



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**



**Licenciatura en Investigación Biomédica Básica de la UNAM  
Unidad de Investigación Médica de Zacatecas del IMSS**

**IDENTIFICACIÓN DE UN CONJUNTO DE GENES, COMPLEJOS  
MOLECULARES Y PUTATIVOS MÓDULOS FUNCIONALES  
POTENCIALMENTE RELACIONADOS A LA INFLAMACIÓN INDUCIDA  
POR *M. TUBERCULOSIS***

*TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA PRESENTA:*

**DAVID GUILLERMO FAJARDO ORTIZ.**

**ASESOR: DR JOSÉ ANTONIO ENCISO MORENO**

**NOVIEMBRE DE 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Índice

---

1. Resumen
2. Introducción
3. Antecedentes experimentales.
4. Hipótesis.
5. Objetivo General.
6. Metodología.
7. Resultados.
8. Discusión y análisis de resultados.
9. Conclusiones.
10. Bibliografía.

# Resumen

---

La tuberculosis es una enfermedad caracterizado por la inducción, por parte de *Mycobacterium tuberculosis*, de una respuesta inflamatoria exacerbada que conduce a la destrucción del tejido pulmonar. En tanto que un tercio de la humanidad está infectada con el bacilo tuberculoso sin presentar la enfermedad pero en algún momento de su vida pueden entrar en fase activa de la tuberculosis; es imprescindible identificar y entender los mecanismos moleculares que participan del transito de la infección en estado latente a la enfermedad. Desde el descubrimiento del fenómeno de Koch se entiende que la clave para entender la enfermedad es identificar los procesos que estén relacionados a la inflamación.

En el presente trabajo nos propusimos identificar dichos mecanismos moleculares en el ratón que son claves de la inflamación inducida por *M. tuberculosis*. Para esto utilizamos la cepa mutante del bacilo, H37Rv  $\Delta$ sigH, la cual tiene el peculiar fenotipo de tener tasa de replicación y supervivencia al infectar al ratón, pero sin inducir la inflamación. De este modo tenemos un modelo experimental que nos permite discernir entre la infección y la enfermedad. Esta mutante y su genómica a sido ampliamente descrita en **D. Kaushal, B. G. Schroeder, y otros 2002**. Nosotros en este trabajo nos avocamos a identificar los cambios a nivel de expresión genómica que ocurren en el raton infectado tanto por la cepa silvestre H37Rv como por la mutante H37Rv  $\Delta$ sigH. Para ello realizamos experimentos de hibridación a microarregos al RNA total obtenido de los pulmones de ratones infectados por ambas cepas.

A partir de un trabajo de bioinformática pudimos identificar un conjunto de 134 genes potencialmente asociado a la inflamación inducida por *M. tuberculosis*. Posteriormente se dentifico aquellas categorías ontológicas del gen manejadas por el “**Gene Ontology Consortium**” que estuvieran significativamente sobrerrepresentadas dentro de este conjunto de 134 genes, encontrandose entonces que varios des estos genes participan de la activación, proliferación y

diferenciación de las células T, así como de la inducción de la biocintesis de citocinas.

Finalmente a partir de la construcción de un modelo de red de interacciones moleculares, utilizando el programa **Cytoscape**, se pudo identificar una serie de mecanismos moleculares sobreexpresados durante la inflamación inducida por *M. tuberculosis* que podrían constituir una asa de retroalimentación positiva de la citocina proinflamatoria IL2. Esta asa de retroalimentación positiva podría ser entonces un elemento central de la inflamación patógena de la tuberculosis y un potencial blanco terapéutico.

# Introducción.

---

## **Importancia, situación epidemiológica de la tuberculosis (TB) en el mundo, las Américas y México.**

La tuberculosis (TB) es una de las principales causas de enfermedad y muerte en el mundo especialmente en África y Asia. En el 2006, se estima, ocurrieron 9.2 millones de casos nuevos y 1.7 millones de muertes por *M. tuberculosis*, de los cuales 200 mil fueron personas VIH-positivos. La tuberculosis tiene una prevalencia a escala mundial estimada de 14.4 millones de casos. **(World Health Organization 2008).**

En 2006 fueron 5.1 millones de nuevos casos reportados provenientes de 202 países, 83 por ciento de los cuales provenían de África, el sudoeste asiático y el Pacífico occidental. De los 15 países con más alta incidencia de casos por habitante 14 son africanos y uno asiático **(World Health Organization 2008).**

En las Américas para el año 2003 hubo 502,605 casos prevalentes, 307,107 casos nuevos de TB en todas las formas y 53,803 muertes con una incidencia estimada de 43 por cada 100,000 habitantes. Es Haití el país con la mayor incidencia, 323, seguido por Bolivia, Perú, Ecuador y trece países mas cuya incidencia es mayor que el promedio regional y que concentran el 82% de los casos nuevos, con tan solo el 43% de la población **(Organización Panamericana de la Salud 2006).**

Tanto de los datos de la OMS como de la OPS, se puede inferir que hay una correlación positiva entre la pobreza y la enfermedad siendo los países en vías de desarrollo los más afectados. De hecho 95% de los casos de TB y 99% de las muertes se dan en los países pobres **(Montoro y Rodriguez 2007).**

En México, en 2006, se dieron 22,473 nuevos casos, es decir una incidencia de 22, con un la prevalencia de 25 y una mortalidad de 2. **(World Health Organization 2008).** Es por esto que México resulta ser uno de los países de

Latinoamérica con menos casos de tuberculosis per cápita, teniendo una incidencia de la mitad del promedio regional. Sin embargo, la incidencia de tuberculosis no es homogénea en el país, siendo Baja California el estado con mayor tasa de incidencia de TB pulmonar en 2006, 38, muy cercano al promedio regional y casi el doble del promedio nacional, seguido por Tamaulipas, 32, Guerrero 29, Nayarit 26, Baja California Sur, 25. Los estados con menor incidencia son: México, Zacatecas y Distrito Federal **(Sistema Único para la Vigilancia de la Epidemiología s.f.)**

Estos datos son relevantes en tanto que nos indican que la tuberculosis es un problema de salud a nivel mundial y en México, con una dimensión solamente comparable con el SIDA. Tanto así que su reducción y reversión en las tendencias de incidencia es enmarcada por la OMS dentro de la Sexta Meta de Desarrollo del Milenio y teniendo como primera estrategia el mejoramiento del diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis **(World Health Organization 2008)**.

### **La tuberculosis pulmonar**

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch. Esta enfermedad es conocida desde la antigüedad como tisis, consunción o peste blanca **(Cardoso y Portaels 2007)**. Sus síntomas típicos son: adelgazamiento, sudores nocturnos, falta de apetito y posteriormente tos crónica que puede estar acompañada con sangre en el esputo.

Existe una división conceptual entre la infección latente y la infección activa por *M. tuberculosis* que es propiamente la enfermedad. Esta división es muy importante dado que aproximadamente un 90% de los infectados con *M. tuberculosis* nunca desarrollarán la enfermedad a lo largo de su vida **(Montoro y Rodríguez 2007)**. Siendo los factores claves del cambio de infección latente a activa; el sistema inmune y los factores de virulencia de *M. tuberculosis* **(Hernández-Pando, Chacón-Salinas y Estrada 2007)**.

## **Contagio e infección por *Mycobacterium tuberculosis***

Cuando un individuo tose o habla pequeñas gotitas de 5  $\mu\text{m}$  son generadas, las cuales pueden ser inhaladas por una persona susceptible, o no inmunizada **(Riley, Mill y Nyka 1959)**. El número de bacilos en 5  $\mu\text{m}$  puede ir de 1 a 10. Siendo necesario una cantidad mínima de bacilos, entre 5 y 200, para potencialmente infectar **(Dannenberg 1989)**. Dado que es poca la cantidad de bacilos expulsados, es necesario de uno o más meses de exposición a una persona con tuberculosis activa para que la infección se dé.

Estas micro-gotas tienen un comportamiento similar al de un gas, evadiendo fácilmente las defensas mucociliares del organismo, por lo que fácilmente llegan al tracto respiratorio inferior y en particular a los alvéolos. Ahí, son ampliamente fagocitados por los macrófagos alveolares **(Kritski y Fiuza de Melo. 2007)**.

Los macrófagos son la primera línea de defensa contra *M. tuberculosis*. Si la respuesta inicial es efectiva, causará la eliminación de los bacilos a través de la acción fagocitante de los macrófagos, si ésta falla, una respuesta pro-inflamatoria localizada es llevada a cabo por la actividad de los agonistas de los receptores tipo Toll, abundantes en la superficie de la bacteria (TLR). Estos receptores TLR2 y TLR-4 son activados por varios componentes de *M. tuberculosis* entre otros, la lipoproteína 19-kD y el glicolípido lipoarabinomano activan a los macrófagos promoviendo la producción de IL-12 y la síntesis de óxido nítrico **(Kritski y Fiuza de Melo. 2007)**.

Las quimiocinas inflamatorias y el Factor de Necrosis Tumoral producidos por los macrófagos infectados reclutan a los glóbulos blancos los cuales fagocitan a los bacilos y posteriormente regresan a la circulación sanguínea causando la diseminación hematológica primaria de *M. Tuberculosis* **(Kritski y Fiuza de Melo. 2007)**.

Las células reclutadas producen a su vez quimiocinas y citocinas que amplifican el reclutamiento celular y remodela el sitio de infección en una masa celular, el tubérculo o granuloma. El granuloma inicialmente formado consiste en un centro de macrófagos infectados rodeado por los macrófagos "foamy" con una

capa externa de linfocitos rodeados de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular **(Kritski y Fiuza de Melo. 2007)**.

Los bacilos del tubérculo pueden posteriormente diseminarse por la “ruta linfática” a los nódulos linfáticos cercanos, constituyendo el complejo primario tuberculoso de Ranke, compuesto por el granuloma original, la linfagitis y la ampliación de los nódulos linfáticos en el hilio **(Kritski y Fiuza de Melo. 2007)**.

De los nódulos hilares, los bacilos se pueden diseminar a los nódulos linfáticos traqueales y vertebrales. A través del ducto torácico los bacilos pueden entrar a la circulación sanguínea dispersándose a otras áreas del pulmón o a otros órganos tales como los riñones, cerebro y huesos **(Kritski y Fiuza de Melo. 2007)**.

### **Evasión de *M. tuberculosis* del fagolisosoma**

Se sabe experimentalmente que la ingestión de bacterias inactivadas o partículas inertes está acompañada por la activación del macrófago caracterizada por un incremento en el flujo de calcio y el reclutamiento de la pequeña GTPasa Rab5b y la quinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K) al endosoma temprano. Cuando el fagosoma se fusiona al endosoma tardío y se convierte en fagolisosoma, las ATPasas vacuolares son reclutadas, disminuyendo el pH luminal y activando las hidrolasas lisosomales. El medio ambiente lisosomal y la actividad de las proteasas resultan en la destrucción del microbio **(Sundaramurthy y Pieters 2007)**.

Se ha demostrado que el bloqueo resultante en la maduración del fagosoma contribuye a la persistencia de *M. tuberculosis* en los macrófagos **(Russell, Mwandumba y Rhoades 2002)**. Por otra parte la inhibición del calcio citosólico bloquea la fusión del fagosoma-lisosoma y su subsecuente acidificación **(Malik, Denning y Kusner 2000) (Downey, y otros 1999)**. Significativamente, la infección del macrófago con *M. tuberculosis*, evita el flujo de calcio e inhibe la activación subsecuente de los efectores de calcio/calmodulina tales como la quinasa II de calcio/calmodulina (CaMKII) **(Malik, Denning y Kusner 2000) (Malik, Lyer y Kusner, 2001)**. Siendo señalado el factor de virulencia

lipoarabinomannan (LAM) de *M. tuberculosis* como el bloqueador del incremento citosólico de calcio y de la ruta dependiente de calmodulina que conecta la señalización intracelular con el tráfico de membrana (**fusión fagolisosomal**) (**Vergne, Chua y Deretic 2003**).

Recientemente se ha señalado una liga entre la supervivencia de la micobacteria en el macrófago y la activación de la fosfatasa 2B calcineurina la cual es dependiente de calcio a través de coronina 1. En este mecanismo de bloqueo de la fusión fagolisosomal se muestra una persistente elevación del calcio citosólico (**Jayachandran, y otros 2007**). Este dos direcciones opuestas en la regulación de la señalización del calcio como dos causas que llevan a una misma consecuencia, la interrupción de la formación del fagolisosoma implican, de acuerdo a una revisión en la revista *Cell*, “un profundo abismo conceptual entre las obserbaciones primeras y las de Jayachandran (**Trimble y Grinstein 2007**).

### **La transición de la inmunidad protectora a la enfermedad progresiva**

A partir del descubrimiento del fenómeno de Koch la etiología de la enfermedad de la tuberculosis adquiere la perspectiva clave para su estudio, es el sistema inmune afectado por la infección lo que provoca en los individuos la enfermedad. Desde entonces la principal línea de investigación de la enfermedad por TB consiste en entender la transición de infección latente por *M. tuberculosis* a la enfermedad de la tuberculosis pulmonar, para lo cual es importante entender las diferencias, durante la infección, entre la inmunidad protectora y la enfermedad progresiva; Buscando los mecanismos y factores tanto del huésped como del bacilo que llevan al organismo infectado a desplegar una respuesta inmune efectiva a desarrollar los procesos inmunopatológicos inflamatorios.

## **Factores de virulencia de *M. tuberculosis***

### **El papel de los Fenolglucolípidos y de LAM (lipoarabinomannan) en la virulencia de *M. tuberculosis***

La pared celular micobacteriana es una compleja estructura que juega un papel principal tanto para la virulencia como para la habilidad de los bacilos tuberculosos para resistir el ambiente hostil encontrado durante el proceso infeccioso. Una única propiedad de esta envoltura celular es su alto contenido lipídico que confiere una excepcionalmente baja permeabilidad a la micobacteria **(Daffe y Draper 1998) (Jarlier y Nikaido 1990)**. Entre los constituyentes expuestos de superficie de la envoltura celular de *M. tuberculosis* dos familias de lípidos estructuralmente relacionadas, los tiocerol dimicocerosatos (DIM) y los fenoltiocerol dimicocerosatos, también llamados fenolglucolípidos (PGL), han sido extensamente estudiados debido a su papel clave en la patogénesis de la tuberculosis y en la interacción bacilo-huésped **(Camacho, y otros 2001)**.

El fenolglucolípidos de *M. tuberculosis* fue originalmente identificado en la cepa *canetti* **(Daffe, Lacave y Laneelle 1987) (van Soolingen, y otros 1997)**. Su producción por un subconjunto de aislados clínicos de *M. tuberculosis* ha sido asociada con un incremento en la virulencia del bacilo en los modelos de infección en animales. Estudios de infección por aerosol en ratón ha mostrado que la diferencia de supervivencia entre animales infectados con la cepa WBeijing HN878 que produce PGL y una cepa isogénica que no, es de un promedio de 90 días **(Reed, y otros 2004)**.

Esta virulencia incrementada está así mismo relacionada con la inducción de una respuesta inmune Th1 deficiente **(Manca, y otros 2001) (Manca, Reed, y otros 2004)**. Se han mostrado además que la producción de PGL por la cepa W-Beijing resulta en una producción reducida del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y de interleucina-12 (IL-12) por monolitos humanos infectados con *M. tuberculosis* **(Manca, Tsenova y Freeman, y otros 2005)**. Por lo que esta

observación provee una liga entre la hipervirulencia de estas cepas en animales experimentales con la deficiente inmunidad Th1 durante la infección.

La mayoría de los aislados clínicos así como las cepas de laboratorio H37Rv y Erdman, son deficientes en la producción del fenolglucolípido **(Cho, y otros 1992) (Constant, y otros 2002) (Cox, y otros 1999) (Reed, Gagneux, y otros 2007)**. Una deleción de 7 pares de base en el gen de una sintasa de poliuetido (pks1-15), la cual origina una mutación consistente en un desfase del marco de lectura, ha sido asociada con la incapacidad de los aislados de *M. tuberculosis* para sintetizar fenolglucolípido **(Constant, y otros 2002)**. Miembros de la familia W-Beijing, usualmente tienen un gen pks1-15 intacto, y muchas de estas cepas retienen la habilidad de producir fenolglucolípido **(Reed, y otros 2004) (Manca, Reed, y otros 2004) (Reed, Gagneux, y otros 2007)**. Sin embargo, recientemente, algunos aislados de W-Beijing que poseen un intacto pks1-15 se mostraron deficientes en la síntesis de fenolglucolípido indicando que no todos los miembros de esta familia son productores de este lípido y sugieren otros mecanismos moleculares para su éxito. Mostrándose además, que la producción de fenolglucolípidos está altamente restringida dentro del complejo de *M. tuberculosis* y posiblemente solo producido por la cepa W-Beijing. Y que aunque el fenolglucolípido puede ejercer un efecto modulador en diferentes fondos genéticos de *M. tuberculosis*, esta modulación de la respuesta de citocinas del huésped no es la misma para cada cepa productora, y que la modulación de citocinas inducida por fenolglucolípidos no necesariamente confiere hipervirulencia **(Sinsimer, y otros 2008)**.

