



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**TESIS**

“POLIMORFISMOS DE LOS GENES *PE* Y *PPE* PRESENTES  
EN CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* PROVENIENTES  
DE MICHOACÁN”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

QFB. ERANDI FRUTOS HERNÁNDEZ

Directora de tesis:

DOCTORA EN CIENCIAS

MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS



Morelia, Michoacán. Agosto

2015

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la U.M.S.N.H., bajo la dirección de D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán. Se contó con el apoyo de los Proyectos: 16.4/CIC-UMSNH “Diversidad genética de aislados clínicos de cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de regiones con mayor incidencia del Estado de Michoacán”; CONACyT/FORDECyT/ST 346/2012, “Análisis genómico epidemiológico del complejo *M. tuberculosis* en los estados de Querétaro, Guanajuato y Michoacán” del Fondo Institucional del Fomento Regional para el Desarrollo, Científico, Tecnológico y de Innovación” y MICH-2012-C05-197631 “Hacia una estrategia integral para el control y tratamiento de la tuberculosis humana en Michoacán: evidencia epidemiológica y genética del Fondo Mixto Conacyt-Gobierno del Estado de Michoacán. La realización de este trabajo también fue posible gracias a la beca para estudios de maestría otorgada por CONACyT con número de expediente (CVU/Becario):513311/286563.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Epidemiología .....	1
1.2 Agente causal .....	2
1.3 Detección y tipificación del agente causal.....	2
1.4 Vía de transmisión y mecanismo de invasión .....	7
1.5 Patogenicidad y virulencia. ....	8
1.6 Familia de genes <i>pe/ppe</i> .....	10
1.6.1 Evolución y variación de las familias <i>pe-ppe</i> .....	12
1.6.2 Regulación de la transcripción de genes <i>pe-ppe</i> .....	17
1.6.3 Localización y función de proteínas <i>pe/ppe</i> .....	18
1.6.4 Polimorfismos en los genes <i>pe/ppe</i> .....	20
1.7 Antecedentes.....	23
<b>2. Justificación</b> .....	28
<b>3. Hipótesis</b> .....	29
<b>4. Objetivos</b> .....	29
4.1 Objetivo general.....	29
4.2 Objetivos específicos .....	29
<b>5. Estrategia experimental</b> .....	30
<b>6. Materiales y métodos</b> .....	31
6.1 Material biológico .....	31
6.2 Extracción de ADN.....	31
6.3 Amplificación por PCR de los genes <i>pe</i> y <i>ppe</i> . ....	32
6.4 Secuenciación.....	34
6.5 Análisis bioinformático.....	34

6.6 Análisis estadístico.....	34
<b>7. Resultados.....</b>	<b>35</b>
<b>8. Discusión.....</b>	<b>60</b>
<b>9. Resumen de resultados.....</b>	<b>68</b>
<b>10. Conclusión.....</b>	<b>69</b>
<b>11. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1. Características clínicas, genotípicas y resistencia a antibióticos de las cepas de estudio.....	24
2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	33
3. Condiciones empleadas en los ensayos de PCR para la amplificación de los genes de virulencia.....	33
4. Programas de amplificación mediante PCR de los genes de estudio.....	33
5. Tipos y cantidad de polimorfismos encontrados en cada gen.....	40
6. Tipos de polimorfismos en el gen <i>pe_pgrs18</i> , posiciones y familia en que se encuentran.....	44
7. Tipos de polimorfismos en el gen <i>pe_pgrs26</i> , posiciones y familia en la que se encuentran.....	48
8. Tipos de polimorfismos en el gen <i>pe3</i> , posiciones y familia en que se encuentran.....	49
9. Tipos de polimorfismos en el gen <i>ppe44</i> , posiciones y familia en que se encuentran.....	51
10. Origen clínico de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen <i>pe_pgrs18</i> .....	54
11. Origen clínico de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen <i>pe_pgrs26</i> .....	55
12. Origen clínico de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen <i>pe3</i> .....	56
13. Origen clínico de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen <i>ppe44</i> .....	57
14. Polimorfismos que coinciden con los reportados y familias en que se presentó la variación.....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Mapa físico del elemento de inserción IS6110 de 1.35 kb en <i>M. tuberculosis</i> .....	3
2. Estructura de repetidos directos (DR) en el genoma micobacteriano.....	4
3. Genotipificación de MTBC basada en VNTR.....	5
4. Estructura de los genes <i>pe/ppe</i> .....	11
5. Reconstrucción filogenética de relaciones evolutivas entre los miembros de la familia de proteínas PE.....	14
6. Reconstrucción filogenética de relaciones evolutivas entre los miembros de la familia de proteínas PPE.....	15
7. Influencia de las proteínas PE/PPE en el procesamiento del macrófago por <i>M. tuberculosis</i> .....	20
8. Productos de amplificación obtenidos de los genes de estudio con ADN de la cepa <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	35
9. Productos de amplificación obtenidos de los genes de estudio en las cepas de <i>M. tuberculosis</i> .....	36
10. Electroferogramas representativos de las secuencias obtenidas de distintos productos de amplificación de los genes de interés.....	37
11. Alineamiento múltiple representativo de las secuencias de los genes de estudio.....	39
12. Asociación entre SNPs del gen <i>pe_pgrs18</i> y las familias de <i>M. tuberculosis</i> .....	42
13. Asociación entre la inserción 297-308 del gen <i>pe_pgrs18</i> y las familias de <i>M. tuberculosis</i> .....	44
14. Asociación entre SNPs del gen <i>pe_pgrs26</i> y las familias de <i>M. tuberculosis</i> .....	46
15. Asociación entre la delección del gen <i>pe_pgrs26</i> y las familias de <i>M. tuberculosis</i> .....	48

16. Asociación entre SNPs del gen <i>ppe44</i> y las familias de <i>M. tuberculosis</i> .....	50
17. Asociación entre SNPs del gen <i>pe_pgrs18</i> y la procedencia clínica de la cepa.....	53
18. Asociación entre inserción del gen <i>pe_pgrs18</i> y la procedencia clínica de la cepa.....	53

## RESUMEN

Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* están clasificadas en 6 grandes linajes que a su vez se subdividen en familias y genotipos con características fenotípicas particulares que influyen en su virulencia y transmisibilidad. En el genoma de *M. tuberculosis* se encuentran los genes *pe* y *ppe* que codifican para la familia de proteínas PE y PPE, de las cuales algunas se encuentran en la superficie celular y otras son secretadas. Factores como su inmunogenicidad y la naturaleza polimórfica del extremo C-terminal han llevado a proponer que estas proteínas juegan un papel en la variación antigénica de la bacteria y en la evasión de la respuesta inmune. Se han identificado inserciones y deleciones que afectan los marcos de lectura abiertos de los genes *pe/ppe*, causando cambios físico-químicos en las proteínas codificadas. Muchos de estos cambios han sido correlacionados con la función *in vivo*, incluyendo su virulencia y patogénesis. Con el objetivo de encontrar una relación entre los polimorfismos de los genes *pe/ppe* con linajes/familias específicas del patógeno, en este estudio se analizaron 59 cepas de *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis provenientes de Michoacán. Se utilizaron datos de estudios previos en los que se había determinado la especie, el linaje y la familia de estas cepas. Se amplificaron y secuenciaron los genes *pe\_pgrs18*, *pe\_pgrs26*, *pe3* y *ppe44*; posteriormente se buscaron polimorfismos mediante la comparación en GenBank por medio del algoritmo BLASTn y usando alineamientos múltiples con los programas Clustal X y Mega 6. Para el gen *pe\_pgrs18* se encontró que las cepas de las familias T, LAM, SNR del linaje Euro Americano, EAI del linaje Indo-Oceánico y Beijing del linaje del Este de Asia, presentaron polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en las posiciones 54 a 247. Este mismo gen en las familias Haarlem, X, SNR del linaje Euro Americano, SNR del linaje Indo Oceánico y Ghana del Oeste de África presentaron SNPs e inserciones en las posiciones 295 a 510. El gen *pe\_pgrs26* presentó SNPs, inserciones y deleciones; las cepas de las familias X y T presentaron los mismos SNPs y las cepas de la familia EAI también. El gen *ppe44* presentó dos SNPs, 176 y 581, y fueron encontrados en las familias T, EAI, Beijing, SNR EA y ND. Algunos de los polimorfismos encontrados concuerdan con la literatura, pero otros son de nueva descripción. El gen *pe\_pgrs18* fue el más polimórfico, encontrándose polimorfismos en más de la mitad de las cepas estudiadas. Los datos obtenidos permiten concluir que existe una relación entre algunos de los polimorfismos encontrados y la familia a la que pertenecen las cepas de estudio.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, genes *pe/ppe*, polimorfismos, linajes.



## ABSTRACT

The strains of *M. tuberculosis* are classified into 6 major lineages, which in turn are subdivided into families and genotypes that shown particular phenotypic characteristics that influence its virulence and transmissibility. In the genome of *M. tuberculosis* are the *pe* and *ppe* genes that encode the protein families PE and PPE, which may found on the cell surface or secreted. Factors such as its immunogenicity and the polymorphic nature of the C-terminal end, have led to assume that these proteins play a role in antigenic variation and the bacteria evasion of the immune response. Insertions and deletions have been identified and they affect the open reading frames of the *pe* and *ppe* genes; this causes physico-chemical changes in the proteins. Many of these changes have been correlated to the function *in vivo*, including virulence and pathogenesis. The aim of this study was to find an association between the polymorphisms of *pe/ppe* genes with specific lineages/families of the pathogen, so 59 strains of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with tuberculosis from Michoacán were analyzed. The species, lineage and family of these strains were previously described. The genes *pe\_pgrs18*, *pe\_pgrs26*, *pe3* and *ppe44* were amplified and sequenced. The sequences were analyzed to find polymorphisms using the BLASTn algorithm and multiple alignments with the Clustal X and Mega 6 programs. For the gene *pe\_pgrs18* it was found that the strains of families T, LAM, SNR of Euro-American lineage, EAI of Indo-Oceanic lineage and Beijing of East Asia lineage, presented single nucleotide polymorphisms (SNPs) in positions 54 to 247. The same gene in the families Haarlem, X, SNR of Euro-American lineage, SNR of Indo-Oceanic lineage and Ghana of West Africa presented SNPs and insertions in the positions 295 to 510. The gene *pe\_pgrs26* presented SNPs, insertions and deletions; strains of families X and T presented the same SNPs as well as the strains of family EAI. The *ppe44* gen presented two SNPs, 176 and 581, and were found in families T, EAI, Beijing, SNR EA and ND. Some of the polymorphisms found are consistent with the literature, but others are newly described. The *pe\_pgrs18* gene was the most polymorphic, polymorphisms were found in more than half of the studied strains. The data obtained suggest that there is association between some polymorphisms found and the family to which they belong the studied strains.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, *pe/ppe* genes, polymorphism, lineages.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Epidemiología

La tuberculosis (TB) representa un problema de salud pública mundial, siendo la primera enfermedad que fue declarada como emergencia mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Para el año 2011 se reportaron 8.6 millones de casos nuevos y 1.3 millones de personas murieron por esta causa en todo el mundo. La mayor incidencia de TB se presenta en Asia y África, destacando la India y China, las cuales en conjunto representan casi el 40% de los casos mundiales de TB. Cerca de un 60% de los casos corresponden a las Regiones de Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental (WHO, 2014). Con excepción de Europa del Este y algunos países africanos, las tasas de prevalencia y mortalidad se han reducido en todo el mundo gracias a las medidas para el tratamiento y control sugeridas por la OMS. Sin embargo, se han reportado cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a isoniazida y rifampicina, lo que se ha denominado como tuberculosis multidrogorresistente (MDR-TB). También se han aislado cepas extensamente drogorresistentes (XDR-TB) que además de presentar resistencia a rifampicina e isoniazida, también son resistentes a cualquier fluoroquinolona y al menos a uno de los tres antibióticos inyectables de segunda línea que son la capreomicina, kanamicina y amikacina. En el 2012 se detectaron más de 450,000 casos de MDR-TB, representando el 3.6% de los casos nuevos y el 20% de los casos previamente tratados; la mayor parte de cepas que presentan este tipo de resistencia se concentran en Europa (particularmente en Europa del Este) y África (particularmente Sudáfrica). A finales del 2012 prácticamente todos los países y territorios habían reportado a la OMS por lo menos un caso de XDR-TB, siendo un total de 2, 230 casos los reportados hasta el momento (WHO, 2014).

La situación en América Latina es menos preocupante que en regiones como Asia y África, sin que por ello deje de representar un problema de salud pública. En México, en el año 2014 la Secretaría de Salud reportó una incidencia de más de 20,000 casos nuevos de TB pulmonar y extrapulmonar, con cerca de dos mil defunciones; presentándose en Michoacán 324 de los casos nuevos reportados (SSA, 2014). Asimismo, en nuestro país también se han reportado casos de MDR-TB y XDR-TB (WHO, 2009).

## 1.2 Agente causal

El agente causal de la TB humana es la actinobacteria *M. tuberculosis*, la cual forma junto con *M. bovis*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. africanum* y *M. microti*, un grupo genéticamente muy cercano denominado Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC, por sus siglas en inglés). Si bien *M. tuberculosis* es el principal agente de TB en humanos, el resto de los miembros del MTBC también se han aislado ocasionalmente de muestras humanas (Palomino *et al.*, 2007).

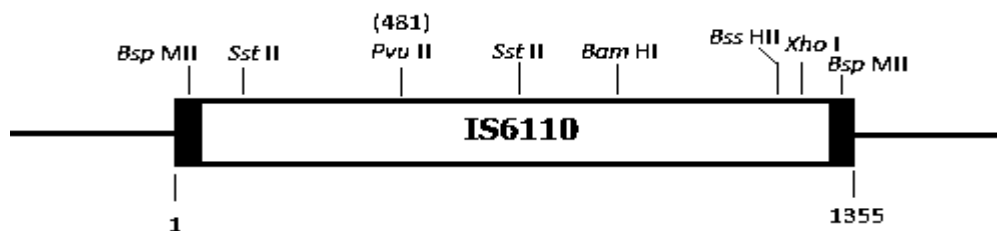
*M. tuberculosis* es una bacteria aerobia que no produce esporas, cilíndrica (0.5 a 3  $\mu\text{m}$ ), y que no posee flagelos ni cápsulas. Tiene una gran cantidad de ácidos micólicos en su pared celular, lo cual la distingue del resto de las bacterias; es de crecimiento lento con un tiempo de generación de 18 h, por lo que necesita de 3 a 4 semanas de incubación a 37°C, por lo general, para formar colonias visibles macroscópicamente (Raviglione y O'Brien, 2008).

## 1.3 Detección y tipificación del agente causal

En los países en desarrollo el diagnóstico de la TB se lleva a cabo principalmente mediante microscopía y cultivo bacteriano. Dado que los miembros del MTBC son organismos de crecimiento lento, pueden transcurrir de 6 a 12 semanas antes de que se observen colonias en el medio de cultivo, por lo que el diagnóstico suele basarse en la sintomatología del paciente, radiografías de tórax y microscopía (Palomino *et al.*, 2007). De éstas, la microscopía es el método de diagnóstico más específico y consiste en la tinción de muestras de esputo con la

técnica de Ziehl-Neelsen para bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR); sin embargo, se requieren 10,000 bacterias por  $\text{mm}^3$  en la muestra para que la tinción sea positiva. Se ha calculado que la tinción para BAAR detecta solamente entre un 40 a 60% de los casos de TB activa. Por esta razón desde hace casi veinte años se han hecho importantes esfuerzos por aplicar técnicas de biología molecular para acelerar y mejorar la certeza del diagnóstico (van Soolingen, 2001). Además de la detección de bacilos del MTBC en muestras clínicas, las técnicas moleculares también permiten la tipificación de los aislados, de manera que se puede hacer un seguimiento epidemiológico.

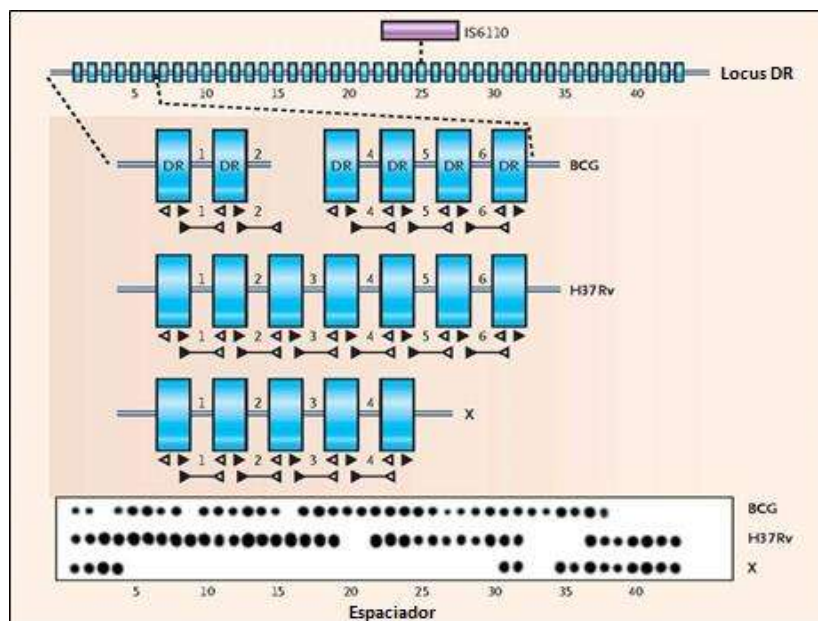
Entre las técnicas desarrolladas, el “estándar de oro” de genotipificación de *M. tuberculosis* es el análisis de IS6110-RFLP, que caracteriza a los aislados por el análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción de la secuencia de inserción IS6110 que se encuentra en varias copias en el cromosoma bacteriano (de 8 a 20 copias). Más de una enzima de restricción corta a esta secuencia de inserción, entre las que se encuentran *Bam*HI, *Sst*II, *Pst*I, *Bst*EII, *Bss*HIII y *Pvu*II (Fig. 1), y todas se han utilizado con éxito para generar polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción; sin embargo, se prefiere el uso de *Pvu*II ya que tiene un sitio único de restricción en la secuencia IS6110. Una gran ventaja de esta técnica es la alta reproducibilidad de los resultados entre diferentes laboratorios (van Embden *et al*, 1993).



**Figura 1.** Mapa físico del elemento de inserción IS6110 de 1.35 kb en *M. tuberculosis*. (Modificado de van Embden *et al.*, 1993).

Otra técnica estandarizada a nivel mundial es el *spoligotyping* o “espoligotipificación”, la cual detecta la presencia o ausencia de varios

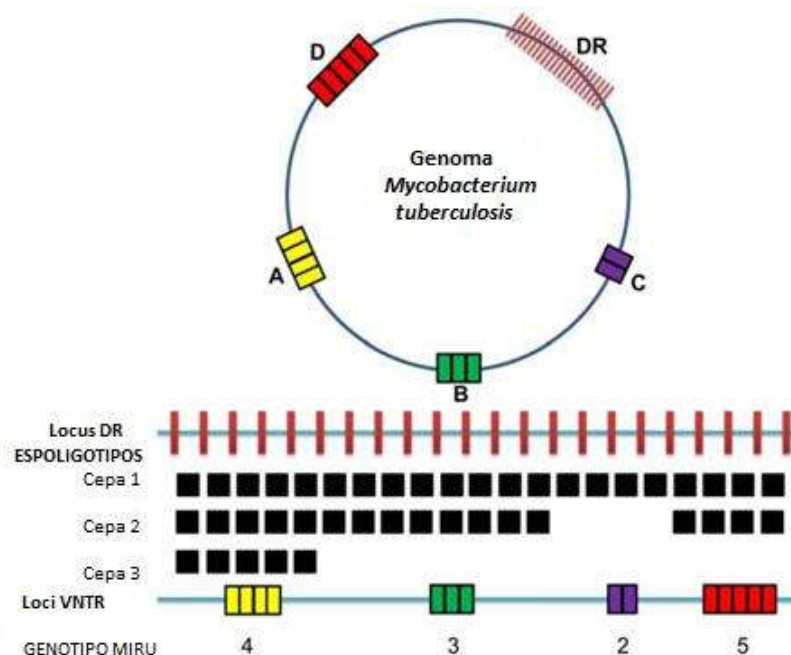
espaciadores que se encuentran entre secuencias repetidas en una zona de repetidos directos del cromosoma micobacteriano (Fig. 2). Este locus contiene múltiples repetidos directos de 36 pb altamente conservados, interespaciados por secuencias no repetitivas de 34 a 41 pb de longitud, denominadas espaciadores (Kamberbeek *et al.*, 1997).



**Figura 2. Estructura de repetidos directos (DR) en el genoma micobacteriano..** Principio de la amplificación *in vitro* de la región de repetidos directos mediante PCR y patrones de hibridación o espigotipos. BCG: Bacillus Calmette-Guérin; H37Rv: cepa de referencia de *M. tuberculosis*; X: familia X de *M. tuberculosis*. (Modificado de Comas *et al.*, 2009).

