TGF-β en cinética de infección con aislamientos clínicos colombianos de ratón Balb/c. La medición de la expresión se realizó por medio de qRT-PCR y la cuantificación de la expresión se realizó por cuantificación relativa usando como gen de referencia *rplp0*. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de dos vías. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.005; ****P < 0.001.

1.3.1.6. Expresión global de genes ante la infección de ratones Balb/c con aislamientos clínicos colombianos genotipo Beijing

En el momento del diseño del experimento se tuvo en cuenta las características del modelo de TB pulmonar progresiva crónica; en este, cuando se usa la cepa de referencia H37Rv los días claves en los que hay cambios histológicos determinantes de la infección son día 3 (infección temprana), día 21 (formación de granulomas “latencia”) y fase tardía posterior al día 60 PI (TB activa), sin embargo, los aislamientos clínicos genotipo Beijing, mostraron un fenotipo virulento con una progresión más rápida de la enfermedad en los animales, formando granulomas a partir del día 14 PI y adelantando su fase activa hacia el día 28 PI. Con las observaciones obtenidas a partir del recuento de UFCs y los hallazgos histológicos pulmonares, se eligieron como días determinantes en la progresión del cuadro pulmonar los días 3, 14, 28 y 60 PI.

Los pulmones de tres animales diferentes infectados con 2.5×10^5 bacterias, se pulverizaron con nitrógeno líquido y se les realizó extracción de RNA, se verificó la cantidad y calidad del mismo antes de ser enviados a secuenciación. La calidad de las librerías (RIN) se verificó por electroforesis capilar antes del proceso de secuenciación el cual se realizó usando la plataforma Illumina en la Red de Apoyo a la Investigación RAI, instituto adscrito a la Universidad Nacional Autónoma de México, secuenciando ambos extremos (paired end); en todos los parámetros de control de calidad de la secuenciación se obtuvieron buenos resultados para el análisis bioinformático. A continuación en la **Tabla 1-13.**, se relacionan las muestras enviadas a secuenciación con su respectiva concentración, relación 260/280 y RIN.

Tabla 1- 13. Relación de la cantidad y calidad de las muestras enviadas a RNA-seq del hospedador, ratones Balb/c infectados con cepas Beijing

Cepa Infectante	Día post-Infeción	Ratones enviados a secuenciar	Concentración ng/ μ l	260/280	RIN	Integridad Ribosomal Electroforesis Capilar
Beijing-Like 323	D3	R1	117.24	2.107	8.30	
		R2	165.22	2.115	8.60	
		R3	84.88	2.141	8.20	
	D14	R1	68.34	2.063	8.80	
		R2	224.25	2.089	8.90	
		R3	414.68	2.025	9.10	
	D28	R1	475.84	2.031	7.60	
		R2	158.30	2.045	8.40	
		R3	364.48	2.047	9.20	
Beijing-Clásico 391	D3	R1	150.45	2.067	9.30	
		R2	113.08	2.086	8.40	
		R3	236.51	1.999	9.30	
	D14	R1	213.01	2.020	9.0	
		R2	319.45	2.012	9.0	
		R3	189.78	2.047	9.10	
	D28	R1	175.29	2.061	8.10	
		R2	179.62	2.022	9.10	
		R3	475.84	2.031	8.10	
	D60	R1	364.98	2.047	8.10	
		R2	158.30	2.045	7.90	
		R3	111.38	2.038	9.10	

Después de realizar el procedimiento de limpieza, control de calidad, mapeo contra el genoma de referencia *Mus musculus* (assembly GRCm38.p6), se determinó el listado de genes diferencialmente expresados, utilizando la herramienta DESeq 2 Bioconductor del paquete estadístico R comparando el número de genes diferencialmente expresados del día 3 vs 14, 28 y 60.

Para determinar la expresión diferencial de genes a los diferentes días PI en ratones infectados con las dos cepas de estudio, se comparó el listado de genes obtenido para cada uno de los días usando como control el día 3 PI, este proceso se realizó tanto para los genes sobreexpresados como para los genes con expresión negativa.

En la **Figura 1-17 A** se observan los resultados del número de genes sobreexpresados en ratones infectados con 323 Beijing-Like y en la **Figura 1-17 B**, se observan los genes con expresión negativa para ratones infectados con la misma cepa. En cuanto a los genes sobreexpresados se obtuvo que al Día 14 PI se sobreexpresaron 98 genes, al día 3 PI se sobreexpresaron 602 genes y al día 28 PI se

sobreexpresaron 138 genes, se compartió la expresión de un grupo de 349 genes entre los días 3 y 14 PI. En cuanto a los genes con expresión negativa en ratones infectados con 323 Beijing-Like se obtuvo que al día 3 PI no hubo genes diferencialmente expresados, al día 14 se obtuvieron 129 genes con expresión negativa, al día 28 PI 147 genes con expresión negativa y entre los días 14 y 28 PI se compartió la expresión de 473 genes regulados negativamente.

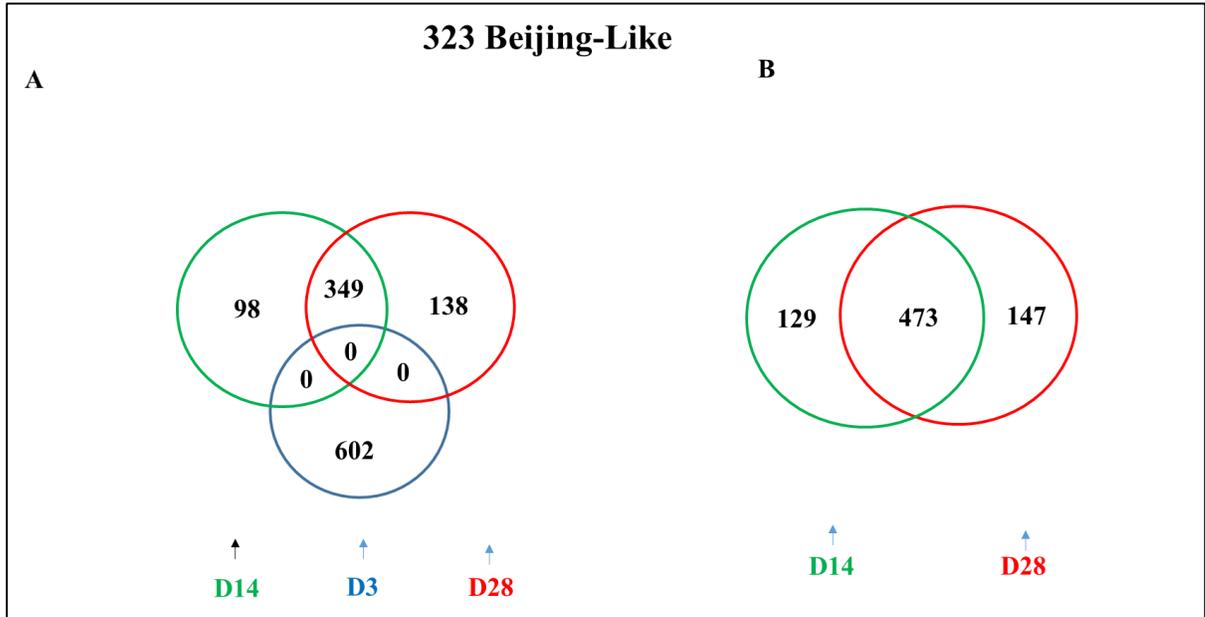


Figura 1- 17. Representación global de la expresión diferencial de genes en pulmones infectados con 323 Beijing-Like a los días 3, 14 y 28 PI. **A)** Genes sobreexpresados. **B)** Genes expresados negativamente

En cuanto a los ratones infectados con la cepa 391 Beijing-Clásico, se obtuvo que se sobreexpresaron 150 genes al día 14 PI, 102 genes al día 28 PI y 395 genes al día 60 PI; entre los días 14 y 28 PI se compartió la expresión de un conjunto de 339 genes. Con respecto a los genes con expresión negativa se obtuvo que al día 14 PI se expresaron negativamente 97 genes, al día 28 se expresaron negativamente 137 genes y al día 60 PI se expresaron negativamente 468 genes; entre el día 14 y el día 28 PI se compartió la expresión negativa de 188 genes (**Figura 1-18**).

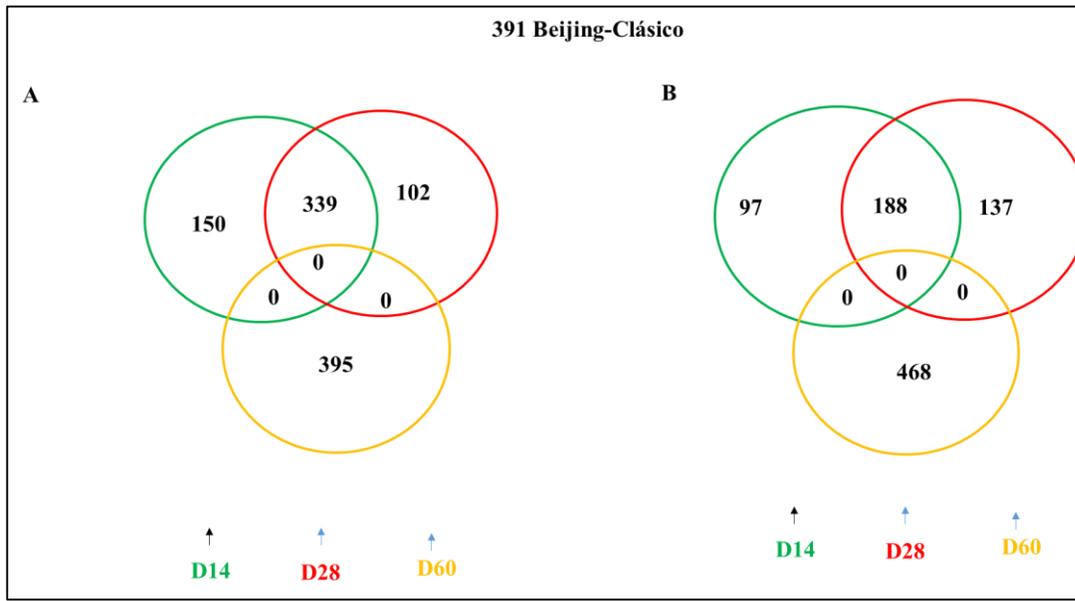


Figura 1- 18. Representación global de la expresión diferencial de genes en pulmones infectados con 391 Beijing-Clásico los días 14, 28 y 60 PI. **A)** Genes sobreexpresados. **B)** Genes expresados negativamente

Posterior a la obtención del listado de genes diferencialmente expresados, se realizaron análisis de enriquecimiento funcional del listado de genes obtenido usando los repositorios Gene Ontology (GO), la cual es una base de datos de conocimientos biológicos que permite describir la función de los genes y los productos de los mismos, además permite ubicar ontológicamente la información genética de acuerdo a su función molecular, su participación en procesos biológicos y su localización dentro de las células. Permite establecer una relación jerárquica entre las relaciones de los genes a través de nodos, en donde a medida que avanza la clasificación jerárquica, los genes hijos van a tener funciones cada vez más especializadas y por último permite hacer la anotación genética en términos ontológicos. Un análisis adicional se realizó en el repositorio KEGG en el que se indaga sobre las vías metabólicas en las que están involucrados los genes diferencialmente expresados a través de una jerarquía de rutas metabólicas y establece la ruta de dichas vías hasta la participación de los productos génicos (proteínas).

Para 323 Beijing-Like, el análisis de enriquecimiento en KEGG al día 3 PI mostró genes involucrados en la presentación y procesamiento de antígeno, asociados a funciones fagosomales, genes involucrados en la respuesta a la infección por *Staphylococcus aureus*, asma y rechazo de transplantes principalmente (**Figura 1-19 A**). Adicionalmente, el análisis de sobrerrepresentación en GO (límite significativo 1,3) evidenció genes relacionados con respuesta inmune incluyendo complejos proteicos asociados a MHC-II, genes asociados a la respuesta celular a interferones de tipo I y II (IFN- γ e IFN- β), esta respuesta es predecible ante la infección de patógenos intracelulares (**Figura 1-19 B**).

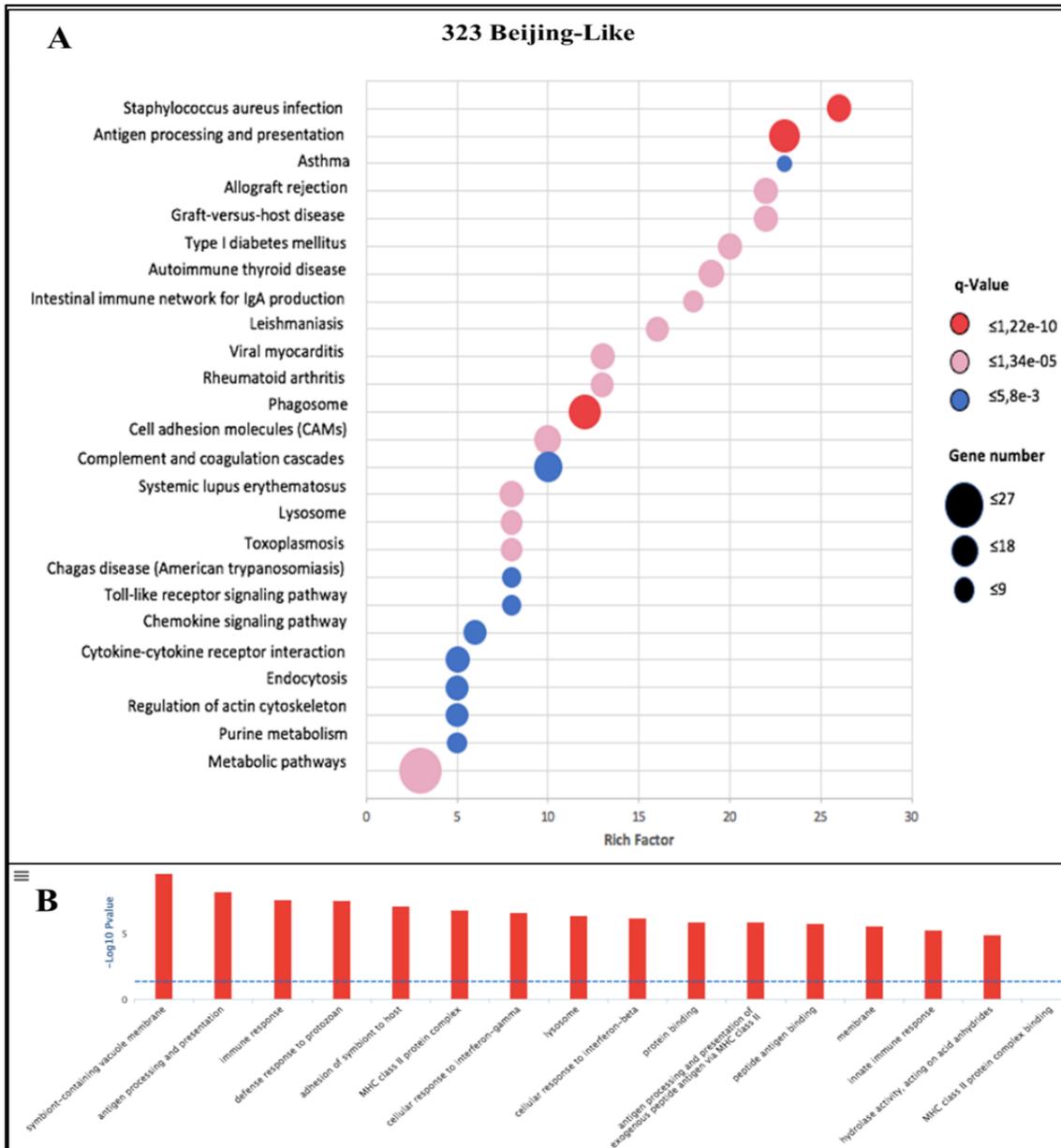


Figura 1- 19. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 323 Beijing-Like comparando el día 3 PI vs día 14 PI. A) Cada círculo en la gráfica representa una vía metabólica KEGG, en el eje Y se encuentra el nombre de cada vía y el factor de enriquecimiento se indica en el eje X. 1 factor de enriquecimiento es la proporción del número de genes diferencialmente expresados anotados en cada vía en relación con la proporción de todos los genes mencionados en la misma vía. Un factor de enriquecimiento más alto significa un enriquecimiento más significativo de los genes diferencialmente expresados en una vía determinada. El color del círculo representa el valor q , que se obtuvo a partir del valor de P ajustado después de múltiples pruebas de hipótesis, que van de 0 a 1. Un valor q más pequeño indicó una mayor confiabilidad de la importancia del enriquecimiento de genes diferencialmente expresados en cada vía. Los tamaños de los círculos representan el número de genes enriquecidos. B) Representación del análisis de enriquecimiento en ratones infectados con 323 Beijing-like al día 3 PI. El umbral representa 1.3 B-H del valor de p ajustado, el cual se calculó de la distribución hipergeométrica. Las barras más largas representan una proporción más grande de genes enriquecidos en una vía específica.

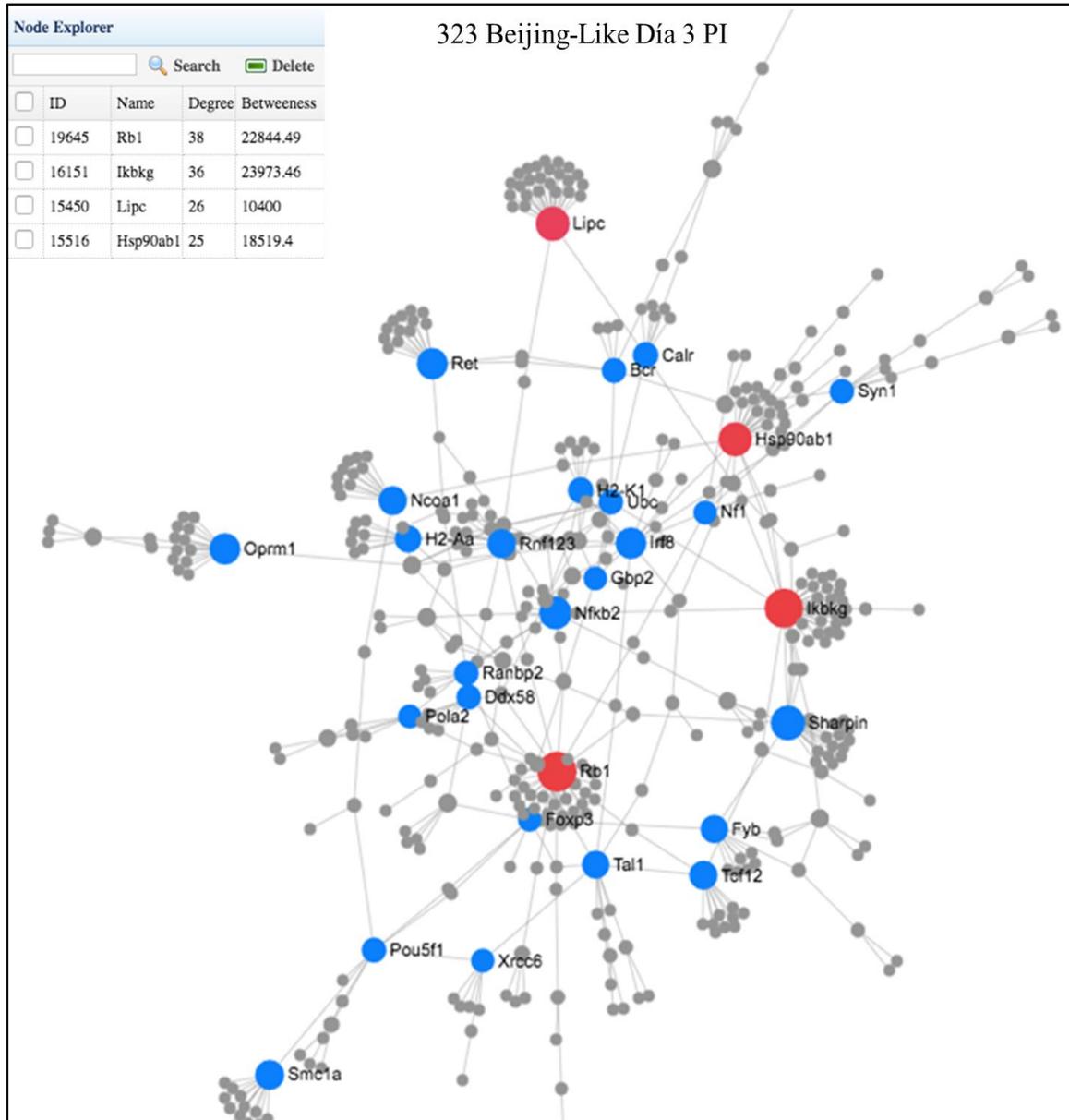


Figura 1- 20. Análisis de redes de interacción génica en ratones infectados con 323 Beijing-Like al día 3 PI. Las interacciones proteína-proteína se realizaron usando la herramienta Networkanalyst en la plataforma InnateDB. Esta red se construyó con los genes sobre-regulados al día 3 PI. Los círculos representan los nodos (genes) y las líneas representan las interacciones entre los nodos (genes). El grado de un nodo, es el número de conexiones que tiene con otros nodos. Los nodos con más alto grado actúan como ejes importantes en la red. La intermediación “Betweenness” mide el número de rutas más cortas que atraviesan el nodo. Las notas con mayor intermediación actúan como importantes cuellos de botella en la red. Los círculos rojos resaltan los 4 nodos principales en nivel e intermediación.

Un análisis adicional se realizó utilizando la plataforma innateDB. Esta es una base de datos pública de genes y proteínas con evidencia experimental que permite indagar sobre las vías de señalización involucradas en la respuesta inmune innata en humanos, murinos y bovinos ante la infección con microorganismos patógenos; a partir de los análisis de enriquecimiento, los datos se analizaron usando la herramienta Networkanalyst mostrando grandes nodos de interacción génica, involucrando

vías de señalización asociadas a respuesta inmune, con el predominio de respuesta inflamatoria, específicamente los genes *Ikbkg* y *Hsp90*. El gen más expresado al día 3 PI con 323 Beijing-Like fue el gene *Tnfrsf8* (Fold change: 7.79) el cual es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, el segundo gen más sobre expresado fue la quimioquina *CXCL9* (Fold change:7.7), involucrada en el crecimiento, movimiento y activación de la respuesta inmune pro-inflamatoria de las células e implicado directamente en la formación de granulomas en infecciones por *Mtb*. Otros genes sobreexpresados que codifican para quimioquinas fueron *CCL3* (Proteína inflamatoria de macrófagos 1 *MIP-1α*), *CCL4*, *CXCL16* e 7 (*IL-7*), todos involucrados en respuesta inmune pro-inflamatoria, como se espera en las fases iniciales de infección por *Mtb*. Otro gen sobreexpresado es *SHARPIN*, cuya función es la inducción en la producción de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a la activación de los TLRs en macrófagos y es requerida en la activación óptima del inflamasoma NLRP (**Figura 1-20**).

Al día 14 PI las vías metabólicas más enriquecidas fueron: Biosíntesis de Aminoacil-tRNA, fosforilación oxidativa, VEGF, vías de señalización de calcio y vías de señalización de MAPK (**Figura 1-21 A**). Por otra parte, los análisis en GO mostraron genes relacionados con la unión de proteínas, actividad mitocondrial, remodelación de vasos sanguíneos y actividad esfingosina kinasa (**Figura 1-21 B**). La interacción proteína-proteína analizada con networkanalyst mostró genes involucrados en la respuesta inmune en nodos de interacción; por ejemplo, el gen *FYN* (Fold change: 1.09) que codifica para una tirosin-kinasa asociada a membrana implicada en el control del crecimiento celular y al control de la función de la IL-16 (**Figura 1-22**).

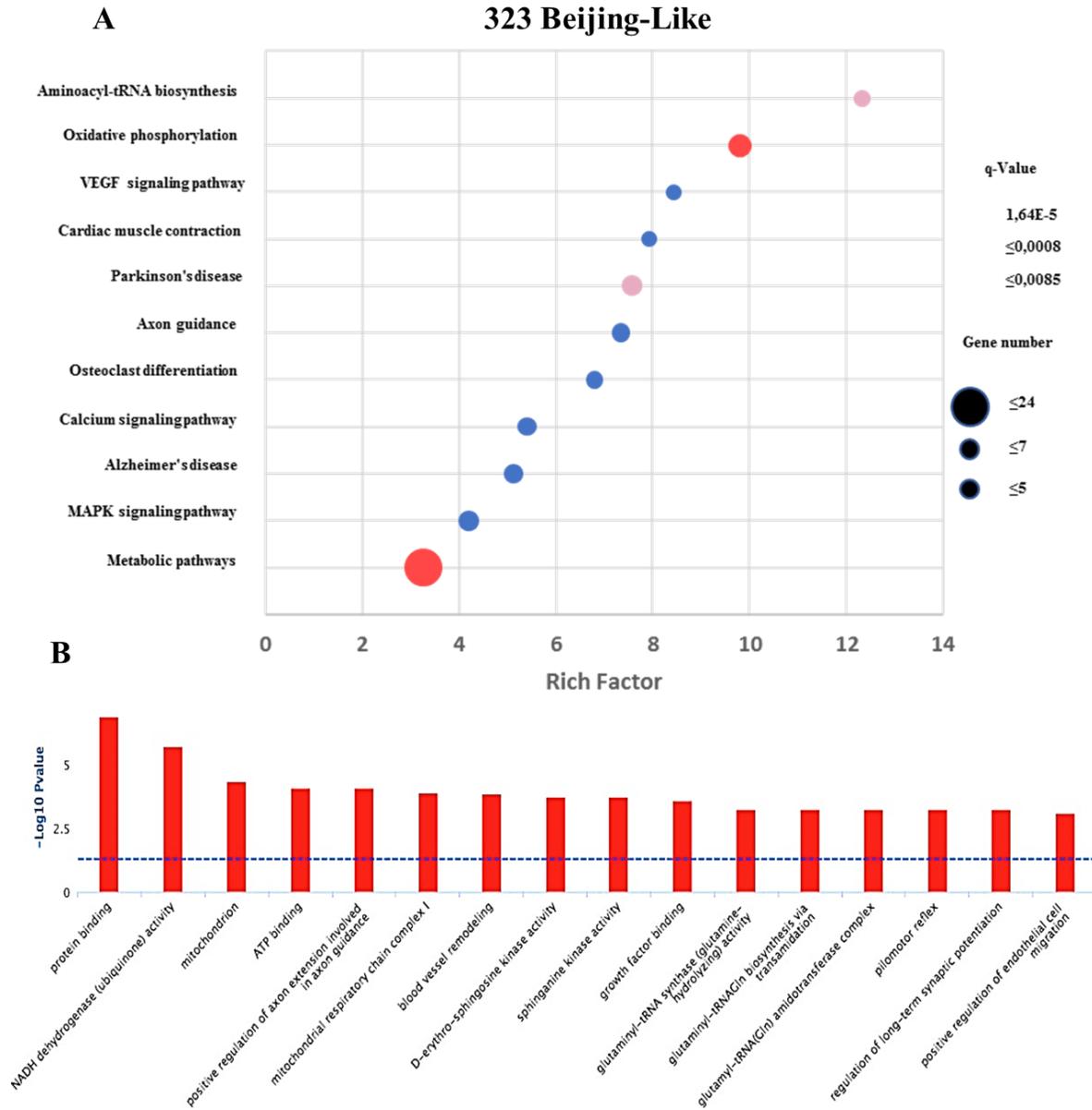


Figura 1- 21. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 323 Beijing-Like comparando el día 14 PI vs día 3 PI. **A)** Los elementos enriquecidos en la vía KEGG se midieron mediante el factor de enriquecimiento, el valor q y el número de genes, como se menciona en las figuras 26 y 27. Se enriquecieron diferentes vías el día 14 frente al 3. **B)** Enriquecimiento en GO en ratones infectados con 323 Beijing-Like día 14 PI.

Otro importante centro de interacción es el gen *Smarca2*, el cual está involucrado en la activación transcripcional y la activación y represión de genes seleccionados para la remodelación de la cromatina (Alteraciones en la topología del DNA).

El gen *Fyn* es miembro de la familia de oncogenes de la protein-tirosin-kinasa que codifica para una proteína-kinasa asociada a membrana celular implicada en el control del crecimiento celular y está

relacionada con diversas vías de señalización en respuesta inmune como la vía de señalización de IFN- γ , media eventos de señalización de IL-12, señalización en receptor de células T, señalización del receptor de RGF- β y TRAIL (Miembro de la superfamilia TNF) (**Figura 1-22, Tabla 1-14**).

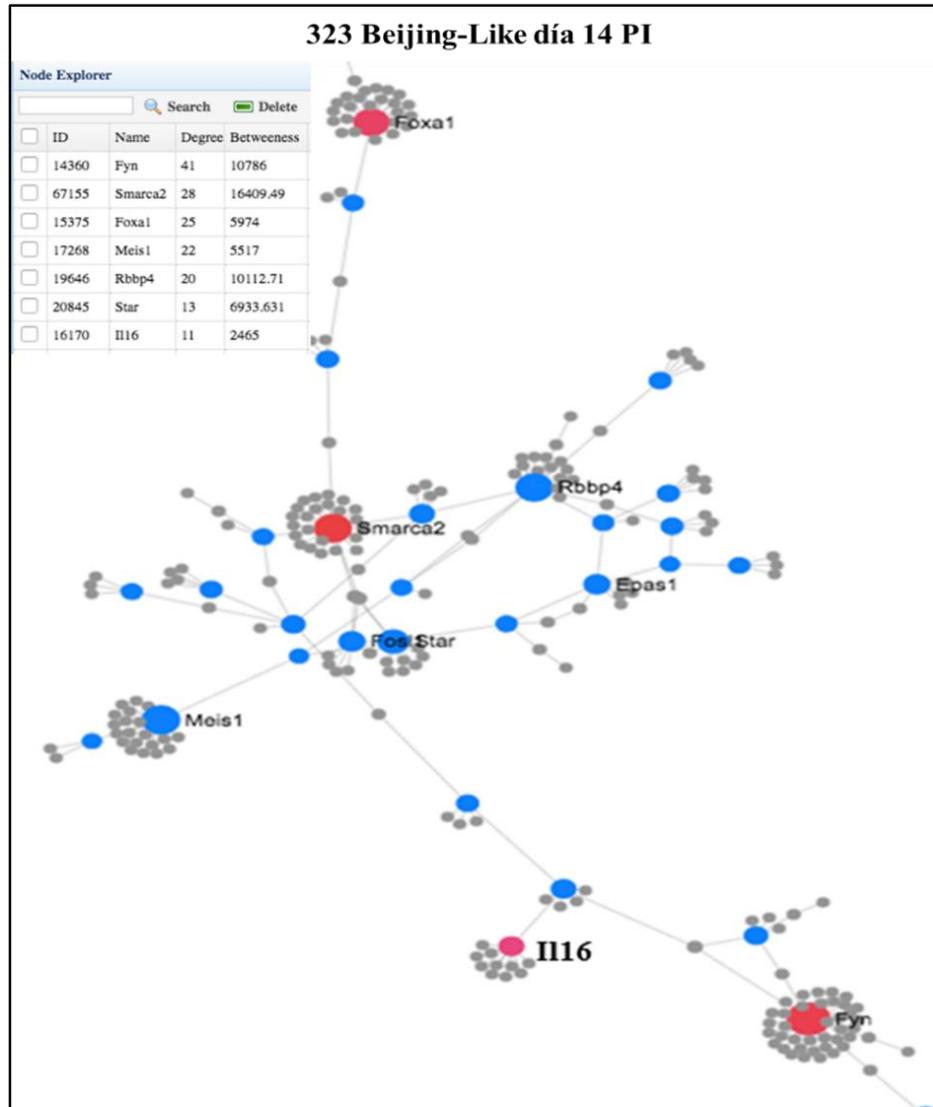


Figura 1- 22. Análisis de redes de interacción génica en ratones infectados con 323 Beijing-Like al día 14 PI

También se encontró sobreexpresado el gen *Spkh2* (Fold change: 1.3) (**Tabla 1-14**) que codifica para una esfingosina kinasa responsable de suprimir la inflamación y la activación de los macrófagos. También se sobreexpresaron los genes *Cacna1c* and *Rras2*, relacionados con la señalización del calcio y de las MAPK que están implicados en el silenciamiento de la respuesta inflamatoria durante la infección con *Mtb*, sugiriendo que a estas alturas de la cinética de infección se está produciendo un cambio en la regulación de la respuesta inmune, polarizando la respuesta hacia una de tipo anti-inflamatoria no protectora que puede estar favoreciendo el rápido progreso de la enfermedad en los animales.

Tabla 1- 14. Genes diferencialmente expresados a los 14 días PI en pulmones de ratones infectados con 323-Beijing-Like.

Entrez ID	Name	Biotype	Description	Log FC	p-value
17739	TrnP	tRNA	tRNA proline, mitochondrial	0,66	0,0008
17977	Ncoa1	Protein	Nuclear receptor coactivator	0,44	0,0199
23874	Farsb	tRNA	Phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit	0,48	0,0077
55936	Ctps2	Protein	Cytidine 5'-triphosphate synthase	1,27	0,0000
56632	Sphk2	Protein	Sphingosine kinase 2	0,88	0,0000
69721	Nkiras1	Protein	NFKB inhibitor interactions	0,46	0,0022
71056	4933405E24Rik	ncRNA	Non coding RNA	0,40	0,0077
74453	Cfap53	Protein	Cilia and flagella associated protein 53	0,52	0,0004
75138	4930526L06Rik	ncRNA	Non coding RNA	0,84	0,0000
75388	Boll	Protein	Boule homolog, RNA binding protein	0,52	0,0102
75784	Cfap299	Protein	Cilia and flagella associated protein 299	0,55	0,0054
75888	4930573H18Rik	ncRNA	RIKEN cDNA 4930573H18	0,74	0,0000
76933	Ifi272a	Protein	Interferon alpha-inducible protein 27 like 2A	0,55	0,0004
330401	Tmcc1	Protein	Transmembrane and coiled coil domains 1	0,43	0,0030
664942	Gm13858	Predicted gene	Cancer susceptibility candidate 4 pseudogene	0,48	0,0040
668253	Dleu2	lncRNA	Long non coding RNA	0,42	0,0069
100504464	E230016K23Rik	lncRNA	Long non coding RNA	0,72	0,0000
102632404	Gm15396	lncRNA	Long non coding RNA	0,30	0,0062
102635296	Gm32673	lncRNA	Long non coding RNA	0,60	0,0027
102636584	Gm32673	lncRNA	Long non coding RNA	0,42	0,0061
108167382	LOC108167382	lncRNA	Long non coding RNA	0,85	0,0093

Después de un mes de infección (día 28 PI) y del marcado deterioro en el estado de salud de los animales, se encontró un número menor de vías de señalización activadas que el día 14 PI, al día 28 algunas de las vías enriquecidas se compartieron en esta etapa de la infección, lo que indica que hubo un ligero cambio en la respuesta del animal (**Figura 1-23 A**). Una de las vías que permanecieron activadas fue la de las MAPK, la sobreexpresión de supresores inmunes *MAPK7* and *MAPK12* que sugieren una respuesta anti-inflamatoria sostenida.

Los análisis de enriquecimiento ontológico mostraron un perfil genético similar entre los días 14 y 28 PI, el perfil genético en esta etapa de la enfermedad está relacionado con la unión de proteínas, la actividad mitocondrial y el remodelamiento de los vasos sanguíneos. En este caso, no hubo actividad de la esfingosina-kinasa, indicando un cambio hacia una respuesta pro-inflamatoria (**Figura 1-23 B**).

323 Beijing-Like

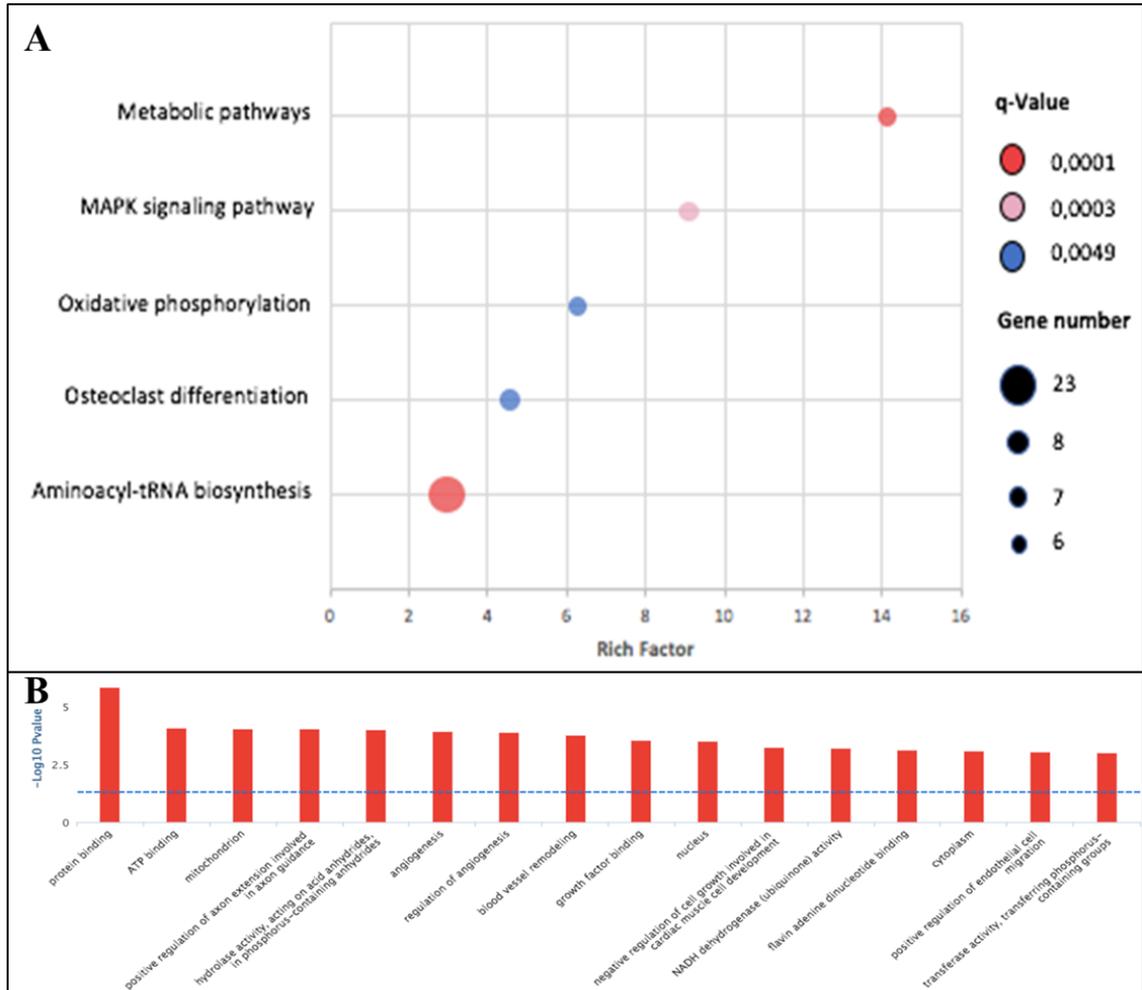


Figura 1- 23. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 323 Beijing-Like al día 28 vs día 3 PI. A) Los elementos enriquecidos en la vía KEGG se midieron mediante el factor de enriquecimiento, el valor q y el número de genes, como se menciona en las figuras 26 y 27. Se enriquecieron diferentes vías el día 28 frente al día 3 PI. B) Enriquecimiento en GO en ratones infectados con 323 Beijing-líke día 28 PI

Los genes con mayores interconexiones en el análisis en Networkanalyst al día 28 PI fueron *Fyn* and *Smarca2* los cuales están involucrados con hipertensión arterial pulmonar (**Figura 1-24**).

En síntesis, estos resultados indican que al inicio de la enfermedad de los animales infectados con 323 Beijing-Like (día 3 PI) se produce una fuerte expresión de genes involucrados en respuesta inmune pro-inflamatoria, la cual disminuye hacia el día 14 PI y posteriormente se reactiva hacia el mes PI. Esta evolución en la respuesta inflamatoria puede estar inducida por el mantenimiento en la vía de señalización de MAPK y por la pérdida en la actividad de la esfingosina-kinasa. Este perfil

de expresión coexiste con la inflamación pulmonar extensiva y las altas cargas bacilares cuyo desenlace final es la muerte prematura de los animales.

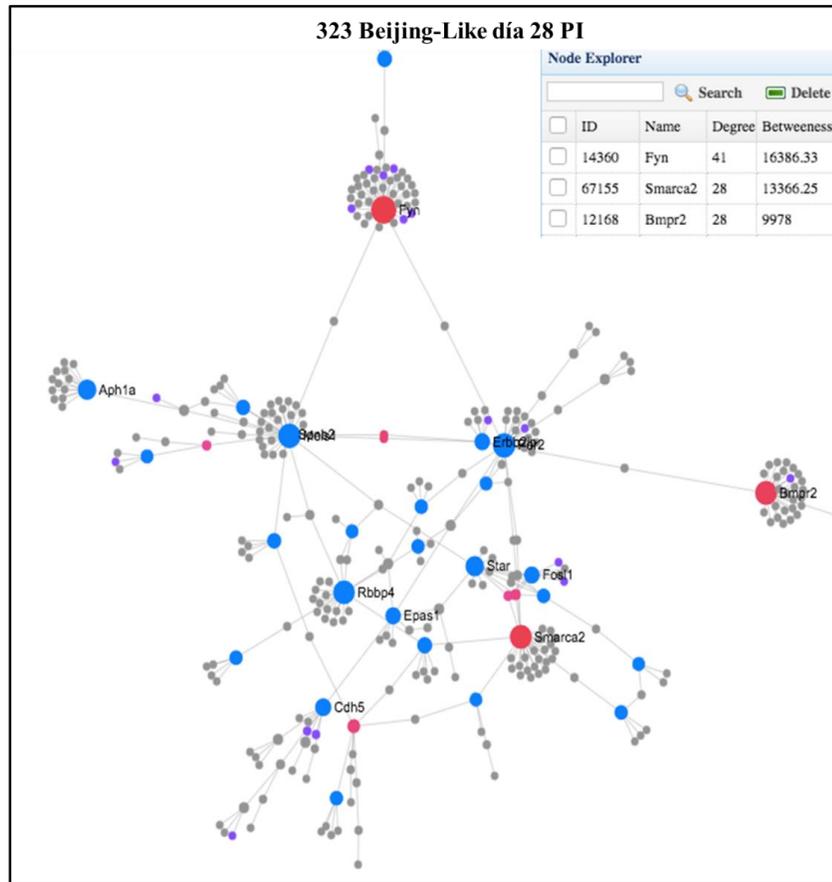


Figura 1- 24. Análisis de redes de interacción génica en ratones infectados con 323 Beijing-Like al día 28 PI

Los ratones infectados con 391 Beijing-Clásico, desarrollaron una enfermedad de curso más crónico, logrando sobrevivir hasta el día 60 PI, por lo que además del día 3, 14 y 28 PI, se secuenciaron los pulmones de tres animales al día 60 PI. Los análisis de enriquecimiento en KEGG revelaron que los genes sobreexpresados estuvieron involucrados en la presentación y procesamiento de antígeno, en la respuesta a la infección por *Staphylococcus aureus*, asma y rechazo a trasplantes. Los análisis de enriquecimiento observados con esta cepa en la fase temprana de la enfermedad son muy similares a los de 323 Beijing-Like (**Figura 1-25 A**). Los análisis en GO también mostraron un perfil de expresión génica muy similar relacionado con la respuesta inmune entre ambos aislamientos clínicos (**Figura 1-25 B**).

De nuevo en el análisis de redes biológicas se observó la sobreexpresión de genes muy similares formando parte de los nodos superiores de interacción, mostrando a *Ikbkg* and *Hsp90ab1* como los genes más significativamente involucrados en la respuesta inmune. Se debe resaltar que se encontró la expresión de *SHARPIN* en ambos aislamientos clínicos cuya función principal es la inducción de la expresión de citoquinas para la activación de los TLR en los macrófagos y la óptima activación

del inflammasoma NLRP. Por otra parte, uno de los genes con más interconexiones de genes sobreexpresados es el *Nos2* que codifica para la Óxido Nítrico Sintasa 2, confirmando el perfil proinflamatorio de la respuesta (**Figura 1-26**). El perfil de quimioquinas inducido por este aislamiento es similar a 323 Beijing-Like con la sobreexpresión de *CXCL19*, *CCl4* e *IL7*.

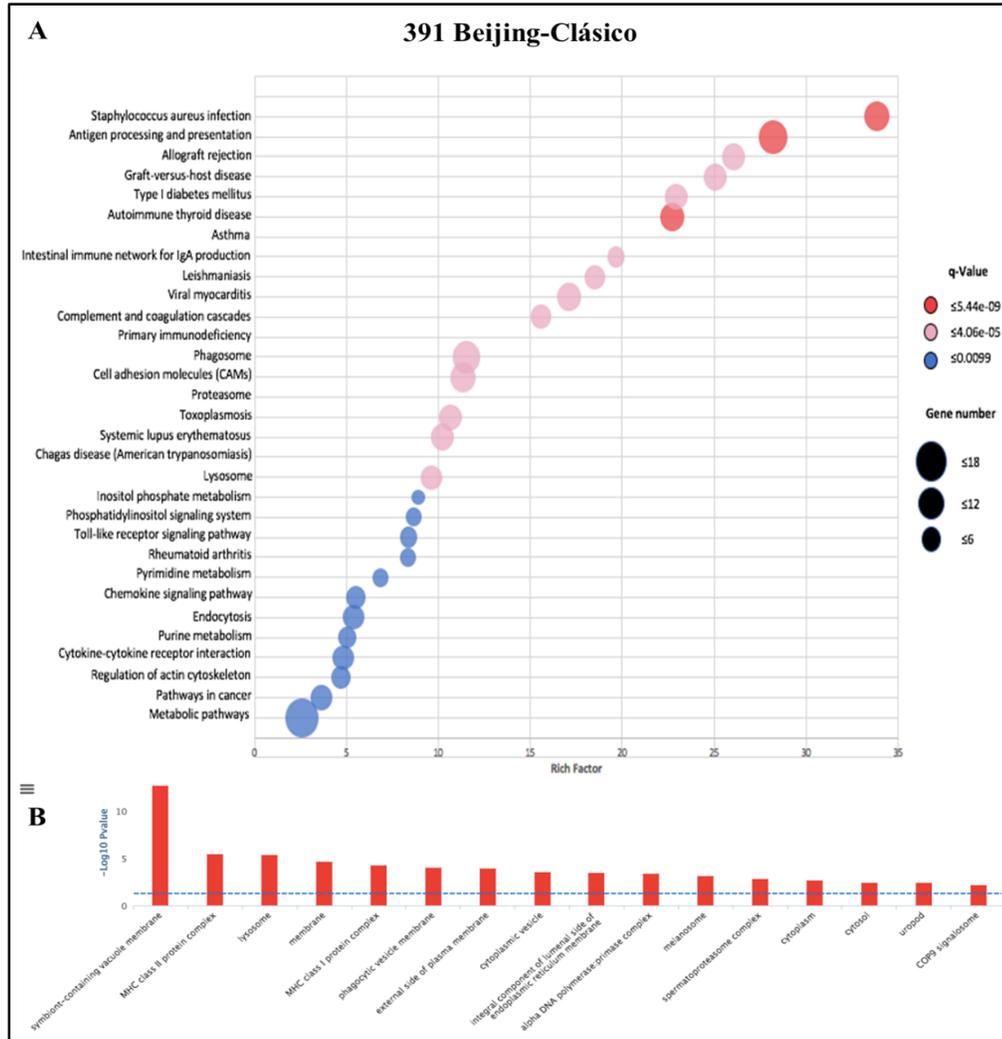


Figura 1- 25. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 391 Beijing-Clásico comparando el día 3 PI vs día 14 PI. A) Cada círculo en la gráfica representa una vía metabólica KEGG, en el eje Y se encuentra el nombre de cada vía y el factor de enriquecimiento se indica en el eje X. 1 factor de enriquecimiento es la proporción del número de genes diferencialmente expresados anotados en cada vía en relación con la proporción de todos los genes mencionados en la misma vía. Un factor de enriquecimiento más alto significa un enriquecimiento más significativo de los genes diferencialmente expresados en una vía determinada. El color del círculo representa el valor **q**, que se obtuvo a partir del valor de **P** ajustado después de múltiples pruebas de hipótesis, que van de 0 a 1. Un valor **q** más pequeño indicó una mayor confiabilidad de la importancia del enriquecimiento de genes diferencialmente expresados en cada vía. Los tamaños de los círculos representan el número de genes enriquecidos. **B) Representación del análisis de enriquecimiento en ratones infectados con 391 Beijing-**

Clásico al día 3 PI. El umbral representa 1.3 B-H del valor de p ajustado, el cual se calculó de la distribución hipergeométrica. Las barras más largas representan una proporción más grande de genes enriquecidos en una vía específica.

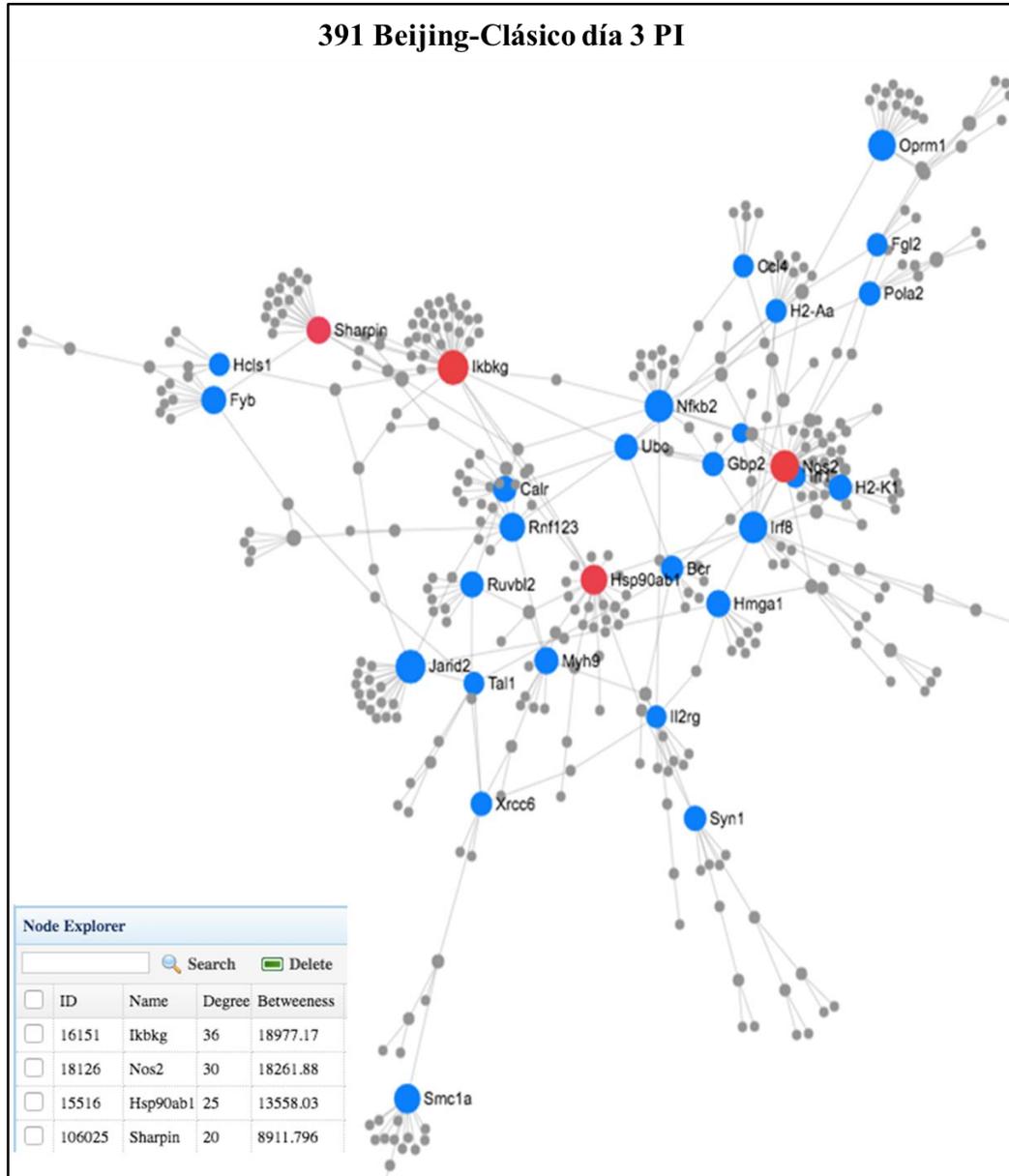


Figura 1- 26. . Análisis de redes de interacción génica en ratones infectados con 391 Beijing-Clásico al día 3 PI. Las interacciones proteína-proteína se realizaron usando la herramienta Networkanalyst en la plataforma InnateDB. Esta red se construyó con los genes sobre-regulados al día 3 PI. Los círculos representan los nodos (genes) y las líneas representan las interacciones entre los nodos (genes). El grado de un nodo, es el número de conexiones que tiene con otros nodos. Los nodos con más alto grado actúan como ejes importantes en la red. La intermediación “Betweenness” mide el número de rutas más cortas que atraviesan el nodo. Las notas con mayor intermediación actúan como importantes cuellos de botella en la red. Los círculos rojos resaltan los 4 nodos principales en nivel e intermediación.

Al día 14 PI, el análisis de enriquecimiento en KEGG mostró que los genes sobreexpresados estaban implicados a la vía del sistema renina-angiotensina, a la vía de la biosíntesis de tRNA, a la fosforilación oxidativa y a la señalización de VEGF principalmente, se encontraron genes involucradas en vías de señalización específicamente asociadas a respuesta inmune, entre ellas la vía de citotoxicidad mediada por células NK (**Figura 1-27 A**).

En los análisis en GO se obtuvo que los genes sobreexpresados estaban involucrados en vías de fosforilación oxidativa, actividad mitocondrial, el sistema renina-angiotensina, la vía de señalización VEGF y vía de señalización del receptor de LT CD4 (**Figura 1-27 B**).

La sobreexpresión de genes que provienen de la vía de señalización de citotoxicidad mediada por células NK como *Itgb2*, *RAC3*, *Kras* y *Ppp3cc* fueron detectados a las dos semanas de progreso de la enfermedad. El gen *Itgb2* codifica para una integrina que contribuye a la citotoxicidad de las células NK y además está involucrado en la capacidad de adhesión de los leucocitos y la trans migración de los mismos, entre ellos los LT y los neutrófilos, estas poblaciones celulares son claves para la formación y el mantenimiento de los granulomas. El gen *Itgb2* además promueve la trans migración de los neutrófilos durante eventos de daño tisular importante como la neumonía a través de la activación del sistema proteico PTK2B/PYK2.

391 Beijing-Clásico

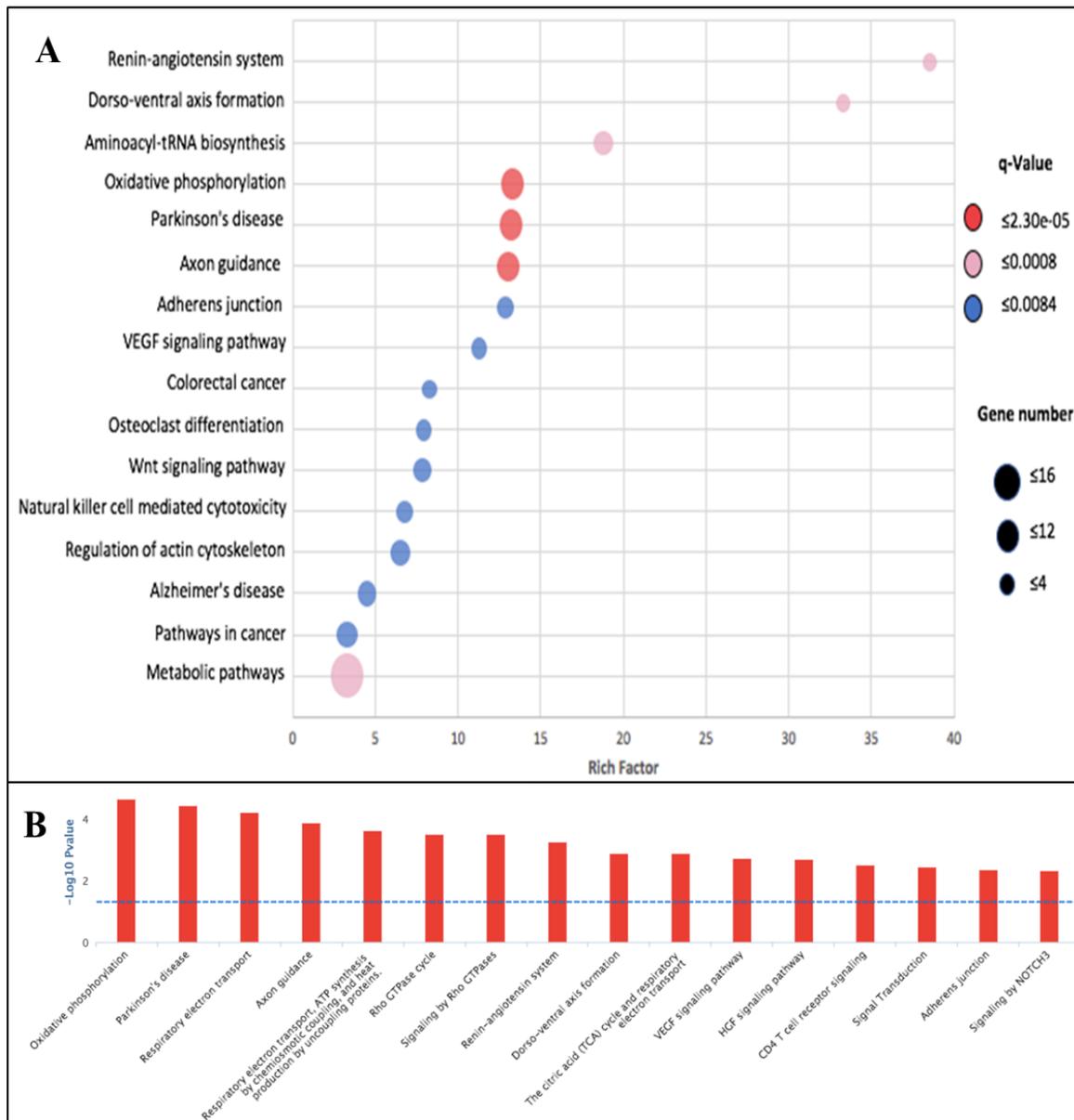


Figura 1- 27. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 391 Beijing-Clásico comparando el día 14 PI vs día 3 PI. A) Los elementos enriquecidos en la vía KEGG se midieron mediante el factor de enriquecimiento, el valor q y el número de genes, como se menciona en las figuras 26 y 27. Se enriquecieron diferentes vías el día 14 frente al 3. B) Enriquecimiento en GO en ratones infectados con 391 Beijing-clásico día 14 PI

Las interacciones proteína-proteína en NetworkAnalyst mostró que los genes *Aph1*, *Dynclil*, *Notch3* y *Gnb1* eran los más interconectados en esta red. La dineína 1 citoplasmática codificada por el gen *Dynclil* contribuye a la motilidad retrógrada intracelular de vesículas y organelos a lo largo de los microtúbulos, y *Gnb1* que es una proteína guanina heterodimérica de unión a nucleótido (Proteína

G), integra señales entre receptores y proteínas efectoras. Al día 14 PI solo se detectaron 29 genes diferencialmente sobreexpresados con respecto a 323 Beijing-Like y además llama la atención que el 48% de los genes son RNA no codificantes que no se compartieron entre las dos cepas (**Figura 1-28**).

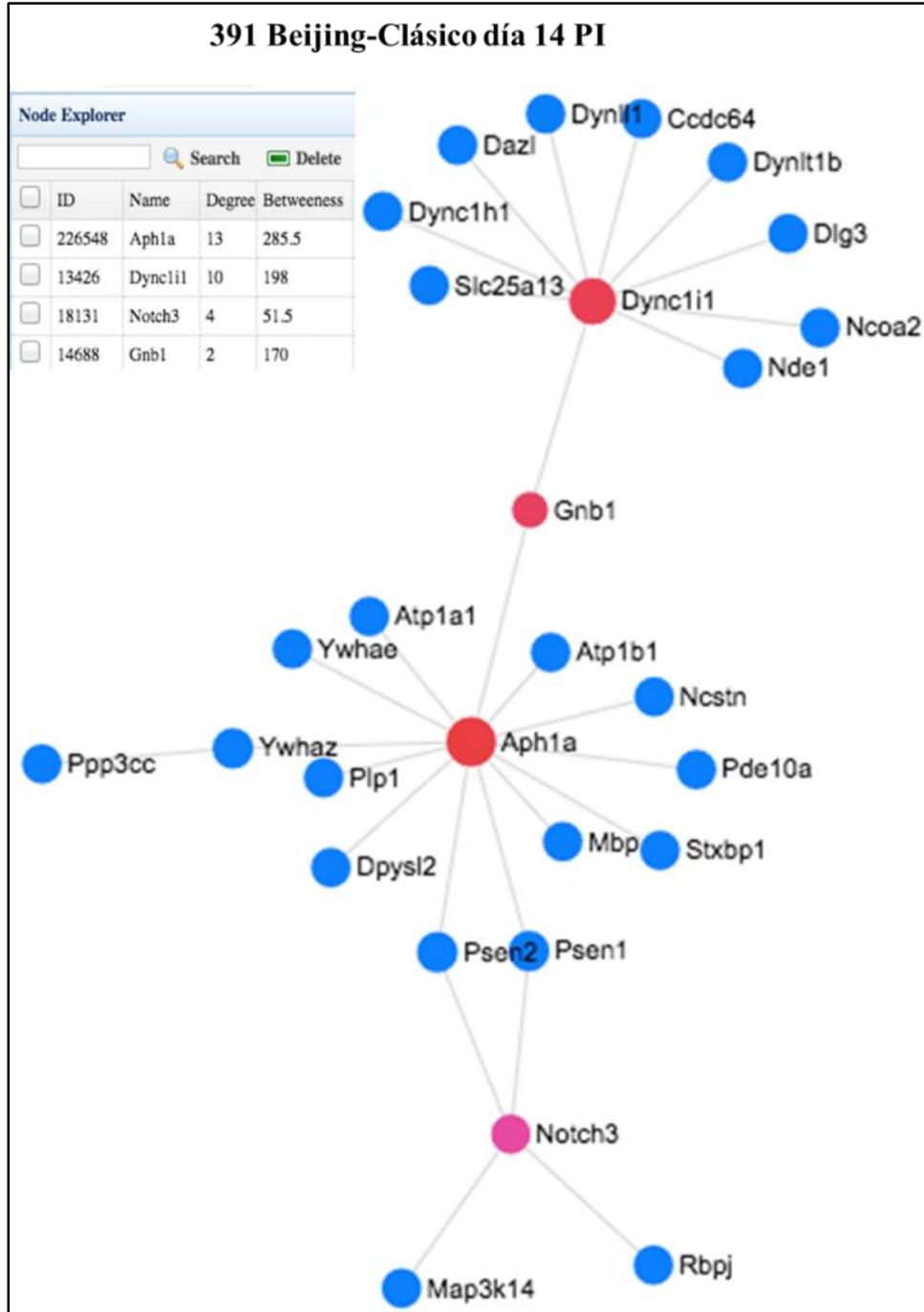


Figura 1- 28. Análisis de redes de interacción génica en ratones infectados con 391 Beijing-Clásico al día 14 PI.

Tabla 1- 15. Genes diferencialmente expresados a los 14 días PI en pulmones de ratones infectados con 391-Beijing-Clásico.