La Lipoarabinomanana (LAM) es un lipoglicano de la pared celular. La presencia y estructura de la cubierta permite la clasificación de las moléculas LAM en tres clases principales **(Chatterjee, y otros 1992)**. Las primeras, LAM manosiladas (ManLAM), las cuales son caracterizadas por la cubierta de manosa, son encontradas en especies patogénicas incluyendo *M. tuberculosis* y *Mycobacterium kansasii* **(Guérardel, y otros 2003)**. Las segundas, LAM cubiertas por fosfoinositol (PILAM), han sido aisladas de cepas no patogénicas tales como *Mycobacterium. smegmatis* y otras especies micobacterianas de rapido crecimiento no identificadas **(Gilleron, y otros 1997)**. Finalmente, las

LAM descubiertas (AraLAM) aisladas de *Mycobacterium chelonae*, que carecen de ambos tipos de cubierta **(Guerardel, y otros 2002)**.

Las LAM micobacterianas son importantes factores de virulencia y pueden ser considerados modulinas por su capacidad de manipular la respuesta inmune del hospedero **(Brennan 2003) (Chatterjee y Khoo 1998) (Nigou, Gilleron y Puzo 2003)**. Las LAM han sido implicadas en el disparo de múltiples rutas de señalización que modulan la apoptosis y la producción de IL-2 en macrófagos y células dendríticas. ManLAM aislada de *M. tuberculosis* no induce IL-2 ni apoptosis y podría actualmente inhibir la inducción de estas dos rutas vía agonistas tales como lipopolisacárido o infección bacteriana **(Nigou, Gilleron y Rojas, y otros 2002) (Nigou, Zelle-Rieser, y otros 2001) (Rojas, y otros 2000)**. En contraste los PILAM de los organismos *M. smegmatis* y *Mycobacterium species* son potentes inductores de IL-2 apoptosis **(Ghosh, y otros 1998) (Nigou, Gilleron y Puzo 2003) (Nigou, Gilleron y Rojas, y otros 2002)**. Estas observaciones sugieren que la chapa de manosa de ManLAM de *M. tuberculosis* es importante para modular la inducción de señales proinflamatorias en los macrófagos y las células dendríticas. No obstante estos estudios estructurales fueron limitados debido a la dificultad técnica que impide la remoción específica de la chapa de manosa de la ManLAM de *M. tuberculosis* y por el limitado número de variantes estructurales de LAM disponibles.

Recientemente se ha mostrado que las chapas de manosa no necesariamente modulan la inducción de IL-2 y de apoptosis. Dándose también evidencia de que LM induce fuertemente la producción de IL-2 y apoptosis el cual tiene una fuerte actividad proinflamatoria sin importar que especie de micobacteria es aislada. Esta importante función apunta al dominio de arabinana que podría ocultar la capacidad proinflamatoria del dominio de manana de LM. Por lo tanto, la expresión y actividad de enzimas tales como arabinosiltransferasa que modifica en centro de manana de LM podrían ser importantes en determinar la virulencia relativa de la bacteria al modificar la proporción LM/LAM dentro de la pared celular. Siendo esta proporción LM/LAM en realidad el posible factor de virulencia **(Dao, y otros 2004)**.

## **Factores de transcripción $\sigma$ de *M. tuberculosis* y virulencia**

Los distintos factores de transcripción de *M. tuberculosis* permiten que los bacilos puedan enfrentar, durante el proceso de infección, varios estreses ambientales a los cuales se tiene que adaptar requiriendo para ello de una compleja regulación de la expresión genética **(Manganelli, y otros 2004)**. Estos distintos estreses son: Primero, la exposición a agentes oxidantes, principalmente representados por intermediarios reactivos del oxígeno y intermediarios reactivos del nitrógeno, producidos por los macrófagos activados. Segundo, la exposición a un pH bajo. Aun si *M. tuberculosis* es capaz de bloquear la acidificación del fagosoma, este bloqueo no es completo en tanto el fagosoma experimenta un ligero decremento en el pH **(Deretic y Fratti 1999)**. Tercero, el daño a las estructuras de la superficie. El surfactante alveolar es un detergente suave con actividad antimicrobial y podría dañar la estructura de la envoltura celular del bacilo rica en ácidos grasos. Adicionalmente péptidos tóxicos y proteínas tales como la granulosa, pensada para actuar al nivel de la superficie, son liberados por los macrófagos activados y por las células NK **(Dieli, y otros 2001)**. Finalmente los radicales de ácidos grasos, secretados por el macrófago tanto a dentro del fagosoma mioabacteriano como al medio externo, exhiben su toxicidad cuando interactúan con la superficie micobacteriana **(Akaki, y otros 2000)**. El cuarto es la hipoxia, especialmente dentro del granuloma pero también dentro del fagosoma. Esta condición ambiental es actualmente la principal candidata para la inducción de la persistencia (latencia o dormancia), un fenómeno de gran importancia en la patogénesis de *M. tuberculosis* aun no bien entendido a nivel molecular **(Wayne y Sohaskey 2001)**.

El genoma de *M. tuberculosis* codifica para 190 reguladores transcripcionales: 13 factores sigma, 11 sistemas de dos componentes, 5 reguladores de respuesta desacoplada, 11 proteínas cinasas y más de 140 reguladores transcripcionales putativos **(Cole, y otros 1998) (Fleischmann, y otros 2002) (Bishai 1998)**. Varios reguladores han sido caracterizados; algunos de estos

responden a estreses ambientales como choque frío (**Shires y Steyn 2001**), choque calórico (**Manganelli, Dubnau, y otros 1999**) (**Stewart, y otros 2002**), hipoxia (**Dasgupta, y otros 2000**) (**Sherman, y otros 2001**), inanición por hierro (**Rodriguez y Smith 2003**), y estrés oxidativo (**Manganelli, Voskuil, y otros 2002**). El cuadro resultante está aún incompleto pero este sugiere sistemas regulatorios complejos con funciones sobrelapadas y redundancia (**Manganelli, Proveddi y Rodriguez, y otros 2004**). Por ejemplo, la respuesta a choque térmico es determinada por la activación de cinco regulones sobrelapados bajo el control de tres factores sigma (sigB, SigE y SigH) y otros dos reguladores transcripcionales (HspR y HrcA) (**Manganelli, Dubnau, y otros 1999**) (**Stewart, y otros 2002**).

Los factores sigma pueden ser divididos en dos grupos que son filogenéticamente distintos: aquellos relacionados a  $\sigma^{70}$  y aquellos relacionados a  $\sigma^{54}$ . Mientras que todas las eubacterias codifican al menos un factor sigma perteneciente a la clase  $\sigma^{70}$ , ninguno codifica alguno perteneciente a la clase  $\sigma^{54}$  (**Wösten 1998**). La familia  $\sigma^{70}$  puede ser posteriormente clasificada en tres grupos dependiendo de su estructura y función: factores  $\sigma$  primarios, factores no esenciales similares a los factores primarios y factores  $\sigma$  alternativos (**Paget y Helmann 2003**).

El tercer grupo, el de los factores sigma alternativos es el mas heterogéneo y puede dividirse en numerosos subgrupos. En *M. tuberculosis* están representados por, sigE, sigG, sigH, sigI, sigJ, sigK, sigL y sigM, que pertenecen al subgrupo de factores sigma de función extracelular (ECF). Los factores sigma ECF son reguladores que responden al ambiente. Las bacterias usualmente contienen varios miembros de la familia ECF controlando una variedad de funciones en respuesta a específicas señales del ambiente extracelular, tales como la presencia de proteínas desnaturalizadas, la presencia de luz, cambios en la osmolaridad o en la presión barométrica o la presencia de moléculas tóxicas en el ambiente externo (**Missiakas y Raina 1998**) (**Wösten 1998**).

Todos los 13 factores sigma de *M. tuberculosis* son expresados durante el crecimiento exponencial (**Manganelli, Dubnau, y otros 1999**) (**Hu y Coates**

**2001).** Aunque los niveles de mRNA de algunos factores sigma cambian cuando los bacilos son sujetos a condiciones de estrés; por ejemplo los niveles de mRNA tanto de sigE como de sigB se incrementaron cuando los bacilos fueron expuestos a estrés de superficie mediante dodecil sulfato de sodio **(Manganelli, Dubnau, y otros 1999) (Manganelli, Voskuil, y otros 2001).** Los niveles de estos mismos factores sigma y de sigH también se incrementaron después del choque térmico y de la exposición al agente oxidante diamina **(Manganelli, Dubnau, y otros 1999) (Manganelli, Voskuil, y otros 2002).** Interesantemente sigF, sigE y sigH fueron inducidos durante la infección del macrófago, sugiriendo su involucramiento en la **virulencia (Graham y Clark-Curtiss 1999).**

### **El factor Sigma H y de *M. tuberculosis***

El factor Sigma H de *M. Tuberculosis*, que pertenece a la familia de función extracitoplasmica (ECF) es un regulador central de la respuesta al estrés oxidativo, nitrosativo y térmico; regulando directamente tanto a los efectores de la respuesta, como a los reguladores de la transcripción que controlan la expresión de un amplio rango de genes **(Fernandes, y otros 1999) (Raman, y otros 2001) (Song, y otros 2003) (Darwin, y otros 2003).**

SigH es regulado a nivel transcripcional vía la autorregulación del promotor SigH y postranscripcionalmente mediante la interacción con el factor anti-sigma RshA. Esta proteína es un miembro de la familia anti-sigma asociada a zinc (ZAS), cuyos miembros, incluyendo RshA, funcionan como proteínas interruptoras sensibles al estado redox **(Li, y otros 2003) (Paget, Bae, y otros 2001).** En *M. tuberculosis* la interacción de RshA con SigH es interrumpida bajo condiciones oxidantes, permitiéndole a SigH asociarse al centro de la RNA polimerasa y activar la transcripción de los genes de respuesta a estrés y de otros reguladores transcripcionales. La auto-regulación del promotor de SigH resulta en una rápida y fuerte inducción del regulón SigH a consecuencia del estrés oxidativo. La inducción es mantenida hasta que la homeostasis redox es restablecida y la retroalimentación positiva

transcripcional es interrumpida por la unión de SigH con RshA (**Song, y otros 2003**).

Por otra parte se ha visto que la expresión de sigH de *M. tuberculosis* es sobrerregulada a distintos tiempos durante la infección del macrófago (**Graham y Clark-Curtiss 1999**). Lo cual sugiere que sigH podría ser un factor de virulencia para *M. tuberculosis*. Siendo esto último corroborado por el fenotipo mutante  $\Delta$ SigH de reducida inmunopatología aunque con tasas normales de replicación y supervivencia (**D. Kaushal, B. G. Schroeder, y otros 2002**).

### **La cepa mutante $\Delta$ sigH de *M. tuberculosis* y su repercusión en la virulencia**

El estudio de la mutante  $\Delta$ SigH confirma que el regulón SigH comprende un sistema global de respuesta para manejar estrés oxidativo y otros tipos de estreses desnaturalizantes, por inducir una familia de tioredoxina y genes de choque térmico. Sorprendentemente, resulta que la expresión de sigma H y la defensa oxidativa mediada por sigma H parecen ser dispensables para el crecimiento bacterial y supervivencia en los tejidos del ratón, aunque ellos son requeridos para la inducción de enfermedad y letalidad en ratón (**D. Kaushal, B. G. Schroeder, y otros 2002**).

El defecto en la virulencia de la mutante  $\Delta$ SigH *M. tuberculosis* cae en una clase fenotípica en la cual hay una reducida inmunopatología a pesar de haber una replicación normal de la bacteria y supervivencia en el tejido del huésped (**D. Kaushal, B. G. Schroeder, y otros 2002**). Se ha observado recientemente que la mutación de *WhiB3* en *M. tuberculosis* produce una cepa mutante con un fenotipo similar al de la mutante  $\Delta$ SigH de *M. tuberculosis* (**Steyn, y otros 2002**). Interesantemente *WhiB3* parece unirse al principal factor  $\sigma$  de *M. tuberculosis* y ser un posible regulador postranscripcional de la actividad de los factores sigma. El hilo común de la actividad defectuosa del factor  $\sigma$  en ambos mutantes de *WhiB3* y SigH sugiere que la habilidad para inducir inmunopatología e infección letal requiere de un conjunto genético regulado, y

subraya el hecho de que *M. tuberculosis* posee mecanismos específicos que disparan la caída de la respuesta inmune llevando a una inflamación granulomatosa aún mas extensiva **(D. Kaushal, B. G. Schroeder, y otros 2002)**.

El estudio de la mutante  $\Delta$ SigH demuestran que el fenotipo de reducida inmunopatología en esta mutante está relacionado a un reclutamiento reducido al pulmón de células T CD4+ y CD8+ y a la vez asociado con el inicio de la respuesta inmune adquirida y con el control de la replicación bacteriana. Concomitante con la reducción de células CD4+ y CD8+ en el pulmón, hubo una disminuida población de células T expresando INF- $\alpha$  y de TNF- $\gamma$  en la cuarta semana **(D. Kaushal, B. G. Schroeder, y otros 2002)**.

El reclutamiento de células T al bazo fue idéntico tanto con la cepa mutante  $\Delta$ SigH como con la silvestre, sugiriendo que el defecto inmunopatológico de la mutante podría ser específica del pulmón. Es interesante notar que mientras que la entrada de células T al pulmón a las tres o cuatro semanas después de la infección está asociada con el control de crecimiento bacteriano, la replicación de la mutante, la cual reclutó diez veces menos células CD4+ y CD8+ a las cuatro semanas, fue inhibida con el mismo grado que la cepa silvestre a pesar del menor influjo de células T. Esta observación sugiere que aun una modesta respuesta inmune celular es suficiente para contener la replicación bacteriana a un estado estable de las cuatro a las seis semanas en el pulmón y que el numero diez veces mas grande de células reclutadas CD4+ y CD8+ constituye una excesiva respuesta celular que resulta en un acelerado daño tisular y en mortalidad **(D. Kaushal, B. G. Schroeder, y otros 2002)**.

Mientras que los análisis de microarreglos muestran un papel de SigH en la inducción de un sistema intracelular de proteínas redox y de estrés para reparar el daño oxidativo, SigH no controla la transcripción de genes para los bien caracterizados antígenos de superficie o para proteínas secretadas, lo cual podría explicar en parte esta falla para obtener la típica respuesta inmune en el pulmón. Una explicación para este retardado fenotipo de enfermedad es que la carencia de un ciclo redox mediado por SigH podría generar una proporción mas alta de antígenos bacterianos oxidados o desnaturalizados, por

lo que no se generaría una respuesta inmune que dañase al tejido pulmonar. Alternativamente, el retardo en la progresión de la enfermedad podría ser independiente de la respuesta al estrés alterada por la mutación, pero en cambio podría explicarse por la disminuida síntesis o liberación de antígenos de superficie proinflamatorias o moléculas secretas que son dependientes de SigH. En soporte a esta noción está el hecho de que el 30% de los genes dependientes de SigH son proteínas hipotéticas de función desconocida, algunas de las cuales podrían ser tales antígenos; adicionalmente varias proteínas transportadoras (transportadores ABC sulfato MT2468–2469 y proteína de eflujo MT1297) son controladas por SigH, sugiriendo la disminución en la secreción de moléculas potencialmente proinflamatorias **(D. Kaushal, B. G. Schroeder, y otros 2002)**.

### **El uso de microarreglos para el análisis de expresión diferencial en células expuestas a agentes infecciosos**

Por muchos años en la biología molecular se abordaba el análisis de un gen o unos pocos a la vez. Basándose la técnicas en el uso de ácidos nucleicos (hibridación *in situ*, Northern blot, protección de RNasa) o en anticuerpos (inmunohistoquímica, Western blot). La descripción de la expresión de los genes era azarosa, largamente dependiente de la oportunidad de estas pruebas y de la intuición de los investigadores. La disponibilidad de información de los genomas y el paralelo desarrollo de la tecnología de microarreglos ha proveído de los medios para realizar el análisis global de la expresión de miles de genes en un solo ensayo **(Murphy 2002)**.

El concepto de análisis por microarreglos es simple. El RNA es cosechado de un tipo celular o tejido de interés y marcado para generar el blanco u objetivo – La muestra libre de ácido nucleico cuya identidad o abundancia está siendo detectada. Este es hibridizado a una sonda fija de secuencias de DNA correspondientes a genes específicos que han sido pegados, en una configuración conocida, sobre una matriz sólida. La hibridación, basada en el apareamiento de Watson-Crick, entre la sonda y el blanco provee una medida cuantitativa de una secuencia en particular de la población objetivo. Esta

información es capturada digitalmente y sujeta a varios análisis para extraer información biológica. La comparación de los patrones de hibridación posibilita la identificación de mRNAs que difieran en la abundancia en dos o más muestras blanco. Así, los microarreglos constituyen una poderosa herramienta para investigar las alteraciones en los organismos vivos de la expresión de mRNA que acompaña y posiblemente regula los cambios fisiológicos y patológicos ocurridos en ellos **(Murphy 2002)**.