Mientras que el análisis mediante RFLPs tiene un alto poder de resolución y es útil en la definición de cadenas de transmisión, el *spoligotyping* tiene un poder de resolución más limitado, pero permite establecer relaciones entre genotipos en una escala temporal más amplia y asignarlos a familias de cepas. Combinando ambas técnicas se obtiene una caracterización más completa de las cepas causantes de brotes de TB en una población, además, los resultados generados son comparables con los datos de cualquier región del mundo. La técnica de RAPDs (polimorfismos de amplificación de ADN al azar) también se ha utilizado para caracterizar brotes de *M. tuberculosis* y pseudo-epidemias de otras especies

de micobacterias (Linton *et al.*, 1994; Harn *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2002; Esteban *et al.*, 2006; Vázquez-Marrufo *et al.*, 2008). Aunque es una técnica rápida y económica, no ha tenido una aceptación generalizada debido a las dudas sobre su reproducibilidad entre laboratorios (Tazi *et al.*, 2002). La genotipificación por análisis de minisatélites, denominados MIRU-VNTRs en *M. tuberculosis* (Fig. 3) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) es cada vez más utilizada en sustitución del análisis RFLP, el cual tiene varias complicaciones técnicas, además de ser costoso (Supply *et al.*, 2001; Gutacker *et al.*, 2002).



**Figura 3. Genotipificación de MTBC basada en VNTR.** (Modificado de Comas *et al.*, 2009).

Estudios recientes en Taipei (Dou *et al.*, 2008), Trinidad y Tobago (Baboolal *et al.*, 2009), Burkina Faso (Godreuil *et al.*, 2007), India (Stavrum *et al.*, 2008), España (López-Calleja *et al.*, 2009) y Brasil (Lazzarini *et al.*, 2007) han demostrado la utilidad de éstas técnicas en la genotipificación de cepas locales. Actualmente, las bases de datos de genotipos de *M. tuberculosis* a nivel mundial contienen datos generados mediante *spoligotyping* y MIRU-VNTRs

(<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/> y <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>).

En resumen, las técnicas moleculares desarrolladas a la fecha difieren en su poder de resolución y se utilizan para evaluar jerarquías taxonómicas distintas. Algunas permiten identificar miembros del MTBC (Huard *et al.*, 2003), discernir entre micobacterias del MTBC y micobacterias atípicas (Telenti *et al.*, 1993; Takewaki *et al.*, 1994; Roth *et al.*, 1998) y establecer subfamilias y relaciones epidemiológicas o evolutivas entre ellas (van Soolingen, 2001; Mathema *et al.*, 2006). Respecto a las ventajas de incluir técnicas moleculares en los estudios epidemiológicos de TB, diversos trabajos han demostrado que el seguimiento tradicional, a través de investigación de contactos, cubre un bajo porcentaje, de entre 10 y 30% de los casos relacionados que son identificados por técnicas moleculares (Mathema *et al.*, 2006). El uso complementario de estas técnicas ha permitido el establecimiento de grupos de riesgo o áreas en las cuales existe transmisión activa, casos pertenecientes a un brote en una región en particular, o aquellos asociados a movimientos migratorios.

Con el surgimiento de la epidemiología molecular y gracias a la genotipificación de aislados de *M. tuberculosis* alrededor del mundo, fue posible identificar grandes grupos de aislados con características particulares; estos grupos van en orden decreciente, linaje, familia, genotipo, definiendo el linaje como la clasificación de *M. tuberculosis* basado en largas secuencias de polimorfismos y SNP (LSP/SNP), la familia se refiere a las clasificaciones basadas en *spoligo*typing, y el genotipo se refiere a los patrones de MIRU-VNTR (Kato-Maeda *et al.*, 2011). Se tiene claro que los distintos genotipos se encuentran asociados a ciertas regiones del mundo en particular (Gagneux y Small, 2007; Reed *et al.*, 2009). Actualmente se manejan 6 grandes linajes de *M. tuberculosis* y la información recopilada indica que cada linaje y sus genotipos pueden poseer particularidades fenotípicas que influyen en su virulencia y transmisibilidad (Tsenova *et al.*, 2005; Nicol y Wilkinson, 2008), lo que resalta la importancia de la combinación de la epidemiología clásica y molecular en los seguimientos de brotes tanto a nivel local como mundial.

#### 1.4 Vía de transmisión y mecanismo de invasión

La TB es transmitida de humano a humano principalmente por vía aérea. La fuente de infección es aquel paciente con TB pulmonar que expectora bacilos por medio de pequeñas gotas infecciosas (gotas de Flügge) mientras tose, habla, canta, escupe o estornuda. Estas partículas miden de 0.5 a 10  $\mu\text{m}$  y pueden permanecer hasta 30 minutos en el aire en suspensión, lo cual les permite ingresar hasta la vía aérea y sacos alveolares de un nuevo hospedero (American Thoracic Society, 2000), donde tienen contacto con los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas del pulmón, a los cuales pueden infectar originando la producción y secreción de péptidos antimicrobianos, citocinas y quimiocinas. El balance de mediadores lipídicos, como la prostaglandina E2 (proapoptótica) o lipoxina (LX) A4 (pronecrótica), dentro de los macrófagos infectados juega un papel muy importante en la determinación de las vías que conducen a la inducción de apoptosis o necrosis. Las células apoptóticas infectadas pueden ser englobadas por las células dendríticas o endocitadas por macrófagos pulmonares no infectados. Las células dendríticas infectadas por *M. tuberculosis* migran a los ganglios linfáticos locales a los 8-12 días después de la infección, bajo la influencia de la IL-12 y de las quimiocinas CCL19 y CCL21, para impulsar la diferenciación de células T a su forma activa Th1. Las células protectoras de antígeno específicas Th1 migran de regreso a los pulmones de manera dependiente de quimiocinas después de 14-17 días de la infección o exposición inicial y producen INF- $\gamma$ , conduciendo a la activación del macrófago, la producción de citocinas, la inducción de factores microbicidas, incluyendo la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), y el control bacteriano (O'Garra *et al.*, 2013).

Se estima que un paciente con TB no diagnosticado y no tratado infecta de 10 a 20 personas por año. Aproximadamente el 10% de las personas infectadas con el bacilo de la TB desarrollará la enfermedad activa durante su vida, con un alto riesgo en los dos primeros años después de la infección. Cerca del 55% de estos pacientes con enfermedad activa tienen una forma pulmonar contagiosa (American Thoracic Society, 2000). Las probabilidades de entrar en contacto con



una persona con TB, la duración e intimidad de ese contacto, el grado de contagiosidad y el ambiente que se comparte con la persona enferma son, todos ellos, factores importantes para la transmisión (Raviglione y O'Brien, 2008).

### 1.5 Patogenicidad y virulencia

Definir con precisión estos términos ha sido tema de debate a través de los años y, sin duda alguna, el conocimiento más profundo de los microorganismos ha ayudado a aclarar tales conceptos. En este trabajo se tomarán las definiciones establecidas por Casadevall y Pirofski (1999), quienes revisaron de manera exhaustiva y sistemática estos términos; definiendo patogenicidad como la capacidad de un microbio para causar daño en el hospedero, y virulencia como la capacidad relativa de un microbio para causar daño en el hospedero, dicho de otra manera, el grado de daño que el microorganismo pueda llegar a causar.

Los miembros del MTBC han desarrollado estrategias para evadir o modular la respuesta inmune del hospedero a su favor. En los últimos años se han dado avances considerables en el entendimiento molecular de la patogenicidad, virulencia y persistencia de estas micobacterias. Una contribución significativa ha sido la identificación de genes esenciales de virulencia micobacterianos, permitiendo entender los mecanismos que el bacilo emplea para sobrevivir y persistir en el hospedero (Forrellad *et al.*, 2013). La mayoría de estos genes de virulencia codifican para enzimas relacionadas con vías de síntesis de lípidos, proteínas de la superficie celular, así como reguladores y proteínas de los sistemas de transducción de señales. Otro grupo relevante de genes es el involucrado en la supervivencia micobacteriana dentro del microambiente hostil en los macrófagos del hospedero (Forrellad *et al.*, 2013).

Es notable el hecho de que las micobacterias carezcan de los factores de virulencia clásicos, como las toxinas, que son típicos en otros patógenos bacterianos, y el hecho de que muchos de los genes de virulencia de las especies del MTBC también se conservan en micobacterias no patógenas. Esto sugiere que las especies patógenas han adaptado sus genomas de un estilo de vida libre a un

ambiente intracelular con la mínima adquisición de genes de virulencia exclusivos (Forrellad *et al.*, 2013).

El MTBC presenta una gran cantidad de factores de virulencia, teniendo cada uno participación en procesos de infección, desarrollo de la enfermedad o persistencia (Forrellad *et al.*, 2013). Algunos de estos factores son:

- Metabolismo de ácidos grasos y lípidos: síntesis de ácidos micólicos, síntesis de lípidos complejos (dimicocerosato de tiocerol, sulfolípidos), catabolismo del colesterol.
- Proteínas de la envoltura celular: proteínas de la pared celular, lipoproteínas, sistemas de secreción.
- Proteínas inhibidoras de agentes antimicrobianos: respuesta a estrés oxidativo y nitrosativo, secuestro del fagosoma, inhibición de la apoptosis.
- Protein-cinasas.
- Proteasas y metalo-proteasas.
- Proteínas transportadoras de metales (importadoras y exportadoras).
- Reguladores de expresión de genes: sistema de dos componentes, factores sigma, otros reguladores transcripcionales.
- Proteínas de función desconocida: familias PE/PPE.

La presencia de cada uno de estos factores de virulencia va a determinar el éxito de la micobacteria sobre el hospedero.

Un requisito para clasificar a un gen como factor de virulencia es que su ausencia atenúe la virulencia del microorganismo en un modelo *in vivo*. Sin embargo, este criterio comprende a una gran cantidad de genes, incluyendo a los genes *housekeeping* o de mantenimiento, que tienen función en la supervivencia de la bacteria dentro del hospedero. Estos genes están involucrados en el metabolismo celular básico, por lo que no se consideran generalmente factores de virulencia (Forrellad *et al.*, 2013).

En relación a los factores anteriormente listados, existen estudios en los que han inactivado genes o proteínas del genoma micobacteriano y que ha llevado a una pérdida medible de la patogenicidad o virulencia en modelos *in vivo*, por lo que se han establecido como verdaderos factores de virulencia de la micobacteria (Bhatt *et al.*, 2007; Berthet *et al.*, 1998; Ferrer *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008).

## 1.6 Familia de genes *pe/ppe*

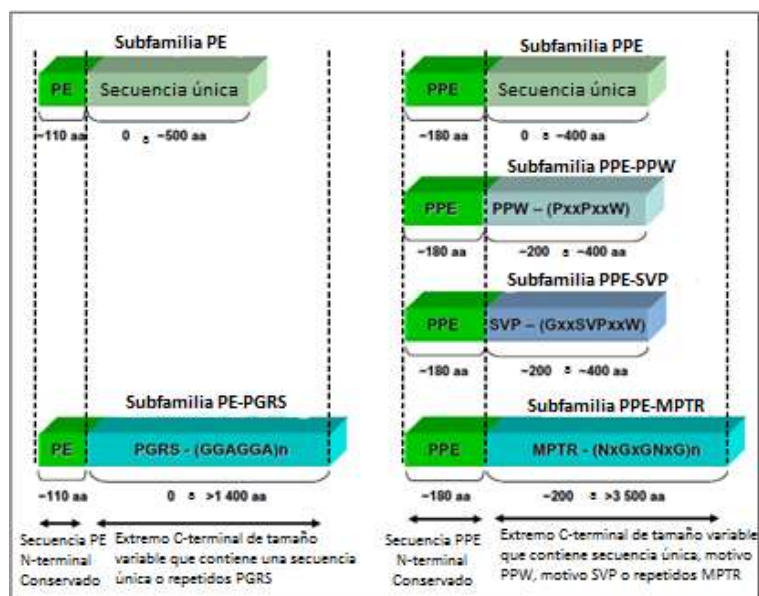
Uno de los aportes de mayor relevancia tras la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998) fue el descubrimiento de las familias de genes *pe/ppe*, los cuales representan uno de los aspectos más intrigantes de esta bacteria. A pesar de que han transcurrido 17 años de este hallazgo, la función de dichos genes y las proteínas codificadas sigue sin ser totalmente conocida, aunque ya se cuenta con evidencia de que algunos miembros de estas familias de genes están implicados en la virulencia de las micobacterias patógenas (Fishbein *et al.*, 2015).

En un principio se planteó que estas dos familias multigénicas representaban cerca del 10% del potencial de codificación cromosómica (Cole *et al.*, 1998); sin embargo, en una reexaminación de la base de datos Tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>) se observó que este valor se sobreestimó ligeramente, siendo un total del 7% del potencial de codificación el que representan en realidad los genes *pe/ppe* (Lew *et al.*, 2011). Es notable la presencia de dichos genes en los miembros de lento crecimiento del género *Mycobacterium* (Fishbein *et al.*, 2015).

Estos genes codifican para dos familias de proteínas, denominadas PE y PPE, que se caracterizan por tener dominios N-terminales conservados de alrededor de 110 y 180 aminoácidos, respectivamente (Cole *et al.*, 1998). El nombre PE se deriva del motivo distintivo Prolina (P)-Glutámico (E), y el de PPE representa el motivo Prolina (P)-Prolina (P)-Glutámico (E) usualmente presente dentro de los 10 primeros aminoácidos de estas proteínas. De las dos familias, la PE es la más grande (Cascioferro *et al.*, 2007) con 99 miembros, mientras que la

PPE tiene 69 miembros (McEvoy *et al.*, 2012), están presentes en todas las micobacterias, aunque las especies no patógenas tienen una cantidad menor de genes *pe/ppe* y proteínas PE/PPE (Fishbein *et al.*, 2015). En la especie que se han realizado una mayor cantidad de estudios relacionados a estas familias de genes y proteínas es en *M. tuberculosis*, sin dejar de lado los estudios en *M. marinum* y *M. avium*.

La familia *pe* puede dividirse en genes *pe\_pgrs* (secuencias polimórficas ricas en GC) y genes *pe* (sin características distintivas). A su vez, la familia *ppe* se divide en genes *ppe\_mptr* (repetidos en tándem polimórficos principales), genes *ppe\_svp* (con un motivo GxxSVPxxW), genes *ppe\_ppw* (con un motivo PxxPxxW) y genes *ppe* sin características distintivas (Fig. 4). Esta diversidad de subclases indica que los miembros de las familias podrían jugar papeles funcionalmente distintos (Fishbein *et al.*, 2015).



**Figura 4. Estructura de los genes *pe/ppe*.** Representación de la estructura de los miembros de las familias de genes *pe/ppe*, se muestra el dominio N-terminal conservado (verde), las posiciones de los motivos y las diferencias entre las subfamilias encontradas en ambos genes (gris y azul). (Tomado de Gey van Pittius *et al.*, 2006).

### 1.6.1 Evolución y variación de las familias *pe/ppe*

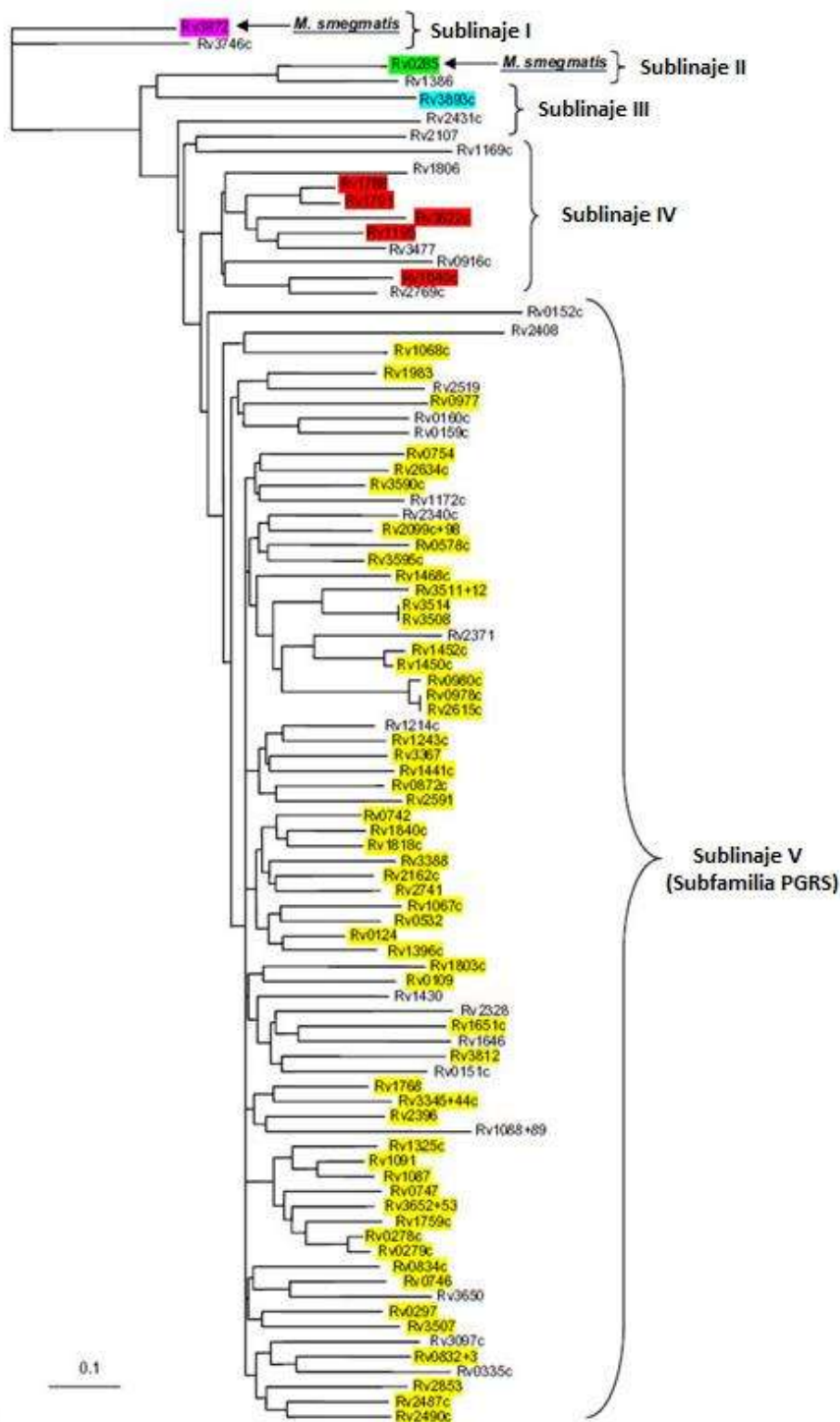
Estas familias de genes no han sido todavía identificadas en ninguna especie no micobacteriana, ni en aquellas bacterias cercanamente relacionadas, por ejemplo *Nocardia farcinica* (Mukhopadhyay y Balaji, 2011). Las proteínas PE/PPE están presentes tanto en micobacterias patógenas como en saprófitas, y parecen ser más importantes para el metabolismo micobacteriano de lo que se pensaba (Gey van Pittius *et al.*, 2006; Akhter *et al.*, 2012).

Se han realizado análisis filogenéticos de estas familias de genes y sus proteínas (Gey van Pittius *et al.*, 2006), para lograr comprender de donde provienen y cómo influye su variación en la función que desempeñan. Las micobacterias no patógenas tienden a tener menos genes *pe/ppe*, mientras que las especies patógenas tienen una expansión general de estos genes, especialmente dentro del sublinaje V de ambas familias de genes (Fig. 5 y 6) (Fishbein *et al.*, 2015). El MTBC, así como las especies *M. leprae*, *M. marinum*, *M. ulcerans* y *M. avium*, poseen la mayor cantidad de genes *pe/ppe* (McGuire *et al.*, 2012).

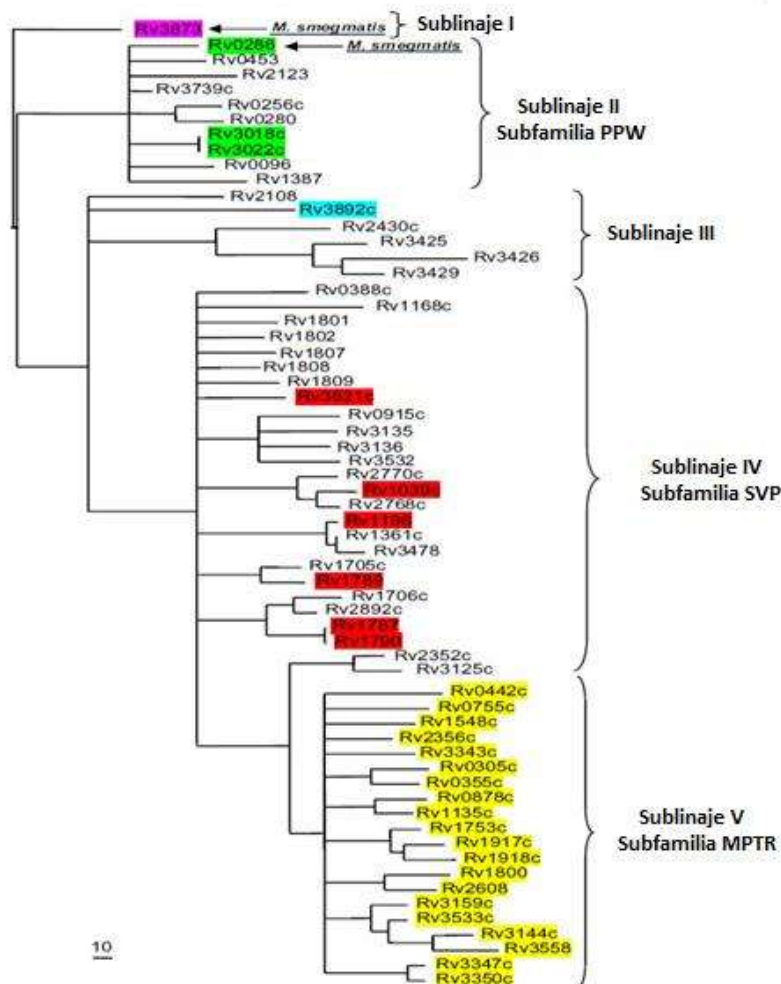
Las subfamilias polimórficas *pe\_pgrs* y *ppe\_mptr* están presentes en todos los miembros del MTBC, y solamente algunas especies de micobacterias de lento crecimiento presentan pocos integrantes de estas dos subfamilias (Gey van Pittius *et al.*, 2006).

