



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

“Polimorfismos en el gen *pe_pgrs18* en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Michoacán y Querétaro y su asociación con el genotipo y datos clínicos”

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO**

P R E S E N T A

EVA NELIDA JIMÉNEZ RUIZ

DIRECTORA DE TESIS:

D. en C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS

CO-DIRECTORA DE TESIS:

D. en C. ANA LAURA GUILLÉN NEPITA

Morelia, Michoacán, octubre 2017



AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por darme la fuerza y la valentía para poder realizar este trabajo además de estar conmigo siempre.

A mi Mamá que gracias a su apoyo pude concluir este gran sueño, por siempre confiar en mí, preocuparse conmigo en los momentos difíciles, brindarme fortaleza para seguir adelante y todo su cariño.

A mi hermana por estar siempre al pendiente de mí, por su apoyo siempre en las decisiones difíciles, por confiar en mí, por sus consejos y amistad.

A mi Papi que aunque ya no esté con nosotras sé que nos cuida donde quiera que esté.

También quiero agradecer a mi asesora la Doctora Sol por haberme brindado la oportunidad de realizar el servicio social y este proyecto en su laboratorio, por la confianza y compartir sus conocimientos conmigo.

A mi co-asesora Anita, Erandi y Andrea por encaminarme en este proyecto, por sus enseñanzas, tiempo y consejos para realizar un mejor trabajo tanto en lo práctico como en lo teórico.

A mis compañeros del laboratorio Mar, Adrián, Rubén, Edgardo y Estela por formar parte de este camino conmigo, compartir sus experiencias y siempre hacerme reír.

A mis amigas Sol, May, Jessi y Miriam por su confianza, cariño y amistad que me han brindado siempre.

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 la 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 “Genotipificación y búsqueda de marcadores de virulencia en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Michoacán y Querétaro”
- 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”

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT	VI

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Agente causal de la tuberculosis	1
1.1.1 Composición de la envoltura celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.2 Vía de transmisión	2
1.3 Mecanismo de Invasión	3
1.4 Cuadro clínico de la tuberculosis	4
1.4.1 Tuberculosis pulmonar	5
1.4.2 Tuberculosis extra pulmonar	5
1.4.3 Tuberculosis diseminada	6
1.5 Epidemiología	6
1.6 Detección del agente causal	9
1.6.1 IS6110 RFLP	10
1.6.2 Spoligotyping	11
1.6.3 RAPD: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplified Polymorphic DNA)	12
1.6.4. MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-variable-number tandem repeat analysis)	12
1.7 Patogenicidad y virulencia	12
□ Antígenos solubles	13
□ Proteínas	13
□ Antígenos de secreción	13
□ Componentes glicosilados de la envoltura de <i>M. tuberculosis</i> que intervienen en la patogénesis	13
1.8 Genes de virulencia	13
1.8.1 Familia de genes PE/PPE	14
1.8.2 Evolución y variación de las familias PE/PPE	15
1.8.3 Regulación de la transcripción de genes <i>pe/ppe</i>	19
1.8.4 Localización y función de las proteínas PE/PPE	20
1.8.5 Regiones conservadas de PE_PGRS en la cepa H37Rv	23
1.8.6 Polimorfismos en los genes <i>pe/ppe</i>	24
1.9 Antecedentes	27
2. JUSTIFICACIÓN	29

3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVOS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS ESPECIFICOS	30
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1 Material biológico	32
6.2 Extracción de ADN	33
6.3 Amplificación por PCR del gen <i>pe_pgrs18</i>	34
6.4. Secuenciación de los productos de PCR	35
6.5 Análisis bioinformático	35
6.6 Análisis Estadístico	35
7. RESULTADOS	36
7.1 Amplificación del gen <i>pe_pgrs18</i>	36
7.2 Secuencias de los fragmentos amplificados	37
7.3 Detección de SNPs, inserciones y deleciones del gen <i>pe_pgrs18</i> en las cepas de estudio.	38
7.4 Modelado de la proteína PE_PGRS18	42
7.5 Análisis de los polimorfismos del gen <i>pe_pgrs18</i> encontrados en las regiones conservadas de las cepas de estudio.	42
7.6 Efecto de los polimorfismos sobre la proteína.	46
7.7 Asociación de los polimorfismos con los genotipos de las cepas de estudio....	47
7.8 Asociación de polimorfismos del gen <i>pe_pgrs18</i> con la familia y linaje de las cepas de estudio.	50
7.9. Asociación de los polimorfismos con los datos epidemiológicos y características clínicas de las cepas.	54
7.10 Asociación entre los polimorfismos y la jurisdicción sanitaria de las cepas.	55
7.11 Asociación de los polimorfismos con el sexo y la edad del paciente.	57
8. DISCUSIÓN	61
9. RESUMEN DE RESULTADOS	69
10. CONCLUSIÓN	71
11. BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Descripción	Pág.
1	Características clínicas, genotípicas y resistencia a antibióticos de las cepas de estudio.	32
2	Polimorfismos encontrados en el gen <i>pe_pgrs18</i> en las cepas de estudio de acuerdo a la entidad de origen.	39
3	Polimorfismos del gen <i>pe_pgrs18</i> encontrados en las regiones conservadas de algunas de las cepas de estudio	43
4	Predicciones de los polimorfismos encontrados en las regiones conservadas.	46
5	Tipos de polimorfismos en el gen <i>pe_pgrs18</i> , posiciones y genotipos en que se encuentran.	49
6	Polimorfismos, familia y linaje de las cepas de estudio.	51
7	Origen clínico de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen <i>pe_pgrs18</i>	55
8	Jurisdicción sanitaria de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen <i>pe_pgrs18</i> .	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Descripción	Pag.
1	Incidencia mundial de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en todas las formas.	7
2	Mapa físico del elemento de inserción IS6110 de 1.35 kb en <i>M. tuberculosis</i> .	10
3	Estructura de repetidos directos (DR) en el genoma micobacteriano.	11
4	Estructura de los genes <i>pe/ppe</i>	15
5	Reconstrucción filogenética de relaciones evolutivas entre los miembros de la familia de proteínas PE.	17
6	Influencia de las proteínas PE/PPE en el procesamiento del macrófago por <i>M. tuberculosis</i>	23
7	Productos de amplificación del gen <i>pe_pgrs18</i> obtenidos con el ADN de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> .	36
8	Electroferogramas representativos de las secuencias obtenidas del gen <i>pe_pgrs18</i> .	37
9	Alineamiento múltiple de algunas de las cepas con el gene de estudio	39
10	Número de SNPs presentes en el gen <i>pe_pgrs18</i> de cada una de las cepas de estudio.	40
11	Número de inserciones presentes en el gen <i>pe_pgrs18</i> de cada una de las cepas de estudio	41
12	Número de deleciones presentes en el gen <i>pe_pgrs18</i> de cada una de las cepas de estudio.	41
13	Modelado de la estructura de la proteína PE_PGRS18.	42
14	Regiones conservadas de la secuencia del gen <i>pe_pgrs18</i> .	43
15	Cepas que presentan SNPs en regiones conservadas.	44
16	Cepas que presentan Inserciones en regiones conservadas.	45
17	Cepas que presentan deleciones en regiones conservadas.	45
18	Asociación entre los polimorfismos del gen <i>pe_pgrs18</i> y los	48

	genotipos de las cepas de estudio.	
19	Asociación entre los polimorfismos del gen <i>pe_pgrs18</i> y la familia de las cepas de estudio.	50
20	Asociación entre los polimorfismos del gen <i>pe_pgrs18</i> y los linajes de <i>M.tuberculosis</i> .	53
21	Localización clínica (P/EP/M) de las cepas de estudio	54
22	Jurisdicción sanitaria de las cepas de estudio.	56
23	Asociación entre los polimorfismos del gen <i>pe_pgrs18</i> y la Jurisdicción sanitaria de las cepas de estudio.	57
24	Edad de los pacientes y el número de cepa correspondiente.	58
25	Asociación entre los polimorfismos del gen <i>pe_pgrs18</i> y la edad de los pacientes de quienes se aislaron las cepas de estudio.	59

RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis se clasifica en 6 linajes que se subdividen en familias y genotipos con características fenotípicas particulares, que influyen en su virulencia y transmisibilidad. Algunos de los genes *pe/ppe* de *M. tuberculosis* codifican para proteínas asociadas con la virulencia y la modulación de la respuesta inmune del huésped. Estos genes son altamente polimórficos y dichos polimorfismos se han relacionado con variaciones en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas para las cuales codifican y con la patogenicidad de las cepas que los presentan. Nuestro grupo de trabajo cuenta con cepas de *M. tuberculosis* aisladas del 2009 al 2015 de pacientes de Michoacán y Querétaro. Se sabe que más del 50% de las cepas aisladas del 2009 al 2011, presentan polimorfismos en el gen *pe_pgrs18*, y que ciertos polimorfismos se relacionan con el origen clínico. En este trabajo se detectaron los polimorfismos en el gen *pe_pgrs18* de 59 cepas de *M. tuberculosis* de las cuales 40 fueron aisladas en Michoacán durante 2009-2014 y 19 de Querétaro durante 2015. Para las cepas de Michoacán se determinó si existía una relación entre dichos polimorfismos con el genotipo y los datos epidemiológicos. De todas las cepas, 26 presentaron variaciones en las regiones conservadas del gen, de las cuales 16 son de Michoacán con 77 SNPs, 1 inserción y 11 deleciones y 10 de Querétaro, con 224 SNPs, 2 inserciones y 14 deleciones. Las cepas más polimórficas fueron MYC 106 y MYC 107 de Querétaro y la cepa MYC 066 de Michoacán. El programa PROVEAN predijo que seis de las cepas poseen polimorfismos perjudiciales para la proteína, de las cuales 4 son de Michoacán y 2 de Querétaro. Se observó el polimorfismo 12/40 en 27 de las cepas de estudio, consistente en una inserción de 12 nucleótidos en la posición 354 a la 365 y 40 SNPs entre la posición 352 a la 579. Cuatro de las cepas de Michoacán de las familias X, LAM y EAI presentaron asociación con un grupo de SNPs en las posiciones 83 y 300. No se encontró asociación entre la localización clínica de la enfermedad y el sexo de los pacientes con los polimorfismos en las cepas de Michoacán.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, genes *pe/ppe*, polimorfismos, genotipo, gen *pe_pgrs18*.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is classified into 6 lineages that are subdivided into families and genotypes with particular phenotypic characteristics, which influence its virulence and transmissibility. Some of the *pe/ppe* genes of *M. tuberculosis* encode the proteins associated with virulence and modulation of the host's immune response. These genes are highly polymorphic and such polymorphisms have been associated with variations in the physicochemical properties of the proteins they encode and with the pathogenicity of the strains that present them. Our work group has strains of *M. tuberculosis* isolated from 2009 to 2015 from patients from Michoacán and Querétaro. It is known that more than 50% of the strains isolated from 2009 to 2011 have polymorphisms in the *pe_pgrs18* gene, and that certain polymorphisms are related to the clinical origin. In this work, polymorphisms were detected in the *pe_pgrs18* gene of 59 *M. tuberculosis* strains, of which 40 were isolated in Michoacán during 2009-2014 and 19 in Querétaro during 2015. For the Michoacán strains, it was determined whether there was a relationship between such polymorphisms with the genotype and the epidemiological data. Of all the strains, 26 presented variations in conserved regions of the gene, of which 16 are from Michoacán with 77 SNPs, 1 insertion and 11 deletions, and 10 from Querétaro with 224 SNPs, 2 insertions and 14 deletions. The most polymorphic strains were MYC 106 and MYC 107 from Querétaro and MYC 066 from Michoacán. The PROVEAN program predicted that 6 of the strains have polymorphisms detrimental to the protein, of which 4 are from Michoacán and 2 from Querétaro. The 12/40 polymorphism was observed in 27 of the study strains, consistent in an insertion of 12 nucleotides at positions 354 through 365 and 40 SNPs between positions 352 through 579. Four of the Michoacán strains from families X, LAM and EAI presented association with a group of SNPs in positions 83 and 300. No association was found between the clinical location of the disease and the sex of the patients with the polymorphisms in the Michoacán strains.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, *pe/ppe* genes, polymorphisms, genotype, *pe_pgrs18*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Agente causal de la tuberculosis.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica, causada por un grupo de bacterias del orden Actinomicetales de la familia Mycobacteriaceae. . Este grupo se denomina Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) e incluye, entre otras, a las especies *M. tuberculosis* y *M. africanum* son específicas en humanos, mientras que las especies del complejo asociadas a otros mamíferos son *M. bovis* (incluida la cepa BCG) en bovinos, *M. microti* en roedores, *M. caprae* en caprinos, *M. pinnipedii* en focas y lobos marinos y *M. orygis* en diversas especies a demás están las especies que no muestran una asociación clara al hospedero que incluyen a *M. canettii*. Productoras todas ellas de tuberculosis en el humano, siendo la primera la que se aísla con mayor frecuencia,

Mycobacterium tuberculosis se caracteriza por ser un microorganismo intracelular facultativo, aerobio, inmóvil, que se replica dentro de los fagosomas de los macrófagos. Su tiempo de duplicación es de 12 horas o más por lo que su crecimiento en medios de cultivo es muy lento. Es sensible al calor, rayos ultravioleta y al sol directo, presenta resistencia a ácidos, alcoholes, álcalis, desinfectantes y a la desecación; además es naturalmente resistente a muchos antibióticos debido principalmente a la envoltura celular altamente hidrofóbica que actúa como una barrera impermeable lo que hace difícil su tratamiento (Rivera et al., 2005).

1.1.1 Composición de la envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

Es una estructura compleja constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática (Gorocica et al., 2005).

La capsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias y sirve de protección contra factores externos, así que tiene interacción directa con los elementos de la respuesta inmune. Sus características y composición varían en las diferentes especies y cepas de micobacterias. Entre los principales

componentes se encuentran el ácido micólico y glicolípidos; estos glicolípidos junto con algunas proteínas son responsables de las características antigénicas de la bacteria.

La pared celular es compleja, posee un alto contenido de lípidos (40%), proteínas y polisacáridos, rica en ácidos micólicos, que se encuentran unidos covalentemente con glicolípidos tales como: α,α - tetrahalosa dimicolato (TDM, cord factor) y α,α - trihalosa monomycolato (TMM). Se encuentra separada de la membrana celular espacio periplásmico, con cuatro capas:

- a) La más interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetil glucosamina y ácido-N glucolilmurámico, con cortas cadenas de alanina. Esta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez.
- b) Capa compuesta por polímeros de arabinosa y galactosa.
- c) Ácidos micólicos (que son derivado de ácidos grasos). Tiene de 70 – 80 carbonos y se le atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura
- d) La superficie formada por lípidos como los sulfolípidos, el cord factor, llamado así por su aparente asociación con la forma acordeonada con que se agrupan las micobacterias virulentas, y los micósidos.

Función: Esta barrera permeable protege al organismo del medio ambiente, además contribuye a la persistencia de la enfermedad y a la resistencia a muchos antibióticos a la vez que contribuye a la longevidad de la micobacteria

La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como la lipoarabinomanana (LAM), que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis (Gorocica, 2005).

1.2 Vía de transmisión.

El hombre es el principal reservorio de *Mycobacterium tuberculosis* en la naturaleza, y la principal vía de transmisión en el ser humano es la aérea. Un paciente con tuberculosis pulmonar, puede transmitir este bacilo por medio de la tos, el estornudo y otros movimientos respiratorios similares, que producen pequeñas gotas llamas “gotitas de Pflügg”, las cuales distribuyen los bacilos al

entorno. Cuando las gotas son expulsadas al exterior, las de mayor tamaño caen por acción gravitatoria y las de menor tamaño se mantienen en el aire por mayor tiempo, por lo que son transportadas por las corrientes. Esto permite la evaporación del agua, lo que a su vez deja en suspensión los “núcleos de Wells” que contienen uno o más bacilos. Los núcleos de Wells pueden alcanzar a otros individuos quienes, al inspirar transportan los bacilos a los alveolos pulmonares. La enfermedad depende del establecimiento y de la proliferación de bacilos virulentos y de la propia respuesta del huésped. Una vez que la bacteria llega al pulmón, pueden desencadenarse cuatro escenarios: 1) una respuesta inicial del hospedero que permite matar a todos los bacilos efectivamente, por lo tanto la persona no desarrolla tuberculosis; 2) el microorganismo comienza a multiplicarse inmediatamente después de la infección, causando una tuberculosis primaria; 3) el bacilo llega y se establece pero no causa enfermedad, alcanzando un “equilibrio” con el huésped; tales pacientes tienen una enfermedad latente; o 4) estos microorganismos latentes pueden eventualmente crecer y causar la enfermedad de tuberculosis reactiva cuando se rompe ese equilibrio (Rosas-Taraco y Arce-Mendoza, 2007).

El bacilo tuberculoso resiste poco a la exposición del sol, y muere con rapidez cuando esto sucede. La ropa personal y de cama así como los utensilios de los pacientes con tuberculosis (platos, vasos, etc.) tienen muy poca importancia en la transmisión de la infección ya que las gotas que contaminan estos elementos, por su tamaño, no se suspenden en el aire. La tuberculosis bovina, producida por *M. bovis* puede contraerse por vía oral, por ejemplo, al tomar leche de vacas enfermas. La transmisión por esta vía es poco frecuente y la transmisión por vía cutánea mediante heridas por objetos contaminados es aún más rara (Reyes Corcho *et al.*, 2004)

1.3 Mecanismo de invasión.

La infección inicia con la entrada del bacilo de la tuberculosis en el cuerpo, a través del tracto respiratorio. Cuando el bacilo pasa a vías respiratorias bajas, opsonizado o no, encuentra células epiteliales y macrófagos alveolares.

Enseguida el bacilo es reconocido a través de receptores que reconocen patrones moleculares (RRPM) como: receptores desecho, receptor de manosa, CD14, CD44, DC, SIGN, receptores para opsoninas, receptores para proteínas surfactantes, FcR, y receptor complemento (Taraco, 2007). El reconocimiento de LAM (lipoarabinoamano) y la proteína secretora de 19kDa de *Mycobacterium tuberculosis* es mediada por receptores parecidos a Toll (TLR) tipo 2 y 6 (TLR2 y TLR6) expresados en la membrana de macrófagos alveolares (Taraco, 2007). Las micobacterias tienen la capacidad de utilizar las células fagocíticas para multiplicarse. El proceso inicia con la interacción del macrófago con la micobacteria por medio de sus componentes los RRPM lo que permite la entrada de la micobacteria a la célula huésped y a la activación de la cascada intracelular para la producción de citosinas. Las citosinas pro-inflamatorias se producen en la etapa inicial de la infección como: interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), y factores de necrosis tumoral- alfa (TNF- α), éstas se encargan de atraer los neutrófilos, linfocitos y macrófagos para que fagociten los bacilos extracelulares y generen un foco inflamatorio (Rosas-Taraco y Arce-Mendoza, 2007).

Tras su activación, estos linfocitos secretan otras citocinas, principalmente: interferón-gamma (IFN- γ), que activará los macrófagos infectados, e inducirá la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno, favorecerá la eliminación de la bacteria; Mientras se desencadena esta respuesta inmune innata, los bacilos se van diseminando hacia los nódulos linfáticos regionales y los vasos sanguíneos.

Los linfocitos Th1 se ocupan de la resolución de la infección, mientras que las células T cooperadoras Th2 (IL-4 e IL-10) se asocian al control del proceso inflamatorio que podría afectar al hospedero causando hasta la muerte (Rosas-Taraco y Arce-Mendoza, 2007).

1.4 Cuadro clínico de la tuberculosis.

Aunque la tuberculosis (TB) se trata principalmente de una enfermedad pulmonar (85% de los casos), la tuberculosis afecta también a otros órganos y tejidos. Puede ser mortal si el paciente no recibe el tratamiento adecuado. Alrededor del

10% de los individuos infectados desarrollan la enfermedad activa, la mayor parte en el transcurso de los dos primeros años posteriores a la adquisición de la infección. (Berrueta, 2016).

1.4.1 Tuberculosis Pulmonar.

La localización pulmonar de la tuberculosis es la más frecuente pero puede observarse en cualquier órgano. El cuadro clínico es de comienzo insidioso y naturaleza crónica. Esto dificulta el diagnóstico precoz. El síndrome de impregnación bacilar está constituido por síntomas generales como astenia, adinamia, hiporexia, pérdida de peso, febrícula vespertina y sudoración nocturna asociada a sintomatología respiratoria (tos, expectoración, disnea). En aproximadamente 20 % de los casos los síntomas constitucionales son el único hallazgo de enfermedad.

El paciente puede presentar disnea, dolor torácico, hemoptisis. La tos es por mucho el síntoma pulmonar más frecuente; al inicio puede ser seca y a medida que avanza la enfermedad se transforma en productiva, con expectoración mucosa, mucopurulenta o hemoptoica. Las manifestaciones clínicas de la TB se ven influenciadas por la edad y el estado de la inmunidad (Omar Aidar, 2013).

1.4.2 Tuberculosis extra pulmonar.

Afecta cualquier órgano que no sea el pulmón. Incluye formas que están ubicadas parcial o totalmente dentro del tórax y son también consideradas extra pulmonares como la tuberculosis pleural, adenopatías hiliares o mediastinales. La incidencia de localizaciones extrapulmonares es del 15 al 20% en pacientes inmunocompetentes, observándose hasta el 70% en inmunosuprimidos. La sintomatología depende de la localización. Las más comunes son la pleural y la ganglionar.

Otras localizaciones son: laríngea, abdominal, genitourinaria, osteo articular, meníngea y cutánea pero el bacilo puede afectar cualquier órgano. Tanto por su morbilidad como por su mortalidad la meningitis tuberculosa es la de mayor gravedad encuadrándose para su diagnóstico dentro de las meningitis a líquido

claro. La tuberculosis meníngea sus primeros síntomas son: fiebre sin que se le encuentre una causa, malestar general, falta de apetito, la persona está irritable, con dolor de cabeza, dolor de espalda y vomito ocasional. Enseguida se presentan síntomas por daño al sistema nervioso, se afecta la memoria y la conciencia. La fiebre continúa. Hay meningitis (inflamación del tejido que cubre el cerebro y la médula espinal), con vómito y rigidez en el cuello; los nervios dejan de hacer su función, puede haber parálisis o falta de sensibilidad de ciertas partes del cuerpo (Omar Aidar, 2013).

1.4.3 Tuberculosis diseminada.

Compromete más de 2 órganos. Hay gran deterioro del estado general, hipertermia, disnea, astenia e incluye signos clínicos de aquellos órganos que pueden estar afectados: derrame pleural, trastornos digestivos, hematológicos (anemia, linfopenia, trombocitopenia) hepatoesplenomegalia y a veces signos meníngeos. En las evoluciones crónicas se observa compromiso del estado general y fiebre de origen desconocido. En las formas agudas puede presentarse como síndrome del distrés respiratorio del adulto. La naturaleza no específica de la presentación es probablemente la causa más frecuente del retraso en el diagnóstico.