Entrez ID	Name	Biotype	Description	Log FC	p-value
15516	Hsp90ab1	Protein	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic)2C class B member 1	0,44	0,0172
16468	Jarid2	Protein	Jumonji, AT rich interactive domain 2	0,64	0,0003
16651	Sspn	Protein	Sarcospan	0,78	0,0000
21577	Tcrb	Protein	T cell receptor beta chain	0,56	0,0001
27204	Syn3	Protein	Synapsin III	0,41	0,0042
27660	1700088E04Rik	cDNA	RIKEN cDNA 1700088E04 gene	0,40	0,0102
76392	Slnf5os	lncRNA	Schlafen 5 opposite strand	0,46	0,0028
78749	Filp1	Protein	Filamin A interacting protein 1-like	0,68	0,0001
106205	Zc3h7a	Protein	Zinc finger CCCH type containing 7	0,65	0,0001
106585	Ankrd12	Protein	Ankyrin repeat domain 12	0,48	0,0038
109979	Art3	Protein	ADP -ribosyltransferase 3	0,37	0,0180
225182	Rbbp8	Protein	Retinoblastoma binding protein	0,88	0,0001
232414	Clec9a	Protein	C -type lectin domain family 9, member a	0,45	0,0168
278279	Tntc2	Protein	Transmembrane and tetratricopeptide repeat containing	0,62	0,0008
319371	D030028A08Rik	lncRNA	Long non coding RNA	0,37	0,0180
320249	D130009I18Rik	lncRNA	Long non coding RNA	0,71	0,0000
667373	Ifit1bl1	Protein	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats	0,30	0,0066
101056014	LOC101056014	misc_RNA	Long non coding RNA	0,47	0,0011
102465200	Mir6381	Micro RNA	Micro RNA 6381	0,44	0,0005
102632231	LOC102632231	lncRNA	Long non coding RNA	0,49	0,0038
102634124	Gm31785	lncRNA	Long non coding RNA	0,52	0,0003
102635265	Gm32650	lncRNA	Long non coding RNA	0,42	0,0036
102636152	Gm28068	lncRNA	Long non coding RNA	0,28	0,0151
102639821	Gm36043	lncRNA	Long non coding RNA	0,46	0,0006
102639982	LOC102639982	lncRNA	Long non coding RNA	0,41	0,0119
102640929	Gm36876	lncRNA	Long non coding RNA	0,66	0,0002
105243537	Gm39429	lncRNA	Long non coding RNA	0,57	0,0013
108167336	108167336	lncRNA	Long non coding RNA	0,52	0,0001
108168339	108168339	lncRNA	Long non coding RNA	0,69	0,0002

Los análisis de enriquecimiento en KEGG al día 28 PI con 391 Beijing-Clásico (**Figura 1-29 A**) mostró menos vías activadas que en el día 14, pero en ambos días se comparte la sobreexpresión de algunos genes y algunas nuevas vías se evidenciaron en estos análisis, tal como la vía del metabolismo de propanoato y metabolismo de triptófano. En el análisis en GO (**Figura 1-29 B**) se obtuvieron resultados similares a los observados al día 14 PI, en donde se encontraron genes involucrados en actividad mitocondrial y angiogénesis, entre las nuevas vías de señalización encontradas está una de regulación de procesos de metabolismo de lípidos. En los análisis de interacción de proteínas se encontró que los genes *Smarca2*, *Gata2*, *Rbbp4* y *Aph1* fueron los más interconectados en la red de interacción biológica.

391 Beijing-Clásico

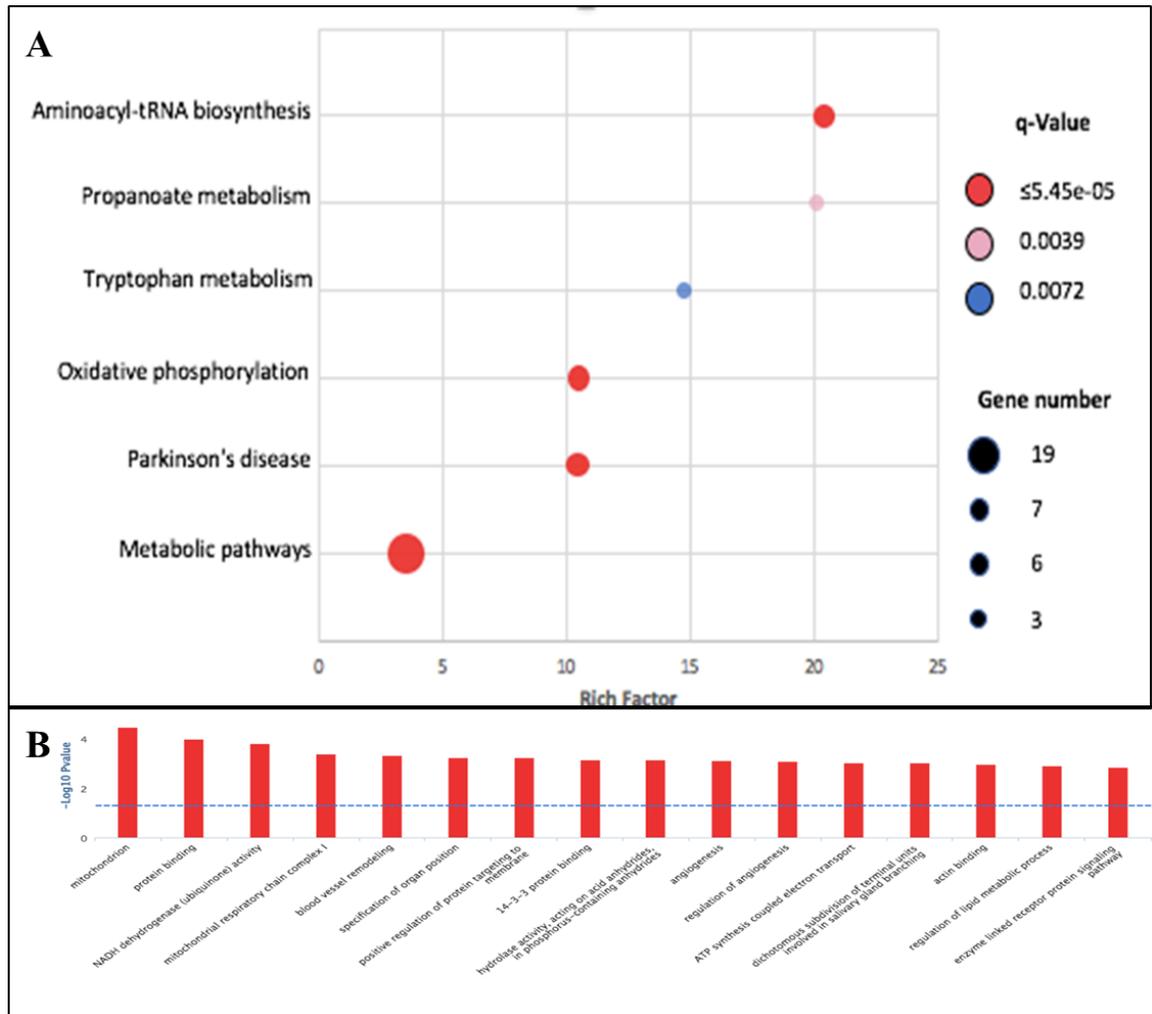


Figura 1- 29. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 391 Beijing-clásico al día 28 vs día 3 PI. A) Los elementos enriquecidos en la vía KEGG se midieron mediante el factor de enriquecimiento, el valor q y el número de genes, como se menciona en las figuras 26 y 27. Se enriquecieron diferentes vías el día 28 frente al día 3 PI. **B)** Enriquecimiento en GO en ratones infectados con 391 Beijing-clásico día 28 PI

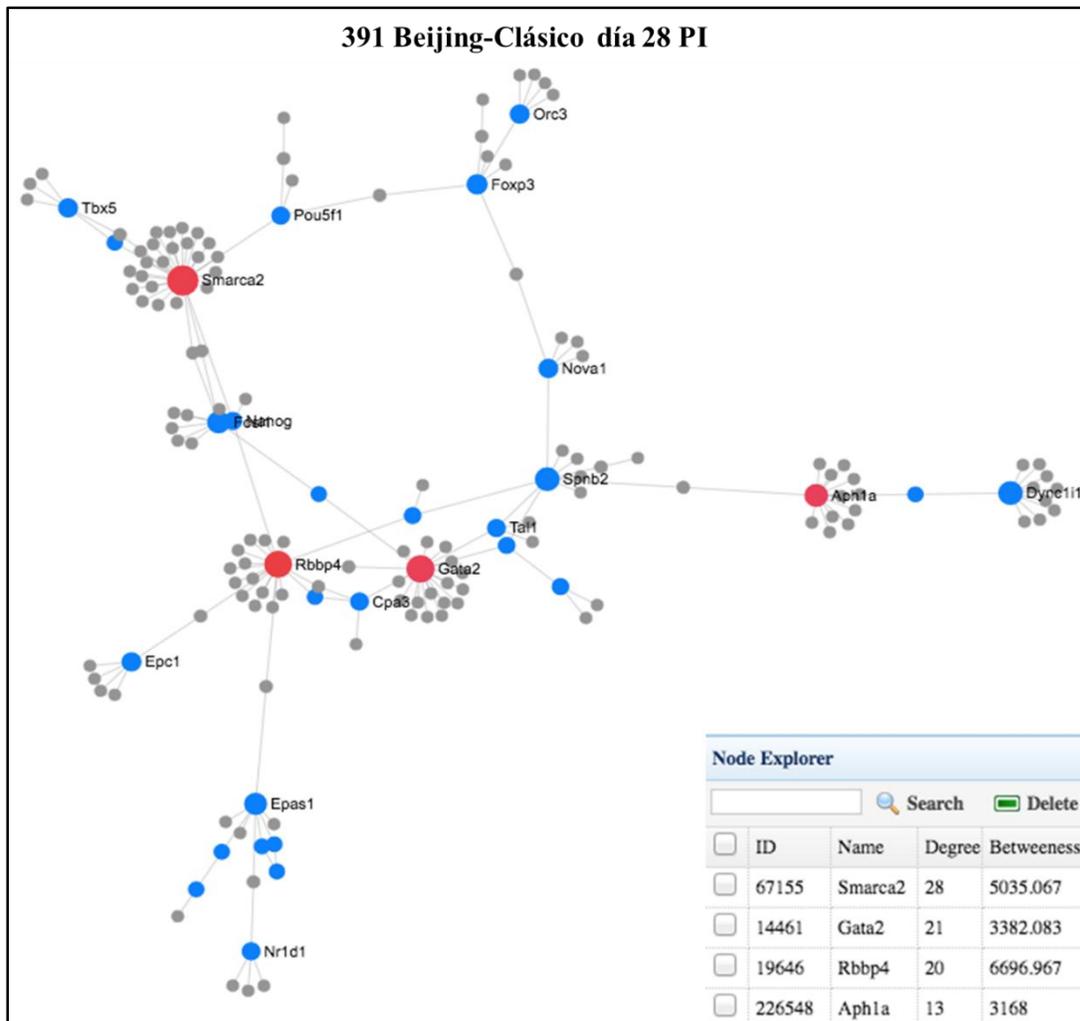


Figura 1-30. Análisis de redes de interacción génica in ratones infectados con 391 Beijing-Clásico al día 28 PI.

Por último, al día 60 PI los análisis de enriquecimiento en KEGG mostraron unas vías involucradas en la respuesta inmune de tipo inflamatoria muy similares a las encontradas al día 3 PI (**Figura 1-25** y **Figura 1-31 A y B**), entre ellas, la vía de presentación y procesamiento de antígenos, la vía de respuesta inmune a la infección por *Staphylococcus aureus*, asma y la vía de rechazo de trasplantes. Los análisis en GO y NetworkAnalyst confirmaron estos resultados, se encontraron sobreexpresados los genes *CCL4*, *IL-7* y *SHARPIN*, (**Figura 1-32**) creemos que en esta etapa de la infección y después de evidenciar un marcado daño tisular con presencia de necrosis, los animales tratan de reestablecer la respuesta inmune pro-inflamatoria que resulta ser un esfuerzo ineficiente desencadenando la muerte de los animales.

391 Beijing-Clásico

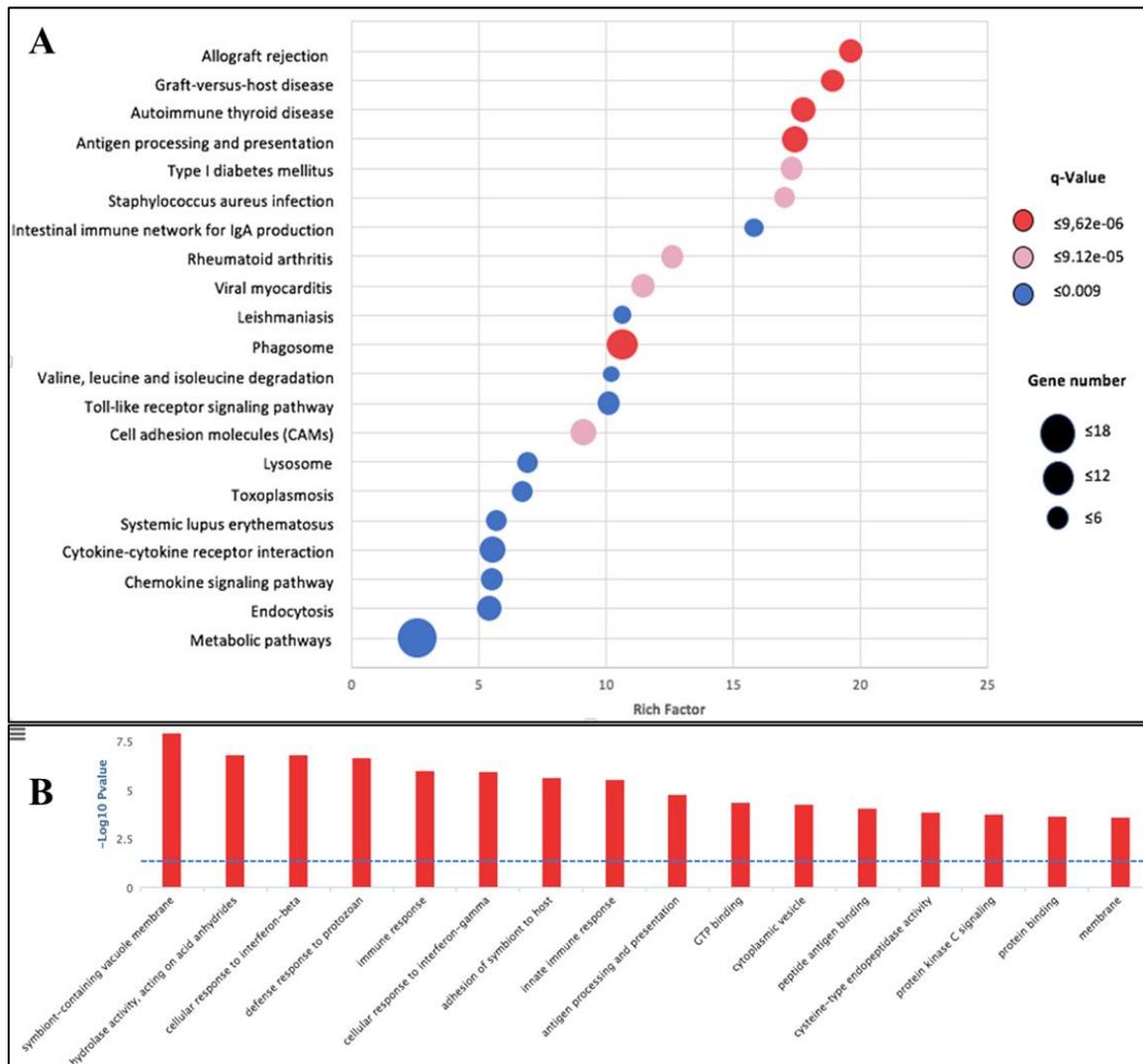


Figura 1- 31. Análisis de enriquecimiento con KEGG y GO de los genes diferencialmente expresados durante la infección con 391 Beijing-clásico al día 60 vs día 3 PI. **A)** Los elementos enriquecidos en la vía KEGG se midieron mediante el factor de enriquecimiento, el valor q y el número de genes, como se menciona en las figuras 26 y 27. Se enriquecieron diferentes vías el día 28 frente al día 3 PI. **B)** Enriquecimiento en GO en ratones infectados con 391 Beijing-clásico día 28 PI.

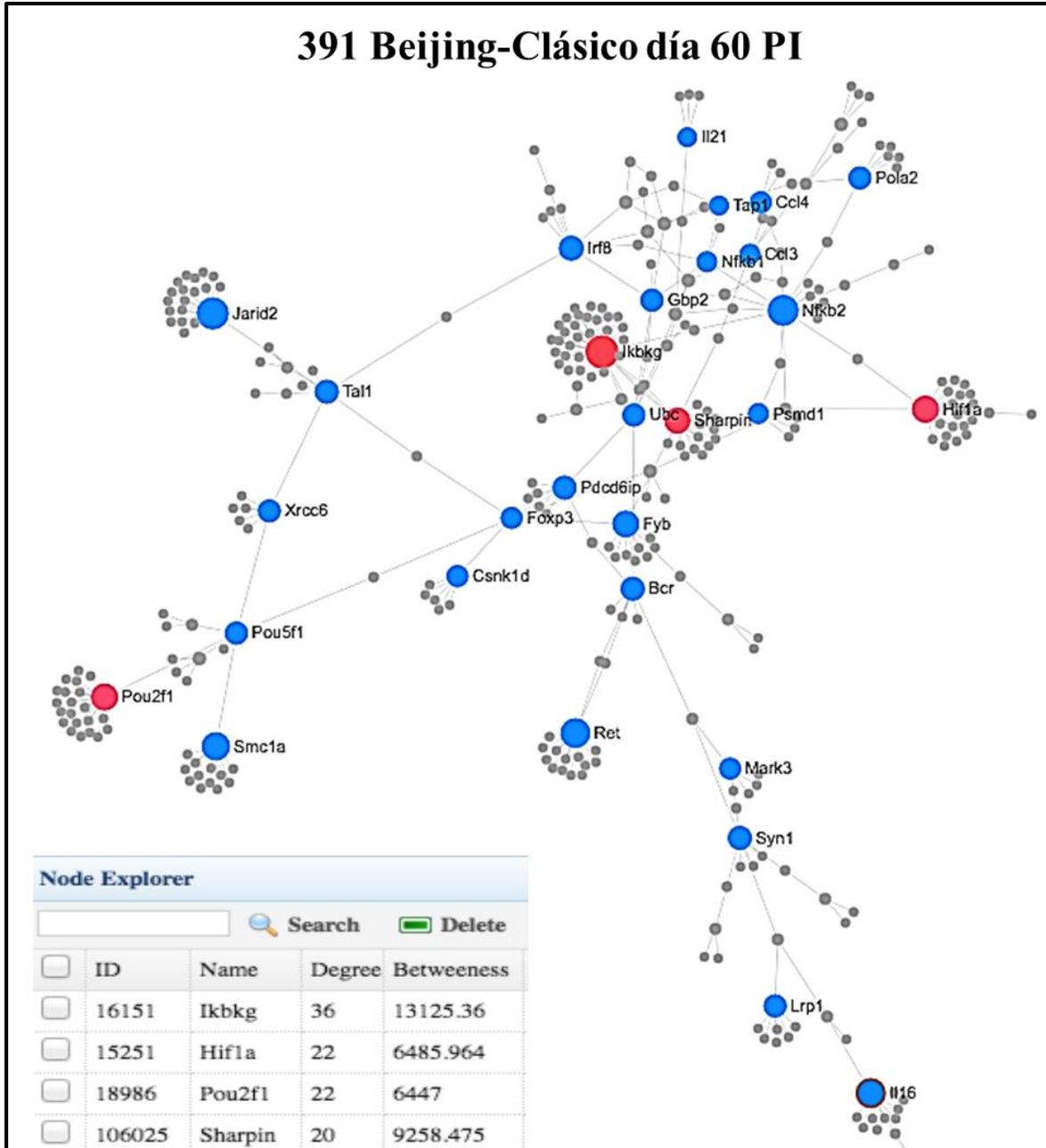


Figura 1- 32. Análisis de redes de interacción génica en ratones infectados con 391 Beijing-Clásico al día 60 PI.

En resumen, los ratones infectados con el aislamiento clínico 391 Beijing-Clásico, muestran una respuesta pro-inflamatoria al inicio de la infección, después de dos semanas, hay una activación en la vía de señalización citotóxica mediada por células NK que se apaga hacia el día 28 PI, en la última etapa de la enfermedad (día 60 PI), cambia el perfil de expresión de genes involucrados en respuesta inmune siendo de nuevo tipo pro-inflamatoria como al inicio de la infección, pero con una mayor expresión de quimioquinas que creemos permite un recrudecimiento de la enfermedad mostrando una extensiva necrosis en los pulmones y como desenlace final la muerte de los animales.

1.4. Discusión

El linaje Beijing, también conocido como linaje 2 de *Mtb*, es uno de los más prevalentes y virulentos a nivel global, lo cual ha sido demostrado en diversos estudios a partir de su identificación en pacientes de China, Mongolia, Corea del Sur y Tailandia [105]. Observaciones en diversos trabajos de investigación han demostrado que este genotipo está asociado con frecuencia a resistencia a antibióticos [168,261] y expresa factores de virulencia que le permiten evadir de forma eficiente los mecanismos inmunes del hospedador y, por lo tanto replicarse, diseminarse y transmitirse a otras persona [135]. Este genotipo también es el responsable de TB severa, de causar brotes de TB y de circular endémicamente en distintas localizaciones geográficas a nivel global. De acuerdo a una revisión hecha recientemente por Cerezo y cols., este genotipo no es frecuentemente reportado en Latinoamérica presentando una incidencia menor al 5% [163]. En Colombia, este genotipo ha sido reportado en la costa sur occidental del país desde 1998 y frecuentemente se ha encontrado asociado a resistencia a medicamentos antituberculosis, con diferentes espectros de resistencia (Monoresistencias, MDR y XDR) [163]. En Colombia, hasta el momento se conoce de la presencia de dos variantes principales del genotipo Beijing, aislamientos de SIT 190 de acuerdo a la base de datos SITVIT2 y aislamientos SIT 1, pero con un predominio marcado en la circulación del SIT 190 causando un alto grado de TB complicada y con altos índices de mortalidad [184].

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación en genómica comparativa de aislamientos clínicos Beijing aislados en Colombia, se encontró que los aislamientos clínicos de las variantes antes mencionadas presentan una alta homología mostrando diferencias solo en 18 SNPs, sin embargo estas pequeñas variaciones pueden ser las responsables de la variabilidad en el desenlace clínico de la enfermedad causada por cada genotipo y hasta variabilidad en la patología desencadenada dependiente del aislamiento bacteriano [262].

Para tener una visión inicial sobre las características de los aislamientos clínicos genotipo Beijing estudiados en este trabajo y dada la disponibilidad de un microscopio electrónico de transferencia, se tuvo la oportunidad de caracterizar fenotípicamente las bacterias en fase logarítmica de crecimiento en cultivo líquido de genotipo Beijing 323 Beijing-Like y 391 Beijing-Clásico, y se obtuvieron imágenes ultraestructurales de alta resolución de las bacterias para identificar las diferencias morfológicas entre ellas.

La primera gran impresión en el momento de comparar las morfologías de estas bacterias es que a pesar de ser altamente homólogas a nivel genómico, morfológicamente cada aislamiento clínico tiene características únicas. La primera gran diferencia evidenciada, fue la presencia de grandes vacuolas lipídicas en 323 Beijing-Like (**Figura 1-7 A, E**), las cuales en 391 (**Figura 1-8 C**) aunque están presentes no son del tamaño y frecuencia encontrada en 323.

En varios estudios se ha determinado que Mtb utiliza los lípidos para su metabolismo encaminado a la obtención de energía, a partir de diversas fuentes de carbono siendo los triacilgliceroles los componentes principales de las inclusiones intracelulares de tipo lipídico encontrados en Mtb, se cree además que la acumulación de grandes vacuolas lipídicas se asocia con persistencia (latencia) por la disponibilidad de fuentes de energía almacenada, resistencia o tolerancia a antibióticos, formación de lesiones con cavitación, ineficacia en los tratamientos y por ende, enfermedad complicada en los pacientes [263]. Es posible entonces que la capacidad de almacenar grandes cantidades de lípidos le permita a la bacteria detener su crecimiento e influir en la pérdida de las actividades antimicrobianas de los macrófagos espumosos dando lugar a infecciones complicadas [264,265].

Como se mencionó previamente, 323 Beijing-Like, se caracteriza por estar asociada a diferentes grados de resistencia a antibióticos, causar TB complicada y ocasionar la muerte de las personas de las que este genotipo bacteriano se aísla; entonces, la característica morfológica de esta bacteria y su capacidad de acumular grandes almacenes intracelulares lipídicos y su posible asociación a virulencia, concuerda con los antecedentes patogénicos de esta cepa. En 391-Beijing Clásico, también se evidenció la presencia de vacuolas lipídicas pero de menor tamaño y en menor frecuencia, como discutiremos más adelante, esta bacteria también mostró un fenotipo altamente virulento, y la presencia de estas inclusiones puede estar asociada a su capacidad de causar enfermedad complicada pero de curso más crónico.

Aunque H37Rv es considerada la cepa virulenta de referencia, llama la atención que en las fotografías analizadas no se observó la presencia de estas inclusiones intracitoplasmáticas, a pesar de estar en fase logarítmica de crecimiento, observación que también fue realizada previamente [260].

Vijay y cols, analizaron por MET esputos positivos para BAAR y posteriormente aislaron estas bacterias en cultivo líquido; en las muestras de esputo encontrando la presencia de inclusiones lipídicas las cuales aumentaron en tamaño y número al analizar las bacterias en fase log de crecimiento, lo cual es una observación concordante con lo encontrado con 323 Beijing-Like, además observó que al someter las bacterias en cultivo a condiciones de estrés oxidativo por medio de la adición de peróxido de hidrógeno a una concentración progresiva entre 21 y 210 mM y al agregar cantidades subinhibitorias de H a los cultivos, las bacterias incrementaron la capacidad de almacenar lípidos [260], sugiriendo que la presión selectiva con antibióticos les permite realizar a las bacterias estos procesos de acumulación lipídica como mecanismo de persistencia y supervivencia [266].

En general, Mtb interactúa estrechamente con las células y efectores inmunes del hospedador a lo largo de las fases de la enfermedad, en varios estudios se ha evidenciado que Mtb interviene en la formación de los macrófagos espumosos aparentemente mediada por los ácidos grasos de cadena larga (ácidos micólicos), los cuales desencadenan la diferenciación de los monocitos a macrófagos espumosos, al final, las bacterias engolfadas por estos macrófagos acumulan lípidos dentro del

citoplasma, permitiéndole a la bacteria persistir y modular la respuesta de las células del hospedador [263].

En bacterias de genotipo Beijing, se ha evidenciado su habilidad de almacenar lípidos del tipo triacilglicéridos cuando estas se encuentran en cultivo, Reed y cols, encontraron que esta alta capacidad de almacenamiento de triacilglicéridos se presentó a la vez que se sobreexpresó el miembro del regulón DosR o regulón de dormancia Rv3130c, el cual le permite a estas bacterias crecer en ambientes anaeróbicos o microaerófilos y su actividad transcripcional se activa ante las bajas tensiones de oxígeno y óxido nítrico, permitiendo la sobrevivencia de las bacterias durante la fase de latencia de la enfermedad [267]. Por último, en la capacidad de almacenamiento de este tipo de lípidos, también se demostró que las bacterias de genotipo Beijing se asocian con la producción de glicolípidos fenólicos que es producido por bacterias altamente virulentas y que se asocia con la inhibición en la producción de citoquinas pro-inflamatorias [132] como se pudo confirmar en el presente estudio tanto en la infección in-vitro (**Figura 1-11 B-E**) como in-vivo (**Figura 1-17 B-D**) [239,267], demostrando la importancia de la presencia de lípidos y la regulación en la producción de los mismos tanto en cultivo como dentro del hospedador, como factores de virulencia desencadenantes de cuadros complicados de TB [268].

Otra estructura observada fue el Mesosoma, siendo más evidente en los aislamientos 323-Beijing-Like y 391 Beijing-Clásico que en H37Rv, aún es controversial la presencia y función de esta estructura en las preparaciones para MET, algunos autores afirman que esta estructura se forma como un artefacto resultante del procesamiento de fijación química y desecación [260], mientras que otros afirman, que esta estructura es el resultado de la prolongación e invaginación del citoplasma y que es característico solo en bacilos gram positivos, pero actualmente existe un acuerdo general en que estas estructuras también se encuentran en bacterias Gram negativas [256, 266]. En *Mycobacterium leprae*, se ha evidenciado la estructura membranosa mesosoma y se le ha asociado con el proceso de división celular, de acuerdo con su localización dentro del bacilo, infiriendo que esta estructura puede estar implicada en la formación del septo durante la replicación [269], estas estructuras se observan como sistemas membranosos trilaminares separados por una zona electron transparente con forma tubular, vesicular o laminar [259]. Cepas de *Staphylococcus aureus* tratados con antibióticos que presentan diferentes mecanismos de acción fueron sometidos a análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión método rápido, encontrando que bacterias tratadas con antibiótico, principalmente vancomicina y oxacilina, mostraban la presencia de mesosomas caracterizados por una invaginación profunda de la membrana celular a diferencia de las cepas control no tratadas con antibióticos, postulando que estas bacterias forman estas estructuras como mecanismo de defensa ante la presencia de antibióticos [270]. Las cepas genotipo Beijing de este estudio presentan un amplio espectro de resistencia a antibióticos, lo cual posiblemente ha desencadenado la capacidad en estas bacterias de formar estas estructuras que además de los mecanismos ya descritos como mutaciones cromosomales, pueden favorecer la resistencia a medicamentos, sin embargo esta hipótesis debe ser comprobada experimentalmente

Con el fin evaluar la virulencia de los aislamientos clínicos y con tener un punto de comparación con la cinética *in-vivo*, objetivo principal del presente trabajo, se realizó un experimento de infección de macrófagos alveolares de ratón (MH-S). En general, los macrófagos infectados, sean de tipo primario o de líneas celulares inmortalizadas, en condiciones normales, al inicio de la infección inducen una fuerte respuesta de tipo pro-inflamatorio con la secreción de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α principalmente [235], este tipo de respuesta permite que las bacterias sean eliminadas durante el proceso de fusión fagolisosomal, se procesen los antígenos y sean presentados por medio del MHC-II a los LT y generar una memoria inmunológica de larga duración de tipo celular. Sin embargo, y en gran parte dependiendo del tipo de bacterias utilizadas para la infección, se puede alterar el tipo de respuesta inmune producida, la cual al final influye en el desenlace de la infección de las células [271].

Los resultados mostraron una mayor replicación intracelular en 323 Beijing-Like, seguido de LAM9 B077bc, 391 Beijing-clásico se replicó a niveles muy similares a la cepa de laboratorio H37Rv que, aunque es considerada una cepa virulenta, es superada ampliamente por 323 Beijing-Like y LAM9 B077bc, siendo más evidente esta diferencia al día 4 PI.

En nuestra hipótesis inicial, las cepas con comportamiento más virulento serían los aislamientos clínicos genotipo Beijing. En este experimento se evidenció que, tanto en la capacidad de replicación intracelular como en el perfil de producción de citoquinas, el aislamiento clínico sensible a medicamentos LAM9 B077bc tuvo un comportamiento muy similar a 323 Beijing-Like, las dos produjeron una mayor cantidad de TNF- α , mientras que la cepa 391 Beijing-Clásico produjo una muy baja producción de IL-10 al día 4 PI. Estos resultados contrastan con un trabajo previo, en el cual se evaluaron 7 aislamientos clínicos de genotipo Beijing (SIT 1 Beijing Clásico, y Beijing-Like SIT 269 y 941) sensibles a medicamentos, provenientes de Vietnam, todos ellos, mostraron una producción temprana de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α , sin embargo, al día 0 PI si se produjo una cantidad temprana de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 [71]. Por lo tanto, la respuesta inmune generada en este tipo de experimentos, no depende solo de la cepa infectante, si no del tipo de línea celular utilizada para el experimento [65,72].

En otro estudio en el que se evaluaron cepas genotipo Beijing Clásico, se indujo una baja producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α en los estadios tempranos de infección, lo cual contrasta con la alta producción de TNF- α después de 4 días de incubación con 323 Beijing-Like y LAM9 B077bc, sugiriendo que el tiempo post-infección es también un factor a tener en cuenta en el momento de analizar los resultados, en la producción de citoquinas en los macrófagos infectados, por lo que este tipo de estudios se debe extender hacia el uso de modelos *in vivo* y comparar los resultados [272].

El objetivo principal de este trabajo, fue indagar y comparar el tipo de respuesta inmune generada por las dos variantes de genotipo Beijing que circulan en Colombia, en comparación con la respuesta

producida por un aislamiento clínico de diferente genotipo, en este caso LAM9, el cual es el que circula más frecuentemente en el territorio nacional, utilizando el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva crónica ratón Balb/c (UFCs, Histología Pulmonar, expresión de genes asociados a respuesta inmune qRT-PCR y expresión global de genes del ratón en pulmones infectados).

Han sido numerosos los estudios en los que se evalúa la variación en la virulencia en modelos in-vivo de tuberculosis pulmonar, en uno de ellos se obtuvo que los aislamientos clínicos genotipo Beijing obtenidos de pacientes asiáticos, han mostrado ser altamente virulentos y son incapaces de inducir una respuesta inmune protectora para el hospedador [71]. Posteriormente, se utilizaron aislamientos clínicos de genotipo Beijing provenientes de Sur África, se demostró que aquellos aislamientos clínicos pertenecientes al genotipo Beijing, presentaban un espectro variable en la virulencia similar a sus características epidemiológicas. Las cepas Beijing típicas demostraron ser altamente transmisibles y desencadenaron enfermedad severa en los animales infectados. Por otro lado, las cepas Beijing atípicas no fueron transmisibles y mostraron un perfil de virulencia atenuado, aun cuando tanto las cepas virulentas como las no virulentas pertenecían al mismo sub-linaje [247].

En los resultados de los aislamientos clínicos genotipo Beijing del presente estudio, se confirmó la hipervirulencia de ambos aislamientos clínicos, sin embargo 323 Beijing-Like demostró ser una bacteria más virulenta que 391 Beijing-Clásico, causando la muerte de los animales infectados más tempranamente (**Figura 20 A**), con una alta capacidad replicativa (**Figura 20 B**) en el pulmón, causando una gran extensión de daño tisular con predominio de neumonía (Figuras 21 y 24B), aunque 391 Beijing-Clásico no causó la muerte tan temprana de los animales (**Figura 20 A**), también mostró un fenotipo altamente virulento, causando la muerte de la totalidad de los animales hacia el día 60 PI pero desencadenando una TB complicada con un curso un poco más crónico, con la presencia de neumonía masiva con parches de necrosis tisular (**Figura 22 y 24 B**).

Por otro lado, aunque se tiende a pensar que el hecho de que un aislamiento clínico o cepa sea sensible a todos los antibióticos antituberculosis, lo hace menos virulento que los aislamientos clínicos que presentan algún tipo de resistencia; al comparar aislamientos clínicos genotipo Beijing, altamente resistentes a antibióticos y con antecedentes de causar decesos en los pacientes afectados, con un aislamiento clínico sensible linaje 4 Euro-Americano y prevalente en el país, se demostró que este tipo de bacterias son tan virulentas como las cepas de genotipo Beijing. Este tipo de observaciones también han sido reportadas tanto en modelos in-vivo como in vitro. Marquina y cols., en 2009 reportó un aislamiento clínico de linaje 4 que fue altamente virulento, causando la muerte de los animales a las 3 semanas PI, con una alta capacidad replicativa y a diferencia del aislamiento clínico aquí evaluado, altamente transmisible, lo cual estaba en concordancia con las características epidemiológicas de dicho aislamiento clínico, el cual fue obtenido a partir de un gran cluster de infección reciente en México [254]. En otro estudio, en el que se evaluó la virulencia en ratones Balb/c, incluidas cepas pertenecientes al linaje 2 y 4, se observó que aquellas pertenecientes al genotipo Beijing, mostraron un fenotipo más virulento que las cepas pertenecientes al linaje 4

(Harlem), estos animales sobrevivieron más de 4 meses después de la infección, a diferencia de lo que se encontró en LAM9 B077bc de este estudio [106].

Las observaciones obtenidas a partir de la infección de macrófagos alveolares de ratón en el experimento de Killing, se correlacionan con el perfil de virulencia que se obtuvo en la cinética *in-vivo*, mostrando que, aunque los experimentos *in-vitro* no permiten obtener resultados 100% extrapolables a lo que sucedería en los animales o en el hospedador humano, en este caso, si se pudo obtener un acercamiento inicial al comportamiento de los aislamientos clínicos aquí incluidos en un modelo de infección, siendo una herramienta económica y un poco más sencilla de manejar para la obtención de información preliminar.

Dadas las observaciones anteriores, se decidió determinar el perfil inmunológico desencadenado por las bacterias a nivel puntual (determinación de expresión de citoquinas por qRT-PCR), si no global (RNA-seq). Dados los costos generados para hacer secuenciación de transcriptomas completos, se decidió hacer RNA-seq de pulmones de ratones infectados solo con los dos aislamientos clínicos genotipo Beijing, los cuales son el objeto principal del presente estudio, sin embargo y dado que con LAMB077bc se obtuvieron hallazgos tan interesantes, en estudios futuros se pretende hacer la secuenciación de transcriptoma completo de esta, para determinar las posibles causales y mecanismos de su fenotipo altamente virulento.

Se obtuvieron transcriptomas de 3 ratones de cada cepa a los días 3, 14, 28 PI y 60 PI para 391 Beijing-Clásico, no se obtuvieron diferencias entre los transcriptomas al día 3 y 28 PI entre las dos cepas, el perfil de expresión de genes al inicio de la cinética fue esencialmente pro-inflamatorio, en el cual la expresión del gen *SHARPIN* parece cumplir un rol fundamental, ya que está involucrado en la activación del inflammasoma [273] y además participa en la inducción de la respuesta a citoquinas en respuesta a la activación del TLR en macrófagos [274]. Aunque se observaron granulomas bien formados al día 14 PI, se sugiere que al día 3 PI inicia el reclutamiento celular para su formación, ya que varios genes involucrados en la formación de estos, están sobre-expresados tales como aquellos que codifican para las quimiocinas CXCL9, CCL3 y CCL4. Sin embargo, se encontró una diferencia sutil, aunque no sin importancia y fue que el gen *Hsp90ab* tenía una expresión más alta (dos veces más) en ratones infectados con la cepa 391 Beijing-Clásico (Fold Change: 1,54). El gen *Hsp90ab1* tiene un rol antagónico con la ubiquitinación mediada por CHIP y la degradación de Smad3, que permite la activación de la vía de señalización mediada por la proteína anti-inflamatoria TGF- β . Por lo tanto, se observa que aun en estadíos tempranos de la infección, hay una activación de factores anti-inflamatorios no protectores que inducen daño tisular en los animales. Por otra parte, al día 14 PI se empezaron a observar cambios más significativos; en este momento en los animales infectados con 323 Beijing-Like, se observó que solamente había 21 genes sobre-expresados, de los cuales el 42% fueron RNAs no codificantes. De la misma manera, para los animales infectados con 391 Beijing-Clásico, se obtuvo que había solo 29 genes sobre-expresados, de los cuales el 48% fueron RNAs no codificantes, cabe resaltar que el aislamiento clínico menos virulento fue el que presentó mayor porcentaje de RNAs no codificantes y ninguno de estos se

compartió entre los genes sobreexpresados, lo que indica una respuesta específica del huésped a cada aislamiento de Mtb después de 2 semanas de infección. La sobreexpresión de *ZC3H7A* (Dedo de zinc tipo CCCH que contiene 7 A) puede estar relacionada con este proceso, ya que codifica para una proteína reguladora específica para la biogénesis de miRNA [275]. Después del día 14 PI, el aislamiento clínico 323 Beijing-Like indujo una respuesta inmune parcialmente suprimida, debido a que los genes *Nkiras1*, *Dleu2* y *Sphk2* estaban sobreexpresados. *Nkiras1* es un gen atípico similar a *Ras* que codifica una proteína, que es un potente regulador de la actividad de *NF-kappa-β* que previene la degradación del inhibidor beta de *NF-kappa-β* (NFKBIB) por la mayoría de las señales y media la retención citoplasmática de la Subunidad p65. / RELA de NF-kappa-B [276,277].

La sobre-expresión del gen largo no codificante *Dleu2* debería ser importante en la respuesta inmune humoral, ya que controla la proliferación de células B, mientras que la proteína codificada por el gen *Sphk2*, debe ser importante en la respuesta inmune mediada por células, ya que este regula la vía de señalización de la IL-12 en células T suprimiendo la respuesta de tipo inflamatorio [278]. Adicionalmente, la sobre-expresión de este gen codifica para una Esfingosina quinasa 2 que es un factor inmunosupresor importante, ya que es un regulador negativo de la activación de macrófagos [279], inhibe el crecimiento celular y aumenta la apoptosis [280]. Por otra parte, el gen *Ifi2712a* que está involucrado en la apoptosis de linfocitos inducida por interferones de tipo I, puede estar contribuyendo en la inmunomodulación de la respuesta que se está generando [281,282].

Los datos aquí obtenidos, además sugieren que los eventos epigenómicos son otros procesos significativos e importantes a las 2 semanas de infección con la cepa 323 Beijing-Like, considerando que el análisis de red sugirió la interacción del co-activador del receptor nuclear 1 (NCOA1 o SRC-1). NCOA1 es una proteína co-reguladora transcripcional que muestra varios dominios de interacción con el receptor nuclear y una actividad intrínseca de histona acetiltransferasa que modula la expresión del DNA [283].

Otra actividad celular significativa fue la proliferación celular, considerando la sobreexpresión del gen que codifica la proteína relacionada con el metabolismo *Ctps2*, que cataliza la aminación dependiente de ATP de UTP a CTP con L-glutamina o amoníaco como fuente de nitrógeno. *Ctps2* es la enzima que limita la velocidad en la síntesis de nucleótidos de citosina que indica la replicación celular. Además, dos genes sobre-expresados fueron proteínas asociadas a cilios y flagelos, CFap53 y Cfap299. Estos genes han estado involucrados en el asma y la enfermedad pulmonar crónica, respectivamente [284,285].

El aislamiento clínico 323 Beijing-Like produjo un cambio en el perfil de expresión luego de dos semanas de infección que disminuyó la respuesta pro-inflamatoria, pero al día 28 PI la fuerte respuesta pro-inflamatoria regresó como lo sugiere la falta de expresión del gen de esfingosina quinasa, que probablemente contribuya al desarrollo de neumonía rápida y extensa que produce la

muerte de animales por insuficiencia respiratoria. Esta reprogramación del sistema inmunológico se ha descrito previamente en infecciones *in vitro* e *in vivo* con cepas genotipo Beijing [286].

En contraste, al día 14 PI en animales infectados con 391 Beijing-Clásico, se observó un perfil diferente en el patrón de genes. Este perfil genético se caracterizó por un fuerte patrón de señalización de las células NK y genes sobre-expresados relacionados con la respuesta pro-inflamatoria, como *Tcrb* (receptor B de células T), receptor de lectina tipo C (CTLR) del grupo V CLEC9A, que es un activador de receptor que induce la producción de citocinas pro-inflamatorias [287], el gen *Rbbp8* (Proteína Retinoblastoma), que son importantes genes de recombinación inmunológica y, *Syn3*, el cual es un miembro de la familia de genes sinapsina, importantes para la maduración del fagosoma. La sobreexpresión de *Art3*, ADP-ribosyltransferase 3 (ADPRT) es un importante mediador en la regulación de la respuesta inmune celular, ya que este codifica para una proteína que cataliza una reacción reversible que modifica proteínas por la adición o remoción de la ADP-ribosa a un residuo de arginina, regulando la función de la proteína modificada en las células T maduras, pero sin efecto alguno en LB y macrófagos. La expresión de ADPRT permite ADP-ribosilar las proteínas de la superficie celular. Existe un grupo significativo de moléculas ADP-ribosiladas muy importantes para la función de las células T, como LFA-1, CD8, CD27, CD43, CD44 y CD45 [288].

La comunicación entre el citoesqueleto y la matriz extracelular también es un evento importante en este momento de la infección con 391 Beijing-Clásico, ya que hubo sobreexpresión del gen *Sspn*, un miembro del complejo distrofina-glicoproteína (DGC) que proporciona un vínculo estructural entre el citoesqueleto de la matriz extracelular; [289] el gen *Filip1*, el cual codifica para una filamina, la cual es una proteína de unión que promueve su degradación [290] y *Ankrd12* que codifica para un miembro de la familia de cofactores que contiene repeticiones de anquirina, estas proteínas inhiben la actividad transcripcional de receptores nucleares a partir del reclutamiento de desacetilasas de histonas; en plasma de pacientes con TB activa, se detecta circRNA Hsa_circ_102296, que se alinea con ANKRD12 [291].

Otra actividad importante es la función del retículo endoplásmico rugoso, como indica la sobreexpresión de *Tmtc2*, cuya proteína codificada se localiza en el retículo endoplásmico y juega un papel en la homeostasis del calcio [292].

Por último, llama la atención la sobreexpresión del gen *Ifit1bl1* (proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1B-like 1), debido a que esta proteína inhibe la replicación viral y el inicio de la traducción [293]. Considerando que Mtb es un patógeno intracelular similar a los virus, es posible que compartan mecanismos de defensa similares.

Los ratones infectados con la cepa Beijing clásico 391, mostraron una mayor supervivencia, algunos de ellos lograron sobrevivir hasta el día 60 PI. Curiosamente, en este punto de tiempo “tardío”, el perfil de expresión era pro-inflamatorio, muy similar al día 3 PI, se expresaron algunos genes

considerados marcadores de gravedad de la enfermedad, como CLC3 y CLC4, que se correlacionaron bien con cargas bacilares altas y daño tisular extenso (neumonía con necrosis).

Es importante resaltar, que a pesar de que los aislamientos clínicos Beijing son casi idénticos, ya que solo difieren en 18 SNPs a nivel genómico y en un espaciador en el locus DR, desencadenaron un perfil diferente en su virulencia y expresión génica en el hospedador, sugiriendo que pequeños cambios a nivel genómico podrían tener alto impacto en el fenotipo. En comparación con 391 Beijing-Clásico, los SNP de 323 Beijing-Like se localizan en genes relacionados con la síntesis de peptidoglicano (PDIM) y el factor de transcripción WhiB6 [262]. Esto podría explicar parcialmente las diferencias descritas en este estudio, pero se requieren otros estudios para determinar con mayor precisión diferencias a partir de estudios funcionales para verificar el papel del DEG en el fenotipo.

Como resumen del efecto de la expresión diferencial en las células infectadas con Mtb, en la **Figura 1-33** se muestra un modelo de inmunomodulación durante la progresión de la TB en ratones infectados con 323 Beijing like, construido a partir de los genes que presentaron mayor interacción de los genes reportados en la base de datos INNATE-DB y en la **Figura 1-34** se muestran las mismas características, pero en ratones infectados con 391 Beijing-Clásico.

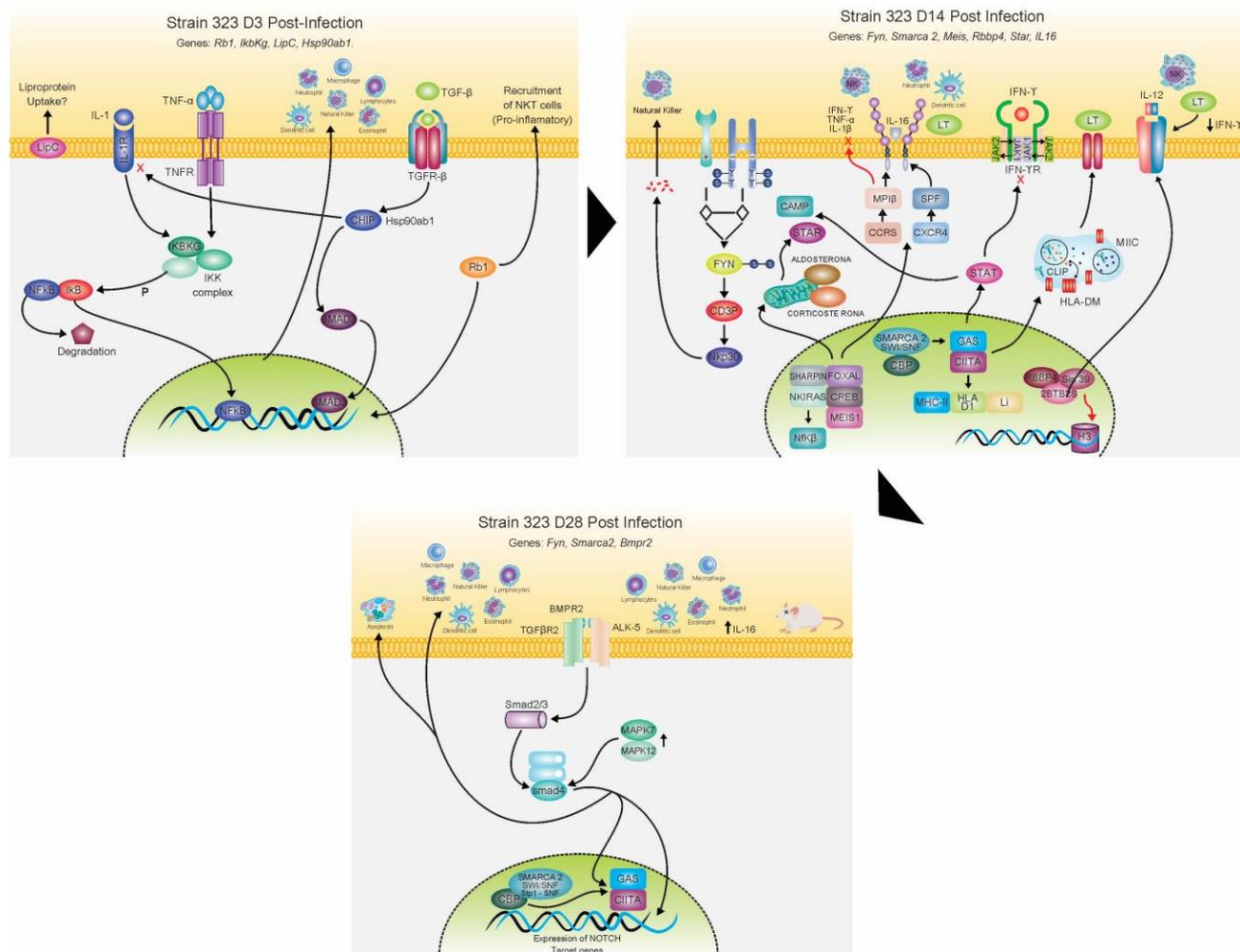


Figura 1- 33. Modelo de inmunopatogenicidad a lo largo de la infección de pulmones de ratones Balb/c infectados con 323 Beijing-Like. Se construye un modelo resumen con los genes con expresión diferencial que mas interacciones mostraron en el análisis realizado en el portal InnateDB en la fase inicial (D3), intermedia (D14) y tardía (D28) de la infección.

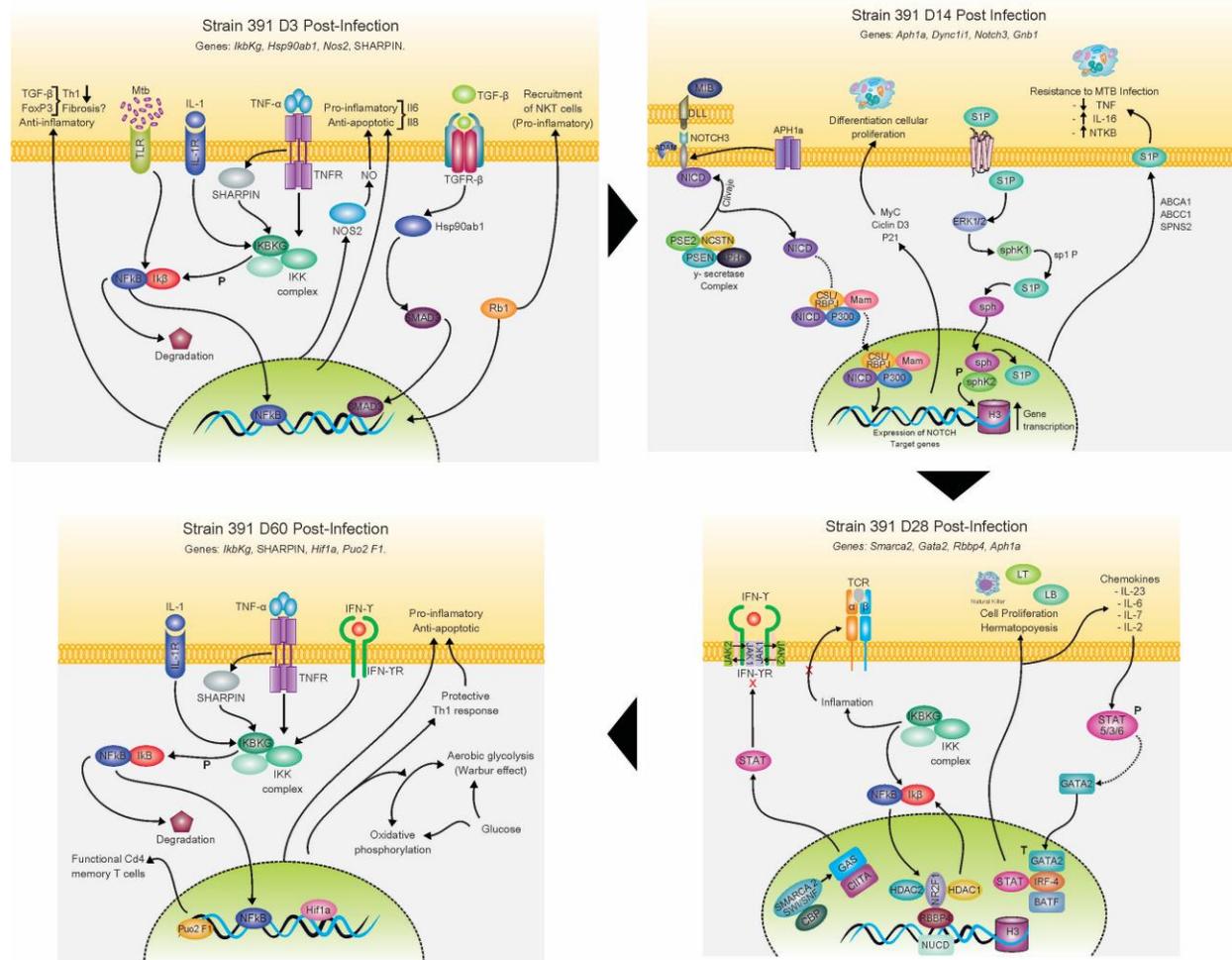


Figura 1- 34. Modelo de inmunopatogenicidad a lo largo de la infección de pulmones de ratones Balb/c infectados con 391 Beijing-Clásico. Se construye un modelo resumen con los genes con expresión diferencial que mas interacciones mostraron en el análisis realizado en el portal InnateDB en la fase inicial (D3), intermedia (D14) y tardía (D28 y D60) de la infección.

1.5. Conclusiones

- 323 Beijing-Like fue altamente virulenta, desarrollando TB aguda en el ratón.
- 391 Beijing-Clásico, aunque mostró un fenotipo virulento, el curso de la TB fue más crónica que con 323 Beijing-Like.
- Ambas cepas genotipo Beijing desencadenan una respuesta inmune no protectora en ratones Balb/c, responsable del desenlace de la enfermedad de los animales.
- Beijing-Like 323 y 391 Beijing-Clásico desencadenaron la expresión temprana pero fugaz de TNF- α e IFN- γ .
- La cepa LAM B077bc, mostró un comportamiento altamente virulenta In-vivo.
- LAM B077bc, mostró un perfil de expresión simultánea de citoquinas pro y anti-inflamatorias, con la expresión sostenida de TNF- α y fugaz expresión de IFN- γ .
- En ambas cepas Beijing, el inicio de la cinética fue esencialmente pro-inflamatorio desde fases tempranas.
- Al D14 PI la cepa 323 Beijing-Like, desencadena en el modelo murino la expresión de genes responsables del reclutamiento de células para la formación de granulomas.
- En el modelo murino al día 28 PI, la cepa 323 Beijing-Like desencadenó la expresión de genes pro-inflamatorios como el gen *Bmpr2* que posiblemente al igual que en los humanos cause hipertensión pulmonar y muerte de los animales.
- La cepa 391 Beijing-Clásico al día 14 PI, indujo una fuerte señalización de células NK en el modelo murino.
- En la cepa 391 Beijing-Clásico, la respuesta inflamatoria producida en los ratones se mantiene hasta el día 28 PI, día en el cual la respuesta producida es similar a la generada por la cepa 323 Beijing-Like al día 14 PI.
- Al día 60 PI, en ratones infectados con la cepa 391 Beijing-Clásico, el perfil de expresión génica observado fue similar al día 3 PI, sin embargo, dada la extensión del daño tisular, esta respuesta no tuvo efectos benéficos.

Capítulo 2. Expresión diferencial de genes de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de la secuenciación de transcriptoma bacteriano completo (RNA-seq) en pulmones infectados de ratón Balb/c.

2.1. Marco Conceptual

2.1.1. Factores de Virulencia de Mtb

Un microorganismo patógeno es considerado virulento por la capacidad que este tenga de infectar, colonizar, enfermar y matar a la célula u organismo blanco de infección [294]. En un gran número de microorganismos, las habilidades antes mencionadas dependen de la presencia de una variedad de factores de virulencia tales como: la producción de toxinas o la presencia de organelos celulares tales como pilis, flagelos, cápsulas polisacáridas, entre otros [295].

En Mtb, la virulencia se puede evidenciar en términos de morbilidad (severidad de la enfermedad) y mortalidad (capacidad de producir la muerte del hospedador), evaluando parámetros tales como la carga bacteriana tanto en modelos celulares como animales [294].

Dado que las especies del complejo MTBC a excepción de *M. canettii*, no hacen transferencia horizontal de genes, que permita transferir a otras bacterias por ejemplo resistencia a antibióticos, característica considerada como un factor de virulencia. Sin embargo, en Mtb la resistencia se produce por la presencia de SNPs a nivel comósomico, que constituyen cambios evolutivos que le permiten a la bacteria adaptarse a cambios ambientales y de hospedador. Adicionalmente, cambios en la expresión de los genes que le permiten producir las proteínas involucradas en la biosíntesis y

metabolismo bacteriano, juegan un rol importante tanto en el fenotipo de las bacterias como en la enfermedad que producen [296].

Son numerosos los genes que cambian su perfil de expresión ante un ambiente determinado, para facilitar el entendimiento en la función génica en Mtb, es necesario agruparlos de acuerdo al proceso metabólico en el que están involucrados o, dicho de otra manera, asociar dichos genes a categorías funcionales, sin embargo, hay genes que desempeñan funciones muy específicas en las células bacterianas. De acuerdo con los datos genómicos obtenidos a partir de la secuenciación de la cepa de laboratorio H37Rv, se sabe que esta bacteria posee un genoma de 4.411.529 pb, con 65.6% de contenido G+C, con un único origen de replicación (OriC), es un genoma con alta concentración de zonas repetitivas, contiene 3.924 marcos abiertos de lectura con una capacidad codificante de 91% del genoma [297].

De acuerdo con los datos de secuenciación y de la clasificación funcional de los genes 4000 que posee Mtb, se encontró que: 225 genes están involucrados en el metabolismo de lípidos (9.3% de genoma codificante); 207 genes están involucrados en vías de información (6.1% de genoma codificante); 517 genes están asociados a procesos celulares y de síntesis y funcionamiento de pared celular (15.5% de genoma codificante); 50 genes codifican para RNAs estables (0.2% de genoma codificante); 137 genes se asocian a secuencias de inserción y fagos (2.5% de genoma codificante); 167 genes codifican para el grupo de proteínas PE y PPE (7.1% de genoma codificante); 877 genes codifican para proteínas intermediarias de metabolismo y respiración (24.6% de genoma codificante); 607 genes codifican para proteínas de función desconocida (9.9% de genoma codificante); 188 genes codificantes para proteínas regulatorias (4% de genoma codificante); 911 genes codificantes para proteínas hipotéticas conservadas (18.4% de genoma codificante) y, 91 genes que codifican para proteínas de virulencia, detoxificación y adaptación (2.4% de genoma codificante) [297,298].

De acuerdo a la clasificación funcional de los genes identificados en el genoma completo, estos a su vez se han clasificado como factores de virulencia de Mtb, cumpliendo funciones específicas en el metabolismo bacteriano. A continuación, se mencionan algunos de dichos factores de virulencia que le han permitido a Mtb ser un patógeno exitosamente adaptado al humano.

2.1.1.1 Sistemas de secreción

La secreción de proteínas es un mecanismo importante en el funcionamiento bacteriano en su entorno natural e importante para la adaptación y la supervivencia. Estos sistemas son esenciales para la interacción con las células hospederas, mediante la exportación de proteínas señal o toxinas que le permiten a las Micobacterias causar enfermedad con diferentes patrones de virulencia de acuerdo a la actividad regulatoria de los genes asociados a estos sistemas [294].

Uno de los principales sistemas asociados a la virulencia de Mtb son los Sistemas de secreción. Mtb expresa constitutivamente la vía general de secreción dependiente de SecA1 y un sistema accesorio

pero asociado a hipervirulencia dependiente de SecA2 requerida para la secreción óptima de superóxido dismutasa y la catalasa-peroxidasa KatG [299], estos sistemas permiten la traslocación de proteínas precursoras que contienen los péptidos señal clásicos amino-terminales que les permiten pasar a través de la membrana citoplasmática, interactuando con chaperonas, fosfolípidos y proteínas integrales de membrana [299].

Hasta el momento, se ha descrito la presencia de 5 sistemas de secreción específicos en el género *Mycobacterium*, ESX-1-ESX-5 que son conocidos como sistemas de secreción tipo VII, el principal miembro de esta familia de sistemas es el ESX-1 que está compuesto por la proteína de secreción temprana ESAT-6 (*Rv3875*) (Early Secreted Antigenic Target-6 kDa), y CFP10 (*Rv3874*) (Culture Filtrate Protein-10kDa) [300], normalmente, estas proteínas se encuentran en los filtrados de cultivos de *Mtb*, comportándose como antígenos inmunoreguladores dominantes que pueden ser detectados en el suero de pacientes infectados con *Mtb* y su función básica, es promover la secreción de proteínas al ambiente extracitoplasmático[89]. Los genes *Rv3874* y *Rv3875*, son necesarios para la virulencia de *Mtb* y están localizados en la RD1, esta región está compuesta por 9 genes estructurales *Rv3971-Rv23979*, se ha demostrado que la delección en esta región como ocurre normalmente en *M. bovis* BCG, desaparece la virulencia de las cepas [294].

La principal función adjudicada a ESX-1, es conferir la habilidad a la micobacteria de evadir la fusión fagolisosomal de las células infectadas, permitiéndole a la bacteria traslocarse del citosol de los macrófagos y células dendríticas durante el curso de la infección, lo que le permite a la bacteria ser invisible a los mecanismos de reconocimiento antigénico en la célula infectada [300]. En estudios de sobrevivencia intracelular mediada por ESAT6:CFP10, se ha demostrado en *M. marinum* que posee una RD1 intacta, tiene la capacidad de romper la membrana del fagosoma y traslocarse al citoplasma, desencadenando vías citoplasmáticas (MHC-I) de reconocimiento de patógeno [301]. En el caso de *Mtb*, se ha demostrado que la ruptura de la membrana fagolisosomal y translocación de la bacteria al citoplasma tanto en cepas de *Mtb* y cepas de *M. bovis* mutantes para RD1 o transfectadas con RD1 recombinante restituyendo su función y presencia, a partir del uso del método FRET (Transferencia de energía por resonancia) usando el gen *BlaC* como reportero, para investigar el potencial de *Mtb* de acceder al citoplasma de los macrófagos THP-1 infectados y su consecuencia de forma cuantitativa y no sesgada y de esta manera determinar la importancia del efecto de ESX-1 en el proceso de ruptura del fagosoma; desencadenando que la célula entre en muerte celular por vía necrótica (identificado con un marcador de necrosis Ioduro de Propidio), gracias a la polarización de la respuesta inmune hacia el tipo anti-inflamatorio [302].

Además de ESX-1, existen cuatro loci ESX parálogos en el genoma de *Mtb*, ESX2-ESX-5, de los cuales ESX-3 y ESX-5 han cobrado importancia por su asociación a virulencia en *Mtb* y *M. marinum*. En general, los sistemas de secreción están compuestos por complejos multiprotéicos, que se arman sobre genes o componentes conservados (*Ecc*) y proteínas asociadas a secreción (EsP, EsX y PE/PPE). Básicamente, la maquinaria dispone de dos componentes: uno citosólico y proteínas de

unión a ATP ancladas a la membrana (EccB, EccD, EccE), esta maquinaria permite la traslocación y exportación de proteínas, mediada por ATP [303].

2.1.1.2. RV2031C, HSPX α -Cristalina

La α -Cristalina, es una proteína de 16-kDa codificada por el gen *Rv2031c* o *hspX* o *Acr*, cuyo nivel de transcripción está regulado por el regulón dosR (Responsable de la regulación de cerca de 50 genes en respuesta a hipoxia y estrés). Esta proteína es uno de los antígenos más comúnmente encontrados en los pacientes con TB, pertenece a la familia de proteínas de shock térmico similares a α -Cristalina (α -HSP), la sobreproducción de esta proteína, ocurre en respuesta a condiciones de hipoxia favoreciendo el estado de latencia de la bacteria [304].

En cultivos de Mtb, la α -Cristalina es detectada en fase estacionaria de crecimiento e indetectable en fase logarítmica, inicialmente esta proteína se encontraba asociada a membrana celular, pero además se ha descrito como una proteína chaperona independiente de ATP y también se ha encontrado asociada a estructuras macromoleculares de la pared celular, por lo tanto, esta proteína ha sido blanco de caracterización y búsqueda en estudios de dormancia del bacilo tuberculoso y de latencia de la TB, tanto es estudios *in-vitro* como *in-vivo* [305].