Aunque el origen de las familias *pe/ppe* es todavía desconocido, los genes *pe/ppe* ancestrales se han asociado con el sistema de secreción micobacteriano tipo VII o ESX, denominado sistema antigénico de secreción temprana blanco 6 (Abdallah *et al.*, 2007). El genoma de *M. tuberculosis* posee cinco grupos de genes *esx* (Gey van Pittius *et al.*, 2001), algunos de ellos están implicados en la patogénesis (Simeone *et al.*, 2009). Se ha propuesto que la expansión de las familias de genes *pe/ppe* inició por una serie de duplicaciones del grupo de genes *esx* que comenzó con la duplicación de una región *esx* ancestral (Gey van Pittius *et al.*, 2001; Akhter *et al.*, 2012). Las reconstrucciones filogenéticas muestran que los grupos de genes *esx* se expandieron a través de múltiples duplicaciones de

genes, acompañadas por una expansión de la familia de genes *pe/ppe*. El sublinaje I constituye los genes *pe/ppe* insertados en y/o asociados con el grupo de genes *esx-1*. Se tiene la hipótesis de una relación similar para el sublinaje II/*esx-3*, sublinaje III/*esx-2* y sublinaje IV/*esx-5*. Este análisis filogenético sugiere una lenta expansión de los genes *pe/ppe* hasta el surgimiento del sublinaje más expansivo y reciente, el sublinaje V (Fig. 5 y 6) (Fishbein *et al.*, 2015).



**Figura 5. Reconstrucción filogenética de relaciones evolutivas entre los miembros de la familia de proteínas PE.** Los genes marcados en morado, verde y azul, están presentes en las regiones 1, 2 y 3 del grupo de genes ESAT-6 (*esx*), respectivamente. Los genes marcados en rojo están presentes en la región 5 del grupo de genes ESAT-6 (*esx*) y los genes marcados en amarillo son miembros de la subfamilia PGRS. (Modificado de van Pittius *et al.*, 2006).



**Figura 6. Reconstrucción filogenética de relaciones evolutivas entre los miembros de la familia de proteínas PPE.** En colores se muestra la región del grupo de genes ESAT-6 (*esx*) en la que se encuentra cada grupo de genes: los genes marcados en morado están presentes en la región 1, los marcados en verde en la región 3, los marcados en azul en la región 2, los marcados en rojo en la región 5 y los marcados en amarillo son miembros de la subfamilia MPTR (Modificado de van Pittius *et al.*, 2006).

Varios autores han especulado que las proteínas PE/PPE representan una fuente de variación antigénica, lo cual se sigue investigando. Sin embargo, determinados miembros de las familias presentan una extensa variación genética, con múltiples mecanismos que contribuyen a la alteración de su secuencia codificante (Fishbein *et al.*, 2015). La recombinación homóloga espontánea ocurre de manera intergénica principalmente en los genes *pe\_pgrs* que comparten grandes regiones homólogas (Karboul *et al.*, 2008); esto puede resultar en



deleciones, codones de inicio alternativos, inserciones, polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) e inserciones de elementos transponibles que también pueden contribuir a la variación genética (Gey van Pittius *et al.*, 2006; McEvoy *et al.*, 2009a; 2012).

Las variaciones genéticas son muy frecuentes entre los miembros del sublinaje V, incluyendo los genes *pe\_pgrs33*, *pe\_pgrs16*, *pe\_pgrs26* y *ppe\_mptr34*, aunque la variación también ha sido reportada en miembros de otros sublinajes, por ejemplo *ppe38* del sublinaje IV (Sampson *et al.*, 2001; Banu *et al.*, 2002; Talarico *et al.*, 2005; 2008; McEvoy *et al.*, 2009b; Copin *et al.*, 2014).

Es cada vez más evidente que la inserción de elementos desempeña un papel en la presencia y arreglo de los genes *pe/ppe* en el genoma micobacteriano. En particular, los elementos IS6110 conducen a la variación genética que podría contribuir a cambios fenotípicos, ya que frecuentemente se insertan en los genes *pe/ppe* y las regiones que flanquean (Sampson *et al.*, 1999; McEvoy *et al.*, 2007).

Un análisis de secuenciación de los sitios de inserción de IS6110 realizado en 519 aislados clínicos demostró que la secuencia IS6110 frecuentemente interrumpe los genes *pe/ppe* (Reyes *et al.*, 2012). La mayoría de las inserciones reportadas de IS6110 fueron en genes *ppe*, predominando en los sublinajes IV y V. La presencia de estos elementos de inserción, cerca o dentro de los genes *pe/ppe*, puede influir en los niveles de expresión de los genes, algo que ha sido reportado para otros genes de *M. tuberculosis* (Safi *et al.*, 2004).

El impacto de la variación genética sobre la estructura y, consecuentemente, sobre la función de las proteínas PE/PPE, sigue siendo ampliamente desconocido. La limitada información de la estructura confirmada experimentalmente de estas proteínas limita la capacidad de predecir las consecuencias funcionales de la variabilidad de las proteínas PE/PPE (Fishbein *et al.*, 2015).

### 1.6.2 Regulación de la transcripción de genes *pe/ppe*

La regulación de la familia de genes *pe/ppe* está controlada por un grupo heterogéneo de reguladores transcripcionales (Voskuil *et al.*, 2004). Los factores sigma micobacterianos facilitan la adaptación fisiológica a los estímulos ambientales y la virulencia de las micobacterias patógenas (Sachdeva *et al.*, 2010); múltiples factores sigma regulan la expresión de genes *pe/ppe*. Se ha visto que SigF regula genes de todos los sublinajes de la familia de genes *pe*, así como genes *ppe* de los sublinajes I-IV. SigF está presente tanto en micobacterias saprófitas como en patógenas, y está unido a la adaptación bacteriana al ambiente de estrés por pH, estrés oxidativo y choque de calor (Williams *et al.*, 2007). SigB es otro factor sigma implicado en el control de la respuesta a estrés de la pared celular micobacteriana. SigB regula la expresión de muchos genes *pe\_pgrs* y algunos genes *ppe*, los cuales se ha sugerido que están involucrados en la interacción hospedero-patógeno en la pared celular (Lee *et al.*, 2008). SigD también regula muchos genes *pe\_pgrs*, aunque mayoritariamente sólo regula genes *ppe*, con la excepción de *ppe19*. SigD responde al ambiente pulmonar humano, modulando la expresión en respuesta a inanición e hipoxia, y suprime la expresión de múltiples proteínas PE\_PGRS (Calamita *et al.*, 2005).

SigB y SigD parecen controlar la expresión de la mayoría de los miembros del sublinaje de reciente evolución de los genes *pe/ppe* encontrados solamente en micobacterias patógenas, y controlan la expresión de genes esenciales de la respuesta a estrés y patogenicidad de la bacteria *in vivo* (Calamita *et al.*, 2005). Esto indica que las proteínas PE/PPE bajo su control también podrían jugar un papel en la virulencia de la micobacteria (Fishbein *et al.*, 2015).

Algunos otros reguladores identificados hasta el momento son los sistemas reguladores de dos componentes (TCSs, por sus siglas en inglés), los cuales son sensores de células bacterianas, y que en *M. tuberculosis* contribuyen a la adaptación de su estilo de vida intracelular. Varios TCSs afectan la expresión de genes *pe/ppe*; como *phoPR* que controla la expresión de al menos trece de estos genes (Bretl *et al.*, 2011; Walters *et al.*, 2006).

### 1.6.3 Localización y función de proteínas PE/PPE

Existe evidencia experimental que prueba que gran parte de las proteínas PE/PPE se encuentran en la superficie celular (Brennan *et al.*, 2001). Se demostró también que el dominio PE del extremo N-terminal de la bien caracterizada proteína PE\_PGSR33 es necesario para la localización de la proteína en la pared celular de *M. marinum* y *M. tuberculosis* (Cascioferro *et al.*, 2007). Por otra parte, varias proteínas PE/PPE son secretadas por el sistema de secreción tipo VII (ESX) (Abdallah *et al.*, 2007).

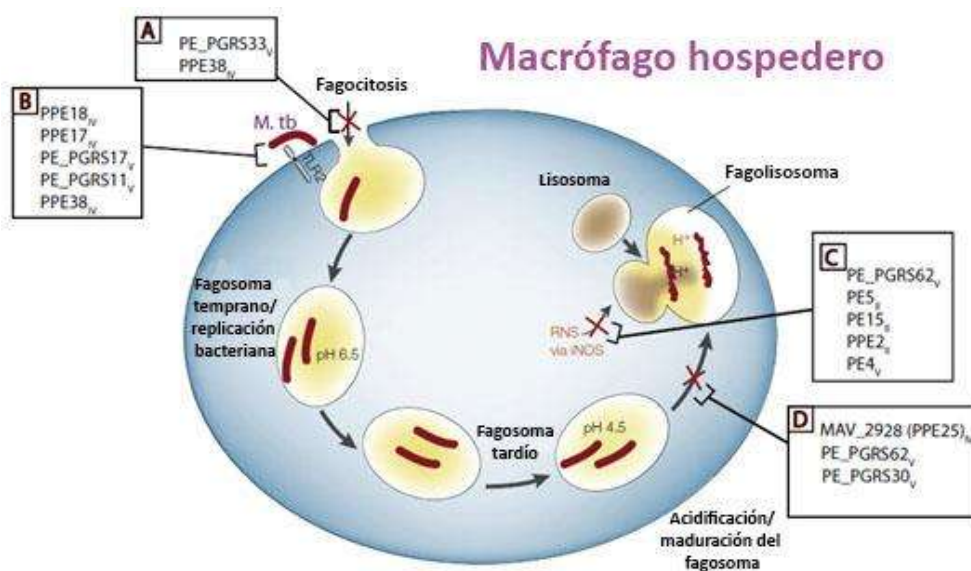
El alto contenido de genes *pe/ppe* del MTBC sugiere un importante papel biológico para sus respectivas proteínas (McEvoy *et al.*, 2012). Un gran número de funciones han sido atribuidas a los genes *pe/ppe*, todas dirigidas hacia la interacción del bacilo con el hospedero (Namouchiet *et al.*, 2013). Con base en los estudios publicados al respecto, es evidente que varios miembros de estas familias de genes y proteínas tienen la capacidad de influir en la respuesta inmune del hospedero (Fishbein *et al.*, 2015). Sin embargo, la función de las proteínas PE/PPE sigue siendo en gran parte desconocida y la hipótesis que se ha planteado los últimos años aún espera por un mayor soporte experimental (Cascioferro *et al.*, 2007).

Dada la asociación de una gran cantidad de proteínas PE/PPE con la pared celular de la micobacteria, algunas proteínas han sido implicadas en la integridad estructural y la morfología de las colonias de *M. tuberculosis* (Fishbein *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha observado que la delección del gen *ppe38* en el sublinaje IV de *M. marinum*, compromete la integridad estructural por la alteración de la superficie celular y evita la formación del biofilm (Dong *et al.*, 2012). La ruptura de tres genes *ppe* del sublinaje V a través de mutagénesis mediante transposones, incrementó significativamente la resistencia a ampicilina, implicando a estas proteínas en el mantenimiento de la integridad de la pared celular de *M. tuberculosis* (Danilchanka *et al.*, 2008). La exposición en la superficie o la secreción al medio extracelular posiciona a las proteínas PE/PPE para interactuar directamente con blancos del hospedero (Fishbein *et al.*, 2015). Existe evidencia

de que ciertos miembros de la familia de estas proteínas pueden interactuar con moléculas del hospedero, como los receptores tipo Toll 2 (TLR2, por sus siglas en inglés) (Basu *et al.*, 2007; Nair *et al.*, 2009; Zumbo *et al.*, 2013).

Investigaciones recientes han sugerido una unión intrigante entre las proteínas PE/PPE y el metabolismo de lípidos de las micobacterias. Un estudio reciente mostró que una mutante de *M. marinum* deficiente en la síntesis de lipooligosacáridos, presenta una disminución en la secreción de proteínas PE\_PGRS (van den Woude *et al.*, 2012). Otro trabajo mostró que en estado de inanición continua, *M. tuberculosis* aumenta la regulación de la expresión de los genes de lipasas, incluyendo dos miembros de la familia PE, llamados LipY (PE\_PGRS63) y LipX (PE11) (Deb *et al.*, 2006). LipY fue la primer proteína PE/PPE que se asoció con propiedades enzimáticas, por lo que fue denominada triacilglicérido lipasa (Fishbein *et al.*, 2015).

Antes de la aparición de la respuesta inmune adaptativa, la infección por *M. tuberculosis* es establecida mediante su entrada al macrófago del hospedero (Kaufmann, 2001; Thi *et al.*, 2012). Varias proteínas PE/PPE han sido ligadas a la inhibición y/o activación de la actividad del macrófago (Fig. 7). El sistema de secreción ESX-5 y las proteínas PE/PPE asociadas son parcialmente responsables de la virulencia de *M. tuberculosis* y contribuyen con su capacidad para crecer dentro del macrófago (Bottai *et al.*, 2012). Por ejemplo, PE\_PGRS62 (sublinaje V) inhibe la maduración del fagosoma y ciertos mecanismos bactericidas *in vivo* (Huang *et al.*, 2012). Además, PE\_PGRS62, PE5, PPE15 y PPE2 inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno; mientras que PE5, PE15 y PE4 ayudan a incrementar la supervivencia de la micobacteria dentro del macrófago (Tiwari *et al.*, 2012). Por último, PE\_PGRS30 inhibe la fusión del fagolisosoma, asociándose también a la virulencia micobacteriana (Iantomasi *et al.*, 2012). Se ha visto que la interrupción de *ppe38* en *M. marinum* reduce la fagocitosis del macrófago y la virulencia en peces zebra (Dong *et al.*, 2012), y hay evidencia de los efectos inmunomoduladores de las proteínas PE/PPE sobre el ambiente del macrófago (Mukhopadhyay y Balaji, 2011).



**Figura 7. Influencia de las proteínas PE/PPE en el procesamiento del macrófago por *M. tuberculosis*.** Representación de la infección de *M. tuberculosis* al macrófago hospedero y los puntos en los cuales las proteínas PE/PPE afectan este proceso. A) Proteínas que presentan inhibición de la fagocitosis del bacilo. B) Proteínas que se unen a TLR2. C) Proteínas que detienen los mecanismos de estrés nitrosativo mediante la inhibición de la Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS) para la producción de Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS). D) Proteínas que inhiben parcialmente la maduración del fagosoma, ya sea la acidificación o la fusión del fagolisosoma (Modificado de Fishbein *et al.*, 2015).

Un análisis *in vivo* de la expresión de 10 genes *ppe\_mptr* de cepas pertenecientes al sublinaje V en tejido de pulmón y bazo de ratones infectados con *M. tuberculosis*, reveló que estos genes aumentan en gran medida su transcripción cuando son expuestos a isoniazida y etambutol. El blanco de estos fármacos son las vías enzimáticas que llevan a la biosíntesis de la pared celular, proporcionando evidencia indirecta del papel de las proteínas PPE\_MPTR en dicha estructura celular y la posible interacción entre el patógeno y el hospedero (Soldini *et al.*, 2011).

#### 1.6.4 Polimorfismos en los genes *pe/ppe*

En organismos patógenos generalmente se encuentra que las proteínas directamente expuestas a la vigilancia del sistema inmune del hospedero muestran niveles más altos de polimorfismos que las que se encuentran en las

proteínas *housekeeping* (McEvoy *et al.*, 2012). Como se mencionó anteriormente, actualmente existe evidencia robusta de que muchas proteínas PE/PPE se encuentran en la superficie celular (Sampson *et al.*, 2001; Banu *et al.*, 2002; Delogu *et al.*, 2004; Cascioferro *et al.*, 2007; Brennan *et al.*, 2001) y que otras probablemente son secretadas (Abdallah *et al.*, 2006). Esto, junto con su inmunogenicidad y la naturaleza polimórfica bien establecida de los repetidos en el extremo C-terminal, ha conducido a plantear su implicación en la variación antigénica y la evasión de la respuesta inmune (McEvoy *et al.*, 2012). De hecho, existen estudios que han revelado diversos grados de polimorfismos en la secuencia de *pe/ppe* entre aislados clínicos de *M. tuberculosis*. En ese sentido, Talarico y colaboradores (2005, 2007, 2008), han documentado el alto grado de polimorfismos en los genes *pe\_pgrs33*, *pe\_pgrs16* y *pe\_pgrs26*.

La mayor parte de los estudios se han llevado a cabo en *pe\_pgrs33*, el cual ha sido usado como modelo de esta subfamilia (Cascioferro *et al.*, 2007). Se ha demostrado que esta proteína está implicada en la interacción del bacilo con los macrófagos (Brennan *et al.*, 2001), el dominio PE de PE\_PGRS33 es necesario para su localización en la pared celular, y el dominio PGRS afecta la forma y la morfología de la colonia bacteriana (Mukhopadhyay y Balaji, 2011). Basu y colaboradores en (2007) demostraron que *pe\_pgrs33* provoca apoptosis en los macrófagos mediante interacción directa con TLR2 e induce la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés). En el mismo estudio se comprobó también que la interacción es mediada por el dominio PGRS, que esta propiedad es específica para PE\_PGRS33, y que polimorfismos en el dominio PGRS afectan la capacidad de la proteína para inducir la secreción de TNF- $\alpha$  (Basu *et al.*, 2007).

Recientemente, Kohli y colaboradores (2012) realizaron un estudio comparativo entre la familia de genes *pe/ppe* de las cepas H37Rv y H37Ra que presentan diferencias genéticas en el contexto de virulencia, dichas cepas están bien caracterizadas y provienen de la misma cepa antecesora *M. tuberculosis* H37. Para una interpretación más significativa también investigaron familias de

genes que no pertenecen a *pe/ppe* y que se conoce están asociados con patogénesis, como son las familia *mce*, MmpL, factores Sigma y TCSs, así como los cambios fisicoquímicos que se presentaron en las proteínas codificadas. Encontraron que en la cepa H37Ra están ausentes las proteínas PE10, PE\_PGRS49, PE\_PGRS56, PE\_PGRS60, a pesar de que las secuencias de nucleótidos estaban presentes en el genoma. Entre la familia de proteínas PE\_PGRS encontraron secuencias de aminoácidos completamente iguales de PE\_PGRS14, PE\_PGRS24, PE\_PGRS30, PE\_PGRS33, PE\_PGRS34, PE\_PGRS35 y PE\_PGRS45 en ambas cepas. Las diferencias en las secuencias de aminoácidos también fueron evidentes en las proteínas wag22, PPE18, PE24, PPE5, PPE9, PPE13, PE\_PGRS22, PE\_PGRS25, PE\_PGRS36, PE\_PGRS40 y PE\_PGRS47. En cuanto a las familias de genes que no pertenecen a *pe/ppe*, las diferencias fueron mínimas, encontrándose sólo un miembro de cada familia diferente en la cepa H37Ra por inserción o SNP, atribuyendo dichos cambios a la atenuación de esta cepa. El análisis genómico comparativo identificó varios cambios claves en la secuencia de nucleótidos entre las proteínas PE/PPE homólogas de H37Rv y H37Ra, estos cambios incluyeron principalmente inserciones y deleciones que afectaban los marcos de lectura abiertos de los genes; además, dichas alteraciones resultaron en cambios físico-químicos de las proteínas codificadas, como alteración de la estructura globular del extremo N-terminal, pérdida o ganancia de sitios de fosforilación, codones de paro que provocan el acortamiento del extremo C-terminal, que sean hidrófobas o hidrofílicas. Así, dicho trabajo establece una correlación de diversos cambios en la secuencia de nucleótidos con la función *in vivo*, incluyendo la virulencia y patogénesis, por lo que los investigadores señalan que son necesarios más estudios bioquímicos y funcionales para establecer el papel que los cambios detectados juegan en la atenuación de H37Ra (Kohli *et al.*, 2012).

Se han detectado polimorfismos en algunos genes y proteínas de la familia *ppe* asociados a determinados genotipos dentro de especies del género *Mycobacterium*. Por ejemplo, en *M. avium* subsp. *paratuberculosis* los

polimorfismos dentro del locus MAP1506 permitió diferenciar entre cepas de los genotipos I (específico de ovinos), II (específico de bovinos) y III (cepas intermedias) (Griffiths *et al.*, 2008). También se ha documentado un SNP en la posición 581 en el gen *ppe44* que es específico de cepas de la familia Beijing (Rindi *et al.*, 2007). Dicho polimorfismo puede ser empleado como herramienta epidemiológica para distinguir a las cepas Beijing en ensayos simples de PCR, algo que todavía no ha sido explorado. Esto mismo puede ser aplicado para otros genotipos de *M. tuberculosis*. No obstante, a la fecha no existen estudios en los que se busque asociar a los polimorfismos en los genes de las familias de proteínas PE/PPE con genotipos específicos. Por otro lado, también se han reportado polimorfismos en genes que codifican para la familia de proteínas PE relacionados con características clínicas de las cepas. Así, Wang y colaboradores (2011) reportaron que ciertos polimorfismos del gen que codifica para la proteína PE\_PGRS33 están relacionados con cepas clínicas capaces de causar tuberculosis meníngea pediátrica, una forma particularmente agresiva de la enfermedad. De manera interesante, dicho polimorfismo presenta la misma frecuencia entre cepas de la familia Beijing y cepas dentro de otras familias (Wang *et al.*, 2011). Nuevamente, la relación entre polimorfismos de los genes *pe* y otras familias de *M. tuberculosis* se encuentra poco explorada.