El potencial de infectividad de un paciente con tuberculosis depende, fundamentalmente, de 4 factores: 1) severidad y frecuencia de la tos; 2) carácter y volumen de las secreciones; 3) número de bacilos de la fuente de infección (los pacientes con baciloscopia positiva son los más infectantes), y 4) uso de la quimioterapia (después de 2 semanas de tratamiento, se produce una reducción en el número de bacilos cercana al 99%'º) (Omar Aidar, 2013).

1.5 Epidemiología.

La tuberculosis es una enfermedad cuya presencia ha sido constante en la historia de la humanidad. El aumento mundial es atribuible a la notable proliferación de casos en países de Europa oriental (principalmente la antigua Unión Soviética) desde 1990 y en el África subsahariana desde mediados de los años ochenta.

Es principalmente una enfermedad de los hombres. Cuando la transmisión de *Mycobacterium tuberculosis* ha sido estable o ha aumentado durante muchos años, la tasa de incidencia es más alta entre los adultos jóvenes, y la mayoría de los casos se deben a una reciente infección o reinfección. A medida que disminuye la transmisión, el número de casos se traslada a los adultos mayores y una mayor proporción de casos es atribuible a la reactivación de la infección latente, los pacientes indígenas con tuberculosis tienden, a ser viejos, mientras que los pacientes que son inmigrantes de países de alta incidencia tienden a ser adultos jóvenes. Hay pocos casos de *M. tuberculosis* infantil entre 0-14 años, incluso en las zonas de alta transmisión (10% de todos los nuevos casos en África) (WHO, 2013)

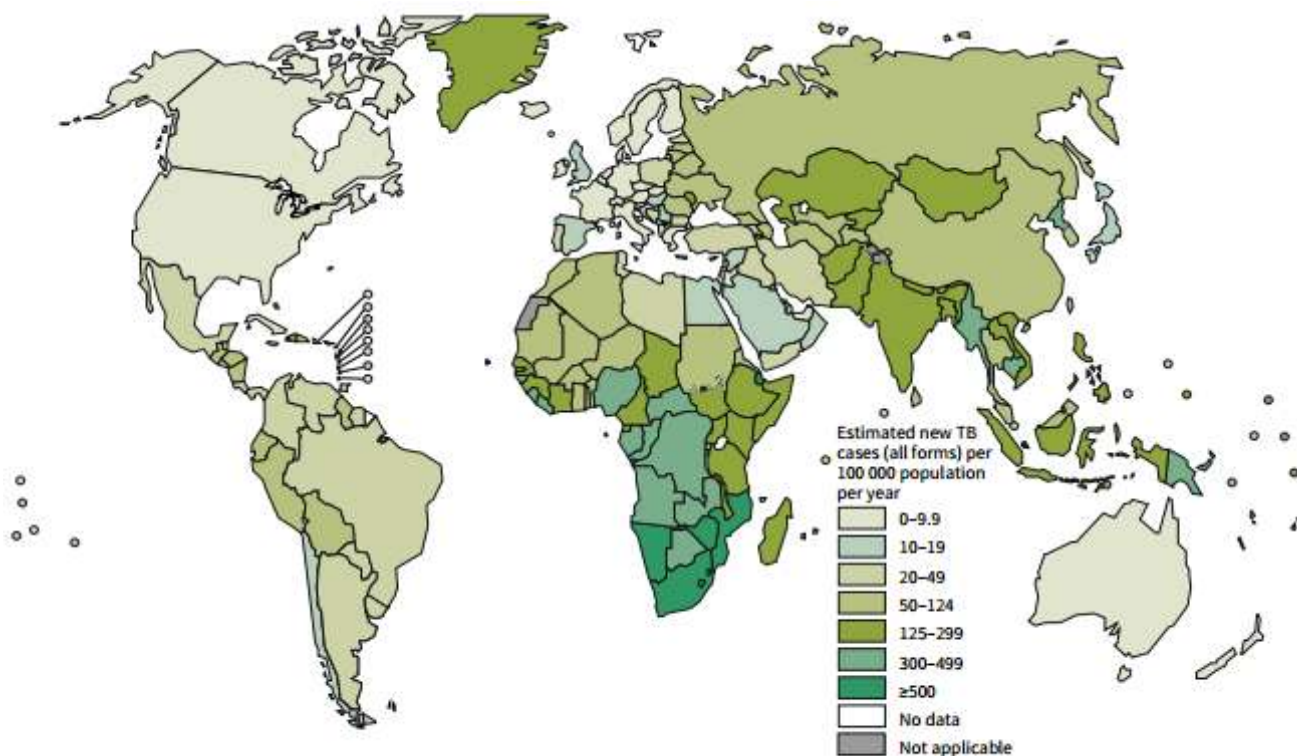


Fig. 1 Incidencia mundial de *Mycobacterium tuberculosis* en todas las formas (WHO, 2014).

En 2015 el mayor número de nuevos casos de tuberculosis se registró en Asia, a la que correspondió el 61%, seguida de África, con un 26%. Más del 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países de ingresos bajos y medianos, seis de ellos acaparan el 60% de los nuevos casos de tuberculosis: la India,

Indonesia, China, Nigeria, el Pakistán y Sudáfrica como se muestra en la. Además en este año se estima que enfermaron de tuberculosis un millón de niños y que 170 000 niños murieron debido a esta causa (sin incluir los niños con VIH) (OMS, 2017). Las tasas más bajas se encuentran predominantemente en los países de altos ingresos, incluyendo la mayoría de los países de Europa occidental, Canadá, Estados Unidos de América, Japón, Australia y Nueva Zelanda (Fig. 1). En estos países, la tasa de incidencia es inferior a 10 casos por 100 000 habitantes por año (WHO, 2014).

Mientras tanto en América la OMS reportó en el 2014 un estimado de 277, 200 incidentes con una tasa de incidencia de 28 casos por 100 000 habitantes. Por lo tanto se ha observado que la incidencia anual ha disminuido constantemente desde 1990 un que esta disminución parece ser más lenta en el último año.

Sin embargo a nivel subregional, la incidencia estimada en 2014 fue la más alta en la región del Caribe (69 por 100 000), seguida por Sudamérica-Andina (60 por 100 000), América del Sur- Otros (39 por 100 000), México y Centroamérica (28 por 100 000). Fue la más baja en América del Norte (3,7 por 100 000). La tasa está disminuyendo en todas las subregiones excepto México y América Central, donde se ha mantenido constante durante los últimos siete años. Un estimado de 47, 060 casos de tuberculosis ocurrieron en México y en la subregión de América central. De esto un estimado de 26, 000 casos de incidencia tuberculosis ocurrió en México, más que la mitad (55%) de la carga estimada de tuberculosis en los ocho países de la subregión de México y Centroamérica (Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá). México fue seguido por Guatemala (9,200 casos o 20%), Nicaragua (3, 500 casos o 7,4%) y Honduras (3 400 casos o 7,2%). Un total de 4 960 casos (11%) ocurrieron en los cuatro países restantes: Belice (130 casos o 0,3%), Costa Rica (530 casos o 1,1%), El Salvador (2 500 casos o 5,3%), Panamá (1, 800 casos o 3,8%) (WHO 2015).

Según el registro y notificación del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de tuberculosis, en el año 2010 se reportó un total de 18 848 casos nuevos de tuberculosis de todas las formas en todo el país de México, correspondiendo a una

tasa de incidencia de 16.8 casos por cada 100 mil habitantes. La tasa más elevada se ubicó en Baja California, con 54.1 casos por cada 100 mil habitantes siendo de gran importancia pues ha presentado las más altas tasa de morbilidad y mortalidad. Asimismo, en la zona norte del país siendo la más desarrollada, se ha identificado que los estados de Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas registran la mayor incidencia de Tuberculosis de todas las formas a nivel nacional. En el año 2010 se notificaron 4 627 casos de tuberculosis pulmonar, lo que correspondió aproximadamente al 32% de la situación nacional. De las patologías más frecuentemente asociadas se encuentra Diabetes mellitus (DM) en 4, 048 casos (21%), la desnutrición con 2, 716 casos (14%) y la coinfección VIH/SIDA en 1, 189 casos (6%).

Michoacán es uno de los Estados con menor incidencia de casos de tuberculosis. En el año 2010 se reportaron 336 casos de incidencia de tuberculosis todas las formas en el estado de Michoacán de los cuales; 266 casos presentaron tuberculosis pulmonar, 5 casos tuberculosis meníngea y 65 casos otras formas (Dávila, 2012). A demás los casos reportados por Tuberculosis de todas las formas por enfermedades asociadas en Michoacán fueron 330, siendo: VIH/SIDA 9 casos, alcoholismo 17 casos, DM (Diabetes Mellitus) 79 casos, desnutrición 33 casos, EPOC 9 casos, drogas IV 1 caso, otras 36 casos, ninguna 97 casos e ignorado 3 casos. Estos casos se han mantenido constantes (Dávila, 2012).

1.6 Detección del agente causal.

Durante un siglo, el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis, basado en la baciloscopía, y en el aislamiento e identificación de *M. tuberculosis* en los cultivos, ha sido poco sensible y lento. La incorporación de técnicas de genética molecular, en la última década del siglo XX ha supuesto un avance importante al aumentar claramente la sensibilidad, precisión y rapidez en el diagnóstico. Además han permitido un mejor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, de los factores de virulencia así como también de los mecanismos de resistencia lo que dará lugar en un futuro a nuevas estrategias de prevención y tratamiento de la enfermedad.

La sensibilidad y especificidad de los distintos métodos de detección es variable. En general, el examen microscópico directo de la muestra clínica, mediante técnicas específicas de tinción (baciloscopía), es la técnica menos sensible pero la más rápida, en el caso de los cultivos son los más sensibles y más lentos, mientras que las técnicas moleculares basadas en la amplificación genómica tienen una sensibilidad menor que los cultivos pero son más rápidas (González-Martin, 2014).

1.6.1 IS6110 RFLP.

La IS6110 es una secuencia de inserción de 1,335 pares de bases que se repite entre 0 y 25 veces en diferentes lugares del cromosoma de cada CMT (Complejo *Mycobacterium tuberculosis*). El análisis de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) utilizando como secuencia diana la IS6110 es el método más utilizado y el que se considera de referencia. 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*HII y *Pvu*II (Fig. 2) 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 (van Embden *et al.* 1993). Esta técnica presenta algunas limitaciones, ya que no puede utilizarse si la micobacteria tienen menos de 6 copias de este fragmento en su cromosoma y requiere grandes cantidades de ADN (González-Martin 2014).

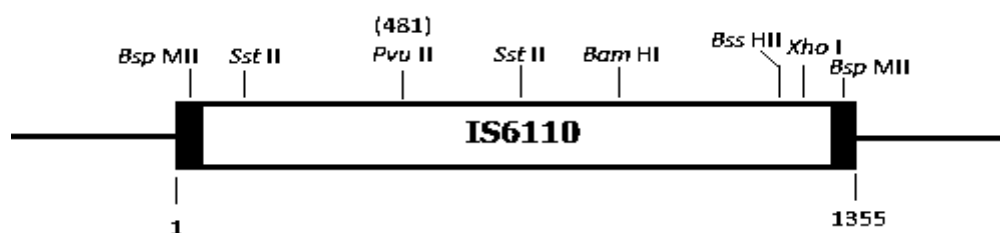


Figura 2. Mapa físico del elemento de inserción IS6110 de 1.35 kb en *M. tuberculosis*.
(Modificado de van Embden *et al.*, 1993)

1.6.2 Spoligotyping

Es un método muy utilizado, generalmente como complemento del mencionado anteriormente. Esta técnica explora la variabilidad polimórfica de ADN dentro de los repetidos directos (DR), que son secuencias cortas (36 pares de bases) de repetición y *hot-spots* de la IS6110. Estas repeticiones están separadas por espaciadores de 34-41 pares de bases. La técnica se basa en la amplificación de estas zonas espaciadoras, y una posterior hibridación en membrana con espaciadores sintéticos (Fig. 3).

Algunas ventajas son que requiere menos ADN que el anterior y al expresarse en forma de positivo o negativo (de cada espaciador), puede analizarse en una base de datos internacional con más de 11,000 patrones (“espologitipos”) de aislamientos obtenidos en más de 90 países. La principal limitación es que es menos discriminatoria que la IS6110 a pesar de que permite distinguir más fácilmente cepas no identificadas que forman parte de una familia o un clon (González-Martin 2014).

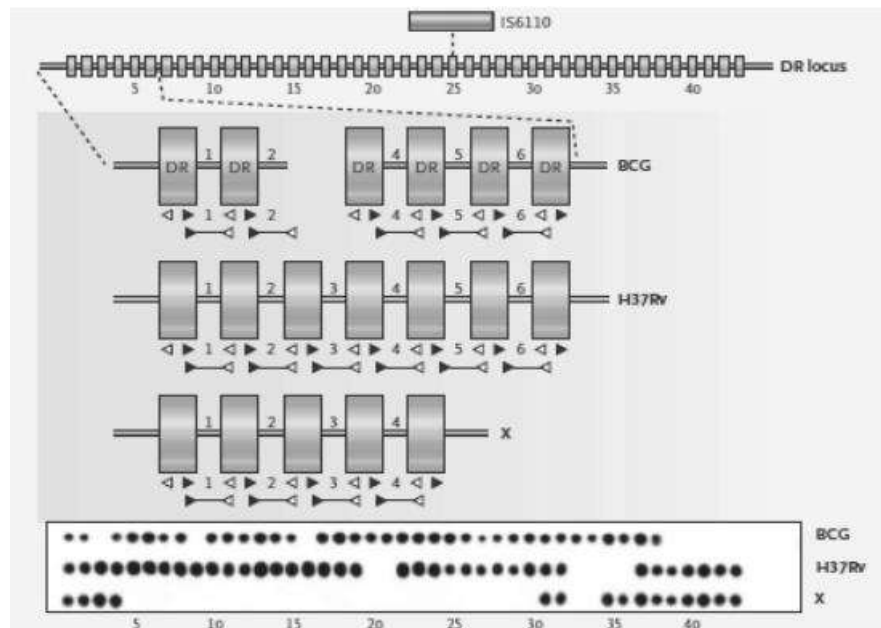


Fig 3. Estructura de repetidos directos (DR) en el genoma micobacteriano. Principio de la amplificación *in vitro* de la región de repetidos directos mediante PCR y patrones de hibridación o espologitipos. BCG: Bacillus Calmette-Guérin; H37Rv: cepa de referencia de *M. tuberculosis*; X: familia X de *M. tuberculosis*. (Modificado de Comas *et al.*, 2009).

1.6.3 RAPD: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplified Polymorphic DNA).

La técnica RAPD, conocida también como AP-PCR es básicamente una variación del protocolo de la PCR con dos características distintivas: utiliza un cebador único con una secuencia arbitraria, por lo tanto desconocida. Se emplean cebadores cortos (10 pares de bases) que se utilizan de forma individual en reacciones de PCR con un nivel de especificidad muy bajos. De esta manera se genera un patrón de bandas sencillos que dependerá de la capacidad de los cebadores para encontrar zonas en el ADN, parcial o totalmente complementario. Para poder visualizar los segmentos amplificados pueden utilizarse geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o geles de poliacrilamida de alta resolución visualizados por autorradiografía.

Por su rapidez, sencillez y bajo costo son los marcadores elegidos para numerosos estudios de diversidad de especies sobre todo en aquellas especies que no se dispone de información previa de secuencias (Picó Sirvent and Pérez de Castro, 2008).

1.6.4. MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-variable-number tandem repeat analysis).

Este método se basa en la detección del número de veces que se repiten de forma adyacente varias secuencias dentro del genoma de la micobacteria. Determina las unidades repetitivas en 12 *loci* tras una PCR, en cada uno de estos *loci* hay de 2 a 8 alelos, lo que da lugar a unas 20 millones de posibles combinaciones de alelos. Este método es más discriminante que el spoligotyping, similar al basado en el RFLP- IS6110, se puede automatizar y técnicamente es más simple. Existe una base de datos internacional accesible por Internet para poder comparar los hallazgos.

1.7 Patogenicidad y virulencia.

La habilidad de un patógeno bacteriano para sobrevivir dentro de un organismo hospedero requiere de la expresión de una serie de determinantes genéticos

involucrados en la interacción patógeno-hospedero, situación que le permite resistir el estrés fisiológico y ambiental (Maulén, 2011). Así, podemos describir el significado de estas dos palabras: patogenicidad se refiere a la capacidad de un microorganismo para producir enfermedad y virulencia define el grado en el que un patógeno puede causar enfermedad. En otras palabras la patogenicidad es la cualidad de una bacteria para producir enfermedad infecciosa en un huésped, siendo la virulencia la cuantificación de dicha capacidad.

Los factores de patogenicidad (factores de virulencia) trabajan en conjunto para poder enfermar al huésped, también influye el estado inmunológico del huésped afectado (Borrero et al. 2011). Se han estudiado numerosos factores de virulencia de *M. tuberculosis* entre ellos:

- Antígenos solubles.
- Proteínas.
- Antígenos de secreción.
- Componentes glicosilados de la envoltura de *M. tuberculosis* que intervienen en la patogénesis.

1.8 Genes de virulencia.

Mycobacterium tuberculosis ha demostrado tener una gran capacidad para sobrevivir en diversas condiciones como; las tensiones bactericidas dentro del macrófago, el ambiente anaeróbico y alterado nutricionalmente del granuloma así como también el estado latente alterado nutricionalmente inactivo. La comprensión de este comportamiento adaptativo radica en la identificación de genes (determinantes de virulencia), los cuales se expresan en estas condiciones variadas. El control de la transcripción desempeña un papel muy importante en la regulación de la expresión génica en respuesta a señales ambientales.

La pared celular de las micobacterias, que está constituida por un complejo conjunto de glucolípidos propios y ácidos micólicos, imparten una característica en la morfología de colonias, además, esta pared celular ha sido implicada para albergar determinantes de virulencia. Koch observó primero la relación entre la virulencia y la morfología de *M. tuberculosis* (Koch, 1882).

Las señales ambientales que actúan para el control de la expresión de genes de virulencia en patógenos animales son generalmente factores físicos y químicos como: temperatura, osmolaridad, O₂, CO₂, pH, reactivos compuestos de oxígeno y nitrógeno, además de la disponibilidad de nutrientes y la concentración de iones inorgánicos. Las bacterias son capaces de responder a un entorno complejo, mediante la integración de una gran variedad de señales para detectar su ubicación y expresar genes apropiados (Mehrotra, 2001).

1.8.1 Familia de genes PE/PPE.

Los genes PE/PPE representan uno de los más intrigantes aspectos del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*. Estos genes son especialmente abundantes en micobacterias patógenas, con más de 160 miembros en *M. tuberculosis*. Fueron descubiertos desde hace más de 15 años y su función sigue siendo incierta (Fishbein et al. 2015). Esta familia de genes *pe/ppe* comprende el 7% del genoma de *M. tuberculosis* identificado en la cepa de estudio H37Rv. Además codifican para dos familias de proteínas *pe/ppe* las cuales se caracterizan por tener dominios N-terminal conservados de aproximadamente 110 y 180 aminoácidos (Cole et al. 1998).

El nombre *pe* deriva del motivo distintivo prolina (P) – glutámico (E) y el *ppe* motivo prolina (P)- prolina (P)- glutámico (E) los cuales se encuentran presentes dentro de los 10 primeros aminoácidos de esta proteína (Fig. 4) (Cole et al. 1998). De las dos familias, la *pe* es la de mayor tamaño con 99 miembros y la *ppe* con 69 miembros.

Estos genes están presentes en todas las especies del género *Mycobacterium* aunque en especies no patógenas tienen una cantidad menor de genes *pe/ppe*.

La familia *pe* puede dividirse en genes *pe_pgrs* (secuencias polimórficas ricas en GC) y genes *pe* (sin características distintivas). La familia *ppe* se divide en *ppe_mptr* (repeticiones tándem polimórficas mayores), *ppe__svp* (con un motivo GxxSVPxxW), *ppe_ppw* (con un motivo PxxPxxW) y genes *ppe* sin características distintivas. Esta variedad de subclases proporciona la primera indicación que los

miembros de las familias pueden jugar distintos roles funcionales (Fishbein et al. 2015).

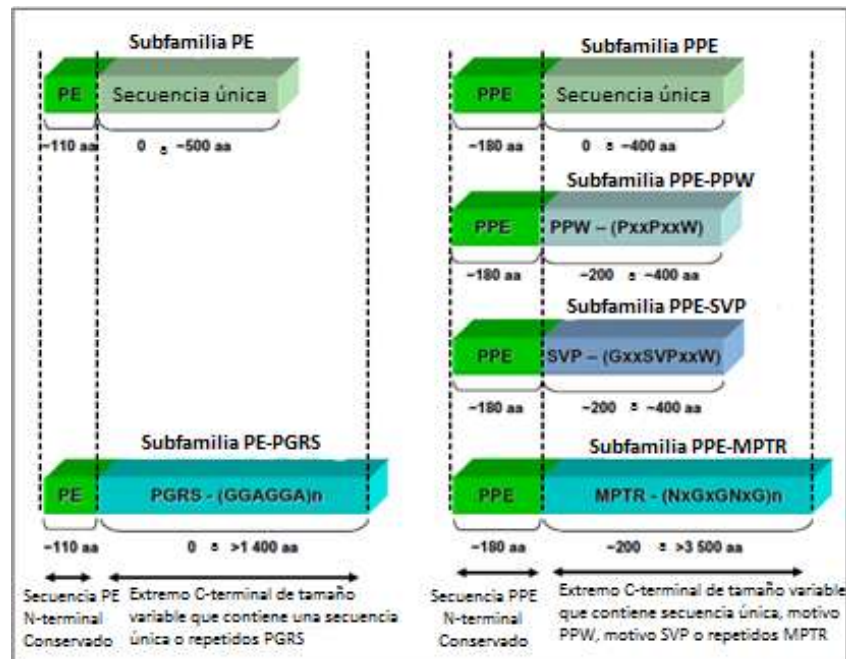


Figura 4. Estructura de los genes *pe/ppe*. Representación de la estructura de los miembros de las familias de genes *pe/ppe*, se muestra el dominio N-terminal conservado (verde), las posiciones de los motivos y las diferencias entre las subfamilias encontradas en ambos genes (gris y azul). (Tomado de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

1.8.2 Evolución y variación de las familias PE/PPE.

Las proteínas PE/PPE están presentes en mycobacterias patógenas y saprofitas y son quizás más asociadas al metabolismo mycobacteriano de lo que se creía.

Especies del complejo *Mycobacterium Tuberculosis* (CMT), *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marium*, *Mycobacterium ulcerans* y *Mycobacterium avium* poseen el más alto número de genes *pe/ppe*.

Los polimorfismos de la subfamilia *pe_pgrs* y *ppe_mptr* están sólo presentes en el CMT; estos representan el más reciente sublinaje de la familia de genes *pe/ppe*. El origen de estas familias de genes es aún desconocido, en el antepasado se les asocio con el tipo VII o *esx* (sistema secretor de antígeno temprano objetivo 6) del sistema de secreción micobacteriana. El genoma de *M. tuberculosis* posee cinco

grupos de genes *esx*, algunos de los cuales han sido implicados en la patogenicidad. Se piensa que la expansión de la familia de genes *pe* / *ppe* se inició con una serie de duplicaciones de grupos de genes *esx* que comenzaron con la duplicación de una región *esx* ancestral. Se realizó un examen filogenético el cual muestra que los grupos de genes *esx* se expandieron a partir 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 dentro y/o asociados con el grupo de gen *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) (Fishbein *et al.*, 2015).