La co-evolución de los patógenos y el sistema inmune ha resultado en la selección de mecanismos sofisticados, los cuales pueden proveer de ventajas tanto al huésped como al patógeno y ultimadamente resulta en resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. El uso tanto de los microarreglos a hospederos como a patógenos durante la infección, podría mostrar como los cambios en la expresión genética del huésped se correlacionan con los cambios en el patógeno y viceversa. Una comprensión detallada de esto arrojaría luz sobre los mecanismos básicos que dirigen la interacción huésped-patógeno, mientras que genes que son modulados de una manera específica al tipo celular podrían proveer información acerca de específicos programas genéticos iniciados a partir del encuentro con el patógeno. Esta estrategia de investigación basada en el uso de microarreglos permitirá discernir a las redes reguladoras que subyacen a la respuesta transcripcional del huésped y del patógeno a la infección **(Tailleux, y otros 2008)**.

Una gran cantidad de trabajos se han realizado utilizando la tecnología de los microarreglos para la búsqueda de los distintos perfiles de expresión de especies, órganos, tejidos y tipos celulares expuestos a agentes patogénicos, con el objetivo de encontrar genes del huésped que constituyan factores de susceptibilidad; determinar marcadores geonómicos de la enfermedad como método de diagnóstico, y buscar entender la interacción a escala molecular del huésped con el patógeno.

Algunos ejemplos del uso de microarreglos para el análisis de expresión diferencial en células expuestas a agentes infecciosos son: la asociación entre las diferentes rutas inmunológicas y los distintos resultados clínicos de la infección por dengue mediante el perfil de expresión genética de un conjunto

de genes inflamatorios a partir de muestras de sangre de niños con infección severa **(de Kruif, y otros 2008)**; el estudio del efecto del virus del dengue en células endoteliales para el análisis de la interacción huésped-patógeno **(Warke, y otros 2003)**; el estudio de la interacción entre la *Salmonella enterica* y los heterofilos de pollos susceptibles y resistente, obteniéndose conjuntos de genes exclusivos de la susceptibilidad y la resistencia a la enfermedad **(Chiang, y otros 2008)**; o el estudio de la interacción huésped-patógeno entre el bacilo de *M. tuberculosis*, y las células dendríticas y macrófagos **(Tailleux, y otros 2008)**.

De una manera similar en el presente trabajo se utilizó la tecnología de los microarreglos con el objetivo de identificar mediante el análisis de la expresión diferencial de ratones infectados con la mutante  $\Delta$ sigH e infectados con la cepa isogénica silvestre -la cuales tienen diferencias fenotípicas conocidas- a aquellos genes del huésped relacionados con los procesos inmunopatogénicos de la infección.

# Antecedentes experimentales

---

Para el modelo de infección intratraqueal se utilizan ratones machos BALB/c obtenidos del bioterio del Instituto de Ciencias Médicas de la Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

La cepa de referencia H37Rv y la cepa mutante H37Rv  $\Delta$ sigH, así como su respectiva cepa complementada, fueron producidas en el laboratorio del Dr. Gary Schoolnick, de la universidad de Stanford, EE.UU. actualmente en el cepario de la Unidad de Investigaciones Médicas del IMSS-Zacatecas. Las cepas fueron cultivadas en medio Proskauer y Beck modificados por Youmans, todos los procedimientos fueron realizados en un nivel de bioseguridad clase III. Después de un mes de cultivo los bacilos fueron cosechados en alícuotas de  $250 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ l de buffer salino de fosfatos y fueron almacenados a -70 hasta su uso.

## **Infección intratraqueal**

Los ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad fueron inoculados con las cepas de *M. tuberculosis* antes referidas de acuerdo al procedimiento descrito por Hernández Pando et al.<sup>45</sup> Brevemente, una alícuota conteniendo 250 000 bacilos es sonicada en baño de agua durante 30 segundos y se inyecta en ratones anestesiados previamente con 56 mg/kg de pentotal. Los bacilos viables son inyectados directamente en la traquea expuesta. La incisión se sutura con seda estéril y el ratón se mantiene en posición vertical hasta que el efecto de la anestesia haya pasado. Los ratones infectados se mantienen en cajas con microaislamiento y filtros HEPA conectados a una presión negativa. Todo el procedimiento se realizó en campana de flujo laminar de nivel de bioseguridad III.

## **Estudio de viabilidad animal**

Ocho ratones Balb/c fueron usados por cada grupo experimental. Estos fueron incluidos en el sistema de microaislamiento y dejados sin ninguna maniobra con suficiente agua y alimento durante el periodo de evaluación (6 meses). Se realizaron curvas de supervivencia. Este estudio se realizó por duplicado.

## **Aislamiento de RNA de pulmones infectados**

Resultados previos del Dr. Rogelio Hernández Pando con el modelo de infección tuberculosa experimental, han demostrado que el desenlace a enfermedad, ocurre en las primeras 3-4 semanas posteriores a la infección. En particular es a partir de la tercera semana cuando la infección con cepas virulentas supera la capacidad de respuesta del huésped, con lo que se establece una progresión a enfermedad crónica, con daño tisular y funcional en los pulmones de ratones infectados. Por lo anterior nuestro análisis contempla este periodo de tiempo para los análisis de expresión diferencial. Así, los pulmones derechos o izquierdos de los ratones infectados con la cepa de *M. tuberculosis* (incluyendo pulmones de animales control), recuperados a los 1, 14, 21 y 28 días post-infección, fueron removidos y cortados en pequeñas secciones con tijeras estériles y se depositaron en el fondo de un tubo de propileno de 5 ml que contendrá 2 ml de solución estabilizadora de RNA (Ambion Inc., USA) e inmediatamente fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

Para el aislamiento del RNA las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a 3000-5000 x g en centrifuga clínica (Beckman modelo RC 1550). La extracción de RNA se realizó con un sistema "Rneasy midi kit" de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Quiagen Inc., USA). Una alícuota se usó para la cuantificación de RNA total mediante medición de la absorbancia a 260/280 nm en espectrofotómetro Nanodrop (modelo ND 1000, USA). La concentración de RNA total se ajustó a 1.5 µg/ul y se almacenará en alícuotas de 20 µl a -70°C hasta su uso.

## **Ensayos de hibridación a microarreglos de expresión**

El análisis de la expresión diferencial de los pulmones de los diferentes lotes de ratones infectados con la cepa H37Rv, cepa mutante H37Rv  $\Delta$ sigH y su respectiva cepa complementada, será realizado usando RNA total. La preparación de las muestras de cRNA marcado con biotina derivadas del tejido infectado y de ratones no infectados, fueron hibridada a microarreglos de oligonucleótidos de alta densidad (Affymetrix, Santa clara, CA, USA), de acuerdo a los protocolos descritos en "GeneChip Expression Analysis Technical Manual" (Affymetrix 2007) y bajo protocolos estandarizados desarrollados en la Universidad de Stanford, EEUU. El microarreglo a usar contiene cerca de 22,000 genes de ratón con función conocida. Cada gen será interrogado por once pares de oligonucleótidos que determinaran la presencia de transcritos para cada gen presentado en este microarreglo. La colección de los niveles de expresión para cada gen serán analizados con el programa SAM (Significance Analysis of Microarrays, V. Tusher et al). Los valores serán obtenidos al promediar las diferencias de la señal de intensidad de cada par de oligonucleótidos al hibridar las sondas específicas. La normalización será efectuada con respecto a la mediana de los valores control tomando un valor de referencia de 500 unidades. La identificación de genes inducidos en los animales infectados con cepas mutantes y silvestres será determinada por selección de genes con niveles de expresión  $\pm 2$  veces con respecto a los animales no infectados. Se excluirán genes expresados a muy bajo nivel ajustando un valor de corte de expresión basal definido por el programa antes mencionado. Estos métodos de filtración nos permitirán incluir genes que expresen cambios robustos en los niveles de expresión de RNA en respuesta a la infección tuberculosa por las cepas mutantes o silvestres.

# Hipótesis

---

Al hacer la comparación entre la expresión transcripcional del pulmón de ratón Balb/c infectado con la cepa mutante H37Rv  $\Delta$ sigH y la expresión en el ratón infectado con la cepa silvestre isogénica H37Rv; identificaremos genes potencialmente relacionados a la inflamación inducida por *M. tuberculosis*, varios de los cuales podrían sobrerrepresentar categorías ontológicas del gen (manejadas por el Gene Ontology Consortium) que establecerían relaciones procesuales y estructurales entre estos genes y la inflamación inducida.

Varios de estos genes podrían constituirse a su vez, en módulos funcionales putativos y complejos moleculares que darían cuenta de eventos moleculares claves de la patología de la tuberculosis.

# Objetivo General

---

*Identificar a través un análisis bioinformático de microarreglos los genes potencialmente relacionados con la inflamación inducida por M. tuberculosis.*

*Identificar las principales categorías ontológicas de estos genes*

*Determinar si estos genes se constituyen en módulos funcionales putativos y complejos moleculares.*

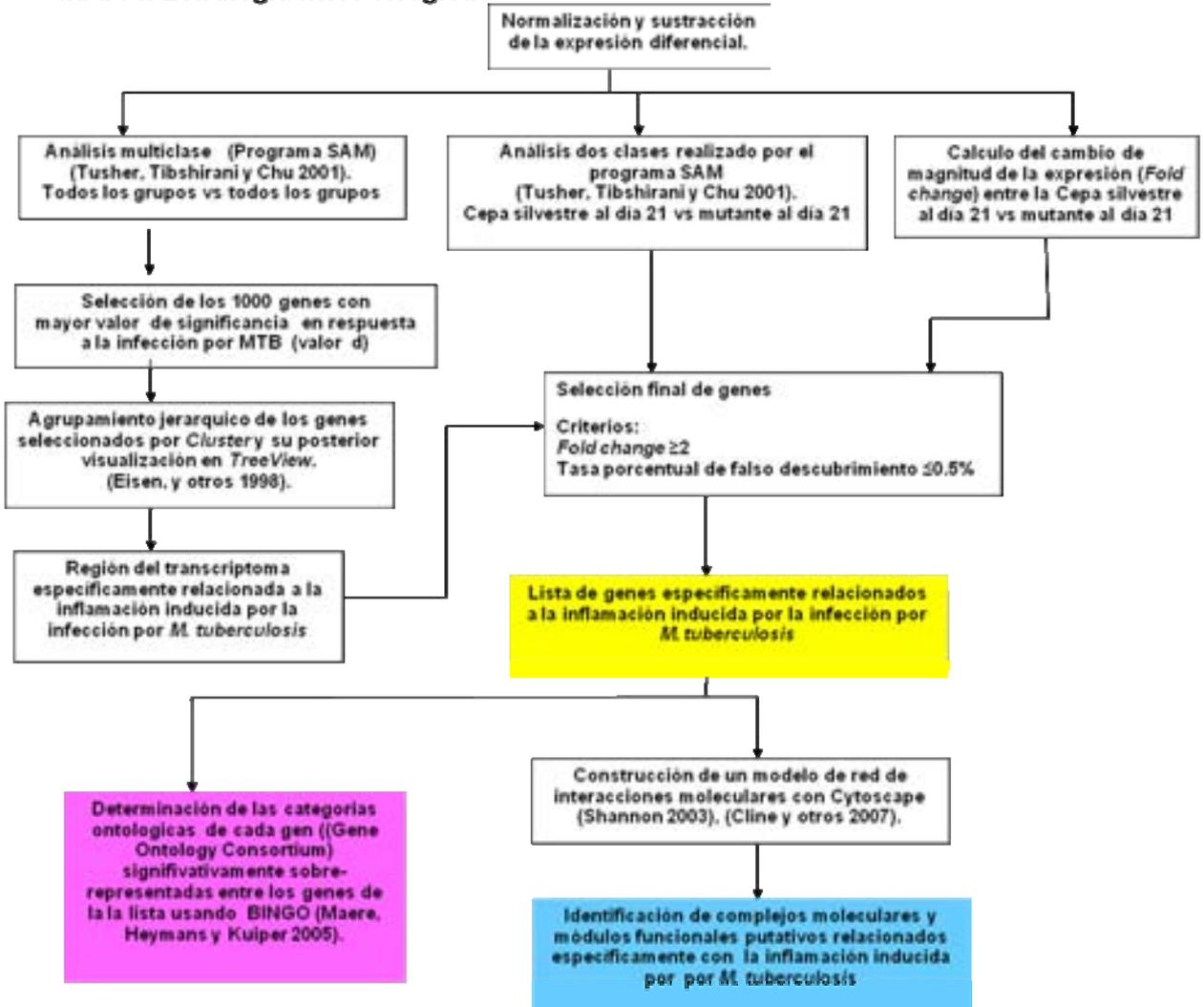
# Metodología

---

**La estrategia general** de este trabajo de investigación tiene dos componentes principales en función de los dos grandes objetivos de esta tesis.

El primero es la obtención de una lista de genes asociados a la inflamación inducida por *M. tuberculosis* a partir de un análisis bioinformático de los genes y el segundo es la extracción de datos de alto valor conceptual a través de la determinación de las categorías ontológicas del gen que están sobrerrepresentadas en la lista de genes y de la identificación de módulos funcionales putativos y complejos moleculares relacionados a la inflamación inducida (Cuadro 1).

**Cuadro1. Estrategia metodológica**



### Normalización y sustracción de la expresión diferencial.

La expresión de los microarreglos, correspondientes a las 4 condiciones experimentales y al control, se normalizo ajustándola a una recta por el método de mínimos cuadrados. Posteriormente a la expresión de las condiciones experimentales se les sustrajo la expresión promedio del control, obteniéndose así la expresión diferencial.

**Análisis multiclase realizado por el programa Significance Analysis of Microarray SAM (Tusher, Tibshirani y Chu 2001).**

Se realizó un análisis multiclase a las dos condiciones experimentales a los días 1 y 21 para determinar que genes tuvieron la mas significativa expresión diferencial en función de las condiciones experimentales y de los días. Es decir, se buscó a aquellos genes cuya expresión fuese más sensible a las condiciones experimentales.

SAM generó un ranqueo de genes de acuerdo a la estadística (d) la cual es una medida de la significancia de los cambios en la expresión en función de la condición experimental. Se seleccionó a los 1000 genes con mayor valor en la estadística (d), logrando con esto descartar a aquellos genes que presentaran una expresión diferencial cercana a cero, ó a aquellos que tuvieran inconsistencias entre los triplicados de cada condición experimental a un tiempo dado. Todos estos genes seleccionados presentaron, además, una tasa porcentual de falso descubrimiento igual a cero.

### **Agrupamiento jerárquico de los genes seleccionados por el programa Cluster y su posterior visualización en el TreeView. (Eisen, y otros 1998).**

Los mil genes de mayor significancia en el análisis multiclases de SAM fueron agrupados jerárquicamente por Cluster bajo la modalidad de “Average Linkage Clustering”, sin calcular pesos. Posteriormente el agrupamiento realizado por Cluster fue visualizado en TreeView, donde se realizó la búsqueda del nodo (agrupamiento) más amplio cuyos genes presentaran una sobreexpresión en la infección por cepa silvestre al día 21 y una subexpresión o una nula expresión diferencial en las demás condiciones y días. Una vez identificado el nodo se exportó la lista de estos genes en foma de archivo de texto delimitado por tabulaciones.

### **Selección final de genes.**

A los genes de este nodo se les determinó una la tasa porcentual de falso descubrimiento y una estadística (d) a partir de la ubicación de estos genes

dentro de un ranqueo generado en un análisis de tipo dos-clases realizado por SAM, paralelo al análisis multiclase, entre la infección por cepa silvestre versus cepa mutante, ambas al día 21. También, a partir de la expresión total normalizada, se determinó el cambio de magnitud (fold change) de cada uno de los genes del nodo en la cepa silvestre con respecto a la mutante al día 21.

Finalmente se seleccionaron aquellos genes del nodo que presentaran un cambio de magnitud mayor a 2 y que presentaran una tasa de falso descubrimiento menor a 0.1%. Estos genes pasaron a constituir la lista o conjunto de genes del ratón específicamente relacionados a los procesos inflamatorios inducidos por *M. tuberculosis*.

**Determinación de las categorías de la ontología del gen manejadas por GO (Gene Ontology Consortium) significativamente sobre-representadas en la de la lista, mediante el programa BINGO (Maere, Heymans y Kuiper 2005).**

Con el objeto de determinar la ubicación de los genes de la lista dentro de las categorías ontológicas manejadas por GO, se procedió a la realización de pruebas estadísticas a través del programa BINGO.

Se seleccionó como opción de prueba estadística, la recomendada por el programa, esto es, la prueba hipergeométrica. Se seleccionó además la corrección de la tasa de falso descubrimiento de Benjamini y Hochberg. El valor escogido de significancia fue de 0.05.

Se realizaron en total tres pruebas estadísticas correspondientes a los tres principios ontológicos organizativos: Componente celular, proceso biológico y función molecular.

**Construcción de un modelo de red de interacciones moleculares con el programa Cytoscape (Shannon 2003), (Cline y otros 2007).**

Las redes de interacciones moleculares de las proteínas de los genes de la lista se importaron a través del Pathway Common Web Service de Cytoscape. Posteriormente fueron coloreados los nodos correspondientes a las proteínas de los genes de la lista con un gradiente continuo en función del cambio de magnitud entre la infección por cepa silvestre al día 21 con respecto a la infección por cepa mutante al día 21. El gradiente de color parte del rojo al 50% de brillo y llega al rojo al 100% de brillo. La relación entre el cambio de magnitud y el brillo del rojo está dada de la siguiente manera:

“y” es el porcentaje de brillo; “x” es el valor del cambio de magnitud

Si  $4 \leq x \leq 2$  entonces  $25x=y$

Si  $x \geq 4$  entonces  $y=100$

Una vez coloreados, se identificaron los complejos moleculares y putativos módulos funcionales en los que estuvieran interactuando entre sí al menos dos proteínas de los genes de la lista. También se identificaron pequeñas moléculas y porciones de RNA que interactúan con al menos dos proteínas de los genes de la lista. Los complejos moleculares y los putativos módulos funcionales encontrados fueron entonces relacionados a la inflamación inducida por la infección por *M. tuberculosis*.