2.1.1.3. Genes asociados a superficie celular

La envoltura de las micobacterias, está compuesta por la membrana plasmática que a su vez, está rodeada por una pared celular compleja compuesta de un 60% de lípidos, carbohidratos y en algunas especies, especialmente las más patógenas, la pared celular está rodeada por una estructura similar a cápsula, el análisis de los componentes de esta importante estructura celular han sido estudiados desde hace más de 50 años a partir de extractos libres de micobacterias tales como *M. bovis* y *M. smegmatis* [306].

Los lípidos de la pared de las micobacterias conforman más del 40% del peso seco de la bacteria, siendo la pared celular más rica en lípidos, lo que le confiere la propiedad de ácido alcohol resistencia y la baja permeabilidad a nutrientes, iones, compuestos químicos como antibióticos etc. El fragmento principal de la pared celular de Mtb está compuesta por ácidos micólicos, factor cuerda o dimicolato de trehalosa y ceraD (*waxD*), a su vez, está formada por los segmentos exterior e interior [307]. La estructura central de la pared celular (mAGP) está compuesta por la unión covalente del peptidoglicano (PG) con el arabinogalactano (AG), los cuales están unidos a las cadenas α largas y cortas del meromicolato, a su vez, la porción más externa de la pared celular, está compuesta por lípidos libres con cadenas largas y cortas de ácidos grasos, en donde las proteínas de membrana están intercaladas junto con los fosfatidilinositol manósidos (PIMs) y el ptiocerol y contiene los lípidos lipomanan (LM) y lipoarabinomanan (LAM), esta compleja red de lípidos, carbohidratos y proteínas

que conforman la pared celular, permite que ellas sean moléculas efectoras en el proceso de enfermedad y antígenos importantes para el desarrollo de la respuesta inmune del huésped, y por tanto es uno de los componentes micobacterianos más tenidos en cuenta para el desarrollo de antibióticos [306,308].

El LAM, es uno de los principales factores de virulencia de la pared celular de Mtb, una de sus principales funciones es favorecer la sobrevivencia en el ambiente intracelular y evadir la acción de los efectos citotóxicos de los radicales libres que se producen en el macrófago infectado, inhibe la acción de los linfocitos T citotóxicos activados por los macrófagos, inhibe la transcripción de Interferón Gamma (IFN- γ) e inhibe las vías de señalización intracelulares mediadas por proteínas quinasas, que señalizan la transcripción de citoquinas y demás efectores de la respuesta inmune [307].

Estudios que analizan las proteínas de la pared celular, han identificado que más del 5% de estas están relacionadas con la virulencia de Mtb. Entre estas encontramos la proteína Erp (Proteína exportadora repetitiva), o P36, Pirg y *Rv3810*, la cual es un miembro de la familia de proteínas extracelulares exclusivas del género *Mycobacterium*, esta proteína está asociada a la pared celular y tiene una organización modular que consiste de tres dominios: dos conservados (N-y C-terminales) y un dominio central que contiene varias motivos de aminoácidos PGLTS, cuyas repeticiones varían en número; esta variabilidad en el dominio central está relacionada con la virulencia y multiplicación intracelular del bacilo [309].

La proteína de unión a fibronectina (Fbp) también conocida como Apa, ModD, *Rv1860*, o MPT-32, es la principal proteína secretada durante el cultivo celular y se encuentra asociada con la superficie [310]. Este es un antígeno inmundominante rico en prolina y alanina identificado en varias especies patógenas del género *Mycobacterium*, que desempeña un papel esencial en la patogénesis de la tuberculosis, favoreciendo la adherencia de la micobacteria a la superficie de la mucosa, y a la superficie de los macrófagos, crecimiento, migración y diferenciación celular, favoreciendo la entrada a la célula blanco y su sobrevivencia dentro de la misma [311]. Su contribución a la virulencia de Mtb se da gracias a su papel en la síntesis de la pared celular, que se centra en el mantenimiento de la integridad de la envoltura celular. Se ha demostrado que en residuos de cuatro repeticiones de treonina en regiones ricas en prolina, cerca de los dominios N y C terminales de Apa, son O-glicosilados con manosa por uniones vía α -1,2 glycosídicos, desencadenando la respuesta de los linfocitos T ante la infección. Por otra parte, la supresión de la interacción Fibronectina-Apa impide la unión de las bacterias a las células y por ende la capacidad de invadirlas, siendo este un factor de virulencia crucial en Mtb [312].

Dentro de las proteínas de síntesis de pared celular, se encuentra la codificada por el gen *pcaA* (*Rv0470c*), determinante de virulencia y persistencia de Mtb en las células infectadas. Codifica para una S-adenosil dependiente de metionina metiltransferasa que cataliza la ciclopropanación

(incorporación de anillos de ciclopropano) proximal del α -micolato, el cual es la principal subclase de ácido micólico de la pared celular de Mtb, y está involucrado en la producción de factor cordón, esta capacidad de modificación de las cadenas de ácidos micólicos se presenta solo en micobacterias patógenas. La función de ciclopropilación, está involucrada en la evasión de la acción de las especies reactivas de oxígeno iNOS y especies reactivas de nitrógeno RNIs producida por el huésped [313].

Los sulfolípidos (SLs) son un importante factor de virulencia de Mtb, ya que producen lípidos ácidos, los cuales están presentes en la mayoría de las micobacterias patógenas; a su vez se han implicado en la inhibición de la maduración fagolisosomal de los macrófagos. El Ftiocerol Dimicoserosato (PDIM), es el lípido principal de Mtb, es el más apolar de la pared de la bacteria, relacionado estructuralmente con el glicolípido fenólico. La estructura del PDIM es tan densa, que ha sido denominada la CERA de la pared celular, los PDIM y PGLs poseen esqueletos de cadenas largas de ácidos grasos que consisten en 3-metoxi (o 3-ceto, 3- 41 hidroxil), 4-metil, 9,11-dihidroxil glicoles (ftiocerolos) y p-glicosilados fenilglycoles 42 (glicosil fenolftiocerolos) y están esterificados en di-, tri-, y tetra- 43 brazos metilo cadenas acyl (micocerosatos). EL PDIM se encuentra presente en todas las especies del complejo *M. tuberculosis* y en algunas micobacterias no tuberculosas (MNT), siempre y cuando sean patógenas para humanos y animales. Todas la cepas de Mtb que producen ftiocerol dimicoserosatos o ftiocerol ftioceranatos, también sintetizan sustancias estructuralmente relacionadas como los fenolftiocerol [41,314].

El PDIM es codificado por el gen *pks15/1*, en teoría las cepas de Mtb virulentas poseen una copia completa de este gen y producen PDIM, sin embargo cepas de Mtb tales como H37Rv y CDC1551, poseen una delección de 7 pares de bases en este gen, afectando la producción tanto de PDIM como de PGLs; las cepas del linaje del Este de Asia (Linaje 2), producen estos dos lípidos, lo que posiblemente está relacionado con su exacerbada virulencia, esto ha sido comprobado en estudios en modelos animales (Ratón y Cobayo) y celulares (Macrófagos) usando cepas virulentas (HN878) deficientes en *pks15/1* o cepas transfectadas con este gen (CDC1551, H37Rv, Erdman) cuyo fenotipo resulta en cepas con alta virulencia [306,315].

MmpL7 (Rv2942, *mmpL7*), es otra proteína importante para la virulencia de Mtb, es miembro de un grupo de proteínas relacionadas, 13 proteínas de membrana (*mmpL*) codificadas por 13 genes denominados RND (proteínas de resistencia, nodulación y división celular); están involucradas en el transporte de varias sustancias de naturaleza catiónica, aniónica y neutra, dentro de los que se encuentran los antibióticos, metales pesados, solventes orgánicos, sales biliares, ácidos grasos, entre otros, mediando el transporte de dichas sustancias a través de la membrana citoplasmática y modulando el gradiente del potencial electroquímico de membrana [316], la *mmpL7* está involucrada en el transporte de PDIM y se ha sugerido que esta y otros miembros de la familia *mmpL* median la secreción de lípidos contribuyendo a la habilidad del patógeno, de sobrevivir dentro de las células infectadas y son determinantes para el desenlace de la infección, mediando los procesos de interacción hospedero-patógeno [41].

La Isocitrato-Liasa (isocitrasa, isocitritasa, isocitratasa e isocitrato glyoxylato-liasa) codificada por los genes *icl* es una enzima involucrada en el ciclo del glioxilato, la cual es una vía alternativa a la de los ácidos tricarbónicos, para generar energía que le permite a Mtb sobrevivir cuando el ciclo del ácido tricarbónico está regulado negativamente, es un factor de virulencia determinante para la patogenicidad y sobrevivencia intracelular de Mtb. Esta enzima es un blanco potencial de medicamentos antituberculosis, ya que no se encuentra en mamíferos. Las isoformas ICL1 (Isoforma similar a procariotas) y la isoforma ICL2 (Isoforma similar a eucariotas), se requieren para garantizar la sobrevivencia intracelular de Mtb [317].

2.1.1.4. Genes y proteínas asociadas a regulación transcripcional

PhoP (*Rv0757*, *phoP*) hace parte del sistema de dos componentes PhoP/PhoR, responsable de la regulación de la expresión de un grupo de genes de Mtb controlando funciones metabólicas vitales para el bacilo tales como: sobrevivencia ante la hipoxia, metabolismo respiratorio, respuesta ante condiciones de estrés, síntesis de lípidos, entre otros., este gen codifica para un factor regulador de transcripción putativo del sistema de dos componentes PhoP/PhoR, el cual es un transductor de señal de ATPasa que utiliza la energía liberada a partir de la hidrólisis de ATP, para responder ante cambios en las condiciones del microambiente de la bacteria y regula la expresión de cerca del 2% de los genes de Mtb [318].

En general, la expresión de los genes regulados por PhoP desempeñan funciones en el metabolismo de lípidos, transporte de sustancias a través de membrana celular, reguladores de síntesis (DosR). Cuando se ha hecho mutación de *phoP*, se afectan funciones tales como síntesis de sulfátidos por regulación negativa de los genes *msh3*, *pks2* y *mmpl8* involucrados en la síntesis de sulfátidos. PhoP también regula la transcripción de ESAT-6 antes descrita, *lipF* y *fadD21*, que codifican para esterasas importantes en la patogénesis y además PhoP se autoregula gracias a la unión de dos motivos repetidos adyacentes directos de 9pb, localizados corriente abajo del sitio de transcripción [319].

Por otra parte el grupo de factores **Sigma (σ)** hacen parte de la holoenzima RNA polimerasa con estructura $\alpha 2\beta\beta' \sigma$ compuesto en total por 13 genes, que son expresados constitutivamente durante la fase exponencial de crecimiento de Mtb (*sigA*, *sigB*, *SigC*, *sigC-like*, *sigD*, *sigE*, *sigF*, *sigF-like*, *sigG*, *sigH*, *sigI*, *sigJ*, *sigK*, *sigL*, *sigM*) [320]. La subunidad σ es necesaria para proveer la unión específica de ácido desoxirribonucleico (ADN) mientras que el complejo $\alpha 2\beta\beta'$ (core) lleva a cabo la reacción de polimerización. Los factores σ de un organismo generalmente tienen distintas especificidades de promotor, por lo que combinar varios factores σ con la ARN polimerasa, muestra una forma eficiente de modular los perfiles de transcripción, a su vez, los niveles de expresión génica se modifican aún más por la acción de activadores y represores de la transcripción [321].

Los factores σ se dividen en dos grupos: i) Los relacionados a σ^{70} y σ^{54} , todas las eubacterias codifican para al menos un factor σ^{70} y solo algunas codifican para alguna de la clase σ^{54} . Los factores

relacionados a σ^{70} a su vez se dividen en tres grupos dependiendo de su estructura y función: (i) Factores σ primarios los cuales son codificados por casi todas las eubacterias dando lugar a la transcripción de genes constitutivos; (ii) factores σ similares a factores primarios no esenciales involucrados en la sobrevivencia en fase no estacionaria en enterobacterias y (iii) Factores alternativos, no esenciales en condiciones fisiológicas de crecimiento, es un grupo más heterogeneo de factores que se puede clasificar en diferentes subgrupos σ^F perteneciente al grupo de factores de respuesta a estrés y esporulación y σ^C , σ^D , σ^E , σ^G , σ^H , σ^I , σ^J , σ^K , σ^L y σ^M , pertenecientes al subgrupo de los involucrados en funciones extracelulares, los cuales son reguladores sensibles al ambiente, controlando una variedad de funciones en respuesta a señales ambientales extracelulares, como proteínas mal plegadas en el periplasma, cambios en la luz, en osmolaridad o presión barométrica, y la presencia de moléculas tóxicas [320].

El regulón *dosR* (*Rv2027c*) es un conjunto de cerca de 48 genes co-regulados cuya expresión se induce ante la presencia de tres factores que inhiben la respiración aeróbica del bacilo: Hipoxia, óxido nítrico (NO) y óxido de carbono [322]. La activación de la expresión del regulón *dosR* ocurre durante la TB y cuando el bacilo está dormante o en estado persistente no replicativo, por la activación de los sensores de quinasa DosS and DosT. que hacen parte del regulón y a partir de ese momento inicia el proceso de regulación de la expresión de los 48 genes asociados, que le permiten a la bacteria adaptarse y sobrevivir a las condiciones adversas del granuloma [323].

Dentro del conjunto de genes regulados por *dosR* ante la exposición a condiciones de hipoxia y presencia de NO, se encuentra el sistema regulatorio de dos componentes dosR-dosS (*devR-devS*, *Rv3133c/Rv3132c2*), el cual está compuesto de un sensor de quinasa unido a membrana y un regulador de respuesta, activado por la fosforilación de una histidina-aspartato, para unirse corriente arriba a algunos genes regulando su expresión, por lo tanto DosS (*Rv3132c*) es una quinasa funcional del sistema de dos componentes antes mencionados activando a *dosR* por la transferencia de fosfato así como dosT (*Rv2027c*) [324].

Por último, la superfamilia de genes reguladores de transcripción *whiB*, son pequeños reguladores de transcripción globales citoplasmáticos, que contienen cuatro residuos de cisteína conservados con la capacidad de sensar estados redox en *Streptomyces* regulando las funciones de esporulación y diferenciación. En total son 7 las proteínas pertenecientes a esta familia con motivos CXXC y WhiB5 con motivos CXXXXC, estas proteínas tienen la capacidad de unirse al DNA para regular la transcripción de proteínas específicas, gracias a su actividad disulfuro reductasa [294,325].

WhiB1 es un regulador transcripcional que se activa ante la presencia de NO dando lugar a la expresión de un sistema de dormancia que da lugar al establecimiento de la fase latente de la TB [326]. WhiB2 (WhmD) está involucrado en división celular, WhiB3 interactúa con el factor SigA, ante la presencia de condiciones de estrés generadores de dormancia actuando como sensor de redox, dando lugar a la biosíntesis de lípidos complejos contribuyendo a la homeostasis de la célula. Por

otra parte, WhiB7 desencadena una resistencia de bajo nivel a antibióticos, por la inducción en la expresión de genes de protección ribosomal y bombas de eflujo [325].

2.1.1.5. Antígeno 85

Las proteínas del antígeno 85 son uno de los principales grupos proteicos de productos de secreción en *Mtb* y *M. bovis* BCG, que se encuentran en sobrenadantes de cultivos bacterianos y son altamente inmunogénicas; son proteínas exportadoras de unión a fibronectina y se consideran de gran importancia en la biosíntesis de la pared celular [327]. Son tres las proteínas que componen este complejo: (i) Ag85A (FbpA), (ii) Ag85B (FbpB) y (iii) Ag85C2 (FbpC2), su función específica es catalizar la transferencia de micolatos por medio de la micoliltransferasa formando monomicolatos y dimicolatos (Factor cuerda), en cuanto a FbpC2, se sabe que su principal función es unir covalentemente ácidos micólicos al arabinogalactano [328].

2.1.2. Métodos de última generación para el estudio de la expresión génica

El análisis de la expresión de genes en seres vivos, se ha convertido en un proceso fundamental para el entendimiento de los procesos biológicos. El desarrollo de las diferentes metodologías para determinar las diferencias en la expresión de genes bajo diferentes condiciones fisiológicas, ambientales y de infección, ha permitido comprender muchos aspectos que antes no se habían podido analizar de forma global o simultánea.

Las metodologías usadas para el análisis de la expresión de genes son básicamente, qRT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa por transcripción reversa) [329], que solo permite la evaluación de la expresión de genes individuales; métodos basados en la hibridación o unión de sondas marcadas a un gen particular entre los que se encuentran los Microarreglos y Northern Blott y, más recientemente el método de secuenciación a nivel global del RNA total RNA-seq. La primera aproximación de estudios globales de expresión pudo ser realizada gracias a los microarreglos en donde se usan paneles con sondas complementarias a todas las regiones codificantes del genoma, permitiendo hacer análisis de expresión bajo diferentes condiciones de la célula, así como hacer inferencias a nivel proteico y funcional para entender los mecanismos mediados por la regulación génica diferencial, la cual orquesta la respuesta celular a los estímulos ambientales como por ejemplo la respuesta celular a tratamientos con fármacos, estrés nutricional etc. Los análisis de estos datos ofrecen información útil para ser empleados en: (i). identificación de nuevos blancos terapéuticos; (ii). posibles candidatos a vacunas y (iii). permite entender más la biología de los diferentes tipos celulares [330].

El RNA-seq, es un método de secuenciación masiva de todos los RNAs de una célula presentes en un momento determinado, es decir, el análisis global de expresión se puede realizar tanto en modelos de infección experimental tanto animales como celulares. A partir del cDNA correspondiente al

RNA extraído y fragmentado previamente, se construye una biblioteca de fragmentos a secuenciar, para posteriormente ser secuenciados mediante las tecnologías de nueva generación, las cuales permiten que el proceso sea más eficiente. Estas tecnologías pueden utilizar o no el paso de amplificación previa por PCR [331]. Mediante este método se pueden detectar, además de las regiones codificantes en los transcriptomas bacterianos que están asociados directamente con la funcionalidad de su maquinaria, las regiones no codificantes (rRNA y tRNA) y los pequeños RNA como los sRNA que pueden ser indicativos de regulaciones post transcripcionales, involucrados en el fitness de la bacteria. Esta metodología permite obtener transcriptomas a un relativo bajo precio y además analizar más fácilmente la expresión global de secuencia completa, sin tener la secuencia del genoma [332].

Los métodos de secuenciación masiva de nueva generación se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a si usan o no el paso previo a la secuenciación de amplificación por PCR, las tecnologías más utilizadas basadas en PCR son: (i) Life Technologies (SOLiD), (ii): Roche 454 que ya no están en el mercado como métodos de secuenciación de rutina y, por otra parte i) Illumina (Solexa) ii) PaCBio SMRT y iii) MinION-Oxford Nanopore Technologies que son los métodos más utilizados para secuenciación de genomas y transcriptomas. Los protocolos de cada método varían entre ellos de acuerdo a la química que utilizan y generan lecturas. Para el caso de los análisis globales de expresión en infecciones experimentales *in vivo* e *in vitro*, es preferible el uso de plataformas que usen la amplificación previa a la secuenciación, para obtener suficientes lecturas del microorganismo. Más que la capacidad de obtener millones de lecturas de una secuencia, la robustez de RNA-seq se basa en la capacidad de análisis de los datos, ya que este método a diferencia de los microarreglos, requiere del uso de una estadística no paramétrica que normalmente se encuentra gratis en la web, SamSeq en “R” [333,334].

Una vez se obtienen los datos generados del proceso de secuenciación, el esquema de análisis de RNA-Seq para el análisis de expresión diferencial contiene cinco estaciones o fases básicas: i) las muestras de ARN largas se cortan en fragmento cortos de ADN complementario (ADNc) ii) Se secuencian los fragmentos en una plataforma de alto rendimiento como Illumina, iii) Las lecturas de secuencia corta resultantes se vuelven a asignar al genoma o transcriptoma de referencia iv) Luego se determina el nivel de expresión para cada gen, v) Los datos resumidos luego se normalizan utilizando enfoques estadísticos o algoritmos de aprendizaje automático para identificar genes expresados diferencialmente. Finalmente, la importancia de los datos se determina en un contexto biológico [335].

Las lecturas obtenidas con los métodos de secuenciación de nueva generación (NGS), son mapeadas y ensambladas contra un genoma de referencia, para luego buscar las regiones codificantes, marcos abiertos de lectura, genes diferencialmente expresados etc., la metodología RNA-seq posee diversas ventajas que la convierten en el método más adecuado para estudios de expresión génica como lo son, la alta sensibilidad, se genera información de forma masiva, permite identificar genes diferencialmente expresados que no se reportaron antes, no existe el problema de background en las

señales como en los microarreglos, y el análisis en las diferencias en expresión, pierden subjetividad, pues en el análisis de genoma completo este cálculo se realiza por medio de métodos estadísticos, sin embargo una de las principales desventajas de esta metodología, es la dificultad en el mapeo y análisis de regiones genómicas altamente repetitivas muy comunes en genomas tanto eucariotas como procariotas, por lo que es necesario tener en cuenta la profundidad de la secuenciación [336].

A pesar de las bondades de la secuenciación masiva de datos y las ventajas que ofrece a nivel de expresión génica, en ocasiones y por razones ajenas al método de secuenciación se introducen errores en el proceso, por lo que es necesario realizar acciones para normalizar los datos que se obtienen del proceso, actualmente, existen un gran número de algoritmos que permiten realizar este proceso para la corrección de errores, cuya selección dependerá del método de secuenciación utilizado, del tipo de datos que se generen, se la escala de los datos y de los análisis que se planea realizar [337,338].

Entre los métodos que mas se utilizan en la normalización de datos se encuentran: los de no abundancia: RC, UQ, Med, TMM, DESeq, Q, RPKM y ERPKM y los métodos de normalización de estimación de abundancia RSEM y Sailfish; todos estos métodos se usan con datos obtenidos por secuenciación por Illumina, estos métodos son frecuentemente utilizados y permiten determinar con el menor error posible diferencias entre muestras tales como el tamaño de la biblioteca o profundidad de secuenciación, diferencias dentro de la muestra como la longitud del gen, el contenido de guanina-citosina (GC), o variaciones no deseadas introducidas por efecto de lote del criterio de la persona que realiza los análisis y del origen y destino de la información a analizar [339].

2.2. Materiales & Métodos para cumplir con el objetivo específico N° 2: Evaluar en ratón BALB/c la expresión diferencial de genes de *Mycobacterium tuberculosis* genotipo Beijing circulante en Colombia, asociados a su virulencia en las fases aguda y crónica de la infección.

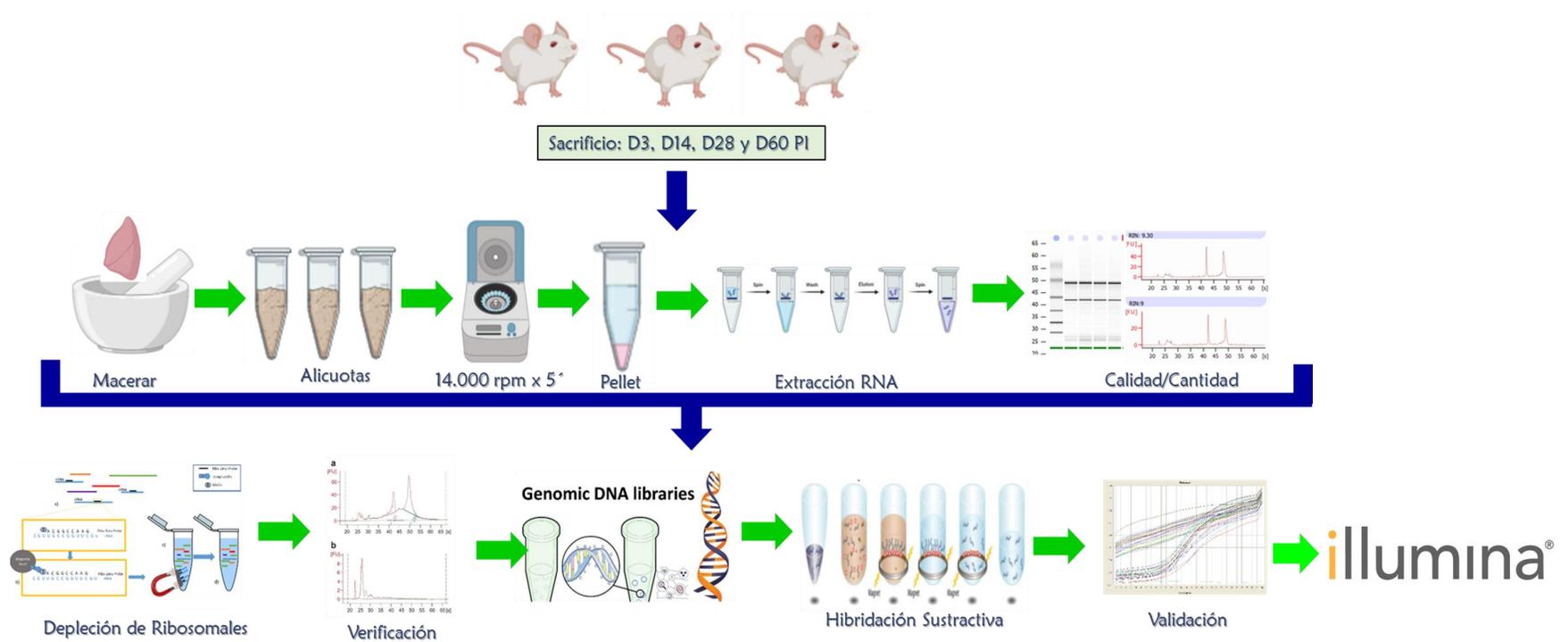


Figura 2- 1. Resumen metodológico para cumplir el objetivo específico N° 2.

2.2.1. Infección de animales: Modelo de TB pulmonar progresiva crónica ratón Balb/c.

2.2.1.1. Cultivo de bacterias y preparación de inóculo para infección

Las cepas de Mtb se encontraban criopreservadas en glicerol a -70°C . Para la recuperación de las cepas en cultivo, se sacaron del ultracongelador y se colocaron a -20°C por 1 hora y luego se dejaron a -4°C hasta su descongelación.

Una vez descongeladas, se tomaron 100 μl de la suspensión descongelada de bacterias y se inocularon en 25 ml de medio de cultivo 7H9 suplementado con Tyloxapol Premium (Ver **Anexo A-4** de preparación de medios de cultivo) y se llevó a incubar con agitación a 37°C con 5% de CO_2 por 48 horas. Una vez pasadas las 48 horas de incubación, el cultivo se escaló a 65 ml de medio de cultivo 7H9 suplementado con Tyloxapol Premium, y se llevó a incubación a 37°C al 5% de CO_2 en agitación. Las cepas se recuperaron en la mitad de la fase logarítmica de crecimiento (**Ver Anexo A-8**) y se hicieron alícuotas del cultivo que se congeló a -70°C por 72 horas, posteriormente se descongelaron 3 alícuotas para verificar la concentración de las mismas haciendo diluciones seriadas de la suspensión bacteriana, posteriormente las diluciones se sembraron en placas de agar 7H10, se incubaron a 37°C por 14 a 21 días y se realizó recuento de UFCs, de acuerdo a la dilución sembrada, las UFCs se multiplicaron por un factor de dilución y se calculó la cantidad de bacterias (**Ver Anexo A-10**).

2.2.1.2. Inoculación intratraqueal de ratones Balb/c

El día de la infección, se calculó el número de dosis necesarias para (Número de animales) las infecciones de acuerdo con la concentración de los stocks bacterianos, de manera tal que se obtengan 250.000 bacterias en cada 100 μl de solución salina suplementada con Tyloxapol Premium de cada cepa bacteriana.

Una vez se tiene ajustada la concentración de las bacterias, estas se envían de forma escalada al bioterio en donde se realiza la infección para que las suspensiones bacterianas no pierdan la cadena de frío.

En el bioterio los animales se anestesiaron con vapor de sevoflurano (100 μL por ratón), dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm, para su inoculación intratraqueal (v.it.) los animales se colocaron sobre una placa de icopor revestida con papel aluminio y se les sujetaron los incisivos con una banda de caucho, se introdujo una cánula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea y se infectaron con 250.000 UFC de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Clásico 391, Beijing-Like 323. Los animales utilizados para los estudios relacionados con micobacterias se alojaron en cajas ventiladas bajo presión negativa y aire suministrado a través de filtros HEPA y manipulados bajo Bioseguridad Animal Nivel 3.

2.2.1.3. Sacrificio de ratones

Grupos de 7 animales para el experimento de Secuenciación de Transcriptoma completo a los días 3, 14 y 28 post-infección.

Para la eutanasia de los animales estos se inyectaron con Pentobarbital 210 mg/kg intraperitoneal. Se sacrificaron por exanguinación, posteriormente se expuso la cavidad peritoneal y torácica haciendo disección del animal haciendo colgajos de la piel de dicha zona teniendo la precaución de no cortar el peritoneo, luego se cortó el peritoneo y se abrió la caja torácica de manera tal que queden expuestos los pulmones, la tráquea y los órganos abdominales. Se cortaron los pulmones de cada animal y colocaron en criotubos previamente identificados y se almacenaron en nitrógeno líquido para su transporte.

Para el almacenamiento permanente de los órganos, los tubos se organizaron en crio cajas las cuales se guardaron a -70°C hasta el procesamiento de los mismos, UFCs y experimentos de biología molecular.

2.2.1.4. Extracción y purificación de RNA bacteriano a partir de pulmones infectados con aislamientos clínicos de Mtb.

Para la obtención del RNA bacteriano purificado a partir de pulmones infectados, se sacaron los tubos con los pulmones del ultracongelador y se transportaron en nitrógeno líquido, para realizar los procedimientos en cabina de bioseguridad. Los pistilos, moteros, tubos y pinzas se enfriaron previamente con nitrógeno líquido y los procedimientos con dichos órganos se trabajaron en temperaturas de congelación para preservar la integridad de los ácidos nucleicos. Para cada día post-infección se utilizaron los pulmones derecho e izquierdo de 3 animales (réplicas biológicas).

- Se tomaron los dos pulmones congelados de cada ratón y se llevaron a un mortero para ser macerados hasta obtener un polvo fino el cual fue almacenado en alícuotas en tubos eppendorff estériles previamente marcados e inmediatamente se llevaron a nitrógeno líquido para impedir su descongelación.
- Con las alícuotas de pulmónes pulverizados se realizó un proceso de enriquecimiento bacteriano por ultracentrifugación y lisis diferencial, a partir de la adición de buffer de lisis RLT suplementado con 1% de β -mercaptoetanol para romper las membranas y componentes celulares, pero manteniendo la integridad de las bacterias, se resuspendió el pulverizado en dicho buffer y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos.
- Una vez centrifugados, se inició el proceso de extracción de RNA usando el kit Quick RNA miniprep kit (Zymo Research CA, USA; Cat. R1055) siguiendo las instrucciones del fabricante (**Ver anexo B-1**). Antes de empezar el proceso de extracción, se hizo una digestión con DNAsa I para degradar el DNA presente en la muestra, una vez extraído y purificado el RNA se verificó la calidad y la cantidad del RNA por espectrofotometría,

electroforesis en gel de agarosa y se midió la integridad de las subunidades ribosomales en bioanalizador usando Agilent RNA 6000 Nano chip Cat: 5067-1511.

2.2.1.5. Determinación de cantidad y calidad del RNA previo al proceso de secuenciación

Una vez obtenido el RNA, se hicieron 3 alícuotas de 5 µl en tubos de PCR (0,2 ml). Una alícuota se utilizó para medir la concentración y la relación 260/280 por espectrofotometría en el equipo EPOCH™, la segunda alícuota fue utilizada para realizar electroforesis en agarosa al 2% con el fin de evidenciar la integridad de las subunidades ribosomales, si las extracciones tenían relaciones 260/280 cercanas a 2.0 y en el gel de agarosa se observaban claramente las subunidades ribosomales sin signos de degradación, se enviaron a la Red de Apoyo a la Investigación (RAI) para la medición de RIN (RNA Integrity Number) por medio de electroforesis capilar usando los Nanochips RNA 6000 en el equipo 2100 Bioanalyzer. Si el RIN de cada muestra extraída era 7.0 o superior, estas muestras eran seleccionadas para el proceso de RNA-seq. Para cada tratamiento, se secuenciaron 3 ratones independientes.

2.2.1.6. Depleción de subunidades ribosomales

Una vez verificada la concentración y calidad del RNA enriquecido extraído y con el fin de eliminar una primera cantidad de las subunidades ribosomales presentes en la muestra, para construir las librerías sobre la mayor cantidad de mRNA posible, las muestras se sometieron al proceso de depleción o eliminación de subunidades ribosomales usando el kit Illumina® Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit Cat. 20037135 siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, este kit que usa como fase sólida perlas magnéticas, usa los pasos de: (i) Lavado de perlas magnéticas, para activarlas y prepararlas para ponerlas en contacto con las muestras; (ii) Hibridación de sondas dirigidas contra subunidades ribosomales, en este paso, las sondas en la solución de remoción se hibrida con el rRNA presente en la muestra. Antes de la hibridación de las sondas, la muestra debe ser purificada y estar libre de contaminación con gDNA; (iii) Remoción del rRNA, para combinar las muestras pre hibridadas con las perlas magnéticas, las cuales se unen a las sondas. El RNA recuperado está depletado para RNA ribosomal; (iv) Limpieza de RNA depletado, aquí las muestras de RNA depletadas para RNA Ribosomal, deben ser purificadas antes de la preparación de librerías. El paso de limpieza remueve cualquier remanente de sales y buffers y concentra las muestras depletadas (v) Verificación de calidad de las muestras depletadas en un chip Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 pico chip ya que el Nano chip no provee suficiente sensibilidad para la detección de muestras depletadas.

2.2.1.7. Construcción de librerías genómicas de secuenciación

Para construir las bibliotecas genómicas para secuenciación, se tomaron alrededor de 500 ng de RNA depletado como muestra de partida para construir las librerías usando el kit TruSeq® Stranded mRNA Illumina® siguiendo las instrucciones del fabricante (**Ver Anexo B-3**), usando un tiempo de fragmentación de 14 minutos para obtener librerías de 8 minutos, para obtener insertos de 200 a 400

pb y 15 ciclos de PCR para el enriquecimiento de las librerías. La calidad, tamaño y concentración de las librerías fue verificada por TapeStation o con Bioanalyzer 2100 y la cuantificación fue realizada por fluorometría usando el Kit Qubit™ dsDNA HS (High Sensitivity) de Invitrogen™.

2.2.1.8. Hibridación in-house con sondas para depleción de subunidades ribosomales de Mtb

Librerías obtenidas a partir del RNA de tres ratones diferentes por cada punto de sacrificio, fueron sometidas al proceso de hibridación con sondas diseñadas In-House por el Dr. Adrian Ochoa y cols del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Estas sondas biotiniladas capturan las secuencias de rRNA de Mtb con el fin de reducir al máximo la presencia de las mismas antes de enviarlas a secuenciar. Cada librería se hibridó por 72 horas con las sondas de depleción de rRNA haciendo rampas de temperatura de 95°C a 65°C (**Ver anexo B-4**), posteriormente con perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dyabeads MyOne Streptavidin C1; Invitrogen, CA, USA; Cat. 65001) y soluciones de lavado a rangos de temperatura de 65°C a 99°C se eliminaron gradualmente las sondas biotiniladas para posteriormente limpiar de ellas el rRNA capturado. Por otro lado, la librería no capturada se cuantificó por fluorometría con Qubit™ dsDNA HS (High Sensitivity) de Invitrogen™ y Bioanalyzer 2100. Las dos fracciones de librería; tanto las depletadas como las no depletadas fueron sometidas a validación por qPCR antes de realizar el proceso de secuenciación.

2.2.1.9. Validación por qPCR de librerías depletadas para subunidades de rRNA de Mtb

Para validar que se encontrara DNA bacteriano se realizó qPCR para amplificar DNA obtenido a partir de mRNA y rRNA. Se utilizaron dos sets de primers para montar reacciones independientes. La PCR para detección de mRNA se realizó en los tubos H1, H2, H3 y H4 (**Ver Anexo B-4**) y la PCR para detección de rRNA se realizó en los tubos H6 y H6 (**Ver Anexo B-4**).

2.2.1.10. Secuenciación

Una vez se realizó el control de calidad de las librerías hibridadas, se enviaron a secuenciar al INMEGEN (Instituto Nacional de Ciencias Genómicas) en la Ciudad de México, para ser secuenciadas por Illumina® Next Seq™ sistema de celda de salida por 500 ciclos, la secuenciación se realizó por en ambas hebras (Paired-end) y se obtuvieron en promedio 20 millones de lecturas por muestra.

2.2.1.11. Análisis bioinformático

Los datos de la secuenciación de transcriptomas completos arrojaron 100GB de información correspondientes a los transcriptomas de los dos aislamientos clínicos. Para el mapeo de las lecturas se utilizaron las secuencias de los genomas que se encuentran ya reportados en el NCBI con los números de acceso CP017596 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=CP017596>) para

Beijing Clásico 391 y CP010873 para Beijing-like 323 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP010873.1/>) [340].

- **Control de calidad:** Para verificar la calidad del proceso de secuenciación y detectar las posibles fallas de la misma, se realizó un análisis usando la herramienta MULTIQC (<https://multiqc.info/>) [341], el análisis produjo resultados de muy buena calidad en el proceso de secuenciación, la mayoría de las bases de ADN con puntajes de calidad por encima de 25, indicando pocos errores en la secuenciación.
- **Filtrado de secuencias con errores:** Para eliminar posibles errores de secuenciación, todos los datos se filtraron por medio de la herramienta TRIMMOMATIC (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>), con filtros de calidad de 25, y una longitud mínima de 50 nucleótidos.
- **Mapeo de secuencias a genoma de referencia:** Para los experimentos de mapeo se utilizó la herramienta SMALT del Instituto SANGER (<https://www.sanger.ac.uk/science/tools/smalt-0>). Cada una de las muestras se mapeó inicialmente a genoma de ratón, dividiendo cada archivo en dos partes: 1) Lecturas que mapeaban a genoma de ratón y 2) Lecturas que no mapeaban a genoma de ratón.
- Las secuencias que mapearon al genoma de ratón fueron removidas y las restantes fueron mapeadas contra el genoma de Mtb H37Rv y los genomas de los aislamientos de Mtb genotipo Beijing y Beijing-like disponibles en bases de datos.
- Dichos archivos de mapeo fueron luego utilizados para determinar la expresión de genes de las cepas Beijing y Beijing-like por medio de la herramienta featureCounts del paquete SUBREAD (<http://subread.sourceforge.net/>), en donde la expresión de genes es determinada de acuerdo al número de lecturas que mapea al gen.
- Los resultados de la expresión de genes en la bacteria se pueden ver en el archivo sobrantes de ratón mapeados a CP010873 y CP017586.xlsx, en donde se encuentra el identificador de cada gen, su función biológica (en caso de ser conocida) y el valor de expresión del gen en cada condición
- El diseño experimental se realizó analizando los transcriptomas de los genotipos CP017596 para la cepa Beijing (código interno - 391) y CP010873 para la cepa Beijing-like (código interno - 323), obtenidos los días 3, 14, 28 y 60.

Los análisis se han realizado con el siguiente flujo de trabajo:

- a). Análisis de expresión diferencial en el transcurso de la infección tuberculosa de la cepa Mtb Beijing 391 los días 14 Vs 3, 28 Vs 3 y 60 Vs 3
- b). Análisis de expresión diferencial en el transcurso de la infección tuberculosa de la cepa Mtb Beijing 391 los días 14 Vs 3, 28 Vs 14 y 60 Vs 28
- c). Análisis de expresión diferencial en el transcurso de la infección tuberculosa de la cepa Mtb 323 Beijing-like los días 14 Vs 3, 28 Vs 3

d). Análisis de expresión diferencial en el transcurso de la infección tuberculosa de la cepa Mtb 323 Beijing-like los días 14 Vs 3 y 28 Vs 14

e). Análisis de expresión diferencial entre Mtb Beijing 391 y Mtb 323 Beijing-like comparando su expresión el mismo día de la infección

Como resultado se tiene el listado de genes diferencialmente expresados en cada una de estas condiciones.

- **Análisis de genes diferencialmente expresados:** Para cada una de las condiciones comparadas, se tomaron los genes cuyo FDR fuese menor o igual a 0.05 ($FDR \leq 0.05$). Estos representan genes que desde el punto de vista estadístico están siendo diferencialmente expresados entre las diferentes condiciones evaluadas. Para estos genes se determinó la magnitud de la diferencia en expresión y se generaron gráficas representando el cambio de magnitud en la expresión de cada gen. Además de eso se asoció la función molecular del gen a su respectivo identificador con el fin de facilitar el análisis a nivel funcional y de ontologías de genes.
- **Mapeo de identificadores de genes a ontologías de genes:** Se utilizaron los recursos de la base de datos de Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) para asociar la gran mayoría de los genes de las cepas 391 Beijing-Clásico y 323 Beijing-like con las anotaciones de las ontologías de genes. Brevemente las ontologías de genes se constituyen como un lenguaje controlado sobre el cual se pueden determinar las funciones moleculares de los genes, los procesos biológicos en donde están involucrados y el compartimiento celular en donde están ubicados. Cada uno de los términos de las ontologías tiene un identificador que lo diferencia del resto. Con base en las ontologías es posible hacer un mapeo funcional de los genes de un organismo, en este caso en particular se trata de Mtb.
- **Análisis de enriquecimiento funcional:** Con base en las ontologías fue posible computar posibles enriquecimientos funcionales en los genes diferencialmente expresados para las condiciones evaluadas. Esto se hizo por medio del software GeneMerge [342]. Este análisis también se hizo para todas las posibles combinaciones de condiciones.

2.3 Resultados

2.3.1 Expresión global de genes de Mtb genotipos Beijing y Beijing-Like a partir de ratones Balb/c infectados con aislamientos clínicos colombianos 323 Beijing-Like y 391 Beijing-Clásico.

La aproximación metodológica utilizada se diseñó con el fin de detectar la mayor cantidad de genes bacterianos, utilizando como punto de partida para la obtención de material genético pulmones de murino infectados con Mtb genotipo Beijing, para identificar los genes diferencialmente expresados en las diferentes condiciones experimentales.

Al igual que con el RNA-seq del hospedador, el objetivo fue medir la expresión diferencial de genes de Mtb en fase temprana de infección (día 3 PI), fase de TB intermedia o latencia (Día 14 PI) y fase tardía o de TB activa (día 28 y 60 PI), para poder describir los cambios en la expresión de genes (Factores de virulencia bacterianos) a medida que progresa la enfermedad en los animales, de manera tal que se puedan explicar a nivel regulatorio los cambios fenotípicos observados en la cinética de infección y a su vez comparar los cambios en el perfil regulatorio entre los dos aislamientos clínicos utilizados en el presente trabajo.

2.3.1.1. Enriquecimiento bacteriano de pulverizados de pulmones infectados con Mtb

Antes de iniciar con el proceso de obtención de ácidos nucleicos bacterianos a partir de pulmones infectados, se plantearon estrategias encaminadas al enriquecimiento de las muestras, de manera tal que se pudiera garantizar la presencia de la mayor cantidad de bacterias posible y utilizar las muestras enriquecidas como punto de partida para la obtención de RNA para RNA-seq de la bacteria. La ultracentrifugación a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C del pulverizado diluido en solución de lisis suplementada con β -mercaptoetanol al 10%, resultó ser un paso previo eficiente para el enriquecimiento de las muestras, lo cual fue evidenciado con tinciones de ZN de las muestras; en la **Figura 2-2**, se observan las tinciones de las muestras sin enriquecer, comparadas con las muestras enriquecidas a los 3, 14, 28 y 60 días PI, en donde es evidente el aumento en la presencia de BAAR después de la ultracentrifugación de las muestras.

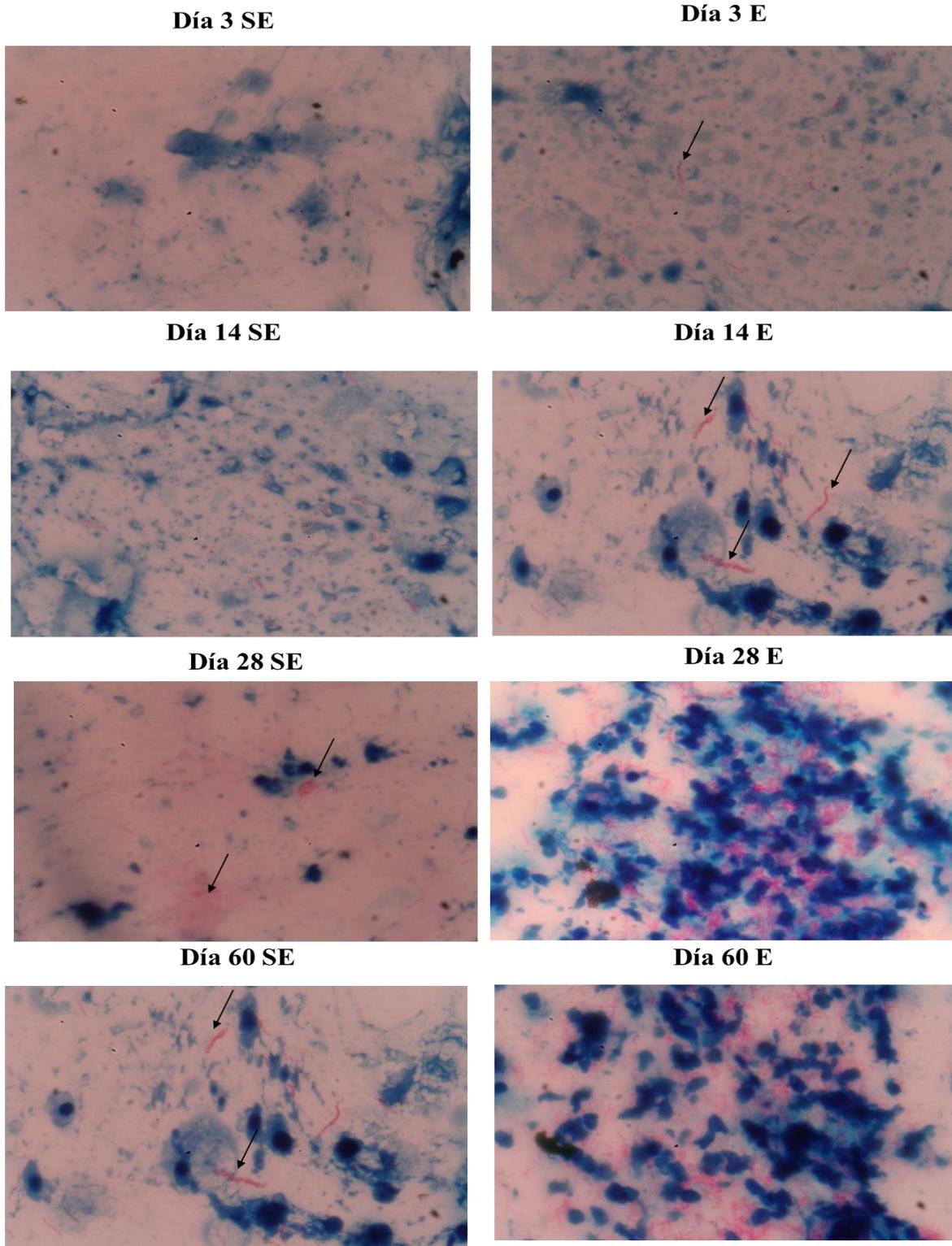


Figura 2- 2. Tinción por ZN de muestras de pulverizados pulmonares en solución de lisis sin enriquecer (SE) y enriquecidas (E) por ultra centrífugar a los días 3, 14, 28 y 60 PI. Las flechas indican los BAAR presentes en las preparaciones.

2.3.1.2. Control de calidad de RNA para RNA-seq de Mtb.

Posterior al proceso de enriquecimiento de las muestras se realizó la extracción y purificación de RNA en columnas de sílice, la cantidad y calidad se verificó midiendo la concentración y calidad por relación 260/280 en Epoch Microplate Spectrophotometer y la integridad de las subunidades ribosomales se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las muestras con relaciones 260/280 cercanas a 2.0 y con buena integridad verificada visualmente en las subunidades ribosomales, se les realizó electroforesis capilar para determinación de RIN (RNA Integrity Number) en Bioanalizador, las muestras con RIN superior a 7 fueron seleccionadas para secuenciación. En la **Tabla 2-1.**, se observan los resultados del control de calidad para cada una de las muestras.

Tabla 2- 1. Relación de la cantidad y calidad de las muestras enviadas a secuenciación de transcriptoma completo para Mtb a partir de pulverizados de pulmones infectados con aislamientos clínicos genotipo Beijing

Cepa Infectante	Día post-Infeción	Ratones enviados a secuenciar	Concentración ng/µl	260/280	RIN	Integridad Ribosomal Electroforesis Capilar
Beijing-Like 323	D3	R1	152,4	2,06	7,80	
		R2	95	1,90	9,10	
		R3	1345	1,90	8,00	
	D14	R1	73	2,06	9,00	
		R2	85	2,06	9,20	
		R3	141,5	1,90	9,00	
	D28	R1	141	1,95	8,60	
		R2	57	1,96	8,90	
		R3	100	2,00	9,00	
Beijing-Clásico 391	D3	R1	418,00	1,80	7,50	
		R2	82,82	8,00	9,40	
		R3	316,00	1,99	7,40	
	D14	R1	268,00	1,90	9,30	
		R2	352,00	2,01	8,00	
		R3	255,00	2,02	9,30	
	D28	R1	202,00	1,90	9,30	
		R2	131,00	1,90	9,40	
		R3	168,00	1,90	9,10	
	D60	R1	111,38	1,95	9,30	
		R2	171,26	1,99	9,00	
		R3	83,76	2,06	8,80	

2.3.1.3. Primera depleción de subunidades ribosomales

El ARN enriquecido con bacterias de cada muestra se trató con el kit Ribo-Zero (Illumina® Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit Cat. 20037135) siguiendo las instrucciones del fabricante para la depleción o eliminación de las subunidades ribosómicas de origen eucariota con el fin de obtener la mayor cantidad de mRNA antes de la construcción de las librerías. En las Tablas 2-2 y 2-3 se relacionan los resultados de electroforesis capilar de las muestras sometidas a primera ronda de depleción de subunidades ribosomales, las muestras en las que se observa una curva de distribución normal corresponden a perlas magnéticas que no son retenidas por las gradillas en el proceso de limpieza de las muestras.

Tabla 2- 2. Relación de resultados de electroforesis capilar para muestras provenientes de ratones infectados con 323 Beijing-Like.

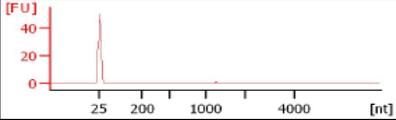
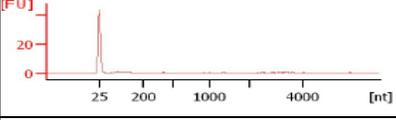
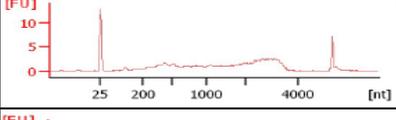
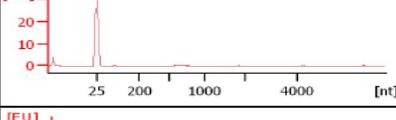
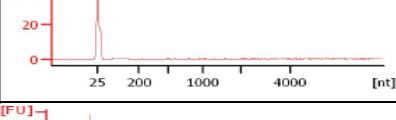
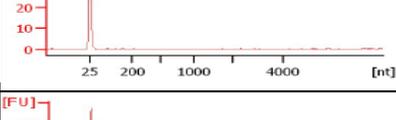
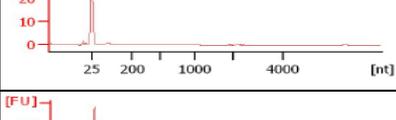
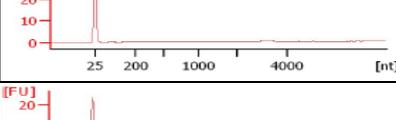
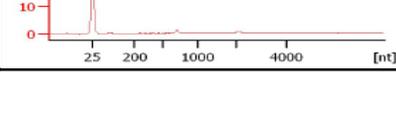
Cepa Infectante	Día post-Infección	Ratones enviados a secuenciar	RIN	Histograma de RNA depletado
Beijing-Like 323	D3	R1	3.0	
		R2	1.0	
		R3	2.0	
	D14	R1	NA	
		R2	2.7	
		R3	3.1	
	D28	R1	1.0	
		R2	1.1	
		R3	1.0	

Tabla 2- 3. Relación de resultados de electroforesis capilar para muestras provenientes de ratones infectados con 391 Beijing Clásico.

Cepa Infectante	Día post-Infección	Ratones enviados a secuenciar	RIN	Histograma de RNA depletado
Beijing-Clásico 391	D3	R1	4.0	
		R2	2.0	
		R3	NA	
	D14	R1	NA	
		R2	3.6	
		R3	NA	
	D28	R1	1.3	
		R2	2.8	
		R3	1.4	
	D60	R1	NA	
		R2	NA	
		R3	NA	

2.3.1.4. Elaboración de librerías genómicas a partir de RNA depletado para subunidades ribosomales.

Las librerías genómicas se construyeron utilizando el kit TruSeq® Stranded mRNA Illumina®, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración se verificó con Qubit™ dsDNA HS (alta sensibilidad) y el tamaño de las bibliotecas se evaluó con el kit de ADN de alta sensibilidad del sistema bioanalizador Agilent 2100 (Cat. 5067-4626) o por medio de High Sensitivity DNA ScreenTape Analysis Cat., 5067-5584. En las **Tablas 2-2 y 2-3** se relacionan los resultados de control de calidad para cada una de las librerías elaboradas a partir de RNA depletado para subunidades ribosomales.

2.3.1.5. Depleción de subunidades ribosomales de origen procariota por hibridación subtractiva in-house

Con el fin de eliminar el rRNA remanente y enriquecer el mRNA de Mtb, se utilizaron sondas biotiniladas específicas para hibridar y eliminar selectivamente el rRNA de Mtb de cada biblioteca por separado utilizando el protocolo descrito en el **Anexo B-4**. Para el control de calidad del proceso de hibridación subtractiva se realizó qPCR en cada muestra para verificar la presencia de mRNA y rRNA en las diferentes fracciones de muestra obtenidas durante el proceso de depleción de subunidades ribosomales (**Ver Anexo B-4**). Al evidenciar la presencia de mRNA en las muestras, estas fueron enviadas al servicio de secuenciación del INMEGEN en el secuenciador MiSeq Output cell a 500 ciclos en el formato de extremos pareados.

Tabla 2- 4. Tamaño de inserto y concentración de las librerías genómicas obtenidas a partir de RNA de pulmones de ratones infectados con 323 Beijing-Like.

Cepa Infectante	Día post-Infección	Ratones enviados a secuenciar	Tamaño Promedio de la Librería	Concentración promedio de librería pg/μl	Histograma de amplitud de librerías TapeStation o PicoChips Bioanalyzer
Beijing-Like 323	D3	R1	326 pb	317504	
		R2	351 pb	42900	
		R3	290 pb	172218	
	D14	R1	341 pb	20300	
		R2	321 pb	23000	
		R3	324 pb	20100	
	D28	R1	314 pb	24300	
		R2	319 pb	34500	
		R3	316 pb	21300	

Tabla 2- 5. Tamaño de inserto y concentración de las librerías genómicas obtenidas a partir de RNA de pulmones de ratones infectados con 391 Beijing-Clásico.

Cepa Infectante	Día post-Infección	Ratones enviados a secuenciar	Tamaño Promedio de la Librería	Concentración promedio de librería pg/ μ l	Histograma de amplitud de librerías TapeStation o PicoChips Bioanalyzer
Beijing-Clásico 391	D3	R1	317 pb	44279	
		R2	324 pb	91400	
		R3	392 pb	13521	
	D14	R1	309 pb	53200	
		R2	307 pb	117000	
		R3	332 pb	7348	
	D28	R1	305 pb	7325	
		R2	395 pb	25362	
		R3	341 pb	104727	
	D60	R1	328 pb	40444	
		R2	402 pb	31328	
		R3	304 pb	167737	

2.3.1.6. Análisis de lecturas y expresión global de genes de Mtb genotipo Beijing a partir pulmones infectados de ratones Balb/c.

Del proceso de secuenciación de transcriptomas completos de Mtb a partir de la infección de un modelo animal se obtuvieron 100 GB de datos de secuenciación en formato fastq, los cuales arrojaron valores adecuados para el control de calidad al ser analizados en MULTIQC con valores >25 con pocos errores en el proceso de secuenciación, los cuales fueron filtrados para obtener secuencias depuradas con la herramienta TRIMMOMATIC con valores de calidad >25.

Al cumplir con los filtros de calidad y limpieza de las lecturas, estas se utilizaron para ser mapeadas contra los genomas reportados para cada cepa de este estudio en el NCBI con los códigos de acceso CP017596 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=CP017596>) para 391 Beijing-Clásico y CP010873 para 323 Beijing-like (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP010873.1/>). Del proceso de secuenciación se obtuvieron en promedio 11.010.075,69 +/- 2.230.432,704 lecturas, de las cuales en promedio 62.430,83333 +/- 24.625,09151 (7,33% +/-1%) mapearon contra cada genoma de Mtb, las lecturas restantes pertenecieron al ratón al ser mapeadas contra el genoma de referencia *Mus musculus* (assembly GRCm38.p6). En promedio mapearon en secuencias codificantes para proteínas o mRNA de Mtb 58.219,78571 +/-24.263,09732 (92.80% +/- 4.30%), 0.74 +/- 0.62 (0.001%) lecturas mapearon contra tRNAs, 110,33 +/-100,78 (0,18 % +/-0,15%) lecturas mapearon contra ncRNA y 3315,73 +/-2424,68 (5.5% +/-3.38) mapearon contra rRNA lo que indica que las dos rondas de eliminación de subunidades ribosomales tanto de ratón como de Mtb fueron eficientes para la obtención de muestras enriquecidas en mRNA. En la **Figura 2-3**, se muestran los porcentajes del mapeo de lecturas para 323 Beijing-Like (**Figura 2-3A**) y 391 Beijing-Clásico (**Figura 2-3B**), en donde se observa que la mayoría de las lecturas de Mtb que se obtuvieron en el proceso de secuenciación, mapearon correctamente contra los genomas, en su mayoría en regiones codificantes para genes.

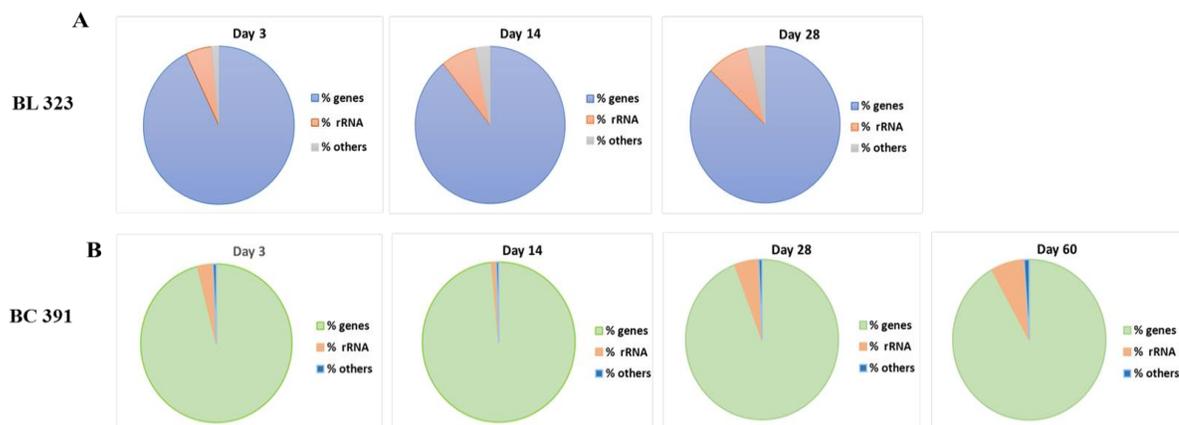


Figura 2- 3. Resultados del porcentaje de mapeo de lecturas contra mRNA y tRNA A). 323 Beijing-Like y B). 391 Beijing-Clásico.

De acuerdo a los resultados de mapeo de lecturas y a los tipos de RNA, se hizo un conteo de genes en donde mapearan 2 o mas lecturas, se realizó el promedio del número de genes detectados con las replicas y se obtuvo que para 323 Beijing-Like de 3789 (100%) genes anotados, se detectaron para el día 3 PI 1148 (30%); para día 14 PI, 1429 (37%) y para día 28 PI, 1493 (39%) y para 391 Beijing-Clásico al día 3 PI se encontraron 1323 (33%); para el día 14 PI 705 (18%); para el día 28 PI, 57 (34%) y para el día 60 PI, 1623 (41%). Aplicando la metodología aquí descrita, es posible detectar un ~33% del transcriptoma de Mtb en un modelo *in-vivo* de infección, lo cual es un resultado prometedor y muestra la eficiencia del enriquecimiento bacteriano por ultracentrifugación y la pertinencia de la eliminación del rRNA para poder secuenciar la mayor cantidad posible de mRNA, teniendo de esta manera una buena aproximación de la expresión de la manera más global posible y determinar como se da el proceso de regulación génica bacteriano en un hospedador animal, lo cual permite hacer predicciones sobre los mecanismos bacterianos durante el proceso de infección.

2.3.1.7. Clasificación funcional de genes DE en pulmones de ratones infectados con 323 Beijing-Like de acuerdo a categorías de TUBERCULIST

Una vez realizados los análisis globales de expresión diferencial y de hacer los análisis ontológicos de los genes, se categorizaron los genes obtenidos anteriormente en categorías funcionales de acuerdo a los grupos de TUBERCULIST (<https://mycobrowser.epfl.ch/genes/Rv0791c>), que agrupa los genes anotados a partir del genoma de H37Rv en 11 categorías funcionales principales: 1) Pared Celular y procesos celulares, 2) Proteínas hipotéticas conservadas, 3) Vías de Información, 4) Secuencias de inserción y fagos, 5) Intermediarios de metabolismo y respiración, 6) Metabolismo de lípidos, 7) Proteínas PE/PPE, 8) Proteínas regulatorias, 9) Proteínas de función desconocida, 10) Virulencia, detoxificación y adaptación y 11) Sin función asignada. A continuación, en la **Figura 2-4** se muestra la distribución del listado de genes DE en categorías funcionales. En el caso de los ratones infectados con 323 Beijing-Like, se obtuvo que a lo largo de la infección (día 3, 14 y 28 PI), más del 20% de los genes DE se agruparon en la categoría de genes que codifican para proteínas intermediarias del metabolismo y respiración, otro 20% se agruparon en la categoría de genes codificantes para proteínas asociadas a biosíntesis de pared celular y procesos celulares y otro porcentaje similar de genes se agrupó bajo la categoría de proteínas hipotéticas, los demás genes DE se distribuyeron en porcentaje similar en el resto de las categorías, sin embargo, las categorías con menor número de genes asociados fueron la categoría de proteínas con función desconocida y la categoría de secuencias de inserción y fagos. Estos resultados muestran que la expresión de genes asociada a cada uno de los grandes grupos de proceso biológicos bacterianos se mantiene casi invariable a lo largo de la infección, haciendo necesario hacer un análisis puntual de los genes DE, para de esta manera establecer diferencias a lo largo de la cinética de la infección, ya que como se observó en los análisis anteriores se produce una expresión diferencial de pocos genes que posiblemente brinden explicación sobre el comportamiento virulento de esta cepa.