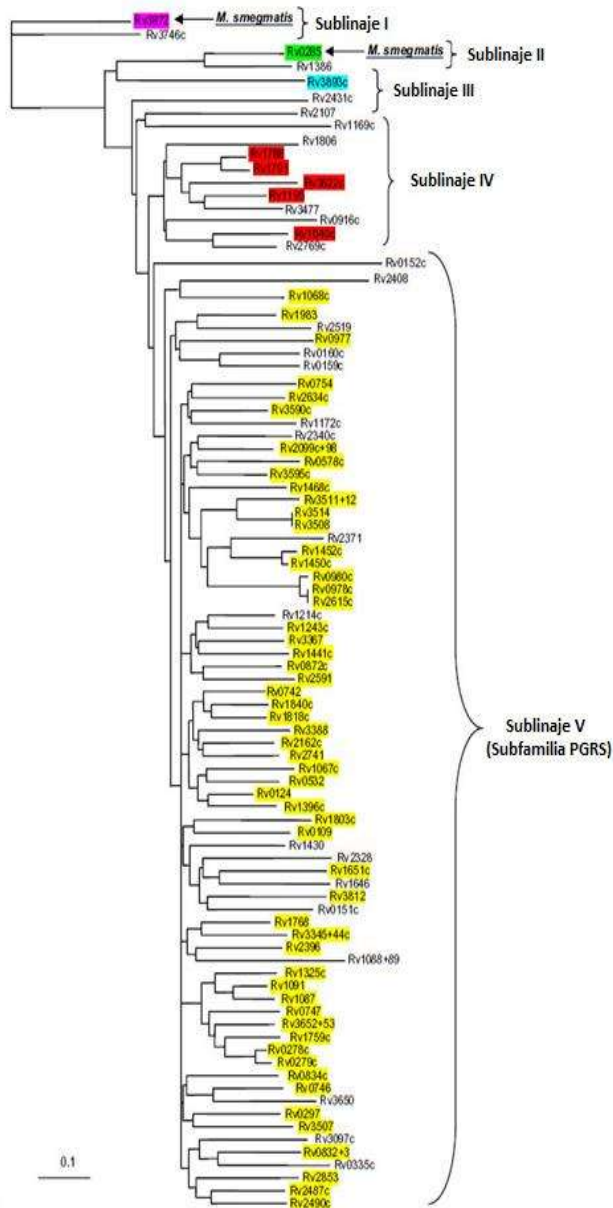


Figura 5. Reconstrucción filogenética de relaciones evolutivas entre los miembros de la familia de proteínas PE. Los genes marcados en morado, verde y azul, están presentes en las regiones 1, 2 y 3 del grupo de genes ESAT-6 (*esx*), respectivamente. Los genes marcados en rojo están presentes en la región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

Algunos autores han considerado que las proteínas PE/PPE representan una fuente de variación antigénica pero esto no ha sido comprobado mediante datos experimentales. Sin embargo los miembros seleccionados de las familias presentan una amplia variación genética, con múltiples mecanismos que contribuyen a alterar sus secuencias de codificación. Un estudio realizado por Gey y colaboradores sugiere que la expansión de PE_PGRS precedió a la aparición de la subfamilia PPE_MPTR, proponen que proviene del hecho de que hay cierta semejanza entre la secuencia repetitiva (GCCGGTGTG) de MPTR y la secuencia

complementaria de la región central de dos elementos repetitivos dispuestos en tándem (TT **GCCGCCGTTG** CCGCCG) de PGRS (Pittius, 2006).

La recombinación homóloga espontánea ocurre aleatoriamente, principalmente en los genes *pe_pgrs* que comparten secuencias homologas extensas. Esto puede resultar en eliminaciones, duplicaciones, codones alternativos de inicio, cambios en el marco de lectura, inserciones, polimorfismos de un solo nucleótido y elementos de inserción transponibles, lo que contribuye a la variación genética. Los datos precedentes sugieren que los polimorfismos *pe/ppe* no evolucionan en respuesta a la selección inmune, se cree que es por otro mecanismo que aún es desconocido. En un estudio McEvoy y colaboradores (McEvoy et al., 2012) encontraron que mientras que los genes *pe* y *ppe* tenían tasas de mutación aproximadamente tres veces mayores que los genes no *pe / ppe*, no hubo restricciones selectivas, aunque este estudio excluyó el subgrupo *pe_pgrs*. Sin embargo, un examen in silico de todos los genes H37Rv sugirió que un gen *ppe* sublineaje IV y tres genes del sublineaje V *pe_pgrs* mostraron una selección positiva (Zhang et al., 2011). Un análisis extenso de 27 genes *pe_pgrs* de 94 aislamientos clínicos que representan cinco sublinajes filogenéticos, demostró que mientras los genes *pe_pgrs* en su conjunto presentan una variación genética significativa en comparación con el resto del genoma, los genes *pe_pgrs* individuales difieren entre ellos principalmente con respecto a la diversidad de nucleótidos y de sitios de inserciones y eliminaciones, así como en las proporciones dN/dS. Esta última medida indicó la existencia tanto de una evolución neutra, como de selección purificadora y selección diversificadora en los diferentes miembros de la familia, sugiriendo roles funcionalmente distintos (Copin, Coscollá, and Seiffert 2014). Resulta cada vez más evidente que los elementos de inserción juegan un papel en la presencia y arreglo de los genes *pe/ppe* en el genoma micobacteriano. En particular los elementos de inserción IS6110 producen una variación genética que podría contribuir a cambios fenotípicos (McEvoy, 2007; Sampson, 1999), con frecuencia insertados dentro de los genes *pe/ppe* y sus regiones flaqueadas causando mutación (Pérez-Lago et al. 2011). Un estudio demostró, en un muestreo de 519 aislados clínicos, que la

secuencia IS6110 interrumpe frecuentemente los genes *pe/ppe*. (Reyes et al. 2012). 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 la función de las proteínas PE/PPE, permanece en gran parte desconocido. Además los limitados datos estructurales confirmados experimentalmente atribuyen limitaciones a la capacidad de predecir las consecuencias funcionales de la variabilidad PE/PPE (Fishbein et al. 2015).

1.8.3 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 de la transcripción (Voskuil, 2004). Los factores sigma micobacterianos facilitan la adaptación fisiológica a estímulos ambientales y virulencia en las micobacterias patógenas (Sachdeva et al., 2010); múltiples factores sigma regulan la expresión de los genes *pe/ppe*. Uno de estos factores es el factor SigF ha sido mostrado que regula todos los sublinajes de la familia de genes *pe* (Fishbein et al., 2015). SigF se presenta en micobacterias patógenas y saprofitas además de que está constantemente ligado a la adaptación bacteriana como estrés ambiental en forma de pH, estrés oxidativo y choque térmico (Williams et al., 2007). Además de que SigF es una gran ventaja para la supervivencia de las micobacterias ambientales, esta capacidad adaptativa también resulta importante para la supervivencia de las micobacterias patógenas dentro del macrófago (Russell, 2011). Otro factor sigma estudiado es el SigB, es un factor ubicuo el cual participa en el control de la respuesta al estrés de la pared celular micobacteriana (Manganelli et al., 1999), además de que regula la expresión de muchos genes *pe_pgrs* y algunos genes *ppe* que se han postulado para estar implicados en la interacción huésped-bacteria en la pared celular (Fontán et al., 2009; Lee, Karakousis et al., 2008). SigD también regula muchos genes *pe-pgrs*, en su mayor parte sólo regula genes *pe*, con la excepción de *ppe19/IV*. SigD responde al medio ambiente pulmonar humano, la modulación de

la expresión en respuesta a la inanición y la hipoxia, y suprime la expresión de múltiples proteínas PE_PGRS (Calamita *et al.*, 2005; Raman *et al.*, 2004). Tanto SigB y SigD aparecen en el control de la expresión del más reciente y evolucionado sublinaje de genes *pe/ppe* encontrados solo en micobacterias patógenas y en el control de la expresión de genes esenciales para la respuesta a estrés y patogenicidad de la bacteria in vivo (Calamita *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008). Esto indica que las proteínas PE/PPE bajo su control también pueden jugar un rol en la virulencia bacteriana (Fishbein *et al.*, 2015).

Otros reguladores identificados por el momento son los sistemas reguladores de dos componentes (TCSs, por sus siglas en ingles), los cuales son sensores de células bacterianas además de que en *Mycobacterium tuberculosis* contribuyen a la adaptación de la bacteria a su estilo de vida intracelular (Bretl, Demetriadou, and Zahrt 2011). Varios TCSs afectan la expresión de los genes *pe/ppe*. El TCS más influyente en la expresión génica *pe / ppe* es *phoPR*, controlando la expresión de al menos 13 genes *pe/ppe* diferentes (Walters *et al.*, 2006).

1.8.4 Localización y función de las proteínas PE/PPE

Existe evidencia experimental que apoya la asociación de PE/PPE con la micomembrana, o la exposición superficial huésped-patógeno (Sampson, 2001). Se han encontrado más de 35 proteínas PE/PPE en o sobre la membrana micobacteriana y/o la pared celular. Aunque las funciones PE/PPE pueden haber variado, su función específica depende con frecuencia de la localización en la pared celular o extracelular. Recientemente se han estudiado los dominios PE/PPE implicados en la localización subcelular. Se demostró que el dominio PE N-terminal de PE_PGRS33V bien caracterizado era necesario para la localización de proteínas en la pared celular en *M. marinum* y *M. tuberculosis* (Cascioferro *et al.*, 2007, 2011; Zumbo *et al.*, 2013). A demás de que esta función *también existe en* *Lip_{IV}* y PE_PGRS30V, así que la secuencia N-terminal permite la secreción y el C-terminal codifica la actividad lipasa de la proteína (Daleke *et al.* 2011; Iantomasi *et al.* 2012). Trabajos recientes sobre PPE17_{IV} sugieren que los dominios de PE y PPE pueden cumplir funciones similares de orientación en la pared celular (Donà

et al. 2013). Otro apoyo para la importancia del dominio PE en la localización de proteínas PE_PGRS en la pared celular se proporcionó mediante el examen de PE_PGRS30V (Chatrath et al., 2014).

Varias proteínas son secretadas mediante el sistema de secreción tipo VII (ESX) (T7S, por sus siglas en inglés) (Abdallah et al. 2006, 2009). Los homólogos de EspG5 son también conocidos por facilitar la secreción y estabilidad de la proteína PE / PPE. Algunos estudios sugieren que EspG confiere especificidad y guía a las proteínas PE/PPE a los sistemas de secreción ESX (Ekiert and Cox 2014; Korotkova et al. 2014). Se ha observado una asociación de varias proteínas PE/PPE con la pared celular micobacteriana, se puede pensar que algunas proteínas PE/PPE hayan estado implicadas en la integridad estructural y en la morfología de colonias de *M. tuberculosis* (Chatrath et al. 2011). Por su exposición en la superficie o a la secreción en el medio extracelular se puede implicar a las proteínas PE/PPE para interactuar directamente con el huésped. Se cuenta con evidencia de que miembros de la familia seleccionados pueden interactuar con las moléculas del huésped, como el receptor TLR2 (Bansal et al. 2010; Basu et al. 2007; Nair et al. 2009; Tiwari et al. 2012; Zumbo et al. 2013). Los objetivos del huésped dentro del fagosoma en las proteínas PE/PPE todavía no se han identificado (Fishbein et al. 2015). Estudios recientes han sugerido una relación entre las familias PE/PPE y el metabolismo de los lípidos de las micobacterias ya que al ingresar en un macrófago, *M. tuberculosis* experimenta adaptación fisiológica al ambiente intracelular incluyendo la regulación positiva, de los genes del metabolismo lipídico (Rosas-Magallanes et al. 2007). En un estudio reciente se demostró que un mutante de *M. marium* deficiente en la síntesis de lipopolisacáridos presenta deterioro en la secreción de proteína PE_PGRS. (Van Der Woude et al. 2012). Además, otros trabajos han demostrado que después de la debilidad, *M. tuberculosis* aumenta la expresión de genes de la lipasa, incluyendo dos miembros de la familia PE; LipYV (PE_PGRS63V) y LipXIV (PE11IV) (Deb et al. 2006). LipY fue la primera proteína PE/PPE que se asoció con propiedades enzimáticas, por lo que fue denominada triacilglicérido lipasa (Fishbein et al. 2015). El impacto de la variación genética sobre la estructura y

consecuentemente la función de las proteínas PE/PPE sigue siendo en gran parte desconocido. La primera estructura para un par de proteínas PE/PPE (PE25_{III}/PPE41_{III}) se determinó en 2006 (Strong et al. 2006). La estructura cristalina de un dominio enzimático putativo de PE_PGRS16v fue reportada en 2013 (Barathy and Suguna 2013), y dos estructuras completas de PE25_{III}/PPE41_{III} (en complejos con EspG) se publicaron en 2014 (Ekiert and Cox 2014; Korotkova et al. 2014). Los limitados datos estructurales confirmados experimentalmente imponen limitaciones en la capacidad de predecir las consecuencias funcionales de la variabilidad PE/PPE (Fishbein et al. 2015), además de que no se cuenta con la función precisa de los dominios de la proteína.

Antes de la aparición de la respuesta inmune adaptativa, la infección por *M. tuberculosis* se establece mediante la entrada a los macrófagos del huésped (Thi, Lambertz, and Reiner 2012). Varias proteínas de PE/PPE se han ligado a la inhibición y/o activación del macrófago del huésped (Fig. 6). Se cree que el sistema de secreción ESX-5 y las proteínas PE/PPE son responsables de la virulencia de *M. tuberculosis* y contribuyen a su capacidad para crecer en un macrófago (Bottai et al. 2012), por ejemplo, PE_PGRS30V también se ha asociado con la virulencia micobacteriana, específicamente mediante la inhibición de la fusión fagolisosomal (Iantomasi 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). Otro estudio in vivo reveló la notable abundancia relativa de proteínas PE/PPE detectadas durante la infección en cobayas (cuyo), lo que subraya su posible papel en la virulencia (Kruh et al. 2010), además de que un 60% de las proteínas PE_PGRS y PPE_MPTR se expresan en pulmones de cobaya a los 90 días después de la infección.

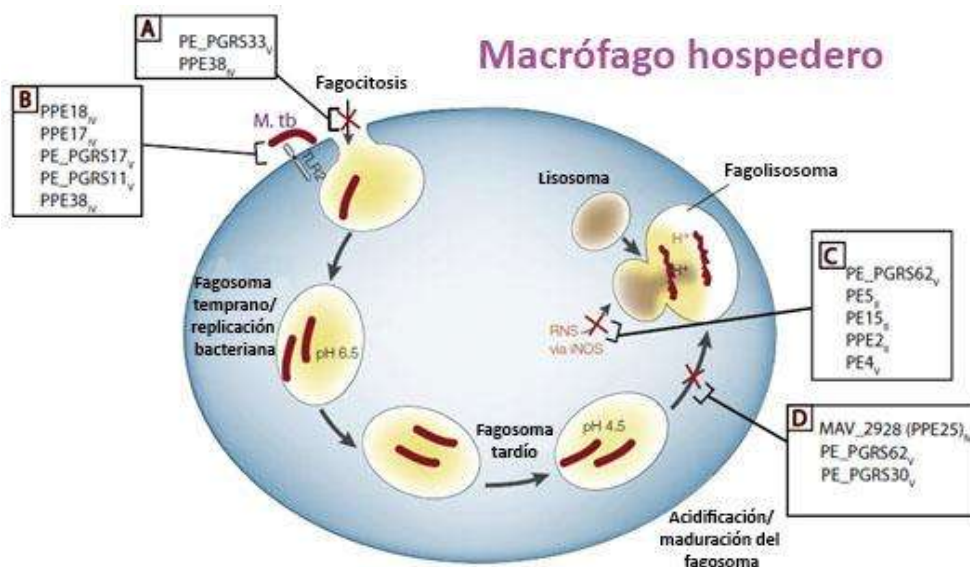


Figura 6. Influencia de las proteínas PE/PPE en el procesamiento del macrófago por *M. tuberculosis*. Representación de la infección de *M. tuberculosis* al macrófago hospedero y los puntos en los cuales las proteínas PE/PPE afectan este proceso. A) Proteínas que presentan inhibición de la fagocitosis 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).

1.8.5 Regiones conservadas de PE_PGRS en la cepa H37Rv

a) N-terminal.

Es un dominio altamente conservado, se caracteriza por tener 110 aminoácidos que se disponen dando lugar a una estructura globular. En este dominio se encuentran los motivos Prolina (Pro) – Glutamina (Glu). (Cole *et al.*, 1998). Fue demostrado que este dominio es el más inmunógeno. (Vordermeier *et al.*, 2012). Un estudio demostró que el dominio PE N-terminal del PE_PGRS33V bien caracterizado era necesario para la localización de proteínas en la pared celular en *M. marinum* y *M. tuberculosis* (Cascioferro *et al.*, 2007; Zumbo *et al.*, 2013).

Esta función también existe en LipYV y PE_PGRS30V, por lo que la secuencia N-terminal permite la secreción (Daleke *et al.*, 2011; Iantomasi *et al.*, 2012). Además se proporcionó soporte adicional del dominio PE en la localización de proteínas PE_PGRS en la pared celular mediante el examen de PE_PGRS30V (Chatrath *et al.*, 2014).

b) C-terminal

Este dominio codifica para la actividad de la lipasa de la proteína (Fishbein *et al.*, 2015).

c) WD4/YVTN

Este dominio se encontró en la posición 282-445 aminoácidos. En general los dominios WD40 y YVTN repiten motivos, consisten en aproximadamente 40 residuos de aminoácidos, y a pesar de que se componen de secuencias distintas, ellos comparten una estructura similar estructuralmente, tanto el WD40 y la YVTN forman motivos en forma de hélices con siete laminas beta (aunque algunos miembros pueden contener ocho laminas).

En un estudio se demostró que además de las repeticiones cortas PGRS (ricas en GC), dos proteínas PE_PGRS (PE_PGRS17V y PE_PGRS18V) poseen repeticiones en tándem de residuos de 41-43 aminoácidos (a.a) en las regiones variables de C-terminal (Adindla y Guruprasad, 2003), que corresponden a los antígenos de superficie celular del laberinto de Methanosarcina (Mayerhofer *et al.*, 1995).

d) Óxido nítrico reductasa, N-terminal

Este dominio se encontró en la posición 285-445 aminoácidos. Pertenece a la familia y subfamilia “Reductasa oxido nítrico, dominio N-terminal”, esta clase incluye todas las proteínas beta. Presenta 7 hojas beta-hélice de doblez. Además pertenece a el grupo de las superfamilias SCOP (Structural Classification of Proteins).

Aunque este tipo de dominios son antigénicamente variables en otros patógenos, aún no se ha establecido la importancia de estas repeticiones variables (Fishbein *et al.*, 2015).

1.8.6 Polimorfismos en los genes *pe/ppe*.

En los organismos patógenos en general se encontró que las proteínas que se encuentran directamente expuestas a la vigilancia inmune muestran mayores niveles de polimorfismos. Como se ha mencionado anteriormente, muchas proteínas PE/PPE se encuentran situados en la superficie celular y otras son

probablemente secretadas, esto en conjunto con su inmunogenicidad y la naturaleza polimórfica bien establecida de sus repeticiones C-terminal, ha llevado a la sugerencia de que pueden estar implicados en la variación antigénica y la evasión inmune. Estudios posteriores han reportado un gran número de polimorfismos en los genes *pe_pgrs33*, *pe_pgrs16* y *pe_pgrs26*, además algunos genes PE/PPE han mostrado reportes de niveles elevados de la integración de IS6110 y recombinación homóloga. Sin embargo, en el análisis de 4 secuencias del gen *pe* (*pe5*, *pe11*, *pe18* y *pe31*) y 4 genes *ppe* (*ppe9*, *ppe27*, *ppe41* y *ppe50*) se observó que el polimorfismo estaba limitado o ausente. Junto con la variación de la secuencia, la alteración en la expresión de genes pueden contribuir a la variación antigénica, esto se ha observado en los genes *pe/ppe* de diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (McEvoy *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que las proteínas PE/PPE pueden ayudar en la patogénesis de *M. tuberculosis* influyendo negativamente en la inmunidad del huésped el receptor Toll-like 2 (TLR2) ha asumido un papel importante en esta teoría. Por ejemplo Basu y colaboradores (2007) demostraron que *pe_pgrs33* es capaz de mejorar la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) de una manera dependiente de TLR2 que conduce a la apoptosis del macrófago. Sin embargo, se observó que las deleciones dentro del dominio PGRS (en aislados clínicos) inhibieron esta capacidad. Existen estudios que sugieren que las proteínas PE_PGRS pueden ser capaces de inhibir el procesamiento y/o presentación de antígenos además se ha propuesto que las repeticiones Gly-Ala en los dominios PGRS C-terminal son capaces de inhibir la degradación proteasomal del dominio N-terminal PE lo que inhibe el procesamiento del antígeno por las células T CD8 + (McEvoy *et al.*, 2012).

En un estudio epidemiológico realizado en 19 cepas clínicas de *M. tuberculosis*, detectándose hasta 25 regiones cromosómicas eliminadas, se observó una correlación inversa entre el porcentaje del genoma con eliminaciones y el porcentaje de pacientes infectados que presentaban cavitación pulmonar. Los autores de este estudio han interpretado estos datos considerando que la acumulación de deleciones en *M. tuberculosis* conduce a una disminución de la

virulencia, sin embargo parece ser que estas deleciones tienen lugar como consecuencia de la recombinación homóloga entre copias de IS6110 (Cole *et al.*, 1998). En otro estudio se observó que las deleciones identificadas no eran esenciales para causar la enfermedad, sin embargo su espectro de frecuencia sugiere que la mayoría son poco deletéreos para el patógeno (Tsolaki *et al.*, 2004). Otro estudio relacionado con la seguridad y la potencia vacunal de algunos mutantes de *M. tuberculosis* como candidatos vacúnales contra la tuberculosis demostró que la delección de varios genes involucrados en la patogenicidad y virulencia confirió a los mutantes la capacidad de generar respuestas inmunes protectoras frente al reto con *M. tuberculosis* en modelos animales (Borrero *et al.*, 2011).

Como se había mencionada anteriormente los genes *pe_pgrs* se caracterizan por su alto contenido de GC y extensas secuencias repetitivas, haciéndolos propensos a eventos de recombinación y la variabilidad genética. Se realizó un análisis comparativo de secuencias de los genes *pe_pgrs17* (Rv0978c) y *pe_pgrs18* (Rv0980c) de *M. tuberculosis* el cual reveló una variación genética sorprendente en comparación con la cepa de referencia H37Rv, la variación llamada polimorfismo 12/40 la cual consiste en una inserción de 12 pb acompañado por un conjunto de 40 polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) que se producen en uno o en ambos genes (Karboul *et al.*, 2006). Estos estudios revelaron evidencia directa y clara de la ocurrencia natural de la conversión génica en micobacterias, que parece estar restringido a cepas modernas de *M. tuberculosis*, además proporciona una nueva perspectiva a explorar los eventos moleculares que acompañaron la evolución, expansión clonal y reciente diversificación del bacilo tuberculos (Karboul *et al.*, 2006). La relación entre polimorfismos de los genes *pe* y otras familias de *M. tuberculosis* se encuentra poco explorada.