Finalmente el modelo de red propuesto que contiene a los módulos, complejos y proteínas interactuantes fue ordenado espacialmente con el acomodo “organic” proporcionado por yFiles y ejecutado en Cytoscape.

# Resultados

---

- **El agrupamiento jerárquico de los microarreglos, mostró que los cambios en la expresión genética están en función de la condición experimental y en función del día 1 ó 21 de la infección.**

Dentro del agrupamiento jerárquico realizado por Cluster, los microarreglos fueron posicionados en dos grandes conjuntos: el primero corresponde a la infección por la cepa silvestre H37Rv y el segundo por la cepa mutante H37Rv  $\Delta$ sigH. Estas dos ramas principales del dendrograma fueron divididas a su vez en dos, correspondiendo a los días 1 y 21 de la infección. *Ver figura R1.*

- **Se identificó una porción del transcriptoma relacionada específicamente a la inflamación inducida por la infección por *M. tuberculosis*.**

El nodo 916X, generado por cluster a partir del agrupamiento jerárquico realizado a los 1000 genes de mayor significancia en el análisis multiclase, comprende un conjunto de 229 genes que se encuentran sobre-expresados distintivamente al día 21 de la infección por la cepa silvestre H37Rv; dicha condición, al día 21, está específicamente relacionada con la inflamación inducida por la infección por *M. tuberculosis* de acuerdo a nuestro modelo experimental. La visualización generada por treeView de la porción del transcriptoma contenida en el nodo 916 y su localización dentro del agrupamiento se muestra en la figura R2.

- **Se identificaron 134 genes del nodo a la inflamación inducida por la infección por *M. tuberculosis*.**

Todos estos genes presentaron un cambio de magnitud mayor a 2 al día 21, entre la expresión de los pulmones de ratón infectados por la cepa silvestre H37Rv

con respecto a la expresión de los infectados con la cepa mutante H37Rv  $\Delta$ sigH; una tasa de falso descubrimiento porcentual (q-value%) menor a 0.1%, y altos valores de significancia (score (d)) en su expresión diferencial. Tabla R1.

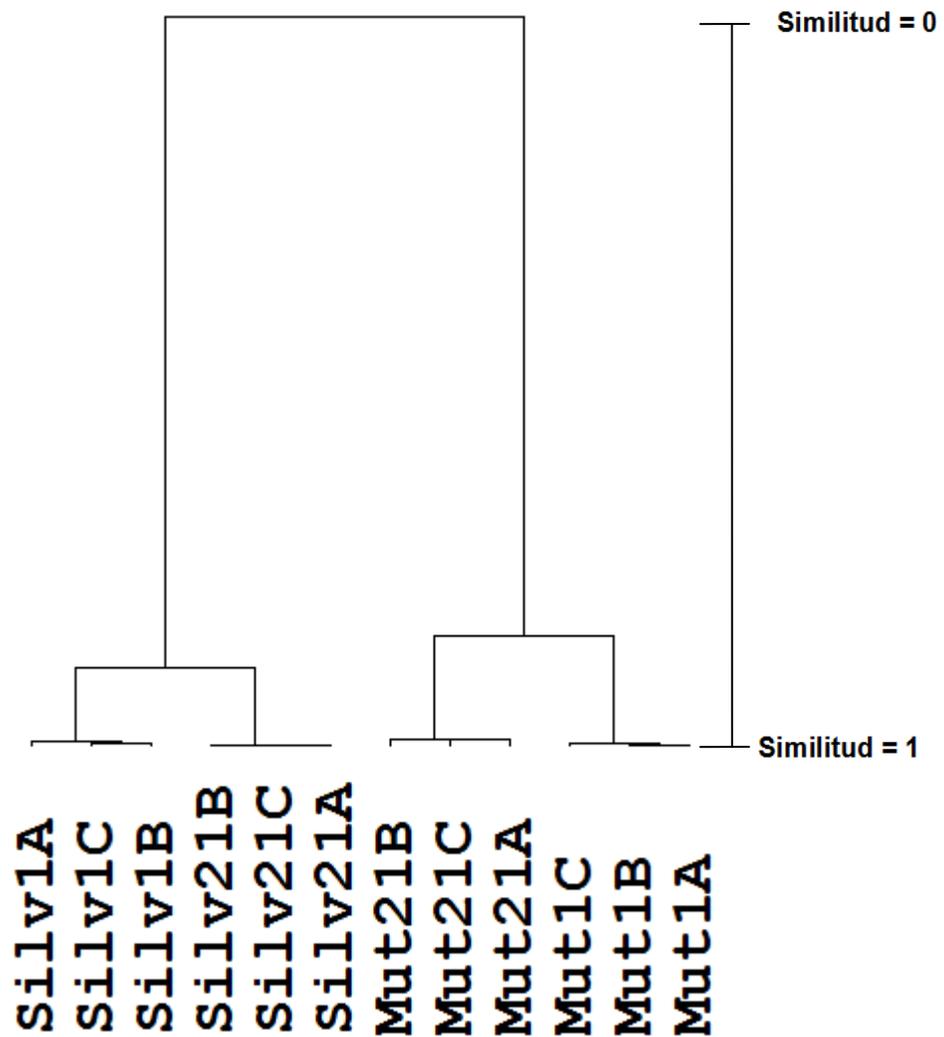
- **Se encontró que las categorías de la ontología del gen (Gene Ontology Consortium) conceptualmente más relevantes y significativamente sobre-representadas en la lista de los 134 genes son, por el lado de componentes celulares: el lado externo de la membrana plasmática y la sinapsis inmunológica; y por el lado de procesos biológicos: la regulación de la activación de las células T alfa-beta, la regulación positiva de los procesos biosintéticos de citocinas, la regulación positiva de la proliferación de las células T, la inducción de apoptosis, la coestimulación de las células T, la diferenciación de las células T, y la regulación positiva de señales mediadas por calcio.**

El resumen de las pruebas estadísticas realizadas se muestra en la tabla R2. La visualización generada por BINGO de las categorías sobre-representadas se muestra en las figura R3, las cuales corresponden a los principios organizativos de función molecular, componente celular y proceso biológico. Una explicación más detallada de las pruebas estadísticas se puede consultar en el capítulo de metodología.

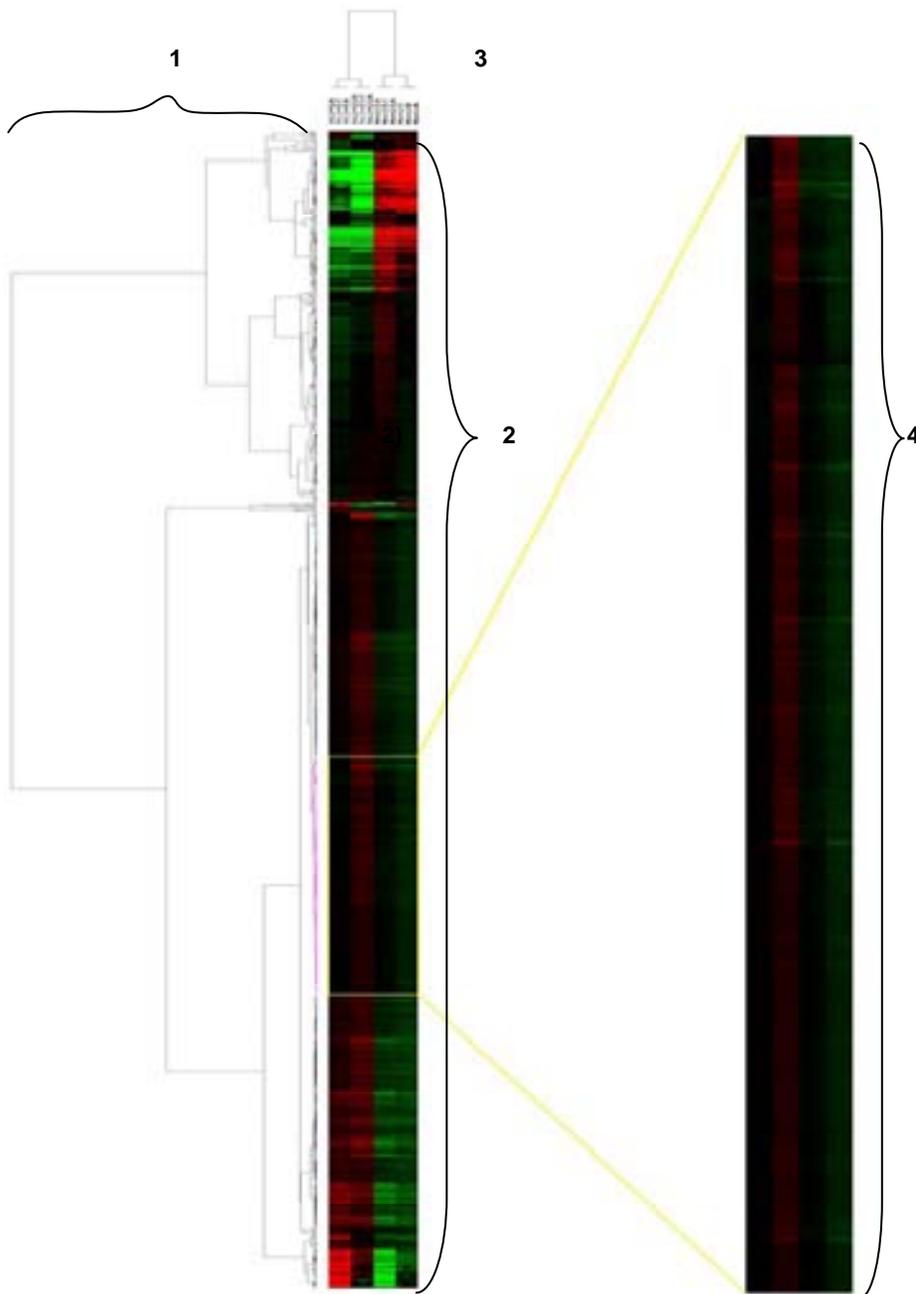
- **El modelo de red de interacciones moleculares construido en Cytoscape a partir de las proteínas homologas a los genes de la lista, identifica putativos módulos funcionales y complejos moleculares específicamente relacionados a la inflamación inducida por *M. tuberculosis*.**

La visualización gráfica del modelo y su descripción se muestra en la figura R4.

- **Un motivo de tres nodos que forman parte de un putativo modulo funcional interacciona físicamente con el fármaco dasatinib de acuerdo al modelo de red construido en Cytoscape.**



**Figura 1. Dendrograma mostrando el agrupamiento jerárquico de los microarreglos.** En el dendrograma, los microarreglos son agrupados, de acuerdo a su similitud, en nuevos nodos que promedian la expresión de los microarreglos que los constituyen. Estos nuevos nodos son agrupados a su vez y así sucesivamente hasta que un nodo final, constituido por todos los microarreglos, queda. La altitud de las ramas del dendrograma es una función de la similitud entre los nodos y microarreglos. Los símbolos de los nodos hacen referencia a la cepa de *M. tuberculosis* de la infección que es la que determina la condición experimental y al día de la infección, Las letras A, B ó C se refieren a los triplicados de cada combinación de condición experimental y día.



**Figura 2. Visualización del nodo 916X y su localización dentro del agrupamiento jerárquico de los genes seleccionados.** 1: Dendrograma que representa el agrupamiento jerárquico realizado por el programa Cluster a los 1000 genes seleccionados. 2: Visualización en TreeView de la expresión de estos mismos genes. 3: dendrograma que muestra como los microarreglos están agrupados de acuerdo a las condiciones experimentales. 4: Ampliación del nodo 916X el cual se localiza dentro del agrupamiento de genes. En la visualización de TreeView las columnas muestran la expresión diferencial de los microarreglos y las series representan la expresión diferencial de los genes. TreeView representa a la expresión diferencial de los genes con un gradiente de color que parte del color negro y llega a los colores rojo o verde brillantes de acuerdo a si se presenta sobreexpresión o subexpresión respectivamente. Se puede observar que la expresión de los microarreglos es agrupada dentro de cuatro columnas bien diferenciadas a la vista, correspondiente a las condiciones experimentales a los días 1y 21. La segunda de estas columnas corresponde a la infección por cepa silvestre al día 21. Esta es la condición experimental relacionada a la inflamación inducida *M. tuberculosis* de acuerdo al modelo. Se puede apreciar en 4 que la segunda columna es la única sobre-expresada.

**Tabla 1. Lista de genes asociados a la inflamación inducida por la infección por *M. tuberculosis*.**

Simbol del gen	Nombre del gen	Cambio de magnitud	Estadística (d)	Valor-q(%)
MYH13	MYOSIN, HEAVY POLYPEPTIDE 13, SKELETAL MUSCLE	124.474417	64.1894728	0
TNNC2	TROPONIN C2, FAST	113.483418	40.7315989	0
SLC28A2	SOLUTE CARRIER FAMILY 28 (SODIUM-COUPLED NUCLEOSIDE TRANSPORTER), MEMB...	29.6456839	20.7736529	0.03012936
SEMA4D	SEMA DOMAIN, IMMUNOGLOBULIN DOMAIN (IG), TRANSMEMBRANE DOMAIN (TM) AND...	20.9832836	21.7193716	0.03012936
ART2A	ADP-RIBOSYLTRANSFERASE 2A	17.2620081	22.939103	0.03012936
MYLPF	MYOSIN LIGHT CHAIN, PHOSPHORYLATABE, FAST SKELETAL MUSCLE	16.4671982	21.1662386	0.03012936
ICOS	INDUCIBLE T-CELL CO-STIMULATOR	15.1148915	40.6273997	0
KLRC1(2)	KILLER CELL LECTIN-LIKE RECEPTOR SUBFAMILY C, MEMBER 1	11.3516382	40.8029522	0
IL10RA	INTERLEUKIN 10 RECEPTOR, ALPHA	10.4217218	16.8839902	0.03012936
LAIR1	LEUKOCYTE-ASSOCIATED IG-LIKE RECEPTOR 1	10.2671123	51.0447389	0
A530032D15RIK	RIKEN CDNA A530032D15RIK GENE	8.97340814	20.5428223	0.03012936
CD86	CD86 ANTIGEN	8.90766189	18.5477021	0.03012936
IGSF6	IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY, MEMBER 6	8.64614438	30.4733202	0
CD8A	CD8 ANTIGEN, ALPHA CHAIN	8.30161452	26.1838703	0
CDCA8	CELL DIVISION CYCLE ASSOCIATED 8	7.99863365	34.6737763	0
SLFN1	SCHLAFEN 1	7.63271945	22.250706	0.03012936
H2-D1	HISTOCOMPATIBILITY 2, D REGION LOCUS 1	7.52087339	33.3882452	0
ITGAL	INTEGRIN ALPHA L	7.40235535	23.2579184	0.03012936
KLRB1B	KILLER CELL LECTIN-LIKE RECEPTOR SUBFAMILY B MEMBER 1B	7.25783177	24.6226169	0

IL2RB	INTERLEUKIN 2 RECEPTOR, BETA CHAIN	7.25159579	25.8591251	0
EPSTI1	RIKEN CDNA 5033415K03 GENE	7.1325394	28.8914116	0
PIGT	PHOSPHATIDYLINOSITOL GLYCAN, CLASS T	6.92163784	19.9870537	0.03012936
CENPF	RIKEN CDNA 6530404A22 GENE	6.657424	24.9683558	0
Cyth4	PLECKSTRIN HOMOLOGY, SEC7 AND COILED/COIL DOMAINS 4	6.64647499	19.9779177	0.03012936
GPNMB	GLYCOPROTEIN (TRANSMEMBRANE) NMB	5.84390694	23.3860845	0
TCRA	T-CELL RECEPTOR ALPHA CHAIN	5.79545676	33.634873	0
F10	COAGULATION FACTOR X	5.67061393	24.9811335	0
ARHGAP9	RHO GTPASE ACTIVATING PROTEIN 9	5.46479516	37.257352	0
H2-OB	HISTOCOMPATIBILITY 2, O REGION BETA LOCUS	5.43166579	17.7300347	0.03012936
SPN	SIALOPHORIN	5.3923324	18.6463473	0.03012936
TLR3	TOLL-LIKE RECEPTOR 3	5.33936164	15.5797798	0.03012936
GPR171	G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 171	5.26791414	32.1201651	0
SH3BP2	SH3-DOMAIN BINDING PROTEIN 2	5.20757773	44.0770274	0
CIITA	CLASS II TRANSACTIVATOR	5.12394353	28.5268177	0
RASSF4	RIKEN CDNA 3830411C14 GENE	5.01582436	25.6198383	0
PSTPIP1	PROLINE-SERINE-THREONINE PHOSPHATASE-INTERACTING PROTEIN 1	4.9541252	21.7400562	0.03012936
SEMA4A	SEMA DOMAIN, IMMUNOGLOBULIN DOMAIN (IG), TRANSMEMBRANE DOMAIN (TM) AND...	4.74461744	17.7906997	0.03012936
MARCH1	MEMBRANE-ASSOCIATED RING FINGER (C3HC4) 1	4.62660264	21.459808	0.03012936
GUSB	BETA-GLUCURONIDASE STRUCTURAL	4.53556656	17.7731349	0.03012936
TMEM173	RIKEN CDNA 2610307O08 GENE	4.47500798	21.848987	0.03012936
KYNU	KYNURENINASE (L-KYNURENINE HYDROLASE)	4.38984325	24.5379708	0
COTL1	RIKEN CDNA 2010004C08 GENE	4.37441675	27.1192019	0
TAPBPL	TAP BINDING PROTEIN-LIKE	4.1340812	35.7229812	0
FIGNL1	FIDGETIN-LIKE 1	4.11220408	21.6157004	0.03012936
PLEC1	PLECTIN 1	3.97377288	38.4374947	0
TM6SF1	TRANSMEMBRANE 6 SUPERFAMILY MEMBER 1	3.97272784	17.3918717	0.03012936