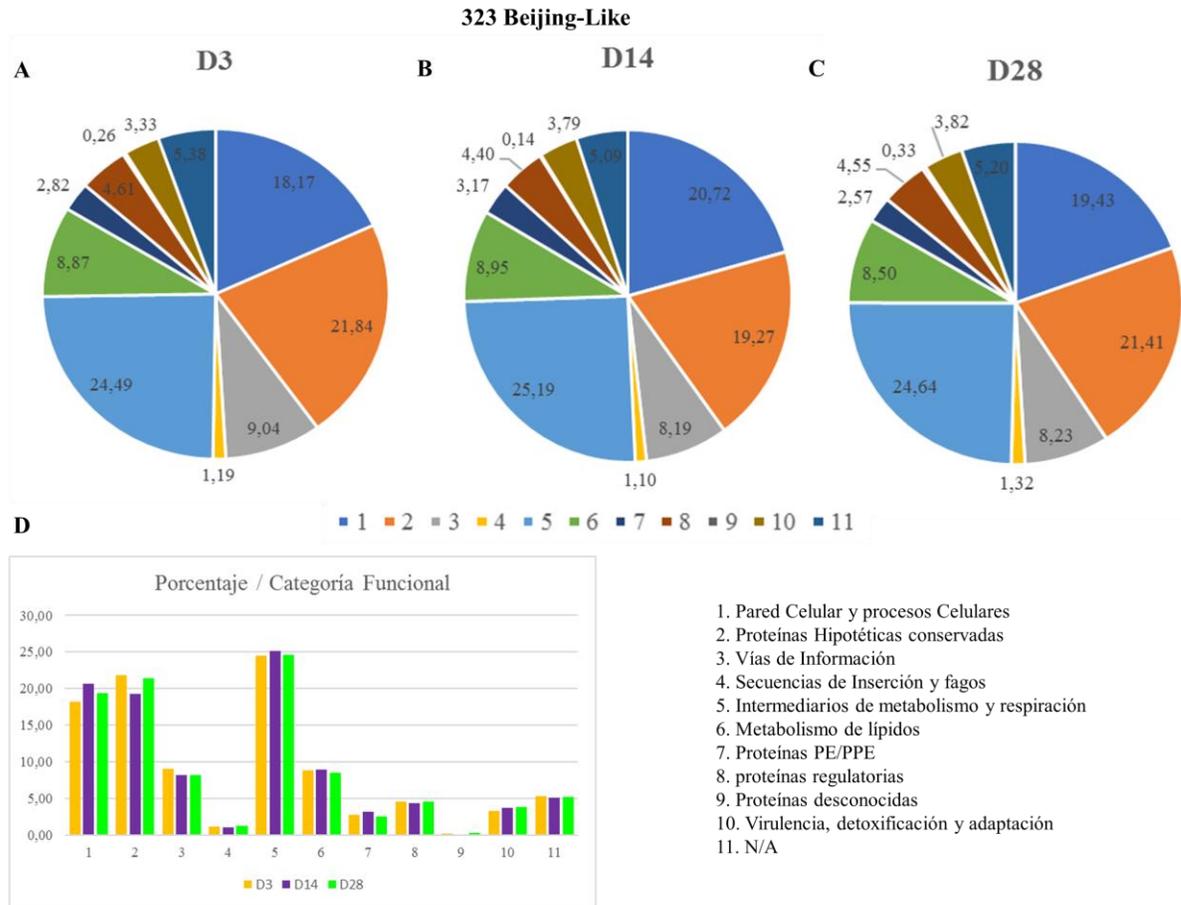


Figura 2- 4. Clasificación de genes diferencialmente expresados a partir de RNA-seq de pulmones de ratón Balb/c infectados con 323 Beijing-Like. **A)** Distribución en categorías funcionales al día 3 PI. **B)** Día 14 PI. **C)** Día 28 PI. **D)** Consolidado de porcentajes de genes en cada categoría funcional.

2.3.1.8. Genes de Mtb 323 Beijing-Like diferencialmente expresados en fase temprana, intermedia y aguda de TB en ratones Balb/c, evaluando la expresión diferencial de genes a lo largo de la infección.

Una vez se detectaron los genes de Mtb con las lecturas que mapearon contra regiones codificantes, se realizó la anotación de dichas regiones genómicas. Los archivos obtenidos del mapeo, fueron utilizados para determinar la expresión de genes de las cepas 323 Beijing-like y 391 Beijing-Clásico, utilizando la herramienta featureCounts del paquete SUBREAD (<http://subread.sourceforge.net/>), en la que la expresión de genes es determinada de acuerdo al número de lecturas que se mapean al gen. Inicialmente, la comparación para la detección de los genes diferencialmente expresados se realizó intra-cepa comparando el día 3, contra los días 14 y 28 PI para 323 Beijing-Like y adicionalmente día 60 para 391 Beijing-Clásico. Para cada una de las condiciones comparadas, se tomaron los genes cuyo FDR fuese menor o igual a 0,05 (FDR<=0.05). El listado de genes obtenido, representa genes que desde el punto de vista estadístico están siendo diferencialmente expresados entre las

condiciones evaluadas; para estos genes se determinó la magnitud de la diferencia en expresión y se le asignó su respectiva función molecular con su respectivo identificador.

Para observar de manera general como se llevó a cabo el proceso de expresión, con el listado de genes DE se construyeron mapas de calor para observar a groso modo la distribución de los mismos en los diferentes grupos experimentales, mostrando si hubo o no expresión compartida de dichos genes. En la **Figura 2-5** se muestra el mapa de calor generado por agrupamiento (clustering), el perfil de expresión global de genes para 323 Beijing-Like, en donde se observan los genes DE por cada replica biológica (n=3) y técnica (n=4). Se observan dos grandes grupos con un perfil de expresión diferente entre ellos, el primero conformado por los animales a los 3 y 14 días PI y el segundo grupo está conformado por los animales al día 28 PI.

Después de observar la distribución global de los genes DE, se determinó específicamente cuales genes mostraron o no expresión compartida al comparar el día 3 PI, con día 14 y 28 PI, de manera tal que se pusieron observar los cambios en la expresión a lo largo (progreso) de la enfermedad en los pulmones de los animales, por lo que se construyeron diagramas de Venn con cada comparación, así como gráficos de barras para obtener una visualización más clara tanto de la variación en la expresión de los genes detectados, como de los análisis de enriquecimiento en Gene Ontology (GO), para determinar las funciones metabólicas mas representadas con los genes DE en cada condición.

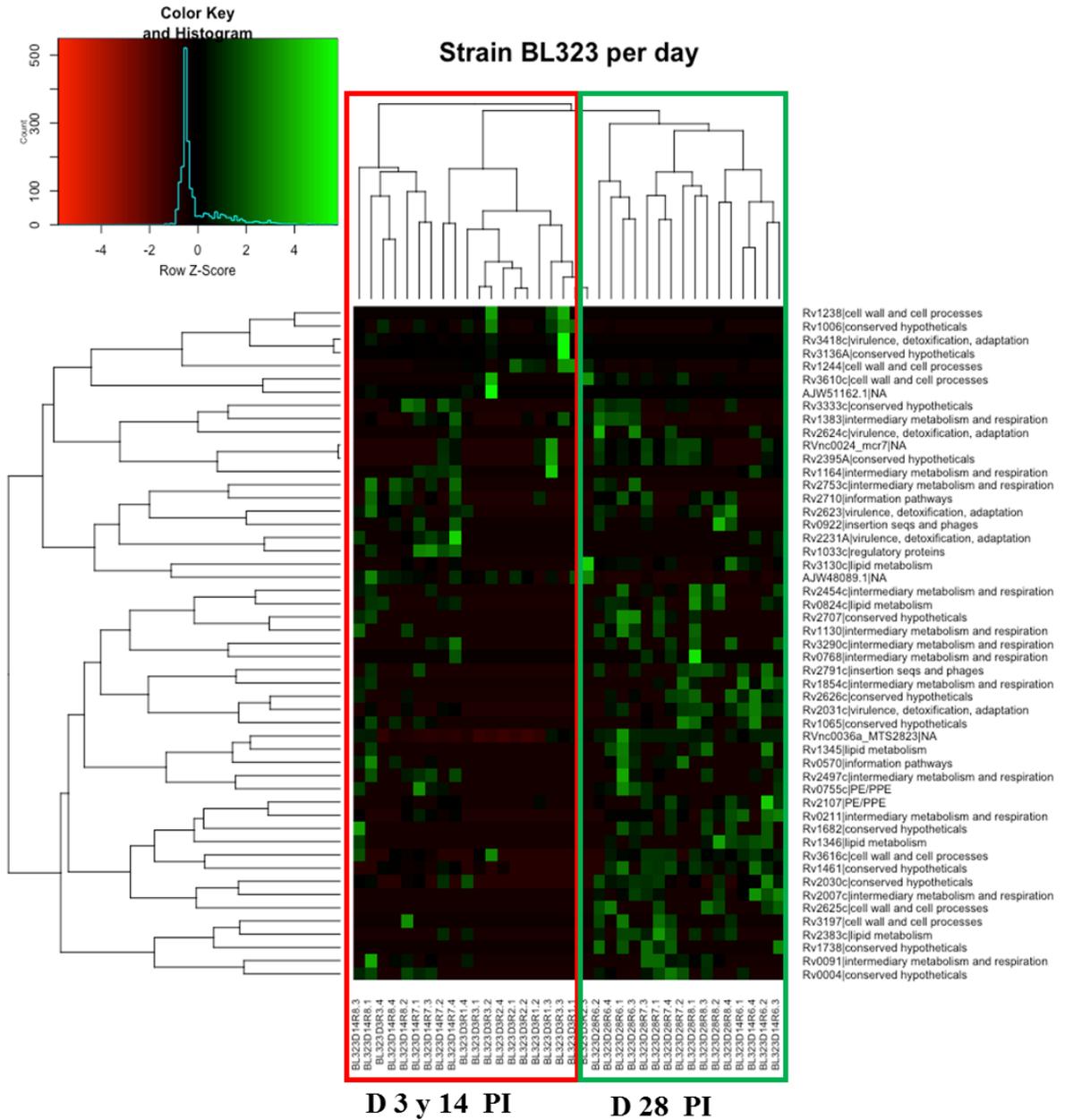


Figura 2- 5. Mapa de calor, muestra globalmente la expresión de genes de Mtb 323 Beijing-Like a los 3, 14 y 28 días PI días post-infección

En la **Figura 2-6** se esquematizan los resultados de los genes diferencialmente expresados de Mtb 323 Beijing-Like en tres fases distintas de la enfermedad comparando contra el día 3, los días 14 y 28 PI, en donde se obtuvo que para el día 14 vs 3 se encontraron 15 genes diferencialmente expresados (DE), de los cuales 8 se expresaron también al comparar 28 vs 3, adicionalmente se encontraron sobreexpresados 35 genes DE para un total de 43 genes DE. Por último, al comparar 28 vs 14 se encontraron 9 genes DE, de los cuales dos se expresaron negativamente en 14 vs 3 y 2 se expresaron negativamente en 28 vs 14.

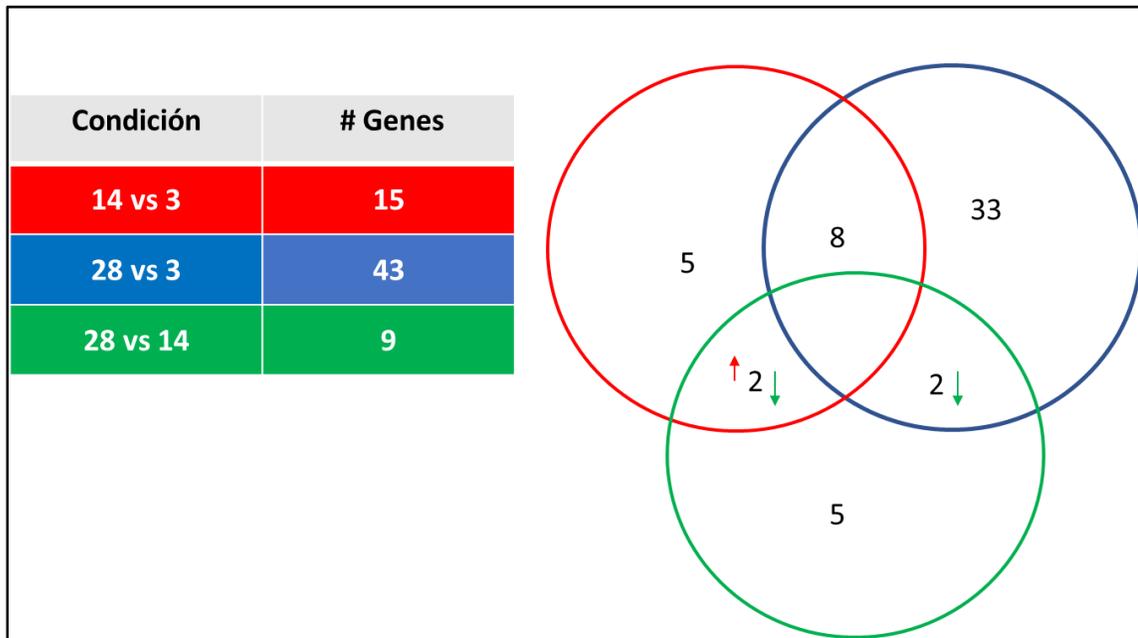


Figura 2- 6. Genes DE en el transcurso de la cinética de infección en ratón Balb/c para 323 Beijing-Like. La determinación de genes DE se realizó al comparar día 14 vs día 3 PI, día 28 vs día 3 PI y día 28 vs día 14 PI.

A partir del análisis de genes DE con los datos obtenidos con el programa Deseq y basándose en el valor del Fold-Change (FC), se obtiene que los genes con mayores niveles de expresión son el gen de la Fosfoenolpiruvato carboxiquiasa (*Rv0211*, UB21_01125), el cual se expresa 4,7 veces más en el día 14 comparado con el día 3, seguido del gen *HspX* o α -cristalina (*Rv2031c*, UB21_10745) con una expresión de 4,5 veces mas expresión al día 14 vs día 3 y una toxina-ribonucleasa (*Rv2231A*, UB21_11805) la cual se expresa 4,1 veces mas al día 14 vs 3 (**Figura 2-7, Tabla 2-6**).

323 Beijing-Like D14 vs D3

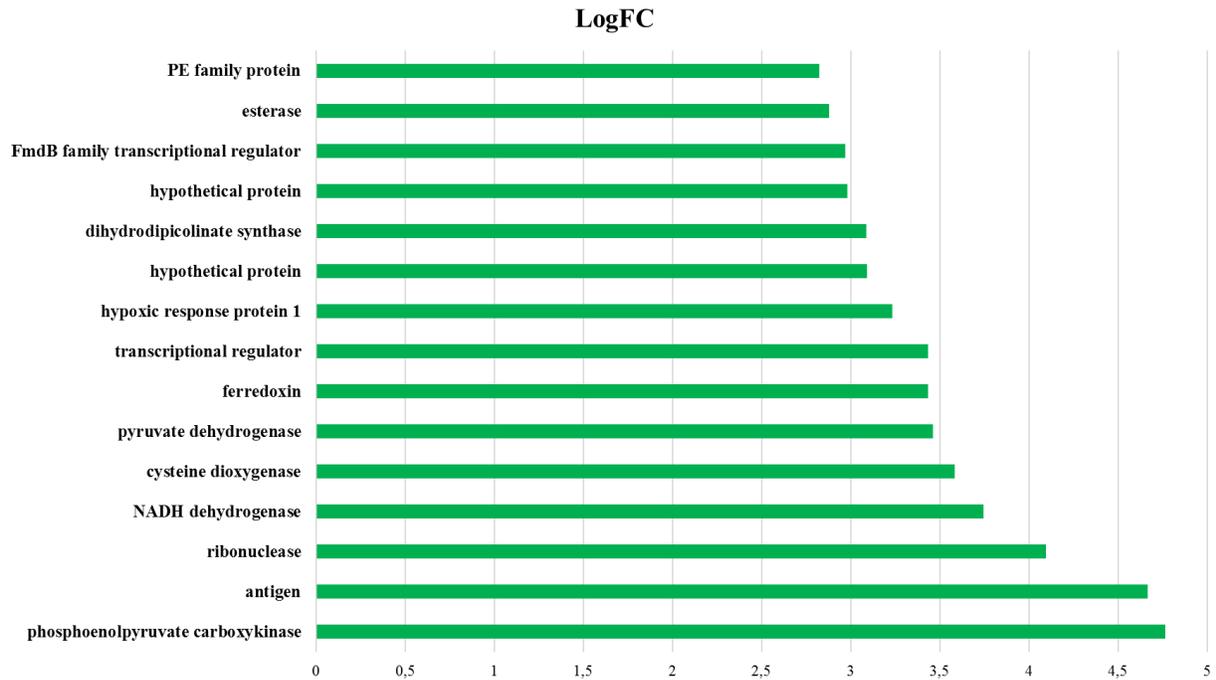


Figura 2- 7. Esquema de niveles de expresión de los genes DE encontrados al comparar día 14 vs día 3 PI de Mtb 323 Beijing-Like, obtenidos al calcular el Fold-Change (FC) $P < 0,005$.

Tabla 2- 6. Listado de genes sobreexpresados de Mtb 323 Beijing-like al día 14 vs 3 PI.

Gene id	Log FC	Log CPM	F	P-Valor	FDR	Descripción	H37Rv
UB21_01125	4,76438	6,286556	32,74404	1,05E-08	4,08E-05	Fosfoenolpiruvato carboxiquiasa	Rv0211
UB21_10745	4,665928	6,323558	30,57802	3,21E-08	6,22E-05	HspX	Rv2031c
UB21_11805	4,093847	5,689083	27,85223	1,31E-07	1,69E-04	ribonuclease, toxin	Rv2231A
UB21_09740	3,74447	5,738695	24,28152	8,60E-07	8,33E-04	NADH dehydrogenase	Rv1854c
UB21_05690	3,585101	5,748473	22,55484	3,24E-06	2,51E-03	cysteine dioxygenase	Rv1065
UB21_13260	3,463562	5,677991	21,10295	1,23E-05	6,80E-03	pyruvate dehydrogenase	Rv2497c
UB21_10595	3,434509	5,797616	20,80848	1,23E-05	6,80E-03	ferredoxin	Rv2007c
UB21_05500	3,434365	5,539757	19,29259	2,40E-05	1,16E-02	transcriptional regulator	Rv1033c
UB21_13940	3,233595	5,807637	18,70437	4,69E-05	2,02E-02	hypoxic response protein 1	Rv2626c
UB21_03985	3,092501	5,669055	17,50399	1,81E-04	4,67E-02	hypothetical protein	Rv0755c
UB21_14600	3,088266	5,612478	17,45962	9,19E-05	3,56E-02	dihydrodipicolinate synthase	Rv2753c
UB21_06470	2,98217	5,591367	16,41583	1,81E-04	4,67E-02	hypothetical protein	Rv1211
UB21_05260	2,971269	5,496508	14,93577	1,81E-04	4,67E-02	FmdB family transcriptional regulator	Rv0991c
UB21_01170	2,878059	5,715116	14,65379	1,29E-04	4,55E-02	esterase	Rv0220
UB21_11145	2,825271	5,868608	14,47697	1,42E-04	4,58E-02	PE family protein	Rv2107

Con la lista de los genes sobreexpresados al día 14 vs 3, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional haciendo la anotación de los genes por análisis ontológicos usando los recursos de la base de datos GeneOntology (**Figura 2-8**), con el fin de determinar las funciones moleculares de los genes DE, los procesos biológicos en los cuales se encuentran implicados y/o el compartimento celular en el que se encuentran ubicados. Basándose en las ontologías, es posible hacer un mapeo funcional de los genes de un organismo, en este caso cepas de genotipo Beijing. Al hacer la transformación del valor P de los datos, para comparar la función de cada gen contra el universo de genes presentes en el repositorio, se obtuvo que la función más sobrerrepresentada fue la de respuesta ante la respuesta inmune del hospedador; es decir que la maquinaria génica de la bacteria señala la expresión de genes que le permitan evadir o sobrevivir al ataque inmune del ratón en este caso. En segundo lugar, la otra función más sobrerrepresentada fue la de genes asociados a hipoxia, la sobreexpresión de estos genes se da como una respuesta adaptativa ante microambientes celulares deletéreos para la bacteria con bajas concentraciones de oxígeno, aunque a las dos semanas de infección, la bacteria se encuentra en un proceso de adaptación al microambiente celular, la evidente presencia de granulomas en gran número y tamaño, se asocia coherentemente con la activación de genes asociados con esta función que le permite a los bacilos estar en dormancia, a la espera de reactivación metabólica ante la aparición de condiciones más favorables.

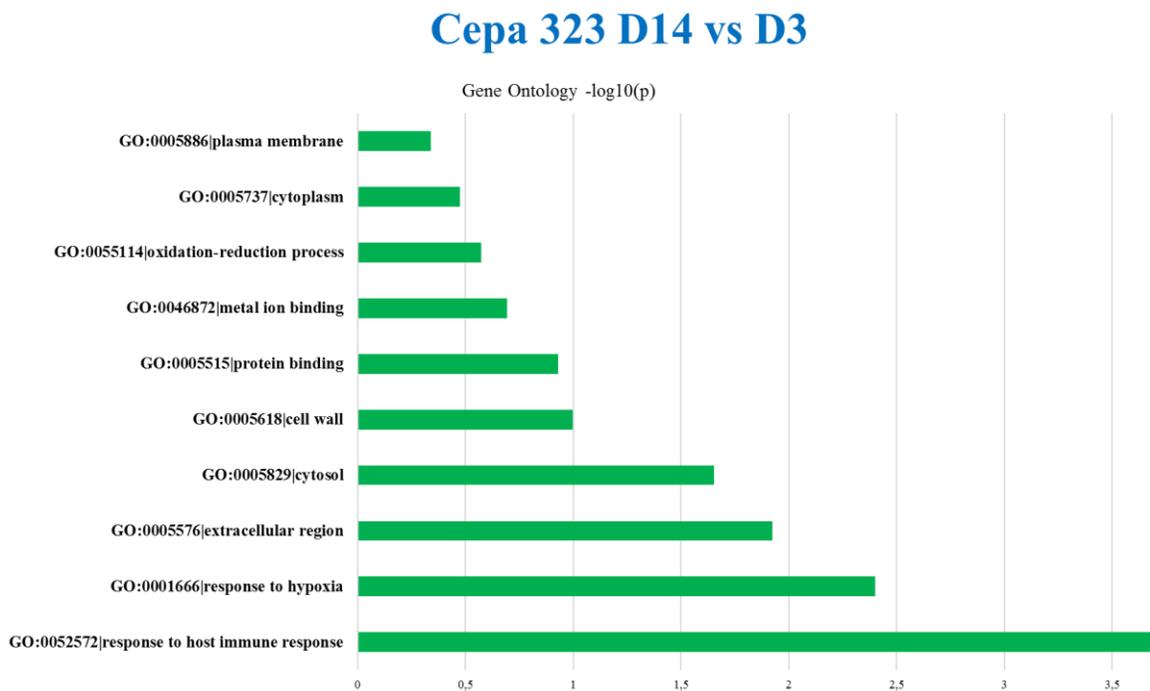


Figura 2- 8. Análisis ontológico de genes de Mtb 323 Beijing-like al día 14 vs 3 PI.

Posteriormente se realizó el mismo análisis para los genes DE al comparar 14 y día 28 PI, se obtuvieron 8 genes sobreexpresados (expresión compartida) entre el día 14 y día 28 PI, los cuales se relacionan en la **Figura 2-9** y son: fosfoenol piruvato quinasa (*Rv0211*), el cual esta involucrado

en la gluconeogénesis, en la formación y elongación de las cadenas de ácidos grasos, catalizando la conversión de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato dependiente de GTP, estos procesos favorecen la infección de los macrófagos por parte de las bacterias, gracias a la inducción en la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-12, y TNF- α por parte de las células inmunes de los ratones. También se observó la expresión del gen de la α -cristalina (*Rv2031c*), se ha observado que las bacterias que sobreexpresan este gen crecen más lentamente que las bacterias que no lo sobreexpresan, haciéndolas menos susceptibles a la autólisis después de la saturación del cultivo *in-vitro*, lo que sugiere que esta proteína puede ralentizar la tasa de crecimiento de Mtb en cultivo y durante la infección de macrófagos. El gen de la Probable NADH deshidrogenasa (*Rv1854c*), el gen de la ferredoxina *fdxA* (*Rv2007c*), el gen que codifica para la Proteína 1 de respuesta a hipoxia *hrp1* *Rv2626c*, el gen que codifica para la proteína hipotética no caracterizada de la familia PPE *PPE12* (*Rv0755c*) y el gen *PE22* (*Rv2107*) parte de la familia de proteínas PE [343].

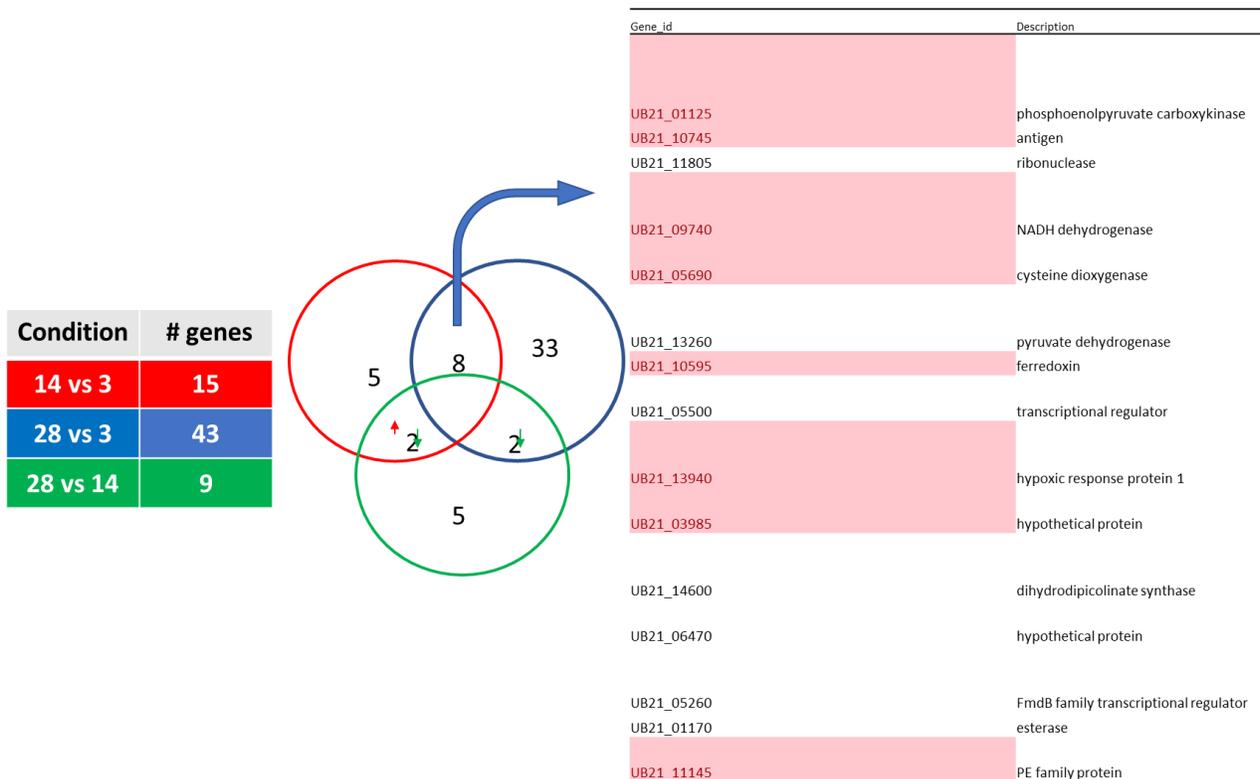


Figura 2- 9. Genes con expresión compartida al día 14 y 28 PI en 323 Beijing-Like

Por último, se hizo la comparación de los genes DE entre el día más temprano de infección (día 3) y el día más tardío de la infección (día 28), observando un mayor número de genes con expresión diferencial, en total 43 genes DE (**Figura 2-10 y Figura 2-11**). Los genes que mostraron expresión compartida con el día 14 se describieron anteriormente; entre los genes que se encontraron DE que más llaman la atención están el *espA* (*Rv3616c*) codificante para la proteína EspA asociada al sistema

de secreción ESX-1 el cual es requerido para la secreción de EsxA (ESAT-6) y EsxB (CFP-10) y para la virulencia en Mtb, involucrado en la translocación de bacterias del fagolitosoma al citoplasma. Por otro lado, el gen codificante para la proteína chaperonina de 10 Kda GroES (*Rv3418c* o *groS*) que acompaña la unión de ATP mediada por magnesio a la proteína chaperonina 2 Cpn60, suprimiendo la actividad ATP-asa, está involucrada en la respuesta celular al calor, en el plegamiento de proteínas y se sobreexpresa ante la presencia de antibióticos y en respuesta al calor. Otro gen de interés es el *sigB* (*Rv2710*) codificante para el factor Sigma B de la RNA polimerasa. En general, los factores sigma actúan como factores de iniciación que promueven la unión de la RNA Polimerasa a sitios específicos de iniciación de transcripción. Específicamente, el factor Sigma B es un factor no esencial principal que se activa ante condiciones de hipoxia y estrés en la envoltura celular, controlando un regulón de ~40 genes que están involucrados con la expresión de 100 genes adicionales que se alteran ante condiciones de estrés y otros ~50 genes que se alteran ante estrés oxidativo [344]. Por último, el gen *fadD13* (*Rv3089*) codificante para la proteína FadD13, la cual es requerida para el mantenimiento y composición adecuada de los ácidos micólicos, balanceando la permeabilidad de la envoltura celular ante la exposición a pH ácido, a partir de la catálisis de la activación de los ácidos grasos de cadena larga como el acyl-CoA, los cuales son transferidos como policétido sintasas (PKS) funcionales de tipo III para la posterior extensión en la longitud de las cadenas, en la **Figura 2-12** se observa el análisis ontológico de los genes DE [343].

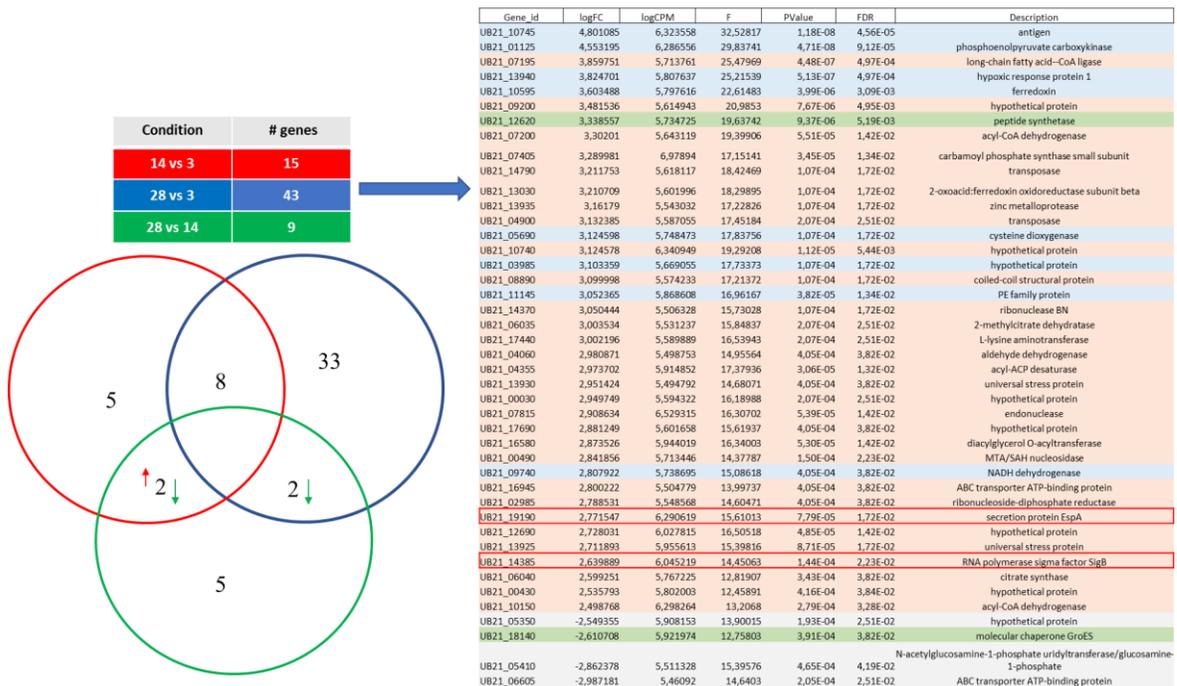


Figura 2- 10. Genes sobreexpresados al día 28 PI con respecto al día 3 PI en 323 Beijing-Like

323 Beijing-Like D28 vs D3

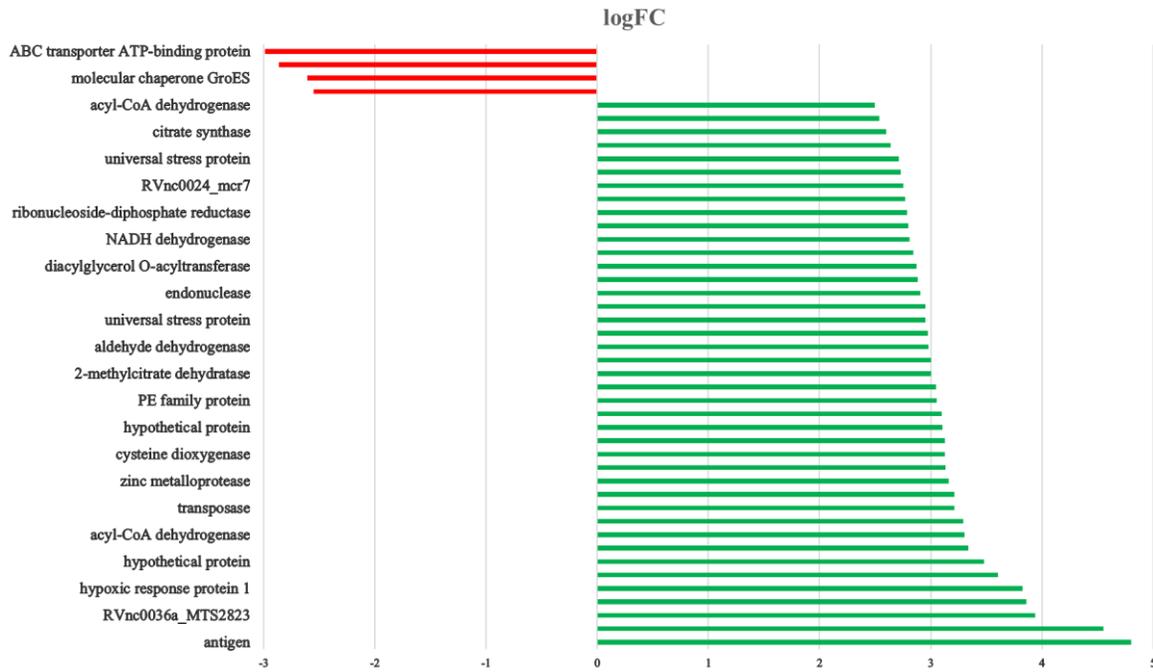


Figura 2- 11. Esquema de niveles de expresión de los genes DE encontrados al comparar día 3 vs día 28 PI de Mtb 323 Beijing-Like, obtenidos al calcular el Fold-Change (FC) $P < 0,005$.

Cepa 323 D28 vs D3

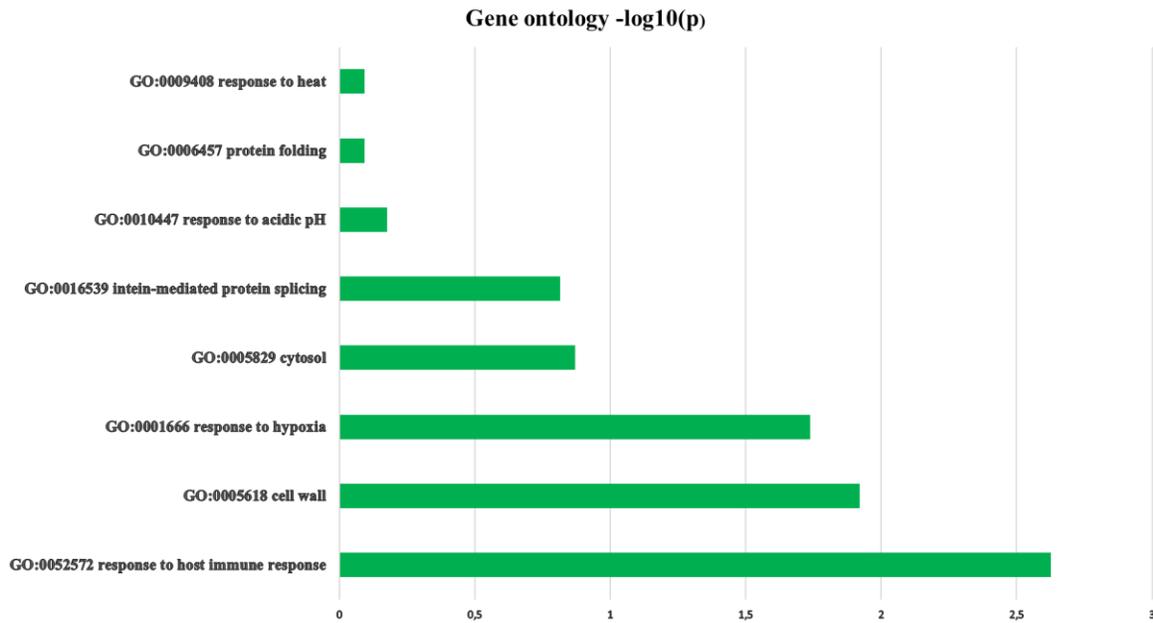


Figura 2- 12. Análisis ontológico de genes de Mtb 323 Beijing-like al día 3 vs 28 PI.

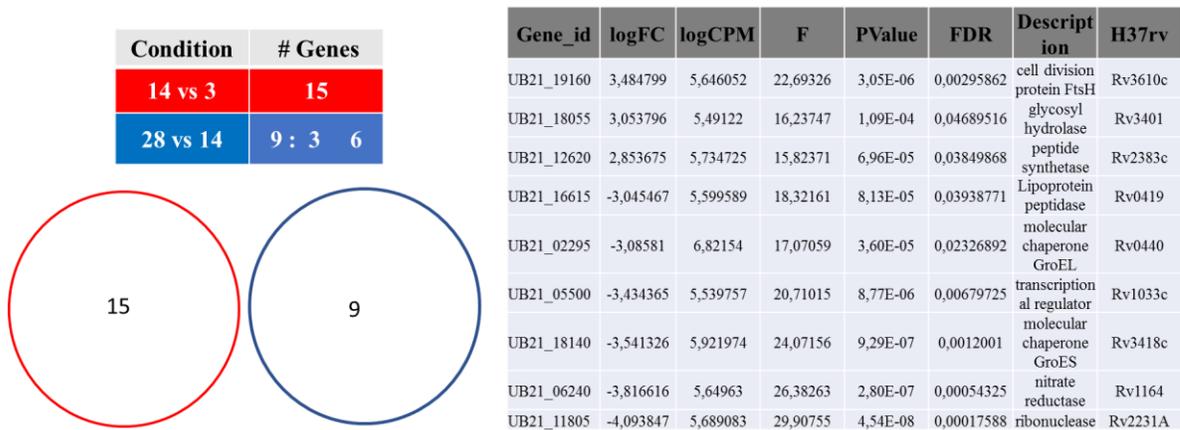


Figura 2- 13. Genes DE para 323 Beijing-Like al día 28 vs día 14 PI

Al analizar el listado de genes DE de acuerdo al logaritmo del Fold Change, comparando el día 14 PI con el día 28 PI se encontraron tres genes sobreexpresados, comenzando con el gen que codifica para la proteína metaloproteasa de zinc asociada a ATP Fsth (*Rv3610c*) que se expresa ~3.5 veces más al día 28 con respecto al día 14 PI y actúa como una metalopeptidasa de Zinc dependiente de ATP asociada a proteínas de membrana y citoplasma, con efecto sobre el control de proteínas integrales de membrana. En segundo lugar, se encontró el gen que codifica para la glicosil hidrolasa (*Rv3401*) no caracterizada, que se sobreexpresa ~3.1 veces más al día 28 PI y la péptido sintasa Feniloxazolona (*Rv2383c*), la cual se expresa ~2.9 veces más al día 28 PI, cuya función está asociada a los estadios iniciales de la vía biosintética de la micobactina, el cual es un proceso esencial para el crecimiento dentro de los marófagos **Figura 2-13** [343].

Cabe resaltar que, al hacer esta comparación, con el fin de determinar expresión diferencial durante la progresión de la enfermedad, se detectaron genes con expresión negativa. El menos expresado fue el gen que codifica para la ribonucleasa VapC16 (*Rv2231A*) el cual se expresó ~4.1 veces menos al día 28 con respecto al día 14 PI, esta proteína es un componente del sistema toxina-antitoxina tipo II con función RNAsa, seguido del gen que codifica para una posible enzima nitrato reductasa respiratoria sin caracterización a nivel funcional expresándose 3,81 veces menos al día 28 PI, y el tercer gen menos expresado fue el codificante para la proteína chaperonina molecular GroES (*Rv3418c*), con actividad supresora de ATPasa, expresándose 3.54 veces menos al día 28 PI. En esta fase de la enfermedad se detecta la expresión de genes asociados a un estado metabólico activo de la bacteria y en simultánea encontramos la expresión de genes asociados a metabolismo estático o reducido, sugiriendo una contrarregulación que puede estar desencadenada por la interacción de la bacteria con el sistema inmune, con un control somero de la infección con la persistencia de algunos granulomas en coexistencia con bacilos metabólicamente activos que en esta fase causan graves daños pulmonares en los animales con desenlace fatal **Figura 2-13 y Figura 2-14** [343].

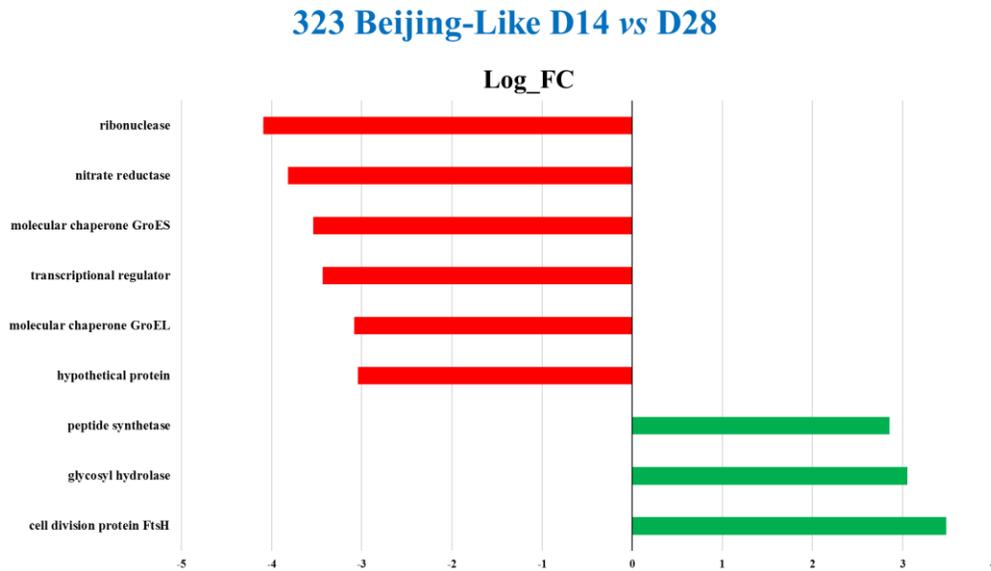


Figura 2- 14. Esquema de niveles de expresión de los genes DE encontrados al comparar día 14 vs día 28 PI de Mtb 323 Beijing-Like, obtenidos al calcular el Fold-Change (FC) $P < 0,005$.

En cuanto al análisis ontológico, se obtuvo que la función más sobrerrepresentada fue la de unión a proteínas no plegadas, seguido de genes activados en respuesta a hipoxia y genes con asociación y función a nivel extracelular, confirmando la coexistencia de bacilos con metabolismo activo produciendo TB activa y bacterias en dormancia o adaptándose a condiciones poco favorables para ellas en el microambiente en el que se encuentran **Figura 2-15.**

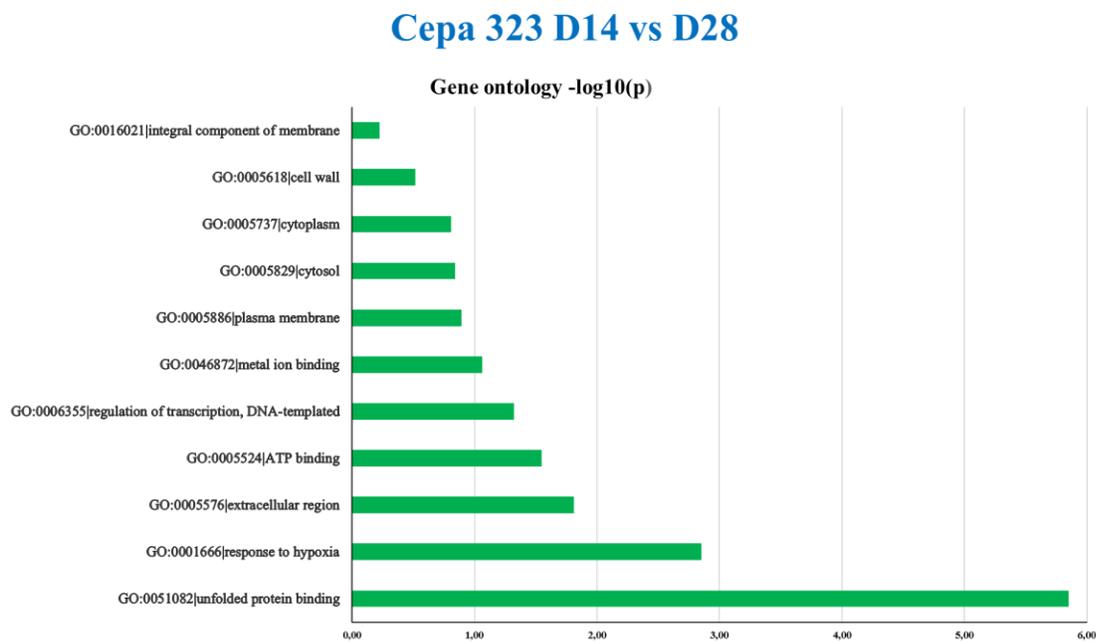


Figura 2- 15. Análisis ontológico de genes de Mtb 323 Beijing-like al día 14 vs 28 PI.

Por último, utilizando las lecturas que mapearon contra genes, se realizó un análisis de línea de tiempo, para visualizar la variación en la presencia de lecturas a lo largo de la infección (**Figura 2-16**) con un grupo de 15 genes observando que genes como los codificantes para α -cristalina, fosfoenolpiruvato quinasa, Hrp1, PE22 y ferredoxina muestran un mayor número de lecturas al día 28 que al día 14 PI, y genes codificantes para TrcR, VapC16 NADH deshidrogenasa disminuyen su expresión hacia el día 28. En conclusión, los análisis antes presentados, muestran una importante variación a nivel de la función de los genes que se encontraron DE a lo largo de la cinética de infección, mostrando que al inicio de la infección (Día 3 PI), se encontraron sobreexpresados genes que median los procesos en la célula hospedadora de procesamiento y presentación de antígenos, genes asociados a metabolismo bacteriano activo, en la producción de ácidos grasos, genes asociados a cadena respiratoria y metabolismo energético. Hacia el día 14 PI, se sobreexpresaron genes asociados a supervivencia intracelular, producción de energía, mantenimiento de integridad celular y además se sobreexpresaron genes como la α -cristalina y otros involucrados en la adaptación y supervivencia a microambientes adversos para la bacteria, permitiéndole sobrevivir y multiplicarse, como se pudo evidenciar en los experimentos in-vivo e in-vitro. Hacia el día 28 PI se regularon negativamente genes como el codificante para el regulador transcripcional *Rv1033c*, el cual se sobreexpresa como mecanismo de adaptación y transición de latencia a reactivación, sin embargo la disminución en la expresión en esta fase de la enfermedad se pudo generar gracias a la severidad de la enfermedad en los animales en esta fase de la enfermedad [343].

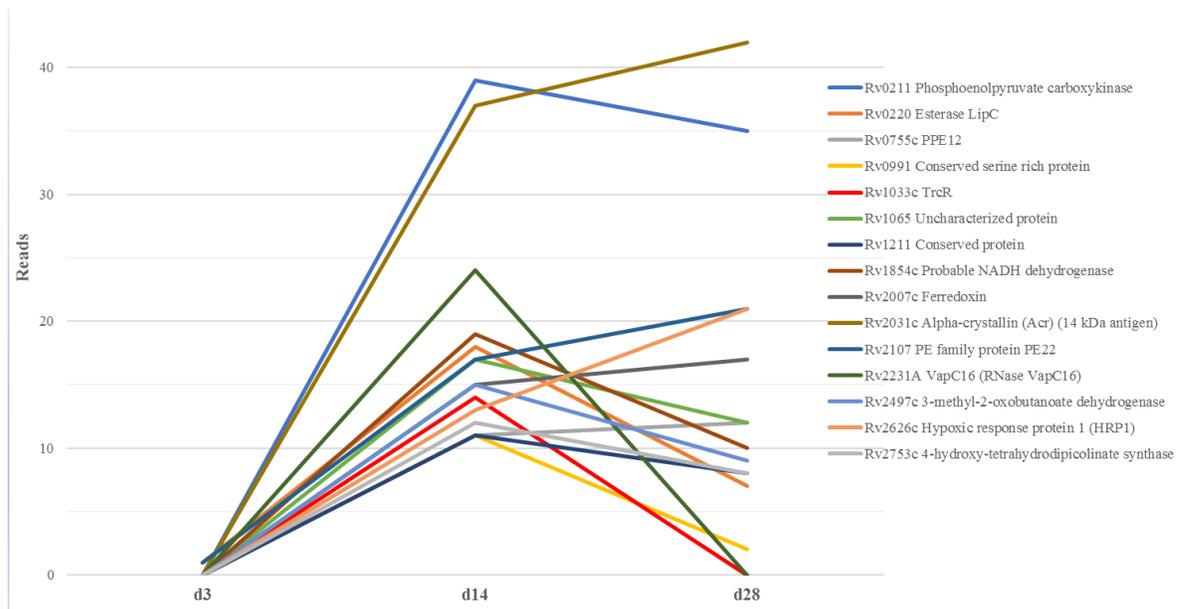


Figura 2- 16. Línea de tiempo generada a partir de las lecturas mapeadas contra genes para determinar la variación en la expresión génica a lo largo de la cinética de infección en 323 Beijing-Like.

2.3.1.9. Genes de Mtb 391 Beijing-Clásico diferencialmente expresados en fase temprana, intermedia y aguda de TB en ratones Balb/c.

Usando la misma secuencia de análisis para 323 Beijing-Like, se contruyó inicialmente un mapa de calor con los genes DE (**Figura 2-17**), en esta gráfica se forman dos grandes grupos de genes con un perfil global de expresión similar, el primer grupo está compuesto por los genes DE obtenidos al día 14 PI y el segundo grupo, incluye los genes DE en los animales al día 3, 28 y 60 PI. Es interesante anotar, que al igual que en el transcriptoma de los ratones, el perfil de expresión de genes al día 60 PI, tiende a ser el mismo que al inicio de la cinética de infección (día 3). Por otra parte, el perfil global de expresión es similiar entre el día 28 y día 60 PI que, para el caso de las bacterias estudiadas en este trabajo, estos son considerados días tardíos de la enfermedad. Fenotípicamente, la inflamación tisular es avanzada y hacia el día 60 incluso aparece necrosis tisular, en el ratón, se produce un cambio en la respuesta tratando de reestablecer la respuesta inmune proinflamatoria más benéfica para el hospedador pero, dicho cambio ya no tiene ningún efecto benéfico en el animal por el estado avanzado de daño en los pulmones, sin embargo este cambio regulatorio, seguramente desencadena un cambio en el perfil de expresión de la bacteria que también agrupa con el perfil generado en la fase temprana de la infección.

391 Beijing-Clásico

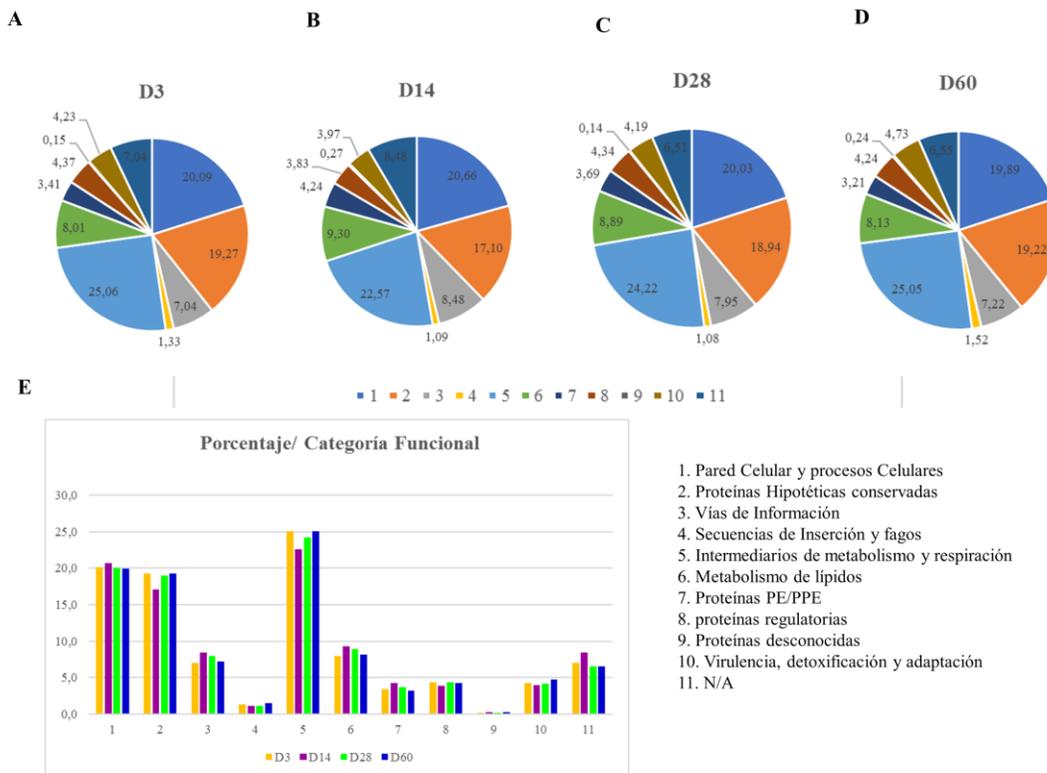


Figura 2- 17. Clasificación de genes diferencialmente expresados a partir de RNA-seq de pulmones de ratón Balb/c infectados con 391 Beijing-Clásico. **A)** Distribución en categorías funcionales al día 3 PI. **B)** Día 14 PI. **C)** Día 28 PI. **D)** Día 28 PI. **E)** Consolidado de porcentajes de genes en cada categoría funcional.

Para esta cepa también se contruyó un mapa de calor (**Figura 2-18**) generado por agrupamiento (clustering), el perfil de expresión global de genes para 323 Beijing-Like, en donde se observan los genes DE por cada replica biológica (n=3) y técnica (n=4). Los genes DE se agruparon de forma diferente a 323 Beijing-Like, en este caso se formó un grupo de genes al día 14 PI y otro gran grupo de genes a los días 3, 28 y 60 PI.

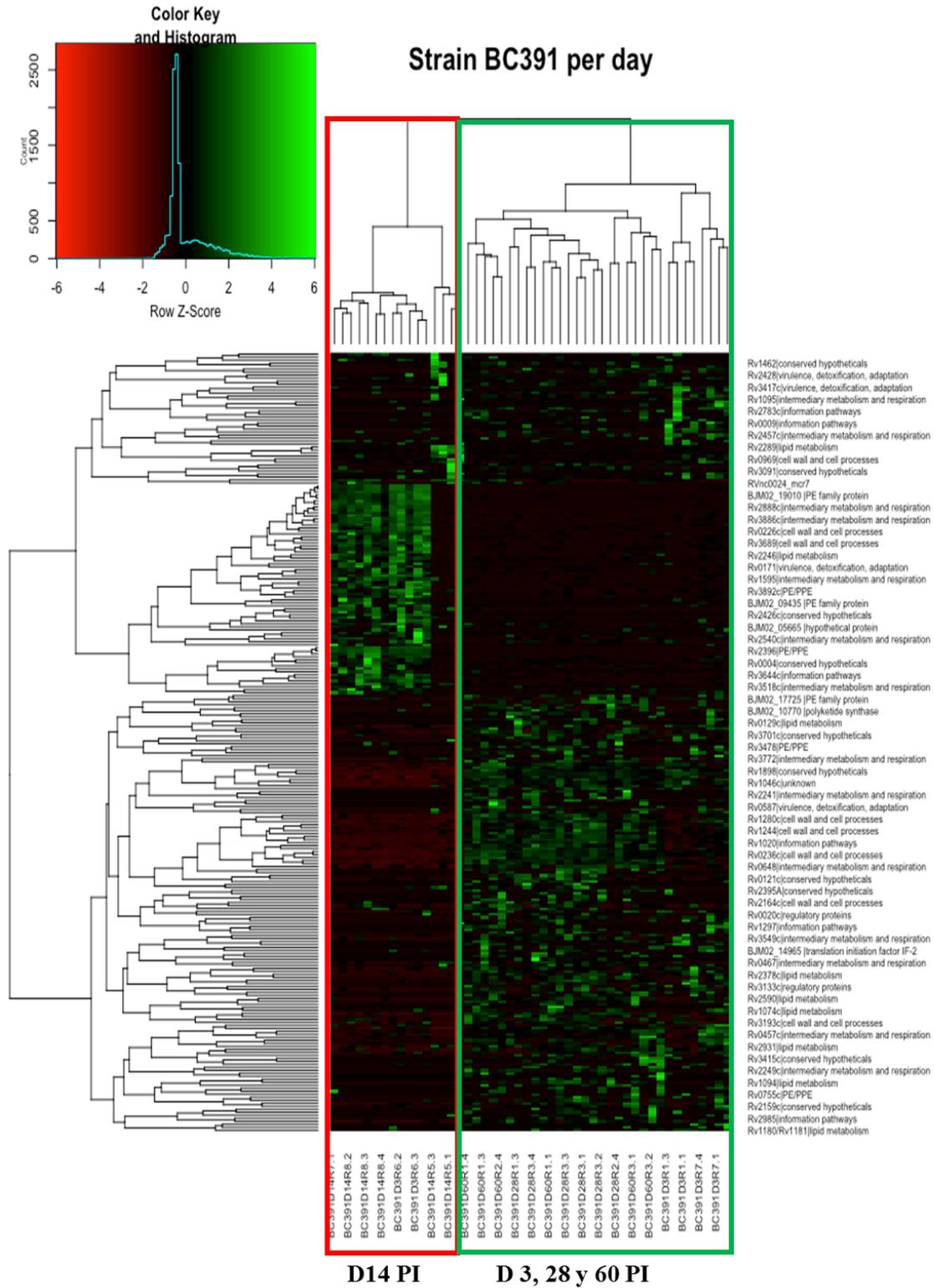


Figura 2- 18. . Mapa de calor, muestra globalmente la expresión de genes de Mtb 391 Beijing-clásico a los 3, 14, 28 y 60 días PI

Figura 2-19 se muestran los resultados de los genes DE de Mtb 391 Beijing-Clásico en tres fases distintas de la enfermedad comparando contra el día 3, los días 14, 28 y 60 PI se obtuvo que para el día 14 vs 3 se encontraron 19 genes expresados (DE), 17 de los cuales se expresaron negativamente y 2 se sobreexpresaron, 13 genes de 14 vs 3, también se encontraron DE al día 28 vs 14 y a su vez, este día se encontraron 113 genes DE, 43 sobreexpresados y 71 regulados negativamente; por último al comparar día 60 vs día 28 solo se encontró un gen DE, siendo concordante las observaciones encontradas aquí con el perfil global de expresión observado en el mapa de calor (**Figura 2-18**). En la **Tabla 2-7**, se muestra el listado de genes DE comparando día 14 vs día 3 PI, en donde se muestran los valores del FC, el valor de P y los genes con su respectivo indicador.

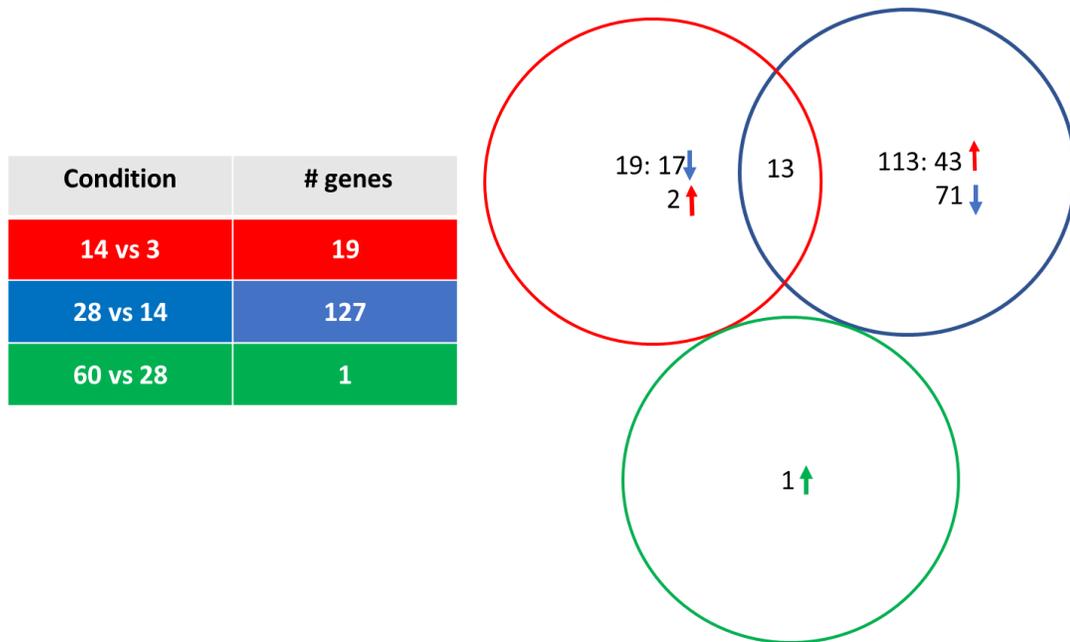


Figura 2- 19. Genes DE en el transcurso de la cinética de infección en ratón Balb/c para 391 Beijing-Clásico. La determinación de genes DE se realizó al comparar día 14 vs día 3 PI, día 28 vs día 14 PI y día 60 vs día 29 PI.

A partir del análisis de genes DE con los datos obtenidos con el programa Deseq y basándose en el valor del FC, se obtiene que los genes con mayores niveles de expresión son el gen de la Alquil Hidroperóxido reductasa (*Rv2428*), el cual se expresa 3.34 veces más en el día 14 comparado con el día 3, actuando como una peroxidasa específica de Tiol que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos a agua y alcoholes, esta función protege la célula bacteriana del estrés oxidativo por medio de la detoxificación de peróxidos, también protege la bacteria de los intermediarios de nitrógeno y el estrés oxidativo generado por la respuesta inmunológica del hospedador [345]. En segundo lugar, se encontró el gen *hemA* (*Rv0509*) codificante para la glutamil tRNA reductasa con una expresión de 1,6 veces más expresión al día 14 vs día 3, cuya función es la de catalizar la reducción de Glutamyl-tRNA a glutamato-1-semialdehído dependiente de NADPH, cuya importancia es la síntesis de componentes metabólicos bacterianos [343]. Uno de los genes más regulados a la baja fue el gen codificante para una proteína hipotética (*Rv1405c*) con expresión

negativa, FC-4.72 y el gen codificante para la proteína DusB (*Rv0832c*) también con expresión negativa FC-4.47, el cual cataliza la síntesis de 5,6, Dihidrouridina a una base modificada encontrada en el bucle D de la mayoría de los tRNA, involucrada en el transporte de mRNA a ribosomas para síntesis proteica (**Figura 2-20, Tabla 2-7**) [343].

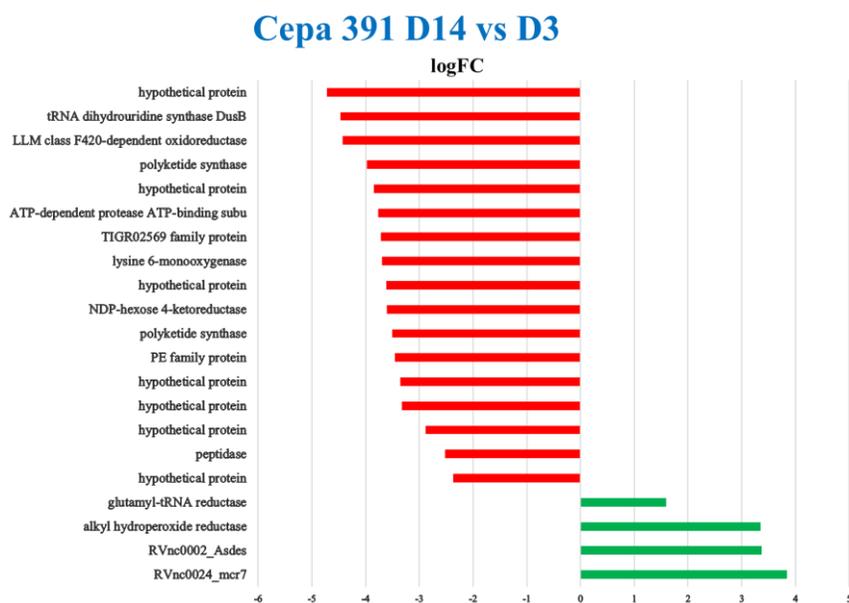


Figura 2- 20. . Esquema de niveles de expresión de los genes DE encontrados al comparar día 14 vs día 3 PI de Mtb 91 Beijing-Clásico, obtenidos al calcular el Fold-Change (FC) $P < 0,005$

Tabla 2- 7. Listado de genes sobreexpresados de Mtb 391 Beijing- Clásico al día 14 vs 3 PI.