1.9 Antecedentes

En el laboratorio de Genética Molecular Microbiana, se tiene una colección de 120 cepas de micobacterias, recolectadas a partir del año 2009. Se tienen los datos epidemiológicos de los pacientes que incluyen: ubicación de la enfermedad, edad, género, y jurisdicción de procedencia. De estos aislados, 19 pertenecen al estado de Querétaro. Además se ha determinado la familia, linaje y genotipo por medio de las técnicas MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats y espoligotipificación (Guillén Nepita,; Vázquez-Heredia. 2014 Tesis de licenciatura). Adicionalmente se determinó si estas 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 (Pérez - Reyes, 2014). En un estudio previo realizado por Frutos-Hernández (2015) se encontraron 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. La cepa de MYC 056 presentó en el gen *pe_pgrs18* una transposasa, es decir con una enzima presente en la secuencia de inserción IS6110. El gen *pe_pgrs18* resultó ser el más polimórfico ya que el 71.1% de las cepas analizadas presentaron algún polimorfismo en su secuencia. Además se observó un patrón de asociación con base en las posiciones de los cambios de la secuencia del gen *pe_pgrs18* y las 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. Una inserción resultó estadísticamente significativa con respecto a la posición y las familias que la presentan. Dicha inserción se encontró en la posición 297-308, presentes en las familias X, T, Haarlem, NEW-1, Ghana, SNR

EA, SNR IO y ND. Con respecto a la asociación entre polimorfismos del gen *pe_pgrs18* y las características clínicas de las cepas se forman 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 (Frutos-Hernández, 2015).

2. JUSTIFICACIÓN

No existe suficiente evidencia epidemiológica y experimental que demuestre que la subfamilia del gen *pe_pgrs18* juega un papel importante en la virulencia y permanencia de *M. tuberculosis* en los tejidos del hospedero

La mayor parte de los estudios se han llevado a cabo en la subfamilia PE_PGRS33 pero no se cuenta con información precisa sobre la estructura y función de esta proteína aunque se conocen sus dominios.

Se cuenta con una colección de cepas aisladas de pacientes con tuberculosis provenientes de los Estados de Michoacán y Querétaro, las cuales han sido tipificadas genético-molecularmente.

El gen *pe_pgrs 18* de dichas cepas presentó polimorfismos y un patrón de asociación entre las posiciones de estos los y las familias a las que pertenecían las cepas.

Resulta interesante encontrar si esta asociación se mantiene a través del tiempo analizando cepas aisladas en un periodo posterior, con la finalidad de tener un mejor entendimiento de las características genéticas que se encuentran detrás de un fenotipo o genotipo observado.

Además de que es de gran importancia relacionar si los cambios que se puedan encontrar dentro de los dominios de las proteínas PE_PGRS18 tienen algún efecto en la estructura y por ende en su función y por tanto en la virulencia y patogenicidad de *M. tuberculosis*. Es de gran importancia contar con un conocimiento más detallado de los polimorfismos que dichos genes presentan en las cepas de *M. tuberculosis* circulantes en los estados de Michoacán y Querétaro, 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

Los polimorfismos en el gen *pe_pgrs18* de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de los Estados de Michoacán y Querétaro, tienen un efecto en la estructura de la proteína codificada y se relacionan con sus características genotípicas y clínicas.

4. OBJETIVOS

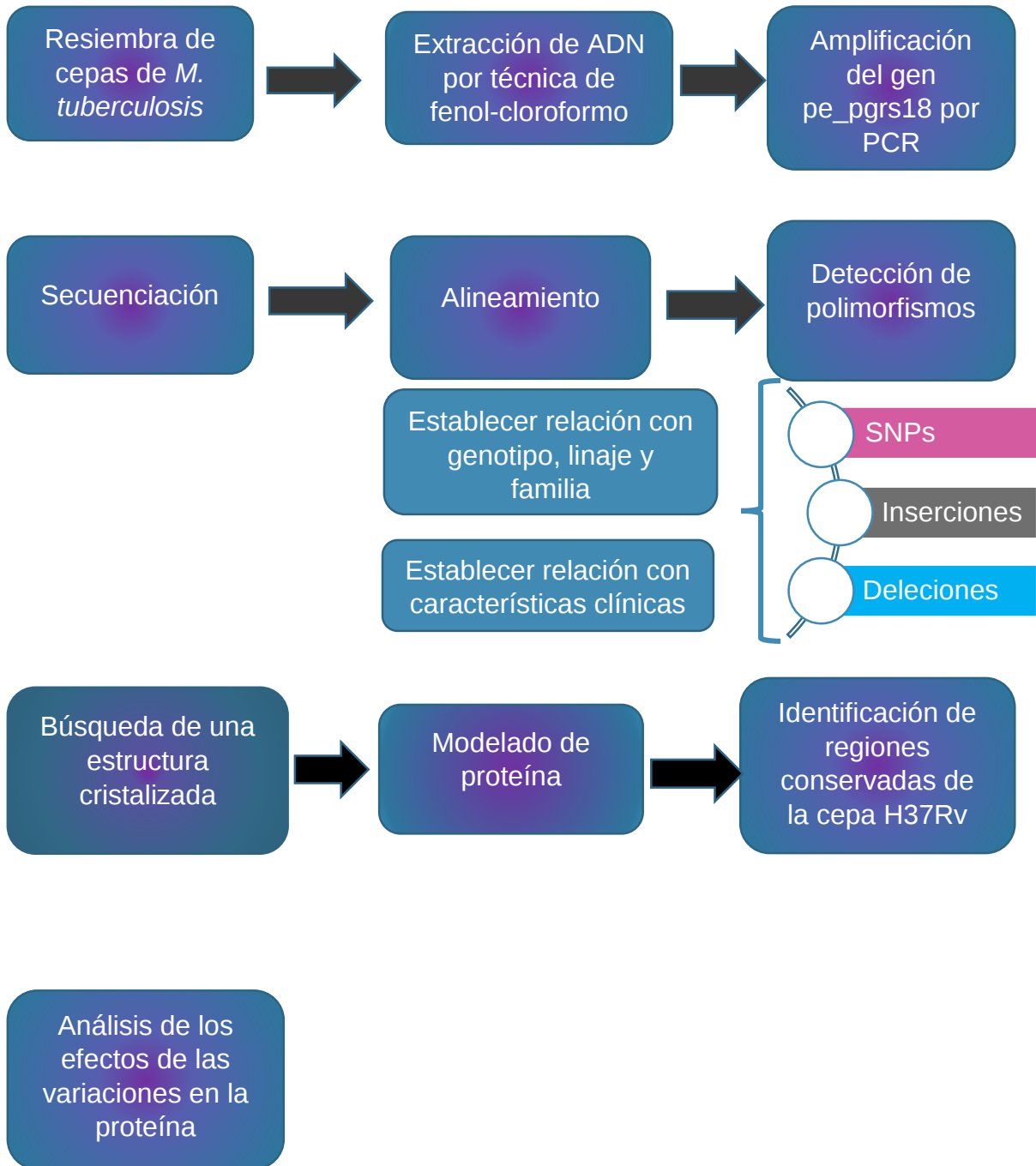
OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto que tienen los polimorfismos en el gen *pe_pgrs18* de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes de Michoacán y Querétaro, en la estructura de la proteína codificada y establecer una relación entre dichos polimorfismos y sus características genotípicas y clínicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar los polimorfismos en el gen *pe_pgrs18* de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en pacientes de Michoacán y Querétaro.
- 2) Analizar el efecto de los polimorfismos en la estructura de la proteína PE_PGRS18.
- 3) Asociar los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* con el genotipo de las cepas de estudio *M. tuberculosis* aisladas de pacientes de los Estados de Michoacán y Querétaro.
- 4) Relacionar los polimorfismos en el gen *pe_pgrs18* con las características epidemiológicas de las cepas de estudio.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Para este estudio se incluyeron 59 cepas de *M. tuberculosis* de las cuales, 40 fueron aisladas en el estado de Michoacán durante el periodo 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) y 19 fueron aisladas en el estado de Querétaro durante un periodo 2015, de estas cepas no se cuenta con información clínica y epidemiológica. 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.

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

Cepa (MYC)	Estado	Localización P/EP/M	Linaje	Familia	Genotipo AF	Resistencia S/ R
047	Mich.	NR	Euro-americano	New-1	NR	S
048	Mich.	NR	Euro-americano	New-1	NR	S
049	Mich.	Pulmonar	Euro-americano	New-1	NR	S
050	Mich.	Pulmonar	Euro-americano	S	NR	S
051	Mich.	Pulmonar	Euro-americano	Haarlem	NR	S
052	Mich.	Pulmonar	Euro-americano	Haarlem	NR	S
053	Mich.	NR	Euro-americano	X	NR	S
055	Mich.	Meníngea	Euro-americano	Lam	NR	R (SM)
056	Mich.	NR	Euro-americano	Lam	NR	S
058	Mich.	Pulmonar	Oeste de África	Chana	NR	S
059	Mich.	Pulmonar	Euro-americano	S	NR	R (MDR-TB)
060	Mich.	Pulmonar	NR	NR	NR	S
061	Mich.	Pulmonar	Euro-americano	Lam	NR	S
062	Mich.	Pulmonar	Indo-oceánico	EAI	NR	R (SM,EMB, PZA)
063	Mich.	Meníngea	Euro-americano	NEW-1	NR	NR
064	Mich.	Pulmonar	Euro-americano	X	NR	S
065	Mich.	Pulmonar	Euro-americano	LAM	NR	R (MDR-TB)
066	Mich.	Pulmonar	NR	NR	Este de África	NR
068	Mich.	Pulmonar	Euro-americano	Haarlem	NR	NR
069	Mich.	NR	Indo-oceánico	EAI	Haarlem	R (RIF)
070	Mich.	Pulmonar	NR	NR	EAI	NR
071	Mich.	Pulmonar	NR	NR	EAI	NR

073	Mich.	Pulmonar	NR	NR	Uganda	NR
076	Mich.	NR	NR	NR	Haarlem	NR
078	Mich.	Meníngea	NR	NR	NR	NR
079	Mich.	Pulmonar	NR	NR	Este de África	NR
080	Mich.	Pulmonar	NR	NR	LAM	NR
086	Mich.	NR	NR	NR	LAM	NR
087	Mich.	Renal	NR	NR	Haarlem	NR
088	Mich.	Pulmonar	NR	NR	H37Rv	NR
089	Mich.	NR	NR	NR	Haarlem	NR
090	Mich.	NR	NR	NR	Haarlem	NR
091	Mich.	NR	NR	NR	Haarlem	NR
092	Mich.	Pulmonar	NR	NR	S	NR
093	Mich.	Pulmonar	NR	NR	Este de África	NR
094	Mich.	NR	NR	NR	S	NR
095	Mich.	Pulmonar	NR	NR	S	NR
096	Mich.	Pulmonar	NR	NR	Haarlem	NR
097	Mich.	Pulmonar	NR	NR	NR	NR
098	Mich.	Pulmonar	NR	NR	Este de África	NR
100	Qro.	NR	NR	NR	LAM	NR
101	Qro.	NR	NR	NR	LAM	NR
102	Qro.	NR	NR	NR	Haarlem	NR
103	Qro.	NR	NR	NR	Haarlem	NR
104	Qro.	NR	NR	NR	Bovis	NR
106	Qro.	NR	NR	NR	Haarlem	NR
107	Qro.	NR	NR	NR	S	NR
108	Qro.	NR	NR	NR	Este de África	NR
109	Qro.	NR	NR	NR	Haarlem	NR
110	Qro.	NR	NR	NR	Bovis	NR
111	Qro.	NR	NR	NR	S	NR
112	Qro.	NR	NR	NR	Haarlem	NR
113	Qro.	NR	NR	NR	EAI	NR
114	Qro.	NR	NR	NR	Bovis	NR
115	Qro.	NR	NR	NR	LAM	NR
116	Qro.	NR	NR	NR	Haarlem	NR
117	Qro.	NR	NR	NR	S	NR
119	Qro.	NR	NR	NR	S	NR
120	Qro.	NR	NR	NR	S	NR

LAM: Latino-América-Mediterráneo; EAI: Este África-Indio; NR: No registrado; S: sensible; R: resistente; MDR-TB: Multidrogresistente; XDR-TB: Extremadamente drog resistente.

6.2 Extracción de ADN.

Las cepas se sembraron en medio Lowenstein-Jensen en campana de bioseguridad nivel II, con prácticas de bioseguridad nivel III, e incubadas a 37°C por tres o cuatro semanas. Se suspendieron dos colonias de micobacterias en 400 µL de solución de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, SDS 0.2%, NaCl 100 mM y EDTA 50 mM) y se inactivaron a 80°C durante 1h. En seguida se colocaron los tubos en hielo durante 2 min, se agitaron vigorosamente por 5 min y se

centrifugaron a 400 g por 1 min. Posteriormente se agregaron 400 μ L de mezcla de fenol y cloroformo 1:1 (v/v), se agitó vigorosamente por 10 min y se centrifugó a 13,400g por 10 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo (pH: 6.5-6.9) 1:1 (v/v), 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 20 min, transcurrido el tiempo se centrifugó a 9300g por 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADN se lavó con 200 μ L de etanol al 70% 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 30 μ L 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 2000/2000c (ThermoScientific®, USA). Se prepararon diluciones de trabajo a una concentración de 30 ng/ μ L. El ADN aislado y las diluciones de trabajo se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

6.3 Amplificación por PCR del gen *pe_pgrs18*.

Para la estandarización de las condiciones de amplificación se llevaron a cabo ensayos de amplificación del gen *pe_pgrs18* utilizando ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv. La reacción de PCR se desarrolló con 0.4 μ M de cada uno de los iniciadores *pe_pgrs18*F: GCAGGGATCGTCCGAATAAA y *pe_pgrs18*R: CGGTCACGCCCACAAGGTG (McEvoy *et al.*, 2012), 0.2 μ M de la mezcla de dNTP (Invitrogen, USA), 20 mM de Tris-HCl (pH 8.2), 2.0 mM de MgCl₂, 0.6U de Taq HIFI (Invitrogen, USA), DMSO 6% y 30 ng de ADN en un volumen total de 30 μ L. Se utilizó el siguiente programa de amplificación en un termociclador Corbett Research Palm-Cycler™ (Corbett Life Science®): un ciclo a 95 °C durante 6 min seguido de 20 ciclos a 95 °C por 30 s, 61 °C por 1 min y 72 °C por 3 min. Se realizó un paso final de extensión a 72 °C durante 2 min. 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).

6.4. Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de amplificación obtenidos fueron secuenciados por la empresa Elim Biopharm (USA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias depositadas en el GenBank empleando el algoritmo Blastn.

6.5 Análisis bioinformático

Las 59 secuencias obtenidas fueron editadas manualmente en el programa Bioedit versión 7.2.5. En seguida se realizó un alineamiento múltiple mediante los programas ClustalX versión 2.1 y Mega versión 6.06 para la identificación de polimorfismos. Se buscó una estructura cristalizable (molde) con el programa Protein Data Bank, y con el programa Chimera 1.11.2 se trató de realizar el modelado de la proteína. Después se localizaron las regiones conservadas o dominios de la secuencia de referencia con la ayuda del programa Interpro y con el programa PROVEAN se analizaron las predicciones de los efectos de las variaciones de cada una de las secuencias de aminoácidos de las 59 cepas que se encuentran en los dominios de la secuencia referencia.

6.6 Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS (Statistical Product and Service Solutions) v. 20.0. La asociación de variables se efectuó con el estadístico de prueba no paramétrico Chi cuadrado. Las cifras estadísticamente significativas fueron las que asociaron a un $P < 0.05$.

Los gráficos y tablas de resultados se realizaron con la ayuda del programa Excel.

7. RESULTADOS

7.1 Amplificación del gen *pe_pgrs18*.

Se amplificó una región del gen *pe_pgrs18* en cada una de las cepas de estudio (Fig. 7). Se obtuvieron los amplicones del tamaño esperado (1400 bases) para todas las cepas, excepto para MYC 056 que presentó una banda de 1650 pb y para las cepas MYC 080 y MYC 086 que presentaron una banda de 1,150 pb. No se obtuvo producto de amplificación para las cepas MYC 082, MYC 105 Y MYC 118.

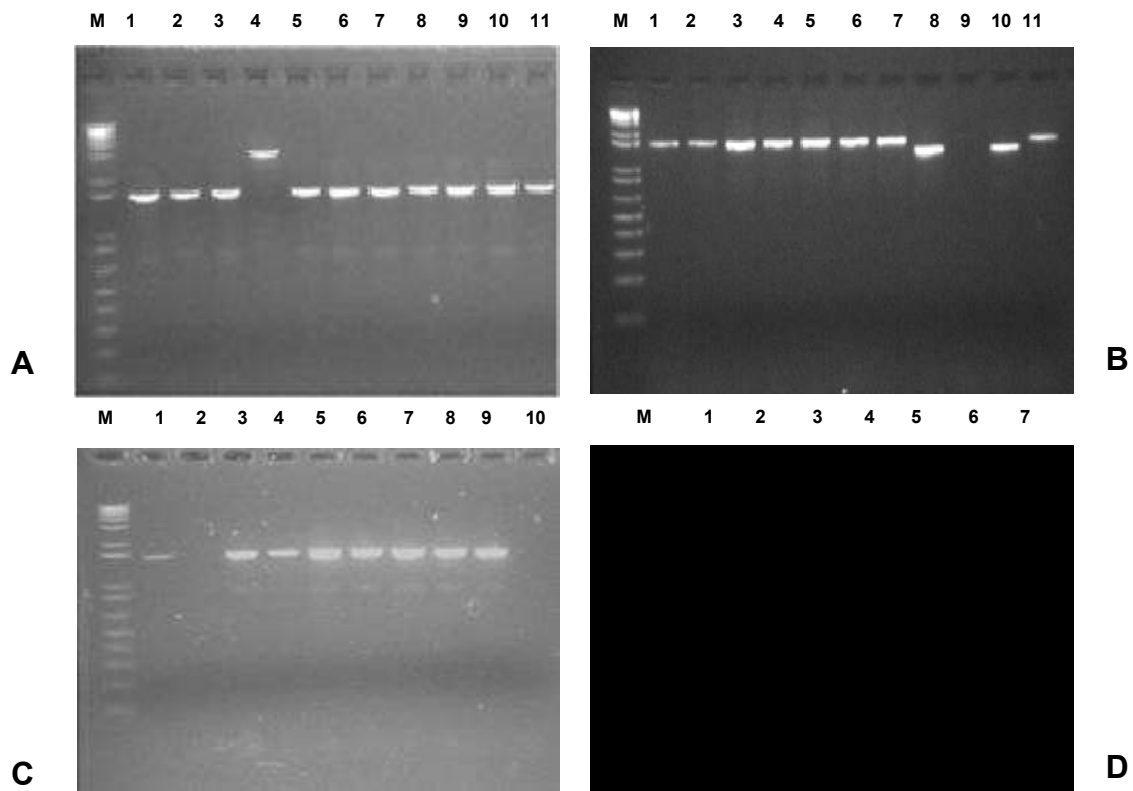
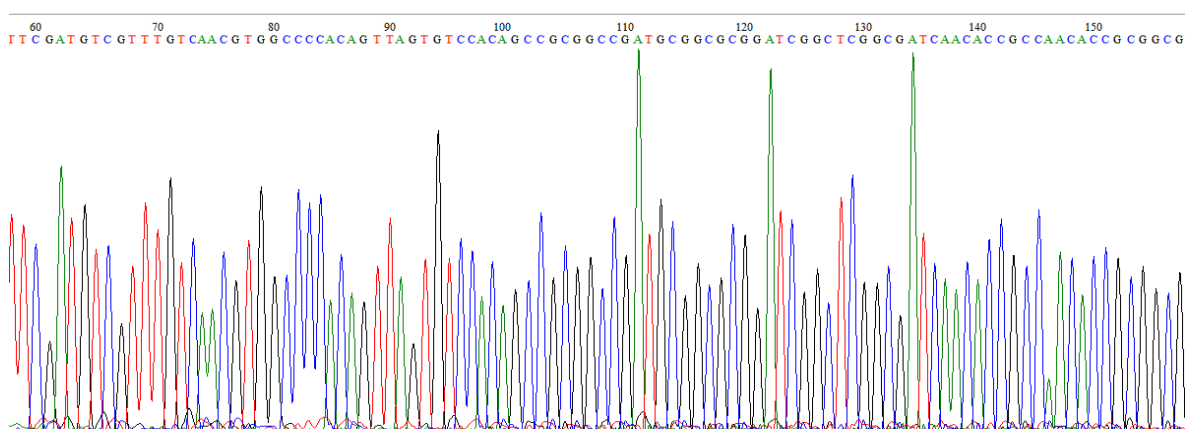


Figura 7. Productos de amplificación del gen *pe_pgrs18* obtenidos con el ADN de las cepas de *M. tuberculosis*. Geles de agarosa al 2% (p/v) teñidos con BrEt que muestran los productos de amplificación del gen *pe_pgrs18* ; A) Carriles: M (marcador de peso molecular, 1 kb plus ADN ladder, Invitrogen, USA) ,1 MYC 052, 2 MYC 053, 3 MYC 055, 4 MYC 056, 5 MYC 058, 6 MYC 059, 7 MYC 060, 8 MYC 061, 9 MYC 061, 10 MYC 062, 11 MYC 063; B) M (marcador de peso molecular), 1 MYC 069, 2 MYC 070, 3 MYC 071, 4 MYC 073, 5 MYC 076, 6 MYC 078, 7 MYC 079, 8 MYC 080, 9 MYC 082, 10 MYC 086, 11 MYC 087; C) M (marcador de peso molecular), 1 MYC 104, 2 MYC 105, 3 MYC 106, 4 MYC 108, 5 MYC 109, 6 MYC 110, 7 MYC 111, 8 MYC 112, 9 MYC 113, 10 MYC 114; D) M (marcador de peso molecular), 1 MYC 114, 2 MYC 115, 3 MYC 116, 4 MYC 117, 5 MYC 118, 6 MYC 119, 7 MYC 120.

7.2 Secuencias de los fragmentos amplificados.

Se secuenció la cadena codificante del gen *pe_pgrs18* de las cepas de estudio. Se obtuvieron electroferogramas de muy buena calidad, con una alta resolución y definición de picos (Fig. 8). Las secuencias obtenidas presentaron un tamaño de 1,371 bases. Sin embargo la cepa 56 solo presentó 837 bases ya que no se encontró unión entre los dos segmentos secuenciados del mismo gen.