ADAM17	A DISINTEGRIN AND METALLOPEPTIDASE DOMAIN 17	3.89665915	16.6734449	0.03012936
CDKN2D	CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 2D (P19, INHIBITS CDK4)	3.83616161	17.1601589	0.03012936
HERC5	HECT DOMAIN AND RLD 5	3.83347867	16.563903	0.03012936
BAK1	BCL2-ANTAGONIST/KILLER 1	3.76953528	28.8633369	0
TMED9	TRANSMEMBRANE EMP24 PROTEIN TRANSPORT DOMAIN CONTAINING 9	3.69317536	27.4844285	0
STAT2	SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 2	3.6280949	21.4046235	0.03012936
RUNX2	RUNT RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 2	3.58295208	70.1211794	0
1700029I01RIK	RIKEN CDNA 1700029I01 GENE	3.47082647	23.131126	0.03012936
ATOX1	ATX1 (ANTIOXIDANT PROTEIN 1) HOMOLOG 1 (YEAST)	3.458755	32.4670074	0
LIPA	LYSOSOMAL ACID LIPASE 1	3.42952948	35.7905722	0
CD22	CD22 ANTIGEN	3.40878466	21.0000137	0.03012936
TMEM37	TRANSMEMBRANE PROTEIN 37	3.39026554	20.7563478	0.03012936
TRIM21	TRIPARTITE MOTIF PROTEIN 21	3.38542147	16.5611148	0.03012936
GIMAP1	GTPASE, IMAP FAMILY MEMBER 1	3.38296621	19.6427825	0.03012936
TDG	THYMINE DNA GLYCOSYLASE	3.37898766	20.1776331	0.03012936
BC067047	CDNA SEQUENCE BC067047	3.36821541	24.4676429	0
CD5	CD5 ANTIGEN	3.24393768	20.1106548	0.03012936
PTPRJ	PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE, RECEPTOR TYPE, J	3.22742844	18.9915519	0.03012936
SIN3B	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, SIN3B (YEAST)	3.20618854	27.746588	0
APOBEC1	APOLIPOPROTEIN B EDITING COMPLEX 1	3.18851876	22.413989	0.03012936
MANBA	RIKEN CDNA 2410030O07 GENE	3.09679711	16.2188889	0.03012936
OGFR	OPIOID GROWTH FACTOR RECEPTOR	3.09426516	17.2053656	0.03012936
BTLA	B AND T LYMPHOCYTE ASSOCIATED	3.05855817	29.5001387	0
6330578E17RIK	RIKEN CDNA 6330578E17 GENE	3.03626894	37.3351047	0
UHRF1	UBIQUITIN-LIKE, CONTAINING PHD AND RING FINGER DOMAINS, 1	3.02662791	22.2300543	0.03012936

U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1	3.02463281	31.9769062	0
MCM5	MINICHROMOSOME MAINTENANCE DEFICIENT 5, CELL DIVISION CYCLE 46 (S. CER...	3.00410964	15.4721702	0.03012936
PLXNC1	PLEXIN C1	2.99612183	24.5527785	0
CYLD	CYLINDROMATOSIS (TURBAN TUMOR SYNDROME)	2.92920048	15.0055134	0.05179505
MMP19	MATRIX METALLOPEPTIDASE 19	2.92053063	16.3827293	0.03012936
ZFP313	ZINC FINGER PROTEIN 313	2.91367725	25.1499947	0
KATNA1	KATANIN P60 (ATPASE-CONTAINING) SUBUNIT A1	2.91062062	23.8150619	0
RNF6	RING FINGER PROTEIN (C3H2C3 TYPE) 6	2.907025	23.1805547	0.03012936
ADA	ADENOSINE DEAMINASE	2.89547974	20.6650627	0.03012936
PLAGL2	PLEIOMORPHIC ADENOMA GENE-LIKE 2	2.88892042	17.8662395	0.03012936
RRAGA	RAS-RELATED GTP BINDING A	2.88012891	19.7624208	0.03012936
RASSF5	RAS ASSOCIATION (RALGDS/AF-6) DOMAIN FAMILY 5	2.87355631	19.8331549	0.03012936
CTSC	CATHEPSIN C	2.81133015	31.8665745	0
SYK	SPLEEN TYROSINE KINASE	2.79712145	22.6919764	0.03012936
CDC20	RIKEN CDNA 2310042N09 GENE	2.66044996	47.4155908	0
ARPC1B	ACTIN RELATED PROTEIN 2/3 COMPLEX, SUBUNIT 1B	2.66033925	29.1342952	0
GNB4	GUANINE NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN, BETA 4	2.63242133	22.2396255	0.03012936
OBFC2A	RIKEN CDNA 5830411E10 GENE	2.63185561	30.725065	0
SELL	SELECTIN, LYMPHOCYTE	2.63118077	20.9666767	0.03012936
CYR61	CYSTEINE RICH PROTEIN 61	2.619375	17.472265	0.03012936
TOR3A	TORSIN FAMILY 3, MEMBER A	2.59553616	19.7624208	0.03012936
GIMAP9	GTPASE, IMAP FAMILY MEMBER 9	2.54566189	27.4053925	0
TMEM66	TRANSMEMBRANE PROTEIN 66	2.5389297	32.9117153	0
SERPINA10	SERINE (OR CYSTEINE) PEPTIDASE INHIBITOR, CLADE A (ALPHA-1 ANTIPROTEIN...	2.53184604	22.7300514	0.03012936
DDX39	DEAD (ASP-GLU-ALA-ASP) BOX POLYPEPTIDE 39	2.52945375	21.3318462	0.03012936
RFX5	REGULATORY FACTOR X, 5 (INFLUENCES HLA CLASS II EXPRESSION)	2.51748663	35.9971924	0

PTPN1	PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE, NON-RECEPTOR TYPE 1	2.51005554	31.1942322	0
TBCA	TUBULIN COFACTOR A	2.49851932	58.7156582	0
MBD2	METHYL-CPG BINDING DOMAIN PROTEIN 2	2.48686736	39.8309552	0
YIPF1	YIP1 DOMAIN FAMILY, MEMBER 1	2.48311171	18.3529718	0.03012936
GPD2	GLYCEROL PHOSPHATE DEHYDROGENASE 2, MITOCHONDRIAL	2.44745661	26.0277261	0
HNRNPA1	HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN A1	2.41173795	63.1103827	0
LSM4	LSM4 HOMOLOG, U6 SMALL NUCLEAR RNA ASSOCIATED (S. CEREVISIAE)	2.38281329	19.6024254	0.03012936
NUBP1	NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN 1	2.37911098	18.8977731	0.03012936
NCL	NUCLEOLIN	2.37785638	24.9578752	0
TMEM51	TRANSMEMBRANE PROTEIN 51	2.37599516	19.9140101	0.03012936
INPPL1	INOSITOL POLYPHOSPHATE PHOSPHATASE-LIKE 1	2.36026781	20.046341	0.03012936
PMAIP1	PHORBOL-12-MYRISTATE-13- ACETATE-INDUCED PROTEIN 1	2.35497832	19.8760748	0.03012936
TM2D2	TM2 DOMAIN CONTAINING 2	2.33075133	21.8265892	0.03012936
TUBB5	TUBULIN, BETA 5	2.32554017	15.7368597	0.03012936
YWHAZ	TYROSINE 3- MONOOXYGENASE/TRYPHOPHAN 5-MONOOXYGENASE ACTIVATION PROTEIN...	2.32449412	28.1887354	0
RBPJ	RECOMBINING BINDING PROTEIN SUPPRESSOR OF HAIRLESS (DROSOPHILA)	2.3090239	15.391701	0.05179505
TNFAIP8	TUMOR NECROSIS FACTOR, ALPHA-INDUCED PROTEIN 8	2.29504436	34.8658101	0
FLOT2	FLOTILLIN 2	2.25892262	32.8591063	0
2510049I19RIK	RIKEN CDNA 2510049I19 GENE	2.24711202	39.1960937	0
MS4A1	MEMBRANE-SPANNING 4- DOMAINS, SUBFAMILY A, MEMBER 1	2.23955508	18.9726635	0.03012936
BCL10	B-CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA 10	2.23945766	22.1393816	0.03012936
PRDM1	PR DOMAIN CONTAINING 1, WITH ZNF DOMAIN	2.22520864	15.4324231	0.05179505

MTAP4	MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 4	2.19550233	17.6526371	0.03012936
DNAJC5	DNAJ (HSP40) HOMOLOG, SUBFAMILY C, MEMBER 5	2.18267798	15.294006	0.05179505
DAZAP1	DAZ ASSOCIATED PROTEIN 1	2.16823065	18.2335942	0.03012936
FBXL20	F-BOX AND LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN 20	2.16230871	19.0223661	0.03012936
TMEM183A	RIKEN CDNA 1300007B12 GENE	2.15513546	41.1069122	0
VRK1	VACCINIA RELATED KINASE 1	2.14115017	21.2029856	0.03012936
PDDC1	PARKINSON DISEASE 7 DOMAIN CONTAINING 1	2.130946	22.0807082	0.03012936
KPNB1	KARYOPHERIN (IMPORTIN) BETA 1	2.12344032	23.7413434	0
LMO2	LIM DOMAIN ONLY 2	2.08675473	43.7999978	0
MAPK14	MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 14	2.07761377	33.0663604	0
SCPEP1	SERINE CARBOXYPEPTIDASE 1	2.04793481	15.4999071	0.03012936
GTPBP2	GTP BINDING PROTEIN 2	2.04550873	14.9480789	0.05179505
MYLIP	MYOSIN REGULATORY LIGHT CHAIN INTERACTING PROTEIN	2.03399798	16.6493669	0.03012936
ALOX5AP	ARACHIDONATE 5-LIPOXYGENASE ACTIVATING PROTEIN	2.02385765	21.5185607	0.03012936
1200015F23RIK	RIKEN CDNA 1200015F23 GENE	2.02191914	23.031794	0.03012936

## Tabla 2 Resumen del las pruebas estadísticas realizadas por BINGO a la lista de los 134 genes.

### ONTOLOGÍA: COMPONENTE CELULAR

Archivo de ontología seleccionado: .../GO\_Cellular\_Component

Archivo de anotación seleccionado: .../M\_musculus\_default

Sobre-representación

Prueba estadística seleccionada : Prueba Hipergeométrica

Corrección seleccionada: Benjamini & Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction

Nivel seleccionada de significancia: 0.05

Opción de prueba: Prueba de agrupamiento contra toda anotación

Valor-p	Valor-p corr	X	nX	Descripción	Conjunto de genes en la prueba
2.63E-12	3.95E-10	14	142	Lado externo de la membrana plasmática	ITGAL IL2RB CD8A SELL H2-D1 TCRA BTLA CD86 ICOS MS4A1 CD22 CD5 SPN KLRC1
1.92E-05	9.62E-04	4	22	Sinapsis inmunológica	ITGAL BCL10 TCRA SYK

### ONTOLOGÍA: FUNCIÓN MOLECULAR

Archivo de ontología seleccionado : .../GO\_Molecular\_Function

Archivo de anotación seleccionado: .../M\_musculus\_default

Sobre-representación

Prueba estadística seleccionada : Prueba Hipergeométrica

Corrección seleccionada: Benjamini & Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction

Nivel seleccionada de significancia: 0.05

Opción de prueba: Prueba de agrupamiento contra toda anotación

Valor-p	Valor-p corr	x	nX	Descripción	Conjunto de genes en la prueba
5.35E-05	1.26E-02	55	50 37	Unión a proteína	BC067047 LMO2 CD8A H2-D1 TLR3 MYLIP PMAIP1 PLEC1 SIN3B CDKN2D DNAJC5 KPNB1 SPN SYK CYR61 CIITA BCL10 F10 FBXL20 INPPL1 FLOT2 HERC5 NCL ARPC1B

| UHRF1|TBCA|SEMA4D|ITGAL|  
 YWHAZ|RRAGA|ZFP313|CYLD|  
 KATNA1|ICOS|PSTPIP1|CD22|  
 GPNMB|RUNX2|CD5|IL2RB|SELL|  
 CDC20|COTL1|TMED9|TRIM21|  
 STAT2|MARCH1|BTLA|RASSF4|  
 RASSF5|RNF6|MAPK14|TDG|  
 RBPJ|SH3BP2

## ONTOLOGÍA: PROCESOS BIOLÓGICOS

Archivo de ontología seleccionado: .../GO\_Biological\_Process

Archivo de anotación seleccionado: .../M\_musculus\_default

Overrepresentation

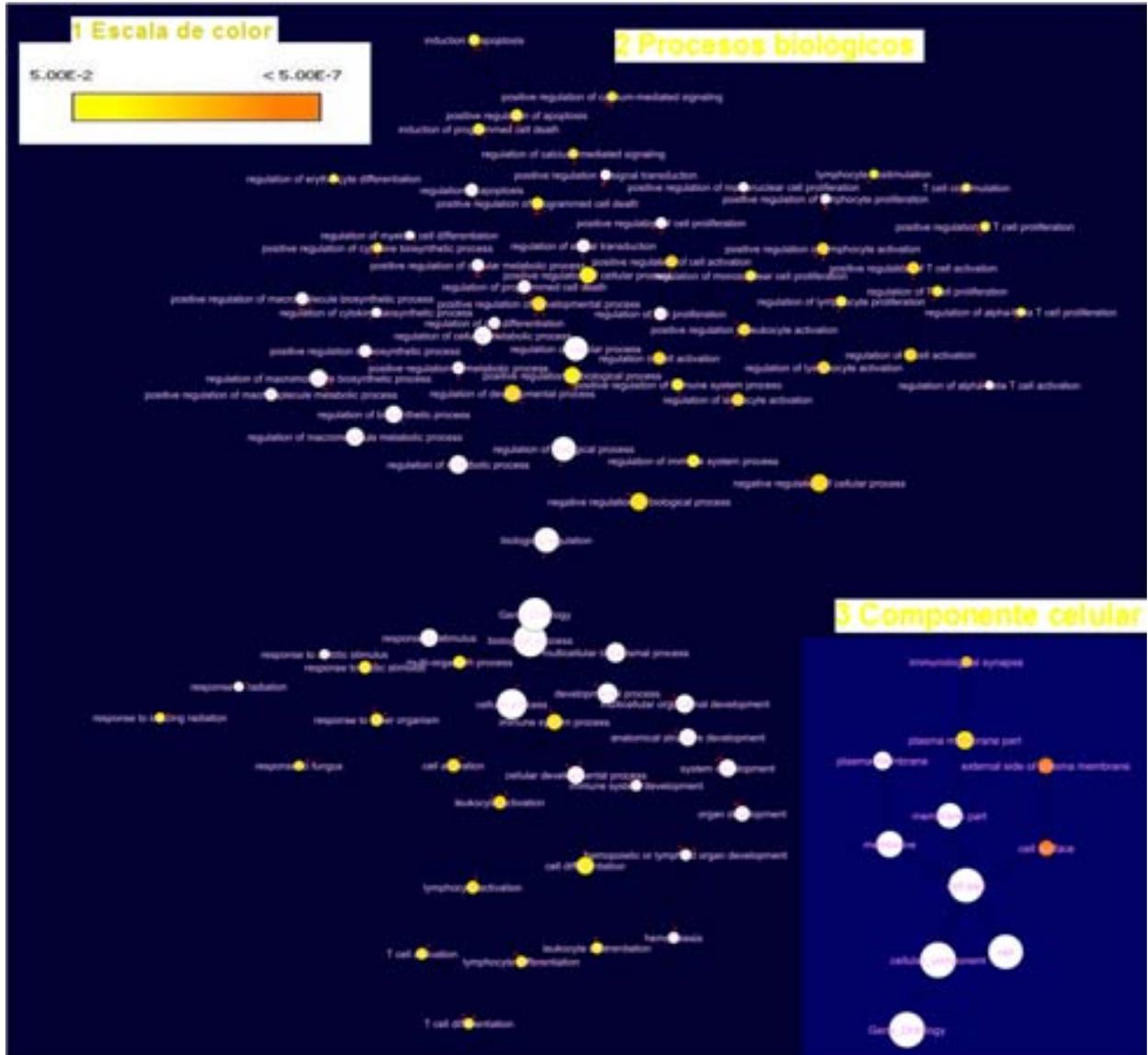
Selected statistical test : Hypergeometric test