Gene id	logFC	Log CPM	F	P-Value	FDR	Description	H37Rv
BJM02_12845	3,345743	5,460225	20,89692	2,19E-04	4,77E-02	alkyl hydroperoxide reductase	R2428
BJM02_02645	1,593293	19,728581	87,30406	9,41E-21	3,90E-17	glutamyl-tRNA reductase	Rv0509
BJM02_01240	-2,367552	17,679969	68,84416	1,07E-16	2,22E-13	hypothetical protein	Rv0236c
BJM02_02365	-2,524513	6,981821	16,85697	4,03E-05	1,17E-02	peptidase	Rv0457c
BJM02_10575	-2,884824	5,910414	18,15897	2,03E-05	6,48E-03	hypothetical protein	Rv2015c
BJM02_07100	-3,325589	7,982107	19,66058	9,25E-06	3,84E-03	Probable hydrolase	Rv1333
BJM02_09905	-3,35419	7,454645	20,05209	7,54E-06	3,47E-03	hypothetical protein	Rv1898
BJM02_04385	-3,449262	5,742028	18,94737	1,46E-04	3,37E-02	PE PGRS12	Rv0832
BJM02_20260	-3,506399	5,817726	19,16671	8,12E-05	1,98E-02	polyketide synthase 2	Rv3825c
BJM02_19040	-3,605175	5,683943	21,17627	4,52E-05	1,17E-02	clpE1	Rv3596c
BJM02_09420	-3,610097	7,221804	18,70069	1,53E-05	5,29E-03	PPE28	Rv1800
BJM02_12555	-3,690734	7,293612	21,88888	2,89E-06	1,71E-03	lysine 6-monooxygenase	Rv2378c
BJM02_16970	-3,718042	5,558746	22,67809	4,52E-05	1,17E-02	TIGR02569 family protein	Rv3205c
BJM02_12995	-3,768927	5,504738	23,21428	1,41E-05	5,29E-03	clpX	Rv2457c
BJM02_05540	-3,847241	7,648535	23,72615	1,11E-06	9,21E-04	hypothetical protein	Rv1046c
BJM02_06290	-3,980128	5,682018	25,9065	4,41E-06	2,29E-03	pks4	Rv1181
BJM02_04155	-4,426075	8,95608	22,23517	2,41E-06	1,67E-03	LLM class F420-dependent oxidoreductase	Rv0791c
BJM02_04320	-4,470263	9,243032	26,69808	2,38E-07	2,47E-04	tRNA dihydrouridine synthase DusB	Rv0832c
BJM02_07485	-4,721941	5,817271	36,48451	2,55E-09	3,53E-06	Putative methyltransferase	Rv1405c

Con la lista de los genes sobreexpresados al día 14 vs 3, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional haciendo la anotación de los genes por análisis ontológicos usando los recursos de la base de datos GeneOntology, Al hacer la transformación del valor P de los datos, se obtuvo que la función mas sobrerrepresentada fue la de plegamiento de proteínas seguida de cerca por la función de proteólisis y actividad peptidasa. Las funciones menos representadas fueron las asociadas a la membrana plasmática, componentes integrales de membrana, funciones asociadas a unión de ATP y de pared celular (**Figura 2-21**).

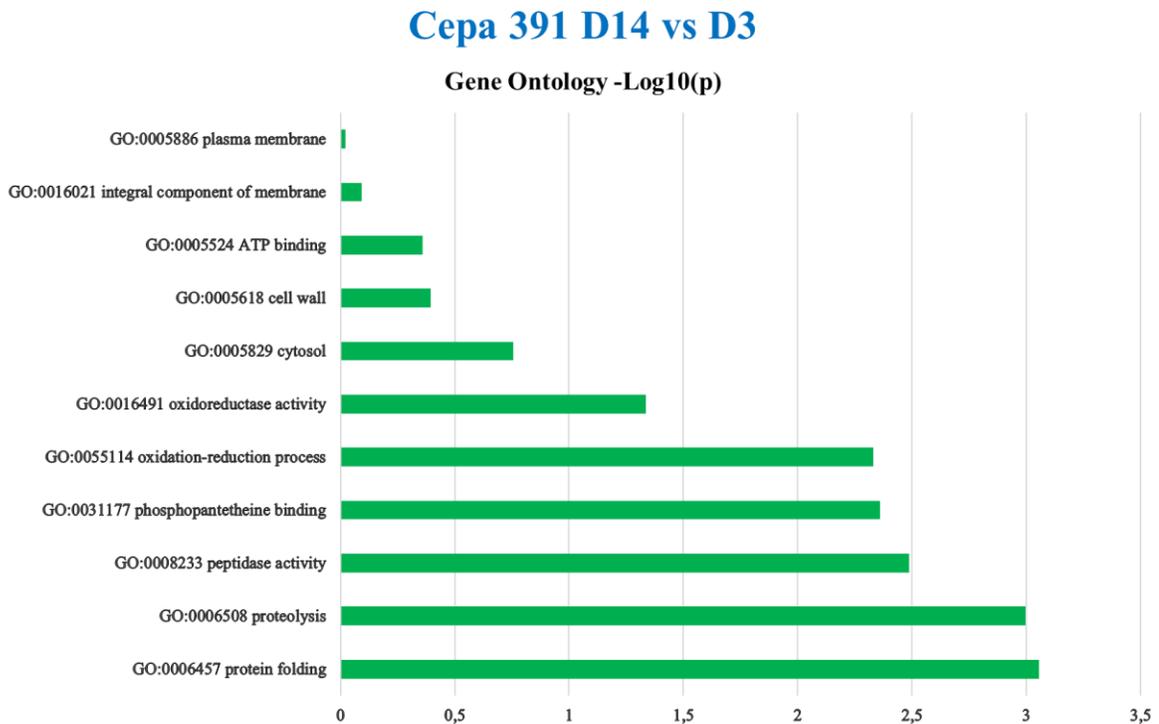


Figura 2- 21. Análisis ontológico de genes de Mtb 391 Beijing-Clásico al día 14 vs 3 PI

Siguiendo el esquema de análisis para cada cepa, se encontró que al comparar día 28 vs día 14, se encontró la sobreexpresión de 56 genes y una expresión negativa de 71 genes (**Figura 2-22, Tabla 2-8 y Tabla 2-9**). De los 56 genes sobreexpresados, los mas representativos son el gen codificante para LLM dependiente de F420 oxidoreductasa (luciferasa-like monooxigenasa) (*Rv0791c*, BJM02_04155), expresado 6.16 veces más al día 28 que en día 14, el gen codificante para la tRNA dihidrouridina sintasa DusB (*Rv0823c*, BJM02_04320) expresado 5,042768 veces mas al día 28 y el gen codificante para la PPE28 sin función caracterizada (*Rv1800*, BJM02_09420) expresado 4,964856 veces más al día 28 PI (**Tabla 2-8**).

Entre los genes regulados negativamente, se encontró que el gen *EccD* de secreción integral de membrana tipo VII (*Rv3448*, BJM02_18285) se expresa 8 veces menos al día 28 vs día 14 PI, este gen pertenece al sistema de secreción ESX-4, categorizado como un excelente blanco terapéutico

ubicado en pared celular y como componente integral de la membrana plasmática involucrado en el transporte de factores de virulencia micobacterianos. El gen codificante para la enzima amidasa AmiB2 *amiB2* (*Rv1263*) que se expresa 7 veces menos al día 28 PI involucrado en el metabolismo de glutamina, glutamato y nitrógeno importante para la biosíntesis bacteriana y el gen codificante para un miembro de la familia de proteínas hipotéticas PE_PGRS12 que se expresa 6,8 veces menos al día 28 PI al comparar con día 14 PI (Tabla 2-9) [343].

Cepa 391 D28 vs D14

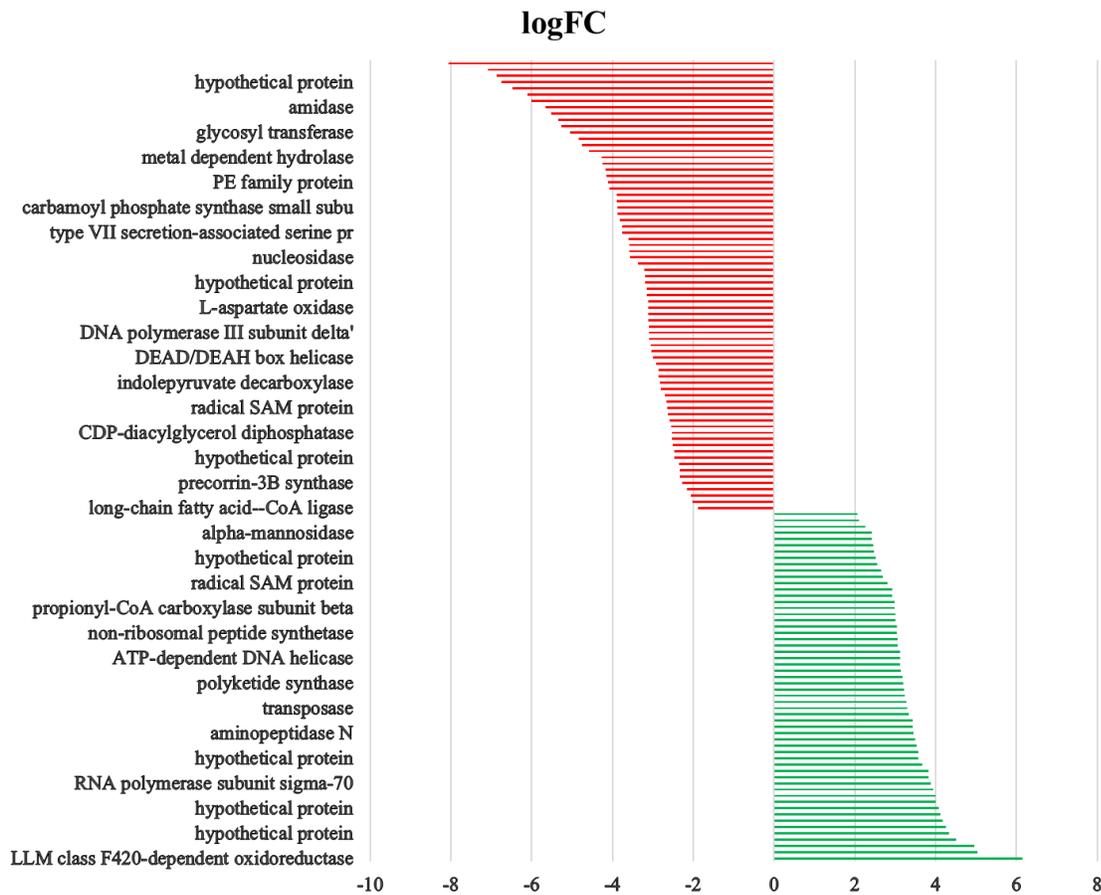


Figura 2- 22. Esquema de niveles de expresión de los genes DE encontrados al comparar día 14 vs día 28 PI de Mtb 91 Beijing-Clásico, obtenidos al calcular el Fold-Change (FC) $P < 0,005$.

Tabla 2- 8. Listado de genes de Mtb 391 Beijing-Clásico sobreexpresados al día 28 vs día 14 PI.

Gene id	logFC	logCPM	F	P-Value	FDR	Description	H37rv
BJM02_04155	6,161633	8,95608	43,1773	5,01E-11	1,09E-08	LLM class F420-dependent oxidoreductase	Rv0791c
BJM02_04320	5,042768	9,243032	33,44197	7,35E-09	8,97E-07	tRNA dihydrouridine synthase DusB	Rv0832c
BJM02_09420	4,964856	7,221804	39,25838	3,72E-10	7,01E-08	PPE28	Rv1800
BJM02_12555	4,51926	7,293612	34,82206	3,62E-09	5,00E-07	lysine 6-monooxygenase	Rv2378c
BJM02_05540	4,33696	7,648535	31,14205	2,40E-08	2,77E-06	hypothetical protein	Rv1046c
BJM02_06610	4,260357	7,155524	34,82066	3,62E-09	5,00E-07	Probable lipoprotein	Rv1244
BJM02_06790	4,185108	6,947319	33,06964	8,91E-09	1,05E-06	oppA Probable periplasmic oligopept	Rv1280c
BJM02_02065	4,125091	5,769533	28,16276	3,74E-07	3,10E-05	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	Rv0399c
BJM02_10680	4,090401	6,013957	25,3556	9,13E-07	7,01E-05	hypothetical protein	Rv2030c
BJM02_10615	4,006982	6,592016	29,84709	4,68E-08	5,17E-06	hypothetical protein	Rv2020c
BJM02_07100	3,993638	7,982107	28,89875	7,64E-08	7,54E-06	Probable hydrolase	Rv1333
BJM02_12190	3,941856	8,323141	28,05405	1,18E-07	1,09E-05	hypothetical protein	Rv2311
BJM02_00960	3,892185	7,420042	29,82315	4,74E-08	5,17E-06	RNA polymerase subunit sigma-70	Rv0182c
BJM02_04385	3,831653	5,742028	24,36633	3,50E-06	2,38E-04	PE PGRS12	Rv0832
BJM02_09905	3,82873	7,454645	27,04638	1,99E-07	1,79E-05	hypothetical protein	Rv1898
BJM02_20260	3,663317	5,817726	21,69504	1,35E-05	8,23E-04	pks2	Rv3825c
BJM02_07485	3,571515	5,817271	20,51425	3,34E-05	1,84E-03	Putative transferase	Rv1405c
BJM02_04120	3,567394	5,61443	21,48819	5,25E-05	2,47E-03	FAD-binding dehydrogenase	Rv0785
BJM02_01240	3,533462	17,679969	138,90298	4,75E-32	6,56E-29	hypothetical protein	Rv0236c
BJM02_08815	3,499813	6,969061	26,1088	3,23E-07	2,79E-05	hypothetical protein	Rv1676
BJM02_13055	3,456891	6,272694	24,37552	7,93E-07	6,20E-05	aminopeptidase N	Rv2467
BJM02_00650	3,4392	6,166289	25,09969	5,45E-07	4,34E-05	PPOX class F420-dependent oxidoreductas	Rv0121c
BJM02_05390	3,429572	7,34017	25,59379	4,22E-07	3,43E-05	transcription-repair coupling factor	Rv1020
BJM02_05815	3,341847	5,520212	18,90423	2,06E-04	8,82E-03	desA2 acyl-ACP desaturase	Rv1094
BJM02_04865	3,305227	5,402299	17,67747	2,06E-04	8,82E-03	transposase	Rv0922
BJM02_13210	3,277852	5,339893	16,0577	2,06E-04	8,82E-03	pdhA pyruvate dehydrogenase (acetyl-transfer	Rv2497c
BJM02_09775	3,241834	5,67968	17,58144	3,26E-04	1,33E-02	alpha-hydroxy-acid oxidizing enzyme	Rv1872c
BJM02_01430	3,230273	6,865987	22,73259	1,86E-06	1,29E-04	TetR family transcriptional regulator	Rv0273c

Tabla 2- 9. Listado de genes de Mtb 391 Beijing-Clásico expresados negativamente al día 28 vs día 14 PI

Gene_id	logFC	logCPM	F	P-Value	FDR	Description	H37rv
BJM02_20575	-3,749789	7,008215	36,38209	1,62E-09	2,81E-07	type VII secretion-associated serine pr	Rv3886c
BJM02_00095	-3,765069	5,665208	34,29034	4,76E-09	6,36E-07	pknB serine/threonine protein kinase	Rv0014c
BJM02_17500	-3,824659	6,55265	39,56056	3,19E-10	6,29E-08	phosphomannomutase	Rv3308
BJM02_19010	-3,867353	10,052548	24,01953	9,54E-07	7,19E-05	PE_PGRS58	Rv3590c
BJM02_07370	-3,880945	6,417204	35,49228	2,57E-09	3,94E-07	carbamoyl phosphate synthase small subu	Rv1383
BJM02_01125	-3,887317	5,612005	35,01528	5,84E-08	6,05E-06	faddD4 acyl-CoA synthetase	Rv0214
BJM02_13580	-3,892575	5,99493	34,86878	3,53E-09	5,00E-07	transglutaminase	Rv2566
BJM02_01155	-4,079766	5,645517	38,4088	6,71E-09	8,43E-07	lipC esterase	Rv0220
BJM02_17840	-4,109842	7,326351	40,46159	2,01E-10	4,17E-08	PE family protein	
BJM02_00905	-4,152467	5,586893	39,68655	2,28E-09	3,64E-07	mce1C mammalian cell entry protein	Rv0171
BJM02_18570	-4,16583	9,488278	28,24498	1,07E-07	1,01E-05	PE-PGRS family protein	
BJM02_01185	-4,249537	6,282803	45,66402	1,41E-11	3,43E-09	hypothetical protein	Rv0226c
BJM02_20110	-4,261253	5,767916	41,15929	7,76E-10	1,40E-07	metal dependent hydrolase	Rv3796
BJM02_19520	-4,57055	6,194364	46,54949	8,96E-12	2,32E-09	hypothetical protein	Rv3689
BJM02_04570	-4,761432	15,019774	74,2719	6,86E-18	5,69E-15	Resuscitation-promoting factor RpfA	Rv0867c
BJM02_05295	-4,84244	6,918596	48,93788	2,65E-12	7,85E-10	dolichyl-phosphate-mannose--protein man	Rv1002c
BJM02_08000	-5,04952	5,987054	56,18559	6,62E-14	2,88E-11	glycosyl transferase	Rv1500
BJM02_12825	-5,267272	6,571283	55,15052	1,12E-13	3,87E-11	ATPase	Rv2426c
BJM02_07735	-5,344007	12,605453	44,5071	2,54E-11	5,85E-09	PE family protein	
BJM02_01725	-5,508468	8,644461	47,22032	6,36E-12	1,76E-09	TetR family transcriptional regulator	Rv0330c
BJM02_06710	-5,659707	6,971139	57,10421	4,15E-14	2,15E-11	amidase	Rv1263
BJM02_05340	-6,000285	7,942945	58,77909	1,77E-14	1,05E-11	4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-	Rv1011
BJM02_07725	-6,102179	14,132662	79,74145	4,31E-19	4,46E-16	hypothetical protein	
BJM02_04470	-6,479405	7,335709	67,72216	1,89E-16	1,31E-13	lpkS probable lipoprotein	Rv0847
BJM02_11395	-6,750713	9,000615	56,09377	6,94E-14	2,88E-11	hypothetical protein	
BJM02_12660	-6,866256	11,23653	54,47966	1,58E-13	5,03E-11	PE family protein	
BJM02_15225	-7,078	10,055721	55,21859	1,08E-13	3,87E-11	amidase	
BJM02_18285	-8,056676	15,440334	182,87379	1,20E-41	4,96E-38	EccD type VII secretion integral membrane pr	Rv3448

Como es evidente, con 391 Beijing-Clásico, se encontró una mayor cantidad de genes DE; al hacer el análisis ontológico, la función mas sobrerrepresentada al día 28 PI en GO es la de unión a

fosfopantéina, seguida de la actividad hidrolasa de dímeros cíclicos y por último la actividad asociada al proceso metabólico de ácidos grasos (**Figura 2-23**).

Cepa 391 D28 vs D14

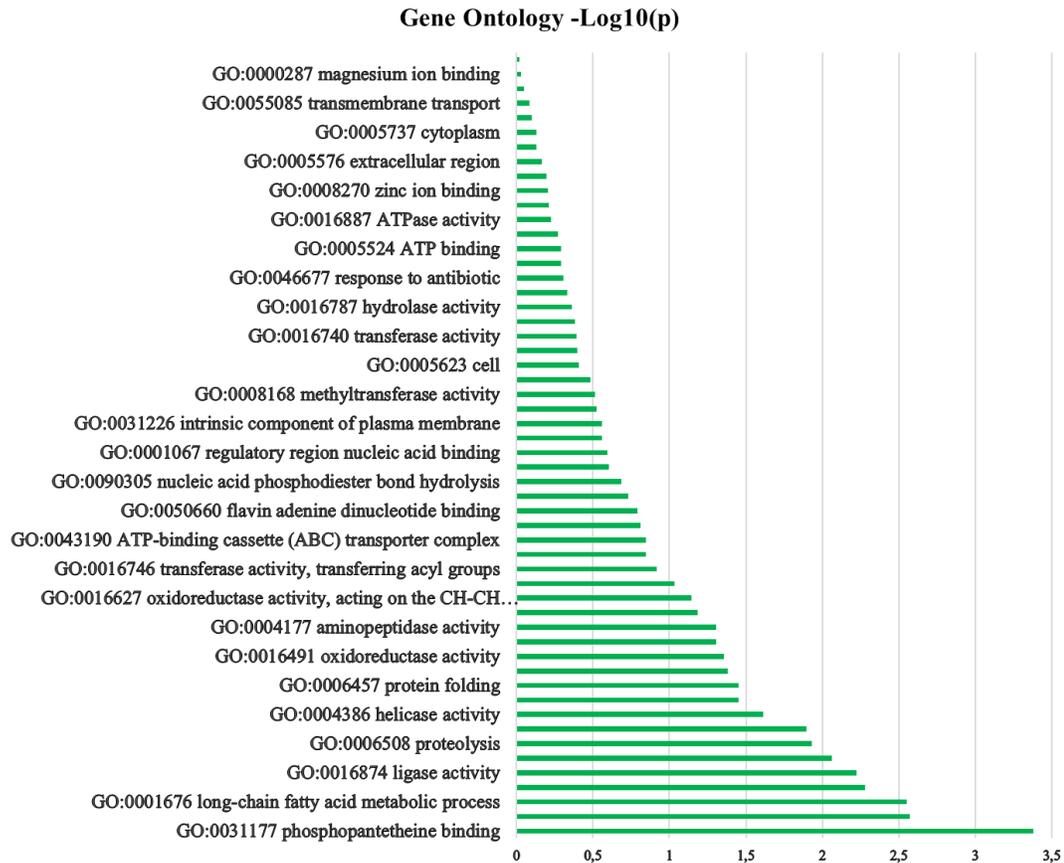


Figura 2- 23. Análisis ontológico de genes de Mtb 391 Beijing-Clásico al día 28 vs 14 PI

Como resultado de la construcción de la línea de tiempo a partir de las lecturas obtenidas del transcriptoma a lo largo de la cinética de infección, se observó que en el día inicial (Día 3 PI) un grupo de genes mostraron un nivel basal de expresión el cual disminuyó abruptamente hacia el día 14 PI, encendiendo la expresión de nuevo hacia el día 28 PI y manteniéndose los niveles de expresión hasta el día 60 PI. En resumen, se observó la detección de una mayor cantidad de genes DE en 391-Beijing-Clásico que en 323 Beijing-like, además sobre todo el día 14 PI muestra un programa regulatorio muy diferente, obteniéndose un alto número de genes regulados negativamente, ofreciendo una posible explicación en cuando a la “cronicidad” en el progreso de la enfermedad y por ende en la sobrevivencia de los ratones por casi el doble de tiempo que con 323 Beijing-Like (**Figura 2-24**).

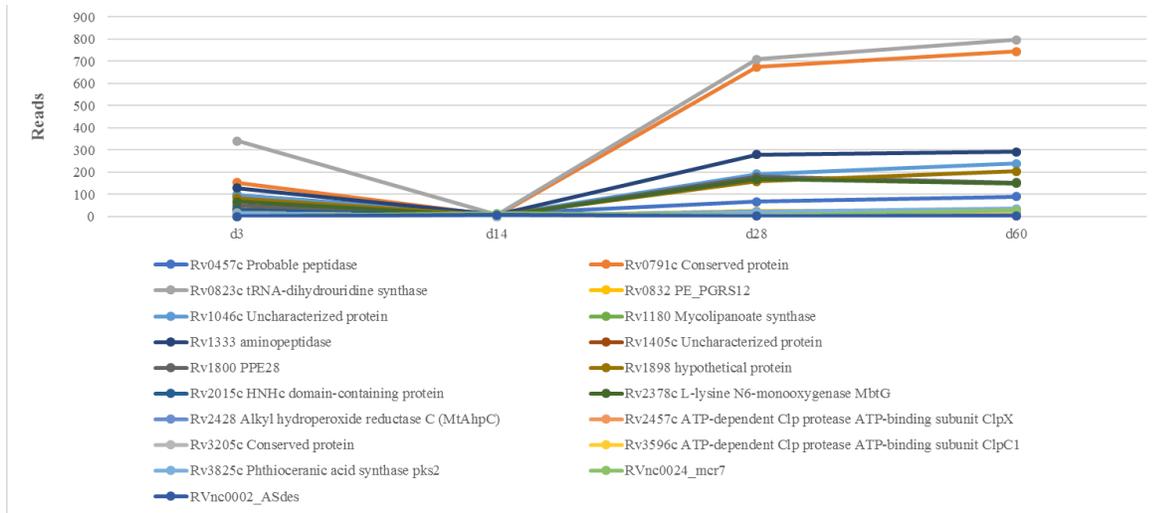


Figura 2- 24. . Línea de tiempo generada a partir de las lecturas mapeadas contra genes para determinar la variación en la expresión génica a lo largo de la cinética de infección en 391 Beijing-Clásico

Por último, al comparar día 60 vs día 28 solo se encontró un gen DE y fue el gen de la familia HAD hidrolasa (BJM02_08895), el cual se expresó 6.7 veces más al día 60 comparado con el día 28 PI.

2.4. Discusión

Disponer de una cantidad de material genético suficiente para la obtención de transcriptomas bacterianos completos por RNA-seq a partir de órganos de animales o humanos infectados con Mtb, requiere de la realización de complejas manipulaciones en el laboratorio para garantizar la disponibilidad de dicho material, debido a que Mtb es un patógeno intracelular, lo que genera una gran dificultad en el cumplimiento de este propósito.

En el presente trabajo, además de realizar la cinética de infección en el modelo de TB pulmonar progresiva crónica ratón Balb/c con tres aislamientos clínicos colombianos, dos de genotipo Beijing y uno de genotipo LAM y de la secuenciación del transcriptoma completo de los ratones infectados con las dos cepas del genotipo Beijing: 323 Beijing-Like y 391 Beijing-Clásico, en las tres fases de la enfermedad (temprana, intermedia y tardía), a partir de los pulmones de los ratones a los 3, 14, 28 y 60 PI; al igual que en el ratón, los días elegidos para la obtención de RNA para RNA-seq, se basó en los hallazgos fenotípicos (UFCs, Histología pulmonar) observados en los ratones a lo largo de la cinética de infección, seleccionando así los días PI en los que se observaron cambios claves a nivel histológico y en el caso de 391 Beijing-Clásico, tomamos el día 60 PI dado que en este punto logramos tener un grupo de animales vivos.

Gracias a la manipulación de los órganos infectados a temperaturas criogénicas para garantizar la integridad del RNA en las muestras, al proceso de doble lisis y al enriquecimiento de las muestras

por ultracentrifugación, seguido de las dos rondas de eliminación de subunidades ribosomales, una utilizando estuches comerciales basados en perlas magnéticas y el otro basado en sondas construidas in-house para hibridación substractiva de rRNA de Mtb, fue posible obtener un importante set de datos que nos permitió evaluar un poco más del 30% del transcriptoma bacteriano con ~1100 genes en promedio entre las diferentes réplicas biológicas.

La mayoría de trabajos de secuenciación de transcriptoma completo por RNA-seq dual o de Mtb, se ha llevado a cabo en infecciones in vitro de macrófagos de línea celular [346–348], aunque metodológicamente, la obtención de RNA para RNA-seq de Mtb es un proceso dispendioso y difícil, es más sencillo y la probabilidad de obtener una mayor cantidad de material genético aumenta, gracias a que es posible obtener grandes cantidades de células e infectarlas con números crecientes de bacterias (MOI) [346–348]. El trabajo con modelos in vivo aumenta el nivel de dificultad metodológico para el cubrimiento del transcriptoma bacteriano, ya que a pesar de estandarizar el inóculo con el que se infectan los animales, se producen muchas fuentes de variabilidad a lo largo de la infección, además de los mecanismos inmunes producidos por el hospedador animal que disminuyen la cantidad de bacterias, haciendo aún más complicado el proceso de secuenciación.

Recientemente, Pisu y cols [349]., realizaron RNA-seq dual a partir de la selección por citometría de flujo de macrófagos alveolares e intersticiales de pulmones infectados de ratones C56BL/6J (infectados con ~1000 UFCs). A los 4 días PI, obtuvieron alrededor de 4×10^4 macrófagos infectados de cada población los cuales fueron sometidos a la extracción de RNA por lisis diferencial con trizol y ultracentrifugación, el RNA obtenido se utilizó para RNA-seq usando la misma muestra para el transcriptoma de ratón y el de bacteria, con este proceso lograron detectar 274 genes de Mtb, nuestra metodología descrita ampliamente en los materiales y métodos, nos permitió detectar ~30% del transcriptoma de Mtb [349].

Otro estudio de secuenciación masiva de RNA a partir de pulmones infectados fue realizado por Skvortsov y cols., [350], en donde realizaron RNA-seq a partir del doble enriquecimiento por PCR de fragmentos de digestión con enzimas de restricción de cDNA obtenido a partir del RNA de las muestras de tejido pulmonar y secuenciado por la metodología Roche 454, con este proceso lograron detectar alrededor de 1435 de los 4,012 genes anotados para Mtb, sin embargo, el proceso de enriquecimiento por PCR puede producir un sesgo en la detección de genes, haciendo que algunos de ellos no se estén expresando realmente y se puede presentar un posible producto artefactual de la amplificación, en nuestro proceso, las librerías se generaron directamente del cDNA del RNA enriquecido para Mtb [350].

Metodológicamente, es crucial eliminar la mayor cantidad posible de rRNA antes de secuenciar las muestras, en nuestro trabajo hicimos una depleción inicial de subunidades ribosomales antes de la preparación de las librerías genómicas usando el estuche comercial Ribozero Gold de Illumina, el cual elimina cerca de un ~50% las subunidades 16S, 28S de ratón, posteriormente se realizó una

segunda ronda de hibridación substractiva de subunidades ribosomales bacterianas sobre las librerías genómicas ya elaboradas, aunque esta manipulación de las muestras reduce significativamente la concentración del cDNA, permitió que las lecturas generadas durante la secuenciación se produjeran en mayor cantidad sobre el mRNA presente en la muestra, ya que el rRNA representa el 95% del RNA total [348,349], se ha observado que cuando no se hace la depleción de rRNA, la cantidad de lecturas generadas por secuenciación corresponde en un ~97% a rRNA, mientras que cuando se hizo la hibridación sustractiva de rRNA bacteriano, se disminuyó al ~72.5% la cantidad de lecturas que mapearon contra rRNA micobacteriano, permitiendo que se aumentara la probabilidad de detectar mRNA (Datos sin publicar).

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, se realizó la secuenciación [185] y anotación de los genomas tanto de 323 Beijing-Like, como de 391 Beijing-Clásico [340], el mapeo de las lecturas se realizó contra el genoma reportado de la cepas correspondientes. De los 3789 genes anotados para 323 Beijing-like, se detectaron al día 3 PI 1148 genes, al día 14 PI 1429 genes y al día 28 PI 1493 genes, cubriendo en promedio un 35.3% del genoma y para 391 Beijing-Clásico de los 3906 anotados se detectaron al día 3 PI 1323 genes, al día 14 PI 705 genes, al día 28 PI 1357 genes y al día 60 1623 genes, cubriendo en promedio el 31,5% del genoma, este cubrimiento se obtuvo con 231.211.590 millones de lecturas en total, en el corrido de secuenciación con un promedio de lecturas de 10.991.483 por muestra, utilizando 3 réplicas biológicas en cada condición con un cubrimiento aproximado del genoma de 2,5 veces, dándole al presente trabajo una fortaleza estadística a los resultados de RNA-seq. En un trabajo de RNA-seq Dual en macrófagos derivados de médula ósea se obtuvo cerca de 75,6 million de lecturas con las cuales se detectaron 1022 genes en promedio, lo que demuestra la eficiencia de nuestra metodología [346].

Un valor agregado de este trabajo es que logramos obtener un perfil regulatorio diferencial de dos cepas genotipo beijing en tres fases diferentes de la enfermedad, por lo que el análisis de datos y las comparaciones en los análisis de genes diferencialmente expresados son mas dispendiosos pero nos permite tener una visión general de los mecanismos a nivel regulatorio, utilizados por estas bacterias que genómicamente son casi idénticas [340], pero que fenotípicamente aunque en ambos casos la TB en animales es agresiva y mortal, entre ellas se evidencian diferencias que pueden ser explicadas con el perfil de genes diferencialmente expresados en cada condición experimental. En algunos de los trabajos de RNA-seq en animales, se evalúa el perfil de expresión en un solo momento de la enfermedad [349–351].

2.4.1. Genes Diferencialmente expresados en 323 Beijing-Like

Al comparar día 14 PI con el día 3 en la cepa 323 Beijing-Like, se obtuvieron 15 genes diferencialmente expresados, el más expresado fue el *pckG* Rv0211, que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, involucrado en la catálisis de la conversión reversible de la guanosina o adenosina dependiente de mononucleótidos del oxaloacetato y el fosfoenolpiruvato, relacionado con el metabolismo de carbohidratos, este hace parte del grupo de los otros factores de

virulencia de acuerdo a las categorías funcionales establecidas para Mtb [127], sin embargo, se ha demostrado que regulan positivamente la respuesta inmune proinflamatoria aumentando la producción de IL-12, TNF- α e IFN- γ , las cuales se dejan de producir en ratones mutantes para este gen, haciendo de este un posible blanco vacunal con el uso de los adyuvantes apropiados [352].

El segundo gen más expresado fue la α -cristalina *hspX* Rv2031c, este gen es un importante factor de sobrevivencia cuando Mtb se encuentra en condiciones hostiles en el medio de crecimiento, este codifica para una proteína que actúa como chaperona en la habilidad de suprimir la denaturación térmica de la enzima alcohol deshidrogenasa. Las micobacterias que sobreexpresan este gen, crecen más lentamente y son más susceptibles a la autólisis cuando se acaba la disponibilidad de nutrientes en cultivo, este gen se sobreexpresa en respuesta a estrés, hipoxia, para evadir la respuesta inmune de la célula hospedadora, etc., al día 14 PI la enfermedad en el animal se encuentra en un estado latente con presencia de grandes y múltiples granulomas, en los cuales hay una baja actividad metabólica en las bacterias por la ausencia de nutrientes y oxígeno y por la contención de la infección por parte del sistema inmune, lo explica la sobreexpresión de este gen en esta fase de la enfermedad [353].

La ribonucleasa *vapC16*, hace parte del sistema Toxina-antitoxina tipo II y codifica para proteína VapC con actividad ribonucleasa. Los sistemas toxina-antitoxina, son operones bicistrónicos caracterizados por la interacción de toxinas estables con su correspondiente inhibidor inestable o antitoxina, estos genes se encargan de regular procesos esenciales en la bacteria tales como la replicación de DNA, la traducción, síntesis de pared celular e incluso la muerte celular. La expresión de los genes Toxina-antitoxina es característica de las micobacterias virulentas y se sobreexpresan cuando las bacterias se encuentran en condiciones de estrés durante la infección, hipoxia y presencia de antibióticos [354], en esta fase de la enfermedad el sistema inmune de los ratones está ejerciendo control de la misma con la formación de granulomas, que hace que el microambiente bacteriano presente bajas concentraciones de oxígeno, ocasionando el estrés de las bacterias, ante la disminución en los niveles de óxido nítrico y monóxido de carbono, teniendo un rol importante en estados dormantes de la bacteria

Al comparar el día 28 vs el día 3 PI, se obtuvo la sobreexpresión de 8 genes compartidos con el día 14 PI, el Rv0211 y el Rv2031c antes descritos, y otros como el gen de la ferredoxina *fdxA* (Rv2007c) involucrada en el transporte de electrones que se sobreexpresa en condiciones de estrés como ante la respuesta inmune del hospedador e hipoxia [355]. Este gen hace parte del regulón DosR [354]. El gen *hrp1* Rv2626c que codifica para la proteína 1 de respuesta a Hipoxia que también hace parte del regulón dosR se encuentra sobreexpresado tanto al día 14 como al 28 PI, también se sobreexpresa en ambientes con bajas tensiones de oxígeno [356]. Por último, se sobreexpresan dos genes de la familia PPE PE, el *PPE12* (Rv0755c) y el *PE22* (Rv2107), los genes de esta familia son genes estructurales del cromosoma de Mtb y representan cerca del 7% del genoma de Mtb, en total se conocen 99 genes *pe* (prolina Glutamato) y 69 genes *ppe* (Prolina-Prolina glutamato) [357]. Tanto

las proteínas PE como las PPE, se expresan por genes del mismo operón y se encuentran frecuentemente insertos en los grupos de genes *esx* que codifican para sistemas de secreción tipo VII, estas proteínas le permiten a Mtb interactuar con el sistema inmune del hospedador [358]. Los genes de las familias PE PPE, están involucrados en diversas funciones en la bacteria que se han ido describiendo experimentalmente, expresando mediadores metabólicos bacterianos, respiración, síntesis de pared celular, metabolismo de lípidos y su expresión normalmente es regulada por factores sigma [357].

Entre los genes que se expresan únicamente al día 14 se encuentran *dapA* Rv2753c, el cual es un gen esencial para Mtb que codifica para la 4-hydroxy-tetrahidrodipicolinato sintasa que cataliza la condensación de la (S)-aspartato-beta-semialdehído [(S)-ASA] y el piruvato a 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato (HTPA), este gen está involucrado en la biosíntesis y mantenimiento de la pared celular de Mtb, lo que lo posiciona como uno de los posibles blancos terapéuticos ya que no se ha reportado la existencia de la inhibición de su producto proteico DapA y a su vez se constituye como un importante factor de virulencia de Mtb [359]. La expresión de este gen específicamente para la fase tardía de la TB para esta bacteria, no se expresa en respuesta a condiciones de estrés, sino que hace parte del metabolismo activo de la micobacteria, que está directamente implicado en la síntesis de pared celular, este puede explicar el aumento en la carga bacteriana en esta fase de la enfermedad, indicando que aunque se sobreexpresan genes de dormancia y en respuesta a estrés, también se sobreexpresan genes de metabolismo activo que en esta fase de la enfermedad son mortales para los ratones. Por otra parte, el gen que codifica para la proteína conservada rica en serina codificada por el gen *fndB* Rv0991cuya función no ha sido caracterizada pero se le ha asignado la función de regulador transcripcional, también se encuentra sobreexpresado al día 28 PI y el gen Rv0220 *lipC* que codifica para la esterasa LipC que hidroliza cadenas cortas de ésteres con cadenas de carbono de 2 a 10 átomos, es una proteína altamente inmunogénica que se expresa característicamente en TB activa y desencadena una fuerte respuesta humoral no protectora en personas infectadas [360], así como también, produce una fuerte respuesta proinflamatoria con producción de citoquinas y quimiocinas producidas por macrófagos y células epiteliales. La familia de proteínas Lip está compuesta por 24 ester hidrolasas, LipC es una proteína de superficie celular presente en pared celular y cápsula de Mtb y participa en la progresión de la TB activa permitiéndole a la bacteria la utilización de los lípidos disponibles en el microambiente para permitir el crecimiento celular, la modulación de la respuesta inmune y la replicación bacteriana [361].

En general, la progresión de la enfermedad en ratones infectados con 323 Beijing-Like mostró un perfil regulatorio particular en cada estadio de la enfermedad, al comparar los genes DE al día 3 vs d14 y 28, al día 14 se sobreexpresaron genes asociados a condiciones de estrés, que le permitieron sobrevivir a las bacterias en los grandes y abundantes granulomas formados en esta fase de la enfermedad sin inhibir precisamente su crecimiento. Al día 14 PI, se mantenía la expresión de los genes asociados a microambientes de estrés, pero se expresaron varios genes que favorecen el metabolismo activo de las bacterias, así como la modulación de ellas con el sistema inmune, que desencadenó el progreso de la TB a una forma activa aguda, generando una abundante inflamación

que pudo ser producida por la expresión de genes como el *lipC* y *dapA*, siendo importantes factores de virulencia para esta bacteria. Sin embargo, al día 28 PI se sobreexpresaron en total 43 genes, en su mayoría involucrados en metabolismo, regulación, síntesis, utilización de metales pesados, que se expresan en TB activa y que desencadenaron la muerte de los animales a partir de este momento de la enfermedad, como el gen *ftsH* (Rv3610c) que codifica para la Metaloproteasa de Zinc dependiente de ATP FtsH, la cual es miembro de la familia de ATPasas AAA, con una función importante en el control de calidad de las proteínas de membrana en Mtb, ya que media la degradación de proteínas mal ensambladas tanto en membrana celular, como en citoplasma, controlando funciones celulares como la respuesta al shock térmico. Se ha demostrado que la presencia de esta proteína es esencial para la sobrevivencia de Mtb dentro de los macrófagos, ya que la ausencia de ésta desencadena la acumulación de proteínas defectuosas que disminuyen la viabilidad de las bacterias [362]. La sobreexpresión de genes involucrados en los procesos antes mencionados y que se constituyen en factores de virulencia desencadenan a partir de este momento la muerte rápida de los animales por TB agresiva caracterizada por una inflamación exacerbada que ocasiona neumonía y colapso pulmonar en los animales.

2.4.2. Genes diferencialmente expresados en 391 Beijing-Clásico

Mientras que en la cepa 323 Beijing-Like, la mayoría de los genes DE estaban regulados positivamente o sobreexpresados, la cepa 391 Beijing-Clásico mostró un perfil de genes DE caracterizado por la regulación negativa de diferentes genes. Al comparar la expresión de genes al día 14 vs días 3 PI, se encontraron 19 genes DE, 17 regulados negativamente y dos sobreexpresados. Al comparar el día 28 vs el día 14 PI, se encontraron 113 genes DE de los cuales 43 estaban sobreexpresados y 71 regulados negativamente; entre el día 14 y 28 PI se encontraron 13 genes comunes y al comparar el día 60 vs el día 28 PI, solo se encontró un gen DE, estas características en la expresión en cada condición, de entrada, marca una gran diferencia en el perfil regulatorio en los animales infectados por 391 Beijing-Clásico.

Vale la pena recordar que en la cinética in vivo, la infección de ratones con esta bacteria desencadenó una TB de curso relativamente crónico que permitió la sobrevivencia de los animales hasta el día 60 PI (**Figura 1-12A**), en los que se empezó a formar neumonía a partir del día 28 (Figura 1-16), la cual aumentó progresivamente hasta el día 60 cuando murió el último animal y a diferencia de 323 Beijing-Like, esta bacteria presentó significativamente menos carga bacteriana.

Uno de los genes DE con menor nivel de expresión es el *Rv1405c*, que codifica para la proteína no caracterizada *Rv1405c*, que molecularmente ejerce una actividad metil transferasa putativa dependiente de SAM, cuya expresión es regulada por *Rv1404* y su expresión, así como la expresión del regulón dependiente de *Rv1404*, permite la adaptación de Mtb a microambientes de infección in vivo mediada por la actividad metiltransferasa [363]. El gen *Rv0832c* es el segundo con menores niveles de expresión, al cual no se le ha asignado función conocida. Por otra parte, el gen *Rv1181*

pks4 que codifica para la proteína Mycolipanoate sintase, con función policétido sintasa que interviene en la biosíntesis de ácidos grasos con ramificaciones metilo, tales como los ácidos micolipanoico, micolipenico (fthienoico) y micolipodienoico, que son requeridos para la síntesis de trehalosas poliacetiladas y catalizan la elongación de ésteres CoA de los ácidos grasos de cadena larga y su expresión es regulada por PhoP el cual regula los genes implicados en la biosíntesis de complejos lipídicos, siendo la expresión de este gen esencial para Mtb, para la regulación de la morfología celular [364].

El gen *clpX* (*Rv2457c*), que codifica para la proteasa Clp dependiente de ClpX, tiene la responsabilidad de pasar las proteasas a sustratos específicos haciendo control de calidad de las proteínas celulares, produciendo por medio de su actividad la degradación de proteínas mal plegadas o dañadas, siendo un actor crítico en el metabolismo bacteriano y por lo tanto esencial para la viabilidad celular [365]. La regulación negativa de genes considerados factores de virulencia, permiten que el control del crecimiento bacteriano por parte del sistema inmune del hospedador limite la progresión de la enfermedad, lo cual es evidenciado fenotípicamente en la histología pulmonar y carga bacteriana.

Solo se encontraron dos genes sobreexpresados al comparar día 14 vs día 3 PI, el primero, es el gen *ahpC* (*Rv2428*) que codifica para Alcil hidropéroxido reductasa C perteneciente a la familia peroxiredoxina, cuyo sitio activo contiene tres residuos de cisteína, que tiene una función peroxidasa específica de TioI, que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno e hidroperóxido orgánico a H₂O y alcohol, protegiendo las células del estrés oxidativo por medio de la detoxificación de peróxidos, teniendo en esencia una actividad antioxidante [345], un hallazgo interesante es que este gen se sobreexpresa en aislamientos clínicos resistentes a isoniacida [366]. El segundo gen sobreexpresado es el gen *hemA* (*Rv0509*) que codifica para la Glutamil tRNA reductasa involucrado en el metabolismo del glutamato. Los dos genes antes mencionados son los únicos que ejercen una función activando el metabolismo activo en esta fase de control de la enfermedad, ejerciendo en cierta forma una actividad compensatoria por la regulación negativa de los genes previamente mencionados.

Al comparar el día 28 PI vs el día 14 PI, se encontraron 56 genes sobreexpresados y 71 genes regulados negativamente. EL gen con el menor nivel de expresión, fue el gen *eccD4* *Rv3448* que codifica para la proteína eccD4 del sistema de secreción ESX-4, estos sistemas se asocian comunmente con evasión de respuesta inmune por escape del fagolisosoma y sobrevivencia en el citoplasma de los macrófagos [367]. El segundo gen con menor nivel de expresión es el *lpqS* (*Rv0847*) que codifica para la lipoproteína LpqS, que juega un rol esencial en la replicación y sobrevivencia bacteriana [368]. Otro gen interesante regulado negativamente es el *pimF* (*Rv1500*) que codifica para una glucosiltransferasa putativa, que tiene un importante papel en el mantenimiento de la viabilidad celular y actuando como un importante factor de virulencia involucrado en la síntesis de fosfatidilinositol manosidos, que actua como modulador de la respuesta inmune del hospedador [369].

Al describir las funciones de algunos de los genes regulados negativamente, se evidencia que estos actúan como factores de virulencia en bacterias hipervirulentas, sin embargo, en este caso y fase de la enfermedad están regulados negativamente y, aunque fenotípicamente la enfermedad progresa, no es fulminante en este estadio de la enfermedad.

En cuanto a los genes más sobreexpresados al día 28 PI encontramos 8 proteínas hipotéticas no caracterizadas sin función conocida, varias de ellas reguladas por el regulón de dormancia DosR y que probablemente se están expresando ante la disminución en la tensión de oxígeno en el microambiente pulmonar. Además encontramos un gen sobrerregulado de importancia es el *mbtG* (*Rv2378c*) que codifica para la L-lisina N6-monooxygenasa, requerida para la N-hidroxilación de residuos de lisina acilados durante el ensamblaje de micobactina, el cual es un importante sideróforo que actúa en la toma y metabolismo del hierro [370]. El gen *sigG* (*Rv0182c*) que codifica para la proteína ECF de la RNA polimerasa factor sigma SigG, cuya función es la unión de la RNA polimerasa a sitios específicos de iniciación de la transcripción, actuando en esencia como un regulador transcripcional, que le permite a la bacteria sobrevivir dentro de los macrófagos [371].

Es interesante ver la cantidad de genes DE encontrados al día 28 PI, a pesar de que solo se detectaron 705 genes en total y, aunque muchos de los factores de virulencia DE se regulan negativamente, encontramos algunos genes que le permiten a la bacteria adaptarse y sobrevivir intracelularmente, mientras avanza el daño tisular y aumenta la carga bacteriana que es significativamente menor que en 323 Beijing-Like. Las funciones más enriquecidas ontológicamente hablando fueron, las relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos, la actividad hidrolasa y la de unión a fosfopantéina, básicamente, actividades enzimáticas.

Globalmente el perfil regulatorio entre el día 28 PI y día 60 PI es prácticamente igual, solo se encontró un gen DE y fue el gen *I917_21845* que codifica para la superfamilia HAD hidrolasa; adicionalmente, se encuentran DE varios genes al día 3 PI. Una observación interesante en el transcriptoma del ratón fue que al día 60 PI el perfil regulatorio observado fue similar al obtenido el día 3 PI, por lo que creemos, que el animal en un intento de defenderse, produjo una respuesta inmune pro-inflamatoria que solo es protectora en fases tempranas de infección, siendo deletérea en una fase tan avanzada de la enfermedad. Es posible, que el cambio a nivel regulatorio en el animal, interaccione con la regulación génica en la bacteria y, se produzca también un perfil regulatorio de estadios tempranos de infección, pero al estar en una fase prácticamente terminal de la enfermedad, este cambio regulatorio resulta infructuoso.

3. Conclusiones y recomendaciones

3.1. Conclusiones

El presente estudio se concibió gracias a la pertinencia del estudio de los aislamientos clínicos genotipo Beijing que circulan de forma endémica en el occidente colombiano, específicamente en el puerto de Buenaventura, los cuales se caracterizan por ser altamente resistentes a antibióticos de primera y segunda línea para el tratamiento de TB, por causar la muerte en los pacientes que padecen la enfermedad, ya que no se conocían los mecanismos utilizados por estas bacterias para causar una TB agresiva.

Dando continuidad a los estudios que se venían realizando con estas bacterias a nivel genómico, se quiso evaluar el desempeño de estas en un modelo de TB pulmonar *in vivo* a partir de la inoculación intratraqueal con una alta carga de bacilos y determinar el fenotipo generado y los mecanismos genotípicos tanto del hospedador como de la bacteria para el desarrollo de la enfermedad observada en los animales obteniendo que:

- Los dos aislamientos clínicos genotipos Beijing-Like y Beijing-Clásico aislados de pacientes colombianos, utilizados en el presente trabajo mostraron ser altamente virulentos, en el modelo *in-vivo* ratón Balb/c.
- El progreso de la TB pulmonar en este modelo animal fue más rápido que lo reportado en la literatura para H37Rv, presentando una corta fase latente (formación de granulomas) que se produjo entre los días 14 y 21 PI, seguida de una fase de TB activa de curso rápido que comenzó después del día 21 PI hasta el día 60 PI.
- Aunque los dos aislamientos clínicos mostraron ser altamente virulentos, el aislamiento clínico 323 Beijing-Like SIT 190 desencadenó en los animales infectados una enfermedad de curso agudo, que causó la muerte temprana de los animales (dos semanas PI), producida por una neumonía pulmonar extensiva y falla pulmonar, debido a la modulación de una respuesta inmune no protectora (antiinflamatoria) acompañada de un alto número de bacterias en el pulmón, así como la diseminación de las bacterias patógenas a bazo causando TB extrapulmonar.

- El aislamiento clínico 391 Beijing-Clásico mostró un fenotipo virulento, pero de curso más crónico, permitiendo que los ratones infectados sobrevivieran hasta el día 60 PI, sin embargo, aunque con una progresión más lenta, los animales infectados con esta bacteria murieron por el desarrollo de una extensa neumonía con amplias zonas de necrosis pulmonar, gracias a la inducción de una respuesta inmune no protectora. El número de bacterias obtenidas en los órganos fue significativamente más bajo que con 323 Beijing-Like, lo que pudo favorecer la sobrevivencia de los animales por más tiempo.
- Gracias a la metodología utilizada para enriquecer las muestras de RNA a partir de pulmones infectados, fue posible obtener lecturas que cubrieron ~33% del transcriptoma completo bacteriano.
- La cantidad total de genes detectados en los pulmones infectados por ambas cepas fue similar
- El perfil de expresión génica global fue diferente ante la infección con cada una de las bacterias, lo cual puede explicar las significativas diferencias a nivel fenotípico de la progresión de la enfermedad.
- El perfil regulatorio en 323 Beijing-Like posiblemente tuvo una interacción importante con la regulación génica en el hospedador, que produjo una enfermedad aguda fulminante en los animales, desencadenada principalmente por la sobreexpresión de importantes factores de virulencia.
- En 391 Beijing-Clásico, el perfil global de expresión fue por completo diferente al de 323 Beijing-Like. Con 391 Beijing-Clásico se encontraron genes regulados positiva y negativamente y la cantidad de genes DE fue superior; concluimos que los roles antagónicos de la modulación génica producen un genotipo y fenotipo conservadores que favorecen el curso más crónico de la enfermedad.

3.2. Recomendaciones

Dada la importancia de cepas emergentes de Mtb caracterizadas por el amplio espectro de resistencia a medicamentos antituberculosis, así como su alta virulencia es fundamental tener a disposición los conocimientos genómicos, regulatorios y funcionales de estas cepas. El presente trabajo es una fuente importante de información en estos aspectos. Sin embargo, es importante seleccionar e individualizar los genes diferencialmente expresados tanto en ratón como en bacteria para determinar su utilidad como blancos terapéuticos o si son postulables o no como blancos vacunales.

Por otra parte, es importante incrementar la búsqueda activa de estos aislamientos clínicos tanto en la población en la que estas cepas circulan más frecuentemente (costa occidental

colombiana) y ampliar su búsqueda al territorio nacional, ya que actualmente se desconoce que tan circulantes en la población encontramos este tipo de bacterias.

Aunque a partir de los resultados obtenidos y analizados en el presente trabajo, se obtuvo una fuente importante de información a nivel regulatorio, sería interesante evaluar el perfil transcriptómico bacteriano y del hospedador en otros puntos de la cinética, para determinar los posibles cambios en la regulación génica en puntos intermedios post infección a los aquí evaluados.

Debido a la limitación en recursos económicos, no fue posible hacer RNA-seq en la cepa LAM incluida en la fase inicial del presente trabajo, sin embargo los resultados obtenidos en la cinética in-vivo, mostraron que a pesar de la amplia circulación de este genotipo en Colombia y a pesar de ser susceptible a todos los antituberculosos, también desencadena un fenotipo altamente virulento ocasionando la muerte temprana de los animales, por lo que obtener información a nivel genómico y transcriptoma de los genotipos frecuentes en Colombia será de gran utilidad para caracterizar esta población de bacterias.

4. Anexos

Anexo A: Reactivos, equipos y protocolos para el desarrollo de experimentos para alcanzar el objetivo N° 1.

- **ANEXO A-1.** Listado de equipos de laboratorio
- **ANEXO A-2.** Protocolo de hibridación y detección de productos de PCR para Spoligotyping
- **ANEXO A-3.** protocolo de hibridación para productos de amplificación obtenidos con el kit el GENOTYPE® MTBDRplus 2.0
- **ANEXO A-4.** Protocolos de preparación de medios de cultivo para crecimiento de cepas de *M. tuberculosis*
- **ANEXO A-5.** Protocolo para la recuperación de cepas de *Mycobacterium*
- **ANEXO A-6.** Protocolo para el cultivo en masa de cepas de *Mycobacterium*
- **ANEXO A-7.** Protocolo de tinción para microscopía electrónica de transmisión (TEM) de bacterias en cultivo.
- **ANEXO A-8.** Protocolo para la generación de alícuotas de *Mycobacterium*
- **ANEXO A-9.** Protocolo para realización de experimento “KILLING” usando macrófagos alveolares de ratón infectados con *Mtb*
- **ANEXO A-10.** Protocolo para recuento de unidades formadoras de colonia (UFCs) de *M. tuberculosis* en órganos de ratones infectados
- **ANEXO A-11.** Protocolo extracción de RNA a partir de pulmón de ratón infectado de *M. tuberculosis*. Kit Quick RNA mini prep Zymo. Cat. R1055
- **ANEXO A-12.** Protocolo de pcr en tiempo real (qRT-PCR) para la cuantificación de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias
- **ANEXO A-13.** Pipeline para el análisis de transcriptomas completos obtenidos a partir de pulmones de ratones infectados con aislamientos clínicos colombianos genotipo Beijing de *M. tuberculosis*.

ANEXO A-1. LISTADO DE EQUIPOS DE LABORATORIO

- Micropipetas 0,5-10 ul, 10-100 ul, 20-200 ul, 100-1000 ul
- Pipeta Multicanal 20-200 ul
- Termociclador Biorad C1000 Touch™
- Cabina de seguridad microbiológica tipo B2 Purifier
- Termociclador eppendorf AG N°5341 009258 Cat:22331 Hamburg
- Termociclador Techne Touchgene Gradient TC 512 Cat 5PRIME / 02
- Termociclador de Tiempo Real: AB Applied Biosystems^R 7500 Real Time PCR System Serie: 275000193
- Termociclador en tiempo Real: ABI7500 Fast System SDS v1.4 21 CFR Part 11 Module Applied Biosystems
- Cámara de electroforesis horizontal Biorad
- Epoch™ Spectrophotometer System
- Espectrofotómetros NanoDrop™ 2000/2000c Thermo Scientific
- Ultracongeladores -80°C
- Cabina de Bioseguridad II A2 Thermo Electron Corporation
- Incubadora con agitación Benchtop SSI3
- Documentador de Geles Alpha Innotech Chemilmager™ 4400
- Microscopio Olympus TK-C138E
- Spin Tissue Processor Microm STP 120 (ThermoFisher Scientific).
- Microscopio Q Win Leica, Milton Keynes
- TwinCubator – Hybridization System
- BD BACTEC™ MGIT™ 960
- Microtomo Leica RM2135
- Equipo homogenizador MP FastPrep 24
- Carl Zeiss™ Stemi™ DV4 Series Stereomicroscopio
- Exhaust Allentown caging equipment, co
- FEI Tecnai G2 Spirit transmission electron microscope Hillsboro, OR, USA.
- FastPrep-24™ Classic Bead beating grinder and lysis system

ANEXO A-2. PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN DE PRODUCTOS DE PCR PARA SPOLIGOTYPING

A. Equipos, Materiales y Reactivos

- Horno de hibridación
- Termociclador
- Techne Hybridiser modelo HB-1D a: 60°C
- Micropipetas 10-200 ul. 20-200 ul y 100-1000ul
- Puntas para micropipetas según volumen
- Miniblotter MN45
- Membrana (Ocimum Biosolutions BV) de primera generación
- Kit para quimioluminiscencia Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent (Kit. Set 2 x 125 ml. Marca INVITROGEN)
- Películas fotosensibles SHEETS Thermo Scientific™ Pierce™ CL Xposure film (18 x 24cm).
- 250 ml 2XSSPE/0.1% SDS a 60°C.
- 500 ml 2XSSPE/0.5% SDS 60°C.
- 250 ml 2xSSPE/0.5% SDS, 42°C.
- 500 ml 2xSSPE, temperatura ambiente.
- 2 baños Serológicos a 60°C y a 42°C
- Estreptavidina-POD-conjugada
- Líquido de detección ECL Amersham
- Hyperfilm ECL
- Cassete para revelado de autoradiografía Kodak

B. Procedimiento

1. Adicionar 20 µl de producto de PCR a 150 µl de buffer 2XSSPE/0.1% SDS
2. Incubar a 99°C en termociclador durante 10 minutos.
3. Colocar inmediatamente después de la anterior incubación en una cubeta de hielo para mantener los productos denaturados.
4. Lavar la membrana por 5 minutos a 60°C en 250 ml de 2XSSPE/0,1% SDS a 60°C.
5. Colocar la membrana en un soporte acolchado (Siempre usando pinzas) en el miniblotter de manera que las ranuras queden perpendiculares al patrón de línea de los oligonucleótidos.
6. Remover el líquido residual de las ranuras del miniblotter por aspiración
7. Llenar las ranuras con los productos de PCR diluidos evitando que las ranuras queden con burbujas y colocar a hibridar a 60°C por 60 min sin agitación en una superficie horizontal.
8. Aspirar el contenido de las ranuras hasta que la membrana se vea seca
9. Lavar dos veces la membrana en 250 ml 2xSSPE/0.5% SDS por 10 min a 60 C.
10. En un tubo falcon de 15 ml diluir 2.5 ul de conjugado estreptavidina/peroxidasa (5000U/ml) en 10 ml de 2xSSPE/0.5% SDS.

11. Colocar la membrana en una botella de hibridación redonda, adicionar la dilución de conjugado e incubar a 42°C por 45 minutos en horno de hibridación.
12. Lavar la membrana 2 veces en 250 ml de 2xSSPE/0.5% SDS por 10 minutos a 42°C.
13. Posteriormente enjuagar la membrana dos veces en 250 ml de 2xSSPE por 5 minutos a temperatura ambiente
14. Para la detección del producto de hibridación por quimioluminiscencia, incubar la membrana por 1 minuto con 20 ml de reactivo líquido de detección ECL.
15. Colocar la membrana en un cassette de revelado cubriendo la membrana con un acetato transparente y encima una película para auto radiografía.
16. Todo el proceso de revelado se lleva a cabo en cuarto oscuro.
17. Una vez se obtuvo el patrón de puntos en la película radiográfica, se verificó el patrón de las cepas.

ANEXO A-3. PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN PARA PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN OBTENIDOS CON EL KIT EL GENOTYPE® MTBDRPLUS 2.0

A. Equipos, Materiales y Reactivos

- TwinCubator - Hybridization para 12 muestras usando el programa técnico para GenoType®.
- Termociclador Biorad C1000 Touch™
- Micropipetas 10-200 uL, 20-200 uL y 100-1000uL
- Puntas para micropipetas según volumen
- Solución de Denaturación (Den Azul)
- Solución de hibridación (HYB Verde)
- Solución Astringente de Lavado (STR Roja)
- Solución de enjuague RIN
- Conjugado (Con)
- Substrato (Sub)
- Solución para dilución de conjugado
- Solución para dilución de substrato
- Agua Mq

B. Procedimiento

Nota. El presente protocolo se basa en el protocolo de la metodología original GenoType®MTBDRplus 2.0 de Hain-LifeScience [372] .

1. Precalentar a 45°C los reactivos HYB y STR verificando que se encuentren libres de precipitado
2. En una bandeja de plástico de 12 pozos para 12 tiras agregar 20 uL de producto de amplificación por PCR en un extremo del pozo.
3. Adicionar 20 uL de reactivo de denaturación DEN y mezclar con pipeta
4. Incubar a °T ambiente por 5 minutos
5. Agregar 1 ml de buffer de hibridación HYB
6. Sumergir la tira previamente marcada en la parte inferior, tener cuidado de no dejar voltear la tira.
7. Poner a incubar en el TwinCubator a 45°C por 30 minutos.
8. Aspirar completamente el buffer de hibridación
9. Adicionar 1 ml a cada tira de solución STR
10. Incubar en TwinCubator a 45°C por 15 minutos.
11. Remover completamente la solución STR
12. Agregar 1 ml de solución de lavado RIN e incubar 1 minuto a °T ambiente en TwinCubator

13. Agregar 1 ml de conjugado diluido (10 ul de ConC anaranjado en 1 ml de buffer ConD por cada tira)
14. Incubar a °T ambiente por 30 minutos sobre plataforma TwinCubator
15. Remover completamente el conjugado diluido
16. Lavar dos veces cada tira adicionando 1 ml de solución RIN e incubar 1 a °T ambiente minuto en agitación en platafoma TwinCubator.
17. Lavar una vez con Agua Mq sobre plataforma TwinCubator a °T ambiente en agitación.
18. Adicionar 1 ml de substrato diluido (10 ul de SubC anaranjado en 1 ml de buffer SubD por cada tira).
19. Incubar sobre plataforma TwinCubator sin agitación por 3 a 20 min.
20. Parar la reacción lavando cada tira con agua destilada.

C. Interpretación De Resultados

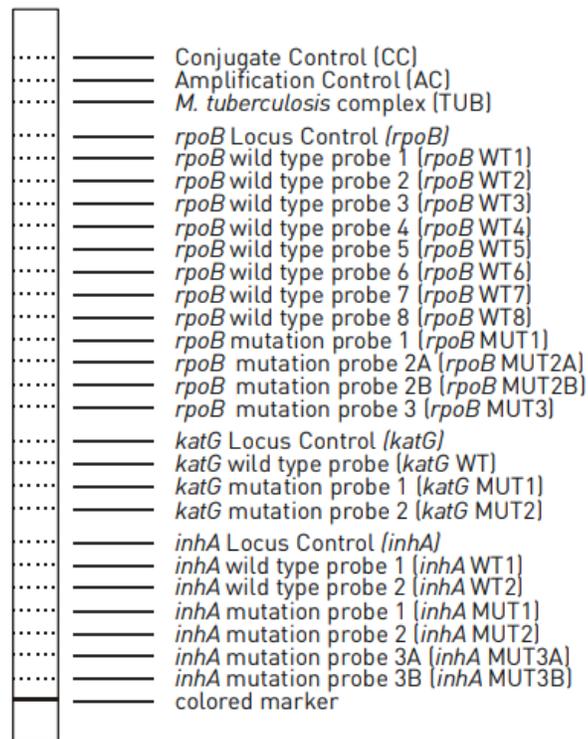


Figura A-1. En el esquema se muestra la hoja de evaluación de resultados en la que se muestra a que corresponde cada banda de hibridación.

1. Antes de validar cualquier resultado verificar que se visualicen bandas de hibridación en el Control de Conjugado (CC), En el control de amplificación (AC) y en el control de amplificación para MTBC (TUB) usando la hoja de evaluación de resultados como se muestra en la **Figura A-1**.
2. Verificar que se tenga hibridación en los controles de cada locus: i: *rpoB* ii: *katG* locus control iii: *inhA* locus control.