A



B

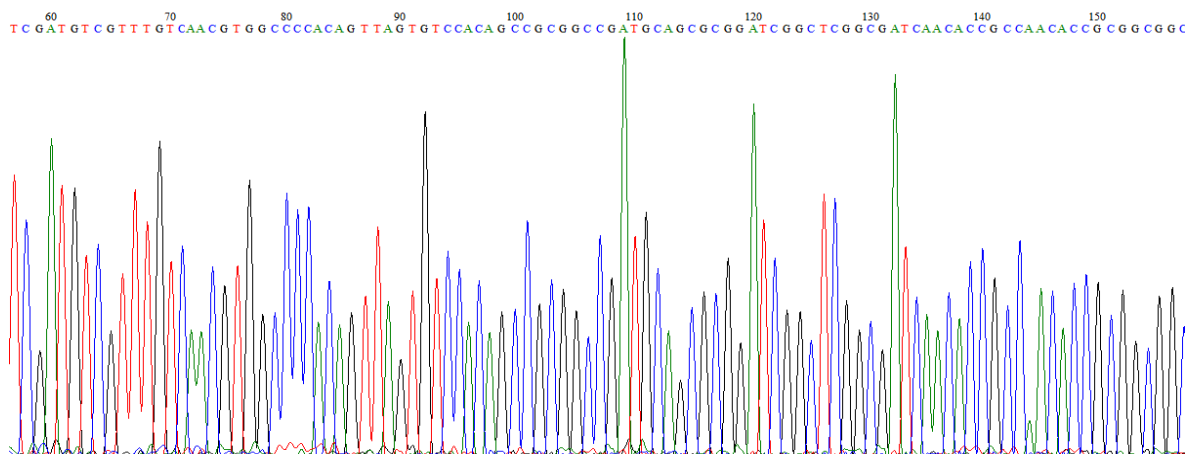
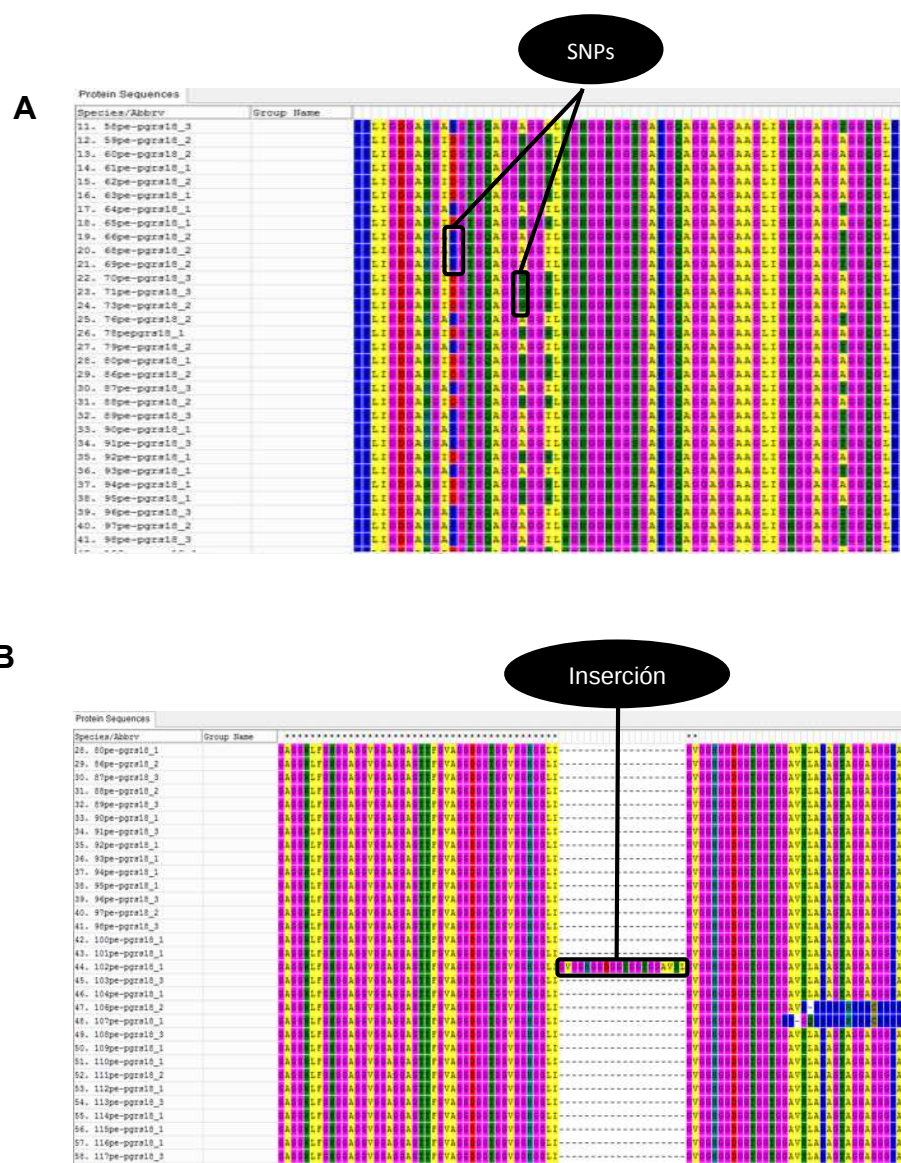


Figura 8. Electroferogramas representativos de las secuencias obtenidas del gen *pe_pgrs18*. Cepas: A) MYC 056 y B) MYC 106.

7.3 Detección de SNPs, inserciones y deleciones del gen *pe_pgrs18* en las cepas de estudio.

El alineamiento múltiple de las 59 secuencias mostró que los polimorfismos identificados fueron SNPs, inserciones y deleciones (Fig. 9). Las posiciones de los polimorfismos se establecieron en base a la posición dentro del gen de la cepa de referencia H37Rv.



C



Figura 9. Alineamiento múltiple de algunas de las cepas con el gene 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. Los alineamientos mostrados corresponden al gen *pe_pgrs18*. Tipos de polimorfismos encontrados: A) SNP; B) inserciones; C) deleciones.

Después de realizar los alineamientos se identificaron los tipos de polimorfismos presentes en cada una de las 59 cepas de las cuales 40 pertenecen al estado de Michoacán y 19 al estado de Querétaro, así como la posición en la que se encontraron (Tabla 2).

Tabla 2. Polimorfismos encontrados en el gen *pe_pgrs18* en las cepas de estudio de acuerdo a la entidad de origen.

Polimorfismos	Entidad Federativa	
	Michoacán	Querétaro
SNPs	429	395
Inserciones	18	13
Deleciones	27	17

Las cepas aisladas en el estado de Querétaro resultaron ser las más polimórficas con un promedio de 20.78% SNPs, 0.68% inserciones y 0.89% deleciones encontrados sólo en 19 cepas, sin embargo las cepas aisladas en el estado de Michoacán presentaron un promedio de 10.72% SNPs, 0.67% inserciones y 0.45% deleciones encontradas en 40 cepas.

El gen *pe_pgrs18* es muy polimórfico, las 59 cepas de estudio presentaron un total de 834 SNPs, 40 inserciones y 35 deleciones. Sin embargo, 13 de las cepas de estudio no presentaron ningún cambio las cuales son: MYC 49, MYC 050, MYC 056, MYC 059, MYC 060, MYC 063, MYC 073, MYC 088, MYC 092, MYC 094, MYC 095, del estado de Michoacán y MYC 111 y MYC 119, del estado de Querétaro.

Las cepas que presentaron un mayor número de SNPs fueron: MYC 107 (146 SNPs), MYC 106 (133 SNPs) del estado de Querétaro, MYC 066 (74 SNPs) y 79 (26 SNPs) del estado de Michoacan. Las cepas que presentan menor número de SNPs son: MYC 104, MYC 110, MYC 114 solo presentan 1 SNPs. Sin embargo las cepas MYC 49, MYC 050, MYC 056, MYC 059, MYC 060, MYC 063, MYC 073, MYC 088, MYC 092, MYC 094, MYC 095, MYC 111 y MYC 119 no presentan SNPs (Fig. 10).

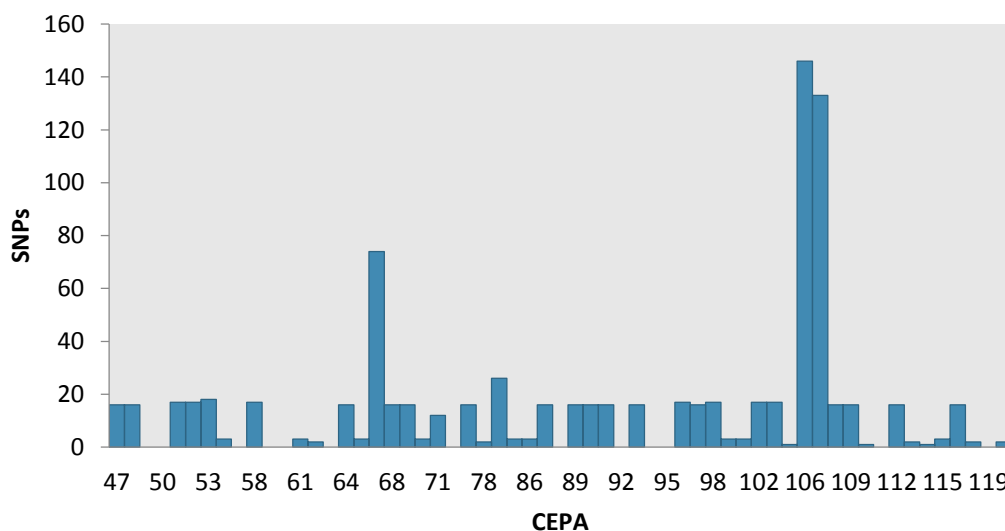


Figura 10. Número de SNPs presentes en el gen *pe_pgrs18* de cada una de las cepas de estudio.

La cepa que presenta un mayor número de inserciones es MYC 069 (7 inserciones), seguido de la cepa MYC 106 (4 inserciones) y la cepa MYC 107 (3 inserciones) (Fig. 11).

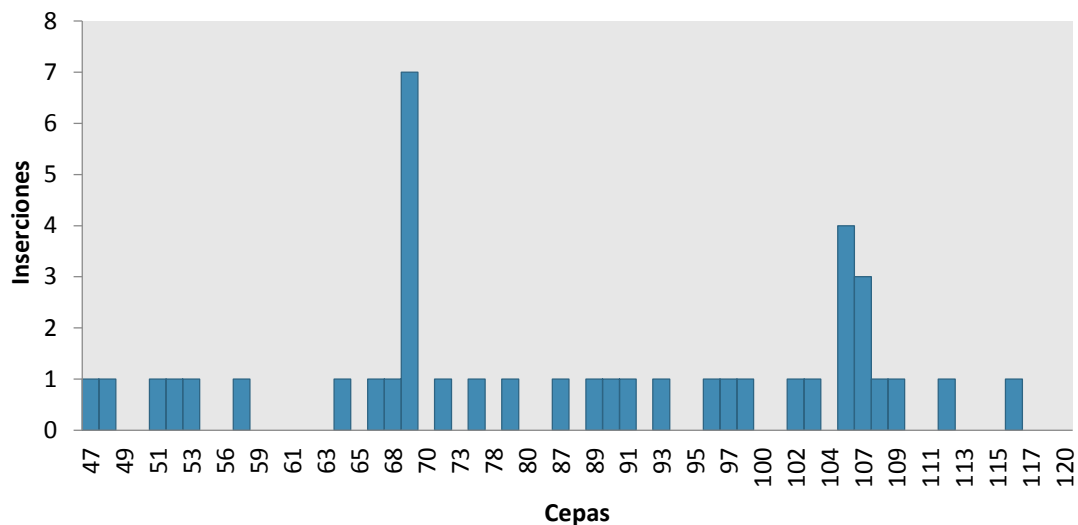


Figura 11. Número de inserciones presentes en el gen *pe_pgrs18* de cada una de las cepas de estudio.

La cepa con mayor número de deleciones en la MYC 066 (10 inserciones) seguido de las cepas MYC 106 y MYC 107 (8 inserciones) además la cepa MYC 102 solo presentan 1 inserción. El resto de las cepas no presentan inserciones (Fig. 12).

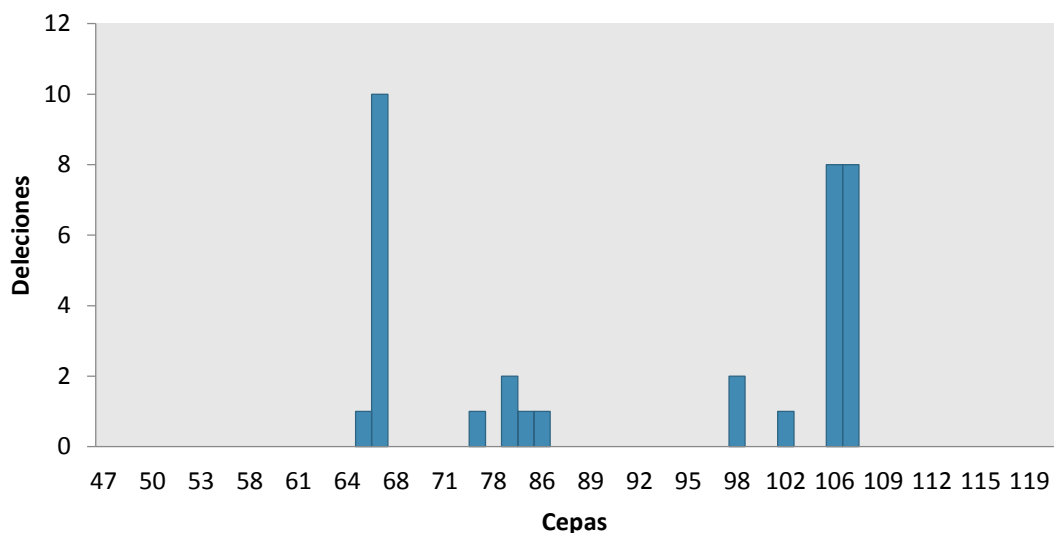


Figura 12. Número de deleciones presentes en el gen *pe_pgrs18* de cada una de las cepas de estudio.

De las 59 cepas de estudio 13 de ellas no presentan ningún cambio, sin embargo las 46 cepas que si presentan cambios todas presentan SNPs, 22 cepas presentan inserciones, 3 cepas presentan delecciones y 7 de las cepas presentaron los tres cambios.

7.4 Modelado de la proteína PE_PGRS18.

Primero se realizó la búsqueda de una estructura cristalizada o proteína molde para poder realizar el modelado de la proteína PE_PGRS18. Se utilizó el programa Protein Data Bank (PDB) en el cual no se encontró una estructura cristalizada.

Se intentó realizar un modelado de la proteína PE_PGRS18, con la ayuda del programa Chimera 1.11.2, mediante la búsqueda de estructuras homólogas de la secuencia en la cepa de referencia H37Rv. Sin embargo no fue posible ya que sólo son reconocidas las regiones conservadas de la proteína y una secuencia de 198 aminoácidos en posición de 93-291 no es reconocida por ninguna secuencia homóloga (Fig. 13).

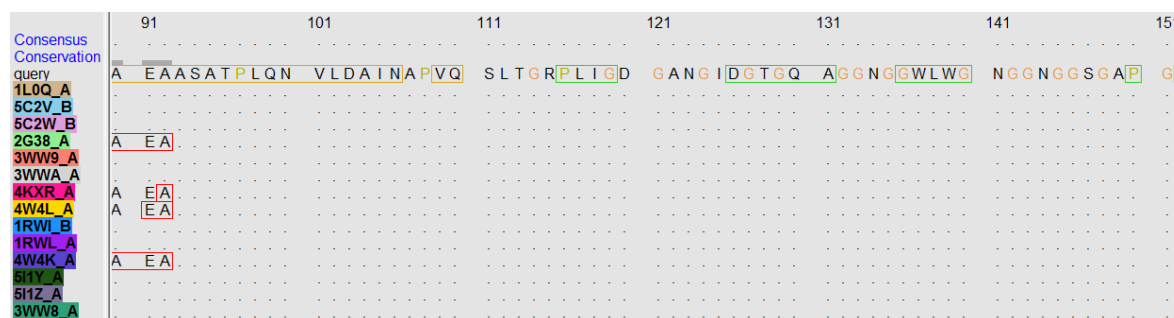


Figura 13. Alineamiento para el modelado de la proteína PE_PGRS18. Los puntos que se observan en la imagen no forman parte de ninguna región conservada.

7.5 Análisis de los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* encontrados en las regiones conservadas de las cepas de estudio.

Primero se identificaron, las regiones conservadas respecto de la cepa H37Rv mediante el programa InterPro (protein sequence analysis and classification). Se identificaron cuatro dominios importantes (Fig. 14) que son: N-terminal, C-terminal, WD40/YVTN y óxido nitroso reductasa.

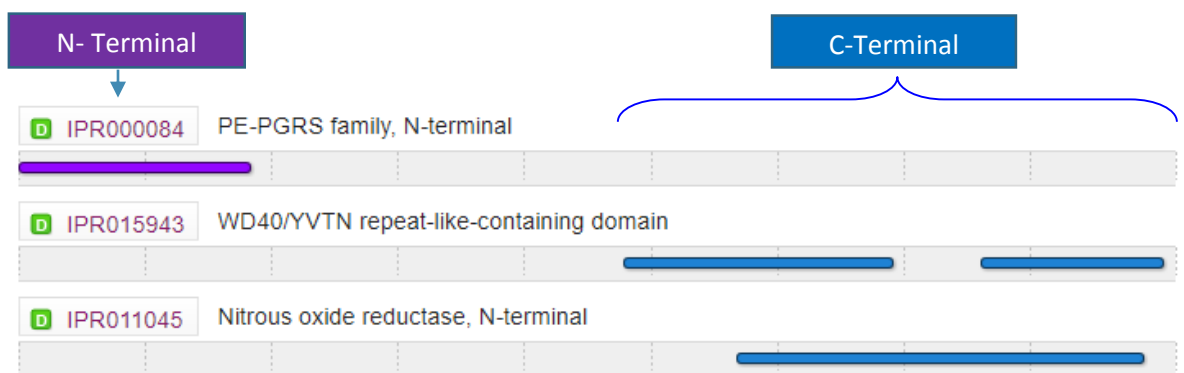


Figura 14. Regiones conservadas de la secuencia del gen *pe_pgrs18*.

A continuación se buscaron en las cepas, los polimorfismos en el gen *pe_pgrs18* que se encuentran dentro de las regiones conservadas (Tabla 3).

Tabla 3. Polimorfismos del gen *pe_pgrs18* encontrados en las regiones conservadas de algunas de las cepas de estudio.

CEPA	SNPs	INSERCCIONES	DELECCIONES
51	1	0	0
52	1	0	0
53	2	0	0
55	3	0	0
58	1	0	0
61	3	0	0
62	2	0	0
65	3	0	1
66	42	0	6
70	1	0	0
71	10	1	0
78	1	0	0
79	0	0	2
80	3	0	1
86	3	0	1
96	1	0	0
100	2	0	0
101	2	0	0
102	1	0	0
103	1	0	0
106	105	1	7
107	105	1	7
113	1	0	0
115	3	0	0
117	2	0	0
120	2	0	0

De las 59 cepas de estudio sólo 26 presentaron cambios en estas regiones conservadas (dominios). Estas cepas presentaron 301 SNPs, 25 delecciones y 3 inserciones en las regiones conservadas.

Se puede observar que en las regiones conservadas sigue siendo mayor el número de SNPs. Sin embargo el número de delecciones en estas regiones es mayor que el número de inserciones. En las regiones conservadas las cepas que presentan mayor número de SNPs son las cepas MYC 106, MYC 107, MYC 066 y MYC 071 (Fig.15).

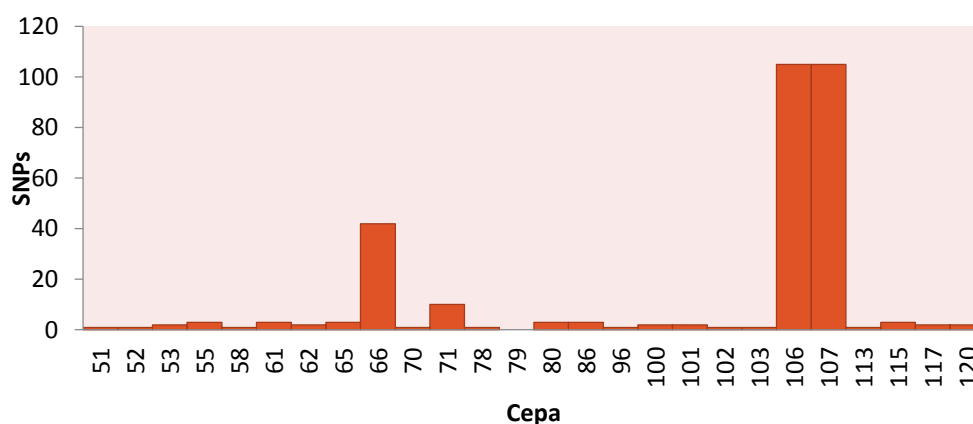


Figura 15. Cepas que presentan SNPs en regiones conservadas.

Las cepas MYC 071, MYC 106 y MYC 10 presentan inserciones en las regiones conservadas (Fig.16).

Las cepas MYC 106 y MYC 107 presentan 7 delecciones, la cepa MYC 066 presenta 6 delecciones, la MYC 079 presenta 2 delecciones y las cepas MYC 065, MYC 080 y MYC 086 presentan 1 delección en regiones conservadas (Fig. 17)

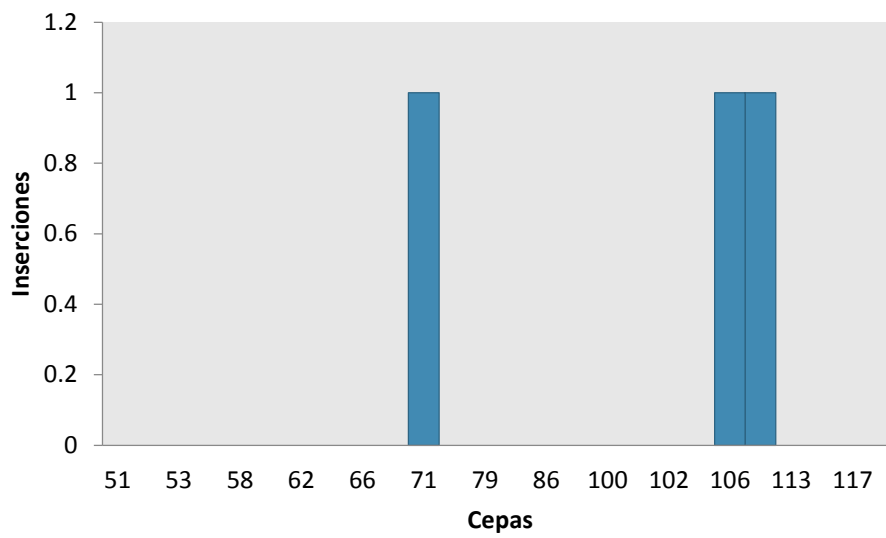


Figura 16. Cepas que presentan inserciones en regiones conservadas

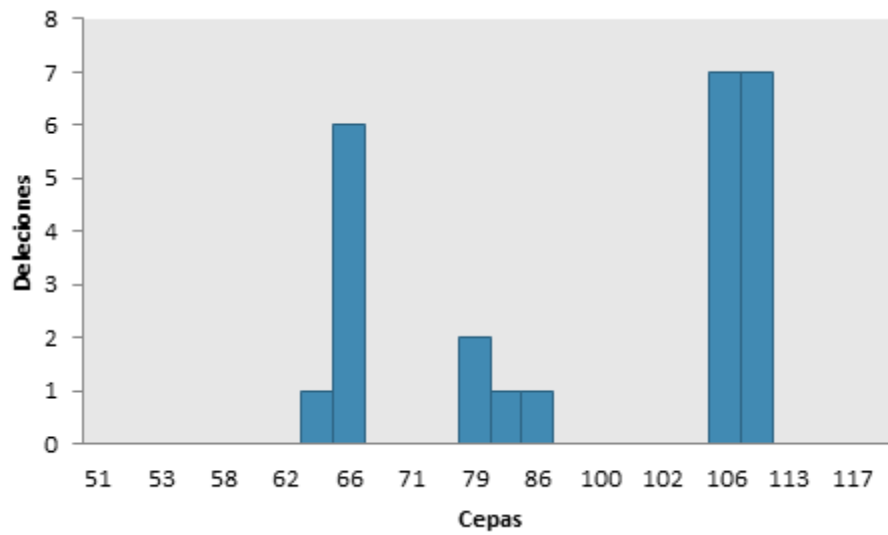


Figura 17. Cepas que presentan deleciones en regiones conservadas

7.6 Efecto de los polimorfismos sobre la proteína.

El programa PROVEAN nos permitió predecir si los polimorfismos encontrados en las regiones conservadas del gen *pe_pgrs18*, eran perjudiciales. Si el score es menor a -2.5, entonces el efecto es perjudicial (Tabla 4).