### 1.7 Antecedentes

En el laboratorio de Genética Molecular Microbiana, se tiene una colección de 120 cepas de micobacterias, recolectadas a partir del año 2009, con datos epidemiológicos de los pacientes, que incluyen: ubicación de la enfermedad, edad, género, comorbilidad y jurisdicción de procedencia. De estos aislados, 59 se han caracterizado mediante al menos una de las siguiente técnicas de genotipificación: análisis de deleciones específicas de especie en 8 regiones genómicas (Huard *et al.*, 2003), espigotipificación (Kamerbeek *et al.*, 1997) y/o MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem



Repeats (Supply *et al.*, 2006). Con estas técnicas se determinó la especie dentro del MTBC a la que pertenece cada asilado, su familia y su linaje (Tabla 1). Dentro de las cepas tipificadas se encontraron tres cepas RD<sup>RIO</sup>: *Mycobacterium tuberculosis* que portan una deleción desde el gen Rv3346c hasta el gen Rv3355c, genotipo reportado previamente por Lazzarini y colaboradores (2007). Destaca la presencia de una cepa de la familia Beijing, de origen asiático, tres cepas del linaje Este de Asia e India, que también es de origen asiático, pero predominante en el estado de Guerrero, y una cepa de la familia Ghana del linaje Oeste de Asia.

Adicionalmente, se ha determinado si estas 59 cepas presentan resistencia a uno o más de los antibióticos de primera línea usados en el tratamiento de TB (Isoniacida (INH), Rifampicina (RIF), Etambutol (EMB), Estreptomina (SM) y Pirazinamida (PZA)) (Tabla 1). Así como la presencia de mutaciones en genes asociados a dichas resistencias.

**Tabla 1. Características clínicas, genotípicas y resistencia a antibióticos de las cepas de estudio.**

CEPA	PANEL DE HUARD	ORIGEN CLÍNICO	LINAJE	FAMILIA	RESISTENCIA
MYC 001	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	X	Sensible
MYC 003	<i>M. tuberculosis</i>	Menígea	Euro-Americano	T	Sensible
MYC 004	<i>M. tuberculosis</i>	Menígea	Este de Asia	Beijing	Sensible
MYC 006	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	X	Sensible
MYC 007	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	LAM	Sensible
MYC 008	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	LAM	Sensible
MYC 009	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	X	Sin información
MYC 011	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	SNR EA	Sensible
MYC 012	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	ND	ND	Resistente (MDR-TB)
MYC 013	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	X	Sensible
MYC 014	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	X	Sensible
MYC 015	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	SNR EA	Sensible

<b>MYC 016</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	SNR EA	Resistente (INH)
<b>MYC 017</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	T	Resistente (MDR-TB)
<b>MYC 018</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	SNR EA	Resistente (SM, EMB)
<b>MYC 019</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	Haarlem	Sensible
<b>MYC 021</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	SNR EA	Sensible
<b>MYC 022</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	X	Sensible
<b>MYC 023</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	LAM	Sensible
<b>MYC 024</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	T	Resistente (MDR-TB)
<b>MYC 026</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Menígea	Indo-Oceánico	SNR IO	Resistente (PZA)
<b>MYC 027</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Indo-Oceánico	EAI	Sensible
<b>MYC 028</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	SNR EA	Resistente (RIF)
<b>MYC 029</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	LAM	Sensible
<b>MYC 030</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	SNR EA	Sensible
<b>MYC 031</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	LAM	Sensible
<b>MYC 032</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Indo-Oceánico	SNR IO	Sensible
<b>MYC 033</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	ND	ND	Resistente (PZA)
<b>MYC 034</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	SNR EA	Sin información
<b>MYC 035</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	T	Resistente (EMB)
<b>MYC 036</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Menígea	Euro-Americano	T	Sin información
<b>MYC 037</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	T	Resistente (SM)
<b>MYC 039</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	Haarlem	Resistente (RIF)

<b>MYC 040</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	S	Resistente (MDR-TB)
<b>MYC 041</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	ND	ND	Resistente (MDR-TB)
<b>MYC 042</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	X	Sensible
<b>MYC 043</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	S	Resistente (MDR-TB)
<b>MYC 044</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	T	Sin información
<b>MYC 045</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Indo-Oceánico	SNR IO	Sensible
<b>MYC 046</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	Haarlem	Sensible
<b>MYC 047</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Mixta	Euro-Americano	NEW-1	Sensible
<b>MYC 048</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Mixta	Euro-Americano	NEW-1	Sensible
<b>MYC 049</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	NEW-1	Sensible
<b>MYC 050</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	S	Sensible
<b>MYC 051</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	Haarlem	Sensible
<b>MYC 052</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	Haarlem	Sensible
<b>MYC 053</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Mixta	Euro-Americano	X	Sensible
<b>MYC 055</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Menígea	Euro-Americano	LAM	Resistente (SM)
<b>MYC 056</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Mixta	Euro-Americano	LAM	Sensible
<b>MYC 058</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Oeste de África	Ghana	Sensible
<b>MYC 059</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	S	Resistente (MDR-TB)
<b>MYC 060</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	ND	ND	Sensible
<b>MYC 061</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	LAM	Sensible
<b>MYC 062</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Indo-Oceánico	EAI	Resistente (SM,EMB, PZA)
<b>MYC 063</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Menígea	Euro-Americano	NEW-1	Sin información
<b>MYC 064</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	X	Sensible
<b>MYC 065</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	LAM	Resistente

					(MDR-TB)
<b>MYC 066</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	ND	ND	Sin información
<b>MYC 068</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Euro-Americano	Haarlem	Sin información
<b>MYC 072</b>	<i>M. tuberculosis</i>	Pulmonar	Indo-Oceánico	EAI	Resistente (RIF)

LAM: Latino-América-Mediterráneo; EAI: Este Africo-Indio; SNR EA: Espoligotipo No Reportado del linaje Euro-Americano; SNR IO: Espoligotipo No Reportado del linaje Indo-Oceánico; ND: No Determinada.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Ya que se cuenta con una colección de cepas aisladas de pacientes con tuberculosis provenientes de Michoacán y que éstas han sido tipificadas genético molecularmente, es interesante encontrar la asociación entre estas familias y las variantes que puedan presentar los genes *pe/ppe* en dichas cepas, con la finalidad de tener un mejor entendimiento de las características genéticas que se encuentran detrás de un fenotipo o genotipo observado.

Dada la falta de una mayor evidencia epidemiológica y experimental que demuestre que los genes *pe/ppe* juegan un importante papel en la virulencia y permanencia de *M. tuberculosis* en los tejidos del hospedero; es de gran importancia contar con un conocimiento más detallado de las características genéticas de las cepas de *M. tuberculosis* circulantes en el estado de Michoacán para establecer las cadenas de transmisión existentes y entender mejor la persistencia de ciertas cepas en los casos clínicos documentados; esto aunado al conocimiento de las características de las cepas predominantes (linaje, familia, genotipo, resistencia a antibióticos y determinantes genéticos relacionados con ella, genes que evaden el sistema inmune), generará información de utilidad para determinar el grado de virulencia y patogenicidad de las cepas y en el manejo epidemiológico futuro de TB en la región.

### 3. HIPÓTESIS

Existen polimorfismos en los genes *pe* y *ppe* en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes del estado de Michoacán que se relacionan con características genotípicas y clínicas específicas.

### 4. OBJETIVOS

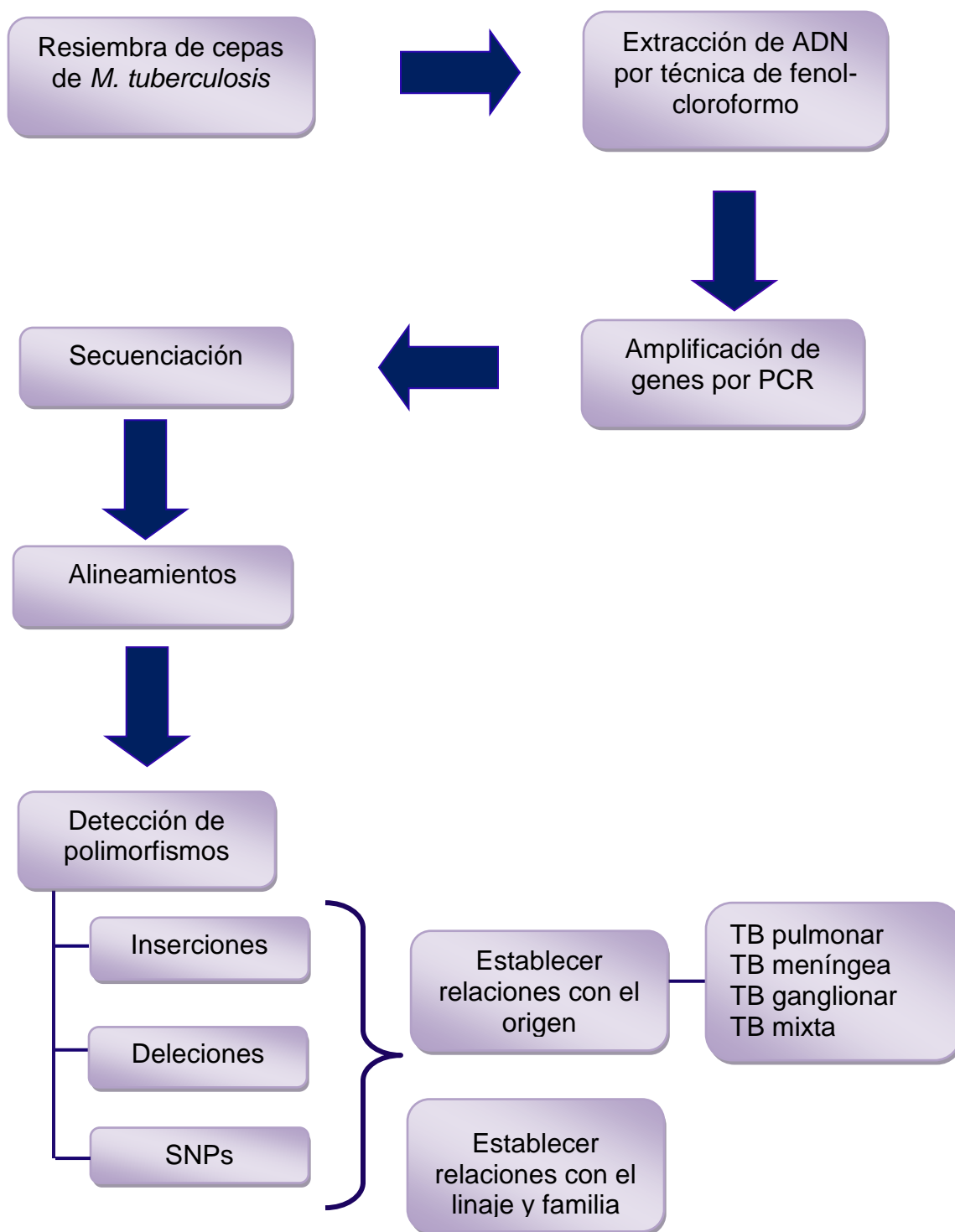
#### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la relación entre los polimorfismos de los genes *pe* y *ppe* de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes del Estado de Michoacán y sus características genotípicas y clínicas.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los polimorfismos en los genes *pe* y *ppe* en cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes del Estado de Michoacán.
2. Asociar los polimorfismos de los genes *pe* y *ppe* con las familias de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes del Estado de Michoacán.
3. Relacionar los polimorfismos de los genes *pe* y *ppe* con las características clínicas de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes del Estado de Michoacán.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico

Para este estudio se incluyeron 59 aislados clínicos de *M. tuberculosis* obtenidos durante 2009-2014 de pacientes con tuberculosis pulmonar, meníngea, ganglionar y mixta (Tabla 1), donados por el “Hospital General Dr. Miguel Silva” (HGMS), la clínica no. 75 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Morelia Michoacán y el Laboratorio de Micobacterias del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán (LESP). La manipulación de las cepas se realizó en un área de bioseguridad nivel II con prácticas de bioseguridad nivel III. Se solicitó también a dichas instancias la información clínica y epidemiológica de cada uno de estos aislados y los pacientes de quienes se obtuvieron. La información obtenida se manejó de acuerdo a los protocolos de ética y confidencialidad correspondientes. Como cepa de referencia para los análisis moleculares se utilizó la cepa *M. tuberculosis* H37Rv donada por el DC. Antonio Enciso Moreno, de la Unidad de Investigación del IMSS-Zacatecas.

### 6.2 Extracción de ADN

Las resiembras de las cepas y la extracción de ADN se llevaron a cabo en campana de bioseguridad nivel II, con prácticas de bioseguridad nivel III. Las cepas fueron resembradas en un tubo con medio Lowenstein-Jensen e incubadas a 37°C por tres o cuatro semanas. A partir de los subcultivos de estas cepas se extrajo el ADN genómico. Se suspendieron colonias de micobacterias en 400 µl de solución de lisis (Tris-HCl 100mM, pH 8.0, SDS 0.2%, NaCl 100mM y EDTA 50mM) y se inactivaron a 80°C durante 1h. Enseguida se colocaron los tubos en hielo durante 2min, se agitaron vigorosamente por 5min y se centrifugaron brevemente. Posteriormente se agregaron 400 µl de mezcla de fenol y cloroformo 1:1 (v/v), se agitó vigorosamente por 10min y se centrifugó a 13,400g por 10min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregó un volumen igual de



mezcla de fenol y cloroformo 1:1 (v/v, 400µl aproximadamente), repitiendo los pasos de agitación y centrifugado. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron dos volúmenes de isopropanol frío. Se incubó la muestra a -20°C por al menos 20min, transcurrido el tiempo se centrifugó a 9300g por 10min, se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADN se lavó con 200 µl de etanol al 70% (v/v) dos veces y se dejó secar a temperatura ambiente hasta la evaporación total del etanol. Una vez seca la pastilla de ADN se resuspendió en 30µl de agua desionizada estéril. La integridad del ADN obtenido se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) teñidos con bromuro de etidio en un fotodocumentador ChemiDoc (BioRad, USA). La concentración de ADN fue determinada en el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific®, USA). Se prepararon diluciones de trabajo a una concentración de 20ng/µl. El ADN aislado y las diluciones de trabajo se conservaron a -20°C hasta su utilización.

### 6.3 Amplificación por PCR de los genes *pe* y *ppe*

Para la estandarización de las condiciones de amplificación se llevaron a cabo ensayos de PCR de los genes *pe\_pgrs18*, *pe\_pgrs26*, *pe3* y *ppe44* utilizando ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv. Los oligonucleótidos utilizados se enlistan en la Tabla 2. Inicialmente la reacción de PCR se desarrolló con Tris-HCl 20mM pH 8.2, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, dNTPs 0.2µM, 0.4µM de cada oligonucleótido, 1U de *Taq* DNA Polimerasa Recombinante (Invitrogen®, USA), 25ng de ADN y DMSO al 4%. Las condiciones iniciales empleadas en la cepa de referencia se fueron modificando para optimizar el ensayo de PCR para cada uno de los 4 genes en todos los aislados de estudio (Tabla 3), y se utilizó la enzima *Taq* HIFI Platinum Polimerasa (Invitrogen®, USA). El programa de amplificación fue distinto para cada gen (Tabla 4). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Corbett Research Palm-Cycler™ (Corbett Life Science®). Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa

al 2% (p/v) teñidos con bromuro de etidio (BrEt) y las imágenes de los geles se capturaron en el fotodocumentador ChemiDoc (BioRad, USA).

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.**

Gen	Clave	Secuencia 5'→3'	Tamaño del fragmento (pb)	Fuente
<i>pe_pgrs18</i>	pe_pgrs18F	GCAGGGATCGTCCGAATAAA	1561	McEvoy <i>et al.</i> , 2012
	pe_pgrs18R	CGGTCACGCCCAAGGTG		
<i>pe_pgrs26</i>	pe_pgrs26F	CGAACGTGATGGTAGTCCCG	1240	
	pe_pgrs26R	CCTTTGCCGTCGAGGCTTTC		
<i>pe3</i>	pe3F	CGGGATCGGTTCCGGCGATAC	1297	
	pe3R	CGACAACCTCCGTCACACTGG		
<i>ppe44</i>	ppe44F	TGGCGAGCGTGGTGCCTACGCTGGC	1292	McEvoy <i>et al.</i> , 2012
	ppe44R	GGGTTAGCGCAATGTGGC		

**Tabla 3. Condiciones empleadas en los ensayos de PCR para la amplificación de los genes de virulencia.**

Gen	Tris-HCl	MgSO <sub>4</sub>	dNTPs	Oligo directo	Oligo reverso	Taq HIFI	ADN	DMSO
<i>pe_pgrs18</i>	20mM	2.0mM	0.2μM	0.4μM	0.4μM	1.2 U/μL	30ng	6%
<i>pe_pgrs26</i>	20mM	2.0mM	0.2μM	0.4μM	0.4μM	1.2 U/μL	20ng	6%
<i>pe3</i>	20mM	2.0mM	0.2μM	0.4μM	0.4μM	1.2 U/μL	20ng	4%
<i>ppe44</i>	20mM	2.0mM	0.2μM	0.4μM	0.4μM	1.2 U/μL	30ng	4%

**Tabla 4. Programas de amplificación mediante PCR de los genes de estudio.**

Gen	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>pe_pgrs18</i>	95° por 6min 1 ciclo	95° por 30s  20 ciclos	61° por 1min 20 ciclos	72° por 3min 20 ciclos	72° por 2min 1 ciclo
	95° por 6min 1 ciclo	95° por 30s 25 ciclos	62° por 1min 25 ciclos	72° por 2min 25 ciclos	72° por 2min 1 ciclo

<b><i>pe3</i></b>	95° por 6min 1 ciclo	95° por 30s 25 ciclos	61° por 1min 25 ciclos	72° por 1:30min 25 ciclos	72° por 2min 1 ciclo
<b><i>ppe44</i></b>	95° por 6min 1 ciclo	95° por 30s 25 ciclos	61° por 1min 25 ciclos	72° por 2min 25 ciclos	72° por 2min 1 ciclo

#### 6.4 Secuenciación

Los productos de amplificación obtenidos fueron secuenciados por la empresa Elim Biopharm (USA) utilizando un secuenciador de electroforesis capilar ABI 3730xl de Applied Biosystems. Solamente se secuenció la cadena codificante de los genes *pe\_pgrs18*, *pe\_pgrs26*, *pe3*, *ppe44*.

#### 6.5 Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en el GenBank por el algoritmo Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para encontrar aquellas con máxima identidad. De dicha búsqueda se seleccionaron secuencias para la identificación de polimorfismos. Se realizó un alineamiento múltiple mediante los programas Clustal X versión 2.1 y Mega versión 6.06 y las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente en el programa Bioedit versión 7.2.5.

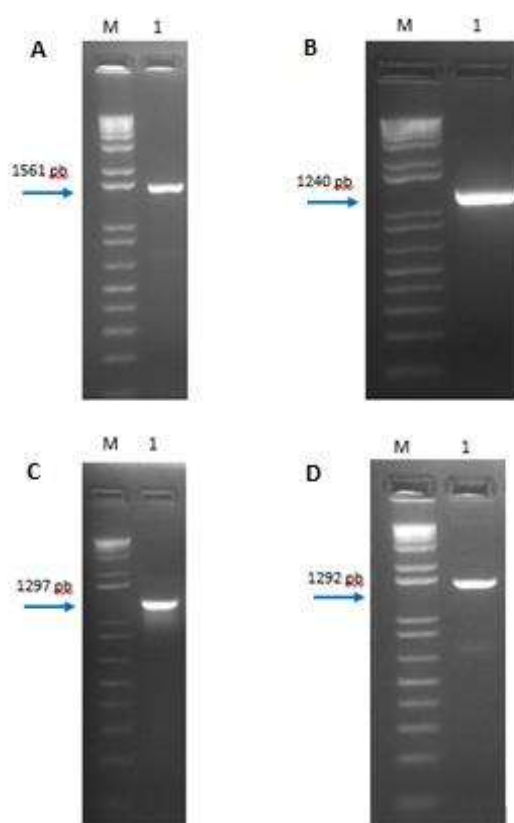
#### 6.6 Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS v. 20.0. La asociación de variables se efectuó con el estadístico de prueba no paramétrico Chi cuadrado. La herramienta estadística para interpretar la asociación de las variables fue mediante residuales tipificados. Las cifras estadísticamente significativas fueron las que asociaron a un  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

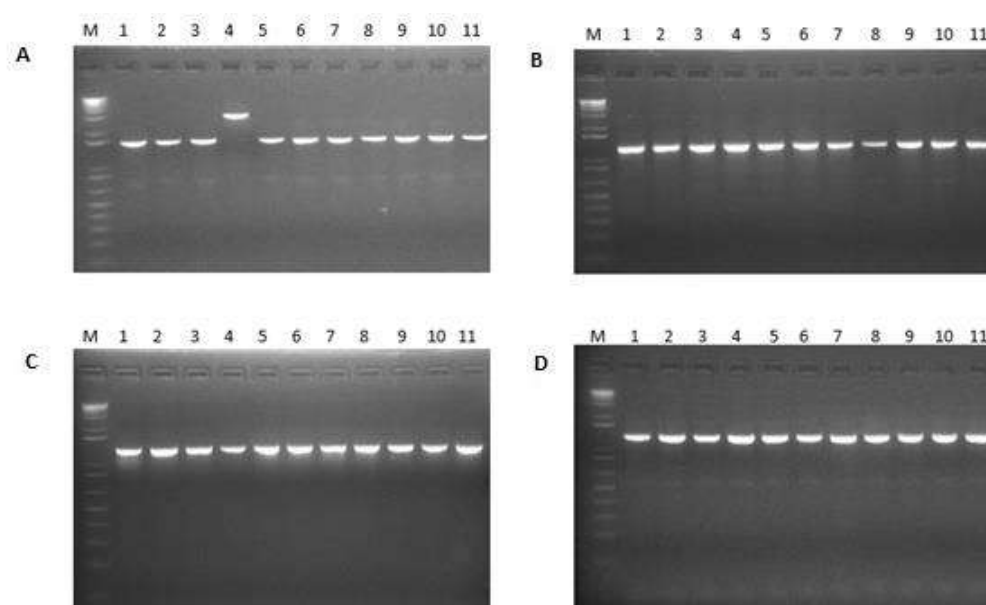
### 7.1 Optimización de los ensayos de amplificación por PCR de los genes *pe/ppe*

Se utilizó el ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv para estandarizar las condiciones de amplificación para cada uno de los genes de estudio, obteniendo los productos esperados (Fig. 8).