3. Para los tres genes hay sondas complementarias para las regiones génicas tipo silvestre (WT) y sondas complementarias a regiones génicas que contienen las mutaciones más frecuentemente reportadas para estos genes.
4. Es posible encontrar cepas con heteroresistencia, en tal caso se observará hibridación tanto en la banda mutante como en la banda tipo silvestre. Puede ocurrir lo mismo si la muestra evaluada proviene de una infección mixta tanto de cepas del MTBC o infección o contaminación con MNT.
5. En la **Tabla A-1** se muestran las mutaciones evaluadas por esta metodología para cada gen, el codón en el que está presente dicha mutación y la banda tipo silvestre faltante correspondiente.

Tabla A-1. Mutaciones en las regiones determinantes de resistencia a Isoniacida y Rifampicina

Gen <i>Rpo</i> β			
Banda Tipo silvestre Faltante	Codones Analizados	Banda de Mutación	Mutación
<i>Rpo</i> β WT1	505-509		F505L
			T508A
			S509T
<i>Rpo</i> β WT2	510-513		E510H
			L511P*
<i>Rpo</i> β WT2/WT3	510-517		Q513L*
			Q513P
			de1514-516
<i>Rpo</i> β WT3/WT4	513-519	<i>Rpo</i> β MUT1	D516V
			D516Y
			de1515
<i>Rpo</i> β WT4/WT5	516-522		de1518*
			N518I
<i>Rpo</i> β WT5/WT6	518-525		S522L
			S522Q
<i>Rpo</i> β WT7	526-529	<i>Rpo</i> β MUT2A	H526Y
		<i>Rpo</i> β MUT2B	H526D
			H526R
			H526P*
			H526Q*
			H526N
			H526L
			H526S
	H526C		
<i>Rpo</i> β WT8	530-533	<i>Rpo</i> β MUT3	S531L
			S531Q*
			S531W
			L533P
Gen <i>katG</i>			
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2
Gen <i>inhA</i>			
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A-16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T-8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T-8A

ANEXO A-4. PROTOCOLOS DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA CRECIMIENTO DE CEPAS DE *M. tuberculosis*

A. Materiales

- Botella de vidrio Schott
- Medio de Cultivo líquido Middlebrook 7H9 DIFCO Ref. 271310 suplementado con: Glicerol al 0,2% (v/v)
- Tyloxapol Premium Sigma Aldrich 4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil) polímero de fenol con formaldehído y oxirano Ref. T8761 (500µL)
- Enriquecimiento con 10% de suplemento ADC (DIFCO, Beckton Dickinson) Ref. 212352. Catalasa Dextrosa
- Agua Destilada (H₂O)
- Autoclave
- Jeringas desechables estériles
- Micropipetas
- Puntas estériles
- Pipetas desechables estériles de 2 ml, 5 ml, 10 ml y 25 ml
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora con CO₂
- Bata desechable estéril
- Guantes de nitrilo desechables
- Zapatones o polainas desechables

B. Procedimiento

Medio de líquido Cultivo 7H9 (DIFCO):

El medio de cultivo líquido 7H9 DIFCO es un medio de enriquecimiento no selectivo para el cultivo de Mycobacterias, el medio contiene aminoácidos como Ácido L- Glutámico que son utilizados por las bacterias como fuente de carbono junto con el glicerol y carbohidratos del medio. El tyloxapol, es un detergente líquido no aniónico que actúa como surfactante y ayuda a que las mycobacterias se distribuyan uniformemente en el medio de cultivo evitando el aglutinamiento de las mismas.

Preparación para un Litro de medio de cultivo:

1. Medir 900 ml de Agua destilada
2. Agregar 4,7 gramos de medio de cultivo.
3. Colocar en agitación con mosca para que se diluyan los componentes
4. Agregar 5 ml de glicerol grado reactivo con una jeringa desechable
5. Agregar 0.5 ml de Tyloxapol Premium y dejar en agitación hasta que se disuelva por completo.
6. Llevar a esterilizar en frasco de vidrio debidamente etiquetado, con la tapa abierta a ¼ de rosca, afirmada con cinta de enmascarar, cubierto con papel aluminio y sombrero de papel usar cinta testigo para verificar que se llevó a cabo bien el proceso de esterilización.

7. Dejar reposar a temperatura ambiente hasta que baje la temperatura a aproximadamente 40°C
8. Llevar a cabina de bioseguridad previamente limpia e irradiada con luz ultravioleta (longitud de onda de 200 a 300 nm).
9. Agregar 4 (100 ml) tubos de suplemento ADC
10. Llevar a prueba de esterilidad por 24 horas a 37°C
11. Si no se obtiene turbidez o crecimiento bacteriano, el medio está listo para usar.

Medio de Cultivo Solido Middlebrook 7H10

Este medio de cultivo, contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de *M. tuberculosis*, de manera tal que se pueda calcular la cantidad de bacterias en una muestra determinada de acuerdo al inóculo en el medio y la dilución de la bacteria.

Procedimiento

1. Medir 900 ml de Agua destilada
2. Agregar 19 gramos de medio de cultivo.
3. Colocar en agitación con mosca
4. Agregar 5 ml de glicerol grado reactivo con una jeringa desechable
5. Una vez estén disueltos los componentes llevar a esterilizar en frasco de vidrio debidamente etiquetado, con la tapa abierta a ¼ de rosca, afirmada con cinta de enmascarar, cubierto con papel aluminio y sombrero de papel usar cinta testigo para verificar que se llevó a cabo bien el proceso de esterilización.
6. Dejar enfriar el medio hasta que alcance una temperatura aproximada de 65°C
7. En cabina de bioseguridad alistar 62 cajas de Petri estériles por cada litro de medio de cultivo y dividir las en 8 partes iguales de forma radial usando un marcador de tinta indeleble.
8. Una vez el medio alcanza la temperatura deseada, en cabina de bioseguridad, agregar 100 ml de suplemento OADC y agitar para que este se mezcle de forma uniforme con el medio de cultivo.
9. Con una pipeta de 25 ml estéril proceder a plaquear el medio de cultivo, cada caja de Petri debe contener aproximadamente 17 ml de este, tener precaución de no dejar burbujas en las placas, ya que estas dificultarían el crecimiento de las bacterias y posterior lectura de las UFCs.
10. Una vez dispensado el medio de cultivo, dejar las cajas de Petri abiertas para que este se solidifique y para que se evapore el agua de condensación de la tapa de la caja.
11. Cuando el medio de cultivo este solidificado y las tapas de las cajas secas, taparlas teniendo precaución de no pasar las manos por encima de las que están abiertas, formar torres de 10 cajas y guardarlas en bolsas plásticas estériles.
12. Llevar a prueba de esterilidad por al menos 24 horas antes de su uso.

ANEXO A-5. PROTOCOLO PARA LA RECUPERACIÓN DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM*

A. Materiales

- Frascos para cultivo primario de células no adherentes de 25 ml
- Medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 suplementado con 5% de glicerol, 10% de OADC y 0.02% de tyloxapol Premium
- Pipetas plásticas desechables de 10 ml
- Cepa criopreservada en glicerol, liofilizada o cultivada
- Pipeteador eléctrico
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora con agitación y CO₂
- Gorro desechable
- Guantes de nitrilo desechables
- Bata desechable
- Polainas o zapatones desechables
- Cinta de enmascarar
- Plumones

B. Base Racional del procedimiento

Para llevar a cabo la mayoría de los procesos del laboratorio de patología experimental del INCMNSZ se requiere del uso de diferentes cepas de *Mycobacterium* en fase logarítmica de crecimiento, debido a que la mayoría de estas se encuentran en criopreservación a -70°C, es necesario cultivar dichas bacterias usando medios de cultivo con los nutrientes necesarios para activarlas metabólicamente y ser utilizadas en procesos de infección de animales o células, extracción de ácidos nucleicos etc.

Todos los procedimientos que impliquen la manipulación de Micobacterias vivas patógenas deben realizarse siguiendo estrictamente todas las normas de bioseguridad, para evitar la contaminación con esta peligrosa bacteria por vía aérea y usar todos los implementos de protección de barrera; antes de iniciar el trabajo con estas se debe usar obligatoriamente: Ropa de laboratorio, bata desechable, gorro desechable, zapatones o polainas desechables respirador N95 y doble par de guantes de nitrilo para el trabajo dentro de la cabina de bioseguridad, el par de guantes exterior es el que está en contacto directo con los cultivos o muestras y no debe salir de la campana de bioseguridad, si se requiere de procesos que implique sacar las manos del área de trabajo, los guantes exteriores se deben retirar cada vez y colocarse de nuevo para el trabajo dentro de la cabina de bioseguridad.

C. Procedimiento

1. Si la bacteria se encuentra criopreservada en glicerol a -70°C , sacarla del ultracongelador y llevarla a incubadora a 37°C por aproximadamente 10 minutos hasta que el tubo contenedor este visiblemente descongelado.
2. Si la bacteria es comprada u obtenida de una colección de referencia y esta liofilizada, llevar a cabina de bioseguridad tipo III y resuspender con medio de cultivo 7H9 o seguir las especificaciones del fabricante.
3. Etiquetar con nombre de la cepa, fecha, código interno del laboratorio y demás datos necesarios una botella de cultivo primario de células de 25 ml.
4. En cabina de bioseguridad agregar 8 ml de medio de cultivo 7H9
5. Una vez la bacteria se encuentre descongelada o en suspensión, mezclar cuidadosamente y tomar 0,1 ml del cultivo y agregarlo a las botellas de cultivo con el medio estéril.
6. Llevar a incubar a 37°C en agitación y 5% de CO_2 por 48 horas
7. A este nivel el cultivo está listo para ser cultivado masivamente.

ANEXO A-6. PROTOCOLO PARA EL CULTIVO EN MASA DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM*

A. Materiales

- Medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 suplementado con 5% de glicerol, 10% de ADC y 0,02% de tyloxapol Premium previo control de esterilidad
- Botellas de cultivo no adherentes estériles de 75 ml
- Pipetas desechables estériles de 10 ml y 25 ml
- Pipeteador eléctrico
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora con agitación y CO₂
- Espectrofotómetro
- Celdas para espectrofotometría
- Gorro desechable
- Guantes de nitrilo desechables
-

B. Base Racional del procedimiento

Una vez se tiene el cultivo de inicio con crecimiento bacteriano suficiente, es necesario realizar el subcultivo del mismo en masa, con el fin de obtener la cantidad suficiente de bacteria para la generación de alícuotas que serán utilizadas al momento de infectar los ratones, para disponer de material bacteriano suficiente para realizar diferentes tipos de experimentos y para disponer de tubos de bacteria con glicerol que serán almacenados en el banco biológico del laboratorio a -70°C

C. Procedimiento

1. Limpiar previamente el área de trabajo y esterilizar cabina usando luz UV (longitud de onda de 200 a 300 nm).
2. El material necesario para el cultivo se debe limpiar previamente con alcohol al 70%.
3. Dispensar 60 ml de medio de cultivo 7H9 en 4 botellas para cultivo celular de 75ml.
4. Agregar 1 ml del cultivo de inicio en cada una de las botellas de cultivo.
5. Juntar las cajas con cinta de enmascarar y rotular con nombre o código de la cepa, fecha de escalamiento y persona responsable.
6. Incubar a 37°C y hacer seguimiento del crecimiento midiendo cada 24 horas el % de transmitancia o la absorbancia en una de las botellas para determinar la fase logarítmica de crecimiento.
7. La mitad de la fase logarítmica se alcanza entre el día 10 y 14 de crecimiento, en este momento el cultivo se recupera en alícuotas como se menciona en el **Anexo A-8**.

ANEXO A-7. PROTOCOLO DE TINCIÓN PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM) DE BACTERIAS EN CULTIVO.

A. Soluciones de trabajo

0.2M PB, pH 7.4:

Na₂HPO₄ ----- 21.8 g

NaH₂PO₄ ----- 6.4 g

Agua destilada----- 1000 ml

Fijador 4F1G (4% Formaldehído 1% Glutaraldehído en 0.1 M PB, pH 7.4):

0.1M PB, pH 7.4 ----- 88 ml

37-40% Formaldehído ----- 10 ml

50% Glutaraldehído ----- 2 ml

8% (0.2M) Sucrosa in 0.1M PB:

Sucrosa ----- 8 g

0.1 M PB ----- 100 ml

1% Osmio in 0.1M PB:

2% Osmio ----- 5 ml

0.2M PB, pH7.4 ----- 5 ml

Solución de Uranyl Acetato al 5%:

Para preparar 50 ml, adicionar 2.5 g de uranyl acetato a 50 ml de agua destilada. Cubrir y dejar toda la noche. Adicionar 10 gotas de ácido acético glacial. Almacenar la solución a 4 °C.

Solución de Citrato de Plomo de Reynold's:

Para preparar 50 ml, adicionar las sustancias químicas al agua destilada en el siguiente orden:

Nitrato de Plomo ----- 1.33 g

Citrato de Sodio deshidratado ----- 1.76 g (La solución se torna turbia al adicionar el citrato de sodio).

NaOH 1N ----- 5 ml (La solución se aclara al adicionar el NaOH)

Agua destilada ----- 30 ml

Agitar durante 10 minutos para disolver y adicionar 15 ml más de agua destilada. Almacenar la solución por 3 a 6 meses a 4°C. Nota: La cantidad adicionada de NaOH es muy importante, adicionar NaOH en exceso tornará la solución muy turbia.

Tabla A-2. EMBED 812

Volumen Final	EMBed-812	DDSA	NMA	DMP-30 (2%)
20.91 ml	10 ml	4.5 ml	6 ml	0.41 ml
31.37 ml	15 ml	6.75 ml	9 ml	0.62 ml
41.82 ml	20 ml	9 ml	12 ml	0.82 ml
52.28 ml	25 ml	11.25 ml	15 ml	1.03 ml

Mezclar los cuatro componentes en un vaso de plástico y mezclar con un agitador de madera

B. Fijación

1. Las células en suspensión son fijadas en formaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% en buffer PB 0,1M pH 7.4, mezclando volúmenes iguales de fijador y células en suspensión.
2. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos o hasta que se obtenga un botón limpio, si es necesario repetir la centrifugación. Remover cuidadosamente el fijador, Adicionar cuidadosamente un volumen de fijador fresco y dejar fijar durante toda la noche (mínimo 2 horas).
3. Remover cuidadosamente el fijador y agregar partes iguales de Sucrosa (0.2M) al 8% y buffer PB 0.1M a 4°C durante toda la noche (Las muestras pueden ser almacenadas en sucrosa durante largos periodos de tiempo).
4. Para la Pos-fijación adicionar OsO₄ 1% en PB 0.1M por una hora
Remover el OsO₄ y lavar en PB 0.1M 3 veces por 10 minutos cada vez.

C. Deshidratación

50% etanol 15min

70% etanol 15min

95% etanol 15min

100% etanol 2 veces x 15min

100% Oxido de Propileno 2 veces x 15min

Mezclar en proporción 1:1 EMBED 812 y Oxido de Propileno por 1-2 horas.

Luego mezclar en proporción 2:1 EMBED 812 y Oxido de Propileno toda la noche en desecador con las tapas abiertas.

D. Inclusión

Embeber en capsulas comprimidas e incubar a 60°C por 48°C

E. Corte

Hacer cortes semidelgados (cortes de 0.5-1 um) y teñir con azul de toluidina. Observar el grosor de los cortes y recortar el bloque EM más si es necesario, luego colocar los cortes ultradelgados en soportes para tinción.

F. Tinción

Colocar los soportes para tinción en uranil acetato por 15 minutos, lavar con agua destilada y luego teñir con citrato de plomo por 3-5 minutos y enjuagar con agua destilada.

G. Observación

Observar al microscopio y tomar diferentes fotografías para el análisis de la estructura de las células.

ANEXO A-8. PROTOCOLO PARA LA GENERACIÓN DE ALÍCUOTAS DE *MYCOBACTERIUM*

Materiales:

- M. tuberculosis cultivada en masa
- Tubos falcon de 50 ml
- Tubos de 1,5 ml con tapa de cierre hermético
- Pipetas plásticas desechables estériles de 2, 10 y 25 ml.
- Celdas para espectrofotometría
- Medio de cultivo liquido Midlebrook 7H9 suplementado con 5% de glicerol, 10% de OADC (albumina, dextrosa y catalasa) y 0,02% de tyloxapol Premium
- Buffer Salino de Fosfatos (PBS) 1X
- Tubos marcados con I, M y F de la cepa en estudio
- Micropipetas automáticas de 1000, 200 y 10 uL.
- Puntas estériles para pipetas de 1000, 200 y 10 uL.
- Medio de cultivo liquido 7H9 suplementado con 5% de glicerol, 10% de ADC (albumina, dextrosa y catalasa) y 0,02% de tyloxapol Premium
- Cajas de medio de cultivo solido 7H10 suplementado con 5% de glicerol y 10% de OADC (Albumina Bovina, Dextrosa, catalasa y Ácido Oleico).
- Tubos eppendorf de 1,5 ml estériles
- Gradillas
- Clidox TM
- Alcohol al 70%
- Espectrofotómetro
- Pipeteador eléctrico
- Gradilla plástica
- Botellas para descarte de desechos líquidos
- Gorro desechable
- Centrifuga Refrigerada
- Ultracongelador a -70°C

Base Racional del procedimiento:

Este procedimiento se realiza con el fin de generar alícuotas bacterianas con la concentración estandarizada para la infección de los ratones (250.000 bacterias por cada 100uL de suspensión), para la obtención de las bacterias, es necesario que estas no se encuentren en grupos, para esto es necesario que el medio en el que se encuentren cultivadas contenga Tyloxapol premium, el cual es un detergente que permite que las micobacterias crezcan de forma disgregada y uniforme.

PROCEDIMIENTO

1. Dispensar las bacterias de las botellas de cultivo en tubos falcon de 50 ml.
2. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C.
3. Descartar sobrenadante, resuspender pellet con el dedo con movimientos suaves y realizar 3 lavados sucesivos con 45 ml de PBS 1X centrifugando cada vez a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C.
4. Mientras se realizan los lavados, marcar 43 tubos de 1.5 ml con tapa de cierre hermético el primer tubo se debe marcar con la letra **I** (Inicial) y los siguientes se deben marcar así: 1/40, 2/40, 3/40...20/40 el siguiente tubo se marca con la letra **M** (Medio) y seguir el marcaje como 21/40...40/40, el ultimo tubo se debe marcar con la letra **F** (Final).
5. Resuspender pellet con el dedo e ir agregando PBS 1X hasta que se obtenga una suspensión bacteriana homogénea similar a un agua de limón e ir resuspendiendo suavemente de manera tal que no se formen grumos.
6. Dispensar en cada tubo marcado 1.5 ml de la suspensión con una pipeta plástica estéril de 10 ml en los tubos I, M y F dispensar solo 0.5 ml de la suspensión.
7. Tapar los tubos tratando de no pasar la mano por encima de los tubos destapados y guardar a -70°C por al menos 24 horas.

La verificación de las Unidades Formadoras de Colonias, es de vital importancia a este nivel, ya que permite verificar la concentración bacteriana a la cual se encuentran las alícuotas que serán utilizadas para la infección de ratones, en caso que dichas alícuotas se encuentren con una concentración bacteriana superior a la deseada (250.000 UFC por cada 100 uL de solución), el resultado obtenido con este experimento permitirá realizar un ajuste aritmético de dicha concentración.

Procedimiento:

- Separar los tubos I (inicial, M (medio) y F (final) del lote de alícuotas.
- Por cada cepa a evaluar se requieren 3 cajas de medio de cultivo 7H10 divididas en 8 partes por la parte reversa de la caja, las cajas de cultivo se deben colocar medio abiertas en la campana con el fin que se evapore el agua de condensación.
- Alistar 5 tubos eppendorf para dilución seriada de cada tubo de alícuota, marcarlos como I, M o F y de -1 a -5.
- Agregar 900 uL de medio de cultivo 7H9 todos los tubos eppendorf para diluciones seriadas
- Descongelar las alícuotas almacenadas a -70°C de forma escalada en incubadora a 37°C por aproximadamente 10 minutos.
- Una vez descongelados, hacer vórtex por aproximadamente 10 segundos
- Tomar 100 uL de la suspensión de bacterias y agregarlos al tubo -1, hacer vórtex y llevar a sonicar por 45 segundos.
- Continuar con las diluciones seriadas como se muestra en la siguiente figura:

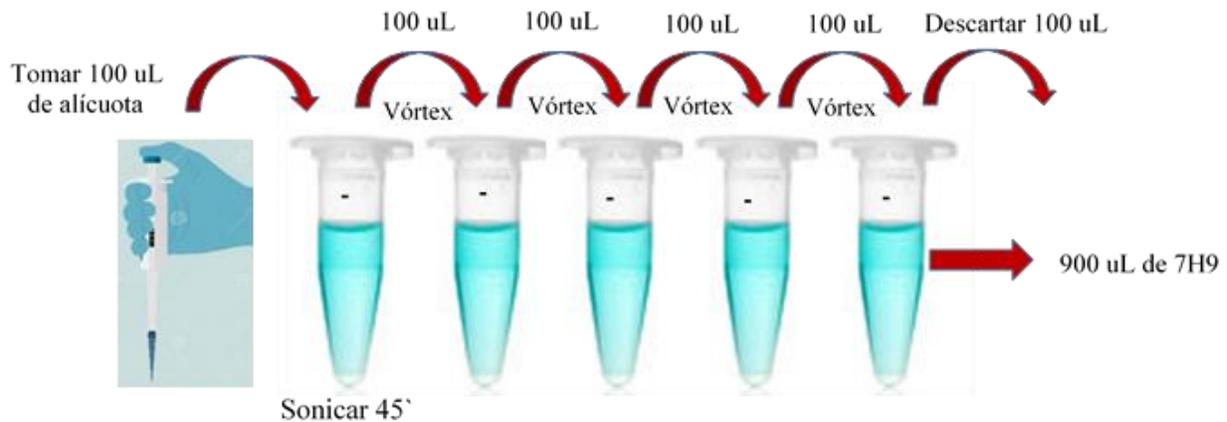


Figura A-2. Esquema de realización de diluciones para siembra de UFCs de alícuotas de cepas de *M. tuberculosis*.

- Tener en cuenta cambiar la punta por cada dilución.
- Realizar el mismo procedimiento con cada una de las alícuotas
- El experimento de UFC se debe realizar por duplicado para cada alícuota (I, M y F).
- Alistar 6 cajas de agar 7H10 y dividir las en 8 partes iguales por la parte reversa de la base.
- Una vez hechas las diluciones, dispensar 10 uL desde la dilución -5 a la -2 en cada una de las divisiones de la caja de agar como se muestra en la Figura 2.

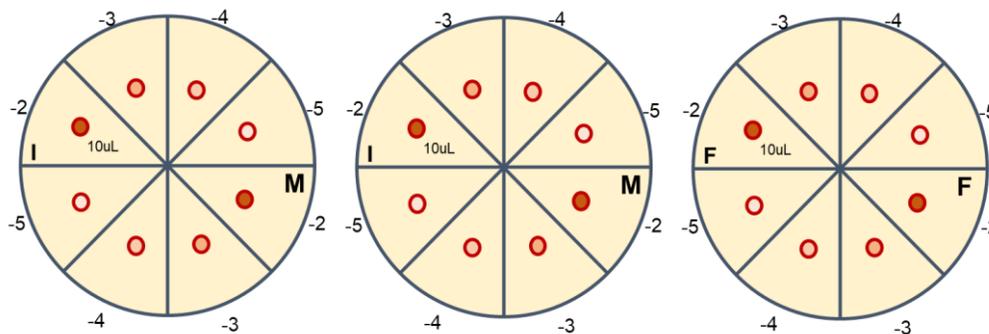


Figura A-3. Esquema de marcaje y dispensación de muestras en cajas de agar 7H10.

- Esperar a que la muestra sembrada sea absorbida por el agar, guardar las cajas en bolsas estériles y sellarlas con cinta de enmascarar.
- Incubar a 37°C con atmosfera de 5% de CO₂ y leer a los 14 y 21 días de sembrado en estereoscopio y verificar la pureza de los cultivos.
- En el momento de realizar el recuento, con un marcador de punta fina ir punteando las colonias que se vayan contando con el fin de no recontar colonias.
- Anotar el número total de UFCs de cada dilución, si las colonias son confluentes y difíciles de diferenciar unas de otras.

- Si las diluciones están contaminadas con bacterias diferentes al complejo M. tuberculosis y no se pueden contar, capturar el dato como impedimento estérico (IE) o contaminadas (C).
- Si el número total es menor a 100 UFC, capturar el dato en números enteros, si el número es mayor a UFC, capturar el dato como incontables (I).

Los datos se deben capturar en una tabla como la que se muestra a continuación:

Tabla A-3. Tabla de captura de datos de UFCs con ejemplo.

Nº de Cepa	C	-1	-2	-3	-4	Observaciones
323 (I)	I/I	C/C	95/97	75/70	20/30	Colonias lisas
323 (M)	I/I	I/I	90/95	68/65	15/20	
323 (F)	I/I	I/I	97/90	69/79	22/23	

Para la interpretación de los datos, el número de UFCs, se elige la dilución más concentrada en la que se pudieron obtener recuentos en números enteros o la dilución con números enteros después de la dilución con un recuento de incontables.

Se realiza el promedio de UFCs entre los datos obtenidos de los tubos de I, M y F, preferentemente la dilución elegida para el análisis de los datos debe ser la misma en los tres tubos.

Una vez se elija la dilución con la que se realizará el cálculo, se tienen en cuenta los siguientes factores de conversión:

No. de bacterias en el conc x 0.0001

No. de bacterias en la dil -1 x 0.001

No. de bacterias en la dil -2 x 0.01

No. de bacterias en la dil -3 x 0.1

No. de bacterias en la dil -4 x 1

Ejemplo

En conc y en dil -1 =incontables

37 en la dil-2 =0.37

42 en la dil-2 =0.42 prom=0.4225 de millón de bacterias

5 en la dil -3=0.5 422, 500 bacterias por dilución

4 en la dil -3=0.4

ANEXO A-9. PROTOCOLO PARA REALIZACIÓN DE EXPERIMENTO “KILLING” USANDO MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE RATÓN INFECTADOS CON Mtb

Materiales, equipos y reactivos:

- Cabina de Bioseguridad Clase II tipo B2
- Vortex
- Pippeteador
- Pipetas 5 ml
- Sonicador
- Baño María a 37°C
- Micropipetas de 1000, 200 y 20 µl.
- Pipeta Multicanal de 20-200 µl.
- Puntas de 1000, 200 y 20 µl.
- Placas de Petri vacías.
- Tubos Falcon de 15 ml y 50 ml
- Gradilla para tubos Falcón
- Tubos eppendorff de 1.5 ml.
- Placas de agar 7H10 – 1 por cepa bacteria
- 5 placas de 96 con tapa para el ensayo
- Botella de desechos
- Bolsa de basura grande
- Par de guantes y otro par para manipular bacteria
- Cámara de Neubauer y azul de Tripan 0.4%

SOLUCIONES Y REACTIVOS NECESARIOS PARA EL EXPERIMENTO

RPMIc para macrófagos MH-S (volumen total: 1000 ml)

RPMI 1640 (RPP12 Caisson)

2 gr de bicarbonato de Sodio

Ajustar a pH 7.4

Esterilizar por filtración

Suplementar con 100 ml de SFB

RPMI + Antibiótico (solución de lavado, volumen total: 130 ml)

1 ml de antibiótico

49 ml de RPMI

PBS-EDTA 1 LT

0.2 gr de EDTA

1000 ml de PBS

Ajustar a pH 7.4

Esterilizar por filtración

SDS 0.1%

Pesar 20 mg de SDS y disolver en 20 ml de 7H9. Filtrar en cabina de bioseguridad con filtro de 0,2µm. Alicuotar de a 4 ml y congelar a -20°C.

BSA 20%

Pesar 4 g de BSA y disolver en 20 ml de 7H9. Filtrar dentro de cabina de bioseguridad con filtro de 0.22µm. Alicuotar de a 4 ml y congelar a -20°C.

Agar 7H10

900 ml agua destilada

19 g de 7H10 agar

5 ml de glicerol

100 ml de OADC

Medio 7H9

4,7g de 7H9 polvo

5 ml de glicerol

900 ml de agua destilada.

0,5 ml de Tyloxapol premium.

100 ml de OADC (5 tubos).

Cultivo Celular

- Disponer de un baño maría precalentado a 37°C
- Colocar 9 ml de medio RPM1c en tubos falcon de 15 ml
- Colocar 8 ml de medio RPM1c en una botella de 25 ml y llevar a 37°C
- Tomar las células del Ultracongelador (-70° C) al baño María hasta que solo quede un hielo pequeño, enseguida limpiar con etanol al 70 %, recolectar las células y colocarlas en el tubo de 15 mL
- Centrifugar a 100 g durante 8 min a 4° C
- Descartar sobrenadante, resuspender el pellet, agregar 2 mL de RPMI – SFB y colocar en la botella de 25 cm²
- Incubar a 37° C y revisar diario

Procedimiento para cultivo y mantenimiento de la línea celular MH-S (ATCC® CRL-2019™)

- Observar confluencia de las células, proseguir si es necesario pase
- Encender UV durante 15 min de la campana de flujo laminar
- Limpiar el material y frascos de soluciones a emplear con etanol antes de colocarlos en la campana
- guantes, limpiar con etanol las botellas de cultivo y colocarlas en la campana
- Retirar medio de las células y colocarlo en un falcon de 50 mL, este contiene las células no adherentes. Poner PBS – EDTA en las botellas de cultivo asegurándose de cubrir la capa celular (aproximadamente 5 mL botella de 25 cm² y 10 mL botella de 75 cm²) e incubar durante 30 min a 37° C, estas son las células adherentes
- Pasado el tiempo dar pocos golpes fuertes a los lados de la botella para despegar las células y traspasar al falcon de 50 mL

- Centrifugar 5 min a 1500 rpm a 4°C, decantar sobrenadante y resuspender el pellet celular
- Adicionar 5 mL de RPMI – SFB y resuspender suavemente
- Tomar 1 mL de la suspensión celular, colocarlo en una o varias nuevas botellas, añadir 4 mL de RPMI – SFB para una botella de 25 cm² y 12 mL para una de 75 cm². Desechar las células restantes.
- Rotular botellas con nombre, línea celular, número de pase y fecha

NOTA:

Poner una gasa en la cabina de bioseguridad y mantenerla húmeda con etanol

Cada vez que se saquen las manos de la cabina, aplicarse etanol en los guantes

Colocar todas las tapas hacia arriba y no pasar nada por encima

No pasar nada por encima de tubos ni botellas abiertas

Obtención de cultivo en masa previo al ensayo de Killing

- Para este ensayo se utilizan 1×10^5 células por pozo en 200 µl de medio de cultivo. Se calculan células para 24 pozos: **2.4×10^6 células**.
- Tomar el volumen necesario del cultivo para obtener 2.4×10^6 células, se colocan en un falcon de 50 ml y se centrifugan durante 5 minutos a 1500 RPM.
- Descartar sobrenadante y resuspender en 40 ml de RPMIc para MH-S
- Sembrar 200 µl en placa de 96 pozos e incubar a 37°C en incubadora con CO₂ al 5% por 24 horas.
- A las 24 horas, retirar el medio de cultivo con pipeta multicanal (cuidando de no tocar el fondo de los pozos) y se colocar 200 µl de RPMIc. Se incuban en incubadora por 48 horas.

Preparación de bacterias para la infección

En este ensayo se utilizan **5×10^5 bacterias por pozo** en 180 µl de medio de cultivo. Calculando un total de 24 pozos por cepa bacteriana, se requieren aproximadamente 12×10^6 bacterias por cepa a partir de un stock de 10.8×10^6 bacterias/ml.

Calculando, se descongelan 2 viales a 37°C durante 10 minutos en incubadora.

El protocolo para la obtención y almacenamiento de bacterias en alícuotas a concentración conocida está detallado en el **ANEXO A-8**

Tomar 1.8 ml de cada bacteria para la infección y agregar 2160 µl de medio de cultivo RPMIc para MH-S.

Sonicar las bacterias por 45 segundos a 20 kHz

Infección

Añadir 180 µl de la solución de bacterias sonicada, a cada pozo según esquema de trabajo

Incubar 3 horas en incubadora a 37°C con CO₂ al 5%

Descartar el sobrenadante en cajas de Petri, evitar hacer burbujas y formar aerosoles y lavar 3 veces con 200 µl de RPMI + Antibiótico.

Añadir 200 µl de RPMIc para MH-S a cada pozo.

Dejar incubando a 37°C 1 hora (Día 0), 24 horas (Día 1), 48 horas (Día 2), 72 horas (Día 3) o 96 horas (Día 4).

Luego de ese tiempo, proseguir con los protocolos de UFCs (D0, D1 y D4), y medición de citoquinas

Control de Calidad

La solución de bacteria utilizada se plaquea en medio sólido 7H10 como control de calidad (cantidad de bacterias sembradas).

- Se colocan 270 µl del medio 7H9 en 4 tubos eppendorff. Se rotulan con -1, -2, -3 y -4.
- Se toman 30 µl de la solución de bacterias y se añaden al tubo -1. Se resuspende 15 veces y se pasan 40 µl al tubo -2. Se repite hasta la dilución -4.
- Se toman 10 µl de cada dilución y se siembra una gota en la placa de 7H10. Se comienza sembrando por la menor dilución (-4).

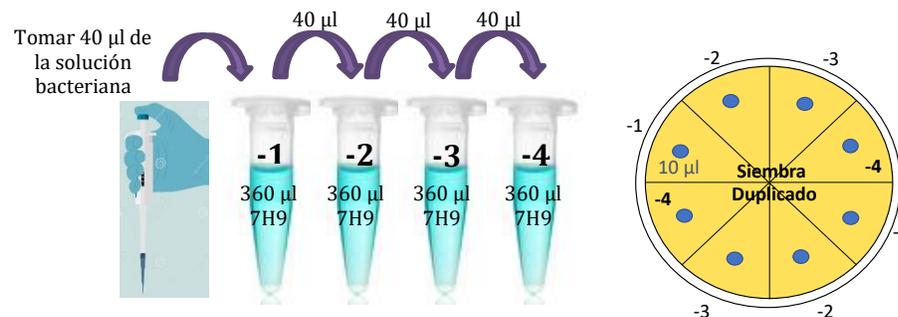


Figura A-4. Diluciones seriadas y siembra para recuento de UFCs.

- Esperar a que la muestra sembrada sea absorbida por el agar (placas con tapa arriba), guardar las cajas en bolsas estériles (placas con tapa abajo) y sellarlas con cinta de enmascarar. Incubar a 37°C con atmosfera de 5% de CO₂ y leer a los 14 y 21 días de sembrado en estereoscopio y verificar la pureza de los cultivos.

CITOQUINAS

- Tomar el sobrenadante de los triplicados y juntarlos en un tubo eppendorff. En los días de cada tiempo pos-infección y cada cepa. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
- Pasar el sobrenadante por un filtro de 0.22 µm de 4 mm de diámetro y colocar en un tubo eppendorff estéril.
- Congelar a -70°C hasta la medición de citoquinas por ELISA.

KILLING: SIEMBRA DE UFCs

- Preparar una placa de 96 pozos sin tapa. Se siembran los triplicados de cada bacteria por duplicado en placas de UFCs.
- Pasado el tiempo de incubación, tomar la una de las placas por cada tiempo.

- Luego de tomar el sobrenadante de cultivo para medir citoquinas, lisar las células con 100 μ l de 7H9 con SDS 0.1% mezclando vigorosamente y raspando en cruz el fondo de la placa durante 10 min a temperatura ambiente.
- Neutralizar la acción del SDS adicionando 100 μ l de 7H9 con BSA al 20%.
- Para hacer las diluciones a sembrar en medio 7H10, colocar 270 μ l de medio 7H9 por pozo.
- Tomar 10 μ l del pozo a estudiar y sembrar la dilución concentrada en la placa de UFCs.
- Tomar 30 μ l del pozo a estudiar, colocar en el primer pozo de la dilución (-1) y hacer diluciones sucesivas resuspendiendo 10 veces y tomando 30 μ l para pasar al pozo siguiente como se esquematiza en la Figura A-5.

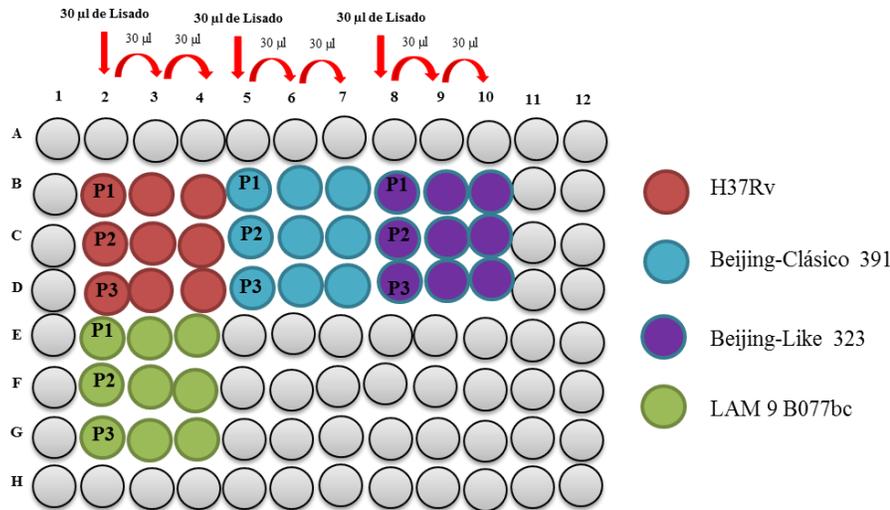


Figura A-5. Esquema de siembra de células y diluciones para la realización de “killing”

- Sembrar **10 μ l de las diluciones -1, -2 y -3 en la placa de UFCs.** Se siembra una placa para cada pozo del triplicado, por duplicado en la misma.
- Dejar absorber las placas con la tapa para arriba para dejar secar la gota de siembra, cerrar e incubar durante 14 y 21 días para el recuento de UFCs.

ELISA PARA CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTE

MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Lector de Elisa
- Placas de 96 pozos de poliestireno para ELISA
- Pipetas 10, 100 y 1000 µl
- Puntas para Micropipetas 10, 100 y 1000 µl
- Probetas
- Agua des ionizada
- Tubos para preparación de estándar

Preparación de soluciones:

Buffer de Cobertura (Coating Buffer):

Carbonato de sodio 0.1 M

NaHCO₃ pH 9.5: 7.13 g

Na₂CO₃ 1.59 g

Cantidad Suficiente para 1000 ml

Ajustar pH a 9.5

Diluyente:

PBS con 10% de Suero Fetal Bovino pH 7.0

Buffer Fosfato Salino:

NaCl 80.0 g

Na₂HPO₄ 11.6 g

KH₂PO₄ 2.0 g

KCL 2.0 g

Cantidad Suficiente para 10000 ml

Ajustar pH a 7.0

PBS* con Tween-20 al 0.05%

Tetrametilbenzidina (TMB)

Peróxido de Hidrógeno

Solución de Parada:

H₃PO₄ 1M

El principio de la prueba utilizada para la medición de citoquinas, fue un ELISA tipo sándwich la cual es altamente sensible y específica que permite evaluar la concentración de la proteína en muestras de interés

Con los sobrenadantes filtrados obtenidos de las células infectadas fueron recolectados al día 0, 2, 3 y 4 post infección para medición de las citoquinas IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-12p70 e IL-10, usando los siguientes kits: Mouse TNF-α (Mono/Mono) ELISA Set Cat. No. 555268 (BD OptEIA™), Mouse IFN-γ ELISA Set Cat. No. 555138 (BD OptEIA™), Mouse IL-12 (p70) ELISA Set (BD OptEIA™), Mouse IL-10 ELISA Set Cat. No. 555252 (BD OptEIA™), Mouse IL-1β ELISA Set Cat. No. 559603 (BD OptEIA™).

Debido a lo poca cantidad de sobrenadante que se obtuvo, se realizaron pools de los pozos replicas para la medición de citoquinas.

Para la realización de la prueba se diseñó el montaje como se muestra a continuación:

	IL-10						TNF α					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2000 pg/ml	2000 pg/ml	H37Rv D0	H37Rv D0	LAM D3	LAM D3	2000 pg/ml	2000 pg/ml	H37Rv D0	H37Rv D0	LAM D3	LAM D3
B	1000 pg/ml	1000 pg/ml	391 D0	391 D0	SI D3	SI D3	1000 pg/ml	1000 pg/ml	391 D0	391 D0	SI D3	SI D3
C	500 pg/ml	500 pg/ml	323 D0	323 D0	H37Rv D4	H37Rv D4	500 pg/ml	500 pg/ml	323 D0	323 D0	H37Rv D4	H37Rv D4
D	250 pg/ml	250 pg/ml	LAM D0	LAM D0	391 D4	391 D4	250 pg/ml	250 pg/ml	LAM D0	LAM D0	391 D4	391 D4
E	125 pg/ml	125 pg/ml	SI D0	SI D0	323 D4	323 D4	125 pg/ml	125 pg/ml	SI D0	SI D0	323 D4	323 D4
F	62,5 pg/ml	62,5 pg/ml	H37Rv D3	H37Rv D3	LAM D4	LAM D4	62,5 pg/ml	62,5 pg/ml	H37Rv D3	H37Rv D3	LAM D4	LAM D4
G	31,3 pg/ml	31,3 pg/ml	391 D3	391 D3	SI D4	SI D4	31,3 pg/ml	31,3 pg/ml	391 D3	391 D3	SI D4	SI D4
H	Blanco	Blanco	323 D3	323 D3			Blanco	Blanco	323 D3	323 D3		

Tabla A-4. Esquema de montaje de placas de ELISA

La reconstitución del estándar de cada kit se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la elaboración de la curva estándar, se realizaron diluciones seriadas a partir del stock correspondiente a cada citoquina como se muestra a continuación:

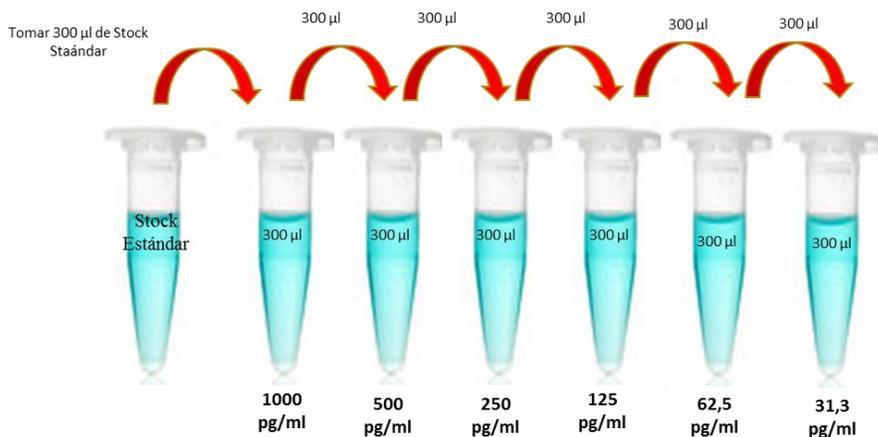


Figura A-6. Esquema de diluciones seriadas para elaboración de curva estándar de cada citoquina.

La preparación de Buffers y reactivos se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante para cada kit con las referencias antes mencionadas.

PROCEDIMIENTO:

- Cubrir los micropozos con 100 µl de anticuerpo de captura diluido en buffer de cobertura. Sellar la placa e incubar durante toda la noche a 4°C.
- Aspirar el contenido de los pozos y lavar 3 veces con buffer de lavado, sacudir la placa sobre papel absorbente para eliminar todo el líquido.
- Bloquear la reacción en las placas con 200 µl de diluyente e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
- Aspirar contenido y lavar tres veces
- Adicionar 100 µl de estándar o muestra a cada pozo según corresponda e incubar 2 horas a °T ambiente.
- Aspirar contenido y lavar 5 veces
- Adicionar 100 µl de reactivo de detección a cada pozo e incubar 1 hora a °T ambiente

- Aspirar contenido y lavar 7 veces
- Adicionar 100 μ l de solución substrato a cada pozo e incubar 30 minutos a °T ambiente.
- Adicionar 50 μ l de solución de parada a cada pozo y leer a 450 nm en máximo 30 minutos con una longitud de onda de corrección a 570 nm.

Interpretación de Resultados

Calcular la media de la absorbancia para cada set de estándares, controles y muestras por duplicado. Restarle a la media de la absorbancia del estándar Cero. Graficar la curva estándar en papel milimetrado o en Excel con la concentración de la citoquina en el eje “X” y la absorbancia en el eje “Y” y trazar la diagonal a lo largo de los puntos obtenidos de la curva. Para determinar la concentración de las citoquinas, encontrar la media del valor de la absorbancia desconocida sobre el eje “Y” y extrapolar a la curva estándar. En el punto de intersección dibujar una línea vertical al eje “X” y leer la concentración de la citoquina.

Graficar usando el programa estadístico de elección.

ANEXO A-10. PROTOCOLO PARA RECuento DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFCS) DE *M. TUBERCULOSIS* EN ÓRGANOS DE RATONES INFECTADOS

Materiales:

- Perlas de sílice y Zirconia
- Equipo homogenizador MP FastPrep 24
- Sonicador
- Micropipetas automáticas 10, 200 y 1000 UI
- Puntas para micropipetas 10, 200 y 1000 UI
- Placas de Petri desocupadas estériles
- Placas de Petri con medio 7H10 suplementado con 5% de glicerol y 10% de OADC (Albumina Bovina, Dextrosa, catalasa y Ácido Oleico)
- Pinzas estériles
- Hielo en contenedores para tubos de 1,5 ml
- Vórtex
- Placas de Elisa para diluciones seriadas
- PBS (Buffer de Fosfatos Salino) +TWEEN 0,05%
- Clidox TM
- Alcohol 70%
- Pipeteador eléctrico
- Gradilla plástica
- Gorro desechable
- Guantes de nitrilo desechables
- Bata desechable
- Polainas o zapatones desechables
- Cinta de enmascarar
- Plumones
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora a 37°C y 5% de CO₂

Base Racional del procedimiento:

Este procedimiento se realiza con el fin de determinar cuál es la carga bacteriana en los órganos de ratones infectados a un tiempo patognomónico de sacrificio; normalmente, en la cinética de inmunopatología de tuberculosis en el ratón, los días establecidos para el sacrificio son: 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120, la cantidad de UFCs variará de acuerdo al tiempo que lleven infectados los animales y a la cepa infectante, este experimento proporciona información sobre la virulencia de la bacteria infectante y de los efectos de los tratamientos que se les estén administrando a los animales si es el caso.

Procedimiento:

Colocar las muestras en orden (Pulmón, Bazo, cerebro etc.) en una gradilla con hielo, tener en cuenta mantener las muestras en estas condiciones a lo largo del experimento.

Disponer en una placa de Petri estéril las perlas de Sílice y Zirconio de acuerdo al número de muestras que se vayan a trabajar.

Con pinzas estériles, agregar a cada tubo una perla de Sílice y Zirconio colocando las tapas boca abajo sobre una gasa estéril.

Con los tubos bien tapados, llevar al equipo Fast-Prep para moler los órganos durante 20 segundos. En cabina de flujo laminar agregar 1 ml de PBS 1x-Tween 0.05%

Llevar a moler en el equipo Fast Prep para disgregar los órganos por 20 segundos tres veces seguidas con intervalos de 3 minutos, estos intervalos son necesarios para dejar el equipo descansar, durante este tiempo las muestras deben ser mantenidas en hielo.

Una vez los órganos estén homogéneos, llevar a sonicar por 45 segundos en sonicador de agua a una frecuencia de 20 kHz, este proceso se realiza con el fin de disgregar los agregados de bacterias y de esta manera tener una dilución más homogénea de las mismas.

En cabina de flujo laminar, hacer Vórtex por 10 a 15 segundos para continuar con el proceso de homogenización.

Destapar los tubos colocando tapas hacia abajo para realizar diluciones en base 10, este proceso se realiza en una placa de Elisa, si los ratones son sacrificados en los días 1, 3 y 7 se usan las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , y 10^{-3} , si los ratones son sacrificados los días 7, 14, 21, 28, 60 y 120, se usan las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

Agregar a los pozos de la placa de ELISA 270uL de PBS 1x-Tween 0.05%, el número de pozos dependerá del número de diluciones a realizar.

En el primer pozo agregar 30μL de la muestra homogenizada usando puntas de 200 μL cortadas en la punta y resuspender con la pipeta.

Hacer diluciones sucesivas pasando de a 30 μL en cada dilución, descartar los últimos 20 μL para que la última dilución quede al mismo volumen de las anteriores.

A continuación, se muestra el proceso esquematizado.

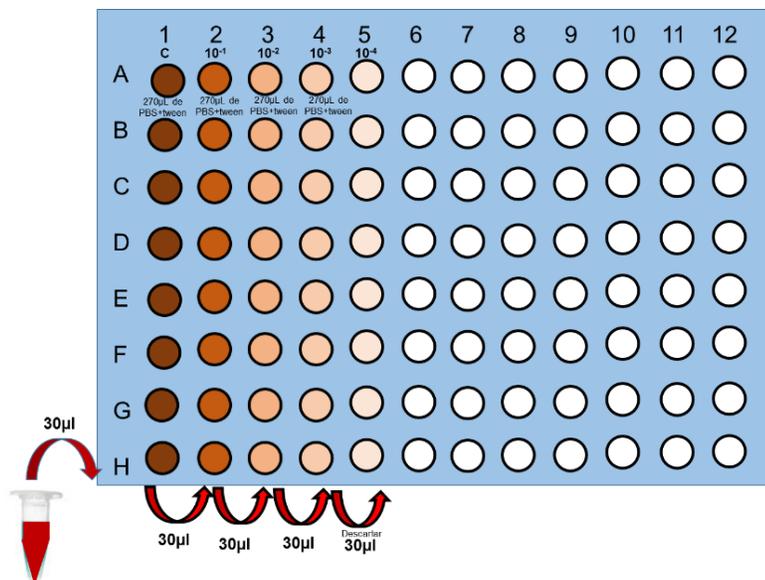


Figura A-7. Proceso de diluciones seriadas de órganos homogenizados

En placas de agar 7H10 sembrar 10 uL de cada dilución desde la más diluida hasta la más concentrada en el centro de cada división del agar como se muestra a continuación.

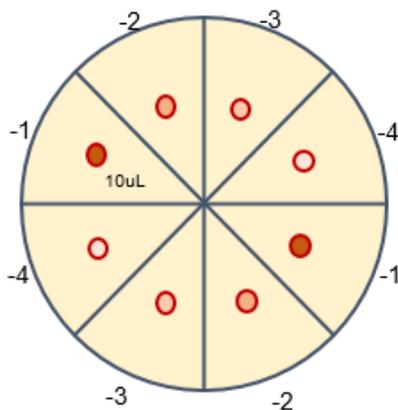


Figura A-8. Siembra de diluciones de órganos homogenizados en agar 7H10.

Dejar que la gota de siembra sea absorbida por el agar y llevar a incubar a 37°C, realizar recuento de UFCs a los 14 y 21 días.

Los datos que se capturas preferiblemente son los del día 21, el valor de las UFC contadas se multiplica por los siguientes factores de acuerdo a la dilución.

- No. de bacterias en el conc x 0.0001
- No. de bacterias en la dil -1 x 0.001
- No. de bacterias en la dil -2 x 0.01
- No. de bacterias en la dil -3 x 0.1
- No.

ANEXO A-11. PROTOCOLO EXTRACCIÓN DERNA A PARTIR DE PULMÓN DE RATÓN INFECTADO DE *M. tuberculosis*. Kit Quick RNA mini prep Zymo. Cat. R1055

Antes de comenzar:

- Mandar a esterilizar una espátula, mortero y pistilo.
- Suplementar el Buffer de Lisis RLT plus con β mercapto etanol, por cada 100 ml de RLT plus agregar 10ul de β mercapto etanol
- Preparar dos tubos estériles de 1.5 mL con 600 μ L de buffer RLT Plus- β mercapto etanol y colocar los tubos en el hielo.
- Pre-tratar una columna verde con DNasa de la siguiente manera:

Pre-tratamiento de Columnas

- Lavar la columna con 400 μ L de RNA Wash Buffer. Centrifugar a 10,000g/1 min/4°C
- Al utilizar el DNA Digestion Buffer, preparar la siguiente mezcla por columna:
 - DNase I 5 μ L
 - DNA Digestion Buffer 75 μ L
- Agregar 80 μ L a la columna ya lavada con wash buffer y dejar incubar durante 15 min a temperatura ambiente
- Centrifugar a 14,000rpm /1 min/4°C
-

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Es importante que todo el procedimiento se haga sin pausas y de manera rápida para evitar que las muestras se calienten.

1. Colocar todos los buffers del kit en hielo. Excepto el buffer de lisis porque cristaliza.
2. Enfriar la espátula, el mortero y el pistilo con nitrógeno líquido.
3. Colocar el pulmón en el mortero y pulverizarlo con ayuda de nitrógeno líquido.
4. Repartir el pulmón en polvo en el mayor número de tubos de 1,5 ml posible y almacenar a -70°C hasta el inicio del proceso de extracción.
5. En un tubo de 1.5 ml agregar 200 uL de RLT plus+ β -Mercaptoetanol y 5 uL de inhibidor de RNasa murino, dejar enfriar en hielo 2 minutos y agregar 400uL adicionales de RLT plus suplementado, agregar esta mezcla a cada tubo con pulmón pulverizado y resuspender cuidadosamente con la pipeta. Si quedan restos de tejido sin homogenizar, quitarlos con la pipeta antes de centrifugar (homogenizar de preferencia 6 veces y colocar en el hielo un momento antes de volver a homogenizar)
6. Agregar al pellet 600 μ L buffer de lisis y homogenizar, no colocar en el hielo.
7. Inmediatamente pasar la mezcla a una columna amarilla de eliminación de DNA genómico y centrifugar a 10,000 g/1 minuto/4°C

Conservar el filtrado

8. Agregar el filtrado a una columna de eliminación de DNA genómico de Quiagen (Morada) y centrifugar a 10,000 g/1 minuto/4°C
9. Agregar al filtrado 600 μ L ETOH 100%. Homogenizar.
10. Colocar la mezcla en la columna verde de purificación de RNA previamente tratada con DNasa.

11. Centrifugar a 10.000 g/1 minuto/4°C Descartar filtrado
12. Agregar el contenido restante por la columna verde centrifugando a 10,000 g/1 minuto/4°C
13. Agregar 400 µL del prep- buffer.
14. Centrifugar a 10.000 g/1 minuto/4°C. Descartar sobrenadante.
15. Agregar 700 µL de wash buffer.
16. Centrifugar 10.000 g/1 minuto/4°C. Descartar el sobrenadante.
17. Agregar 400 µL de wash buffer.
18. Centrifugar 10.000g /2 min/4°C. Descartar el sobrenadante
19. Dejar secar la columna con la tapa abierta 2 minutos a temperatura ambiente.
20. Agregar 35 µL de agua libre de RNAsas en el centro de la membrana.
21. Volver a centrifugar a 14.000g/2 min/4°C en un tubo eppendorf 1.5 mL estéril
22. Repetir los pasos 19. y 20. Para tener al final dos eluciones de RNA en aprox 35 µL de agua cada una.
23. Si se va a correr el gel, de preferencia hacerlo el mismo día de la extracción, sino es posible, congelar a -70°C.
24. Medir la calidad y cantidad del RNA por espectrofotometría (EPOCH™, NanoDrop™) o fluorometría (Qbit).
25. Las muestras con resultados calidad y cantidad adecuada verificadas por electroforesis en gel de agarosa, y por espectrofotometría o fluorometría, se envían para medición de RIN por electroforesis capilar.

ANEXO A-12. PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL (qRT-PCR) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS

Materiales, Equipos y Reactivos

- QuantiTect SYBR® Green PCR Kit (Cat No./ID: 204143) Quiagen
- Omniscript® Reverse Transcription (Cat No./ID: 205111) Quiagen
- ABI 7500 Real Time System Applied Biosystems
- Micropipetas
- Puntas estériles para micropipetas
- Placas ópticas de PCR de 96 pozos
- Plástico óptico para sellar placas de PCR
- Microplate Spectrophotometer EPOCH
- Estación de PCR
- RNA de interés
- Qusntitec SYBR Green PCR Kit Ref: 204143 Quiagen por 200 reacciones de 50 uL
- Hot Start Taq Master Mix kit 250 unidades cat: 203443
- Ladder: Direct load PCR 100 bp Low ladder Cat: D 3687.1VL Sigma Aldrich
- Agarose MS 100 gr Roche Cat: 11816586001
- Adhesivo placas para PCR MicroAmp Optical Adhesive Film PCR Compatible DNA/RNase free Applied Biosystems Cat:4311971
- Placas PCR: ABI/PRISM 96 Well Optical Reaction Plate with barcode Cat: 4306737
- Tips pipeta Repetidora: Combitips plus 0.2 ml Eppendorf Cat: 0030069218
- Pure Ethyl Alcohol Sigma Aldrich 500 ml Cat E7023

Base Racional del Experimento

Uno de los parámetros para determinar la virulencia de las cepas determinado por el daño a los tejidos de los órganos del modelo murino, es a través de la medición de la expresión de diferentes clases de citoquinas a partir de homogenizados de órganos. Como ha sido ampliamente reportado en la literatura, el tipo de respuesta inmunológica generada por la infección de diferentes cepas de Mtb polariza la respuesta inmunológica hacia la producción de citoquinas tipo Th1 y Th2, lo que desencadena o no un amplio daño e incluso la muerte de los animales infectados.

Una de las técnicas más utilizadas para determinar la expresión de genes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real Cuantitativa a partir de la Transcripción Reversa. Por éste método se obtiene una copia de cDNA y amplifica un fragmento de un gen a través de ciclos sucesivos de cambios de temperatura (Denaturación y Anillamiento) y se obtienen millones de copias de dicha región o gen. En esta técnica se combinan dos procesos: Amplificación (PCR) y Detección (A partir del uso de un fluoróforo) y se correlacionan el producto de amplificación después de cada ciclo y la señal de la intensidad de la fluorescencia generada por la unión del fluoróforo al DNA permitiendo hacer el seguimiento del proceso de amplificación sin necesidad de una electroforesis posterior.

La detección de la amplificación se logra cuando se obtiene el número de ciclos necesarios para que cada curva de amplificación alcance el umbral de fluorescencia (Ct: Ciclo Treshold o umbral). Como método de cuantificación se realiza la comparación de los Ct entre las muestras, dando lugar al cálculo de la diferencia de la cantidad inicial de material genético (DNA o RNA). Entonces el valor del Ct es directamente proporcional a la cantidad de inicial de DNA o a la cantidad de número de copias de un gen (A mayor cantidad de DNA o mRNA, menor número de Ct).

PROCEDIMIENTO

Síntesis de cDNA

Del RNA extraído siguiendo el **Anexo A-11** de extracción de RNA, tomar la cantidad indicada en la Tabla X para realizar el proceso de retrotranscripción usando el kit Omniscript® Reverse Transcription de Quiagen.

Componente	Volumen 1x	Concentración Final	Protocolo Térmico
10X Buffer RT	2 µl	1x	Retrotranscribir en termociclador a 37°C por 60 minutos
dNTP Mix (5mM de cada dNTP)	2 µl	0.5 mM c/u	
Oligo (dT) 15 Primer (20 µg)	2 µl	1 µM	
RNase Inhibitor (10 units/µl)	1 µl	10 unidades (por 20 µl reaction)	
Omniscrypt Reverse Transcriptase	1 µl	4 unidades (por 20 µl reaction)	
RNase free water	Variable		
RNA total	Variable	> 2 µg/ 20 µl reacción	
Volumen Total 20 µL	20 µl	-	

Tabla A-5. Condiciones para retro transcripción del RNA obtenido a partir de homogenizados de pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis*.

Una vez obtenidos los productos de la transcripción reversa, almacenar a -20°C hasta el montaje de qRT-PCR.

Citoquinas Cuantificadas

A continuación, se relaciona en la **Tabla A-6**, los genes de las citoquinas que a las que se les midió expresión por qRT-PCR, con la secuencia respectiva de los iniciadores utilizados junto con el protocolo térmico para cada gen.

Gen	Secuencia de Iniciadores	Longitud del Producto de Amplificación	Protocolo Térmico				Curva de Disociación
			Denaturación Inicial	Denaturación	Anillamiento	Extensión	
rplp0	PF: CTCTCGCTTCTGGAGGGTG	108 pb	95°C x 10 min	95°C x 20 seg	60°C x 20 seg	72°Cx 35 seg	95°C x 15 seg
	PR: ACGCGCTGTACCCATTGAT						60°C x 1 min
							95°C x 15 seg
Factor de Crecimiento Transformante beta	PF: AGGGCTACCATGCCAACTCT	102 pb	95°C x 10 min	95°C x 20 seg	60°C x 20 seg	72°Cx 35 seg	95°C x 15 seg
	PR: CCGGGTTGTGTGGTTGTACA						60°C x 1 min
							95°C x 15 seg
Interleuquina 12	PF: GGATGGAAGAGTCCCAAAA	116 pb	95°C x 10 min	95°C x 20 seg	60°C x 20 seg	72°Cx 35 seg	95°C x 15 seg
	PR: GCTCTGCGGGCATTTAACAT						60°C x 1 min
							95°C x 15 seg
Interferón Gamma	PF: GGTGACATGAAAATCCTGCAG	181 pb	95°C x 10 min	95°C x 20 seg	58°C x 20 seg	72°Cx 35 seg	95°C x 15 seg
	PR: CCTCAAACCTGGCAATACTCATGA						60°C x 1 min
							95°C x 15 seg
Factor de necrosis tumoral Alfa	PR:TCGAGTGACAAGCCTGTAGCC	110 pb	95°C x 10 min	95°C x 20 seg	60°C x 20 seg	72°Cx 35 seg	95°C x 15 seg
	PR:ITGAGATCCATGCCGTTGG						60°C x 1 min
							95°C x 15 seg
Oxido Nítrico Sintasa Inducible	PF: CGTGGCTACCAGATGCCCG	100 pb	95°C x 10 min	95°C x 20 seg	60°C x 20 seg	72°Cx 35 seg	95°C x 15 seg
	PR: GCCATAGCGGGCTCCAGC						60°C x 1 min
							95°C x 15 seg
Interleuquina 10	PF: GGTGCAAGCCTTATCGGA	191 pb	95°C x 10 min	95°C x 20 seg	54°C x 20 seg	72°Cx 35 seg	95°C x 15 seg
	PR: ACCTGCTCCACTGCCTTGCT						60°C x 1 min
							95°C x 15 seg

Tabla A-6. Secuencia de Primers y protocolo térmico de citoquinas cuantificadas en homogenizados de pulmones infectados con cepas de *M. tuberculosis*

Para el montaje de la PCR se utilizó el kit QuantiTect SYBR® Green PCR, en la **Tabla A-7.** se relacionan los reactivos y componentes de la mezcla maestra para la amplificación:

Componente	Volumen 1x	Concentración Final
Agua libre de Nucleasas	10.5 µl	-
HotStarTaq Master Mix	12.5 µl	-
Primer Forward	0.5 µl	0.2 µM
Primer Reverse	0.5 µl	0.2 µM
Template (cDNA)	1 µl	-

Tabla A-7. Master mix para cada citoquina.

Amplificar para cada gen con el protocolo térmico correspondiente mostrado en la **Tabla A-6.** Proceder a hacer los cálculos para la expresión relativa de cada citoquina.

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

Cuantificación relativa método ct (2-ΔΔCT)

Para cuantificar el número de copias de un gen de interés existen dos métodos: i) Cuantificación absoluta (a partir de la dilución de estándares) para detección del número exacto de moléculas y ii) Cuantificación Relativa (Cuantificación de la dilución de estándares de un gen Control o de referencia), ideal para ensayos de expresión génica, midiendo los cambios en el estado de base de un gen de interés, contra un gen de expresión constante que sirve como control. Dado a que no se

conoce la concentración o cantidad absoluta del estándar interno, sólo se pueden determinar los cambios relativos del gen de interés con referencia al gen de referencia.

Para el cálculo de la concentración de citoquinas por este método se requiere:

Normalizar los datos a partir de la diferencia entre el valor obtenido para el gen blanco y el valor obtenido para el gen de referencia para este caso con el método del Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

A partir del modelo matemático del Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), se calculan los cambios en la expresión génica como un cambio relativo entre una muestra (experimento) y un calibrador o gen constitutivo.

En la **Tabla A-8.**, se muestra un ejemplo del cálculo por el método ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para la obtención de la concentración de la expresión de iNOS al D3 post-infección de la cepa Beijing 323 usando el gen estructural *rplp0* en ratones infectados con las diferentes cepas vs Ratones sanos o sin ningún tratamiento.