Tabla 4. Predicciones de los polimorfismos encontrados en las regiones conservadas.

CEPAS	MUTACIÓN	POSICIÓN	SCORE	PREDICCIÓN
65, 80, 86	Deleción	361-443(312-394)	-37.954	Perjudicial
66	Deleción	320-349(275-304)	-38.489	Perjudicial
	Deleción	354-383(305-334)	-15.589	Perjudicial
	SNPs	386(337)	-2.689	Perjudicial
	Deleción	425-460 (376-411)	-10.289	Perjudicial
	SNPs	465 (416)	-3.21	Perjudicial
	Deleción	470-474 (421-425)	3.518	Perjudicial
106, 107	SNPs	348 (303)	-3.788	Perjudicial
	Inserción	349-354 (304-305)	-3.241	Perjudicial
	SNPs	360 (311)	-3.234	Perjudicial
	Deleción	380-384 (332-334)	-8.297	Perjudicial
	Deleción	391-402 (343-352)	-4.135	Perjudicial
	Deleción	416-426 (368-376)	-5.461	Perjudicial
	SNPs	459 (410)	-2.966	Perjudicial

De los 329 cambios encontrados en las regiones conservadas de las 26 cepas, sólo 14 de ellos fueron significativos en 6 cepas, para la estructura de la proteína y por ende su función.

Como se puede observar en la tabla 7, las cepas MYC 065, MYC 080 y MYC 086 presentan la misma deleción de 84 aminoácidos que es perjudicial para la estructura de la proteína. Esta deleción puede ser la causa de la banda de menor tamaño en las cepas MYC 080 y MYC 086. En la cepa MYC 065 no se observa esta banda. La cepa 66 presenta 4 deleciones y dos SNPs perjudiciales, por último las cepas MYC 106 y MYC 107 presentan 3 SNPs, 3 deleciones y una inserción.

Los resultados anteriores solo son de tipo pronóstico ya que nos están indicando que sí hay un cambio en la estructura de la proteína, pero no podemos saber si este cambio afecta o no su función.

7.7 Asociación de los polimorfismos con los genotipos de las cepas de estudio.

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

En las figuras se muestran únicamente las asociaciones estadísticamente significativas entre las posiciones del polimorfismo con el genotipo, linaje y familia al que pertenecen las cepas de estudio. La totalidad de polimorfismos, su posición y genotipo, linaje o familia en que se encontraron, son especificados en las tablas 5, 6, y 7.

Se obtuvo la secuencia completa del gen *pe_pgrs18* de la cepa H37Rv (458 aminoácidos) (coordinadas en el genoma 1,095,078.1,096,451), presentó más de 100 SNP, además de inserciones y deleciones, sin embargo se observó un patrón de asociación de las posiciones de los polimorfismos y los genotipos en que se presentaban con un valor de Chi cuadrado de $P < 0.05$, lo que permitió formar cinco grupos bajo estos criterios. El primer grupo presenta dos SNPs en posición 43 y 483, se observa con una frecuencia significativamente mayor en los genotipos Haarlem, Uganda, EAI, S, LAM y ND (Fig.18 A); el segundo grupo lo formaron dos SNPs en posición 73 y 286, con una frecuencia significativamente mayor en los genotipos LAM, EAI y ND (Fig. 18 B); el tercer grupo lo formaron tres SNPs en posición 83, 300 y 301 presentes en los genotipos Bovis, LAM, EAI, S y ND (Fig. 18 C); el cuarto grupo lo formaron un rango de 16 SNPs en posición 99 a 174, dos SNPs mas en posiciones 288 y 471, además de una delección de 84 aminoácidos en posición 360-444, con una frecuencia significativa en los genotipos Haarlem, ND, LAM, EAI y Este de África (Fig. 18 D), por último el quinto grupo lo formaron un SNPs en posición 472 y una inserción de 4 aminoácidos en posición 101-104 con una frecuencia significativa en los genotipo Haarlem, EAI, Este de África y ND (Fig.18 E)

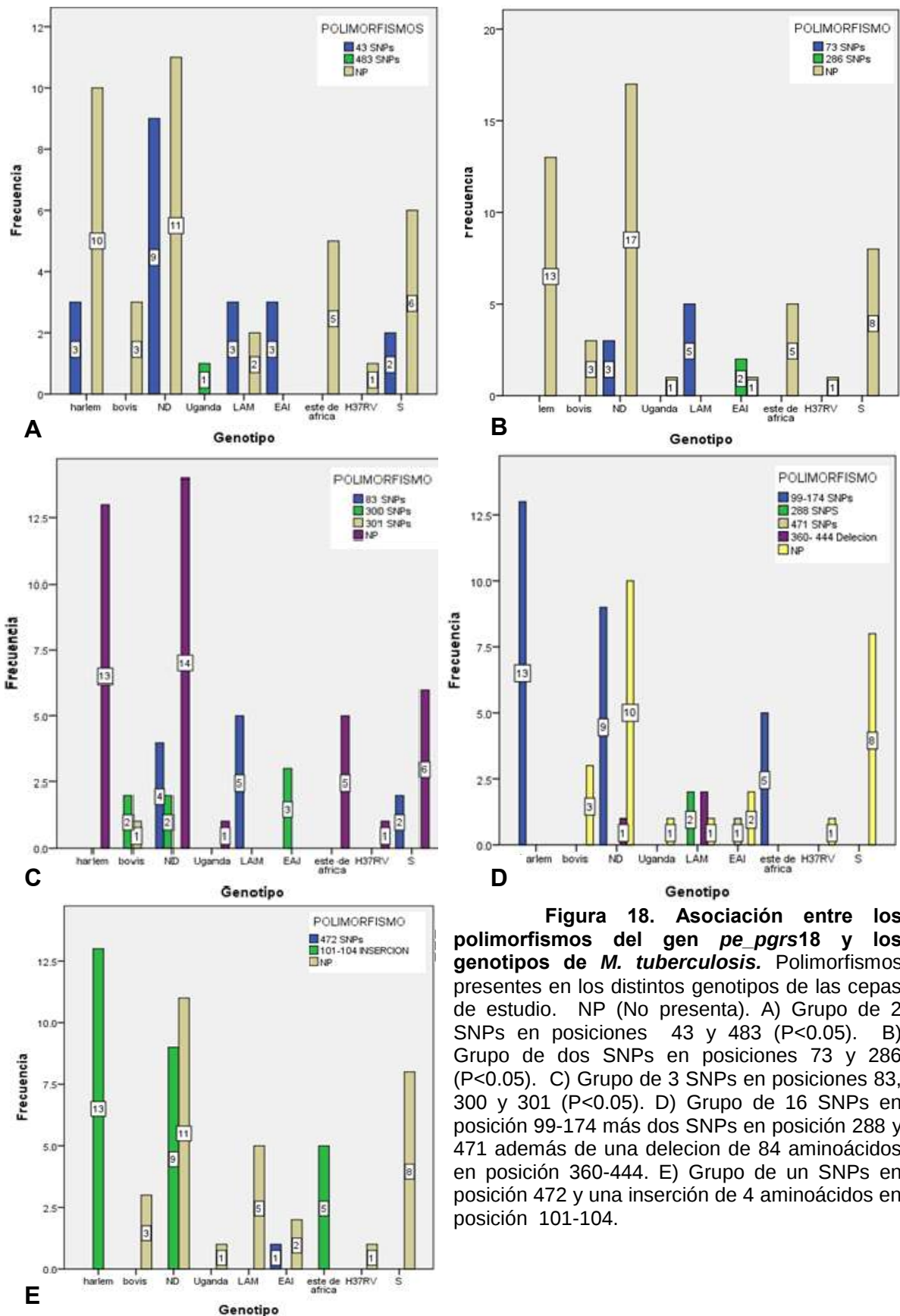


Figura 18. Asociación entre los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* y los genotipos de *M. tuberculosis*. Polimorfismos presentes en los distintos genotipos de las cepas de estudio. NP (No presenta). A) Grupo de 2 SNPs en posiciones 43 y 483 ($P < 0.05$). B) Grupo de dos SNPs en posiciones 73 y 286 ($P < 0.05$). C) Grupo de 3 SNPs en posiciones 83, 300 y 301 ($P < 0.05$). D) Grupo de 16 SNPs en posición 99-174 más dos SNPs en posición 288 y 471 además de una deleción de 84 aminoácidos en posición 360-444. E) Grupo de un SNPs en posición 472 y una inserción de 4 aminoácidos en posición 101-104.

Se determinó la asociación de las posiciones de los polimorfismos encontrados en las regiones conservadas de algunas de las cepas y los genotipos que se presentan con una frecuencia significativamente mayor, sin embargo no se obtuvo un resultado estadísticamente significativo.

El total de polimorfismos, incluidos los no significativos y las cepas correspondientes se muestran en la tabla 5. De las dos inserciones observadas resultó significativa la encontrada en la posición 101-104, con una frecuencia significativamente mayor en los genotipos Haarlem en 13 de las cepas, ND en 9 de las cepas y en el Este de África en 5 de las cepas. Se presentaron 8 deleciones, sin embargo resultó con una frecuencia significativamente mayor la ubicada en la posición 360-444 presente en los genotipos LAM y ND.

Tabla 5. Tipos de polimorfismos en el gen *pe_pgrs18*, posiciones y genotipos en que se encuentran.

Polimorfismo	Posición	Genotipo	Cepa (MYC)
SNPs	99-174	Este de África I, Haarlem, ND	066, 079, 093, 098, 108, 069, 076, 087, 097, 106, 109, 112, 116, 068, 089, 090, 091
	43-174	Haarlem	096, 102, 103
	43,286,300	EAI, ND	070, 071, 113, 78
	43, 73,83	LAM	080, 086. 115
	73, 83, 288	LAM	100, 101
	348, 360, 459	S, Haarlem	106, 107
	43, 83	S	117-120
	300, 301	Bovis	104, 110, 114
Inserción	101-104	Este de África I, Haarlem, ND	066, 079, 093, 098, 108, 069, 076, 087, 089, 090, 091, 096, 097, 102, 103, 106, 109, 112, 116, 068
	349-354	Haarlem, S	106, 107
Delección	360-444	LAM	080, 086,
	320-349	Este de África	066
	354-383	Este de África	066
	425-460	Este de África	066
	470-474	Este de África	066
	380-384	Haarlem, S	106, 107
	391-402	Haarlem, S	106,107
	416-426	Haarlem, S	106,107

Las cepas MYC 106 y MYC 107, son las que presentan mayor número de polimorfismos con un total de 3 inserciones, 8 deleciones, la cepas MYC 106 presenta 146 SNPs y la MYC 107 presentan 133 SNPs , ambas cepas fueron aisladas en el estado de Querétaro sin embargo la cepa MYC 106 pertenece al genotipo Haarlem y la cepa MYC 107 al genotipo S. Ambas cepas presentan los mismos polimorfismo con excepción de 13 SNPs y una inserción adicional que presenta la cepa MYC 106.

7.8 Asociación de polimorfismos del gen *pe_pgrs18* con la familia y linaje de las cepas de estudio.

Se determinó la asociación entre los polimorfismos y la frecuencia significativamente mayor con las familia a la que pertenecen, 19 cepas del estado de Michoacán (son las únicas cepas que se encuentran tipificadas a nivel de familia). Dos SNPs en posiciones 83 y 300 presentan una frecuencia significativa en las familias X, LAM y EAI (Fig. 19).

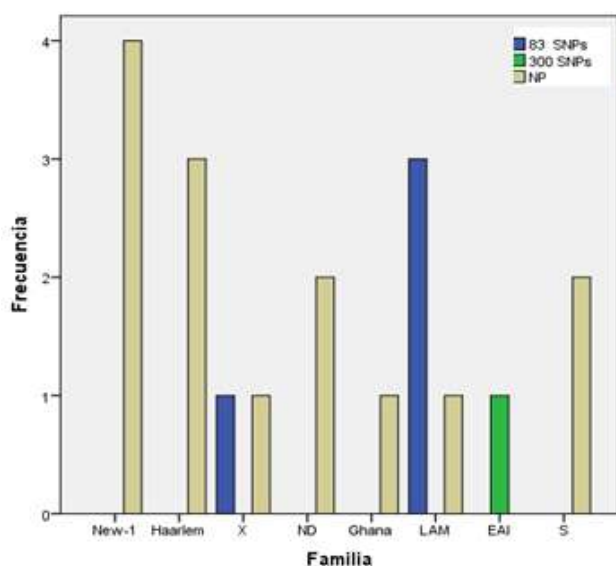


Fig. 19. Asociación entre los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* y la familia de las cepas de estudio. Polimorfismos presentes en las distintas familias de las cepas de estudio. NP (No presenta). Grupo de 2 SNPs en posiciones 83 y 300 ($P < 0.05$).

El total de las posiciones de los polimorfismos, incluidos los no significativos del gen *pe_pgrs18* y las familias a las que pertenecen se muestran en la tabla 6. No se observó una frecuencia significativamente mayor entre las posiciones de las deleciones y las familia.

Tabla 6. Polimorfismos, familia y linaje de las cepas de estudio.

Polimorfismo	Posición	Familias	Linaje	Cepa (MYC)
SNPs	99-174	New-1, Haarlem, X, ND.	Euro-Americano, Indo-Oceánico	047,048, 068, 064, 066
	43-174	Haarlem, X, Ghana	Euro-Americano, Oeste de África	051, 052, 058
	43, 73, 83	LAM	Euro-Americano	055, 061, 065
	43, 300	EAI	Indo- Oceánico	062
Inserción	101-104	New-1, Haarlem, X, Ghana, ND	Euro-Americano, Oeste de África.	047, 048, 051, 052, 068, 053, 064, 058, 066
Delección	360-444	LAM	Euro-Americano	065
	320-349	ND	ND	066
	354-383	ND	ND	066
	425-460	ND	ND	066
	470-474	ND	ND	066

Polimorfismo 12/40

Se encontró el polimorfismo 12/40 en 27 de las cepas de estudio en posiciones que consiste en 40 SNPs en la posición 352-579 y una inserción en la posición 354-365, específicamente en las familias X, Haarlem, NEW-1, Ghana y ND. Estos datos concuerdan con el trabajo previo realizado por McEvoy (2012) en el que señala la presencia de esta variación en cepas de las familias Haarlem y LCC sin embargo la posición de los SNPs y la inserción es distinta.

Se encontró asociación entre las posiciones de los polimorfismos y los linajes de las cepas, lo que permitió formar seis grupos bajo estos criterios (Tabla 6). El primer grupo está formado por una delección de 29 aminoácidos en la posición 320-349 el cual presenta una frecuencias significativa en el linaje ND (Fig. 20A). El

segundo grupo está formado por la delección de 29 aminoácidos en la posición 354-383 presente en el linaje ND (Fig. 20B). El tercer grupo está formado por el SNPs en posición 386 presente en el linaje ND (Fig. 20 C). El cuarto grupo está formado por la delección de 35 aminoácidos en posición 425-460 presente en el linaje ND (Fig. 20 D). El quinto grupo está formado por un SNPs en posición 465 presente en el linaje ND (Fig. 20 E) y el sexto grupo está formado por la delección de 5 aminoácidos en posición 470-475 presente en el linaje ND (Fig. 20F).

Los seis grupos con asociación significativa corresponden a polimorfismos de la cepa MYC 066, la cual pertenece al linaje ND, cabe mencionar que es la cepa que presenta un mayor número de polimorfismos del Estado de Michoacán. Además de que estos polimorfismos se encuentran presentes en las regiones conservadas y las predicciones nos indican que son perjudiciales para la estructura de la proteína.

El total de polimorfismos, incluidos los no significativos y los linajes a los que pertenecen se muestran en la tabla 10.

El linaje Euro- Américo se presenta en 15 de las cepas de estudio, sin embargo la cepa MYC 058 pertenece al linaje Oeste de África, las cepas MYC 062, pertenecen al linaje Indo- Océánico, la cepa MYC 066 pertenece a un linaje ND (no determinado).

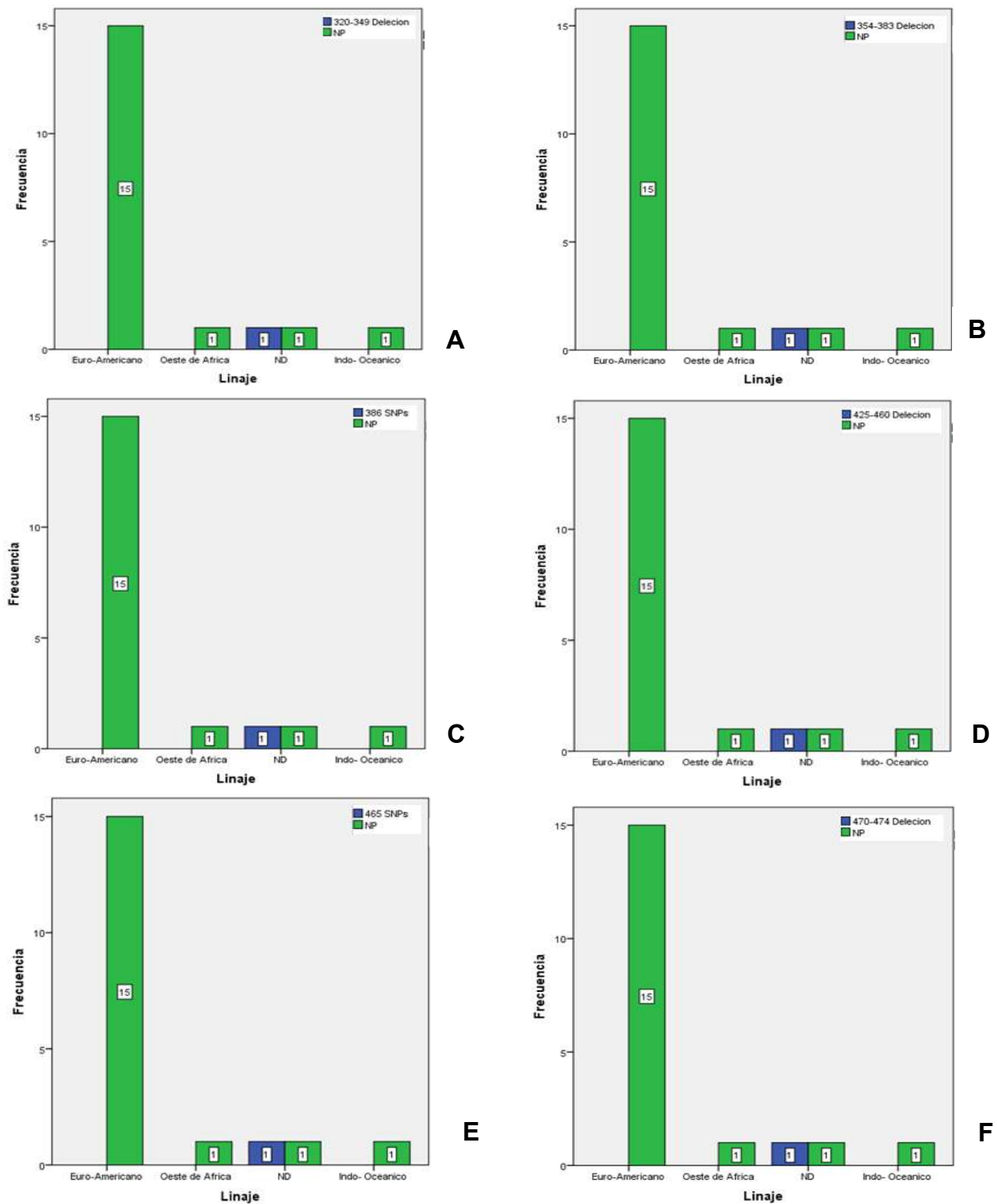


Figura 20. Asociación entre los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* y los linajes de *M.tuberculosis*. Polimorfismos presentes en los linajes de las cepas de estudio. NP (No presenta). A) Grupo de una deleción en posiciones 320-349 ($P < 0.05$). B) Grupo de una deleción en posiciones 354-383 ($P < 0.05$). C) Grupo de un SNPs en posiciones 386 ($P < 0.05$). D) Grupo de una deleción en posición 425-460. E) Grupo de un SNPs en posición 465. F) Grupo de una deleción en posición 470-474.

7.9. Asociación de los polimorfismos con los datos epidemiológicos y características clínicas de las cepas.

Se realizó la asociación de los polimorfismos encontrados en la secuencias de aminoácidos del gen *pe_pgrs18* de 40 de las cepas de estudio (ya que no se han reportado datos epidemiológicos de las 19 cepas del estado de Querétaro) con las frecuencias estadísticamente significativas de los datos epidemiológicos (procedencia clínica, jurisdicción sanitaria, sexo, edad), de cada cepa.

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

Las procedencias clínicas se han dividido en; pulmonar (P), extra pulmonar (EP) y meníngea (M). Como se muestra en la figura 21, 24 de las cepas de *M. tuberculosis* presentan una procedencia pulmonar, 3 de las cepas de *M. tuberculosis* presentan una procedencia meníngea y 2 de las cepas de *M. tuberculosis* presentan una procedencia extra pulmonar (renal y ganglionar).



Figura 21. Localización clínica (P/EP/M) de las cepas de estudio.