**Figura 8. Productos de amplificación obtenidos de los genes de estudio con ADN de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv.** Geles de agarosa al 2% (p/v) teñidos con BrEt. A) Gen *pe\_pgrs18*, 1561pb; B) gen *pe\_pgrs26*, 1240pb; C) gen *pe3*, 1297pb; D) gen *ppe44*, 1292pb. M: marcador de tamaño molecular, 1 kb plus ADN ladder (Invitrogen, USA).

Una vez obtenidos los productos de amplificación deseados con la cepa de referencia, se realizaron las amplificaciones de los genes de interés en cada una de las cepas de estudio (Fig. 9). Se obtuvieron los productos de amplificación del tamaño esperado para cada uno de los 4 genes de interés en las 59 cepas analizadas. Sin embargo, las cepas MYC 023 y MYC 056 mostraron bandas de mayor tamaño en el gen *pe\_pgrs18*, este resultado fue analizado y es explicado posteriormente.

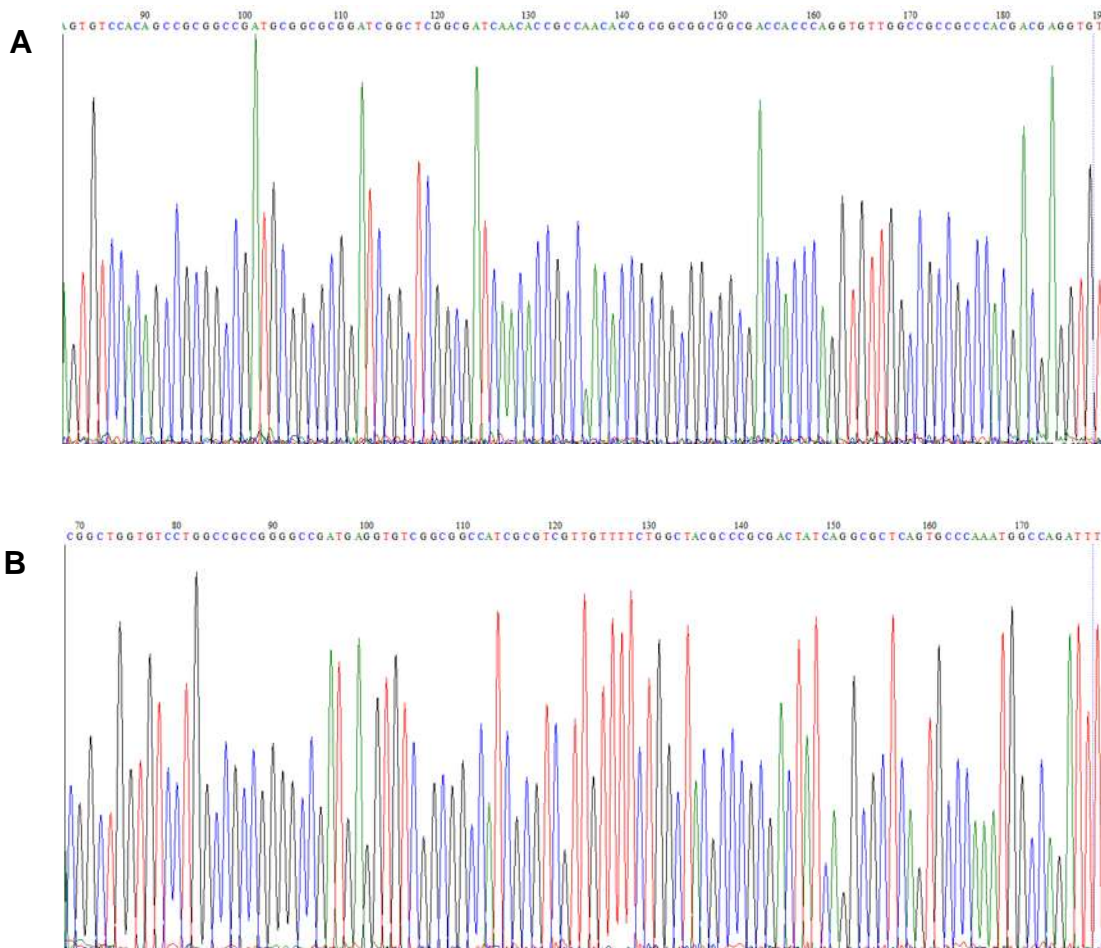


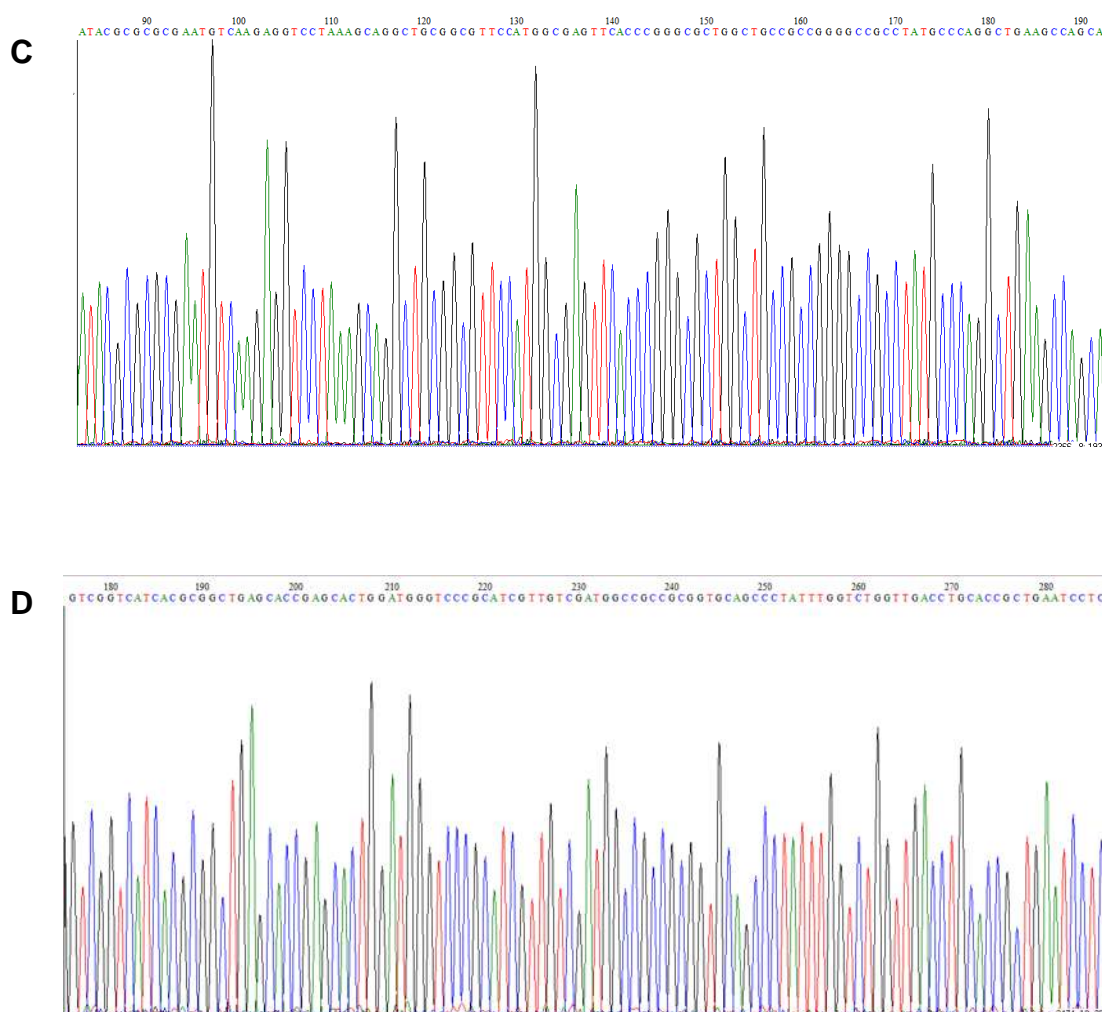
**Figura 9. Productos de amplificación obtenidos de los genes de estudio en las cepas de *M. tuberculosis*.** Geles de agarosa al 2% (p/v) teñidos con BrEt que muestran los productos de amplificación de A) Gen *pe\_pgrs18*; B) gen *pe\_pgrs26*; C) gen *pe3*; y D) gen *ppe44*. Carriles: M, marcador de peso molecular, 1 kb plus ADN ladder (Invitrogen, USA); 1 a 11: amplicones representativos de algunas de las cepas de estudio.

## 7.2 Secuenciación

Las secuencias utilizadas para el análisis presentaron los siguientes tamaños: *pe\_pgrs18* con 1374 bases, *pe\_pgrs26* con 733 bases, *pe3* con 1245 bases y *ppe44* con 822 bases.

Al realizar la secuenciación de los cuatro productos de amplificación de las 59 cepas, se obtuvieron electroferogramas de muy buena calidad, con una alta resolución y definición de picos (Fig. 10).





**Figura 10. Electroferogramas representativos de las secuencias obtenidas de distintos productos de amplificación de los genes de interés.** Electroferogramas obtenidos en la reacción de secuenciación de los genes A) *pe\_pgrs18*, cepa MYC 068; B) *pe\_pgrs26*, cepa MYC 042; C) *pe3*, cepa MYC 007; y D) *ppe44*, cepa MYC 015.

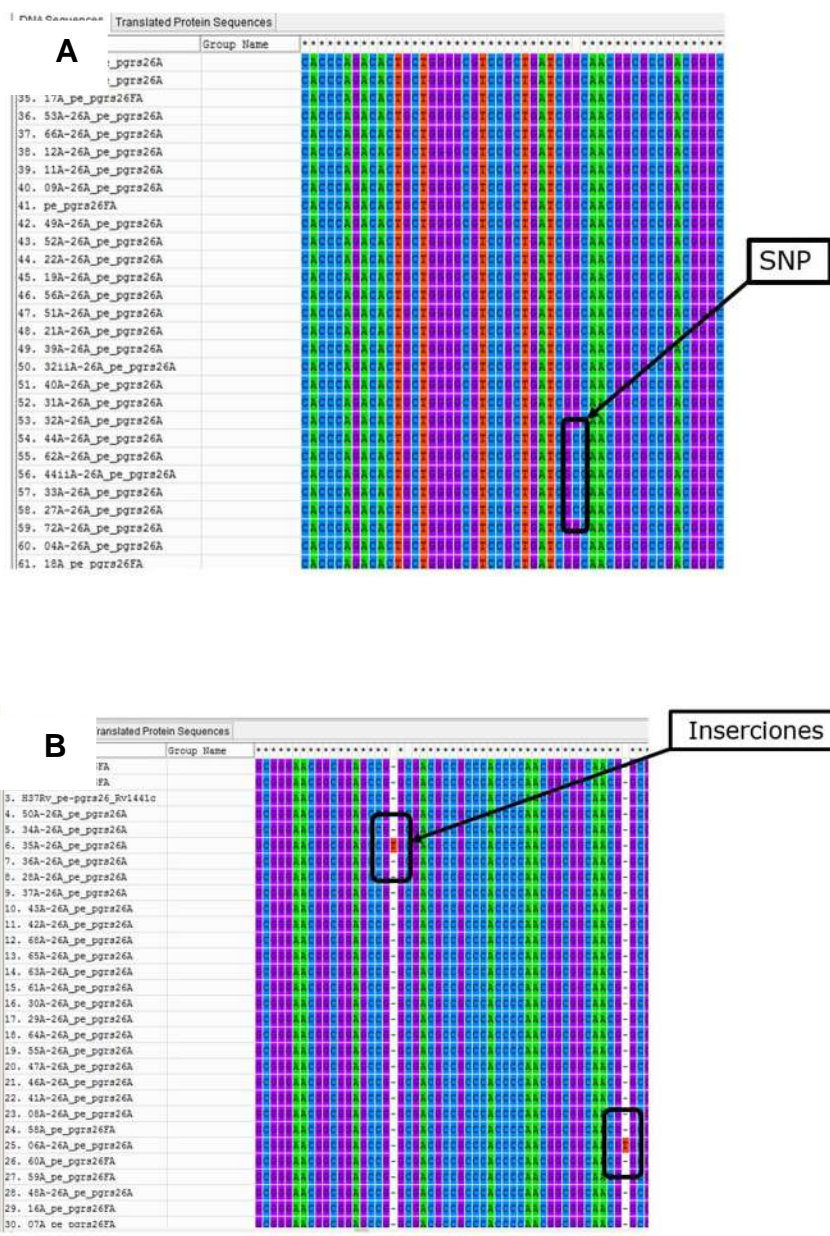
### 7.3 Detección de SNPs, inserciones y deleciones en los genes de interés

Con las secuencias editadas se realizó una búsqueda BLASTn en el Genbank comprobándose que cada una de estas correspondía a los genes de estudio. Anteriormente se mencionó que dos de las cepas (MYC 023 y MYC 056) habían presentado productos de amplificación mayores de lo esperado. Al realizar el BLASTn se encontró que presentaban 100% de identidad con una transposasa, es decir con una enzima presente en elementos móviles del ADN. En este caso en



particular pertenece a la secuencia de inserción IS6110, lo cual corroboró la inserción de esta secuencia en el gen *pe\_pgrs18* de la cepa correspondiente.

El alineamiento múltiple mostró que los tipos de polimorfismos identificados en los cuatro genes analizados fueron SNPs, inserciones y deleciones (Fig. 11). Las posiciones de los polimorfismos se establecieron en base a la posición dentro del gen de la cepa de referencia H37Rv (número de acceso AL123456.3).







**Figura 11. Alineamiento múltiple representativo de las secuencias de los genes de estudio.** Se alinearon las 59 secuencias correspondientes a cada una de las cepas estudiadas; como referencia se usó la secuencia de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv obtenida de la base de datos GenBank(número de acceso AL123456.3). Los alineamientos mostrados corresponden al gen *pe\_pgrs26*. Tipos de polimorfismos encontrados: A) SNP; B) inserciones; C) deleciones.

Después de realizar los alineamientos se identificaron los tipos de polimorfismos presentes en los 4 genes de cada una de las 59 cepas (Tabla 5), así como la posición en la que se encontraban.

**Tabla 5. Tipos y cantidad de polimorfismos encontrados en cada gen.**

Polimorfismo	<i>pe_pgrs18</i>	<i>pe_pgrs26</i>	<i>pe3</i>	<i>ppe44</i>
SNP	144	7	8	2
Inserción	4	2	1	0
Deleción	3	1	0	0

El gen *pe\_pgrs18* resultó ser el más polimórfico ya que el 71.1% de las cepas analizadas presentaron algún polimorfismo en su secuencia, mientras que el gen *ppe44* mostró ser el más conservado, ya que sólo el 11.8% de las cepas presentaron algún polimorfismo.

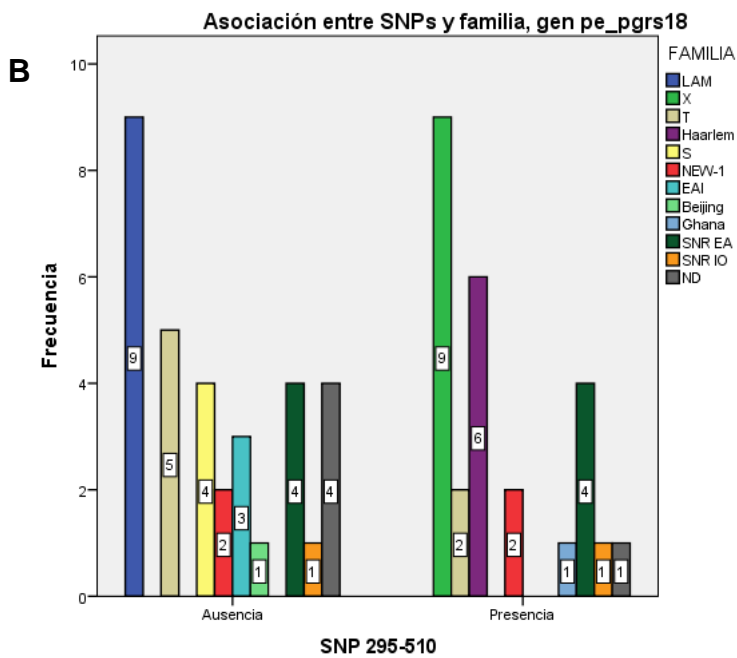
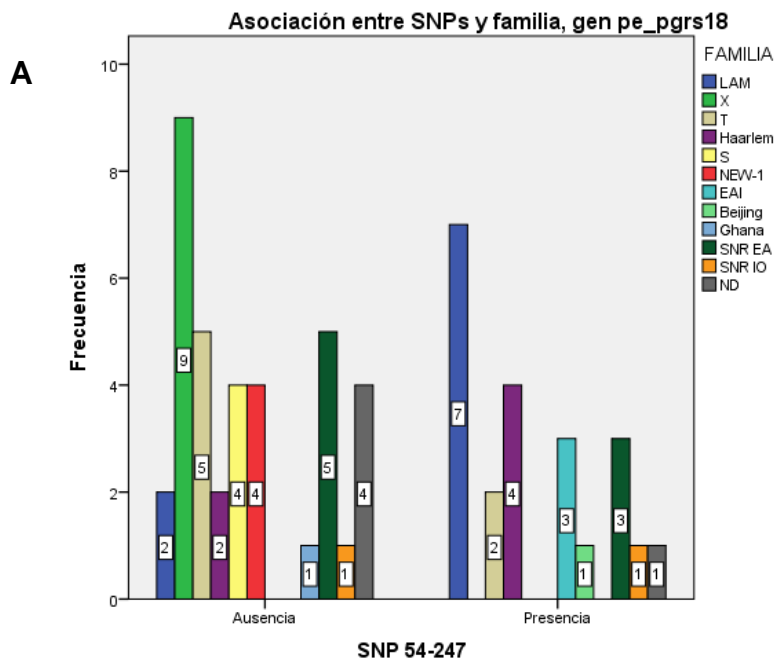
## 7.4 Asociación entre polimorfismos y familias

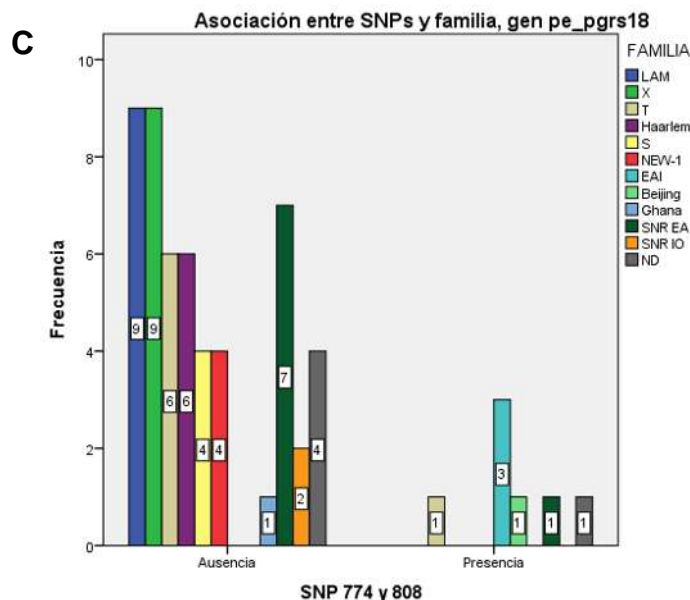
Se realizó la asociación de variables mediante el estadístico de prueba no paramétrico Chi cuadrado, considerando un resultado estadísticamente significativo si era asociado a un  $P < 0.05$ .

En las figuras presentadas a continuación se muestran únicamente las asociaciones estadísticamente significativas entre el polimorfismo y la familia para cada uno de los genes. La totalidad de polimorfismos, su posición y familia en que se encontraron, se especifican en las tablas 6, 7, 8 y 9.