Selected correction : Benjamini & Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction

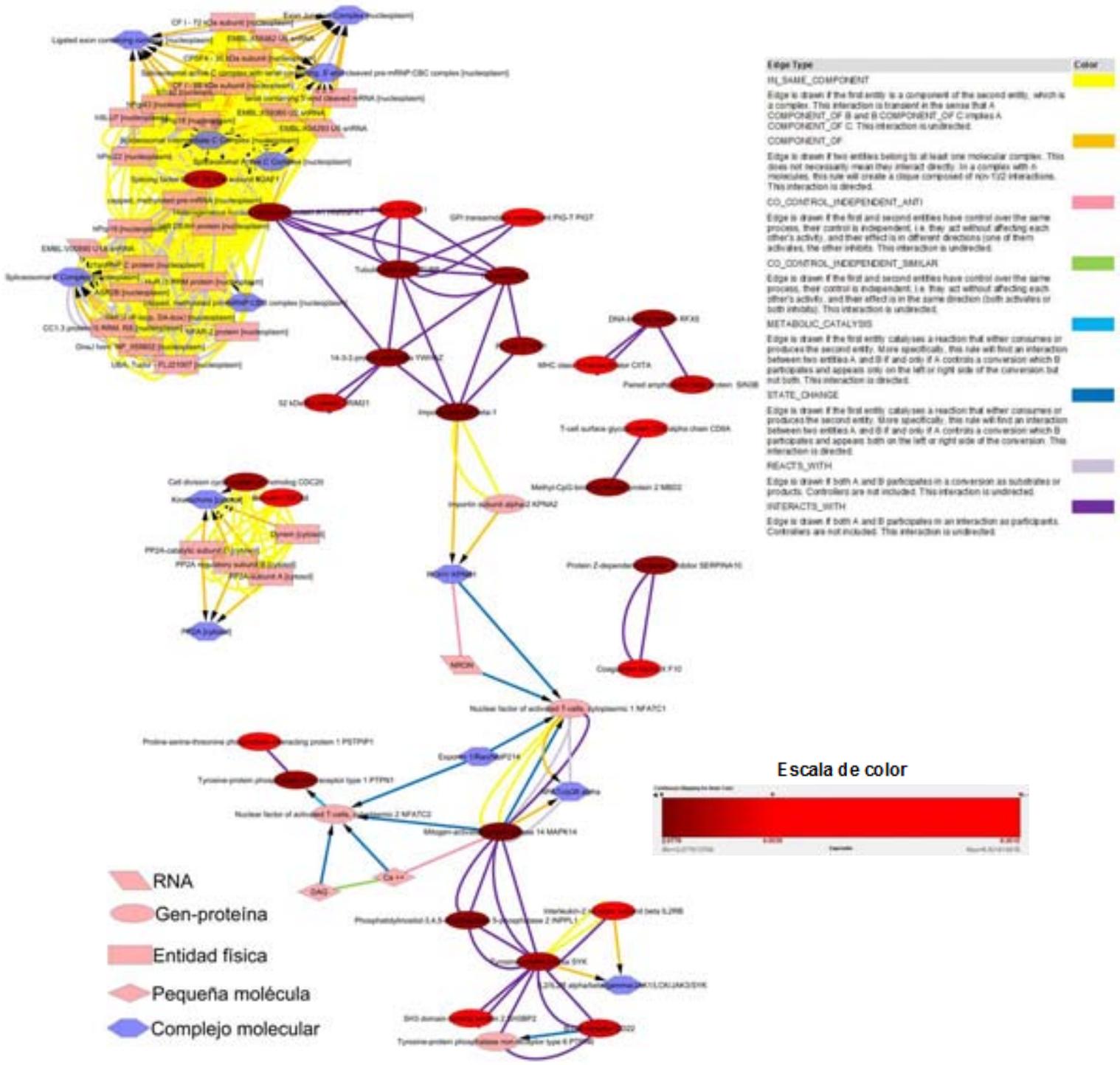
Selected significance level : 0.05

Valor-p	Valor-p corr	x	nX	Descripción	Conjunto de genes en la prueba
8.17E-05	4.57E-03	19	1020	Regulación negativa de procesos biológicos	CIITA BCL10 IL2RB LMO2 RFX5 MTAP4 PMAIP1 MBD2 SLFN1 ADA BTLA RASSF4 RASSF5 SIN3B RNF6 CDKN2D RBPJ RUNX2 SPN
9.28E-05	4.57E-03	3	13	Regulación positiva de señales mediadas por calcio	ITGAL CD8A SYK
9.28E-05	4.57E-03	3	13	Respuesta a fungus	BCL10 BAK1 COTL1
6.05E-04	2.07E-02	4	55	Diferenciación de la célula T	CD8A TCRA SPN SYK
9.84E-04	2.73E-02	3	28	Respuesta a radiación ionizante	BAK1 APOBEC1 PMAIP1
1.34E-03	3.14E-02	2	8	Coestimulación de la célula T	CD5 SPN
1.59E-03	3.46E-02	5	120	Inducción de apoptosis	BCL10 PMAIP1 CD5 SPN PLAGL2
1.60E-03	3.46E-02	3	33	Regulación positiva de la proliferación de la célula T	ITGAL SPN SYK
1.72E-03	3.63E-02	2	9	Regulación de la diferenciación de eritrocito	LMO2 MAPK14
1.90E-03	3.91E-02	3	35	Regulación positiva del proceso biosintético de citocinas	TLR3 SPN SYK
2.14E-03	4.32E-02	2	10	Regulación de la proliferación de las células T alfa-beta	BTLA SYK

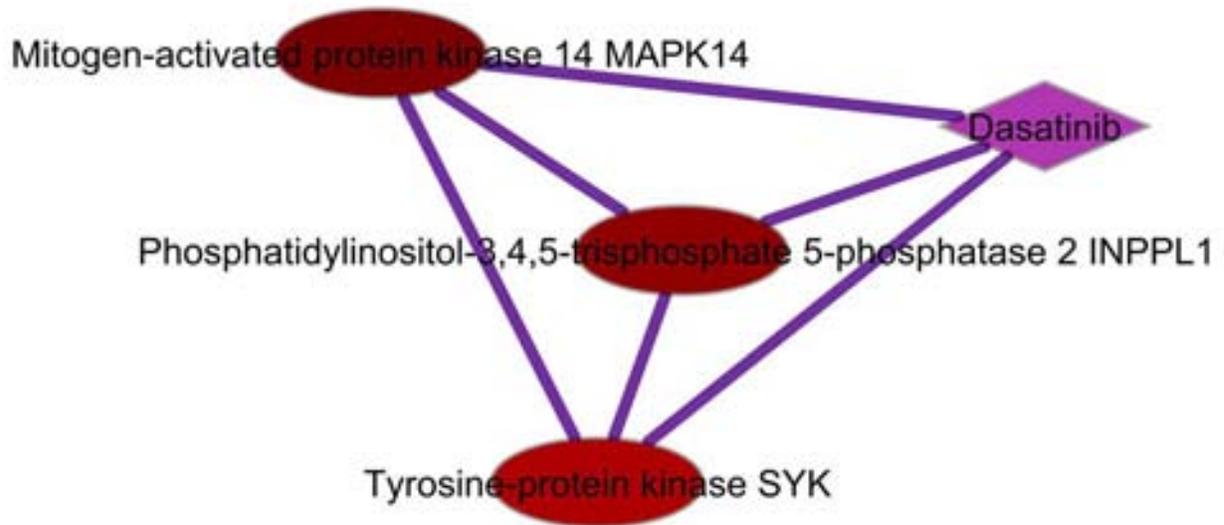
**Figura 3. Visualización generada por BINGO de la organización jerárquica de las categorías de la ontología del gen que resultaron significativas tanto en componente celular como en proceso biológico.** Se muestra dos graficas correspondientes a las ontologías proceso biológico (2) y componente celular (3) y. Los nodos representan las categorías de la ontología del gen colocadas en un orden jerárquico. Los nodos troncales corresponden a las categorías más generales, y conforme los nodos se tornan en posiciones más distales las categorías son más particulares o específicas. Los nodos de color blanco no son suficientemente significativos, es decir, están fuera del umbral de significancia, que es de 0.05. Los nodos con color son por el contrario significativos. El color de los nodos está dado por una escala (1) que va del amarillo claro al naranja la cual está en función del valor-p corregido. El tamaño de los nodos está en función del número de genes de la lista que están en cada categoría. Las flechas de los bordes que conectan los nodos indican la dirección de la jerarquía de las categorías y va de las categorías generales a particulares.



**Figura 4. Complejos moleculares y putativos módulos funcionales relacionados directamente a la inflamación inducida por *M. tuberculosis*.** En este modelo se muestra representados por nodos a los genes-proteínas de la lista que interactúan entre sí y con otras moléculas no proteicas y/o con complejos moleculares. Un conjunto de genes-proteínas sobreexpresados interactuando entre sí podría sugerir un putativo módulo funcional. Los complejos moleculares y los putativos módulos funcionales representados en esta gráfica están específicamente relacionados a la inflamación inducida por *M. tuberculosis* de acuerdo al modelo experimental



**Figura R5. Motivo del putativo modulo funcional interactuando con dasatinib.** En la figura se muestra que las proteínas MAPK14, INPPL1 y SYK interactúan entre sí y con el fármaco dasatinib. La interacción es física y está no indica si es posible o no que el fármaco altere la función molecular de estas enzimas y en qué sentido.



# Discusión y análisis de resultados.

---

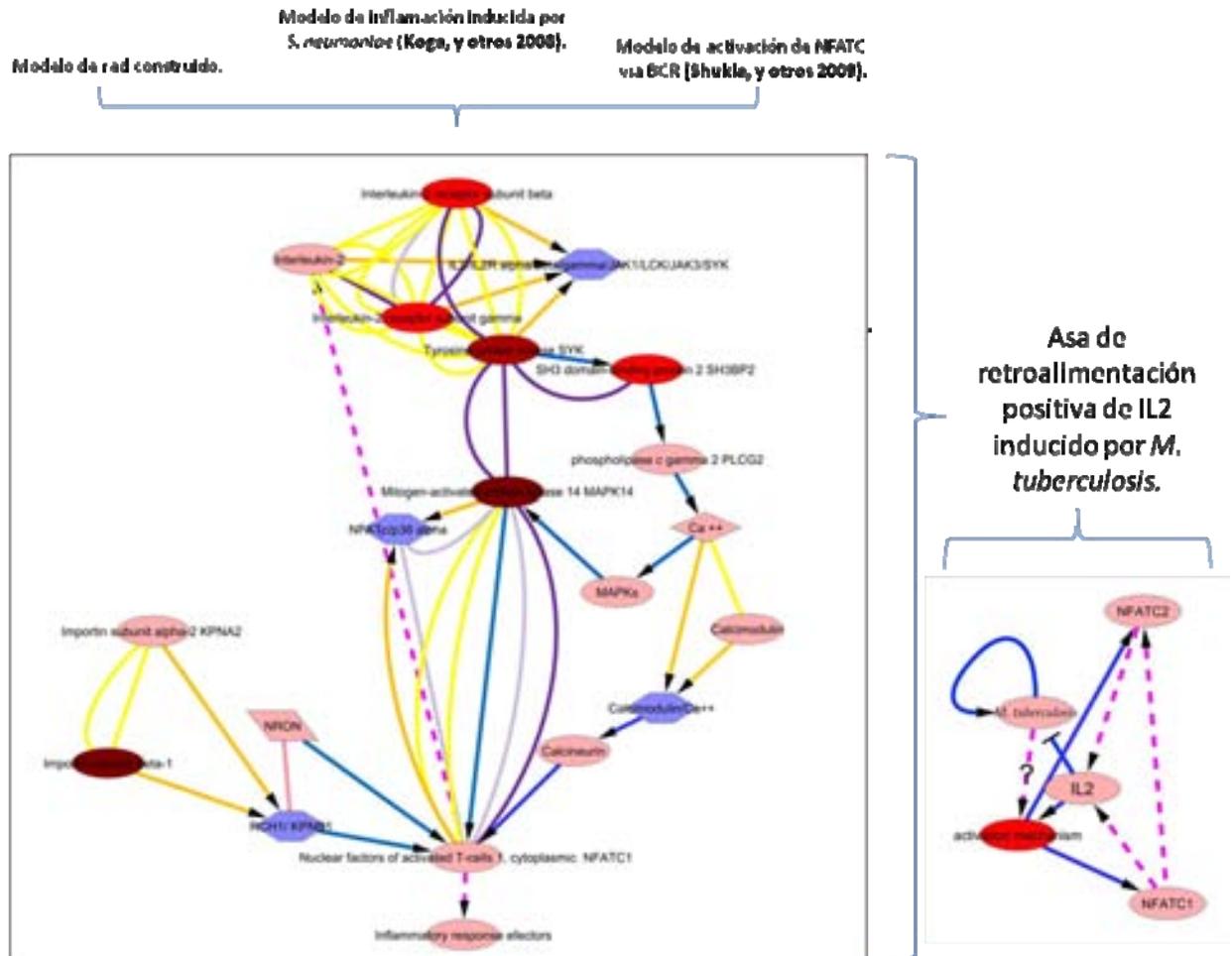
De acuerdo a nuestros resultados, un asa de retroalimentación positiva de IL2 podría ser inducida al día 21 de la infección por la cepa silvestre de *M. tuberculosis*. Esta asa empieza en el complejo proteico que constituye al ILR2 y culmina con los mecanismos que llevan a la translocación y activación de los NFACTs, los cuales a su vez inducen a la expresión de IL2 (Figura 6). Nosotros consideramos que la inducción de dicha asa podría constituir un mecanismo central por el cual la infección por *M. tuberculosis* provoca inflamación. Siendo esto último la hipótesis a comprobar generada en el presente trabajo.

La construcción de esta hipótesis consiste de los siguientes pasos:

1. El modelo de red construido a partir de los resultados de los experimentos de los microarreglos y de las bases de datos de interacciones moleculares que apunta a la activación de los NFATCs.
2. La integración de este modelo con el modelo de activación de los NFACT a partir de la unión BCR-antígeno (**Shukla, y otros 2009**), el mecanismo de inducción de inflamación por *S. pneumoniae* vía NFATC (**Koga, y otros 2008**), el conocimiento sobre el papel de la interacción de las subunidades del ILR2 con la tirosina quinasa SYK (**Miyazaki y Taniguchi 1996**) y el papel de la importina en la regulación específica de la translocación de los NFATCs (**Willingham, y otros 2005**).
3. Identificación de NFATCs como factor de transcripción de IL2. Usando la base de datos **Gene Network Central**. Y su confirmación en la literatura.

4. En una segunda exploración a los resultados se encuentra sobreexpresada, además de la subunidad beta, la subunidad gama del ILR2 al día 21 de la infección.

Figura 6. Modelo de red que muestra el asa de retroalimentación positiva de IL2 que es inducido al día 21 de la infección por *M. tuberculosis*.



**Figura 6.** Muestra el modelo resultante del proceso de integración conceptual entre la red construida a partir de los microarreglos y la literatura que describe varios de los mecanismos representados en el modelo y que se encuentran sobreexpresados en la infección murina por cepa silvestre de *M. tuberculosis* al día 21. La descripción detallada de estos mecanismos y los modelos de referencia se encuentra en el capítulo de discusión. La simbología es en general la misma que utiliza el “Pathway Common Web Service” de Cytoscape. Las flechas amarillas simbolizan que el nodos origen, “source,” son proteínas constituyentes de complejos moleculares que están en la posición de objetivo, “target.” Las flechas azules simbolizan que el elemento representado por el nodo origen cataliza una reacción que afecta la concentración, estado o distribución espacial de la molécula objetivo. La flecha rosa punteada indica una relación entre un gen y un

factor de transcripción. Los bordes amarillos indican que dos elementos forman parte de un mismo complejo molecular, los bordes morados solo indica que en ensayos de hibridación los elementos se unen. Los Exagonos azules son complejos moleculares, los rombos RNAs, y los diamantes, pequeñas moléculas. El rojo refleja el grado de sobreexpresión de los genes observado en los experimentos de microarreglos al día 21 de la infección con la cepa silvestre.