No se encontró un patrón de asociación entre las posiciones de los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* con el origen clínico al que pertenecen las cepas, ya que se

obtienen valores de $P > 0.05$. El total de las posiciones de los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* y el origen clínico al que pertenecen se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Origen clínico de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen *pe_pgrs18*

Origen	SNPs	Inserción	Delección	Cepa (MYC)
Pulmonar	43, 73, 83, 43-174, 43-300, 99-174, 465, 43-485.	101-105, 477-480	320-349, 354-383, 360-444, 425-460, 470-474, 471-477, 480-497.	058, 060, 061, 062, 064, 065, 066, 068, 070, 071, 079, 080, 093, 096, 097, 098.
Meníngea	43, 73, 83, 43-300			049, 055, 078
Ganglionar	43-174	101-105		052
Renal	99-174	101-105		087

7.10 Asociación entre los polimorfismos y la jurisdicción sanitaria de las cepas.

Se ha reportado la jurisdicción sanitaria de 23 cepas del estado de Michoacán. Las jurisdicciones se dividen en: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8. Como se muestra en la figura 22, en 36 de las cepas de estudio de *Mycobacterium tuberculosis*, no se ha registrado la jurisdicción sanitaria, sin embargo 8 de las cepas de estudio pertenecen a la jurisdicción 1, 4 de las cepas pertenecen a la jurisdicción 2, 1 cepa pertenece a la jurisdicción 3, 3 de las cepas pertenecen a la jurisdicción 5, 1 cepa pertenece a la jurisdicción 6, 3 de las cepas pertenecen a la jurisdicción 7 y 3 de las cepas a la jurisdicción 8.

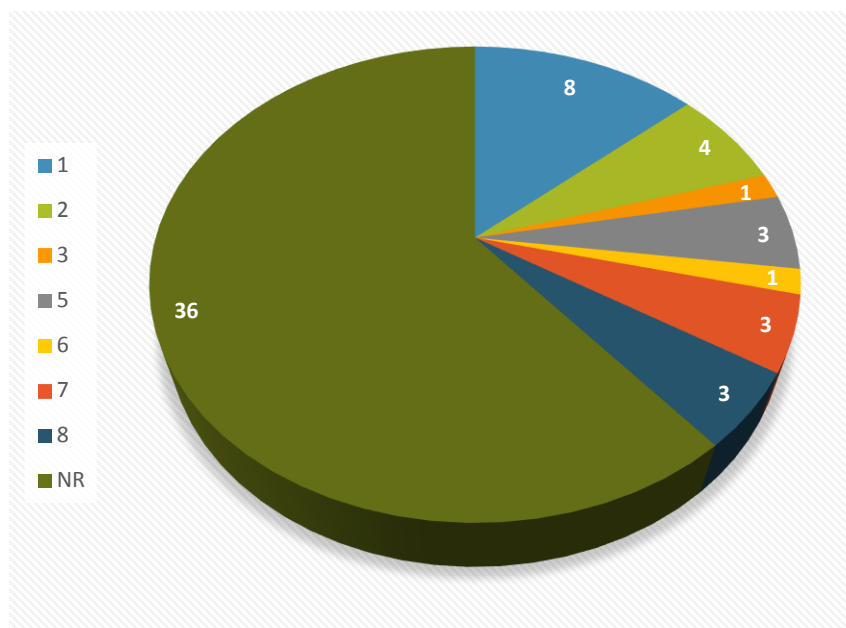


Figura 22. Jurisdicción sanitaria de las cepas de estudio.

Se observó asociación entre ciertos polimorfismos y la jurisdicción sanitaria a la que pertenecen las cepas. Se obtuvo un grupo significativo formado por un SNP en posición 473 presente con frecuencia significativamente mayor en la jurisdicción sanitaria NR (no registrada), además de 4 deleciones; la primera muestra una pérdida de 29 aminoácidos en la posición 320-349 con una frecuencia significativamente mayor en la jurisdicción sanitaria 5; la segunda muestra una pérdida de 7 aminoácidos en posición 471-477 con una frecuencia significativamente mayor en la jurisdicción sanitaria 3; la tercera muestra una pérdida de 5 aminoácidos en posición 493-497 presente con un frecuencia significativamente mayor en la jurisdicción sanitaria NR (no registrado) y la última muestra una pérdida de 5 aminoácidos en posición 503-508 con una frecuencia significativamente mayor en la jurisdicción sanitaria NR (no registrado) (Fig. 23).

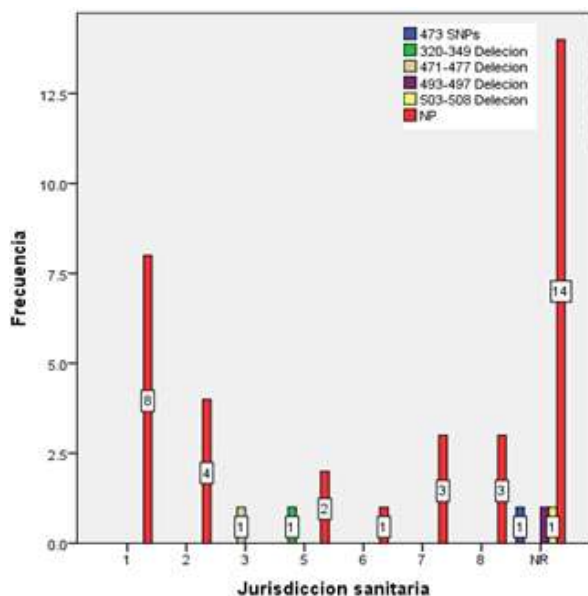


Figura 23. Asociación entre los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* y la Jurisdicción sanitaria de las cepas de estudio. NP (No presenta). Grupo de un SNP en la posición 473, además de cuatro deleciones; la primera en posición 320-349, la segunda en posición 471-477, la tercera en posición 493-497 y la cuarta en posición 503-508 ($P < 0.05$).

El total de polimorfismos y la jurisdicción sanitaria a la que pertenecen las cepas se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Jurisdicción sanitaria de las cepas y su relación con las modificaciones presentes en el gen *pe_pgrs18*.

Jurisdicción sanitaria	SNPs	Inserciones	Deleciones	Cepa (MYC)
1	99-174, 43-174, 43, 73, 83, 300	101-105		047,048, 053, 056, 058,061, 062,093
2	99-174	101-105		060, 087,088,092
3	99-174, 498-508	101-105	471-477, 480-497	079
5	99-174, 43, 73, 83, 43-174	101-105	320-344, 354-383, 425-460, 470-479, 360-444	066, 080, 096
6				063
7	99-174, 43, 73, 83	101-105	360-444	64,65,95
8	99-174	101-105		59,73,97

7.11 Asociación de los polimorfismos con el sexo y la edad del paciente.

Se ha reportado el sexo y la edad de los pacientes a los que pertenecen las cepas de estudio. Sólo se cuenta con el sexo de 31 de las cepas y 28 aún no han sido registrados. De los 31 casos registrados 13 pertenecen al sexo femenino y 18 pertenecen al sexo masculino.

En cuanto la edad se cuenta con datos registrados de 25 de las cepas, sin embargo no se conoce la edad de 34 de éstas. La cepa que presenta un mayor

número de edad del paciente es la cepa MYC 087 con 74 años y la cepa con un menor número de edad del paciente es la cepa MYC 078 con 1 año (Fig. 24).

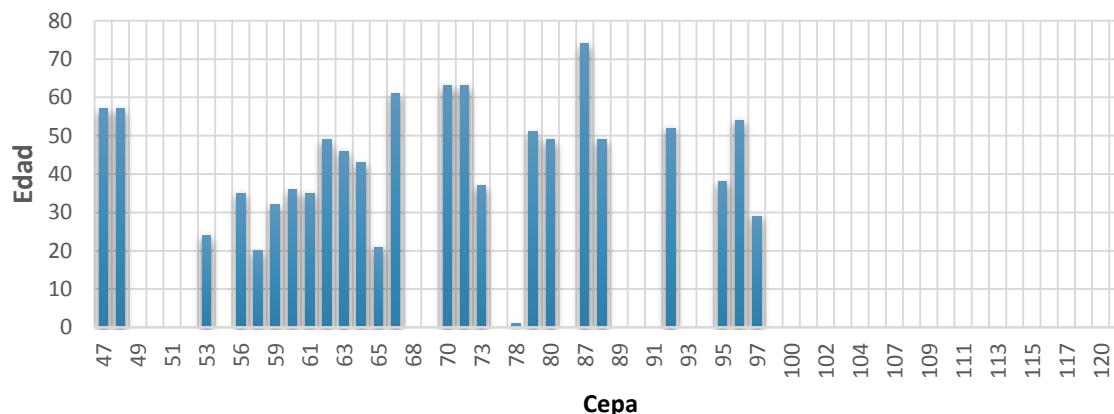


Figura 24. Edad de los pacientes y el número de cepa correspondiente.

Se buscó asociación de los polimorfismos con respecto al sexo y la edad del paciente al que pertenecen las cepas de estudio, no se encontró un valor significativo con respecto al sexo del paciente ya que se obtiene un valor de $P > 0.05$, sin embargo con respecto a la edad se observó asociación con las posiciones de los polimorfismos lo que permitió formar cuatro grupos: el primer grupo se encuentra formado por dos SNPs en posición 43 y 483, presentan una frecuencia significativamente mayor en las edades de 57, 54, 29, 24, 35, 37, 49, 54, 63 y NR (no registrado) (Fig. 25A) ; el segundo grupo está formado por dos SNPs en posiciones 424 y 477, presentan una frecuencia significativamente mayor en las edades en las edades 61 y 63 años (Fig. 25B); el tercer grupo está formado por un SNP en la posición 465 y una delección de 4 aminoácidos en la posición 477-480, presentan una frecuencia significativamente mayor en las edades 61 y 63 años (Fig. 25C); el cuarto grupo está formado por un SNP en posición 481 y una delección de 5 aminoácidos en la posición 470-474, presentan una frecuencia significativamente mayor en las edades de 61 y 63 años (Fig. 25D).

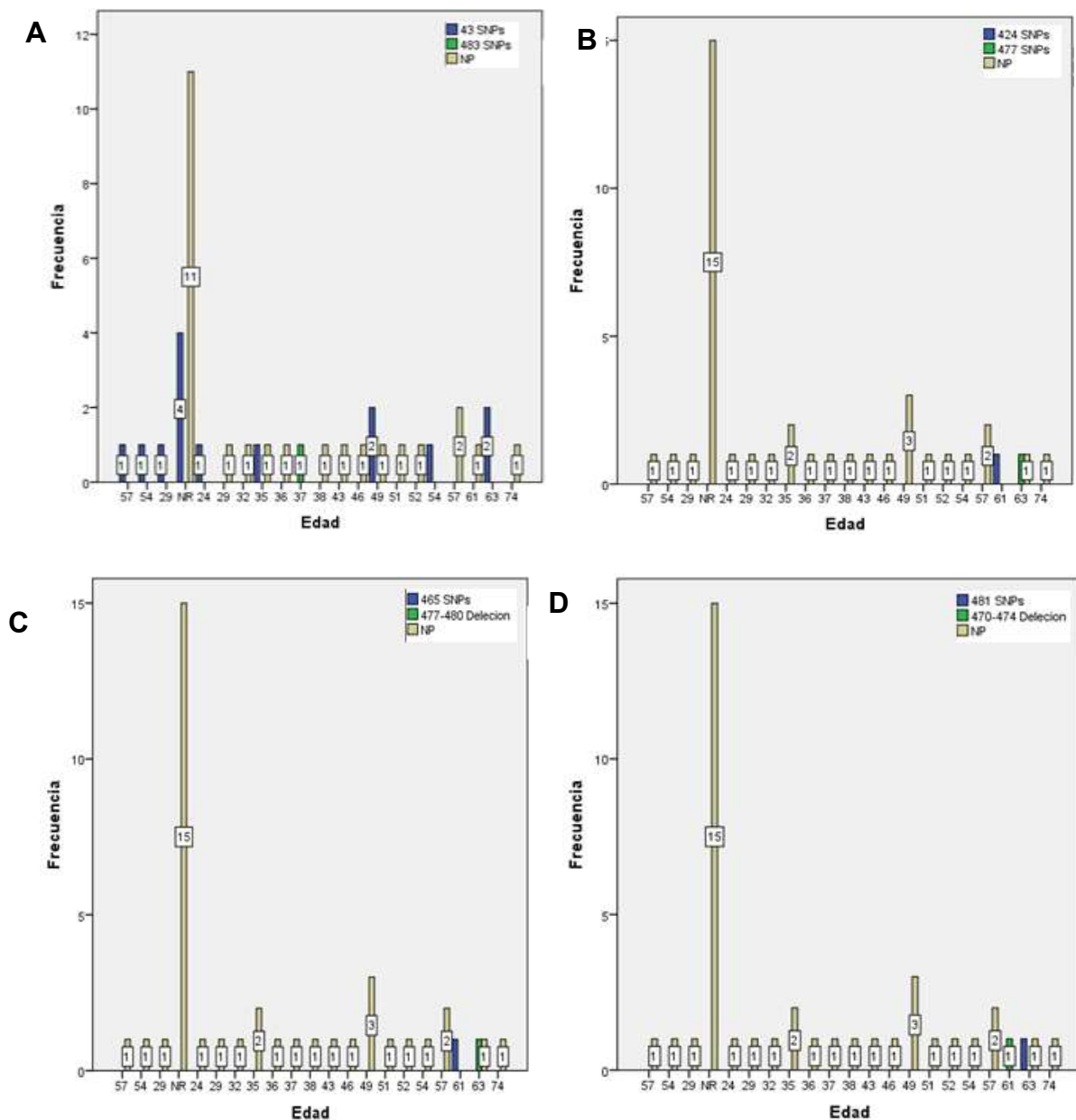


Figura 25. Asociación entre los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* y la edad de los pacientes de quienes se aislaron las cepas de estudio. Polimorfismos presentes en las distintas edades. NP (No presenta). A) Grupo de dos SNPs en posiciones 43 y 483; B) Grupo de dos SNPs en posiciones 424 y 477; C) Grupo de un SNPs en posición 465 así como una delección en la posición 477-480; D) Grupo de un SNPs en la posición 481 así como una delección en posición 470-474.

Los pacientes de quienes se aislaron las cepas MYC 066 y MYC 071 presentan un rango de edad entre 60-65 años, estas dos cepas son las que presentan una

asociación estadísticamente significativa con una $P < 0.05$, las posiciones de los polimorfismos se muestran en la figura 25.

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, declinan 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 y la respuesta inmune del hospedero (Banu *et al.*, 2002; Basu *et al.*, 2007; Bottai *et al.*, 2012; Brennan *et al.*, 2001; 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. Varios estudios han revelado diversos grados de polimorfismos en la secuencia de los genes *pe / ppe* en aislados clínicos de *M. tuberculosis*. La subfamilia de genes *pe_pgrs* ha resultado ser las más polimórficas en un estudio previo (Frutos-Hernández, 2015) este dato se ha corroborado con la literatura. Ya que en estudios posteriores se han reportado un alto grado de polimorfismos dentro de los genes *pe_pgrs33*, *pe_pgrs16* y *pe_pgrs26* (McEvoy *et al.* 2012). Trabajos que intenten analizar los efectos de los polimorfismos en la secuencia del gen *pe_pgrs*, además de relacionar dichos polimorfismos y los genotipos, familias, linajes y el origen clínico de las cepas 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 esta subfamilia multigénica en relación a las características filogenéticas de las cepas analizadas.

La importancia de contar con una mayor comprensión de los efectos de las variaciones en las secuencias de gen *pe_pgrs18* 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 el análisis de los efectos de los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* y la asociación de estos polimorfismos con los genotipos, familias y linajes de *M. tuberculosis* establecidos por métodos genéticos y la procedencia clínica de las cepas de pacientes del estado de Michoacán y Querétaro.

Las 59 cepas de *M. tuberculosis* analizadas, presentaron un total de 834 SNPs, 40 inserciones y 35 deleciones. Las cepas que resultaron ser más polimórficas fueron: MYC 066 del estado de Michoacán con un total de 74 SNPs, 1 inserción y 10 deleciones, las cepas de Querétaro MYC 106 con 146 SNPs, 8 deleciones y 4 inserciones y la cepa MYC 107 con 133 SNPs, 8 deleciones y 3 inserciones. En un estudio previo realizado por Frutos Hernández (2015) se reportó la presencia de 88 SNPs en una sola cepa, sin embargo no hay reportes similares en la literatura de que alguna cepa presente una cantidad tan grande de SNPs. Las cepas MYC 106 y MYC 107 presentan algunas variantes en la misma posición. Un análisis posterior de estas cepas en particular resultaría interesante para observar si la presencia de una cantidad tan grande de polimorfismos tiene implicaciones en su morfología o la interacción con células del hospedero. Sin embargo, 13 de las cepas de estudio no presentaron ningún cambio, las cuales son: MYC 49, MYC 050, MYC 056, MYC 059, MYC 060, MYC 063, MYC 073, MYC 088, MYC 092, MYC 094, MYC 095, del estado de Michoacán y MYC 111 y MYC 119, del estado de Querétaro. Un hallazgo interesante en la secuencia del gen *pe_pgrs18* fue la presencia de la secuencia IS6110, que es un elemento transponible presente en el genoma de MTBC (van Embden *et al.*, 1993). Esta inserción se encontró en la cepa MYC 056 de la familia LAM, dicha inserción ya había sido registrada en un

análisis previo por Frutos Hernández (2015) y por la presencia de dicha inserción no se pudo 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 segunda vez la inserción de dicha secuencia en el gen *pe_pgrs18* en la familia LAM de *M. tuberculosis*. La razón de la inserción de la secuencias IS6110 en los genes *ppe38*, *ppe39* y *ppe40* se desconoce (McEvoy, 2009), , por lo que son necesarios otros análisis 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 (Cascioferro *et al.*, 2007), y que podría ser afectada por esta inserción. De la secuencia del gen *pe_pgrs18* se buscó una estructura cristizable y secuencias homólogas para el modelado de la proteína PE_PGR 18, sin embargo sólo se lograron identificar los dominios PE N-terminal y PGRS C- terminal reportados por la literatura. De las 59 cepas de estudio sólo en 26 de las cepas se encontraron polimorfismos presentes en estos dominios sin embargo el dominio C-terminal resultó ser el más polimórfico además de que presenta repeticiones de Ala-Gly. (Fishbein *et al.*, 2015; McEvoy *et al.*, 2012). La función exacta es desconocida, aunque varios estudios han proporcionado algunas pistas intrigantes. En un análisis *in silico* de las secuencias de las proteínas PGRS revelan que los miembros de al menos 56 PE_PGRS contienen múltiples repeticiones nona-péptido (GGXGXD/NXUX, donde X = cualquier aminoácido y U = un resto hidrófobo grande no polar) que se predican para ser de unión a motivos de calcio. Algunos autores sugieren que estos motivos podrían estar implicados en la unión inicial de *M. tuberculosis* para albergar los macrófagos alveolares. Además, los dominios PGRS también han sido implicados en la estructura celular, la morfología colonial y en la unión de la fibronectina (Fishbein *et al.*, 2015; McEvoy *et al.*, 2012). Sin embargo, los dominios PE- PPE no tienen ninguna secuencia estructural detectable u homóloga a otras familias de proteínas y su

función sigue siendo desconocida (Ekiert and Cox, 2014). De las 26 cepas con polimorfismos en estas regiones conservadas, sólo 6 cepas (MYC 065, MYC 066, MYC 080, MYC 086, MYC 106 Y MYC 107) presentaron polimorfismos perjudiciales para la morfología de la proteína en el dominio C-terminal, lo que es un dato interesante para que en estudios posteriores se analice si estos polimorfismos producen un efecto importante en la estructura del dominio C-terminal y por ende en su función. Una delección de 82 aminoácidos (252 pb) posición 360-444 en el dominio C-terminal es perjudicial y se presentó en las cepas MYC 065, MYC 080 y MYC 086, esta delección también se observó en las cepas MYC 080 y MYC 086, cabe destacar que las cepas MYC 065 y MYC 080 son de origen pulmonar y MYC 086 NR (no registrado). En un estudio previo Basu y colaboradores (2007) demostraron que *pe_pgrs33* es capaz de mejorar la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) de una manera dependiente de TLR2 que conduce a la apoptosis de los macrófagos. Curiosamente, las delecciones dentro del dominio PGRS (como se ve a menudo en aislados clínicos) inhibió esta capacidad (McEvoy *et al.*, 2012). Además algunos autores han interpretado que la acumulación de delecciones en *M. tuberculosis* conduce a una disminución de la virulencia, sin embargo parece ser que estas delecciones tienen lugar como consecuencia de la recombinación homóloga entre copias de IS6110.(Cole *et al.*, 1998). La cepa MYC 065 es multidrogorresistente además de que la relación entre la delección en posición 360-444 y la resistencia de esta cepa resultó estadísticamente significativa, lo cual nos indica que hay una posible asociación entre la delección en posición 360-444 y la resistencia de la cepa. En estudios posteriores sería interesante analizar la resistencia de las cepas MYC 080 y MYC 086 además de hacer un estudio más profundo para conocer si esta delección es la que le brinda dicha capacidad de resistencia a la cepa o podría influir en la capacidad de generar respuesta inmune protectora del huésped. Sin embargo los limitados datos estructurales confirmados experimentalmente imponen limitaciones a la capacidad de predecir las consecuencias funcionales de la variabilidad PE/PPE (Fishbein *et al.*, 2015). Como se mencionó en un estudio relacionado con la seguridad y el efecto de la vacuna en algunos mutantes de *M.*

tuberculosis como candidatos vacúnales contra la tuberculosis demostró que la delección de varios genes involucrados en la patogenicidad y virulencia confirió a los mutantes la capacidad de generar respuestas inmunes protectoras frente al reto con *M. tuberculosis* en modelos animales (Borrero *et al.*, 2011). La cepa MYC 066 del estado de Michoacán y las cepas MYC 106 y MYC 107 del estado de Querétaro resultaron ser las más polimórficas de las 59 cepas estudiadas, como se mencionó anteriormente. Sin embargo la cepa MYC 066 presentó dos SNPs en las posiciones 386 y 465 y cuatro delecciones en posiciones: 320-349, 354-383, 425-460 y 470-474 que se localizan en el dominio C-terminal y presentan predicciones perjudiciales para la morfología de la PE_PGRS18. Además las cepas MYC 106 Y MYC 107 presentaron los mismos polimorfismos dentro del dominio C-terminal y predicciones perjudiciales para la morfología de la proteína, estas variaciones son: tres SNPs en posiciones 348, 360 y 459, una inserción en posición 349-354, además de tres delecciones en posiciones: 380-384, 391-402 y 416-426; no existen estudios relacionados en los que intenten analizar las predicciones de los polimorfismos presentes en las regiones conservadas, es un dato interesante porque estas posiciones tampoco han sido reportadas por la literatura y nos dan una pauta para en estudios posteriores analizarlas más a profundidad ya que las predicciones nos indican que sí hay un cambio perjudicial para la morfología de la proteína pero no podemos saber el efecto que este cambio produce en su función.