### 7.4.1 Asociación entre los polimorfismos del gen *pe\_pgrs18* y las familias de *M. tuberculosis*

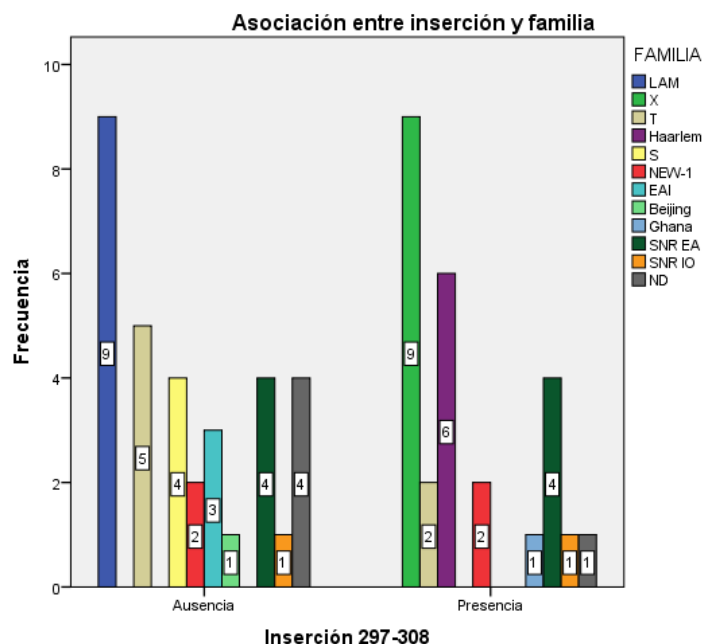
Se obtuvo la secuencia completa del gen *pe\_pgrs18* (1374 bases) (coordinadas en el genoma 1,095,078..1,096,451), presentó más de 100 SNPs; sin embargo, se observó un patrón de asociación con base en las posiciones de los cambios y familias en que se presentaban, lo que permitió formar tres grupos bajo estos criterios. El primer grupo estuvo integrado por siete SNPs en las posiciones 54-247, presentes en las familias LAM, T, Haarlem, EAI, Beijing, SNR EA, SNR IO y ND; el segundo grupo lo formaron 47 SNPs en las posiciones 295-510, presentes en las familias X, T, Haarlem, NEW-1, Ghana, SNR EA, SNR IO y ND; el tercer grupo se formó por dos SNPs en las posiciones 774 y 808, presentes en las familias T, EAI, Beijing, SNR EA y ND (Fig. 12), las cepas que corresponden a las familias que presentaron polimorfismos se muestran en la Tabla 6.





**Figura 12. Asociación entre SNPs del gen *pe\_pgrs18* y las familias de *M. tuberculosis*.** Presencia o ausencia de SNPs en las familias de las cepas de estudio. A) Grupo de 5 SNPs en las posiciones 54 a 247 ( $P < 0.05$ ). B) Grupo de 47 SNPs en las posiciones 295 a 510 ( $P < 0.05$ ). C) Grupo de 2 SNPs en las posiciones 774 y 808 ( $P < 0.05$ ).

De las cuatro inserciones que se presentaron en el gen *pe\_pgrs18*, solo una resultó estadísticamente significativa, la ubicada en la posición 297-308, que se presentó en las familias X, T, Haarlem, NEW-1, Ghana, SNR EA, SNR IO y ND (Fig. 13).



**Figura 13. Asociación entre la inserción 297-308 del gen *pe\_pgrs18* y las familias de *M. tuberculosis*.** Presencia o ausencia de inserciones en las familias de las cepas de estudio. Inserción 297-308 ( $P < 0.05$ ).

Ninguna de las otras tres delecciones fue estadísticamente significativa en su relación con las familias de *M. tuberculosis* de las cepas de Michoacán. El total de las posiciones de los polimorfismos, incluidos los no significativos del gen *pe\_pgrs18* se muestran en la tabla 6. Se observó una clara asociación entre la posición tanto de los SNPs como de una inserción con las familias en las que se presentan.

**Tabla 6. Tipos de polimorfismos en el gen *pe\_pgrs18*, posiciones y familia en que se encuentran.**

Polimorfismo	Posición	Familia	Cepa (MYC)
SNP	54-247	LAM, T, Haarlem, EAI, Beijing, SNR EA, SNR IO, ND	004, 007, 008, 015, 018, 019, 024, 027, 029, 030, 031, 032, 033, 039, 044, 051,

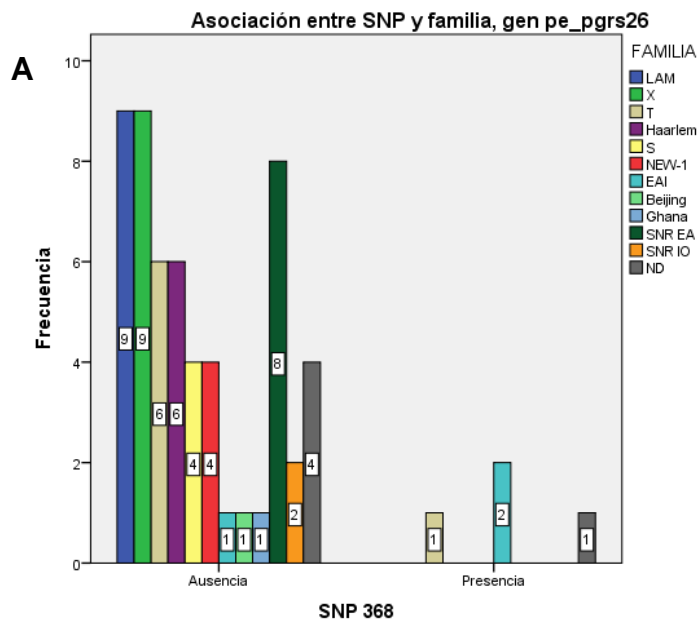
			052, 055, 061, 062, 065, 072
	295-510	X, T, Haarlem, NEW-1, Ghana, SNR EA, SNR IO, ND	001, 006, 009, 011, 013, 014, 017, 019, 021, 022, 024, 028, 030, 032, 039, 042, 046, 047, 048, 051, 052, 053, 058, 064, 066, 068
	746	X	006
	774 y 808	T, EAI, Beijing, SNR EA, ND	004, 018, 027, 033, 044, 062, 072
	784	EAI	072
	962-1217	LAM	065
<b>Inserciones</b>	297-308	X, T, Haarlem, NEW-1, Ghana, SNR EA, SNR IO, ND	001, 006, 009, 011, 013, 014, 017, 019, 021, 022, 024, 028, 030, 032, 039, 042, 046, 047, 048, 051, 052, 053, 058, 064, 066, 068
	985-987	LAM	065
	1167	LAM	065
	1183	LAM	065
<b>Deleciones</b>	468-596	S	040
	1081	LAM	065
	1110-1124	LAM	065

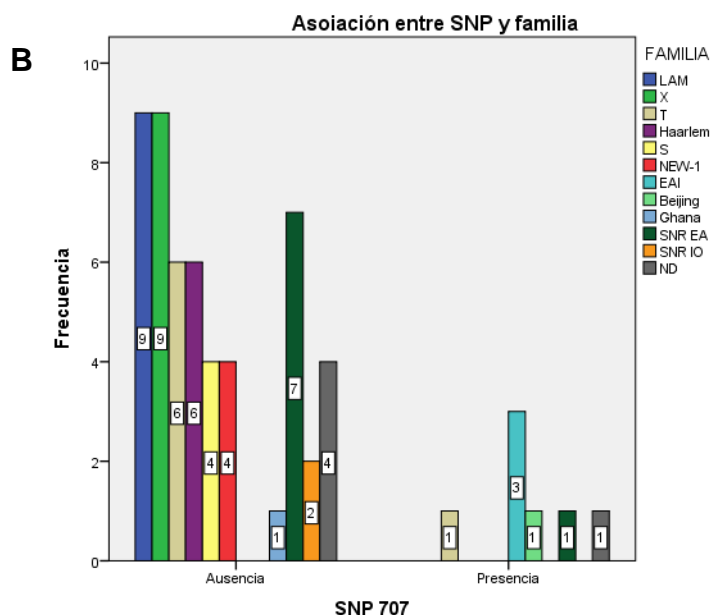
La secuencia del gen *pe\_pgrs18* de la cepa MYC 065 perteneciente a la familia LAM, presentó 88 SNPs (más del 50% de los SNPs para este gen) a partir

de la posición 962 y hasta la 1217. Es importante mencionar que ninguna otra cepa mostró la presencia de dichos polimorfismos.

### 7.4.2 Asociación entre los polimorfismos del gen *pe\_pgrs26* y las familias de *M. tuberculosis*

El gen *pe\_pgrs26* (coordenadas en el genoma 1,618,209..1,619,684) presentó dos SNPs con asociación significativa, uno en la posición 368 presente en las familias T, EAI y ND; el otro en la posición 707 encontrado en familias T, EAI, Beijing, SNR EA y ND (Fig. 14), las cepas que corresponden a las familias que presentaron polimorfismos se muestran en la Tabla 7.

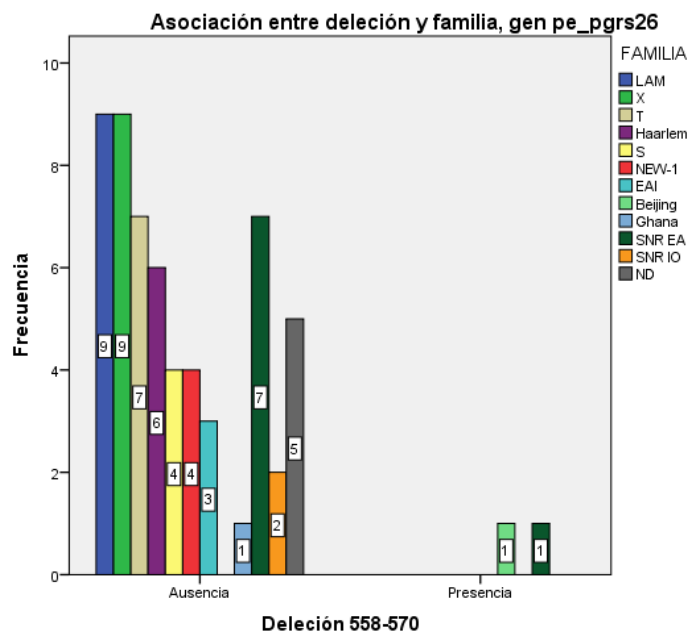




**Figura 14. Asociación entre SNPs del gen *pe\_pgrs26* y las familias de *M. tuberculosis*.** Presencia o ausencia de SNPs en las familias de las cepas de estudio. A) SNP 368 ( $P < 0.05$ ). B) SNP 707 ( $P < 0.05$ ).

Las inserciones no mostraron resultados estadísticamente significativos (Tabla 7), en contraste con la delección 558-570 presente en las familias Beijing y SNR EA, que si presentó una asociación significativa con dichos grupos genéticos (Fig. 15).





**Figura 15. Asociación entre la deleción del gen *pe\_pgrs26* y las familias de *M. tuberculosis*.** Presencia o ausencia de deleciones en las familias de las cepas de estudio. Deleción 558-570. ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 7. Tipos de polimorfismos en el gen *pe\_pgrs26*, posiciones y familia en la que se encuentran.**

Polimorfismo	Posición	Familia	Cepa (MYC)
SNP	302	T	036
	368	T, EAI, ND	027, 033, 044, 062
	450	SNR IO	032
	509	T	044
	637	SNR EA	034
	686	X, SNR EA, ND	013, 014, 016, 053, 066
	707	T, EAI, Beijing, SNR EA y ND	004, 018, 027, 033, 044, 062, 072
Inserciones	449	T	035
	480	X	006

<b>Deleciones</b>	558-570	Beijing y SNR EA	004, 018
-------------------	---------	------------------	----------

El gen *pe\_pgrs26* presentó una menor cantidad de polimorfismos, siendo en las cepas pertenecientes a la familia T en donde se observaron la mayoría de estos cambios. Sin embargo, sólo se amplificaron 733 bases de las 1476 que forman el gen en la cepa de referencia H37Rv.

#### 7.4.3 Asociación entre los polimorfismos del gen *pe3* y las familias de *M. tuberculosis*

En el caso del gen *pe3* (coordenadas en el genoma 187,433..188,839) se amplificaron 1245 bases de las 1407 que constituyen el gen en la cepa de referencia H37Rv; este gen mostró ocho SNPs y una inserción; sin embargo, no se obtuvo ninguna asociación estadísticamente significativa con las familias. Las posiciones de los polimorfismos, así como las familias y las cepas en que se presentan, se muestran en la Tabla 8.

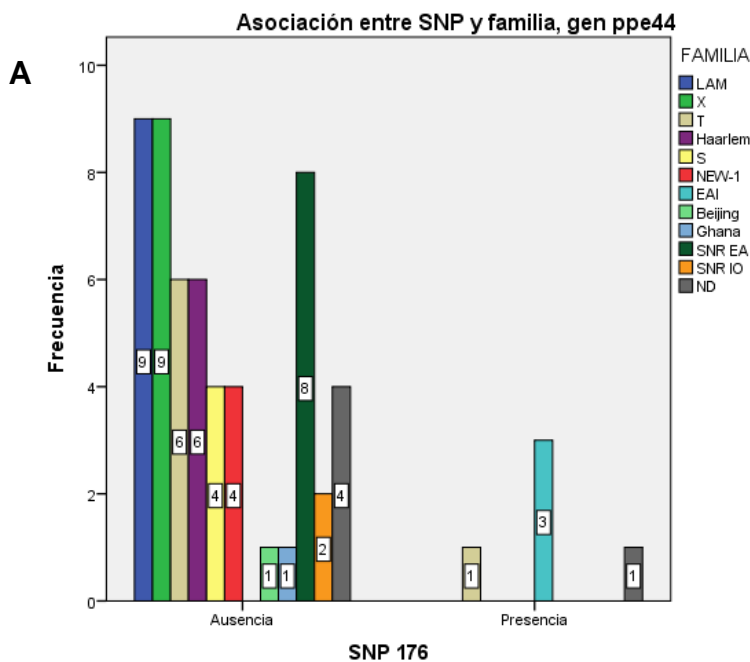
Tabla 8. Tipos de polimorfismos en el gen *pe3*, posiciones y familia en que se encuentran.

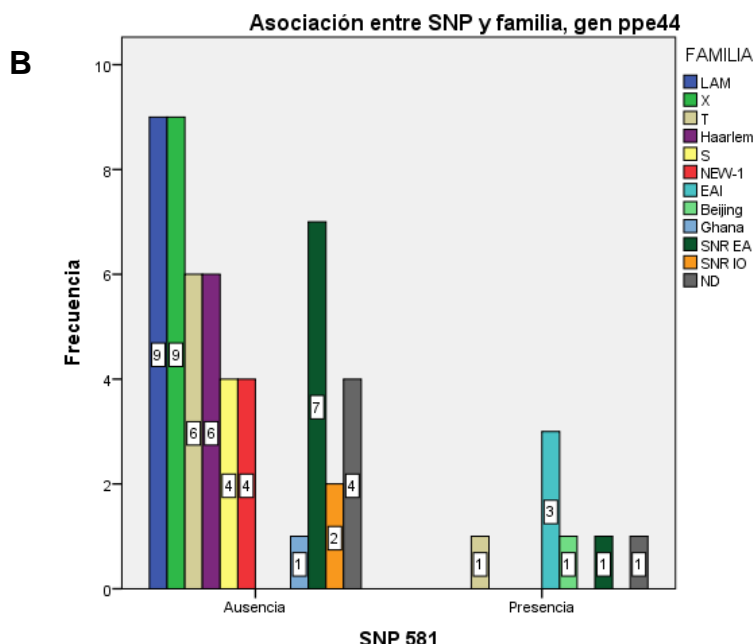
Polimorfismo	Posición	Familia	Cepa (MYC)
<b>SNP</b>	182	T	024
	313	LAM	007, 029
	505	NEW-1	048
	652	LAM	023
	1079	T	024
	1102	X, T, ND	013, 014, 017, 053, 066
	1217	X	006
	1256	X	001
<b>Inserciones</b>	944	ND	060

No se observó relación entre los polimorfismos del gen *pe3*, ya que solo una o dos cepas pertenecientes a las familias mencionadas en la Tabla 8 son las que presentaron algún cambio en la secuencia del gen antes mencionado. Sin embargo, se observó que únicamente las familias pertenecientes al linaje Euro Americano presentaron polimorfismos en la secuencia del gen *pe3*.

#### 7.4.4 Asociación entre los polimorfismos del gen *ppe44* y las familias de *M. tuberculosis*

El gen *ppe44* (coordenadas en el genoma 3,079,309..3,080,457) posee dos SNPs, uno en la posición 176 en las familias T, EAI y ND, y otro en la posición 581 en las familias T, EAI, Beijing, SNR EA, y ND, encontrándose en ambos una asociación estadísticamente significativa (Fig. 16), las cepas que corresponden a las familias que presentaron polimorfismos se muestran en la Tabla 9.





**Figura 16. Asociación entre SNPs del gen *ppe44* y las familias de *M. tuberculosis*.** Presencia o ausencia de SNPs en las familias de las cepas de estudio. A) SNP 176 ( $P_{valor} < 0.05$ ). B) SNP 581 ( $P_{valor} < 0.05$ ).

Se observó que todas las cepas de la familia EAI y una cepa de la familia T y ND presentaron ambos SNPs. El SNP 581 se presentó en un número mayor de cepas en comparación al 176. Los SNPs de este gen están presentes en familias de distintos linajes, Euro-Americano, Indo-Oceánico y Este de Asia.

Se amplificaron un total de 822 bases de las 1145 por las que está formado el gen *ppe44*.

**Tabla 9. Tipos de polimorfismos en el gen *ppe44*, posiciones y familia en que se encuentran.**

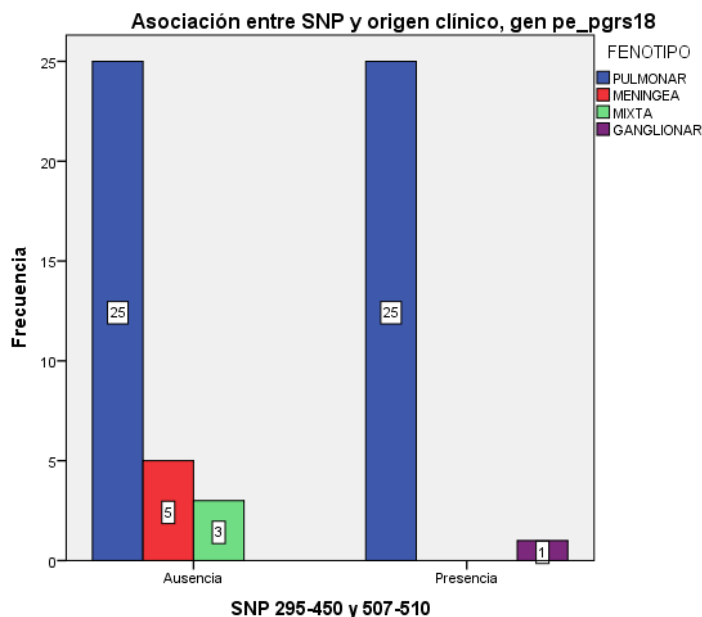
Polimorfismo	Posición	Familia	Cepa (MYC)
SNP	176	T, EAI, ND	027, 033, 044, 062, 072
	581	T, EAI, Beijing, SNR EA, ND	004, 018, 027, 033, 044, 062,

## 7.5 Asociación entre los polimorfismos y las características clínicas de las cepas

Una vez terminado el análisis de asociación entre polimorfismos y familias, se realizó, mediante la misma prueba estadística, la búsqueda de relación entre los polimorfismos y las características clínicas de las cepas, cuyos resultados se presentan a continuación.

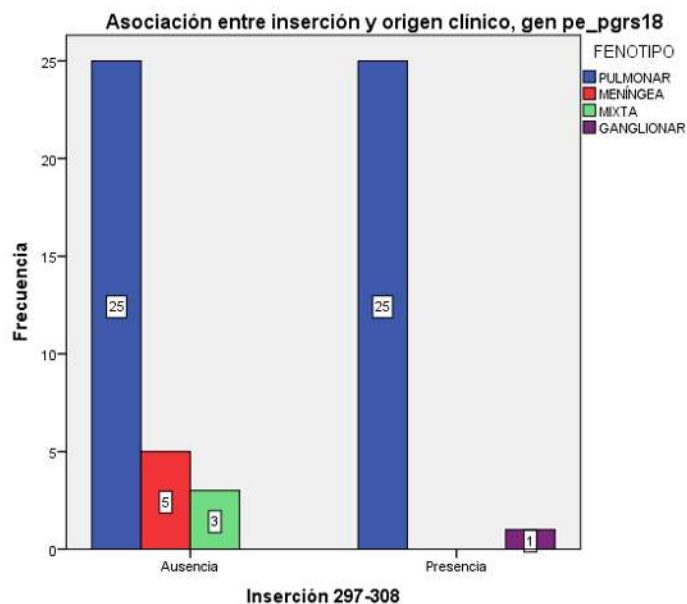
### 7.5.1 Asociación entre polimorfismos del gen *pe\_pgrs18* y las características clínicas de las cepas

Con respecto al gen *pe\_pgrs18* se forman nuevamente dos grupos, el primero incluyó 41 SNPs ubicados en las posiciones 295 a 450 presentes en 25 cepas pulmonares y una ganglionar; y el segundo está compuesto por tres SNPs ubicados en las posiciones 507, 508 y 510, presentes también en 25 cepas pulmonares y una ganglionar. Fue en estos grupos donde se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los SNPs encontrados y las características clínicas de las cepas (Fig. 17). El total de los polimorfismos observados, incluyendo los no significativos, y las cepas que se presentaron muestran en la Tabla 10.