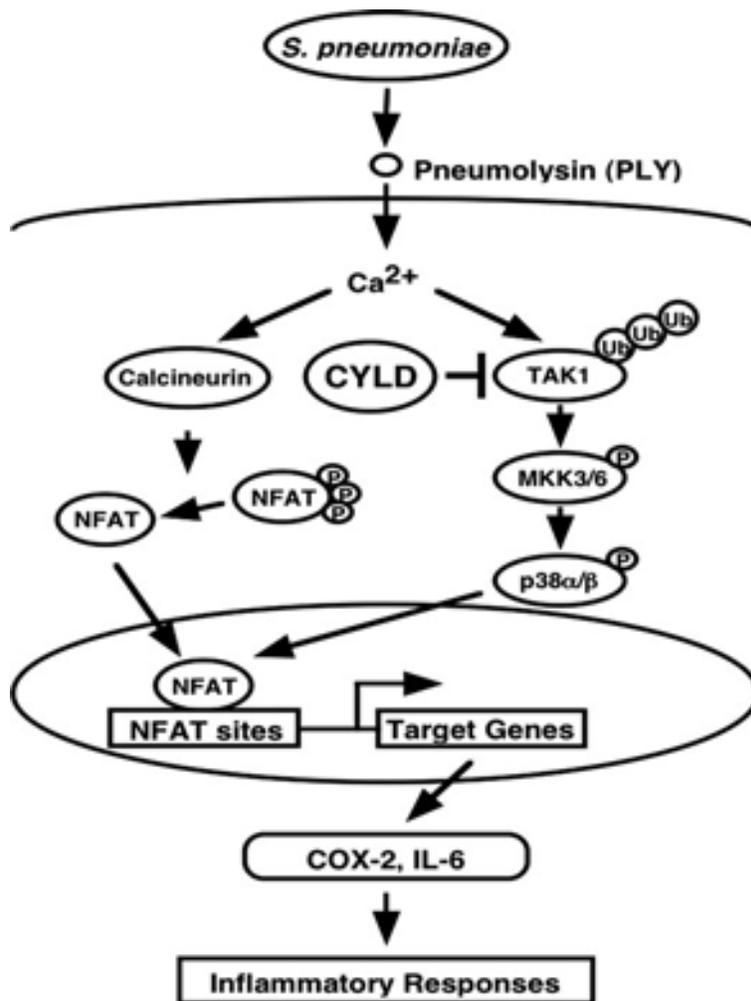
### **Descripción de los mecanismos sobreexpresados contenidos en el asa de retroalimentación positiva de IL2 e hipotesis generada a comprobar.**

Al día 21 del modelo murino de infección intratraqueal por *M. tuberculosis* se muestran ya diferencias en cuanto a los procesos inflamatorios en función de la cepa silvestre H37Rv o mutante H37Rv  $\Delta$ sigH (**datos del laboratorio del Dr. Rogelio Hernández Pando**). De acuerdo a nuestros resultados nosotros hipotetizamos que, a nivel molecular, la infección induce la unión de IL2 a su receptor, el cual está constituido por las subunidades alfa beta y gama, de las cuales resultaron sobreexpresadas al día 21 las subunidades beta y gama. El receptor, posteriormente a la unión a su ligando, recluta a la quinasa SYK sobreexpresada para transducir la señal (**Miyazaki y Taniguchi 1996**). SYK a su vez fosforila a la sobreexpresada proteína SH3BP2 para que través de la actividad de la fosfolipasa C lleve a una movilización del calcio hacia el citosol (**Shukla, y otros 2009**). La elevación del calcio citosolico provoca la translocación mediada por calcineurina del factor nuclear de la activación de las células T al núcleo (**Koga, y otros 2008**). Esta translocación es efectuada por la importina (**Willingham, y otros 2005**) la cual se presenta sobreexpresada al día 21. Por otra parte la movilización del calcio al citosol, dispara una vía señalizadora de las MAP quinasas que culmina en p38 o MAPK14 (Sobreexpresada también) la cual activa al NFATC previamente translocado al núcleo (**Koga, y otros 2008**) promoviendo así la transcripción de IL2 pero además de otras conocidas moléculas efectoras de la inflamación.

Esta serie de mecanismos que proponemos en nuestra hipótesis generada es fuertemente similar al modelo de inducción de inflamación por la infección por *S. pneumoniae* que se propone en **Koga, y otros 2008**, y que mostramos en la figura

7. Esto contribuye a proporcionarle verisimilitud a nuestra hipótesis en tanto que los mecanismos de este modelo son probados experimentalmente.

**Modelo propuesto de la inducción de la inflamación por *S. pneumoniae* (Koga, y otros 2008, *Figure 6*).**



**Figura 7.** *S. pneumoniae* a través de la molécula pneumolisina induce la presencia de calcio citosólico lo que produce la translocación al núcleo de NFATC mediada por calcineurina. Al tiempo que de una cascada de kinasa MAPK14 induce la actividad transcritora de NFATC.

Esta serie de eventos constituyen el asa de retroalimentación positiva de IL2 que creemos se encuentra inducida en una condición experimental que está asociada

a los procesos inflamatorios inducidos por la infección por *M. tuberculosis*, que derivan en la enfermedad tuberculosa, y que estos eventos constituyen los mecanismos centrales a nivel molecular e intracelular que son claves para entender cómo es que la inflamación es provocada por la infección y que la regulación de su funcionamiento podría marcar la diferencia entre una infección que no deriva en enfermedad y una que sí. Todos estos eventos moleculares que constituyen la columna vertebral de nuestra hipótesis son factibles de confirmar experimentalmente en una secuencia de que incluyen los siguientes pasos que deben ocurrir al día 21 de la infección con la cepa silvestre de *M. tuberculosis*.

1. Corroborar la formación del complejo IL2/IL2R/SYK;
2. La fosforilación de SH3BP2;
3. El aumento del calcio citosólico;
4. La translocación de los NFATCs;
5. La Activación de MAPK14 y su efecto en NFATCs.
6. Medir la expresión del precursor de IL2.

# Conclusiones

1. Se identificó un conjunto de 134 genes potencialmente relacionados a la inflamación inducida por *M. tuberculosis*, en tanto éstos se sobreexpresan en la cepa silvestre al día 21 de la infección y teniendo un *fold change* igual o mayor a 2 con respecto a la cepa mutante  $\Delta$ sigH.
2. La presencia de un *fold change* elevado en varios genes y tasas de falso descubrimiento cercanas a cero, indica que estos genes podrían ser usados como marcadores de la enfermedad.
3. Este conjunto de genes sobre-representa una serie de categorías del gen que apuntan a la activación y proliferación de las células T.
4. Se encontraron mecanismos claves en el modelo de red que están implicados en la activación de las células B y T. Sin embargo, el motivo central del modelo de red constituye un importante mecanismo de inducción de la inflamación a través de factor de transcripción NFATC.
5. Los mecanismos descritos en el modelo de red son descritos en la literatura para distintos tipos celulares: macrófagos, linfocitos T y B. Por lo que sería interesante observar la expresión de las moléculas claves de estos mecanismos por tipos celulares durante la infección por *M. tuberculosis* en el mismo modelo infeccioso.
6. Los mecanismos encontrados en la red tienen una función fisiológica de carácter homeostática al igual que otros genes sobre expresados que no aparecieron en el modelo de red. Por ejemplo se presenta simultáneamente la inducción de la expresión del ILRB y del IL10RA, siendo IL2 conocida por inducir inflamación e IL10 por inhibirla. Por lo cual la clarificación del papel que ocupan estas moléculas y mecanismos, requiere ampliar los tiempos a los cuales se realiza las mediciones, siendo sugerente agregar a los días 1 y 21 el día 60 cuando la homeostasis en el ratón está abatida.

7. Dos moléculas claves en la inducción de la inflamación: MAPK14 y SYK, son posiblemente inhibidas por el fármaco *Dasatinib*. Resultaría por demás interesante reproducir el modelo experimental de infección del ratón con ambas cepas agregando como condición experimental la aplicación de fármacos pertenecientes a la familia de los inhibidores de tirosina quinasas, a los ratones infectados por la cepa silvestre.

# Bibliografía

Akaki, T., H. Tomioka, T. Shimizu, S. Dekio, y K. Sato. «Comparative roles of free fatty acids with reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates in expression of the anti-microbial activity of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*.» *Clin. Exp. Immunol.*, 2000: 302–310.

Antony, P., J.B. Petro, G. Carlesso, N.P. Shinnars, J. Lowe, y W.N. Khan. «B cell receptor directs the activation of NFAT and NF-kappaB via distinct molecular mechanisms.» *Exp Cell Res*, 2003: 11-24.

Bader, G.D., y C.W. Hogue. «An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks.» *BMC Bioinformatics*, 2003: 4, 2.

Bishai, W. R. «The *Mycobacterium tuberculosis* genomic sequence: anatomy of a master adaptor.» *Trends Microbiol*, 1998: 464–465.

Braun, A. P., y H. Schulman. «The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function.» *Annu. Rev. Physiol*, 1995: 417.

Braz, J.C., y otros. «Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling.» *J Clin Invest.*, 2003: 1475-86.

Brennan, P. J. «Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*.» *Tuberculosis (Edinb.)*, 2003: 91-97.

Briggs, M, y F Schachat. «Early specialization of the superfast myosin in extraocular and laryngeal muscles.» *J. Exp. Biol*, 2000: 203, 2485–2494.

Camacho, L. R., y otros. «Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier.» *J. Biol. Chem.*, 2001: 19845–19854.

Campbell, M.A., y N.R. Klinman. «Phosphotyrosine-dependent association between CD22 and protein tyrosine phosphatase 1C.» *Eur J Immunol*, 1995: 1573-9.

Cardoso, S., y F. Portaels. «Chapter 1, History.» *Tuberculosis From basic science to patient care*, 2007.

Chatterjee, D., K. Lowell, B. Rivoire, M. R. McNeil, y P. J. Brennan. «Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains.» *J. Biol. Chem.*, 1992: 6234–6239.

- Chatterjee, D., y K. H. Khoo. «Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects.» *Glycobiology*, 1998: 113-120.
- Chen, G., y otros. «The 3BP2 adapter protein is required for optimal B-cell activation and thymus-independent type 2 humoral response.» *Mol Cell Biol*, 2007: 3109-22.
- Chen, G., y otros. «The 3BP2 adapter protein is required for optimal B-cell activation and thymus-independent type 2 humoral response.» *Mol Cell Biol*, 2007: 3109-22.
- Cheng, A.M., B. Rowley, W. Pao, A. Hayday, J.B. Bolen, y T. Pawson. «Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development.» *Nature*, 1995: 303-6.
- Chiang, Hl, y otros. «Gene expression profiling in chicken heterophils with *Salmonella enteritidis* stimulation using a chicken 44 K Agilent microarray.» *BMC Genomics*, 2008: 526.
- Cho, S., J. Shin, M. Daffe, Y. Chong, S. Kim, y J. Kim. «J. Kim. 1992. Production of monoclonal antibody to a phenolic glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* and its use in detection of the antigen in clinical isolates.» *J. Clin. Microbiol.*, 1992: 3065–3069.
- Christoforidis, S., H. M. McBride, R. D. Burgoyne, y M. Zerial. «The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking.» *Nature*, 1999: 621–625.
- Cole, S. T., y otros. «Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete sequence.» *Nature*, 1998: 537–544.
- Constant, P., y otros. «Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the *pks15/1* gene.» *J. Biol. Chem*, 2002: 38148–38158.
- Cornall, R.J., y otros. «Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection.» *Immunity*, 1998: 497-508.
- Costello, P.S., y otros. «Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells.» *Oncogene*, 1996: 2595-605.
- Cox, J. S., B. Chen, M. McNeil, y W. R. Jacobs. «Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice.» *Nature*, 1999: 79–83.
- Daffe, M., C. Lacave, y M. Laneelle. «Structure of the major triglycosyl phenol-phthiocerol of *Mycobacterium tuberculosis* (strain Canetti).» *Eur. J. Biochem.*, 1987: 155-160.
- Daffe, M., y P. Draper. «The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity.» *Adv. Microb. Physiol.*, 1998: 131–203.
- Dannenbergh, A.M. «Immune mechanism in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis.» *Rev Infect Dis (Suppl 2)*, 1989: 369-378 .

Dao, D. N., y otros. «Mycobacterium tuberculosis Lipomannan Induces Apoptosis and Interleukin-12 Production in Macrophages.» *Infection and Immunity*, 2004: 2067-2074.

Darwin, K. N., S. Ehrt, J. C. Gutierrez-Ramos, N. Weich, y C. F. Nathan. «The proteasome of Mycobacterium tuberculosis is required for resistance to nitric oxide.» *Science*, 2003: 1963–1966.

Dasgupta, N., y otros. «Characterization of a two-component system, devRdevS, of Mycobacterium tuberculosis.» *Tuber. Lung Dis.*, 2000: 141–159.

de Kruif, MD, y otros. «Differential gene expression changes in children with severe dengue virus infections.» *PLoS Negl Trop Dis.*, 2008: e215.

de la Fuente, M.A., L. Kumar, B. Lu, y R.S. Geha. «3BP2 deficiency impairs the response of B cells, but not T cells, to antigen receptor ligation.» *Mol Cell Biol*, 2006: 5214-25.

Deckert, M., S. Tartare-Deckert, J. Hernandez, R. Rottapel, y A. Altman. «Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation.» *Immunity*, 1998: 595-605.

Deretic, V., y R. A. Fratti. «Mycobacterium tuberculosis phagosome.» *Mol. Microbiol.*, 1999: 1603–1609.

Dieli, F., y otros. «Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by V9/V2 T lymphocytes.» *J. Infect. Dis.*, 2001: 082–1085.

Dolmetsch, R.E., y R. S. Lewis. «Signaling between intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and depletion-activated Ca<sup>2+</sup> channels generates [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in T lymphocytes.» *J. Gen. Physiol.*, 1994: 365.

Doody, G.M., y otros. «A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP.» *Science*, 1995: 242-4.

Downey, G. P., y otros. «Phagosomal maturation, acidification, and inhibition of bacterial growth in nonphagocytic cells transfected with FcγRIIA receptors.» *J. Biol. Chem*, 1999: 28436–28444.

Fernandes, N. D., Q. L. Wu, D. Kong, X. Puyang, S. Garg, y R. N. Husson. «A mycobacterial extracytoplasmic sigma factor involved in survival following heat shock and oxidative stress.» *J Bacteriol.*, 1999: 4266-74.

Ferro, A. «NetMatch: a Cytoscape plugin for searching biological networks.» *Bioinformatics*, 2007: 23, 910–912.

Fischer, Dominik, y otros. «Definition of the unique human extraocular muscle allotype by expression profiling.» *Physiol Genomics*, 2005: 22: 283–291.

Fleischmann, R. D., y otros. «Whole-genome comparison of Mycobacterium tuberculosis clinical and laboratory strains.» *J. Bacteriol.*, 2002: 5479–5490.

Foucault, I., S. Le Bras, C. Charvet, C. Moon, A. Altman, y M. Deckert. «The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor.» *Blood*, 2005: 1106-13.

Fratti, R. A., J. Chua, I. Vergne, y V Deretic. «Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest.» *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003: 5437–5442.

Gahlmann, Reinhold, y Larry Kedes. «Cloning, Structural Analysis, and Expression of the Human Fast Twitch Skeletal Muscle Troponin C Gene.» *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 1990: 12520-12526.

Gardner, P. «Calcium and T lymphocyte activation.» *Cell*, 1989: 15.

Garfinkel, Leonard, Muthu Periasamy, y Bernardo Nadal-Ginard. «Cloning and Characterization of cDNA Sequences Corresponding Myosin Light Chains 1, 2, and 3, Troponin-C, Troponin-T, a-Tropomyosin, and a-Actin\*.» *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 1982: 11078-11086.

Ghosh, S., S. Pal, S. Das, S. K. Dasgupta, y S. Majumdar. «Lipoarabinomannan induced cytotoxic effects in human mononuclear cells.» *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1998. : 181-188.

Gilbertson, B., J. Zhong, y C. Cheers. «Anergy, IFN-gamma production, and apoptosis in terminal infection of mice with Mycobacterium avium.» *J. Immunol.*, 1999: 2073.

Gilleron, M., y otros. «Mycobacterium smegmatis phosphoinositols-glyceroarabinomannans. Structure and localization of alkali-labile and alkali-stable phosphoinositides.» *J. Biol. Chem.*, 1997: 117–124.

Graham, J. E., y J. E. Clark-Curtiss. «Identification of Mycobacterium tuberculosis RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS).» *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1999: 11554-9.

Greenberg, S., P. Chang, D.C. Wang, R. Xavier, y B. Seed. «Clustered syk tyrosine kinase domains trigger phagocytosis.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996: 1103-7.

Guérardel, Y., y otros. «Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of Mycobacterium kansasii: novel structural features and apoptosis-inducing properties.» *J Biol Chem.*, 2003: 36637-51.

Guerardel, Y., y otros. «Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from Mycobacterium chelonae. Presence of unusual components with alpha 1,3-mannopyranose side chains.» *J. Biol. Chem.*, 2002: 30635–30648.

Hama, N., F. Paliogianni, B. J. Fessler, y D. T. Boumpas. «Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II downregulates both calcineurin and protein kinase C-mediated pathways for cytokine gene transcription in human T cells.» *J. Exp. Med.*, 1995: 1217.

Hao, S., T. Kurosaki, y A. August. «Differential regulation of NFAT and SRF by the B cell receptor via a PLCgamma-Ca(2+)-dependent pathway.» *EMBO J.*, 2003: 4166-77.

Heissmeyer, V., y otros. «Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins.» *Nat. Immunol.*, 2004: 255.

Hernández-Pando, R., R. Chacón-Salinas, y I. Estrada. «Immunology, Pathogenesis, Virulence.» *Tuberculosis From basic science to patient care*, 2007.

Hibbs, M.L., y otros. «Sustained activation of Lyn tyrosine kinase in vivo leads to autoimmunity.» *J Exp Med.*, 2002: 1593-604.