Día Post Infección	Tratamiento	Ct gen	Ct estru1	dCt	prom dCt	Prom dCt xDia	ddCt	Unidades relativas exp 2-
		iNOS	RPLP0	Ctgen-Ctest			dCt exp - dCt\$ cont	2 ^{-ddCt}
D3	Sn1		34,49	-34,49	-34,515	5,5425	-34,515	24549932385
			34,54	-34,54				
	Sn2	34,73	29,56	5,17	4,955			
		34,68	29,94	4,74				
	Sn3	38,28	32,56	5,72	6,13			
		38,4	31,86	6,54				
D3	323 R1		26,91	-26,91	-26,89		-26,89	124364544,5
			26,87	-26,87				
	323 R2		26,85	-26,85	-26,88		-26,88	123505495,8
			26,91	-26,91				
	323 R3		38	-38	-32,765		-32,765	7298738566
			27,53	-27,53				

Tabla A-8. Cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para la determinación de la concentración de iNOS al D3 post-infección en ratones infectados con la cepa Beijing-Like 323

ANEXO A-13. PIPELINE PARA EL ANÁLISIS DE TRANSCRIPTOMAS COMPLETOS OBTENIDOS A PARTIR DE PULMONES DE RATONES INFECTADOS CON AISLAMIENTOS CLÍNICOS COLOMBIANOS GENOTIPO BEIJING DE *M. TUBERCULOSIS*.

CONTROL DE CALIDAD

Primero se hace la remoción de adaptadores y lecturas de baja calidad antes de realizar los análisis posteriores usando el programa TRIM_GALORE.

```
trim_galore -h  
fastx_trimmer -h
```

Estas son las líneas de comando para el control de calidad, fastx_trimmer para quitar los adaptadores y recortar las lecturas según su calidad; en este caso fueron 20.

```
fastx_trimmer -v -f 20 -i R1.fastq -o outfile.fastq  
trim_galore --fastqc -q 20 R1.fastq
```

MAPEO DE LECTURAS

Primero, se debe formatear el genoma de referencia con el comando bwa index. Con la opción -help para mostrar el menú. El genoma de referencia utilizado para este proceso fue el [Mus musculus \(assembly GRCm38.p6\)](#).

```
bwa index ReferenceGenome.fa  
bwa mem ReferenceGenome.fa R1.fastq > aln_OutFile.sam
```

RECUENTO DE LECTURAS

El recuento de lecturas se realizó usando el programa htseq-count, en este caso se debe proporcionar el archivo aaling htseq-count (el archivo sam) y el archivo gff (use la versión gff3).

```
htseq-count -a 2 -s no -t gene aln_OutFile.sam ref_gffFile.gff3 -o COUNTS >  
Counts.txt
```

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES

Para este proceso se utilizó DESeq2 de Bioconductor.

```
library("DESeq2")
```

```
countData <- read.csv("Sample_ForDESeq2.txt", header=T, row.names=1, sep="\t")
```

```
head (countData)
```

```
0610005C13Rik  1438 1104 1825 1348 1154 1005
0610007N19Rik  1012 1152 1139  878  885  835
0610007P14Rik   704  796  881  826  865  929
0610009B22Rik   757  802  780  885  853  987
0610009D07Rik  1107 1183 1220 1258 1221 1428
0610009L18Rik   129  154  139  138  166  179
```

```
colData <- DataFrame(condition=factor(c("ctrl","ctrl", "ctrl", "treat", "treat",
"treat")))
```

```
(condition <- factor(c(rep("ctl", 3), rep("treat", 3))))
```

Construir un conjunto de datos DESeq (DESeqDataSet)

```
dds <- DESeqDataSetFromMatrix(countData=countData, colData=colData,
design=~condition)
```

```
dds <- DESeq(dds)
```

```
res <- results(dds)
```

ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO EN GEE ONTHOLOGY(GO) Y KEGG

Para los análisis de enriquecimiento se utilizó el servidor web WebGestalt http://www.webgestalt.org/webgestalt_2013/ y se utilizó el Gi en el archivo All-Diff-Expression_Set.xlsx. Se utilizó un punto de corte de valor p de 0.01 para los enriquecimientos por GO y KEGG.

B. Anexo: Protocolos de laboratorio para desarrollo de experimentos para alcanzar el objetivo específico N°2.

ANEXO B-1. Protocolo de extracción diferencial y purificación de RNA de Mtb a partir de pulverizados de pulmones infectados.

ANEXO B-2. Protocolo de depleción o remoción de rna ribosomal de muestras de rna para transcriptoma de *Mycobacterium tuberculosis*. Kit Illumina® Ribo-Zero plus rRNA depletion kit.

ANEXO B-3. Protocolo de elaboración de librerías genómicas para RNA-seq de *M. tuberculosis* a partir de rna obtenido de pulmones de ratón balb/c infectados

ANEXO B-4. Protocolo de hibridación in-house con sondas para depleción de subunidades ribosomales de *M. tuberculosis*

**ANEXO B-1. PROTOCOLO EXTRACCIÓN DIFERENCIAL Y PURIFICACIÓN DE RNA
A PARTIR DE PULVERIZADOS DE PULMONES INFECTADOS. Kit Quick RNA mini
prep Zymo. Cat. R1055**

Antes de comenzar:

- a. Mandar a esterilizar una espátula, mortero y pistilo.
- b. Suplementar el Buffer de Lisis RLT plus con **β mercapto etanol**, por cada 100 ml de RLT plus agregar 10ul de β mercapto etanol
- c. Preparar dos tubos estériles de **1.5 mL con 600 μL de buffer RLT Plus-β mercapto etanol** y colocar los tubos en el hielo.
- d. Pre-tratar una **columna verde** con DNasa de la siguiente manera:
 - Lavar la columna con **400 μL de RNA Wash Buffer**. Centrifugar a 10.000g/1 min/4°C
En un tubo de 1.5 mL estéril preparar la siguiente mezcla:

DNase I	5 μL
10X DNase Reaction Buffer	8μL
DNase/RNase free water	3 μL
RNA Wash Buffer	64 μL

En caso de utilizar el **DNA Digestión Buffer del nuevo kit**, la mezcla que se prepara es la siguiente:

DNase I	5μL
DNA Digestion Buffer	75 μL

- Agregar los 80 μL de cualquiera de las dos mezclas que se haya preparado a la columna ya lavada con wash buffer y dejar **incubar durante 15 min a temperatura ambiente**
- Centrifugar a 14.000g /1 min/4°C

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Es importante que todo el procedimiento se haga sin pausas y de manera rápida para evitar que las muestras se calienten.

1. Colocar todos los buffers del kit en hielo. **Excepto el buffer de lisis porque cristaliza.**
2. Enfriar la espátula, el mortero y el pistilo con nitrógeno líquido.
3. Colocar el pulmón en el mortero y pulverizarlo con ayuda de nitrógeno líquido.
4. Repartir el pulmón en polvo en el mayor número de tubos de 1,5 ml posible y almacenar a -70°C hasta el inicio del proceso de extracción.
5. En un tubo de 1.5 ml agregar 200 uL de RLT plus+ β -Mercaptoetanol y 5 uL de inhibidor de RNAsa murino, dejar enfriar en hielo 2 minutos y agregar 400uL adicionales de RLT plus suplementado, agregar esta mezcla a cada tubo con pulmón pulverizado y resuspender cuidadosamente con la pipeta. Si quedan restos de tejido sin homogenizar, quitarlos con la pipeta antes de centrifugar (homogenizar de preferencia 6 veces y colocar en el hielo un momento antes de volver a homogenizar)
6. Centrifugar a **14 000 g/5min/ 4°C**
7. Separar con cuidado el pellet y almacenar el sobrenadante (que contiene el RNA del hospedero) a -80°C hasta su uso.
8. Agregar al pellet **600 μ L buffer de lisis y homogenizar, no colocar en el hielo.**
9. Inmediatamente pasar la mezcla a una columna **amarilla** de eliminación de DNA genómico y centrifugar a **10.000 g/1 minuto/4°C**
10. **Conservar el filtrado**
11. Agregar el filtrado a una columna de eliminación de DNA genómico de Quiagen (**Morada**) y centrifugar a **10.000 g/1 minuto/4°C**
12. Agregar al filtrado **600 μ L ETOH 100%**. Homogenizar.
13. Colocar la mezcla en la columna **verde** de purificación de RNA previamente tratada con DNasa.
14. Centrifugar a **10,000 g/1 minuto/4°C** Descartar filtrado
15. Agregar el contenido restante por la columna **verde** centrifugando a **10.000 g/1 minuto/4°C**
16. Agregar **400 μ L del prep- buffer.**
17. Centrifugar a **10,000 g/1 minuto/4°C. Descartar sobrenadante.**
18. Agregar **700 μ L de wash buffer.**
19. Centrifugar **10.000 g/1 minuto/4°C. Descartar el sobrenadante.**
20. Agregar **400 μ L de wash buffer.**
21. Centrifugar **10.000g /2 min/4°C. Descartar el sobrenadante**
22. Dejar secar la columna con la tapa abierta **2 minutos** a temperatura ambiente.
23. Agregar **35 μ L de agua libre de RNAsas** en el centro de la membrana.
24. Volver a centrifugar a **14.000g/2 min/4°C** en un tubo eppendorf 1.5 mL estéril
25. Repetir los pasos **19. y 20.** Para tener al final dos eluciones de RNA en aprox 35 μ L de agua cada una.

26. Si se va a correr el gel, de preferencia hacerlo el mismo día de la extracción, sino es posible, congelar a -70°C . Guardar dos alícuotas de $2\ \mu\text{l}$ de RNA para verificación de calidad y cantidad por espectrofotometría y Bioanalizador

ANEXO B-2. PROTOCOLO DE DEPLECIÓN O REMOCION DE RNA RIBOSOMAL DE MUESTRAS DE RNA PARA TRANSCRIPTOMA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*. Kit Illumina® Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit Cat. 20037135

DIAGRAMA DE FLUJO DE TRABAJO



1 LAVADO DE PERLAS MAGNETICAS (Este proceso se realiza para preparar las perlas magnéticas antes de ponerlas en contacto con las muestras)

Figura B-1. Esquema de trabajo para depleción de subunidades ribosomales de RNA

Material Necesario:

1. Tubos eppendorf de 1.5 ml para lavar hasta 1350 ul de perlas magnéticas (Hasta 6 muestras)
2. Tubos Falcon de 15 ml para lavar las de 1350 ul de perlas (Más de 7 muestras)
3. Perlas Magnéticas (225ul por muestra)
4. Agua Libre de RNAsas (225 ul por muestra)
5. Solución de Re suspensión de perlas magnéticas (60 ul por muestra)
6. [opcional] 1 ul de Inhibidor de RNAsa Riboguard

Indicaciones especiales para los reactivos:

1. 1350 ul de perlas magnéticas son suficientes para 6 muestras. Se pueden dividir las perlas magnéticas en diferentes tubos de 1.5 ml o lavarlas todas en un tubo de 15 ml.
2. Dispensar las perlas cuidadosamente y tratar de no formar burbujas.
3. Se recomienda el uso del inhibidor de RNAsa Riboguard para evitar la degradación de la muestra por RNAsas contaminantes.

Preparar:

Item	Almacenamiento	Instrucciones
Perlas Magnéticas	2°C a 8°C	Atemperar a °T ambiente y mezclar con Vórtex
Solución de resuspensión de perlas magnéticas	2°C a 8°C	Atemperar a °T ambiente
Agua Libre de RNAsas	2°C a 8°C	Descongelar en hielo, mezclar por inversión y hacer una centrifugación rápida.
[Opcional] Riboguard	-85°C a -65°C	Descongelar en hielo, mezclar por inversión y hacer una centrifugación rápida.

Tabla B-1. Condiciones de mantenimiento y almacenamiento de reactivos

- 4- Para cada muestra, adicionar 225 ul de perlas magnéticas a un tubo eppendorf de 1.5 ml o en tubo de 15 ml.
 - 5- Colocar los tubos en gradilla magnética con la tapa abierta hasta que el líquido se aclare por precipitación de las perlas (aprox. 1 minuto).
 - 6- Remover y descartar todo el sobrenadante sin tocar el botón de perlas
- Precaución:** Descartar sobrenadantes en tubos de desechos, contiene azida de sodio 0,1%
- 7- Remover los tubos de las gradillas magnéticas
 - 8- Lavar dos veces: Adicionando 225ul de agua libre de RNAsas y haciendo Vórtex para resuspender las perlas después de cada lavado
 - 9- Colocar los tubos en la gradilla magnética con la tapa abierta hasta que se aclare el líquido por precipitación de las perlas magnéticas (Aprox. 1 min).
 - 10- Remover y descartar sobrenadante
 - 11- Remover los tubos de la gradilla magnética
 - 12- Adicionar 60 ul de Solución de Resuspensión de Perlas Magnéticas (*Magnetic Bead Resuspension Solution*)
 - 13- Hacer Vórtex para resuspender.
 - 14- Adicionar 65ul de perlas magnéticas por muestra a un tubo eppendorf limpio.
 - 15- **[Opcional]** Adicionar 1ul de inhibidor de RNAsa, hacer Vórtex brevemente para mezclar.
 - 16- Dejar los tubos a °T ambiente.

2 **HIBRIDACIÓN DE SONDAS** (En este paso las sondas en la solución de remoción se hibrida con el rRNA presente en la muestra. Antes de la hibridación de las sondas, la muestra debe ser purificada y estar libre de contaminación con gDNA).

Material Necesario:

1. Tubos de 0.2 o 0.5 ml libres de RNAsas con tapa
2. Agua libre de RNAsa
3. Buffer de reacción de RiboZero (4ul por muestra).

Indicaciones especiales para los reactivos:

- Mezclar constantemente los reactivos a lo largo del procedimiento

Nota: Precalear un termociclador a 68°C

2.1. De acuerdo con la siguiente tabla determinar el volumen apropiado de RNA y Solución de remoción de RiboZero:

Cantidad inicial total de RNA para el epidemiology Kit	RNA total máximo por muestra	Removal solution por muestra
500 ng to 1.25 µg	28 µl	8 µl
> 1.25–2.5 µg	26 µl	10 µl

Tabla B-2. Proporciones de reactivo RiboZero de acuerdo a concentración de la muestra

1. Para cada muestra agregar en un tubo de 0,2ml o 0,5 ml:
2. Agua libre de Rnasa (De acuerdo al volumen y concentración de la muestra)
3. Buffer de reacción de RiboZero 8 ul a 10 ul
4. Muestra de RNA (De acuerdo a concentración)
- 5- El volumen total de reacción será de 40 ul.
- 6- Colocar los tubos en el termociclador precalentado a 68°C e incubar por 10 minutos.
- 7- Remover del calor y después centrifugar brevemente.
- 8- Incubar a °T por 5 minutos.

3 REMOCIÓN DE rRNA (En este paso se combinan las muestras pre hibridadas con las perlas magnéticas, las cuales se unen a las sondas. El RNA recuperado esta depletado para RNA ribosomal)

Material Necesario:

- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Precalear termociclador a 50°C

Procedimiento: Para cada muestra hacer lo siguiente

1. Adicionar 40 ul de muestra de RNA en un tubo de 1.5 ml que contenga 65 ul de perlas magnéticas y **mezclar de inmediato** con pipeta varias veces.
2. Hacer Vórtex por 10 segundos y dejar a °T ambiente.
3. Incubar a °T ambiente por 5 minutos
4. Colocar en termociclador precalentado a 50°C por 5 minutos.
5. Colocar inmediatamente en una gradilla magnética con la tapa abierta y esperar hasta que el líquido se aclare (Aprox. 1 minuto).

- Transferir de 85ul a 90 ul de sobrenadante que contiene RNA depletado para RNA Ribosomal en un tubo eppendorf limpio de 1,5 ml



Aquí se puede detener el proceso de forma segura. Almacenar las muestras de -25°C a -15°C por 24 horas o de -85°C a -65°C por hasta 30 días

4

LIMPIEZA DE RNA DEPLETADO (Las muestras de RNA depletadas para RNA Ribosomal, deben ser purificadas antes de la preparación de librerías. El paso de limpieza remueve cualquier remanente de sales y buffers y concentra las muestras depletadas).

Nota: Una alta proporción de pequeños RNA en las muestras tratadas con RiboZero es normal y no indica que la muestra está degradada

Método de limpieza a utilizar: AgentCourt RNA clean XP Beckam Coulter (Cat: A63987): Este método no recupera RNAs pequeños cuantificables

Material Necesario:

- Tubos de 0.2 ml o 1.5 ml libres de RNAsas con tapas
- Kit AgentCourt RNA clean XP Beckam Coulter
- Etanol al 80% preparado antes de iniciar el proceso
- Agua libre de RNAsas (9.5 a 11 ul por reacción)

Indicaciones especiales para los reactivos:

- Hacer Vórtex a las perlas RNAClean XP antes de cada uso
- Hacer Vórtex frecuentemente a las perlas para asegurar que estas se distribuyan de forma uniforme a lo largo del proceso.
- Siempre preparar etanol fresco al 80%. El etanol puede absorber agua del aire impactando negativamente la muestra.
- Descongelar el agua libre de RNAsa sobre hielo mezclado por inversión y haciendo una centrifugación rápida.
- Mantener el etanol en hielo
- Seguir indicaciones del kit.

Esquema:

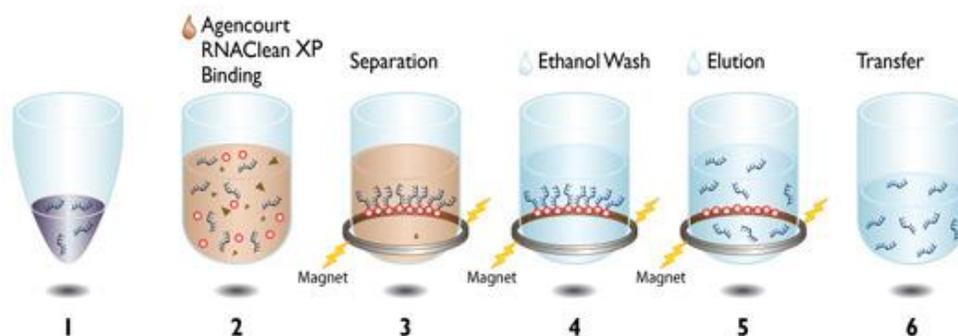


Figura B-2. Fundamento de proceso de purificación de ácidos nucleicos con perlas magnéticas.

- Reacción enzimática
- Unión del RNA total a las perlas magnéticas

3. Separación del RNA total del RNA unido a las perlas de contaminantes
4. Lavado del RNA con etanol
5. Elución del RNA de las partículas magnéticas
6. Transferencia de las perlas a un Nuevo tubo.

PROCEDIMIENTO:

1. Transferir la muestra a tubos de 1.7 ml libres de RNAsas.
2. Mezclar cuidadosamente la botella que contiene el **Agencourt RNAClean XP** para resuspender las partículas magnéticas asentadas. De acuerdo con la siguiente tabla adicionar el volumen deseado de reactivo:

Volumen de reacción (ul)	Volumen de Agencourt RNAClean XP (ul)
50	90
100	180
150	270
200	360

Tabla B-3. Proporción de perlas de limpieza de acuerdo a volumen de reacción

3. Mezclar el **Agencourt RNAClean XP** y la muestra con pipeta subiendo y bajando **15 veces**, dejar incubar a °T ambiente por **5 minutos**.
4. Colocar el tubo en gradilla magnética por 5 minutos para separar las perlas de la solución.
5. Aspirar lentamente la solución aclarada del tubo y **descartar** (No tocar las perlas magnéticas y no retirar el tubo de la gradilla durante este paso).
6. Dispensar de 500 ml a 1000 ml de etanol al 70% en el tubo e incubar por 30 segundos a °T ambiente. Aspirar el etanol y descartar, Hacer en total tres lavados. (Realizar los lavados con el tubo puesto en la gradilla magnética, tener precaución de no mover las perlas y retirar todo el etanol residual).
7. Dejar secar los tubos con tapa abierta sobre la gradilla magnética por 10 minutos (No dejar secar demasiado lo tubos para que no se disminuya la cantidad de muestra a recuperar).



Punto seguro de parada, almacenar las muestras a 4°C o a -20°C de acuerdo con el tiempo que se vayan a guardar. Si no va a parar el proceso continuar con el siguiente paso.

8. Eluir el producto purificado de las perlas con agua libre de RNAsas.

Adicionar un volumen de elución de al menos 30 ul de agua libe de RNAsas al tubo y resuspender las perlas manualmente por pipeteo varias veces. Dispensar el agua por las paredes del tubo para asegurar que se resuspendan todas las perlas.

5

VERIFICACIÓN DE CALIDAD DE MUESTRAS DEPLETADAS

Correr 1 ul de RNA tratado con RiboZero en un microchip Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 pico chip ya que el Nano chip no provee suficiente sensibilidad para la detección de muestras depletadas, las gráficas para muestras depletadas se deben ver de la siguiente forma:

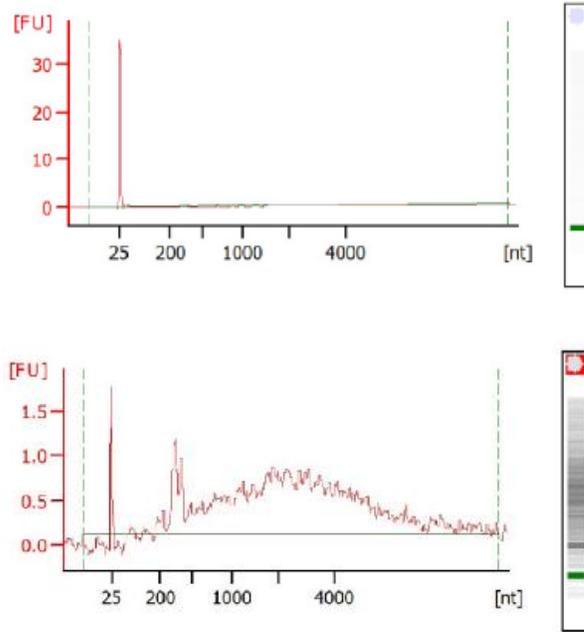


Figura B-3. Imagen de electroforesis capilar de muestras depletadas para subunidades ribosomales.

ANEXO B-3. PROTOCOLO DE ELABORACIÓN DE LIBRERÍAS GENÓMICAS PARA RNA-seq DE *M. tuberculosis* A PARTIR DE RNA OBTENIDO DE PULMONES DE RATÓN Balb/c INFECTADOS USANDO TruSeq® Stranded mRNA Illumina®

MATERIAL DE INICIO:

RNA Total (10 ng–1 µg), mRNA PURIFICADO (10–100 ng), o RNA total depletado para RNA ribosomal (10–100 ng) cuantificados por bioanalizador.

El siguiente protocolo está optimizado para insertos de aproximadamente 200 pb de RNA. Para generar librerías de insertos más largos, tener en cuenta los diferentes tiempos de fragmentación.

LIBRARY PARAMETER	APPROXIMATE INSERT SIZE	250-400 bp	300-450 bp	400-600 bp	500-700 bp
	Approx. Final Library Size	350-500 bp	400-550 bp	500-700 bp	600-800 bp
BEAD VOLUME TO BE ADDED (µl)	1st Bead Selection	45	40	35	30
	2nd Bead Selection	20	20	15	15

Tabla B-4. Condiciones para selección del tamaño recomendado para librerías con insertos mayores a 300 pb

(B) PROTOCOLO PARA mRNA depletado para las subunidades de RNA Ribosomal

1. Fragmentación y cebado de mRNA (Volúmenes por librería)

Reactivo	Volúmen
RNA depletado (10ng-100 ng totales)	8.5uL
Elute, Prime Fragment High Mix	8.5 uL
Volumen final	17 ul

Tabla B-5. Condiciones de reacción para fragmentación

1. Incubar las muestras a **94°C por 8 minutos**
2. Transferir los tubos al hielo
3. Proceder inmediatamente a la síntesis de primera cadena de cDNA

2. SÍNTESIS DE PRIMERA CADENA DE cDNA

1. 2.1. Al RNA fragmentado y cebado del paso anterior (10uL) agregar:

Reactivo	Volúmen
Muestra Fragmentada	17 uL
Transcriptasa Reversa SuperScript II	50 uL
ActD mix	8 uL

Tabla B-6. Condiciones para síntesis de primera hebra

1. Incubar la muestra en un termociclador precalentado con el siguiente protocolo
10 minutos a **25°C**
15 minutos a **42°C**
15 minutos a **70°C**

Hold 4°C

2. Pasar inmediatamente a la síntesis de segunda cadena de cDNA

3. SINTESIS DE SEGUNDA CADENA DE cDNA

3.1. Adicionar los siguientes reactivos a la reacción de síntesis de primera cadena de cDNA (20uL)

Reactivo	Volúmen
Agua libre de Nucleasas	48 uL
Buffer de reacción de síntesis de segunda cadena	8 uL

Tabla B-7. Condiciones para síntesis de segunda hebra

3.2. Mezclar muy bien la mezcla por pipeteo varias veces

3.3. Incubar en un termociclador precalentado **1 hora a 16°C con la tapa a 40°C o menos.**

4. PURIFICACION DEL cDNA DE DOBLE CADENA USANDO LAS PERLAS AgentCourt AMPure XP 1.8X

4.1. Hacer Vórtex a las perlas para resuspender

4.2. Adicionar 144 uL de perlas a la reacción de síntesis de segunda cadena del paso anterior (80 uL aprox.) Mezclar muy bien con Vórtex o pipeta varias veces

4.3. Incubar 5 minutos a °T ambiente

4.4. Hacer un spin y colocar en gradilla magnética dejar 5 minutos

4.5. Adicionar 200 uL de etanol al 80% fresco, esperar 30 segundos, retirar y descartar sobrenadante (Hacer en total dos lavados de la misma forma).

4.6. Dejar secar 10 minutos con tapas abiertas para que se evapore el etanol, no dejar secar demasiado.

4.7. Eluir el DNA de las perlas con 60 uL de agua libre de nucleasas, mezclar con Vórtex o pipeta, hacer un spin y colocar en gradilla magnética hasta que la solución se aclare.

4.8. Remover 55,5 uL del sobrenadante y colocar en un tubo limpio.



Aquí se puede detener el proceso de forma segura. Almacenar las muestras de -25°C a -15°C por 24 horas o de -85°C a -65°C por hasta 30 días

5. Reparación final / dA-tail de la biblioteca de cDNA

5.1. A los 55.5 µl de cDNA de doble cadena purificados adicionar los siguientes componentes:

Reactivo	Volúmen
Buffer de reacción de reparación de extremos	6.5 uL
Mix de enzima End prep	3 uL
Volumen final	65 uL

Tabla B-8. Condiciones de montaje para reacción de reparación final dA-tail

5.2. Incubar

30 minutos a **20°C**

30 minutos a **65°C**

Hold a **4°C**

5.3. Proceder inmediatamente a la ligación de adaptadores.

6. LIGACIÓN DE ADAPTADORES

Nota: Diluir los adaptadores para Illumina (15uM) a 1,5 uM diluyendo 10 veces (1:9) con agua estéril para uso inmediato.

6.1. Al cDNA dA-Tailed adicionar los siguientes componentes por librería:

Reactivo	Volúmen
Master Mix ligasa Blunt/TA	15 uL
Adaptador NEBNext diluido	1 uL
Agua libre de nucleasas	2.5 uL
Volumen final 83,5 uL	83.5 uL

Tabla B-8. Condiciones de reacción para ligación de adaptadores

6.2. Mezclar muy bien por pipeteo y hacer un spin

6.3. Incubar **15 minutos a 20°C** en termociclador

6.4. Adicionar 3 uL de enzima USER (Rojo) a la mezcla de ligación

6.5. Mezclar bien e incubar a 37°C por 15 minutos

7. Purificación de la Reacción de ligación usando AMPure XP Beads

7.1. A la reacción de ligación (86.5 µl), agregar 13.5 µl de agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen de 100 µl.

7.2. Agregar 100 µl de las perlas AMPure XP y mezclar bien con Vórtex o pipeta e incubar 5 minutos a °T ambiente en gradilla magnética con las tapas abiertas

7.3. Hacer un spin y colocar en gradilla magnética dejar 5 minutos

7.4. Adicionar 200 uL de etanol al 80% fresco, esperar 30 segundos, retirar y descartar sobrenadante (Hacer en total dos lavados de la misma forma).

7.5. Dejar secar 10 minutos con tapas abiertas para que se evapore el etanol, no dejar secar demasiado.

7.6. Eluir el DNA de las perlas con 50 uL de agua libre de nucleasas, mezclar con Vórtex o pipeta, hacer un spin y colocar en gradilla magnética hasta que la solución se aclare.

7.7. Remover 50 uL del sobrenadante y colocar en un tubo limpio.

7.8. A los 50 uL eluidos anteriormente, adicionar 50uL de perlas AMPure XP y mezclar bien con Vórtex o pipeta e incubar 5 minutos a temperatura ambiente en gradilla magnética con las tapas abiertas

7.9. Hacer un spin y colocar en gradilla magnética dejar 5 minutos

7.10. Adicionar 200 uL de etanol al 80% fresco, esperar 30 segundos, retirar y descartar sobrenadante (Hacer en total dos lavados de la misma forma).

7.11. Dejar secar 10 minutos con tapas abiertas para que se evapore el etanol, no dejar secar demasiado.

7.12. Eluir el DNA de las perlas con 25 uL de agua libre de nucleasas, mezclar con Vórtex o pipeta, hacer un spin y colocar en gradilla magnética hasta que la solución se aclare.

7.13. Transferir 23 uL del sobrenadante y colocar en un tubo limpio y proceder al paso de enriquecimiento por PCR.

8. Enriquecimiento de la librería por PCR

1. A los 23 uL eluidos en el numeral anterior, adicionar:

Reactivo	Volúmen
NEBNext High-Fidelity PCR Master Mix, 2X	25 uL
Universal PCR Primer (25 µM)	1 uL
Index (X) (NEB #E7335) Primer (25 µM)*	1 uL
Volumen final	50 uL

Tabla B-9. Condiciones de reacción para enriquecimiento de librerías

Ciclar con el siguiente protocolo (15X):

CYCLE STEP	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
Initial Denaturation	98°C	30 seconds	1
Denaturation	98°C	10 seconds	12–15*, **
Annealing	65°C	30 seconds	
Extension	72°C	30 seconds	
Final Extension	72°C	5 minutes	1
Hold	4°C	∞	

Tabla B-10. Protocolo térmico para enriquecimiento de librerías

PURIFICACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR USANDO AgentCourt AMPure XP

9.1. Hacer Vórtex a las perlas para resuspender

9.2. Adicionar 50uL de las perlas Agencourt AMPure XP (1.0X) a la reacción de PCR (Aprox. 50uL), Mezclar muy bien con Vórtex o pipeta.

9.3. Incubar a °T ambiente por 5 minutos en gradilla magnética con las tapas abiertas

Hacer un spin y colocar en gradilla magnética dejar 5 minutos

9.4. Adicionar 200 uL de etanol al 80% fresco, esperar 30 segundos, retirar y descartar sobrenadante (Hacer en total dos lavados de la misma forma).

9.5. Dejar secar 10 minutos con tapas abiertas para que se evapore el etanol, no dejar secar demasiado.

9.6. Eluir el DNA de las perlas con 23 uL de agua libre de nucleasas, mezclar con Vórtex o pipeta, hacer un spin y colocar en gradilla magnética hasta que la solución se aclare.

7.7. Remover 20 uL del sobrenadante y colocar en un tubo limpio, almacenar a -20°C.

10. Control de calidad de la librería en bioanalyzer con chips de alta sensibilidad

Figure 1: Example of RNA library size distribution on a Bioanalyzer.

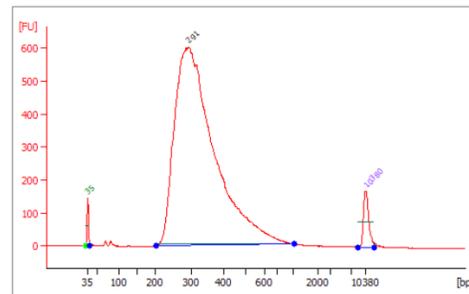


Figura B-4. Electroforesis capilar para verificación de tamaño de insertos de librerías

ANEXO B-4. PROTOCOLO DE HIBRIDACIÓN IN-HOUSE CON SONDAS PARA DEPLECIÓN DE SUBUNIDADES RIBOSOMALES DE *M. tuberculosis*

Estandarizado por: Dr. Adrián Ochoa Leyva Instituto de Biotecnología UNAM

I. REACCIÓN DE HIBRIDACIÓN

1. Se prepara una reacción por librería

Para cada reacción, colocar en un tubo para PCR:

12.8 μ L de Buffer A

1.6 μ L de Buffer B

X μ L de Sondas (equivalente a 500ng)

Y μ L de librería (equivalente a 100ng)

Agregar H₂O suficiente para que el volumen de todas las reacciones sea el mismo.

Se recomienda que el volumen no pase de 60 μ L.

2. Preparar un Control de Hibridación por cada conjunto de librerías que se pongan a hibridar al mismo tiempo.

Para un Control de Hibridación, colocar en un tubo para PCR:

12.8 μ L de Buffer A

1.6 μ L de Buffer B

X μ L de Sondas Ctrl (equivalente a 500ng)

Y μ L de Ctrl 1 (equivalente a 100ng)

Z μ L de Ctrl 2 (equivalente a 100ng)

Agregar H₂O suficiente para que el volumen del control sea el mismo que el de las reacciones de las librerías.

3. Colocar todas las reacciones en un termociclador con el siguiente programa:

95°C/5min

92°C/1min

89°C/1min

86°C/1min

83°C/1min

80°C/1min

77°C/1min

74°C/1min

71°C/1min

68°C/1min

65°C/72 hrs

4. Una vez completadas las 72 hrs de hibridación, continuar con el lavado de las reacciones.

II. LAVADO DE LAS REACCIONES DE HIBRIDACIÓN

A. Lavado de perlas.

1. Tomar 20µl de perlas MyOne por librería
2. Lavar los 20µl y con 80µl de **Buffer de lavado I**
3. Homogenizar y colocar en el rack magnético
4. Quitar sobrenadante
5. Repetir el lavado **2 veces más** (3 lavados totales)
6. Resuspender en 20 µL de **Buffer de lavado I**

B. Lavado de DNA no capturado

7. Agregar **la reacción de hibridación a las perlas lavadas.**
8. Incubar a temp. ambiente 30 min
9. Colocar en el rack magnético y **guardar el sobrenadante (H1)**
10. Agregar a las perlas 50 µL de **Buffer de lavado II.** Homogenizar.
11. Incubar a temp. ambiente 15 min
12. Colocar en el rack magnético y **guardar el sobrenadante (H2)**
13. Agregar 50 µL de **Buffer de lavado III pre-calentado a 65°C.** Homogenizar.
14. Incubar a temp ambiente 15 min.
15. Colocar en el rack magnético y **guardar el sobrenadante (H3)**
16. Agregar 50 µL de **Buffer de lavado III pre-calentado a 65°C.** Homogenizar.
17. Incubar a temp ambiente 15 min.
18. Colocar en el rack magnético y **guardar el sobrenadante (H4)**

C. Lavado del DNA capturado

1. Agregar 50 µL de **Buffer de lavado IV pre-calentado a 99°C.** Homogenizar.
2. Incubar a 99°C 5 min
3. Colocar en el rack magnético y **guardar el sobrenadante (H5)**
4. Agregar 50 µL de **Buffer de lavado IV pre-calentado a 99°C.** Homogenizar.
5. Incubar a 99°C 5 min
6. Colocar en el rack magnético y **guardar el sobrenadante (H6)**
7. Juntar **H1+H2+H3+H4 en un solo tubo (I)** Aquí se obtienen librerías con mRNA
8. Juntar **H5+H6 en otro tubo (II)** Aquí se obtienen los rRNA liberados de las perlas con estreptavidina
9. Purificar ambos sobrenadantes por separado con perlas Ampure.

D. Lavado con perlas Ampure

1. Agregar a cada sobrenadante 1.8x de perlas Ampure. Ej. si el sobrenadante es de 100 µL, agregar 180µL de perlas (1.8 x 100 = 180). Homogenizar.
2. Incubar a temp. ambiente por 5 min
3. Colocar en el rack magnético durante 3 min

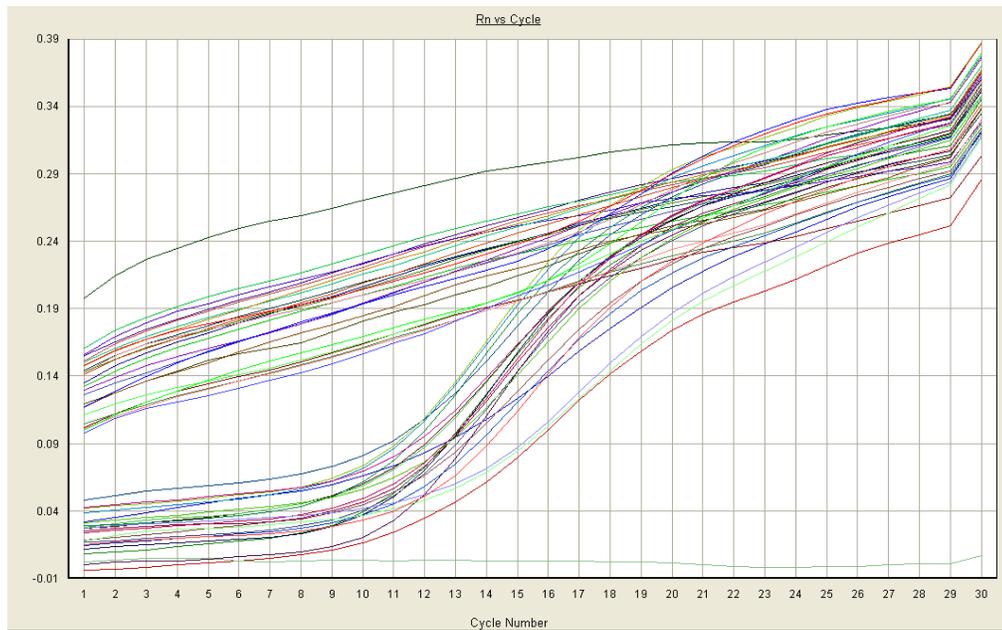
4. Desechar el sobrenadante.
5. Agregar 200µL de etanol al 80%, esperar 30 seg y retirar el etanol. Repetir este paso una vez más para un total de dos lavados.
6. Dejar secar el tubo a temperatura ambiente durante 10 min.
7. Agregar 20 µL de H₂O. Homogenizar.
8. Incubar a temp. ambiente por 5 min
9. Colocar en el rack magnético durante 3 min
10. Retirar y almacenar el DNA eluido en el agua.
11. Cuantificar y diagnosticar de forma cualitativa por qPCR.

A continuación, se muestrasn las condiciones de montaje para la validación por qPCR de las librerías.

CONDICIONES:

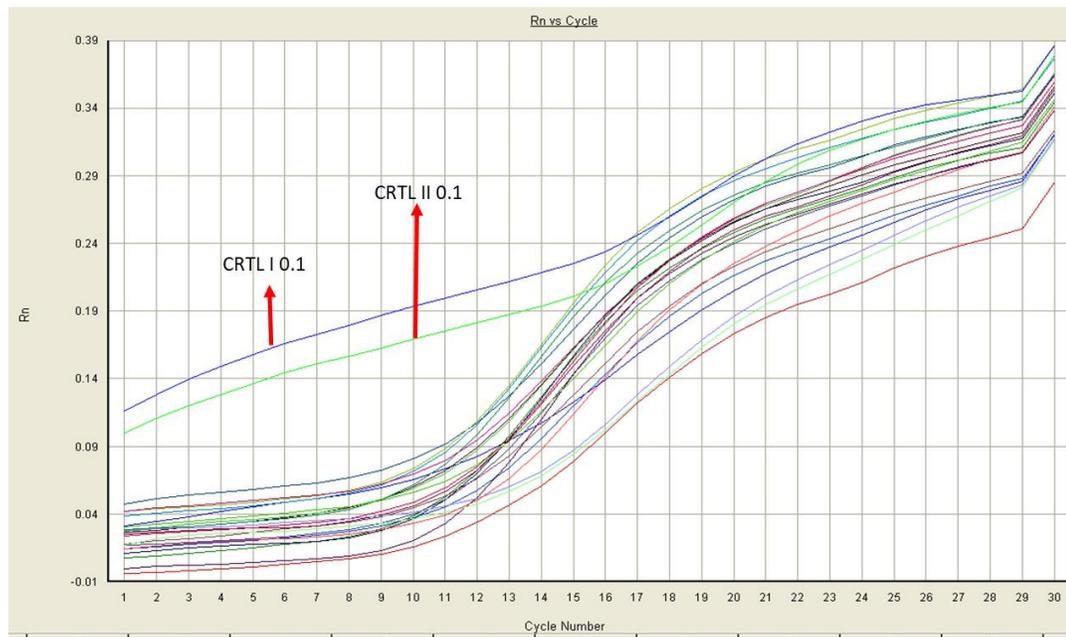
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	323D3R1 0.1 (11)	323D3R1 0.2 (11)	323D3R2 0.1 (1)	323D3R2 0.2(1)	323D3R3 0.1 (12)	323D3R3 0.1(12)	323D14R6 0.1 (2)	323D14R6 0.2 (2)	323D14R7 0.1 (3)	323D3R7 0.2 (3)	323D14R8 0.1 (4)	323D3R8 0.2 (4)	OLIGO A
B	323D28R6 0.1 (5)	323D28R6 0.2 (5)	323D28R7 0.1 (6)	323D28R7 0.2 (6)	323D28R8 0.1 (7)	323D28R8 0.2 (7)	391D3R6 0.1 (8)	391D3R6 0.2 (8)	391D3R7 0.1 (13)	391D3R7 0.2(13)	391D3R8 0.1 (16)	391D3R8 0.2(16)	
C	391D14R5 0.1 (17)	391D14R5 0.2 (17)	391D14R7 0.1 (9)	391D14R7 0.2(9)	391D14R8 0.1 (10)	391D14R8 0.2(10)	391D28R1 0.1 (18)	391D28R1 0.2 (18)	391D28R2 0.1 (19)	391D28R2 0.2(19)	391D28R3 0.1 (20)	391D28R3 0.2(20)	
D	391D60R1 0.1 (21)	391D60R1 0.2 (21)	391D60R2 0.1 (22)	391D60R2 0.2(22)	391D60R3 0.1 (23)	391D60R3 0.2(23)	CTRL I 0.1	CTRL I 0.2	CTRL II 0.1	CTRL II 0.2	C Neg		
E	323D3R1 0.1 (11)	323D3R1 0.2 (11)	323D3R2 0.1 (1)	323D3R2 0.2(1)	323D3R3 0.1 (12)	323D3R3 0.1(12)	323D14R6 0.1 (2)	323D14R6 0.2 (2)	323D14R7 0.1 (3)	323D3R7 0.2 (3)	323D14R8 0.1 (4)	323D3R8 0.2 (4)	OLIGO B
F	323D28R6 0.1 (5)	323D28R6 0.2 (5)	323D28R7 0.1 (6)	323D28R7 0.2 (6)	323D28R8 0.1 (7)	323D28R8 0.2 (7)	391D3R6 0.1 (8)	391D3R6 0.2 (8)	391D3R7 0.1 (13)	391D3R7 0.2(13)	391D3R8 0.1 (16)	391D3R8 0.2(16)	
G	391D14R5 0.1 (17)	391D14R5 0.2 (17)	391D14R7 0.1 (9)	391D14R7 0.2(9)	391D14R8 0.1 (10)	391D14R8 0.2(10)	391D28R1 0.1 (18)	391D28R1 0.2 (18)	391D28R2 0.1 (19)	391D28R2 0.2(19)	391D28R3 0.1 (20)	391D28R3 0.2(20)	
H	391D60R1 0.1 (21)	391D60R1 0.2 (21)	391D60R2 0.1 (22)	391D60R2 0.2(22)	391D60R3 0.1 (23)	391D60R3 0.2(23)	CTRL I 0.1	CTRL I 0.2	CTRL II 0.1	CTRL II 0.2	C Neg		
			RX	1X	48X		RX	1X	48X				
			Master Mix	7,5 ul	360 ul		Master Mix	7,5 ul	360 ul				
			Oligo A 1	0,8 ul	38,4 ul		Oligo A 1	0,8 ul	38,4 ul				
			Oligo A 2	0,8 ul	38,4 ul		Oligo A 2	0,8 ul	38,4 ul				
			Agua	4 ul	192 ul		Agua	4 ul	192 ul				
			DNA	2 ul			DNA	2 ul					

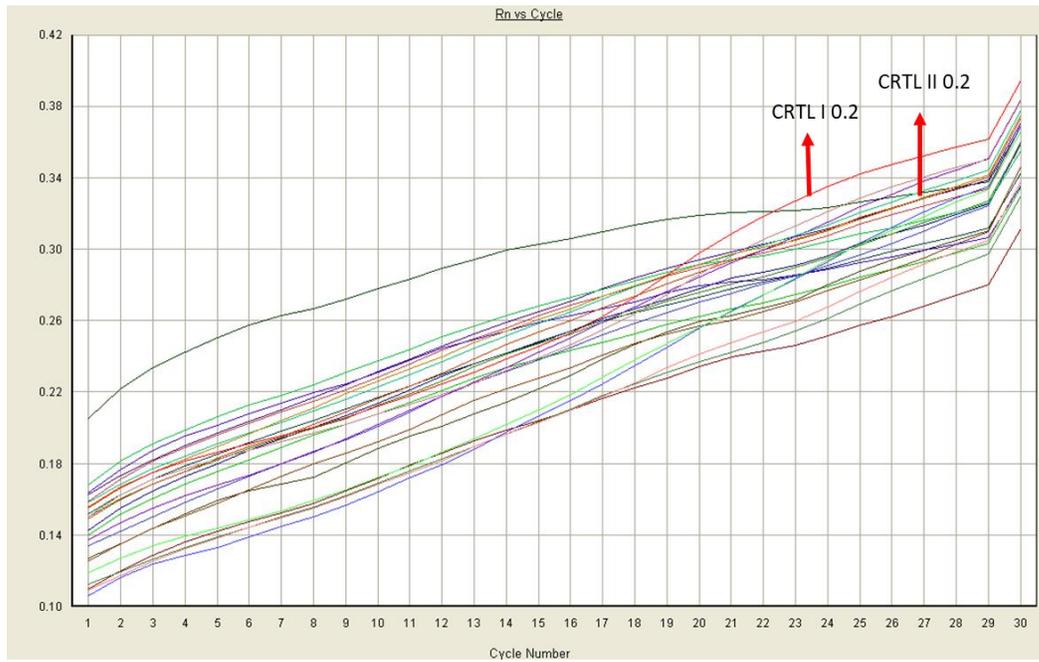
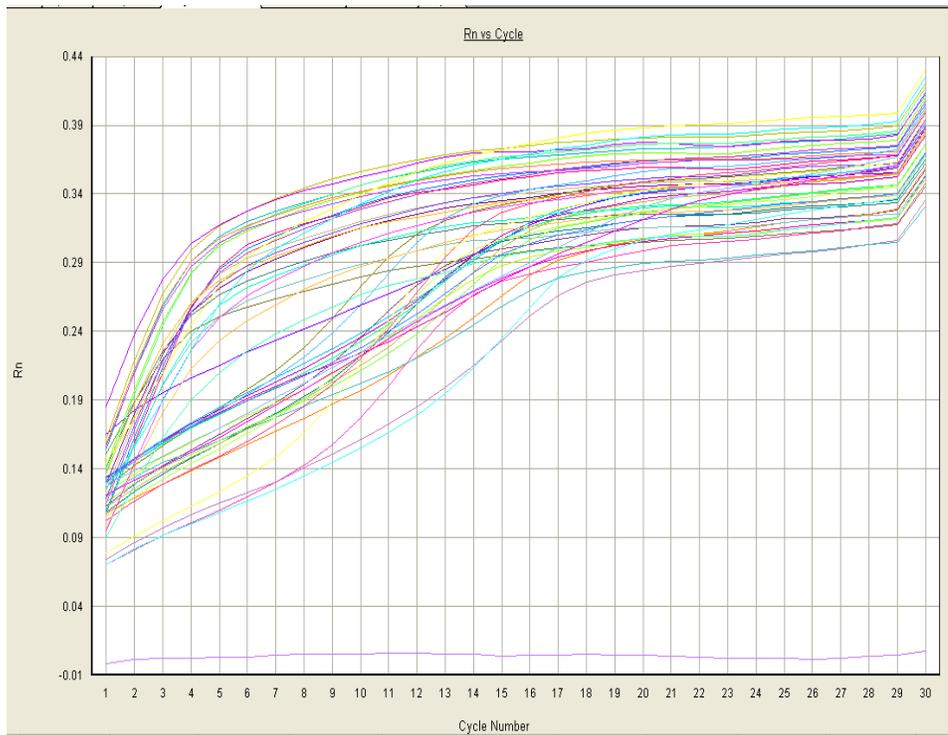
1. PLOT DE AMPLIFICACIÓN DE TODAS LAS MUESTRAS OLIGOS A

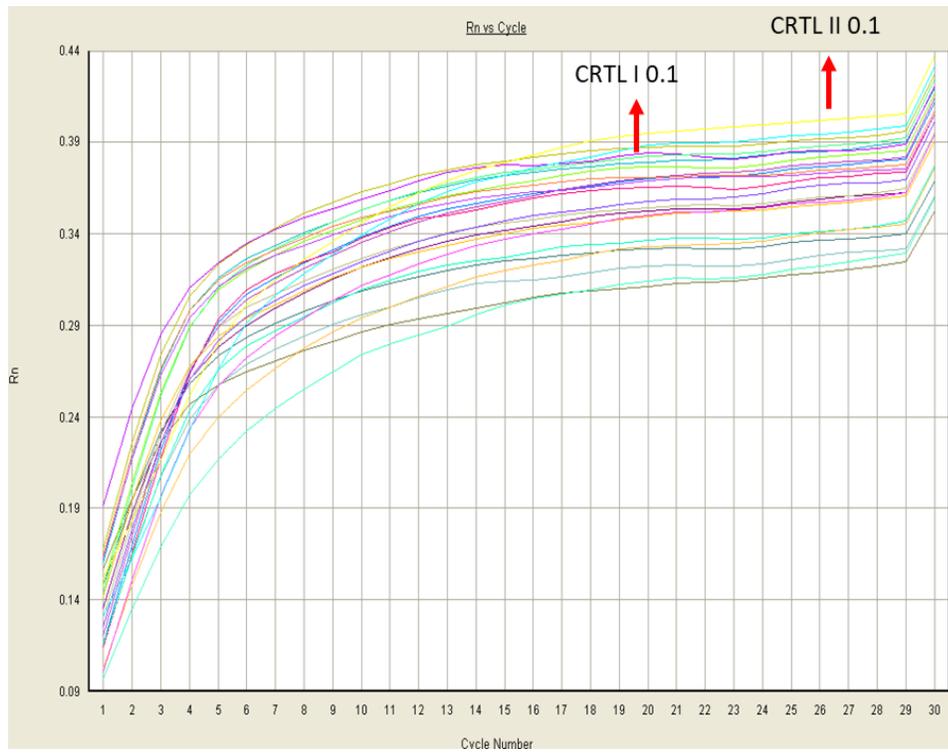
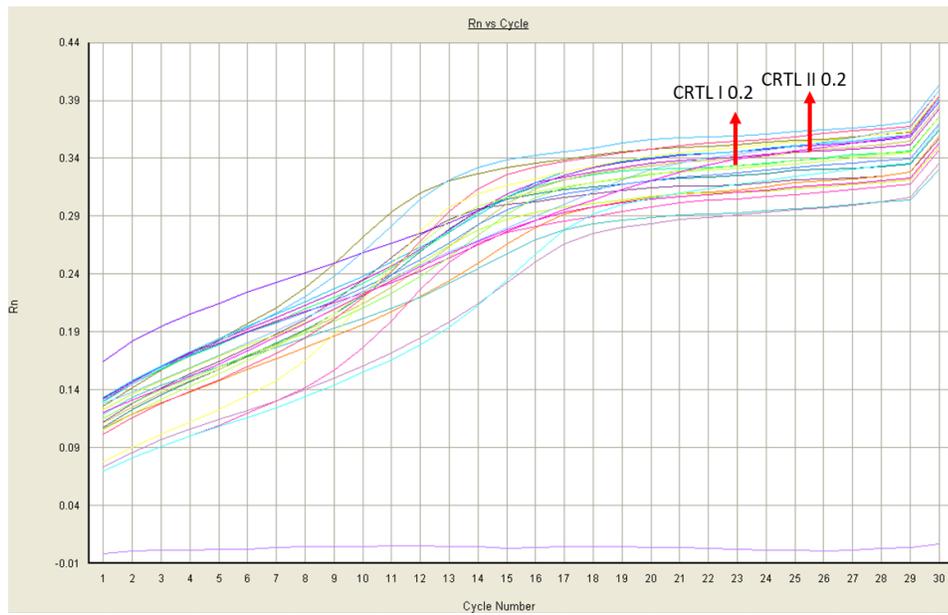


1.1. OLIGOS A TUBOS 0.1

1.2.



OLIGO A TUBOS 0.2**OLIGOS B**

OLIGO B TUBOS 0.1**OLIGOS TUBOS B 0.2**

5. Bibliografía

1. Tiruvilumala P, Reichman LB. Tuberculosis. *Annu Rev Public Health*. 2002;23: 403–426. doi:10.1146/annurev.publhealth.23.100901.140519
2. Lalkhen H, Mash R. Multimorbidity in non-communicable diseases in South African primary healthcare. *South African Medical Journal*. 2015;105: 134-138–138. doi:10.7196/SAMJ.8696
3. Bates M, Marais BJ, Zumla A. Tuberculosis Comorbidity with Communicable and Noncommunicable Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5. doi:10.1101/cshperspect.a017889
4. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis.
5. Thomas TY, Rajagopalan S. Tuberculosis and Aging: A Global Health Problem. *Clin Infect Dis*. 2001;33: 1034–1039. doi:10.1086/322671
6. Zaman K. Tuberculosis: A Global Health Problem. *J Health Popul Nutr*. 2010;28: 111–113.
7. Ospina S. La tuberculosis, una perspectiva histórico-epidemiológica. *Infectio*. 2011;5. doi:10.22354/in.v5i4.371
8. Fenner L, Egger M, Gagneux S. Annie Darwin's death, the evolution of tuberculosis and the need for systems epidemiology. *Int J Epidemiol*. 2009;38: 1425–1428. doi:10.1093/ije/dyp367
9. Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, et al. Molecular identification and characterization of Mycobacterium tuberculosis complex in ancient Egyptian mummies. *International Journal of Osteoarchaeology*. 2004;14: 404–413. doi:10.1002/oa.724
10. Sotomayor H, Burgos J, Arango M. Demostración de tuberculosis en una momia prehispánica colombiana por la ribotipificación del ADN de Mycobacterium tuberculosis. *Biomédica*. 24: 18.
11. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, et al. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLOS Pathogens*. 2005;1: e5. doi:10.1371/journal.ppat.0010005

12. Bates JH, Stead WW. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin North Am.* 1993;77: 1205–1217. doi:10.1016/s0025-7125(16)30188-2
13. Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91: 2091–2094. doi:10.1073/pnas.91.6.2091
14. Bos KI, Harkins KM, Herbig A, Coscolla M, Weber N, Comas I, et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature.* 2014;514: 494–497. doi:10.1038/nature13591
15. Herzog H. History of tuberculosis. *Respiration*:1998;65: 5–15. doi:10.1159/000029220
16. Palomino JC, Leao SC, Ritacco V. *Tuberculosis 2007; from basic science to patient care.* 2007. <http://www.tuberculosistextbook.com>
17. LeMO Bestand - Objekt - Robert Koch, *Die Aetiologie der Tuberculose*, 1882.
18. Pospisil R. [150 years since the birth of R. Koch--his life and work]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 1994;43: 188–191.
19. Kaufmann SHE, Schaible UE. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiol.* 2005;13: 469–475. doi:10.1016/j.tim.2005.08.003
20. Small PM. Tuberculosis in the 21st century: DOTS and SPOTS. Plenary lecture given at the 29th World Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Bangkok, Thailand, 23-26 November 1998. *Directly observed therapy. Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3: 949–955.
21. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017;58: E9–E12.
22. World Health Organization, Falzon D. *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis.* 2011. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK148644/>
23. WHO | Global tuberculosis report 2020. In: WHO [Internet]. World Health Organization; [cited 19 Oct 2020]. Available: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
24. Pérez SF, Pinzon LAB, Polo CL. Informe de evento TUBERCULOSIS, Colombia 2019. 2020; 31.