**Figura 17. Asociación entre SNPs del gen *pe\_pgrs18* y la procedencia clínica de la cepa.** Presencia o ausencia de SNPs en los fenotipos de las cepas de estudio. SNPs 295 a 450 y 507 a 510 ( $P < 0.05$ ).

De igual manera, la inserción 297-308 presente en las mismas 25 cepas de origen pulmonar y una ganglionar, se asoció significativamente con las características clínicas de las cepas analizadas (Fig. 18).



**Figura 18. Asociación entre inserción del gen *pe\_pgrs18* y la procedencia clínica de la cepa.** Presencia o ausencia de inserciones en los fenotipos de las cepas de estudio. Inserción 297-308 ( $P < 0.05$ ).

La delección del gen *pe\_pgrs18* no resultó con asociaciones significativas, y solo se detectó en una cepa de origen pulmonar.

**Tabla 10. Origen clínico de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen *pe\_pgrs18*.**

Origen	SNP	Inserción	Delección	Cepa (MYC)
<b>Pulmonar</b>	54-1217	297-308, 985-987, 1167, 1183	468-596, 1081, 1110-1124	001, 006, 007, 008, 009, 011, 013, 014, 015, 017, 018, 019, 021, 022, 024, 027, 028, 029, 030, 031, 032, 033, 039, 040, 042, 044, 046, 047, 048, 051, 053, 058, 061, 064, 065, 066, 068, 072
<b>Meníngea</b>	54, 153, 213, 774, 808			004
<b>Mixta</b>	54, 129, 153, 213, 247, 462, 471, 774, 808			055, 062
<b>Ganglionar</b>	54, 129, 153, 295-471, 507,	297-308		052

508, 510			
----------	--	--	--

Las cepas provenientes de tuberculosis pulmonar presentaron los tres tipos de polimorfismos, en la cepa ganglionar se encontraron numerosos SNPs y una inserción, y en las cepas meníngeas y mixtas solo se observaron algunos SNPs.

### 7.5.2 Asociación entre los polimorfismos del gen *pe\_pgrs26* y la procedencia clínica de la cepa

Para el gen *pe\_pgrs26* solamente el SNP 302 resultó ser estadísticamente significativo para su asociación a una cepa meníngea (MYC 036). Tanto en inserciones como en deleciones, no se encontraron resultados significativos (Tabla 11).

Tabla 11. Origen clínico de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen *pe\_pgrs26*.

Origen	SNP	Inserción	Delección	Cepa (MYC)
<b>Pulmonar</b>	368, 450, 509, 637, 686, 707	449, 480	558-570	006, 013, 014, 016, 018, 027, 032, 033, 034, 035, 044, 053, 066, 072
<b>Meníngea</b>	302, 707		558-570	004, 036
<b>Mixta</b>	368, 707			062
<b>Ganglionar</b>				

Las cepas pulmonares muestran los tres tipos de polimorfismos en el gen *pe\_pgrs26*, mientras que las meníngeas presentan SNPs y una delección, en referencia a las mixtas presentan solamente SNPs y la ganglionar no tiene ningún



cambio en su secuencia, en este gen. Las cepas pulmonares, meníngeas y mixtas presentan el mismo SNP en la posición 707.

### 7.5.3 Asociación entre los polimorfismos del gen *pe3* y la procedencia clínica de la cepa

En el gen *pe3* no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos presentes (SNPs e inserción) y el origen de las cepas analizadas. Solamente las cepas pulmonares mostraron cambios en la secuencia de este gen (Tabla 12).

Tabla 12. Origen clínico de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen *pe3*.

Origen	SNP	Inserción	Delección	Cepa (MYC)
<b>Pulmonar</b>	182, 313, 505, 652, 1079, 1102, 1217, 1256	944		001, 006, 007, 013, 014, 017, 023, 024, 029, 048, 053, 060, 066
<b>Meníngea</b>				
<b>Mixta</b>				
<b>Ganglionar</b>				

### 7.5.4 Asociación entre los polimorfismos del gen *ppe44* y la procedencia clínica de la cepa

Los resultados tampoco fueron significativos entre los SNPs encontrados en el gen *ppe44* y el origen clínico de las cepas. Los polimorfismos se presentaron en cepas pulmonares, meníngeas y mixtas (Tabla 13).

**Tabla 13. Origen clínico de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen *ppe44*.**

Origen	SNP	Inserción	Delección	Cepa (MYC)
<b>Pulmonar</b>	176, 581			018, 027, 033, 044, 072
<b>Meníngea</b>	581			004
<b>Mixta</b>	176, 581			062
<b>Ganglionar</b>				

Se observó que solamente una cepa meníngea presentó el SNP 581, y una cepa mixta presentó los dos SNPs (176 y 581), y las cepas pulmonares presentaron también ambos SNPs.

### 7.6 Polimorfismos reportados y de nueva descripción

Se obtuvieron polimorfismos que coinciden con lo reportado en la literatura, así como algunos otros que se describe por primera vez su presencia en estos genes de estudio. Se encontraron coincidencias de diferentes familias en las que se han observado las variaciones en la secuencia de estos genes, así como otras en las que no se han reportado previamente.

**Tabla 14. Polimorfismos que coinciden con los reportados y familias en que se presentó la variación.**

Gen	Tipo de polimorfismo	Posición	Variación en familias de nuestro estudio	Variación en familias previamente reportada (McEvoy <i>et al.</i> , 2012)
<b><i>pe_pgrs18</i></b>	SNP	54	LAM, T, Haarlem, EAI, Beijing, SNR EA, SNR IO, ND	EAI, LAM, Beijing, Haarlem, T

		129	LAM, T, Haarlem, EAI, Beijing, SNR EA, SNR IO, ND	LAM, LCC, T, Haarlem, EAI, Beijing
		153	LAM, T, Haarlem, EAI, Beijing, SNR EA, SNR IO, ND	EAI, LAM, Beijing, Haarlem, T
		213	LAM, T, Haarlem, EAI, Beijing, SNR EA, SNR IO, ND	LAM, LCC
		247	LAM, T, Haarlem, EAI, Beijing, SNR EA, SNR IO, ND	LAM, LCC, EAI
		462	X, T, Haarlem, NEW-1, Ghana, SNR EA, SNR IO, ND	EAI
		471	X, T, Haarlem, NEW-1, Ghana, SNR EA, SNR IO, ND	EAI, CAS
		808	T, EAI, Beijing, SNR EA, ND	PGG1
		962	LAM	CAS
	Inserción	297-308	X, T, Haarlem, NEW-1, Ghana, SNR EA, SNR IO, ND	Haarlem, LCC
<b><i>pe_pgrs26</i></b>	SNP	368	T, EAI, ND	EAI
		686	X, SNR EA	LCC
		707	T, EAI, Beijing, SNR EA, ND	PGG1
<b><i>pe3</i></b>	SNP	1102	X, T, ND	LCC

<b><i>ppe44</i></b>	SNP	176	T, EAI, ND	EAI
		581	T, EAI, Beijing, SNR EA, ND	PGG1

El resto de polimorfismos mencionados en las tablas 6, 7, 8 y 9 que no aparecen en esta tabla, son de nueva descripción.

## 8. DISCUSIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, prevenible y curable, que cada año causa la muerte de aproximadamente 2 millones de personas en todo el mundo, por lo que ha sido nombrado el patógeno humano más exitoso. La circulación de cepas multidrogorresistentes y extremadamente drogorresistentes, además de la epidemia de VIH-SIDA, agravan enormemente el control y tratamiento de la enfermedad, haciendo necesaria la búsqueda de nuevas técnicas de diagnóstico, la creación de fármacos exitosos y un mejor entendimiento del estilo de vida intracelular de este patógeno. Después de que el bacilo es fagocitado, emplea mecanismos para evitar la eliminación del macrófago y poder sobrevivir dentro de él, a pesar del ambiente hostil. Muchos de estos mecanismos, ya han sido dilucidados; sin embargo, hay otros que aún no tienen una clara explicación.

En 1998 Cole y colaboradores secuenciaron el genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv, permitiendo así una explicación molecular de varios fenómenos relacionados a la evasión de la respuesta inmune. En este sentido uno de los hallazgos más interesantes fue la identificación de las familias de genes *pe/ppe*, de las cuales diferentes estudios han permitido establecer que su función está relacionada con la virulencia de la bacteria (Banu *et al.*, 2002; Brennan *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2007; Bottai *et al.*, 2012; Kohli *et al.*, 2012). No obstante, tanto de un gran número de genes de estas dos familias, como de las proteínas que codifican, se desconoce todavía su función. Además, trabajos que intenten relacionar polimorfismos en los genes *pe/ppe* con una familia de *M. tuberculosis* son muy escasos, por lo que la relevancia de este trabajo aumenta al presentar resultados no reportados anteriormente y que proporcionan un mayor conocimiento del comportamiento de estas familias multigénicas en relación a las características filogenéticas de las cepas analizadas.

La importancia de contar con una mayor comprensión de la relación que existe entre los genes *pe/ppe* y la virulencia de *M. tuberculosis* dio la base para el desarrollo de este trabajo, como un primer acercamiento para entender dicha

relación. Este estudio se enfocó en la búsqueda de una asociación entre polimorfismos de estos genes y las familias de *M. tuberculosis* establecidas por métodos genéticos y la procedencia clínica de las cepas de pacientes del estado de Michoacán.

Respecto al gen *pe\_pgrs18* los datos obtenidos muestran que los grupos de SNPs están distribuidos en familias pertenecientes a distintos linajes, y las familias que se presentan en el primer grupo (SNPs 54-247) no lo hacen en el segundo (SNPs 295-510); las familias del tercer grupo (SNPs 774 y 808) son las mismas que las del primer grupo de SNPs. Las familias SNR y ND están presentes en los tres grupos; sin embargo, éstas son familias que no se encuentran reportadas en las bases de datos o que no se lograron tipificar con las técnicas empleadas en el laboratorio.

La cepa MYC 065 fue la más polimórfica de todas las estudiadas, presentó 88 de los 144 SNPs encontrados en total en todas las cepas, ubicados en las posiciones 962-1217. Esta cepa pertenece a la familia LAM y también cae dentro del primer grupo de SNPs. Sin embargo, las posiciones del resto de sus SNPs, no representan un resultado estadísticamente significativo. No hay reportes similares en la literatura de que una sola cepa presente una cantidad tan grande de SNPs. Un análisis posterior de esta cepa en particular resultaría interesante para observar si la presencia de una cantidad tan grande de polimorfismos conlleva implicaciones en su morfología o la interacción con células del hospedero.

Actualmente son pocos los estudios que relacionan polimorfismos de los genes *pe/ppe* con las familias de *M. tuberculosis*. La mayor parte de las investigaciones se centran en la función y evolución de estos genes. El gen *pe\_pgrs18*, según un análisis comparativo de secuencias realizado por Karboul y colaboradores (2006), es parte de un par de genes duplicados (con *pe\_pgrs17*) que muestra evidencia de recombinación homóloga. Estos genes presentan una variación genética llamada polimorfismo 12/40, que consiste en una inserción en el marco de lectura de 12 nucleótidos acompañada de 40 SNPs dispersos en un segmento de ADN de 135 nucleótidos que abarca la unión de las regiones PE y PGRS (Karboul *et al.*,

2006). El polimorfismo 12/40 fue encontrado en varias de las cepas analizadas en este trabajo, específicamente en las familias X, T, Haarlem, NEW-1, Ghana, SNR EA, SNR IO, ND. Estos datos concuerdan con el trabajo previo en el que se señala la presencia de esta variación en cepas de las familias Haarlem y LCC (McEvoy *et al.*, 2012). Así, estos resultados sugieren que en dichas cepas se lleva a cabo la recombinación homóloga previamente descrita con la consecuente conversión de genes con *pe\_pgrs17*. Este polimorfismo 12/40 ha sido empleado para inferir detalles de la evolución y expansión clonal del MTBC, ya que el par de genes *pe\_pgrs17* y *pe\_pgrs18* son propios de las especies de este complejo, y dicha variación puede presentarse en ambos genes, en solo uno de ellos o estar ausente en los dos, y de esta manera se pueden identificar las especies antiguas de las recientes dentro del MTBC (Karboul *et al.*, 2006).

Los resultados que muestran la asociación de polimorfismos del gen *pe\_pgrs18* con las familias de *M. tuberculosis* solo son comparables con el estudio realizado por McEvoy y colaboradores (2012), debido a que es el único estudio previo relacionado, observando una coincidencia con los SNPs 54, 129, 153, 213, 247, 462, 471, 808, 962 y la inserción 297-308. El resto de los polimorfismos encontrados en dicho trabajo no fueron observados en los resultados aquí obtenidos. Por otra parte, también hay coincidencia en la presencia de estos cambios en la secuencia del gen en las familias en que se reportan en ese trabajo con los del presente estudio. Sin embargo, en este trabajo se encontraron polimorfismos de nueva descripción, es decir, no reportados anteriormente.

Otro hallazgo interesante en la secuencia del gen *pe\_pgrs18* fue la presencia de la secuencia IS6110, la cual es un elemento transponible presente en el genoma de MTBC (van Embden *et al.*, 1993). Esta inserción se encontró en las cepas MYC 023 y 056, ambas pertenecientes a la familia LAM y que por la presencia de dicha inserción no se pudieron analizar con el resto de las secuencias. Este tipo de eventos de inserción de la secuencia IS6110 han sido previamente reportados por McEvoy y colaboradores (2009a), pero en genes distintos al de este trabajo, ya que lo reportaron en los genes *ppe38*, *ppe39* y

*ppe40* en un total de 10 aislados de *M. tuberculosis* de las familias Haarlem y Beijing. Así, en este estudio se reporta por primera vez la inserción de dicha secuencia en el gen *pe\_pgrs18*. La razón de la inserción de la secuencias IS6110 en el gen *pe\_pgrs18*, y en los genes *ppe38*, *ppe39* y *ppe40* (McEvoy *et al.*, 2009a), se desconoce, por lo que son necesarios análisis posteriores para aclarar el impacto que la inserción de la secuencia IS6110 pueda tener en el gen y su expresión, principalmente en los genes *pe\_pgrs* en los que el dominio *pe* es responsable de la localización celular de las proteínas codificadas por dichos genes (Cascioferro *et al.*, 2007), y que podría ser afectada por esta inserción.

El gen *pe\_pgrs26* presentó tres tipos de polimorfismos que incluyeron 7 SNPs, 2 inserciones y una delección, resultando estadísticamente significativos los SNPs 368 (presente en familias T, EAI, ND), y 707 (presente en familias T, EAI, Beijing, SNR EA, ND); así como la delección 558-570 (presente en familias Beijing, SNR EA). El resto de resultados no fueron significativos, pero en general se observó que las familias T, X y EAI presentaron la mayor cantidad de polimorfismos en este gen; sin embargo, no se observaron en la totalidad de las cepas de dichas familias, a excepción de la familia EAI. Talarico y colaboradores (2008) reportan una gran cantidad de polimorfismos en este gen, especialmente SNPs y delecciones de más de 100pb. En el estudio realizado por estos investigadores se documenta que los genes *pe\_pgrs26* y *pe\_pgrs16* son inversamente regulados, es decir, cuando un gen aumenta su expresión el otro la disminuye, durante la infección persistente por *M. tuberculosis*, lo que sugiere que la regulación diferencial de la expresión de estos genes puede estar involucrada en la latencia de la bacteria.

De los polimorfismos encontrados en las secuencias analizadas del gen *pe\_pgrs26*, los SNPs en las posiciones 368 (familias T, EAI, ND), 686 (familias X, SNR EA) y 707 (familias T, EAI, Beijing, SNR EA, ND) coinciden con lo reportado en la literatura (Talarico *et al.*, 2008; McEvoy *et al.*, 2012), y el resto son de nueva descripción. En cuanto a la coincidencia con las familias en que se reportan estos cambios, el SNP 686 es reportado en la familia LCC (McEvoy *et al.*, 2012), de la



cual no había cepas en nuestra muestra de estudio; sin embargo, no se había reportado anteriormente la presencia de estos SNPs en la familia T.

Es importante tener en cuenta que gran parte de los polimorfismos reportados en los estudios anteriormente mencionados se encontraron después de la posición 800 de la secuencia. Desafortunadamente el tamaño de secuencia que aquí obtenida fue cercana a las 800pb; y aunque se realizó por duplicado el proceso de secuenciación no se logró obtener una secuencia clara y definida de mayor tamaño. Esto seguramente influyó en que no se consiguiera una detección más amplia de polimorfismos y, por lo tanto, mayor concordancia con los datos ya reportados.

En el gen *pe3* se encontraron 8 SNPs y una inserción, sin resultados estadísticamente significativos en relación con la asociación al genotipo. Los polimorfismos se observaron solamente en familias pertenecientes al linaje Euro-Americano (X, T, LAM, NEW-1) y el SNP 1102, y la inserción 944 se presentó en una cepa de la familia ND. Los SNPs encontrados en la secuencia del gen *pe3* sólo se observaron en cepas pertenecientes al linaje Euro-Americano, pero no se presentaron en todas las cepas que integran cada familia de este linaje, por lo que no se puede establecer una relación entre polimorfismo y familia de *M. tuberculosis*. En los datos publicados en la literatura solo coincide la presencia del SNP 1102 y difiere de la familia en la que se encuentra en este trabajo. Dicho SNP se reporta en la familia LCC (McEvoy *et al.*, 2012) y aquí se encontró en la familia ND, no se cuenta en la colección de cepas con alguna que pertenezca a la familia LCC es por ello que no coincide; la coincidencia de solo un SNP y las diferencias en los demás encontrados con los reportados puede deberse a la diversidad de cepas que se presentan en cada región y los eventos de adaptación que deben sufrir para poder persistir. El resto de SNPs encontrados por dichos autores también son reportados solo en familias pertenecientes al linaje Euro-Americano. No existen más estudios que asocien los polimorfismos en este gen con alguna familia de *M. tuberculosis*.

En el gen *ppe44* se encontraron solamente SNPs en las posiciones 176 y 581, resultando ambos estadísticamente significativos en su asociación al genotipo. McEvoy y colaboradores (2012) reportan la presencia de estos SNPs, así como de tres más que no se encontraron en las secuencias aquí analizadas. Las familias que coinciden con lo reportado por estos investigadores son EAI y Beijing. Adicionalmente, en este trabajo se observó la presencia de dichos cambios en una cepa de la familia T, no reportado anteriormente. Rindi y colaboradores (2007) analizaron 30 aislados clínicos de *M. tuberculosis*, observando que únicamente la familia Beijing presentaba el SNP 581 en el gen *ppe44*, el cual no presentaba variación en cepas de las demás familias analizadas. Además, midieron la expresión del gen *ppe44*, encontrando que la expresión era alta exclusivamente en cepas de la familia Beijing. Con base en estos resultados, los autores proponen que este cambio en la secuencia es exclusivo de dicha familia y a este gen como uno de los más conservados de la familia *ppe*. Un estudio posterior reporta cuatro SNPs adicionales al 581 en éste gen; sin embargo, no se especifica claramente en qué familias se encuentra este SNP en particular (McEvoy *et al.*, 2012).

Este trabajo arroja resultados interesantes en relación con el gen *ppe44*. Aunque dicho gen fue el que menor cantidad de polimorfismos presentó, el SNP 581 se asoció con algunas de las familias reportadas también en el estudio de Rindi y colaboradores (2007). Así, aunque en ambos casos este SNP está presente en la familia Beijing, aquí también se encontró en las familias T, EAI, SNR EA y ND, algo no reportado anteriormente. Esto sugiere que la bacteria sufre cambios genéticos constantes como parte de su adaptación a su estilo de vida patógeno, ya que aunque sigue siendo incierta la función de este gen, estudios previos aportan evidencia de que induce la respuesta inmune celular y humoral (Bonanni *et al.*, 2005; Romano *et al.*, 2008). Es necesario realizar estudios para determinar si este cambio en específico, y su presencia en distintas familias, tiene algún impacto sobre la virulencia de las cepas que lo llevan.

Los aislados analizados en este estudio provenían de pacientes con diferentes manifestaciones de la enfermedad e incluían variantes pulmonares (50 aislados),

meníngeas (5 aislados), ganglionares (1 aislado) y mixtas (3 aislados). Con el objetivo de establecer una posible asociación entre el origen clínico y los polimorfismos encontrados, se realizó un análisis de correlación. La evaluación arrojó que para el gen *pe\_pgrs18* existen dos grupos de SNPs. El primer grupo está integrado por 41 SNPs ubicados entre las posiciones 295 - 450, y el segundo incluyó a tres SNPs en las posiciones 507, 508 y 510. Ambos grupos están presentes en el 50% de los aislados pulmonares (25 de 50) y en el único aislado ganglionar. Además, en estos mismos aislados se presentó la inserción 297-308. El resto de los SNPs, inserciones y deleciones, no presentaron asociaciones significativas con el genotipo de las cepas analizadas. Los aislados pulmonares presentaron los tres tipos de polimorfismos, mientras que en las cepas meníngeas y mixtas sólo se observaron SNPs y en la cepa ganglionar se encontraron SNPs y la inserción 297-308; no existen estudios relacionados en los que intenten asociar los polimorfismos del gen *pe\_pgrs18* con la procedencia clínica de las cepas.

Para el gen *pe\_pgrs26* se encontró solamente una asociación estadísticamente significativa, entre el SNP 302 y un aislado de TB meníngea. Las cepas pulmonares presentaron SNPs, inserciones y deleciones, mientras que las mixtas sólo SNPs y la ganglionar no presentó ningún cambio en su secuencia.