Hu, Y., y A. R. Coates. «Increased levels of sigJ mRNA in late stationary phase cultures of Mycobacterium tuberculosis detected by DNA array hybridisation.» *FEMS Microbiol Lett.*, 2001: 59-65.

Jarlier, V., y H. Nikaido. «Permeability barrier to hydrophilic solutes in Mycobacterium chelonae.» *J. Bacteriol.*, 1990: 1418–1423.

Jayachandran, R., y otros. «Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin.» *Cell*, 2007: 37-50.

Kaushal, D., y otros. «Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a Mycobacterium tuberculosis mutant lacking alternative sigma factor, SigH.» *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2002: 8330-5.

Kaushal, D., y otros. «Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a Mycobacterium tuberculosis mutant lacking alternative sigma factor, SigH.» *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2002: 8330-5.

Kelly, K, R Swords, D Mahalingam, S Padmanabhan, y FJ. Giles. «Serosal inflammation (pleural and pericardial effusions) related to tyrosine kinase inhibitors.» *Target Oncol.*, 2009 : 99-105.

Kim, H Y, y otros. «The fast skeletal muscle myosin light chain is differentially expressed in smooth muscle cells of OVA-challenged mouse trachea.» *Mol Cells*, 2008: 25(1):78-85.

Koga, T., y otros. «Tumor suppressor cylindromatosis acts as a negative regulator for Streptococcus pneumoniae-induced NFAT signaling.» *J Biol Chem*, 2008: 12546-54.

Kritski, A., y F. A. Fiuza de Melo. «Chapter 15: Tuberculosis in Adults.» *Tuberculosis. From basic science to patient care*, 2007.

Kuo, HP, TC Ho, CH Wang, CT Yu, y HC Lin. «Increased production of hydrogen peroxide and expression of CD11b/CD18 on alveolar macrophages in patients with active pulmonary tuberculosis.» *Tuber Lung Dis*, 1996: Tuber Lung Dis.

- Kurosaki, T., S.A. Johnson, L. Pao, K. Sada, y H. Yamamura. «Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling.» *J Exp Med.*, 1995: 1815-23.
- Lankester, A.C., G.M. van Schijndel, y R.A. van Lier. «Hematopoietic cell phosphatase is recruited to CD22 following B cell antigen receptor ligation.» *J Biol Chem*, 1995: 20305-8.
- Law, C.L., y otros. «CD22 associates with protein tyrosine phosphatase 1C, Syk, and phospholipase C-gamma(1) upon B cell activation.» *J Exp Med.*, 1996: 547-60.
- Leprince, C., K.E. Draves, R.L. Geahlen, J.A. Ledbetter, y E. A. Clark. «CD22 associates with the human surface IgM-B-cell antigen receptor complex.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993 : 3236-40.
- Li, W., A. R. Bottrill, M. J. Bibb, M. J. Buttner, M. S. Paget, y C. Kleanthous. «Li W, et al. The Role of zinc in the disulphide stress-regulated anti-sigma factor RsrA from *Streptomyces coelicolor*.» *J Mol Biol.*, 2003: 461–472.
- Li, Z B, G H Rossmanith, y J F Hoh. «Cross-bridge kinetics of rabbit single extraocular and limb muscle fibers.» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* , 2000: 41, 3770–3774.
- Lin, M. Y., T. Zal, I. Ch'en, N. Gascoigne, y S. Hedrick. «A Pivotal Role for the Multifunctional Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in T Cells: From Activation to Unresponsiveness.» *The Journal of Immunology*, 2005: 5583–5592.
- Macian, F., F. Garcia-Cozar, H. F. Horto, M. C. Byrne, y A. Rao. «Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance.» *Cell*, 2002: 719.
- Maeno, K., y otros. «Adaptor protein 3BP2 is a potential ligand of Src homology 2 and 3 domains of Lyn protein-tyrosine kinase.» *J Biol Chem*, 2003: 24912-20.
- Malik, Z. A., G. M. Denning, y D. J. Kusner. *J. Exp. Med.*, 2000: 287–302.
- Malik, Z. A., S.S. Iyer, y D.J. Kusner. «Mycobacterium tuberculosis phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages.» *J. Immunol*, 2001: 3392–3401.
- Manca, C., y otros. «Differential monocyte activation underlies strainspecific Mycobacterium tuberculosis pathogenesis.» *Infect. Immun.*, 2004: 5511–5514.
- Manca, C., y otros. «Hypervirulent M. tuberculosis W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway.» *J. Interferon Cytokine Res.*, 2005: 694–701.
- Manca, C., y otros. «Virulence of a bacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha/ beta.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001: 5752–5757.

- Manganelli, R., E. Dubnau, S. Tyagi, F. R. Kramer, y I. Smith. «Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*.» *Mol Microbiol*, 1999: 715-24.
- Manganelli, R., M. I. Voskuil, G. K. Schoolnik, E. Dubnau, M. Gomez, y I. Smith. «Role of the extracytoplasmic-function \_ factor \_H in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression.» *Mol. Microbio.*, 2002: 365–374.
- Manganelli, R., M. I. Voskuil, G. K. Schoolnik, y I. Smith. «The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages.» *Mol Microbiol.*, 2001: 423-37.
- Manganelli, R., R. Proveddi, S. Rodrigue, J. Beaucher, L. Gaudreau, y I. Smith. «Factors and Global Gene Regulation in *Mycobacterium tuberculosis*.» *JOURNAL BACTERIOLOGY*, 2004: 895–902.
- Manganelli, R., R. Proveddi, S. Rodriguez, J. Beaucher, L. Gaudreau, y I. Smith. «Factors and Global Gene Regulation in *Mycobacterium tuberculosis*.» *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 2004: 895–902.
- Missiakas, D., y S. Raina. «The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation.» *Mol Microbiol.*, 1998: 1059-66.
- Miyazaki, T., y T. Taniguchi. «Coupling of the IL2 receptor complex with non-receptor protein tyrosine kinases.» *Cancer Surv*, 1996: 25-40.
- Molkentin, J.D. «Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs.» *Cardiovasc Res.*, 2004: 467-75.
- Montoro, E., y R. Rodríguez. «Global Burden of Tuberculosis.» *Tuberculosis From basic science to patient care*, 2007.
- Montoro, Ernesto, y Rodolfo Rodriguez. « Global Burden of Tuberculosis.» *Tuberculosis 2007 From basic science to patient care.*, 2007.
- Murphy, D. «Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects.» *Adv Physiol Educ.*, 2002: 56-70.
- Nadler, M.J., P.A. McLean, B.G. Neel, y H.H. Wortis. «B cell antigen receptor-evoked calcium influx is enhanced in CD22-deficient B cell lines.» *J Immunol*, 1997: 4233-43.
- Nghiem, P, T. Ollick, P. Gardner, y H. Schulman. *Nature*, 1994: 347.
- Nigou, J., C. Zelle-Rieser, M. Gilleron, M. Thurnher, y G. Puzo. «Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor.» *J. Immunol.*, 2001: 7477-7485.
- Nigou, J., M. Gilleron, M. Rojas, L. Garcia, M. Thurnher, y G. Puzo. «Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response.» *Microbes Infect.*, 2002: 945-953.

Nigou, J., M. Gilleron, y G. Puzo. «Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis.» *Biochimie*, 2003: 153-166.

Nigou, J., M. Gilleron, y G. Puzo. «Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis.» *Biochimie*, 2003: 153-166.

O'Keefe, T.L., G.T. Williams, S.L. Davies, y M.S. Neuberger. «Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice.» *Science*, 1996: 798-801.

Organización Panamericana de la Salud. « Plan Regional de Tuberculosis.» 2006-2015.

Paget, M. S., y J. D. Helmann. «The sigma70 family of sigma factors.» *Genome Biol.*, 2003: 203.

Paget, M. S., y otros. «Mutational analysis of RsrA, a zinc-binding anti-sigma factor with a thiol-disulphide redox switch.» *Mol Microbiol.*, 2001: 1036-47.

Peaker, C.J., y M.S. Neuberger. «Association of CD22 with the B cell antigen receptor.» *Eur J Immunol*, 1993: 1358-63.

Perrino, B. A., y T. R. Soderling. «Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin: role of the autoinhibitory domain.» *J. Biol. Chem.*, 1995: 340.

Pezzutto, A., P.S. Rabinovitch, B. Dörken, G. Moldenhauer, y E.A. Clark. «Role of the CD22 human B cell antigen in B cell triggering by anti-immunoglobulin.» *J Immunol*, 1988: 1791-5.

Qu, X., K. Kawauchi-Kamata, S.M. Miah, T. Hatani, H. Yamamura, y K. Sada. «Tyrosine phosphorylation of adaptor protein 3BP2 induces T cell receptor-mediated activation of transcription factor.» *Biochemistry*, 2005: 3891-8.

Raman, S., T. Song, X. Puyang, S. Bardarov, W. R. Jacobs, y R. N. Husson. «The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in Mycobacterium tuberculosis.» *J Bacteriol.*, 2001: 6119-25.

Reed, M. B., S. Gagneux, K. DeRiemer, P. M. Small, y C.E. Barry. «The W-Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated.» *J. Bacteriol.*, 2007: 2583–2589.

Reed, M. B., y otros. «A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response.» *Nature*, 2004: 84–87.

Riley, R.L., C.C. Mill, y W. Nyka. «Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis.» *Am J Hyg*, 1959: 185-196.

Rodriguez, G. M., y I. Smith. «Mechanism of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence.» *Mol. Microbiol.*, 2003: 485– 1494.

- Rojas, M., L. F. Garcia, J. Nigou, G. Puzo, y M. Olivier. «Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis by altering Ca<sup>2+</sup>-dependent cell signaling.» *J. Infect. Dis.*, 2000: 240-251.
- Rokosz, LL, y otros. «Kinase inhibitors as drugs for chronic inflammatory and immunological diseases: progress and challenges.» *Expert Opin Ther Targets*, 2008: 883-903.
- Russell, D.G., H.C. Mwandumba, y E. E. Rhoades. «Mycobacterium and the coat of many lipids.» *J. Cell Biol*, 2002: 421–426.
- Sada, K., S.M. Miah, K. Maeno, S. Kyo, y H. Yamamura. «Regulation of FcepsilonRI-mediated degranulation by an adaptor protein 3BP2 in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells.» *Blood*, 2002: 2138-44.
- Sakaguchi, S. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004: 531.
- Sato, S., P.J. Jansen, y T.F. Tedder. «CD19 and CD22 expression reciprocally regulates tyrosine phosphorylation of Vav protein during B lymphocyte signaling.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997: 13158-62.
- Schachat, Fred, y Margaret Briggs. «Phylogenetic implications of the superfast myosin in extraocular muscles. Review.» *The Journal of Experimental Biology*, 2002: 205, 2189–2201.
- Schreiber, S.L., y G.R. Crabtree. «The mechanism of action of cyclosporin A and FK506.» *Immunol. Today*, 1992: 136.
- Sherman, D. R., M. I. Voskuil, D. Schnappinger, R. Liao, M. I. Harrell, y G. K. Schoolnik. «Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding  $\sigma$ -crystallin.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001: 7534–7539.
- Shires, K., y L. Steyn. «The cold-shock stress response in Mycobacterium smegmatis induces the expression of a histone-like protein.» *Mol. Microbiol.*, 2001: 994–1009.
- Shukla, Upasana, Tomoko Hatani, Kenji Nakashima, Kazuhiro Ogi, y Kiyonao Sada. «Tyrosine phosphorylation of 3BP2 regulates BCR-mediated activation of NFAT.» *J Biol Chem.*, 2009: [Epub ahead of print].
- Sinsimer, D., y otros. «The Phenolic Glycolipid of Mycobacterium tuberculosis Differentially Modulates the Early Host Cytokine Response but Does Not in Itself Confer Hypervirulence.» *Infection and immunity*, 2008: 3027–3036.
- Sistema Único para la Vigilancia de la Epidemiología. «Sistema Único para la Vigilancia de la Epidemiología. Incidencia de Tuberculosis Pulmonar (A15-A16) por Grupos de Edad, Estados Unidos Mexicanos, 2006, Población General.»

Song, T., S. L. Dove, K. H. Lee, y R. N. Husson. «RshA, an anti-sigma factor that regulates the activity of the mycobacterial stress response sigma factor SigH.» *Mol Microbiol*, 2003: 949–959.

Sprent, J., y C. D. Surh. «Generation and maintenance of memory T cells.» *Curr. Opin. Immunol*, 2001: 248.

Sprent, J., y S.R. Webb. «Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells.» *Curr. Opin. Immunol.*, 1995: 196.

Stewart, G. R., y otros. «Dissection of heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays.» *Microbiology*, 2002: 3129–3138.

Steyn, A. J., D. M. Collins, M. K. Hondalus, W. R. Jacobs, R. P. Kawakami, y B. R. Bloom. «*Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth.» *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002: 3147-52.

Sundaramurthy, V, y J Piesters. «Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages.» *Microbes Infect.*, 2007: 1671-9.

Tailleux, L., y otros. «Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium tuberculosis* and infected human dendritic cells and macrophages.» *PLoS One*, 2008: e1403.

Takata, M., y otros. «Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca<sup>2+</sup> mobilization through distinct pathways.» *EMBO J.*, 1994: 1341-9.

Takata, M., y T. Kurosaki. «A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2.» *J.Exp.Med.*, 1996: 31-40.

Tedder, T.F., J. Tuscano, S. Sato, y J.H. Kehrl. «CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling.» *Annu Rev Immunol.* , 1997: 481-504.

Tooze, R.M., G.M. Doody, y D.T. Fearon. «Counterregulation by the coreceptors CD19 and CD22 of MAP kinase activation by membrane immunoglobulin.» *Immunity*, 1997: 59-67.

Trimble, William, y Sergio Grinstein. «TB or not TB: Calcium Regulation in Mycobacterial Survival.» *Cell*, 2007: 12-14.

Turner, M., y otros. «Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk.» *Nature*, 1995: 298-302.

Tuscano, J.M., P Engel, T.F. Tedder, y J.H. Kehrl. «Engagement of the adhesion receptor CD22 triggers a potent stimulatory signal for B cells and blocking CD22/CD22L interactions impairs T-cell proliferation.» *Blood*, 1996: 4723-30.

- Tuscano, J.M., P. Engel, T.F. Tedder, A. Agarwal, y J. Kehrl. «Involvement of p72syk kinase, p53/56lyn kinase and phosphatidyl inositol-3 kinase in signal transduction via the human B lymphocyte antigen CD22.» *Eur J Immunol*, 1996: 1246-52.
- van Soolingen, D., y otros. «A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa.» *L. M. Schouls, and J. D. van Embden. 1997. A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Int. J. Syst. Bacteriol*, 1997: 1236–1245.
- Vergne, Isabelle, Jennifer Chua, y Vojo Deretic. «Tuberculosis Toxin Blocking Phagosome Maturation Inhibits a Novel Ca<sup>2+</sup> Calmodulin-PI3K hVPS34 Cascade.» *The Journal of Experimental Medicine*, 2003: 653–659.
- Volinia, S., y otros. «A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system.» *The EMBO Journal*, 1995: 3339–3348.
- Warke, R, y otros. «Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells.» *J Virol.*, 2003: 11822-32.
- Wayne, L. G., y C. Sohaskey. «Nonreplicating persistence of Mycobacterium tuberculosis.» *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001: 139–163.
- Welsh, R. M., M. Y. Lin, B. L. Lohman, S. M. Varga, C. C. Zarozinski, y L. K. Selin. «alpha-beta and gamma delta T-cell networks and their roles in natural resistance to viral infections.» *Immunol. Rev.*, 1997: 79.
- Wienands, J., F. Freuler, y G. Baumann. «Tyrosine-phosphorylated forms of Ig beta, CD22, TCR zeta and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of Syk.» *Int Immunol*, 1995: 1701-8.
- Wienands, J., F. Freuler, y G. Baumann. «Tyrosine-phosphorylated forms of Ig beta, CD22, TCR zeta and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of Syk.» *nt Immunol.*, 1995: 1701-8.
- Willingham, A.T., y otros. «A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT.» *Science*, 2005: 1570-3.
- Winters, M, M Briggs, y F Schachat. «The human extraocular muscle myosin heavy chain gene (MYH13) maps to the cluster of fast and developmental myosin genes on chromosome 17.» *Genomics*, 1998: 54, 188–189.
- World Health Organization. « Global Tuberculosis Control, Surveillance, Planning, Financing.» *WHO report*, 2008.
- Wösten, M. M. «Eubacterial sigma-factors.» *FEMS Microbiol Rev*, 1998: 127-50.
- Yassin, R J, y A S Hamblin. «Altered expression of CD11/CD18 on the peripheral blood phagocytes of patients with tuberculosis.» *Clin Exp Immunol*, 1994: 97(1): 120–125.

Zhang, J., E.H. Berenstein, R.L. Evans, y R.P. Siraganian. «Transfection of Syk protein tyrosine kinase reconstitutes high affinity IgE receptor-mediated degranulation in a Syk-negative variant of rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells.» *J Exp Med.*, 1996: 71-9.

Zheng, X, Y Wang, H Wei, R Sun, y Z Tian. «LFA-1 and CD2 synergize for the Erk1/2 activation in the Natural Killer (NK) cell immunological synapse.» *J Biol Chem*, 2009: 284(32):21280-7.