25. Inicia monitoreo a tuberculosis en Colombia. [cited 19 Oct 2020]. Available: <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Inicia-monitoreo-a-tuberculosis-en-Colombia.aspx>
26. Boletín Epidemiológico. [cited 19 Oct 2020]. Available: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Vista-Boletin-Epidemiologico.aspx>
27. Control de la tuberculosis multirresistente a fármacos: un objetivo posible | Biomédica. *Biomedica*. 2019 Sep; 39(3): 431–433.
28. Pérez MPL. INFORME DE EVENTO TUBERCULOSIS, COLOMBIA, 2018. 2019; 29.
29. Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol*. 2018;9: 67. doi:10.3389/fmicb.2018.00067
30. Tsukamura M. Identification of mycobacteria. *Tubercle*. 1967;48: 311–338. doi:10.1016/s0041-3879(67)80040-0
31. Stahl DA, Urbance JW. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol*. 1990;172: 116–124. doi:10.1128/jb.172.1.116-124.1990
32. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. [cited 19 Oct 2020]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC153139/>
33. Rogall T, Wolters J, Flohr T, Böttger EC. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol*. 1990;40: 323–330. doi:10.1099/00207713-40-4-323
34. Tortoli E, Fedrizzi T, Meehan CJ, Trovato A, Grottola A, Giacobazzi E, et al. The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: The old and the news. *Infect Genet Evol*. 2017;56: 19–25. doi:10.1016/j.meegid.2017.10.013
35. Tortoli E. Chapter 1 - The Taxonomy of the Genus *Mycobacterium*. In: Velayati AA, Farnia P, editors. *Nontuberculous Mycobacteria (NTM)*. Academic Press; 2019. pp. 1–10. doi:10.1016/B978-0-12-814692-7.00001-2
36. gli_mycobacteriology_lab_manual_quadri.indd. : 154.
37. Heifets L. MYCOBACTERIOLOGY LABORATORY. *Clinics in Chest Medicine*. 1997;18: 35–53. doi:10.1016/S0272-5231(05)70354-3
38. Woods GL. The mycobacteriology laboratory and new diagnostic techniques. *Infect Dis Clin North Am*. 2002;16: 127–144. doi:10.1016/s0891-5520(03)00049-7

39. Vincent AT, Nyongesa S, Morneau I, Reed MB, Tocheva EI, Veyrier FJ. The Mycobacterial Cell Envelope: A Relict From the Past or the Result of Recent Evolution? *Front Microbiol.* 2018;9. doi:10.3389/fmicb.2018.02341
40. Maitra A, Munshi T, Healy J, Martin LT, Vollmer W, Keep NH, Bhakta S. Cell wall peptidoglycan in Mycobacterium tuberculosis: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiol Rev.* 2019 Sep 1;43(5):548-575. doi: 10.1093/femsre/fuz016. PMID: 31183501; PMCID: PMC6736417.
41. Jackson M. The Mycobacterial Cell Envelope—Lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4. doi:10.1101/cshperspect.a021105
42. Brites D, Gagneux S. Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. *Immunol Rev.* 2015;264: 6–24. doi:10.1111/imr.12264
43. Koeck J-L, Fabre M, Simon F, Daffé M, Garnotel E, Matan AB, et al. Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli “Mycobacterium canettii” infection suggest the existence of an environmental reservoir. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17: 1013–1019. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03347.x
44. Castets MN, Rist HB. La variété africaine du bacille tuberculeux humain. *Med d’Afrique Noire.* 1969;16: 321–2.
45. Mostowy, S., Onipede, A., Gagneux, S., Niemann, S., Kremer, K., Desmond, E. P., Kato-Maeda, M., & Behr, M. (2004). Genomic analysis distinguishes Mycobacterium africanum. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3594–3599. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3594-3599.2004>
46. A.Q. Wells, D.M., Oxon. Tuberculosis in Wild Voles. *Lancet.* 1937 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)83505-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)83505-9)
47. KARLSON A, LESSEL E. Mycobacterium bovis nom. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1970;20: 273–82.
48. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53: 1305–1314. doi:10.1099/ijs.0.02401-0
49. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, et al. Novel Mycobacterium tuberculosis Complex Pathogen, M. mungi. *Emerg Infect Dis.* 2010;16: 1296–1299. doi:10.3201/eid1608.100314
50. van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, et al. Characterization of Mycobacterium orygis as M. tuberculosis Complex Subspecies. *Emerg Infect Dis.* 2012;18: 653–655. doi:10.3201/eid1804.110888

51. Parsons SDC, Drewe JA, Gey van Pittius NC, Warren RM, van Helden PD. Novel Cause of Tuberculosis in Meerkats, South Africa. *Emerg Infect Dis.* 2013;19: 2004–2007. doi:10.3201/eid1912.130268
52. Coscolla M, Lewin A, Metzger S, Maetz-Rennsing K, Calvignac-Spencer S, Nitsche A, et al. Novel Mycobacterium tuberculosis Complex Isolate from a Wild Chimpanzee. *Emerg Infect Dis.* 2013;19: 969–976. doi:10.3201/eid1906.121012
53. Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, et al. Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the Mycobacterium tuberculosis complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49 Pt 3: 1263–1273. doi:10.1099/00207713-49-3-1263
54. van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, et al. A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47: 1236–1245. doi:10.1099/00207713-47-4-1236
55. Riojas MA, McGough KJ, Rider-Riojas CJ, Rastogi N, Hazbón MH. Phylogenomic analysis of the species of the Mycobacterium tuberculosis complex demonstrates that Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium caprae, Mycobacterium microti and Mycobacterium pinnipedii are later heterotypic synonyms of Mycobacterium tuberculosis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018;68: 324–332. doi:10.1099/ijsem.0.002507
56. Gagneux S. Host–pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2012;367: 850–859. doi:10.1098/rstb.2011.0316
57. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans. *Nat Genet.* 2013;45: 1176–1182. doi:10.1038/ng.2744
58. de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. Mycobacterium africanum--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4: e744. doi:10.1371/journal.pntd.0000744
59. Galagan JE. Genomic insights into tuberculosis. *Nat Rev Genet.* 2014;15: 307–320. doi:10.1038/nrg3664
60. Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, et al. Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2003;41: 359–367. doi:10.1128/jcm.41.1.359-367.2003
61. Baron H, Hummel S, Herrmann B. Mycobacterium tuberculosis Complex DNA in Ancient Human Bones. *Journal of Archaeological Science.* 1996;23: 667–671. doi:10.1006/jasc.1996.0063

62. Donoghue HD, Spigelman M, Zias J, Gernaey-Child AM, Minnikin DE. Mycobacterium tuberculosis complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old. *Letters in Applied Microbiology*. 1998;27: 265–269. doi:10.1046/j.1472-765X.1998.00436.x
63. Rabello MC da S, Matsumoto CK, de Almeida LGP, Menendez MC, de Oliveira RS, Silva RM, et al. First Description of Natural and Experimental Conjugation between Mycobacteria Mediated by a Linear Plasmid. *PLoS One*. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0029884
64. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*. 2010;11: 181–190. doi:10.1038/nrg2749
65. Aguilar D, Hanekom M, Mata D, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM, et al. Mycobacterium tuberculosis strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. *Tuberculosis (Edinb)*. 2010;90: 319–325. doi:10.1016/j.tube.2010.08.004
66. Palanisamy GS, DuTeau N, Eisenach KD, Cave DM, Theus SA, Kreiswirth BN, et al. Clinical strains of Mycobacterium tuberculosis display a wide range of virulence in guinea pigs. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89: 203–209. doi:10.1016/j.tube.2009.01.005
67. van Laarhoven A, Mandemakers JJ, Kleinnijenhuis J, Enaimi M, Lachmandas E, Joosten LAB, et al. Low Induction of Proinflammatory Cytokines Parallels Evolutionary Success of Modern Strains within the Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype. *Infect Immun*. 2013;81: 3750–3756. doi:10.1128/IAI.00282-13
68. The Pattern of Cytokine Production In Vitro Induced by Ancient and Modern Beijing Mycobacterium tuberculosis Strains. *PLoS One*. 2014;9(4):e94296. doi: 10.1371/journal.pone.0094296. eCollection 2014.
69. Rakotosamimanana N, Raharimanga V, Andriamandimby SF, Soares J-L, Doherty TM, Ratsitorahina M, et al. Variation in gamma interferon responses to different infecting strains of Mycobacterium tuberculosis in acid-fast bacillus smear-positive patients and household contacts in Antananarivo, Madagascar. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17: 1094–1103. doi:10.1128/CVI.00049-10
70. Natural Variation in Immune Responses to Neonatal Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Vaccination in a Cohort of Gambian Infants. *PLoS One*. 2008;3(10):e3485. doi: 10.1371/journal.pone.0003485.
71. López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. *Clin Exp Immunol*. 2003;133: 30–37. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02171.x

72. Zhang J, Mi L, Wang Y, Liu P, Liang H, Huang Y, et al. Genotypes and drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Shihezi, Xinjiang Province, China. *BMC Res Notes*. 2012;5: 309. doi:10.1186/1756-0500-5-309
73. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Harris SR, et al. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. *Genome Res*. 2012;22: 735–745. doi:10.1101/gr.128678.111
74. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol*. 2014;26: 431–444. doi:10.1016/j.smim.2014.09.012
75. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993;31: 406–409.
76. Otal I, Martín C, Vincent-Lévy-Frebault V, Thierry D, Gicquel B. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 1991;29: 1252–1254.
77. Yuen LK, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J Clin Microbiol*. 1993;31: 1615–1618.
78. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1993;31: 1987–1995.
79. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997;35: 907–914.
80. Warren RM, Streicher EM, Sampson SL, van der Spuy GD, Richardson M, Nguyen D, et al. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. *J Clin Microbiol*. 2002;40: 4457–4465. doi:10.1128/jcm.40.12.4457-4465.2002
81. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169: 5429–5433.
82. Zhang J, Abadia E, Refregier G, Tafaj S, Boschirolu ML, Guillard B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of “spoligotyping” with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *J Med Microbiol*. 2010;59: 285–294. doi:10.1099/jmm.0.016949-0

83. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol. 2006;6: 23. doi:10.1186/1471-2180-6-23
84. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis | Journal of Clinical Microbiology. [cited 20 Oct 2020]. Available: <https://jcm.asm.org/content/44/12/4498>
85. Bidovec-Stojkovic U, Zolnir-Dovc M, Supply P. One year nationwide evaluation of 24-locus MIRU-VNTR genotyping on Slovenian Mycobacterium tuberculosis isolates. Respiratory Medicine. 2011;105: S67–S73. doi:10.1016/S0954-6111(11)70014-2
86. Comas I, Gagneux S. A role for systems epidemiology in tuberculosis research. Trends Microbiol. 2011;19: 492–500. doi:10.1016/j.tim.2011.07.002
87. Kato-Maeda M, Metcalfe JZ, Flores L. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis: application in epidemiologic studies. Future Microbiol. 2011;6: 203–216. doi:10.2217/fmb.10.165
88. Bing Lu 1, Hai Yan Dong, Xiu Qin Zhao, Zhi Guang Liu, et al., A new Multilocus Sequence Analysis Scheme for Mycobacterium tuberculosis. Biomed Environ Sci . 2012 Dec;25(6):620-9. doi: 10.3967/0895-3988.2012.06.003.
89. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99: 3684–3689. doi:10.1073/pnas.052548299
90. Ngabonziza JCS, Loiseau C, Marceau M, Jouet A, Menardo F, Tzfidia O, et al. A sister lineage of the Mycobacterium tuberculosis complex discovered in the African Great Lakes region. Nature Communications. 2020;11: 2917. doi:10.1038/s41467-020-16626-6
91. Coscolla M, Brites D, Menardo F, Loiseau C, Borrell S, Otchere ID, et al. Phylogenomics of Mycobacterium africanum reveals a new lineage and a complex evolutionary history. bioRxiv. 2020; 2020.06.10.141788. doi:10.1101/2020.06.10.141788
92. Iñaki Comas 1, Susanne Homolka, Stefan Niemann, Sebastien Gagneux. Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in Mycobacterium tuberculosis Highlights the Limitations of Current Methodologies. PLoS One. 2009;12;4(11):e7815. doi: 10.1371/journal.pone.0007815.
93. Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and Strategy for Use of MIRU-VNTRplus, a Multifunctional Database for Online Analysis

- of Genotyping Data and Phylogenetic Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *J Clin Microbiol.* 2008;46: 2692–2699. doi:10.1128/JCM.00540-08
94. Caws M, Thwaites G, Dunstan S, Hawn TR, Thi Ngoc Lan N, Thuong NTT, et al. The Influence of Host and Bacterial Genotype on the Development of Disseminated Disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2008;4. doi:10.1371/journal.ppat.1000034
 95. Pérez-Lago L, Comas I, Navarro Y, González-Candelas F, Herranz M, Bouza E, et al. Whole Genome Sequencing Analysis of Inpatient Microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: Potential Impact on the Inference of Tuberculosis Transmission. *J Infect Dis.* 2014;209: 98–108. doi:10.1093/infdis/jit439
 96. Merker M, Kohl TA, Roetzer A, Truebe L, Richter E, Rüsck-Gerdes S, Fattorini L, Oggioni MR, Cox H, Varaine F, Niemann S. Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in patients. *PLoS One.* 2013 Dec 6;8(12):e82551. doi: 10.1371/journal.pone.0082551. PMID: 24324807; PMCID: PMC3855793.
 97. Gutacker MM, Mathema B, Soini H, Shashkina E, Kreiswirth BN, Graviss EA, et al. Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J Infect Dis.* 2006;193: 121–128. doi:10.1086/498574
 98. Ruth Hershberg, Mikhail Lipatov, Peter M Small, Hadar Sheffer, Stefan Niemann, et al., High Functional Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Driven by Genetic Drift and Human Demography. *PLoS Biol.* 2008 Dec 16;6(12):e311. doi: 10.1371/journal.pbio.0060311.
 99. Firdessa R, Berg S, Hailu E, Schelling E, Gumi B, Erenso G, et al. *Mycobacterial* Lineages Causing Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis, Ethiopia. *Emerg Infect Dis.* 2013;19: 460–463. doi:10.3201/eid1903.120256
 100. Rose G, Cortes T, Comas I, Coscolla M, Gagneux S, Young DB. Mapping of Genotype–Phenotype Diversity among Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by Sequence-Based Transcriptional Profiling. *Genome Biol Evol.* 2013;5: 1849–1862. doi:10.1093/gbe/evt138
 101. Comas I, Borrell S, Roetzer A, Rose G, Malla B, Kato-Maeda M, et al. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *M. tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase. *Nat Genet.* 2011;44: 106–110. doi:10.1038/ng.1038
 102. Trauner A, Borrell S, Reither K, Gagneux S. Evolution of Drug Resistance in Tuberculosis: Recent Progress and Implications for Diagnosis and Therapy. *Drugs.* 2014;74: 1063–1072. doi:10.1007/s40265-014-0248-y
 103. Rabahi MF, Conceição EC, de Paiva LO, Souto MVML, Sisco MC, de Waard J, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* var. *africanum* isolated from a patient

- with pulmonary tuberculosis in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2020;85: 104550. doi:10.1016/j.meegid.2020.104550
104. Hurtado UA, Solano JS, Rodriguez A, Robledo J, Rouzaud F. Draft Genome Sequence of a *Mycobacterium africanum* Clinical Isolate from Antioquia, Colombia. *Genome Announc.* 2016;4. doi:10.1128/genomeA.00486-16
105. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol.* 1995;33: 3234–3238. doi:10.1128/JCM.33.12.3234-3238.1995
106. Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P, et al. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol.* 2004;137: 460–468. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02551.x
107. Rindi L, Medici C, Bimbi N, Buzzigoli A, Lari N, Garzelli C. Genomic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Euro-American lineage based on large sequence deletions and 15-locus MIRU-VNTR polymorphism. *PLoS One.* 2014 Sep 8;9(9):e107150. doi: 10.1371/journal.pone.0107150. Erratum in: *PLoS One.* 2014;9(11):e114676. PMID: 25197794; PMCID: PMC4157836.
108. Hernandez Pando R, Aguilar D, Cohen I, Guerrero M, Ribon W, Acosta P, et al. Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model. *Tuberculosis (Edinb).* 2010;90: 268–277. doi:10.1016/j.tube.2010.05.002
109. Luo T, Comas I, Luo D, Lu B, Wu J, Wei L, et al. Southern East Asian origin and coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family with Han Chinese. *PNAS.* 2015;112: 8136–8141. doi:10.1073/pnas.1424063112
110. Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, Vyazovaya A, Limeschenko E, Steklova L, et al. Phylogenetic reconstruction within *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in northwestern Russia. *Res Microbiol.* 2002;153: 629–637. doi:10.1016/s0923-2508(02)01374-8
111. Fenner L, Malla B, Ninet B, Dubuis O, Stucki D, Borrell S, et al. “Pseudo-Beijing”: Evidence for Convergent Evolution in the Direct Repeat Region of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE.* 2011;6: e24737. doi:10.1371/journal.pone.0024737
112. Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis.* 2010;10: 103–111. doi:10.1016/S1473-3099(09)70330-5

113. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide Occurrence of Beijing/W Strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. *Emerg Infect Dis*. 2002;8: 843–849. doi:10.3201/eid0808.020002
114. Kremer K, van der Werf MJ, Au BKY, Anh DD, Kam KM, Rogier van Doorn H, et al. Vaccine-induced Immunity Circumvented by Typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains. *Emerg Infect Dis*. 2009;15: 335–339. doi:10.3201/eid1502.080795
115. Jeon BY, Derrick SC, Lim J, Kolibab K, Dheenadhayalan V, Yang AL, et al. *Mycobacterium bovis* BCG immunization induces protective immunity against nine different *Mycobacterium tuberculosis* strains in mice. *Infect Immun*. 2008;76: 5173–5180. doi:10.1128/IAI.00019-08
116. Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet*. 2015;47: 242–249. doi:10.1038/ng.3195
117. Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS ONE*. 2009;4. doi:10.1371/journal.pone.0007815
118. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103: 2869–2873. doi:10.1073/pnas.0511240103
119. Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, Goguet de la Salmoniere Y-OL, Kreiswirth BN, Van Soolingen D, et al. Genomic Deletions Classify the Beijing/W Strains as a Distinct Genetic Lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2005;43: 3185–3191. doi:10.1128/JCM.43.7.3185-3191.2005
120. Bespyatykh J, Shitikov E, Butenko I, Altukhov I, Alexeev D, Mokrousov I, et al. Proteome analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 cluster. *Sci Rep*. 2016;6: 28985. doi:10.1038/srep28985
121. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998 Jun 11;393(6685):537-44. doi: 10.1038/31159. Erratum in: *Nature* 1998 Nov 12;396(6707):190. PMID: 9634230.
122. de Souza GA, Leversen NA, Målen H, Wiker HG. Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. *J Proteomics*. 2011;75: 502–510. doi:10.1016/j.jprot.2011.08.016

123. Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, Hannan M, Goguet de la Salmoniere YO, Aman K, Kato-Maeda M, Small PM. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 6;101(14):4865-70. doi: 10.1073/pnas.0305634101. Epub 2004 Mar 15. PMID: 15024109; PMCID: PMC387340.
124. Mazandu GK, Mulder NJ. Function prediction and analysis of mycobacterium tuberculosis hypothetical proteins. *Int J Mol Sci*. 2012;13(6):7283-302. doi: 10.3390/ijms13067283. Epub 2012 Jun 13. PMID: 22837694; PMCID: PMC3397526.
125. DeJesus MA, Gerrick ER, Xu W, Park SW, Long JE, Boutte CC, Rubin EJ, Schnappinger D, Ehrt S, Fortune SM, Sasseti CM, Ioerger TR. Comprehensive Essentiality Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Genome via Saturating Transposon Mutagenesis. *mBio*. 2017 Jan 17;8(1):e02133-16. doi: 10.1128/mBio.02133-16. PMID: 28096490; PMCID: PMC5241402.
126. Sachdeva P, Misra R, Tyagi AK, Singh Y. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J*. 2010;277: 605–626. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07479.x
127. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013 Jan 1;4(1):3-66. doi: 10.4161/viru.22329. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23076359; PMCID: PMC3544749.
128. Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol*. 1999;34: 257–267. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01593.x
129. Astarie-Dequeker C, Le Guyader L, Malaga W, Seaphanh F-K, Chalut C, Lopez A, et al. Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. *PLoS Pathog*. 2009;5: e1000289. doi:10.1371/journal.ppat.1000289
130. Giovannini D, Cappelli G, Jiang L, Castilletti C, Colone A, Serafino A, et al. A new *Mycobacterium tuberculosis* smooth colony reduces growth inside human macrophages and represses PDIM Operon gene expression. Does an heterogeneous population exist in intracellular mycobacteria? *Microb Pathog*. 2012;53: 135–146. doi:10.1016/j.micpath.2012.06.002
131. Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, ZiaZarifi AH, et al. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. *Chest*. 2009;136: 420–425. doi:10.1378/chest.08-2427

132. Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, et al. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*. 2004;431: 84–87. doi:10.1038/nature02837
133. de Keijzer J, de Haas PE, de Ru AH, van Veelen PA, van Soolingen D. Disclosure of selective advantages in the “modern” sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype family by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13: 2632–2645. doi:10.1074/mcp.M114.038380
134. Ebrahimi-Rad M, Bifani P, Martin C, Kremer K, Samper S, Rauzier J, et al. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis*. 2003;9: 838–845. doi:10.3201/eid0907.020803
135. Ribeiro SCM, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MRM, Almeida FM, Rezende AL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J Clin Microbiol*. 2014;52: 2615–2624. doi:10.1128/JCM.00498-14
136. Yin QQ, Liu HC, Jiao WW, Li QJ, Han R, Tian JL, Liu ZG, Zhao XQ, Li YJ, Wan KL, Shen AD, Mokrousov I. Evolutionary History and Ongoing Transmission of Phylogenetic Sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype in China. *Sci Rep*. 2016 Sep 29;6:34353. doi: 10.1038/srep34353. PMID: 27681182; PMCID: PMC5041183.
137. Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy CRE, Kidd M, et al. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol*. 2007;45: 1483–1490. doi:10.1128/JCM.02191-06
138. Shitikov E, Kolchenko S, Mokrousov I, Bespyatykh J, Ischenko D, Ilina E, Govorun V. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2017 Aug 23;7(1):9227. doi: 10.1038/s41598-017-10018-5. PMID: 28835627; PMCID: PMC5569047.
139. Hanekom M, Gey van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a template for success. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011;91: 510–523. doi:10.1016/j.tube.2011.07.005
140. Murcia MI, Manotas M, Jiménez YJ, Hernández J, Cortès MIC, López LE, et al. First case of multidrug-resistant tuberculosis caused by a rare “Beijing-like” genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Bogotá, Colombia. *Infect Genet Evol*. 2010;10: 678–681. doi:10.1016/j.meegid.2010.03.010
141. Beijing/W Genotype *Mycobacterium tuberculosis* and Drug Resistance. *Emerg Infect Dis*. 2006;12: 736–743. doi:10.3201/eid1205.050400
142. Liu Y, Jiang X, Li W, Zhang X, Wang W, Li C. The study on the association between Beijing genotype family and drug susceptibility phenotypes of *Mycobacterium*

- tuberculosis in Beijing. *Sci Rep*. 2017 Nov 8;7(1):15076. doi: 10.1038/s41598-017-14119-z. PMID: 29118425; PMCID: PMC5678160.
143. Werngren J, Hoffner SE. Drug-susceptible Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate. *J Clin Microbiol*. 2003 Apr;41(4):1520-4. doi: 10.1128/JCM.41.4.1520-1524.2003. PMID: 12682139; PMCID: PMC153924.
144. Luiz Rdos S, Suffys P, Barroso EC, Kerr LR, Duarte CR, Freitas MV, Mota RM, Frota CC. Genotyping and drug resistance patterns of Mycobacterium tuberculosis strains observed in a tuberculosis high-burden municipality in Northeast, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2013 May-Jun;17(3):338-45. doi: 10.1016/j.bjid.2012.10.019. Epub 2013 Apr 20. PMID: 23607922.
145. Cáceres O, Rastogi N, Bartra C, Couvin D, Galarza M, Asencios L, et al. Characterization of the genetic diversity of extensively-drug resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients in Peru. *PLoS One*. 2014;9: e112789. doi:10.1371/journal.pone.0112789
146. Villegas SL, Ferro BE, Perez-Velez CM, Moreira CA, Forero L, Martínez E, Rastogi N, Caminero JA. High initial multidrug-resistant tuberculosis rate in Buenaventura, Colombia: a public-private initiative. *Eur Respir J*. 2012 Dec;40(6):1569-72. doi: 10.1183/09031936.00018212. PMID: 23204023.
147. Pang Y, Zhou Y, Zhao B, Liu G, Jiang G, Xia H, Song Y, Shang Y, Wang S, Zhao YL. Spoligotyping and drug resistance analysis of Mycobacterium tuberculosis strains from national survey in China. *PLoS One*. 2012;7(3):e32976. doi: 10.1371/journal.pone.0032976. Epub 2012 Mar 7. PMID: 22412962; PMCID: PMC3296750.
148. Genetic Diversity of Mycobacterium tuberculosis Isolates from Inner Mongolia, China. *PLOS ONE*. 2013;8: e57660. doi:10.1371/journal.pone.0057660
149. San LL, Aye KS, Oo NAT, Shwe MM, Fukushima Y, Gordon SV, et al. Insight into multidrug-resistant Beijing genotype Mycobacterium tuberculosis isolates in Myanmar. *Int J Infect Dis*. 2018;76: 109–119. doi:10.1016/j.ijid.2018.06.009
150. Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, Lan NT, van Gorkom T, Kremer K, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis*. 2000;6: 302–305. doi:10.3201/eid0603.000312
151. Nguyen VAT, Choisy M, Nguyen DH, Tran THT, Pham KLT, Thi Dinh PT, et al. High prevalence of Beijing and EAI4-VNM genotypes among M. tuberculosis isolates in northern Vietnam: sampling effect, rural and urban disparities. *PLoS One*. 2012;7: e45553. doi:10.1371/journal.pone.0045553

152. Mathuria JP, Srivastava GN, Sharma P, Mathuria BL, Ojha S, Katoch VM, et al. Prevalence of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype and its association with drug resistance in North India. *Journal of Infection and Public Health*. 2017;10: 409–414. doi:10.1016/j.jiph.2016.06.007
153. Viegas SO, Machado A, Groenheit R, Ghebremichael S, Pennhag A, Gudo PS, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype is associated with HIV infection in Mozambique. *PLoS One*. 2013;8: e71999. doi:10.1371/journal.pone.0071999
154. Sobre el origen y difusión del nombre “América Latina” (o una variación heterodoxa en torno al tema de la construcción social de la verdad) | Quijada | Revista de Indias. [cited 20 Oct 2020]. Available: <http://revistadeindias.revistas.csic.es/index.php/revistadeindias/article/view/749>
155. Sánchez AM, Solache LC. DE LAS EPIDEMIAS EN EL MÉXICO ANTIGUO. : 13.
156. Langlois-Klassen D, Senthilselvan A, Chui L, Kunimoto D, Saunders LD, Menzies D, et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis Beijing Strains, Alberta, Canada, 1991–2007. *Emerg Infect Dis*. 2013;19: 701–711. doi:10.3201/eid1905.121578
157. Langlois-Klassen D, Senthilselvan A, Chui L, Kunimoto D, Saunders LD, Menzies D, et al. Transmission of Mycobacterium tuberculosis Beijing Strains, Alberta, Canada, 1991-2007. *Emerging infectious diseases*. 2013. doi:10.3201/eid1905.121578
158. Langlois-Klassen D, Kunimoto D, Saunders LD, Chui L, Boffa J, Menzies D, Long R. A population-based cohort study of Mycobacterium tuberculosis Beijing strains: an emerging public health threat in an immigrant-receiving country? *PLoS One*. 2012;7(6):e38431. doi: 10.1371/journal.pone.0038431. Epub 2012 Jun 5. PMID: 22679504; PMCID: PMC3367965.
159. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis at a hospital--New York City, 1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1993 Jun 11;42(22):427, 433-4. PMID: 8502215.
160. Soini H, Pan X, Amin A, Graviss EA, Siddiqui A, Musser JM. Characterization of Mycobacterium tuberculosis Isolates from Patients in Houston, Texas, by Spoligotyping. *J Clin Microbiol*. 2000;38: 669–676.
161. Agerton TB, Valway SE, Blinkhorn RJ, Shilkret KL, Reves R, Schluter WW, et al. Spread of strain W, a highly drug-resistant strain of Mycobacterium tuberculosis, across the United States. *Clin Infect Dis*. 1999;29: 85–92; discussion 93-95. doi:10.1086/520187
162. Ritacco V, López B, Cafrune PI, Ferrazoli L, Suffys PN, Candia N, et al. Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103: 489–492. doi:10.1590/s0074-02762008000500014

163. Cerezo-Cortés MI, Rodríguez-Castillo JG, Hernández-Pando R, Murcia MI. Circulation of *M. tuberculosis* Beijing genotype in Latin America and the Caribbean. *Pathog Glob Health*. 2019;113: 336–351. doi:10.1080/20477724.2019.1710066
164. Diaz R, Kremer K, de Haas PE, Gomez RI, Marrero A, Valdivia JA, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998;2: 743–750.
165. Avila YMH, Gómez CMF, Valdés RG, Rodríguez IMM, Molina DL, Cordero MJL, et al. Tipificación con oligonucleótidos espaciadores de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba. *Rev Cubana Med Trop*. 2015;67: 85–96.
166. HERRERA AVILA, Yoslany M et al. Tipificación con oligonucleótidos espaciadores de *Mycobacterium tuberculosis* en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* [online]. 2015;67:85-96. D
167. Grandjean L, Iwamoto T, Lithgow A, Gilman RH, Arikawa K, Nakanishi N, Martin L, Castillo E, Alarcon V, Coronel J, Solano W, Aminian M, Guezala C, Rastogi N, Couvin D, Sheen P, Zimic M, Moore DA. The Association between *Mycobacterium Tuberculosis* Genotype and Drug Resistance in Peru. *PLoS One*. 2015 May 18;10(5):e0126271. doi: 10.1371/journal.pone.0126271. PMID: 25984723; PMCID: PMC4435908.
168. Laserson KF, Osorio L, Sheppard JD, Hernández H, Benitez AM, Brim S, et al. Clinical and programmatic mismanagement rather than community outbreak as the cause of chronic, drug-resistant tuberculosis in Buenaventura, Colombia, 1998. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000;4: 673–683.
169. Zurita J, Espinel N, Barba P, Ortega-Paredes D, Zurita-Salinas C, Rojas Y, et al. Genetic diversity and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Ecuador. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2019;23: 166–173. doi:10.5588/ijtld.18.0095
170. Sola C, Devallois A, Horgen L, Maisetti J, Filliol I, Legrand E, et al. Tuberculosis in the Caribbean: Using Spacer Oligonucleotide Typing to Understand Strain Origin and Transmission. *Emerg Infect Dis*. 1999;5: 404–411. doi:10.3201/eid0503.990311
171. Brudey K, Filliol I, Ferdinand S, Guernier V, Duval P, Maubert B, et al. Long-Term Population-Based Genotyping Study of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates in the French Departments of the Americas. *J Clin Microbiol*. 2006;44: 183–191. doi:10.1128/JCM.44.1.183-191.2006
172. Baboolal S, Millet J, Akpaka PE, Ramoutar D, Rastogi N. First insight into *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology and genetic diversity in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol*. 2009;47: 1911–1914. doi:10.1128/JCM.00535-09

173. Millet J, Baboolal S, Streit E, Akpaka PE, Rastogi N. A first assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and drug-resistance patterns in twelve Caribbean territories. *Biomed Res Int*. 2014;2014: 718496. doi:10.1155/2014/718496
174. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Acquired multidrug-resistant tuberculosis--Buenaventura, Colombia, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1998 Sep 18;47(36):759-61. PMID: 9756459.
175. Murcia MI, Manotas M, Jiménez YJ, Hernández J, Cortès MIC, López LE, et al. First case of multidrug-resistant tuberculosis caused by a rare “Beijing-like” genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Bogotá, Coll. Murcia MI, Manotas M, Jiménez YJ, Hernández J, Cortès MIC, López LE, et al. First case of multidrug-resistant tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010;10: 678–681. doi:10.1016/j.meegid.2010.03.010
176. Nieto LM, Ferro BE, Villegas SL, Mehaffy C, Forero L, Moreira C, et al. Characterization of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis Cases from Valle del Cauca, Colombia. *J Clin Microbiol*. 2012;50: 4185–4187. doi:10.1128/JCM.01946-12
177. Realpe T, Correa N, Rozo JC, Ferro BE, Gomez V, Zapata E, Ribon W, Puerto G, Castro C, Nieto LM, Diaz ML, Rivera O, Couvin D, Rastogi N, Arbelaez MP, Robledo J. Population structure among mycobacterium tuberculosis isolates from pulmonary tuberculosis patients in Colombia. *PLoS One*. 2014 Apr 18;9(4):e93848. doi: 10.1371/journal.pone.0093848. Erratum in: *PLoS One*. 2014;9(9):e109456. Ferro, Beatriz Elena [corrected to Ferro, Beatriz Eugenia]. PMID: 24747767; PMCID: PMC3991582.
178. Cerezo I, Jiménez Y, Hernandez J, Zozio T, Murcia MI, Rastogi N. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. *Infect Genet Evol*. 2012;12: 657–663. doi:10.1016/j.meegid.2011.07.006
179. Puerto G, Erazo L, Wintaco M, Castro C, Ribón W, Guerrero MI. *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes Determined by Spoligotyping to Be Circulating in Colombia between 1999 and 2012 and Their Possible Associations with Transmission and Susceptibility to First-Line Drugs. *PLoS One*. 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0124308
180. Darío Puerto, Erazo Lina, Zabaleta Angie, Lina Erazo, Gloria Puerto, Claudia Llerena. Genotipos de *Mycobacterium tuberculosis*, circulantes en el puerto de Buenaventura, Colombia. *Biomédica Inst Nac Salud*. 2017;37: 149.
181. Rodríguez-Castillo JG, Llerena C, Argoty-Chamorro L, Guerra J, Couvin D, Rastogi N, et al. Population structure of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Colombia. *Tuberculosis (Edinb)*. 2020;125: 102011. doi:10.1016/j.tube.2020.102011

182. Puerto D, Erazo L, Zabaleta A, Murcia MI, Llerena C, Puerto G. Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from indigenous peoples of Colombia. *Biomedica*. 2019;39: 78–92. doi:10.7705/biomedica.v39i3.4318
183. Flores-Treviño S, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, González-Díaz E, Pérez-Gómez HR, Bocanegra-García V, et al. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Guadalajara, Mexico and Identification of a Rare Multidrug Resistant Beijing Genotype. *PLoS One*. 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0118095
184. Nieto Ramirez LM, Ferro BE, Diaz G, Anthony RM, de Beer J, van Soolingen D. Genetic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* revealed “modern” Beijing strains linked to MDR-TB from Southwestern Colombia. *PLoS One*. 2020;15: e0224908. doi:10.1371/journal.pone.0224908
185. Rodríguez JG, Pino C, Tauch A, Murcia MI. Complete Genome Sequence of the Clinical Beijing-Like Strain *Mycobacterium tuberculosis* 323 Using the PacBio Real-Time Sequencing Platform. *Genome Announc*. 2015;3. doi:10.1128/genomeA.00371-15
186. Hernández-Pando R, Marquina-Castillo B, Barrios-Payán J, Mata-Espinosa D. Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12: 725–731. doi:10.1016/j.meegid.2012.02.013
187. Davies J. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia*. 1996;12: 9–16.
188. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res*. 2005;36: 697–705. doi:10.1016/j.arcmed.2005.06.009
189. Davies J. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia*. 1996 Mar;12(1):9-16. PMID: 9019139.
190. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res*. 2005 Nov-Dec;36(6):697-705. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.06.009. PMID: 16216651.
191. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. [cited 20 Oct 2020]. Available: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241549639>
192. Jayachandran R, BoseDasgupta S, Pieters J. Surviving the macrophage: tools and tricks employed by *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;374: 189–209. doi:10.1007/82_2012_273
193. Ramos-Espinosa O, Islas-Weinstein L, Peralta-Álvarez MP, López-Torres MO, Hernández-Pando R. The use of immunotherapy for the treatment of tuberculosis. *Expert Rev Respir Med*. 2018 May;12(5):427-440. doi: 10.1080/17476348.2018.1457439. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29575946.

194. Manabe YC, Dannenberg AM, Tyagi SK, Hatem CL, Yoder M, Woolwine SC, et al. Different Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Cause Various Spectrums of Disease in the Rabbit Model of Tuberculosis. *Infect Immun.* 2003;71: 6004–6011. doi:10.1128/IAI.71.10.6004-6011.2003
195. Vervenne RAW, Jones SL, van Soolingen D, van der Laan T, Andersen P, Heidt PJ, et al. TB diagnosis in non-human primates: comparison of two interferon-gamma assays and the skin test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;100: 61–71. doi:10.1016/j.vetimm.2004.03.003
196. Flynn JL. Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbes Infect.* 2006;8: 1179–1188. doi:10.1016/j.micinf.2005.10.033
197. Phuah JY, Mattila JT, Lin PL, Flynn JL. Activated B Cells in the Granulomas of Nonhuman Primates Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Pathol.* 2012;181: 508–514. doi:10.1016/j.ajpath.2012.05.009
198. McMurray DN. Disease model: pulmonary tuberculosis. *Trends Mol Med.* 2001;7: 135–137. doi:10.1016/s1471-4914(00)01901-8
199. Dey B, Bishai WR. Crosstalk between *Mycobacterium tuberculosis* and the host cell. *Semin Immunol.* 2014;26: 486–496. doi:10.1016/j.smim.2014.09.002
200. Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S. *Mycobacterium tuberculosis*: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology.* 2012;217: 363–374. doi:10.1016/j.imbio.2011.07.008
201. Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and non-pathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe.* 2009;6: 10–21. doi:10.1016/j.chom.2009.06.007
202. North RJ, Jung Y-J. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2004;22: 599–623. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104635
203. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001;19: 93–129. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.93
204. Differential Expression of Immunogenic Proteins on Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. [cited 20 Oct 2020]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/741309/>
205. Kang DD, Lin Y, Moreno J-R, Randall TD, Khader SA. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. *PLoS One.* 2011;6: e16161. doi:10.1371/journal.pone.0016161
206. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Sypek J, Wolf S, Bloom BR. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 1995 Sep 1;155(5):2515-24. PMID: 7650381.

207. MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science*. 2003;302: 654–659. doi:10.1126/science.1088063
208. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med*. 1993;178: 2243–2247. doi:10.1084/jem.178.6.2243
209. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med*. 1993;178: 2249–2254. doi:10.1084/jem.178.6.2249
210. Denis M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell Immunol*. 1991 Jan;132(1):150-7. doi: 10.1016/0008-8749(91)90014-3. PMID: 1905984.
211. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. *Cell*. 2010;140: 871–882. doi:10.1016/j.cell.2010.02.029
212. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94: 5243–5248. doi:10.1073/pnas.94.10.5243
213. Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med*. 1996;183: 147–157. doi:10.1084/jem.183.1.147
214. Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183: 147–157. doi:10.1084/jem.183.1.147
215. Mishra BB, Rathinam VAK, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, et al. Nitric oxide controls tuberculosis immunopathology by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β processing. *Nat Immunol*. 2013;14: 52–60. doi:10.1038/ni.2474
216. Stanley SA, Johndrow JE, Manzanillo P, Cox JS. The Type I IFN response to infection with Mycobacterium tuberculosis requires ESX-1-mediated secretion and contributes to pathogenesis. *J Immunol*. 2007;178: 3143–3152. doi:10.4049/jimmunol.178.5.3143
217. McNab FW, Ewbank J, Howes A, Moreira-Teixeira L, Martirosyan A, Ghilardi N, et al. Type I IFN induces IL-10 production in an IL-27-independent manner and blocks responsiveness to IFN- γ for production of IL-12 and bacterial killing in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *J Immunol*. 2014;193: 3600–3612. doi:10.4049/jimmunol.1401088

218. Manca C, Tsenova L, Freeman S, Barczak AK, Tovey M, Murray PJ, et al. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res.* 2005;25: 694–701. doi:10.1089/jir.2005.25.694
219. Berry MPR, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SAA, Oni T, et al. An Interferon-Inducible Neutrophil-Driven Blood Transcriptional Signature in Human Tuberculosis. *Nature.* 2010;466: 973–977. doi:10.1038/nature09247
220. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity.* 2011;34: 213–223. doi:10.1016/j.immuni.2011.02.006
221. Mayer-Barber KD, Andrade BB, Barber DL, Hieny S, Feng CG, Caspar P, et al. Innate and adaptive interferons suppress IL-1 α and IL-1 β production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity.* 2011;35: 1023–1034. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.002
222. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 1995;2: 561–572. doi:10.1016/1074-7613(95)90001-2
223. Demangel C, Bertolino P, Britton WJ. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *Eur J Immunol.* 2002;32: 994–1002. doi:10.1002/1521-4141(200204)32:4<994::AID-IMMU994>3.0.CO;2-6
224. Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis DL, Basaraba RJ, Kipnis A, Orme IM, et al. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2002;169: 6343–6351. doi:10.4049/jimmunol.169.11.6343
225. Rayamajhi M, Humann J, Penheiter K, Andreasen K, Lenz LL. Induction of IFN- α enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- γ . *J Exp Med.* 2010;207: 327–337. doi:10.1084/jem.20091746
226. Mayer-Barber KD, Andrade BB, Oland SD, Amaral EP, Barber DL, Gonzales J, et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature.* 2014;511: 99–103. doi:10.1038/nature13489
227. Divangahi M, Chen M, Gan H, Desjardins D, Hickman TT, Lee DM, et al. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol.* 2009;10: 899–906. doi:10.1038/ni.1758
228. Tobin DM, Roca FJ, Oh SF, McFarland R, Vickery TW, Ray JP, et al. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell.* 2012;148: 434–446. doi:10.1016/j.cell.2011.12.023

229. Wilkinson RJ, Patel P, Llewelyn M, Hirsch CS, Pasvol G, Snounou G, et al. Influence of Polymorphism in the Genes for the Interleukin (IL)-1 Receptor Antagonist and IL-1 β on Tuberculosis. *J Exp Med*. 1999;189: 1863–1874.
230. Teles RMB, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ, et al. Type I Interferon Suppresses Type II Interferon-Triggered Human Anti-Mycobacterial Responses. *Science*. 2013;339: 1448–1453. doi:10.1126/science.1233665
231. Srivastava S, Ernst JD. Cell-to-cell transfer of *M. tuberculosis* antigens optimizes CD4 T cell priming. *Cell Host Microbe*. 2014;15: 741–752. doi:10.1016/j.chom.2014.05.007
232. Rocha-Ramírez LM, Estrada-García I, López-Marín LM, Segura-Salinas E, Méndez-Aragón P, Van Soolingen D, et al. Mycobacterium tuberculosis lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008;88: 212–220. doi:10.1016/j.tube.2007.10.003
233. Reyes-Martínez JE, Nieto-Patlán E, Nieto-Patlán A, Gonzaga-Bernachi J, Santos-Mendoza T, Serafín-López J, et al. Differential activation of dendritic cells by Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype. *Immunol Invest*. 2014;43: 436–446. doi:10.3109/08820139.2014.880120
234. Rivera-Ordaz A, Gonzaga-Bernachi J, Serafín-López J, Hernández-Pando R, Soolingen DV, Estrada-Parra S, et al. Mycobacterium tuberculosis beijing genotype induces differential cytokine production by peripheral blood mononuclear cells of healthy BCG vaccinated individuals. *Immunological Investigations*. 2012; 144–156. doi:10.3109/08820139.2011.596604
235. Theus SA, Cave MD, Eisenach KD. Intracellular Macrophage Growth Rates and Cytokine Profiles of Mycobacterium tuberculosis Strains with Different Transmission Dynamics. *J Infect Dis*. 2005;191: 453–460. doi:10.1086/425936
236. Shiloh MU, Champion PAD. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about Mycobacterium tuberculosis pathogenesis? *Curr Opin Microbiol*. 2010;13: 86–92. doi:10.1016/j.mib.2009.11.006
237. Suter E. THE MULTIPLICATION OF TUBERCLE BACILLI WITHIN NORMAL PHAGOCYTES IN TISSUE CULTURE. *J Exp Med*. 1952;96: 137–150.
238. Gupta UD, Katoch VM. Animal models of tuberculosis for vaccine development. *Indian J Med Res*. 2009;129: 11–18.
239. Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, Moreira AL, Kurepina N, Reed MB, et al. Virulence of selected Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Dis*. 2005;192: 98–106. doi:10.1086/430614

240. Casellas J. Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal*. 2011 Jan;5(1):1-7. doi: 10.1017/S1751731110001667. PMID: 22440695.
241. Bailey DW. How pure are inbred strains of mice? *Immunology Today*. 1982;3: 210–214. doi:10.1016/0167-5699(82)90093-7
242. Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF, et al. Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet*. 2000;24: 23–25. doi:10.1038/71641
243. 000651 - BALB/cJ. [cited 20 Oct 2020]. Available: <https://www.jax.org/strain/000651>
244. Dharmadhikari AS, Basaraba RJ, Van Der Walt ML, Weyer K, Mphahlele M, Venter K, et al. Natural infection of guinea pigs exposed to patients with highly drug-resistant tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011;91: 329–338. doi:10.1016/j.tube.2011.03.002
245. McShane H, Williams A. A review of preclinical animal models utilised for TB vaccine evaluation in the context of recent human efficacy data. *Tuberculosis (Edinb)*. 2014 Mar;94(2):105-10. doi: 10.1016/j.tube.2013.11.003. Epub 2013 Dec 1. PMID: 24369986; PMCID: PMC3969587.
246. Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol*. 2018 Feb 13;9:67. doi: 10.3389/fmicb.2018.00067. Erratum in: *Front Microbiol*. 2019 Apr 09;10:714. PMID: 29497402; PMCID: PMC5819568.
247. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jul 13;12(8):581-91. doi: 10.1038/nri3259. PMID: 22790178.
248. Hernandez-Pando R, Pavón L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V, Rook G. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun*. 1997 Aug;65(8):3317-27. doi: 10.1128/iai.65.8.3317-3327.1997. PMID: 9234793; PMCID: PMC175470.
249. Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, et al. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1996;89: 26–33.
250. Pando RH, Aguilar LD, Smith I, Manganelli R. Immunogenicity and Protection Induced by a *Mycobacterium tuberculosis* sigE Mutant in a BALB/c Mouse Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. *Infect Immun*. 2010;78: 3168–3176. doi:10.1128/IAI.00023-10
251. Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1997;90: 607–617.

252. Beltrán-León M, Rodríguez-Castillo JG, Zozio T, Rastogi N, I Murcia M. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from HIV-TB patients from two public hospitals at Bogotá, Colombia. *Infect Genet Evol.* 2020;77: 104059. doi:10.1016/j.meegid.2019.104059
253. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 2006. doi:10.1128/JCM.01392-06
254. Marquina-Castillo B, García-García L, Ponce-de-León A, Jimenez-Corona M-E, Bobadilla-Del Valle M, Cano-Arellano B, et al. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of Mycobacterium tuberculosis in a murine model. *Immunology.* 2009;128: 123–33. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03004.x
255. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009 Jul 15;25(14):1754-60. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324. Epub 2009 May 18. PMID: 19451168; PMCID: PMC2705234.
256. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 2015 Jan 15;31(2):166-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638. Epub 2014 Sep 25. PMID: 25260700; PMCID: PMC4287950.
257. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8. PMID: 25516281; PMCID: PMC4302049.
258. Wang J, Vasaiakar S, Shi Z, Greer M, Zhang B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res.* 2017;45: W130–W137. doi:10.1093/nar/gkx356
259. Atlas of Mycobacterium Tuberculosis. Elsevier; 2017. doi:10.1016/C2015-0-00386-0
260. Vijay S, Hai HT, Thu DDA, Johnson E, Pielach A, Phu NH, et al. Ultrastructural Analysis of Cell Envelope and Accumulation of Lipid Inclusions in Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates from Sputum, Oxidative Stress, and Iron Deficiency. *Front Microbiol.* 2018;8. doi:10.3389/fmicb.2017.02681
261. Ferro BE, Nieto LM, Rozo JC, Forero L, van Soolingen D. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis, Southwestern Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2011;17: 1259–1262. doi:10.3201/eid1707.101797
262. Rodríguez-Castillo JG, Pino C, Niño LF, Rozo JC, Llerena-Polo C, Parra-López CA, Tauch A, Murcia-Aranguren MI. Comparative genomic analysis of Mycobacterium tuberculosis Beijing-like strains revealed specific genetic variations associated with

- virulence and drug resistance. *Infect Genet Evol.* 2017 Oct;54:314-323. doi: 10.1016/j.meegid.2017.07.022. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28734764.
263. Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, et al. Foamy Macrophages from Tuberculous Patients' Granulomas Constitute a Nutrient-Rich Reservoir for *M. tuberculosis* Persistence. *PLoS Pathog.* 2008;4. doi:10.1371/journal.ppat.1000204
264. Caire-Brändli I, Papadopoulos A, Malaga W, Marais D, Canaan S, Thilo L, et al. Reversible lipid accumulation and associated division arrest of *Mycobacterium avium* in lipoprotein-induced foamy macrophages may resemble key events during latency and reactivation of tuberculosis. *Infect Immun.* 2014;82: 476–490. doi:10.1128/IAI.01196-13
265. Knight M, Braverman J, Asfaha K, Gronert K, Stanley S. Lipid droplet formation in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages requires IFN- γ /HIF-1 α signaling and supports host defense. *PLoS Pathog.* 2018;14: e1006874. doi:10.1371/journal.ppat.1006874
266. Timmins GS, Deretic V. Mechanisms of action of isoniazid. *Mol Microbiol.* 2006;62: 1220–1227. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05467.x
267. Reed MB, Gagneux S, Deriemer K, Small PM, Barry CE. The W-Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated. *J Bacteriol.* 2007;189: 2583–2589. doi:10.1128/JB.01670-06
268. Drobniowski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, Ruddy M, Kuznetsov S, Zakharova S, et al. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *JAMA.* 2005;293: 2726–2731. doi:10.1001/jama.293.22.2726
269. Hirata T. Electron microscopic observations of intracytoplasmic membrane systems and cell division in *Mycobacterium lepraemurium*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1979;47: 585–596.
270. Santhana Raj L, Hing HL, Baharudin O, Teh Hamidah Z, Aida Suhana R, Nor Asiha CP, et al. Mesosomes are a definite event in antibiotic-treated *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Trop Biomed.* 2007;24: 105–109.
271. Cowley SC, Elkins KL. CD4⁺ T cells mediate IFN-gamma-independent control of *Mycobacterium tuberculosis* infection both in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2003;171: 4689–4699. doi:10.4049/jimmunol.171.9.4689
272. Chacón-Salinas R, Serafín-López J, Ramos-Payán R, Méndez-Aragón P, Hernández-Pando R, Van Soolingen D, et al. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol.* 2005;140: 443–449. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02797.x

273. Zak DE, Tam VC, Aderem A. Systems-level analysis of innate immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32: 547–577. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120254
274. Algood HMS, Chan J, Flynn JL. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14: 467–477. doi:10.1016/s1359-6101(03)00054-6
275. Liang J, Song W, Tromp G, Kolattukudy PE, Fu M. Genome-wide survey and expression profiling of CCCH-zinc finger family reveals a functional module in macrophage activation. *PLoS One.* 2008 Aug 6;3(8):e2880. doi: 10.1371/journal.pone.0002880. PMID: 18682727; PMCID: PMC2478707.
276. Fenwick C, Na SY, Voll RE, Zhong H, Im SY, Lee JW, et al. A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of IkappaB. *Science.* 2000;287: 869–873. doi:10.1126/science.287.5454.869
277. Huxford T, Ghosh G. Inhibition of transcription factor NF-kappaB activation by kappaB-Ras. *Methods Enzymol.* 2006;407: 527–534. doi:10.1016/S0076-6879(05)07042-4
278. Samy ET, Meyer CA, Caplazi P, Langrish CL, Lora JM, Bluethmann H, Peng SL. Cutting edge: Modulation of intestinal autoimmunity and IL-2 signaling by sphingosine kinase 2 independent of sphingosine 1-phosphate. *J Immunol.* 2007 Nov 1;179(9):5644–8. doi: 10.4049/jimmunol.179.9.5644. PMID: 17947634.
279. Weigert A, von Knethen A, Thomas D, Faria I, Namgaladze D, Zezina E, et al. Sphingosine kinase 2 is a negative regulator of inflammatory macrophage activation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2019;1864: 1235–1246. doi:10.1016/j.bbalip.2019.05.008
280. Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, et al. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem.* 2005;280: 37118–37129. doi:10.1074/jbc.M502207200
281. Rosebeck S, Leaman DW. Mitochondrial localization and pro-apoptotic effects of the interferon-inducible protein ISG12a. *Apoptosis.* 2008;13: 562–572. doi:10.1007/s10495-008-0190-0
282. Gytz H, Hansen MF, Skovbjerg S, Kristensen ACM, Hørlyck S, Jensen MB, et al. Apoptotic properties of the type 1 interferon induced family of human mitochondrial membrane ISG12 proteins. *Biol Cell.* 2017;109: 94–112. doi:10.1111/boc.201600034
283. Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, et al. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem.* 1998;273: 12101–12108. doi:10.1074/jbc.273.20.12101

284. Qin L, Gibson PG, Simpson JL, Baines KJ, McDonald VM, Wood LG, et al. Dysregulation of sputum columnar epithelial cells and products in distinct asthma phenotypes. *Clin Exp Allergy*. 2019;49: 1418–1428. doi:10.1111/cea.13452
285. Alevy YG, Patel AC, Romero AG, Patel DA, Tucker J, Roswit WT, et al. IL-13–induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition. *J Clin Invest*. 2012;122: 4555–4568. doi:10.1172/JCI64896
286. Ordway D, Henao-Tamayo M, Harton M, Palanisamy G, Troudt J, Shanley C, et al. The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. *J Immunol*. 2007;179: 522–531. doi:10.4049/jimmunol.179.1.522
287. CLEC9A Is a Novel Activation C-type Lectin-like Receptor Expressed on BDCA3+ Dendritic Cells and a Subset of Monocytes. [cited 20 Oct 2020]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2562446/>
288. Okamoto S, Azhipa O, Yu Y, Russo E, Dennert G. Expression of ADP-ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. *J Immunol*. 1998;160: 4190–4198.
289. Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem*. 1997;272: 31221–31224. doi:10.1074/jbc.272.50.31221
290. Nagano T, Yoneda T, Hatanaka Y, Kubota C, Murakami F, Sato M. Filamin A-interacting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone. *Nat Cell Biol*. 2002;4: 495–501. doi:10.1038/ncb808
291. Yi Z, Gao K, Li R, Fu Y. Dysregulated circRNAs in plasma from active tuberculosis patients. *J Cell Mol Med*. 2018;22: 4076–4084. doi:10.1111/jcmm.13684
292. Sunryd JC, Cheon B, Graham JB, Giorda KM, Fissore RA, Hebert DN. TMTC1 and TMTC2 Are Novel Endoplasmic Reticulum Tetratricopeptide Repeat-containing Adapter Proteins Involved in Calcium Homeostasis. *J Biol Chem*. 2014;289: 16085–16099. doi:10.1074/jbc.M114.554071
293. Fensterl V, Sen GC. Interferon-Induced Ifit Proteins: Their Role in Viral Pathogenesis. *J Virol*. 2014;89: 2462–2468. doi:10.1128/JVI.02744-14
294. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003;16: 463–496. doi:10.1128/CMR.16.3.463-496.2003
295. Vander Beken S, Al Dulayymi JR, Naessens T, Koza G, Maza-Iglesias M, Rowles R, et al. Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern. *Eur J Immunol*. 2011;41: 450–460. doi:10.1002/eji.201040719

296. Colakoğlu S. [Mycobacterium tuberculosis virulence factors and its immune evasion mechanisms]. Mikrobiyol Bul. 2004;38: 155–167.
297. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature. 1998;393: 537–544. doi:10.1038/31159
298. Cole ST. Learning from the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. FEBS Lett. 1999;452: 7–10. doi:10.1016/s0014-5793(99)00536-0
299. Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR. SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of Mycobacterium tuberculosis. Molecular Microbiology. 2003;48: 453–464. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03438.x
300. Simeone R, Bottai D, Frigui W, Majlessi L, Brosch R. ESX/type VII secretion systems of mycobacteria: Insights into evolution, pathogenicity and protection. Tuberculosis (Edinb). 2015;95 Suppl 1: S150-154. doi:10.1016/j.tube.2015.02.019
301. Bosserman RE, Nicholson KR, Champion MM, Champion PA. A New ESX-1 Substrate in Mycobacterium marinum That Is Required for Hemolysis but Not Host Cell Lysis. Journal of Bacteriology. 2019;201. doi:10.1128/JB.00760-18
302. Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, Brosch R, et al. Phagosomal rupture by Mycobacterium tuberculosis results in toxicity and host cell death. PLoS Pathog. 2012;8: e1002507. doi:10.1371/journal.ppat.1002507
303. Brodin P, Majlessi L, Marsollier L, de Jonge MI, Bottai D, Demangel C, et al. Dissection of ESAT-6 system 1 of Mycobacterium tuberculosis and impact on immunogenicity and virulence. Infect Immun. 2006;74: 88–98. doi:10.1128/IAI.74.1.88-98.2006
304. Hu Y, Movahedzadeh F, Stoker NG, Coates ARM. Deletion of the Mycobacterium tuberculosis α -Crystallin-Like hspX Gene Causes Increased Bacterial Growth In Vivo. Infect Immun. 2006;74: 861–868. doi:10.1128/IAI.74.2.861-868.2006
305. Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR, et al. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of Mycobacterium tuberculosis is required for growth in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95: 9578–9583. doi:10.1073/pnas.95.16.9578
306. Barry CE. Interpreting cell wall “virulence factors” of Mycobacterium tuberculosis. Trends Microbiol. 2001;9: 237–241. doi:10.1016/s0966-842x(01)02018-2
307. Rajni null, Rao N, Meena LS. Biosynthesis and Virulent Behavior of Lipids Produced by Mycobacterium tuberculosis: LAM and Cord Factor: An Overview. Biotechnol Res Int. 2011;2011: 274693. doi:10.4061/2011/274693

308. Daffé M. The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015;95 Suppl 1: S155-158. doi:10.1016/j.tube.2015.02.024
309. Kocíncová D, Sondén B, de Mendonça-Lima L, Gicquel B, Reytrat J-M. The Erp protein is anchored at the surface by a carboxy-terminal hydrophobic domain and is important for cell-wall structure in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;231: 191–196. doi:10.1016/S0378-1097(03)00964-9
310. Kuo C-J, Gao J, Huang J-W, Ko T-P, Zhai C, Ma L, et al. Functional and structural investigations of fibronectin-binding protein Apa from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2019;1863: 1351–1359. doi:10.1016/j.bbagen.2019.06.003
311. Pasula R, Wisniowski P, Martin II WJ. Fibronectin Facilitates *Mycobacterium tuberculosis* Attachment to Murine Alveolar Macrophages. *Infect Immun*. 2002;70: 1287–1292. doi:10.1128/IAI.70.3.1287-1292.2002
312. Dobos KM, Khoo KH, Swiderek KM, Brennan PJ, Belisle JT. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 1996;178: 2498–2506. doi:10.1128/jb.178.9.2498-2506.1996
313. Rao V, Fujiwara N, Porcelli SA, Glickman MS. *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J Exp Med*. 2005;201: 535–543. doi:10.1084/jem.20041668
314. Quigley J, Hughitt VK, Velikovskiy CA, Mariuzza RA, El-Sayed NM, Briken V. The Cell Wall Lipid PDIM Contributes to Phagosomal Escape and Host Cell Exit of *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio*. 2017;8. doi:10.1128/mBio.00148-17
315. Lerner TR, Queval CJ, Fearn A, Repnik U, Griffiths G, Gutierrez MG. Phthiocerol dimycocerosates promote access to the cytosol and intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* in lymphatic endothelial cells. *BMC Biol*. 2018;16: 1. doi:10.1186/s12915-017-0471-6
316. Domenech P, Reed MB, Barry CE. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL Protein Family to Virulence and Drug Resistance. *Infect Immun*. 2005;73: 3492–3501. doi:10.1128/IAI.73.6.3492-3501.2005
317. Lee Y-V, Wahab HA, Choong YS. Potential inhibitors for isocitrate lyase of *Mycobacterium tuberculosis* and non-M. tuberculosis: a summary. *Biomed Res Int*. 2015;2015: 895453. doi:10.1155/2015/895453
318. Pérez E, Samper S, Bordas Y, Guilhot C, Gicquel B, Martín C. An essential role for phoP in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol*. 2001;41: 179–187. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02500.x
319. Cimino M, Thomas C, Namouchi A, Dubrac S, Gicquel B, Gopaul DN. Identification of DNA Binding Motifs of the *Mycobacterium tuberculosis* PhoP/PhoR Two-

- Component Signal Transduction System. PLOS ONE. 2012;7: e42876. doi:10.1371/journal.pone.0042876
320. Manganelli R, Proveddi R, Rodrigue S, Beaucher J, Gaudreau L, Smith I. σ Factors and Global Gene Regulation in Mycobacterium tuberculosis. Journal of Bacteriology. 2004;186: 895–902. doi:10.1128/JB.186.4.895-902.2004
321. Gomez JE, Chen J-M, Bishai WR. Sigma factors of Mycobacterium tuberculosis. Tubercle and Lung Disease. 1997;78: 175–183. doi:10.1016/S0962-8479(97)90024-1
322. Leistikow RL, Morton RA, Bartek IL, Frimpong I, Wagner K, Voskuil MI. The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. J Bacteriol. 2010;192: 1662–1670. doi:10.1128/JB.00926-09
323. Bartek IL, Rutherford R, Gruppo V, Morton RA, Morris RP, Klein MR, et al. The DosR regulon of M. tuberculosis and antibacterial tolerance. Tuberculosis (Edinb). 2009;89: 310–316. doi:10.1016/j.tube.2009.06.001
324. Roberts DM, Liao RP, Wisedchaisri G, Hol WGJ, Sherman DR. Two Sensor Kinases Contribute to the Hypoxic Response of Mycobacterium tuberculosis. J Biol Chem. 2004;279: 23082–23087. doi:10.1074/jbc.M401230200
325. Casonato S, Cervantes Sánchez A, Haruki H, Rengifo González M, Proveddi R, Dainese E, et al. WhiB5, a Transcriptional Regulator That Contributes to Mycobacterium tuberculosis Virulence and Reactivation. Infect Immun. 2012;80: 3132–3144. doi:10.1128/IAI.06328-11
326. Stapleton MR, Smith LJ, Hunt DM, Buxton RS, Green J. Mycobacterium tuberculosis WhiB1 represses transcription of the essential chaperonin GroEL2. Tuberculosis. 2012;92: 328–332. doi:10.1016/j.tube.2012.03.001
327. Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of Mycobacterium tuberculosis. Microbiol Rev. 1992;56: 648–661.
328. Kremer L, Maughan WN, Wilson RA, Dover LG, Besra GS. The M. tuberculosis antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. Lett Appl Microbiol. 2002;34: 233–237. doi:10.1046/j.1472-765x.2002.01091.x
329. Sharkey FH, Banat IM, Marchant R. Detection and Quantification of Gene Expression in Environmental Bacteriology. Appl Environ Microbiol. 2004;70: 3795–3806. doi:10.1128/AEM.70.7.3795-3806.2004
330. Kendall SL, Rison SCG, Movahedzadeh F, Frita R, Stoker NG. What do microarrays really tell us about M. tuberculosis? Trends Microbiol. 2004;12: 537–544. doi:10.1016/j.tim.2004.10.005

331. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10: 57–63. doi:10.1038/nrg2484
332. Wang S, Dong X, Zhu Y, Wang C, Sun G, Luo T, et al. Revealing of *Mycobacterium marinum* Transcriptome by RNA-seq. *PLoS One.* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0075828
333. Sonesson C, Delorenzi M. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC Bioinformatics.* 2013;14: 91. doi:10.1186/1471-2105-14-91
334. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122: e59. doi:10.1002/cpmb.59
335. Li P, Piao Y, Shon HS, Ryu KH. Comparing the normalization methods for the differential analysis of Illumina high-throughput RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics.* 2015;16: 347. doi:10.1186/s12859-015-0778-7
336. Srivastava A, Malik L, Sarkar H, Zakeri M, Almodaresi F, Sonesson C, Love MI, Kingsford C, Patro R. Alignment and mapping methodology influence transcript abundance estimation. *Genome Biol.* 2020 Sep 7;21(1):239. doi: 10.1186/s13059-020-02151-8. PMID: 32894187; PMCID: PMC7487471.
337. Abrams ZB, Johnson TS, Huang K, Payne PRO, Coombes K. A protocol to evaluate RNA sequencing normalization methods. *BMC Bioinformatics.* 2019;20: 679. doi:10.1186/s12859-019-3247-x
338. Evans C, Hardin J, Stoebel DM. Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions. *Brief Bioinform.* 2017;19: 776–792. doi:10.1093/bib/bbx008
339. Bushel PR, Ferguson SS, Ramaiahgari SC, Paules RS, Auerbach SS. Comparison of Normalization Methods for Analysis of TempO-Seq Targeted RNA Sequencing Data. *Front Genet.* 2020;11. doi:10.3389/fgene.2020.00594
340. Rodríguez-Castillo JG, Pino C, Niño LF, Rozo JC, Llerena-Polo C, Parra-López CA, et al. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing-like strains revealed specific genetic variations associated with virulence and drug resistance. *Infect Genet Evol.* 2017;54: 314–323. doi:10.1016/j.meegid.2017.07.022
341. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics.* 2016;32: 3047–3048. doi:10.1093/bioinformatics/btw354
342. Castillo-Davis CI, Hartl DL. GeneMerge--post-genomic analysis, data mining, and hypothesis testing. *Bioinformatics.* 2003;19: 891–892. doi:10.1093/bioinformatics/btg114
343. UniProt. [cited 1 Mar 2021]. Available: <https://www.uniprot.org/>

344. Fontán PA, Voskuil MI, Gomez M, Tan D, Pardini M, Manganelli R, et al. The Mycobacterium tuberculosis sigma factor sigmaB is required for full response to cell envelope stress and hypoxia in vitro, but it is dispensable for in vivo growth. *J Bacteriol.* 2009;191: 5628–5633. doi:10.1128/JB.00510-09
345. Hillas PJ, del Alba FS, Oyarzabal J, Wilks A, Ortiz De Montellano PR. The AhpC and AhpD antioxidant defense system of Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem.* 2000;275: 18801–18809. doi:10.1074/jbc.M001001200
346. Lee J, Lee S-G, Kim KK, Lim Y-J, Choi J-A, Cho S-N, et al. Characterisation of genes differentially expressed in macrophages by virulent and attenuated Mycobacterium tuberculosis through RNA-Seq analysis. *Scientific Reports.* 2019;9: 4027. doi:10.1038/s41598-019-40814-0
347. Rienksma RA, Suarez-Diez M, Mollenkopf H-J, Dolganov GM, Dorhoi A, Schoolnik GK, et al. Comprehensive insights into transcriptional adaptation of intracellular mycobacteria by microbe-enriched dual RNA sequencing. *BMC Genomics.* 2015;16: 34. doi:10.1186/s12864-014-1197-2
348. Choudhury S, Akhade AS, Subramanian N. Dual RNA-seq as an effective tool to simultaneously identify transcriptional changes in host macrophages and invading intracellular pathogens. *The Journal of Immunology.* 2020;204: 227.27-227.27.
349. Pisu D, Huang L, Grenier JK, Russell DG. Dual RNA-Seq of Mtb-Infected Macrophages In Vivo Reveals Ontologically Distinct Host-Pathogen Interactions. *Cell Rep.* 2020;30: 335-350.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.12.033
350. Skvortsov TA, Ignatov DV, Majorov KB, Apt AS, Azhikina TL. Mycobacterium tuberculosis Transcriptome Profiling in Mice with Genetically Different Susceptibility to Tuberculosis. *Acta Naturae.* 2013;5: 62–69.
351. Rachman H, Strong M, Ulrichs T, Grode L, Schuchhardt J, Mollenkopf H, et al. Unique transcriptome signature of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 2006;74: 1233–1242. doi:10.1128/IAI.74.2.1233-1242.2006
352. Liu K, Ba X, Yu J, Li J, Wei Q, Han G, et al. The phosphoenolpyruvate carboxykinase of Mycobacterium tuberculosis induces strong cell-mediated immune responses in mice. *Mol Cell Biochem.* 2006;288: 65–71. doi:10.1007/s11010-006-9119-5
353. Yuan Y, Crane DD, Barry CE. Stationary phase-associated protein expression in Mycobacterium tuberculosis: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol.* 1996;178: 4484–4492. doi:10.1128/jb.178.15.4484-4492.1996
354. Sharrock A, Ruthe A, Andrews ESV, Arcus VA, Hicks JL. VapC proteins from Mycobacterium tuberculosis share ribonuclease sequence specificity but differ in regulation and toxicity. *PLOS ONE.* 2018;13: e0203412. doi:10.1371/journal.pone.0203412

355. Kumar A, Toledo JC, Patel RP, Lancaster JR, Steyn AJC. Mycobacterium tuberculosis DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104: 11568–11573. doi:10.1073/pnas.0705054104
356. Sharpe ML, Gao C, Kendall SL, Baker EN, Lott JS. The structure and unusual protein chemistry of hypoxic response protein 1, a latency antigen and highly expressed member of the DosR regulon in Mycobacterium tuberculosis. *J Mol Biol*. 2008;383: 822–836. doi:10.1016/j.jmb.2008.07.001
357. Fishbein S, Wyk N van, Warren RM, Sampson SL. Phylogeny to function: PE/PPE protein evolution and impact on Mycobacterium tuberculosis pathogenicity. *Molecular Microbiology*. 2015;96: 901–916. doi:https://doi.org/10.1111/mmi.12981
358. Delogu G, Brennan MJ, Manganelli R. PE and PPE Genes: A Tale of Conservation and Diversity. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1019: 191–207. doi:10.1007/978-3-319-64371-7_10
359. Shrivastava P, Navratna V, Silla Y, Dewangan RP, Pramanik A, Chaudhary S, et al. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis dihydrodipicolinate synthase by alpha-ketopimelic acid and its other structural analogues. *Scientific Reports*. 2016;6: 30827. doi:10.1038/srep30827
360. Singh G, Singh G, Jadeja D, Kaur J. Lipid hydrolizing enzymes in virulence: Mycobacterium tuberculosis as a model system. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36: 259–269. doi:10.3109/1040841X.2010.482923
361. Shen G, Singh K, Chandra D, Serveau-Avesque C, Maurin D, Canaan S, et al. LipC (Rv0220) Is an Immunogenic Cell Surface Esterase of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. 2012;80: 243–253. doi:10.1128/IAI.05541-11
362. Kiran M, Chauhan A, Dziedzic R, Maloney E, Mukherji SK, Madiraju M, et al. Mycobacterium tuberculosis ftsH expression in response to stress and viability. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89: S70–S73. doi:10.1016/S1472-9792(09)70016-2
363. Healy C, Golby P, MacHugh DE, Gordon SV. The MarR family transcription factor Rv1404 coordinates adaptation of Mycobacterium tuberculosis to acid stress via controlled expression of Rv1405c, a virulence-associated methyltransferase. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016;97: 154–162. doi:10.1016/j.tube.2015.10.003
364. Goyal R, Das AK, Singh R, Singh PK, Korpole S, Sarkar D. Phosphorylation of PhoP Protein Plays Direct Regulatory Role in Lipid Biosynthesis of Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem*. 2011;286: 45197–45208. doi:10.1074/jbc.M111.307447
365. Ollinger J, O'Malley T, Kesicki EA, Odingo J, Parish T. Validation of the Essential ClpP Protease in Mycobacterium tuberculosis as a Novel Drug Target. *J Bacteriol*. 2012;194: 663–668. doi:10.1128/JB.06142-11

366. Chauhan R, Mande SC. Site-directed mutagenesis reveals a novel catalytic mechanism of Mycobacterium tuberculosis alkylhydroperoxidase C. *Biochem J.* 2002;367: 255–261. doi:10.1042/BJ20020545
367. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, DiGiuseppe Champion PA, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CMJE, et al. Type VII secretion — mycobacteria show the way. *Nature Reviews Microbiology.* 2007;5: 883–891. doi:10.1038/nrmicro1773
368. The lpqS knockout mutant of Mycobacterium tuberculosis is attenuated in macrophages - PubMed. [cited 6 Dec 2020]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23562345/>
369. Malm S, Walter K, Engel R, Maass S, Pfau S, Hübner G, et al. In vitro and in vivo characterization of a Mycobacterium tuberculosis mutant deficient in glycosyltransferase Rv1500. *Int J Med Microbiol.* 2008;298: 645–655. doi:10.1016/j.ijmm.2008.03.010
370. Madigan CA, Martinot AJ, Wei J-R, Madduri A, Cheng T-Y, Young DC, et al. Lipidomic analysis links mycobactin synthase K to iron uptake and virulence in M. tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2015;11: e1004792. doi:10.1371/journal.ppat.1004792
371. Cappelli G, Volpe E, Grassi M, Liseo B, Colizzi V, Mariani F. Profiling of Mycobacterium tuberculosis gene expression during human macrophage infection: upregulation of the alternative sigma factor G, a group of transcriptional regulators, and proteins with unknown function. *Res Microbiol.* 2006;157: 445–455. doi:10.1016/j.resmic.2005.10.007