Actualmente no hay estudios que relacionen polimorfismos del gen *pe_pgrs18* con los genotipos y linajes 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. Dicho gen mostró algunos polimorfismos que resultaron estadísticamente significativos con respecto a los genotipos de *M. tuberculosis*, presentó: 11 SNPs en las posiciones 43 y 483 presentes en los genotipos Haarlem, Uganda, EAI, S, LAM y ND; posiciones 73 y 286 presentes en los genotipos LAM, EAI y ND; posiciones 83, 300 y 301 presentes en los genotipos

Bovis, LAM, EAI, S y ND; posiciones 99-174 (16 SNPs), 488 y 471 presentes en los genotipos Haarlem, ND, LAM, EAI y Este de África y la posición 472 presentes en los genotipos Haarlem, EAI, Este de África y ND además de 1 delección de 84 aminoácidos en posición 360-444 presentes en los genotipos Haarlem, ND, LAM, EAI y Este de África y una inserción de 4 aminoácidos en posición 101-104 presentes en los genotipos Haarlem, EAI, Este de África y ND.

Con respecto a la asociación de las posiciones de los polimorfismos encontrados en la secuencia del gen *pe_pgrs18* y los linajes de *M. tuberculosis* se encontró una relación estadísticamente significativa con presencia de dos SNPs en posiciones 386 y 465, y cuatro delecciones en posiciones 320-349, 354-383, 425-460 y 470-475 presentes en linaje ND (no determinado), todas estas variaciones pertenecen a la cepa MYC 066 de origen pulmonar. Este estudio arroja resultados interesantes para que en estudios posteriores se analicen más secuencia del gen *pe_pgrs18* en diferentes cepas de *M. tuberculosis* y comparar si hay presencia de dichos polimorfismos y si corresponden a los linajes en los que se encuentran, además de conocer los impactos diferenciales sobre la patogenia y evolución de la enfermedad. El linaje que nombramos ND el cual presenta las variaciones significativas no está determinado por lo que sería interesante analizar la secuencia del gen de la cepa MYC 066 e integrarlo a un linaje mediante diferentes técnicas de tipificación o quizá un nuevo linaje.

De los polimorfismos encontrados en las secuencias analizadas del gen *pe_pgrs18*, los SNPs en posiciones 83 y 300 presentaron una relación significativa con las familias X, LAM y EAI. Sólo se cuenta con un estudio realizado por McEvoy y colaboradores (2012) que reportan la asociación de los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* con las familias de *M. tuberculosis* observando una coincidencia con los SNPs 54, 129, 153, 213, 247, 462, 471, 808, 962 y la inserción 297-308. Sin embargo ninguno de los polimorfismos encontrados en este estudio corresponde con los reportados en estudios previos. Esto sugiere que la bacteria sufre cambios genéticos constantes como parte de su adaptación a su estilo de vida patógeno. Además este gen presenta 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 27 de las cepas analizadas en este trabajo en posición 352-579 SNPs y 354-365 inserción , específicamente en las familias X, Haarlem, NEW-1, Ghana y 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 sin embargo la posición de los SNPs y la inserción es distinta (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 sólo 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 aislados analizados en este estudio provenían de pacientes con diferentes manifestaciones de la enfermedad e incluían variantes pulmonares (24 aislados), meníngeas (3 aislados), renales (1 aislado) y ganglionares (1 aislado). Con el objetivo de establecer una posible asociación entre el origen clínico y los polimorfismos encontrados, se realizó un análisis de correlación. Sin embargo no se encontró una asociación estadísticamente significativa. Sería interesante realizar este análisis empleando una cantidad mayor de aislados para corroborar que no hay una posible asociación entre los polimorfismos y la manifestación de la enfermedad. A demás, 23 aislados provenían de diferentes jurisdicciones sanitarias dentro del estado de Michoacán. Las jurisdicciones sanitarias se dividen en: N° 1 (8 aislados), N° 2 (4 aislados), N° 3 (1 aislado), N° 5 (3 aislados), N° 6 (1 aislado) N°7 (3 aislados) y N°8 (3 aislados). Para poder establecer una posible relación entre las jurisdicciones sanitarias y los polimorfismos encontrados, también se realizó un análisis de correlación y se encontraron asociaciones estadísticamente significativas formadas por un SNPs en posición 473 con la jurisdicción sanitaria NR, además de 4 delecciones; en posición 320-349 presente

en la jurisdicción sanitaria 5; posición 471-477 presente en la jurisdicción sanitaria 3; posición 493-497 presente en la jurisdicción sanitaria NR (no registrado) y posición 503-508 presente en la jurisdicción sanitaria NR (no registrado). Los aislados de estudio provienen de pacientes con sexo y edades diferentes. Con respecto al sexo se ha registrado este dato de 31 de las cepas y 28 aún no han sido registrados. De los 31 casos registrados 13 pertenecen al sexo femenino y 18 pertenecen al sexo masculino. Se realizó un análisis de correlación para buscar una posible relación entre los sexos y los polimorfismos. Sin embargo no se encontró una asociación estadísticamente significativa. Mientras que los pacientes de dichos aislados presentan diferentes edades. Se cuenta con datos registrados de 25 de las cepas sin embargo no se conoce la edad de 34 de éstas.

No hay estudios en la literatura que reporten dichas asociaciones sin embargo en estudios posteriores sería interesante estudiar los efectos de dichas variaciones sobre la virulencia y patogenicidad de la bacteria e incluir un mayor número de aislados para corroborar estos resultados y así poder realizar un análisis con base a criterios demográficos, epidemiológicos, geográficos, políticos y sociales.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- I. Se cumplió el objetivo número uno ya que se identificaron los polimorfismos en el gen *pe_pgrs18*. Los polimorfismos observados son SNPs, inserciones y deleciones. Las 40 cepas del estado de Michoacán presentaron un total de 429 SNPs, 18 inserciones y 27 deleciones. En contraste las 19 cepas del estado de Querétaro presentaron un total de 395 SNPs, 13 Inserciones y 17 deleciones.
- II. El objetivo numero dos no se cumplió satisfactoriamente ya que no se encontró una estructura cristalizable para realizar el modelado de la proteína PE_PGRS18, sin embargo fueron identificadas las regiones conservadas; un dominio N-terminal y en el dominio C-terminal se identificaron WD40/YVTN y Nitrous oxide reductase, N-terminal. Además 26 de las cepas de estudio presentaron polimorfismos en el gen *pe_pgrs18* en las regiones conservadas con un total de 301 SNPs, 25 deleciones y 3 inserciones. Las cepas con más polimorfismos en estas regiones fueron: MYC 066 del estado de Michoacán y MYC 106, MYC 107 del estado de Querétaro. Sin embargo sólo 6 cepas (MYC 065, MYC 066, MYC 080, MYC 086, MYC 106 Y MYC 107) con presencia de polimorfismos en las regiones conservadas de la PE_PGRS18 resultaron ser perjudiciales para la estructura de la proteína. Entre estos polimorfismos una deleción de 84 aminoácidos en posición 360-444 presente en las cepas MYC 065, MYC 080 y MYC 086.
- III. También se logró cumplir el objetivo número tres ya que se encontró una relación estadísticamente significativa entre los polimorfismos y los genotipos. El gen *pe_pgrs18* presentó asociación entre el grupo de SNPs 54, 83 y los genotipos; Haarlem, Uganda, EAI, S, LAM y ND; segundo grupo de SNPs 73, 286 y los genotipos LAM, EAI y ND; tercer grupo de SNPs 83, 300 y 301 con los genotipos Bovis, LAM, EAI, S y ND; cuarto grupo SNPs 99-174, 288 y 471 y la deleción 360-444 y los genotipos Haarlem, ND, LAM, EAL y Este de África y el quinto grupo de SNPs 472 e inserción 101-104 y los genotipos Haarlem, EAI,

Este de África y ND. A demás de que los SNPs 83 y 300 del gen *pe_pgrs18* presentaron asociación con las familias X, LAM y EAI. También presento asociación entre el grupo de SNPs 386 y 465, y cuatro delecciones 320-349, 354-383, 425-460 y 470-475 y el linaje ND. Todas estas variaciones pertenecen a la cepa MYC 066 de origen pulmonar.

- IV. Con respecto al objetivo número cuatro no se cumplió satisfactoriamente ya que no se encontró un patrón de asociación de las posiciones de los polimorfismos del gen *pe_pgrs18*, el origen clínico y el sexo de los pacientes al que pertenecen las cepas. Sin embargo el gen *pe_pgrs18* presentó asociación entre los polimorfismos; SNPs 473 y cuatro delecciones: 320-349, 472-277, 493-497 y 503-508 y las jurisdicciones sanitarias 1, 5 y NR. Además el gen *pe_pgrs18* presentó asociación entre un grupo de SNPs 43 y 483 y las edades 57, 54, 29, 24, 35, 37, 49, 54, 63 y NR. Además de un segundo grupo de SNPs 424, 477, 465 y 481, dos delecciones 477-480 y 470-474 y las edades 61 y 63 años.
- V. De las cepas analizadas, 27 presentaron el polimorfismo 12/40, además la mayoría de estas cepas son de origen pulmonar.

10. CONCLUSIÓN

Se aceptó parcialmente la hipótesis planteada, ya que se encontró correlación entre los polimorfismos del gen *pe_pgrs18* y las características genotípicas y clínicas de las cepas de *M. tuberculosis*; sin embargo, no se pudo determinar si estos polimorfismos causan algún efecto en la estructura de la proteína y por ende en su función, sólo se hicieron predicciones del efecto de dichos polimorfismos en las regiones conservadas de la proteína PE_PGRS18.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah A M, Verboom T, Hannes F, *et al.*, 2006. "A Specific Secretion System Mediates PPE41 Transport in Pathogenic Mycobacteria." *Molecular Microbiology* 62(3): 667–79.
- Abdallah A M, Verboom T, Weerdenburg EM, *et al.*, 2009. "PPE and PE-PGRS Proteins of Mycobacterium Marinum Are Transported via the Type VII Secretion System ESX-5." *Molecular Microbiology* 73(3): 329–40.
- Bansal K, Akhauri YS, Evram SG, *et al.*, 2010. "Src Homology 3-Interacting Domain of Rv1917c of Mycobacterium Tuberculosis Induces Selective Maturation of Human Dendritic Cells by Regulating PI3K-MAPK-NF- κ B Signaling and Drives Th2 Immune Responses." *Journal of Biological Chemistry* 285(47): 36511–22.
- Banu S, Honoré N, Saint-Joanis B, *et al.*, 2002. "Are the PE-PGRS Proteins of Mycobacterium Tuberculosis Variable Surface Antigens?" *Molecular Microbiology* 44(1): 9–19.
- Barathy D V, and Suguna k. 2013. "Crystal Structure of a Putative Aspartic Proteinase Domain of the Mycobacterium Tuberculosis Cell Surface Antigen PE_PGRS16." *FEBS Open Bio* 3: 256–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2013.05.004>.
- Basu S, Pathak S K, Banerjee A, *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- α ." *Journal of Biological Chemistry* 282(2): 1039–50.
- Borrero R, Álvarez N, Reyes F, *et al.*, 2011. "Mycobacterium Tuberculosis: Factores de Virulencia ." *VacchiMonitor* 20(1): 34–38.
- Bottai D, Di Luca M, Majlessi L, *et al.*, 2012. "Disruption of the ESX-5 System of Mycobacterium Tuberculosis Causes Loss of PPE Protein Secretion, Reduction of Cell Wall Integrity and Strong Attenuation." *Molecular Microbiology* 83(6): 1195–1209.
- Brennan M J, Delogu G, Chen Y, *et al.*, 2001. "Evidence That Mycobacterial PE_PGRS Proteins Are Cell Surface Constituents That Influence Interactions with Other Cells." *Infection and Immunity* 69(12): 7326–33.
- Bretl D J, Demetriadou C, and Zahrt T C. 2011. "Adaptation to Environmental Stimuli within the Host: Two-Component Signal Transduction Systems of Mycobacterium Tuberculosis." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75(4): 566–82. <http://mmb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.05004-11>.
- Calamita H K, Tyagi S, Yoshimatsu T, *et al.*, 2005. "The Mycobacterium Tuberculosis SigD Sigma Factor Controls the Expression of Ribosome-Associated Gene Products in Stationary Phase and Is Required for Full

- Virulence." *Cellular Microbiology* 7(2): 233–44.
- Cascioferro A, Delogu G, Colone M, *et al.*, 2007. "PE Is a Functional Domain Responsible for Protein Translocation and Localization on Mycobacterial Cell Wall." *Molecular Microbiology* 66(6): 1536–47.
- Cascioferro A, Daleke M H, Ventura M, *et al.*, 2011. "Functional Dissection of the Pe Domain Responsible for Translocation of PE_PGRS33 across the Mycobacterial Cell Wall." *PLoS ONE* 6(11).
- Chatrath S, Kumar V, Dixit A, *et al.*, 2011. "The Rv1651c-Encoded PE-PGRS30 Protein Expressed in Mycobacterium Smegmatis Exhibits Polar Localization and Modulates Its Growth Profile." *FEMS Microbiology Letters* 322(2): 194–99.
- Chatrath S, Kumar V, and Lalit C. 2014. "The PGRS Domain Is Responsible for Translocation of PE-PGRS30 to Cell Poles While the PE and the C-Terminal Domains Localize It to the Cell Wall." *FEBS Letters* 588(6): 990–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.059>.
- Cole S T, Brosch R, Parkhill J, *et al.*, 1998. "Deciphering the Biology of Mycobacterium Tuberculosis from the Complete Genome Sequence." *Nature* 393(6685): 537–44.
- Copin R, Coscollá M, and Seiffert S. 2014. "Sequence Diversity in the PE-PGRS Genes of M. Tuberculosis Is Independent of Human T-Cell Recognition." *mBio* 5(1): 1–11.
- Daleke M H, Cascioferro A, Punder K, *et al.*, 2011. "Conserved Pro-Glu (PE) and Pro-Pro-Glu (PPE) Protein Domains Target LipY Lipases of Pathogenic Mycobacteria to the Cell Surface via the ESX-5 Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 286(21): 19024–34.
- Dávila G. 2012. "Perfil Epidemiológico de La Tuberculosis En México." *Secretaría De Salud*: 1–159.
- Deb C, Daniel J, Sirakova T D, *et al.*, 2006. "A Novel Lipase Belonging to the Hormone-Sensitive Lipase Family Induced under Starvation to Utilize Stored Triacylglycerol in Mycobacterium Tuberculosis." *Journal of Biological Chemistry* 281(7): 3866–75.
- Donà V, Ventura M, Sali M, *et al.*, 2013. "The PPE Domain of PPE17 Is Responsible for Its Surface Localization and Can Be Used to Express Heterologous Proteins on the Mycobacterial Surface." *PLoS ONE* 8(3): 1–8.
- Ekiert D C, and Cox J S. 2014. "Structure of a PE-PPE-EspG Complex from Mycobacterium Tuberculosis Reveals Molecular Specificity of ESX Protein Secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(41): 14758–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275011>.
- Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology." *J. Clin. Microbiol* 31(2): 406–9.

- Fishbein S N, van Wyk R M, Warren S L, *et al.*, 2015. "Phylogeny to Function: PE/PPE Protein Evolution and Impact on Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity." *Molecular Microbiology* 96(5): 901–16.
- Fontán P A, Voskuil MI, Gomez M, *et al.*, 2009. "The Mycobacterium Tuberculosis Sigma Factor σ B Is Required for Full Response to Cell Envelope Stress and Hypoxia in Vitro, but It Is Dispensable for in Vivo Growth." *Journal of Bacteriology* 191(18): 5628–33.
- Frutos H. (2015). "Polimorfismos de los genes pe y ppe presentes en cepas de Mycobacterium tuberculosis provenientes de michoacán": 36-52
- González J. 2014. "Microbiología de La Tuberculosis." *Seminarios de la Fundacion Espanola de Reumatologia* 15(1): 25–33.
- Gorocica P, Jiménez M C, Garfias Y, *et al.*, 2005. "Componentes Glicosilados de La Envoltura de Mycobacterium Tuberculosis Que Intervienen En La Patog??nesis de La Tuberculosis." *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 18(2): 142–53.
- Lantomasi R, Sali M, Cascioferro A, *et al.*, 2012. "PE_PGRS30 Is Required for the Full Virulence of Mycobacterium Tuberculosis." *Cellular Microbiology* 14(3): 356–67.
- Karboul A, Gey van Pittiu N C, Namouchi A, *et al.*, 2006. "Insights into the Evolutionary History of Tubercle Bacilli as Disclosed by Genetic Rearrangements within a PE_PGRS Duplicated Gene Pair." *BMC evolutionary biology* 6: 107.
- Kohli S, Singh Y, Sharma K, *et al.*, 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 Research* 40(15): 7113–22.
- Korotkova N, Freire D, Phan TH, *et al.*, 2014. "Structure of the Mycobacterium Tuberculosis Type VII Secretion System Chaperone EspG5 in Complex with PE25-PPE41 Dimer." *Molecular Microbiology* 94(2): 367–82.
- Kruh N A, Troudt J, Izzo A, *et al.*, 2010. "Portrait of a Pathogen: The Mycobacterium Tuberculosis Proteome In Vivo." *PLoS ONE* 5(11).
- Lee, J H, Petros C, and Karakousis, *et al.*, 2008. "Roles of SigB and SigF in the Mycobacterium Tuberculosis Sigma Factor Network." *Journal of Bacteriology* 190(2): 699–707.
- Manganelli R, Dubnau E, Tyagi S, *et al.*, 1999. "Differential Expression of 10 Sigma Factor Genes in Mycobacterium Tuberculosis." *Molecular microbiology* 31(2): 715–24.
- Maulén N P. 2011. "[Virulence Factors of Mycobacterium Tuberculosis]." *Revista médica de Chile* 139(12): 1605–10.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3563495&tool=pmc>

entrez&rendertype=abstract.

- McEvoy CRE, Cloete R, Müller B, *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).
- Nair, S. Poongothai A. Ramaswamy, *et al.*, 2009. "The PPE18 of Mycobacterium Tuberculosis Interacts with TLR2 and Activates IL-10 Induction in Macrophage." *The Journal of Immunology* 183(10): 6269–81. <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0901367>.
- Pérez L, Herranz M, Martínez M, *et al.*, 2011. "Characterization of Microevolution Events in Mycobacterium Tuberculosis Strains Involved in Recent Transmission Clusters." *Journal of Clinical Microbiology* 49(11): 3771–76.
- Picó M B, and Pérez A M. 2008. "Marcadores Moleculares Basados En PCR : Marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Fragmentos de ADN Polimórficos Amplificados Al Azar." : 1–10.
- Raman S, Hazra R, Christopher C D, *et al.*, 2004. "Transcription Regulation by the Mycobacterium Tuberculosis Alternative Sigma Factor SigD and Its Role in Virulence Transcription Regulation by the Mycobacterium Tuberculosis Alternative Sigma Factor SigD and Its Role in Virulence †." *Journal of Bacteriology* 186(19): 66505–616.
- Reyes A, Sandoval A, Cubillos A, *et al.*, 2012. "IS-Seq: A Novel High Throughput Survey of in Vivo IS6110 Transposition in Multiple Mycobacterium Tuberculosis Genomes." *BMC Genomics* 13(1): 249. <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-13-249>.
- Reyes A, Díaz M, and Pérez A. 2004. "Tuberculosis Y SIDA: Algunos Aspectos Clínicos Y Epidemiológicos En 72 Enfermos Cubanos Tuberculosis and AIDS: Some Clinical and Epidemiological Aspects in 72 Cuban Patients." *Rev Cubana Med Trop* 56(1): 35–41. http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol56_1_04/mtr05104.htm.
- Rivera R, , Cocotle B, Méndez A, *et al.*, 2005. "Mycobacterium Tuberculosis : Su Pared Celular Y La Utilidad Diagnóstica de Las Proteínas 16 Y 38 kDa ." 2: 39–43.
- Rosas V, Stadthagen G, Rauzier J, *et al.*, 2007. "Signature-Tagged Transposon Mutagenesis Identifies Novel Mycobacterium Tuberculosis Genes Involved in the Parasitism of Human Macrophages." *Infection and Immunity* 75(1): 504–7.
- Sachdeva P, Misra R, Tyagi AK, *et al.*, 2010. "The Sigma Factors of Mycobacterium Tuberculosis: Regulation of the Regulators." *FEBS Journal* 277(3): 605–26.
- Safi H, Barnes PF, Lakey DL, *et al.*, 2004. "IS6110 Functions as a Mobile, Monocyte-Activated Promoter in Mycobacterium Tuberculosis." *Molecular Microbiology* 52(4): 999–1012.
- Strong M, Sawaya MR, Wang S, *et al.*, 2006. "Toward the Structural Genomics of

- Complexes: Crystal Structure of a PE/PPE Protein Complex from *Mycobacterium Tuberculosis*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(21): 8060–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690741><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1472429>.
- Taraco AG , and Arce Y. 2007. Tuberculosis: mecanismos de defensa, inmunopatogenesis y biomarcadores. RESPYN.
- Thi E P, Ulrike L, and Neil E. 2012. “Sleeping with the Enemy: How Intracellular Pathogens Cope with a Macrophage Lifestyle.” *PLoS Pathogens* 8(3): 1–4.
- Tiwari BM, Kannan N, Vemu L, *et al.*, 2012. “The *Mycobacterium Tuberculosis* PE Proteins Rv0285 and Rv1386 Modulate Innate Immunity and Mediate Bacillary Survival in Macrophages.” *PLoS ONE* 7(12): 1–13.
- Tsolaki AG, Hirsh A†, DeRiemer K, *et al.*, 2004. “Functional and Evolutionary Genomics of *Mycobacterium Tuberculosis*: Insights from Genomic Deletions in 100 Strains.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(14): 4865–70.
- Vazquez, H. (2017). “Epidemiología genético molecular de cepas de *M. tuberculosis* de los estados de michoacán y querétaro” . 1-45.
- Vazquez, H. (2014). Tipificación genético-molecular de micobacterias obtenidas de pacientes con tuberculosis en el periodo 2011-2014. 32-58
- Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, *et al.*, 2006. “The *Mycobacterium Tuberculosis* PhoPR Two-Component System Regulates Genes Essential for Virulence and Complex Lipid Biosynthesis.” *Molecular Microbiology* 60(2): 312–30.
- WHO. 2015. “Tuberculosis in the Americas Regional Report 2015 Epidemiology, Control, and Financing.” *Pan American Health Organization*.
- Williams EP, Lee JH, Bishai WR, *et al.*, 2007. “*Mycobacterium Tuberculosis* SigF Regulates Genes Encoding Cell Wall-Associated Proteins and Directly Regulates the Transcriptional Regulatory Gene *phoY1*.” *Journal of Bacteriology* 189(11): 4234–42.
- Van Der Woude AD, Sarkar D, Bhattet A, *et al*, 2012. “Unexpected Link between Lipooligosaccharide Biosynthesis and Surface Protein Release in *Mycobacterium Marinum*.” *Journal of Biological Chemistry* 287(24): 20417–29.
- van Embden J D, Cave M D, Crawford J T, *et al.*, 1993. “Strain Identification of *Mycobacterium Tuberculosis* by DNA Fingerprinting : Recommendations for a Standardized Strain Identification of *Mycobacterium Tuberculosis* by DNA
- Zumbo A, Palucci I, Cascioferroet A, *et al.*, 2013. “Functional Dissection of Protein Domains Involved in the Immunomodulatory Properties of PE_PGRS33 of *Mycobacterium Tuberculosis*.” *Pathogens and Disease* 69(3): 232–39.