En cuanto al gen *pe3* sólo se presentaron SNPs y una inserción en los aislados pulmonares, siendo el SNP 1102 el que se observó en 5 de las 50 cepas. El resto de los cambios en la secuencia del gen solo los presentaron una o dos cepas, por lo que no se encontraron asociaciones significativas genotipo-polimorfismo.

Finalmente, el SNP 176 del gen *ppe44* estuvo presente en 4 aislados pulmonares y uno mixto. El SNP 581 se encontró en 5 cepas pulmonares, una meníngea y una mixta. El aislado ganglionar no presentó cambios en este gen. Ninguna de estas asociaciones resultaron significativas.

Cabe señalar que en ningún caso se presentó un polimorfismo en la totalidad de aislados de un mismo origen. Sin embargo, sería necesario ampliar el número de cepas analizadas para poder afirmar o negar una posible asociación entre

determinados cambios en las secuencias de los genes y el tipo de manifestación clínica que en la cual se presentan.

Desafortunadamente no existen estudios que permitan una comparación de los resultados entre los polimorfismos en los genes aquí evaluados con los distintos orígenes en relación al tipo de tuberculosis en el cual se encontraron las cepas. Sin embargo, si se han realizado análisis similares con el gen *pe\_pgrs33* (Wang *et al.*, 2011; Talarico *et al.*, 2007), encontrando ciertos cambios en la secuencia presentes en cepas provenientes de casos de TB meníngea en pacientes pediátricos.

## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

- I. Los tipos de polimorfismos encontrados en los genes *pe* y *ppe* fueron SNPs, inserciones y deleciones.
- II. El gen *pe\_pgrs18* presentó asociación entre el grupo de SNPs 54-247 y las familias LAM, T, Haarlem, EAI, Beijing, SNR EA, SNR IO, ND; y entre los grupos de SNPs 295-510, 774 y 808, y la inserción 297-308 y las familias X, T, Haarlem, NEW-1, Ghana, SNR EA, SNR IO, ND.
- III. Se observó la asociación del SNP 368 del gen *pe\_pgrs26* con las familias T, EAI, ND; el SNP 707 y las familias T, EAI, Beijing, SNR EA, ND; así como entre la deleción 558-570 y las familias Beijing, SNR EA.
- IV. El gen *pe\_pgrs18* presentó 151 polimorfismos en total en el 71.1% de las cepas analizadas, siendo el más variable de los 4 genes estudiados.
- V. El SNP 176 del gen *ppe44* presentó asociación con las familias T, EAI, ND; mientras que el 581 con las familias T, EAI, Beijing, SNR EA, ND. Siendo este último reportado por primera vez para familias diferentes a la Beijing.
- VI. Varios aislados pulmonares presentaron los tres polimorfismos en las secuencias de los cuatro genes de estudio, y fue el único caso clínico que presentó cambios en la secuencia del gen *pe3*.
- VII. El único aislado ganglionar presentó únicamente cambios en la secuencia del gen *pe\_pgrs18*.
- VIII. En el gen *pe\_pgrs18* se observó una relación entre los SNPs 295-450, 507, 508 y 510, y la inserción 297-308, y el 50% de los aislados pulmonares y el aislado ganglionar.
- IX. Se presentó asociación entre el SNP 302 del gen *pe\_pgrs26* y un aislado de TB meníngea.

---

## 10. CONCLUSIÓN

Se aceptó parcialmente la hipótesis planteada, ya que se logró establecer una correlación entre polimorfismos de los genes *pe/ppe* y las familias de las cepas de *M. tuberculosis*, pero no se observó una relación con su origen clínico.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CM, *et al.* (2007). Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol.* 5(11):883-91.

Abdallah AM, Verboom T, Hannes F, Safi M, Strong M, Eisenberg D, *et al.* (2006). A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol.* 62(3):667–679.

Akhter Y, Ehebauer MT, Mukhopadhyay S, Hasnain SE. (2012). The PE/PPE multigene family codes for virulence factors and is possible source of mycobacterial antigenic variation: perhaps more? *Biochimie.* 94(1):110-6. doi: 10.1016/j.biochi.2011.09.026.

American Thoracic Society. (2000). Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med.* 161(4 Pt 1):1371-1395.

Baboolal S, Millet J, Akpaka PE, Ramoutar D, Rastogi N. (2009). First insight into *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology and genetic diversity in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol.* 47(6):1911-1914. doi: 10.1128/JCM.00535-09.

Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prevost MC, Cole ST. (2002). Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol Microbiol.* 44(1):9–19.

Basu S, Pathak SK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Yang Z, *et al.* (2007). Execution of macrophage apoptosis by PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 282(2):1039–1050.

Berthet FX, Lagrandiere M, Gounun P, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Chavarot P, *et al.* (1998). Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. *Science.* 282(5389):759-62. doi:10.1126/science.282.5389.759.

Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, Gurcha SS, Kremer L, Chen B, *et al.* Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *PNAS.* 104(12):5157-62. doi: 10.1073/pnas.0608654104.

Bonanni D, Rindi L, Lari N, Garzelli C. (2005). Immunogenicity of mycobacterial PPE44 (Rv2770c) in *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *J Med Microbiol.* 54(Pt 5):443-8.

Bottai D, Di Luca M, Majlessi L, Frigui W, Simeone R, Sayes F, *et al.* (2012). Disruption to the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of wall integrity and strong attenuation. *Mol Microbiol.* 83(6): 1195-1209. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08001.x.

Brennan MJ, Delogu G, Chen Y, Bardarov S, Kriakov J, Alavi M, Jacobs WR Jr. (2001). Evidence that mycobacterial PE\_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun.* 69(12):7326–7333.

Bretl DJ, Demetriadou C, Zahrt TC. (2011). Adaptation to environmental stimuli within the host: two component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75(4):566-582. doi: 10.1128/MMBR.05004-11.

Calamita H, Ko C, Tyagi S, Yoshimatsu T, Morrison NE, Bishai WR. (2005). The *Mycobacterium tuberculosis* SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and required for full virulence. *Cell Microbiol.* 7(2):233-244.

Casadevall A, Pirofski LA. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun.* 67(8):3703-13.

Cascioferro A, Delogu G, Colone M, Sali M, Stringaro A, Arancia G, *et al* (2007). PE is a functional domain responsible for protein translocation and localization on mycobacterial cell wall. *Mol Microbiol.* 66(6):1536-1547.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al.* (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393(6685):537-44.

Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. (2009). Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One.* 4(11):e7815. doi: 10.1371/journal.pone.0007815.

Copin R, Coscolla M, Seiffert SN, Bothamley G, Sutherland J, Mbayo G, *et al.* (2014). Sequence diversity in the pe\_pgrs genes of *Mycobacterium tuberculosis* is independent of human T cell recognition. *mBio.* 5(1):e00960-13. doi: 10.1128/mBio.00960-13.



Danilchanka O, Mailaender C, Niederweis M. (2008). Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(7):2503-2511.

Deb C, Daniel J, Sirakova TD, Abomoelak B, Dubey VS, Kolattukudy PE. (2006). A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 281(7):3866-3875.

Delogu G, Pusceddu C, Bua A, Fadda G, Brennan MJ, Zanetti S. (2004). Rv1818c encoded PE\_PGERS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Mol Microbiol.* 52(3):725-733.

Dong D, Wang D, Li M, Wang H, Yu J, Wang C, *et al.* (2012). PPE38 modulates the innate immune response and is required for *Mycobacterium marinum* virulence. *Infect Immun.* 80(1):43-54. doi: 10.1128/IAI.05249-11.

Dou HY, Tseng FC, Lin CW, Chang JR, Sun JR, Tsai WS, *et al.* (2008). Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Mycobacterium tuberculosis* in Taipei. *BMC Infect Dis.* 8:170. doi: 10.1186/1471-2334-8-170.

Esteban J, Fernández-Roblas R, Ortiz A, García-Cía JI. (2006). Pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae*: usefulness of randomly amplified polymorphic DNA analysis to assess the clonality of the isolates. *Clin Microbiol Infect.* 12(7): 677-679.

Ferrer ND, Gomez AB, Neyrolles O, Gicquel B, Martin C. (2010). Interactions of attenuated *Mycobacterium tuberculosis* *phoP* mutant with human macrophages. *PLoS One.* 5(9):e12978. doi: 10.1371/journal.pone.0012978.

Fishbein S, van Wyk N, Warren RM, Sampson SL. (2015). Phylogeny to function: PE/PPE protein evolution and impact on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol.* 96(5):901-16. doi: 10.1111/mmi.12981.

Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, Santangelo MP, *et al.* (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Landes Bioscience.* 4(1):3-66. doi: 10.4161/viru.22329.

Gagneux S, Small PM. (2007). Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis.* 7(5):328-337.

Gey van Pittius NC, Gamielien J, Hide W, Brown GD, Siezen RJ, Beyers AD. (2001). The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol.* 2(10):1-18. doi:10.1186/gb-2001-2-10-research0044.

Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, Warren RM. (2006). Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (*esx*) gene cluster regions. *BMC Evol Biol* 6: 95.

Godreuil S, Torrea G, Terru D, Chevenet F, Diagbouga S, Supply P, *et al.* (2007). First molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* in Burkina Faso. *J Clin Microbiol.* 45(3):921-927.

Griffiths TA, Rioux K, De Buck J. (2008). Sequence polymorphisms in a surface PPE protein distinguish Types I, II, and III of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 46(4): 1207–1212.

Gutacker MM, Smoot JC, Migliaccio CAL, Ricklefs SM, Hua SDV, Cousins DV, *et al.* (2002). Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics.* 162(4):1533-1543.

Harn HJ, Shen KL, Ho LI, Yu KW, Liu GC, Yueh KC, Lee JH. (1997). Evidence of transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting in Taipei City, Taiwan. *J Clin Pathol.* 50(6):505-508.

Huang Y, Zhou X, Bai Y, Yang L, Yin X, Wang Z, Zhao D. (2012). Phagolysosome maturation of macrophages was reduced by PE\_PGRS62 protein expressing in *Mycobacterium smegmatis* and induced in IFN-gamma priming. *Vet Microbiol.* 160(1-2):117-125. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.05.011

Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. (2003). PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol.* 41(4):1637.

Iantomasi R, Sali M, Cascioferro A, Palucci I, Zumbo A, Soldini S, *et al.* (2012). PE\_PGRS30 is required for the full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol.* 14(3):356-367.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, *et al.* (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 35(4):907-914.

Karboul A, Gey van Pittius NC, Namouchi A, Vincent V, Sola C, Rastogi N, *et al.* (2006). Insights into the evolutionary history of tubercle bacilli as disclosed by genetic rearrangements within a PE\_PGRS duplicated gene pair. *BMC Evol Biol.* 6:107.

Karboul A, Mazza A, van Pittius NCG, Ho JL, Brousseau R, Mardassi H. (2008). Frequent homologous recombination events in *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE multigene families: potential role in antigenic variability. *J Bacteriol.* 190(23):7838-7846. doi: 10.1128/JB.00827-08.

Kato-Maeda M, Gagneux S, Flores LL, Kim EY, Small PM, Desmond EP, *et al.* (2011). Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis*: congruence between large sequence polymorphisms and spoligotypes. *Int J Tuberc Lung Dis.* 15(1):131-133.

Kaufman SHE. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol.* 1(1):20-30.

Kohli S, Singh Y, Sharma K, Mittal A, Ehtesham NZ, Hasnain SE. (2012). Comparative genomic and proteomic analyses of PE/PPE multigene family of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra reveal novel and interesting differences with implications in virulence. *Nucleic Acids Res.* 40(15):7113-7122. doi: 10.1093/nar/gks465.

Lazzarini OCL, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Kurepina N, *et al.* (2007). Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 45(12):3891-3902.

Lee JH, Karakousis PC, Bishai WR. (2008). Roles of SigB and SigF in the *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor network. *J Bacteriol.* 190(2):699-707.

Lee JS, Krause R, Schreiber J, Mollenkopf HJ, Kowall J, Stein R, *et al.* (2008). Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain. *Cell Host Microbe.* 3(2):97-103. doi: 10.1016/j.chom.2008.01.002.

Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. (2011). TubercuList-10 years after. *Tuberculosis.* 91(1):1-7. doi: 10.1016/j.tube.2010.09.008.

Linton CJ, Jalal H, Leeming JP, Millar MR. (1994). Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 32(9):2169-7214.

López-Calleja AI, Gavín P, Lezcano MA, Vitoria MA, Iglesias MJ, Guimbao J, *et al.* (2009). Unsuspected and extensive transmission of a drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strain. *BMC Pulmonary Medicine.* 9:3. doi: 10.1186/1471-2466-9-3.

Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. (2006). Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev.* 19(4):658-685.

McEvoy C, Cloete R, Müller B, Schürch AC, van Helden PD, Gagneux S, *et al.* (2012). Comparative analysis of *Mycobacterium tuberculosis* pe and ppe genes reveals high sequence variation and an apparent absence of selective constraints. *PLoS One*. 7(4):e30593. doi: 10.1371/journal.pone.0030593.

McEvoy CR, van Helden PD, Warren RM, van Pittius NCG. (2009b). Evidence for a rapid rate of molecular evolution at the hypervariable and immunogenic *Mycobacterium tuberculosis* PPE38 gene region. *BMC Evol Biol*. 9:237. doi: 10.1186/1471-2148-9-237.

McEvoy CR, Warren RM, van Helden PD, Gey van Pittius NC. (2009a). Multiple, independent, identical IS6110 insertions in *Mycobacterium tuberculosis* PPE genes. *Tuberculosis*. 89(6):439-442. doi: 10.1016/j.tube.2009.08.001.

McGuire AM, Weiner B, Park ST, Wapinski I, Raman S, Dolganov G, *et al.* (2012). Comparative analysis of *Mycobacterium* and related Actinomycetes yields insight into the evolution of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *BMC Genomics*. 13:120. doi: 10.1186/1471-2164-13-120.

Mukhopadhyay S, Balaji KN. (2011). The PE and PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 91(5):441-447. doi: 10.1016/j.tube.2011.04.004.

Nair S, Ramaswamy PA, Ghosh S, Joshi DC, Pathak N, Siddiqui I, *et al.* (2009). The PPE18 of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with TLR2 and activates IL-10 induction in macrophage. *J Immunol*. 183(10):6269-6281. doi: 10.4049/jimmunol.0901367.

Namouchi A, Karboul A, Fabre M, Gutierrez MC, Mardassi H. (2013). Evolution of smooth tubercle bacilli PE and PE\_PGRS genes: evidence for a prominent role of recombination and imprint of positive selection. *PLoS One*. 8(5):e64718. doi: 10.1371/journal.pone.0064718.

Nicol MP, Wilkinson RJ. (2008). The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 102(10):955-965. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.03.025.

O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry PR. (2013). The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 31:475-527. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095939.

Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. (2007). *Tuberculosis 2007*. First Edit. (Palomino JC, Leão SC, Ritacco V, eds.). BourcillierKamps.com. pp93-97.

Raviglione M, O'Brien R. (2008). Enfermedades por *Mycobacterias*. En Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J (Editores). *Harrison Principios de Medicina Interna*. México: McGraw-Hill, 17ª. Ed. pp 1012-1019.

Reed, MB, Pichler, VK, McIntosh, F, Mattia, A, Fallow, A, Masala, S, *et al.* (2009). Major *Mycobacterium tuberculosis* lineages associate with patient country of origin. *J Clin Microbiol.* 47(4):1119-1128. doi: 10.1128/JCM.02142-08.

Reyes A, Sandoval A, Cubillos-Ruiz A, Varley KE, Hernandez-Neuta I, Samper S, *et al.* (2012). IS-seq: a novel high throughput survey of in vivo IS6110 transposition in multiple *Mycobacterium tuberculosis* genomes. *BMC Genomics.* 13:249. doi: 10.1186/1471-2164-13-249.

Rindi L, Peroni I, Lari N, Bonanni D, Tortoli E, Garzelli C. (2007). Variation of the expression of *Mycobacterium tuberculosis ppe44* gene among clinical isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 51: 381–387.

Romano M, Rindi L, Korf H, Bonanni D, Adnet PY, Jurion F, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis subunit vaccines expressing PPE44 (Rv2770c). *Vaccine.* 26(48):6053-63.

Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H. (1998). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol.* 36(1):139-147.

Sachdeva P, Misra R, Tyagi AK, Singh Y. (2010). The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J.* 277(3):605-626. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07479.x.

Safi H, Barnes PF, Lakey DL, Shams H, Samten B, Vankayalapati R, Howard ST. (2004). IS6110 functions as a mobile, monocyte-activated promoter in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 52(4):999-1012.

Sampson SL, Lukey P, Warren RM, van Helden PD, Richardson M, Everett MJ. (2001). Expression, characterization and subcellular localization of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE gene Rv1917c. *Tuberculosis (Edinb).* 81(5-6):305–317.

Simeone R, Bottai D, Brosch R. (2009). ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol.* 12(1):4-10. doi: 10.1016/j.mib.2008.11.003.

Soldini S, Palucci I, Zumbo A, Sali M, Ria F, Manganelli R, *et al.* (2011). PPE\_MPTR genes are differentially expressed by *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *Tuberculosis*. 91(6):563-568. doi: 10.1016/j.tube.2011.08.002.

SSA. (2014). SUIVE/DGE/SecretariadeSalud/EstadosUnidosMexicanos2014.

Stavrum R, Valvatne H, Bø TH, Jonassen I, Hinds J, Butcher PD, Grewal HM. (2008). Genomic diversity among Beijing and non-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Myanmar. *PLoS ONE*. 3(4):e1973. doi: 10.1371/journal.pone.0001973.

Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol*. 39(10):3563–3571.

Takewaki S-ichi, Okuzumi K, Ishiko H, Nakahara K-ichi. (1994). Genus-specific polymerase chain reaction for the Mycobacterial *dnaJ* gene and species-specific oligonucleotide probes. *Microbiol*. 31(2):446-450.

Talarico S, Cave MD, Foxman B, Marrs CF, Zhang L, Bates JH, Yang Z. (2007). Association of *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS33 polymorphism with clinical and epidemiological characteristics. *Tuberculosis (Edinb)*. 87(4):338–346.

Talarico S, Cave MD, Marrs CF, Foxman B, Zhang L, Yang Z. (2005). Variation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS 33 gene among clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 43(10):4954–4960.

Talarico S, Zhang L, Marrs CF, Foxman B, Cave MD, Brennan MJ, Yang Z. (2008). *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS16 and PE\_PGRS26 genetic polymorphism among clinical isolates. *Tuberculosis (Edinb)*. 88(4):283–294. doi: 10.1016/j.tube.2008.01.001.

Tazi L, Kreiswirth B, Carrière C, Tibayrenc M. (2002). Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and its relevance to the surveillance and control of TB: an e-debate. *Infect Genet Evol*. 2(2):153-158.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. 31(2):175-178.

Thi EP, Lambertz U, Reiner NR. (2012). Sleeping with the enemy : how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. *PLoS Pathog*. 8(3):e51686.

Tiwari BM, Kannan N, Vemu L, Raghunand TR. (2012). The *Mycobacterium tuberculosis* PE proteins Rv0285 and Rv1386 modulate innate immunity and mediate bacillary survival in macrophages. *PLoS ONE*. 7(12):e51686. doi: 10.1371/journal.pone.0051686.

Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, Moreira AL, Kurepina N, Reed MB, *et al.* (2005). 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*. 192(1):98-106.

van der Woude AD, Sarkar D, Bhatt A, Sparrius M, Raadsen SA, Boon L, *et al.* (2012). Unexpected link between lipooligosaccharide biosynthesis and surface protein release in *Mycobacterium marinum*. *J Biol Chem*. 287(24):20417-20429. doi: 10.1074/jbc.M111.336461.

van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, *et al.* (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 31(2):406-409.

van Soolingen, D. (2001). Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med*. 249(1): 1-26.

Vázquez-Marrufo G, Marín-Hernandez D, Zavala-Páramo MG, Vázquez-Narvaez G, Alvarez-Aguilar C, Vázquez-Garcidueñas MS. (2008). Genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Mexican patients. *Can J Microbiol*. 54(8):610-618. doi: 10.1139/w08-051.

Voskuil MI, Schnappinger D, Rutherford R, Liu Y, Schoolnik GK. (2004). Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE genes. *Tuberculosis*. 84(3-4): 256-262.

Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, Laval F, Daffe M, Smith I. (2006). The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol Microbiol*. 60(2):312-330.

Wang J, Huang Y, Zhang A, Zhu C, Yang Z, Xu H. (2011). DNA polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS33 gene among clinical isolates of pediatric TB patients and its associations with clinical presentation. *Tuberculosis*. 91: 287-292.

WHO. (2009). Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009 (Publication no. WHO/HTM/TB/2009.411.). Geneva: World Health Organization.

WHO. (2014). Global tuberculosis report 2014 (Publication no. WHO/HTM/TB/2014.08). Geneva: World Health Organization.

Williams EP, Lee JH, Bishai WR, Colantuoni C, Karakousis PC. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* SigF regulates genes encoding cell Wall-associated proteins and directly regulates the transcriptional regulatory gene *phoY1*. *J Bacteriol.* 189(11):4234-4242.

Zhang Q, Kennon R, Koza MA, Hulten K, Clarridge III JE. (2002). Pseudoepidemic due to a unique strain of *Mycobacterium szulgai*: genotypic, phenotypic, and epidemiological analysis. *J Clin Microbiol.* 40(4):134-1139.

Zumbo A, Palucci I, Cascioferro A, Sali M, Ventura M, D'Alfonso P, *et al.*(2013). Functional dissection of protein domains involved in the immunomodulatory properties of PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathog Dis.* 69(3):232-239. doi: 10.1111/2049-632X.12096.