Tesina de Fin de Carrera de la Licenciatura en Bioquímica

Búsqueda de marcadores moleculares de valor pronóstico en patogenicidad y virulencia en pacientes con tuberculosis pulmonar.

Joaquín Ignacio Hurtado Gutiérrez

Tutor: Dr. Gonzalo Greif

Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur de Montevideo

Febrero, 2019

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLAEP) por brindarme acceso a sus bancos de datos y por el lugar donde realicé parte de mi Tesina.

A la Dra. Cecilia Coitinho por permitirme trabajar en el laboratorio de la Unidad de Biología Molecular de la CHLAEP. A Maria Noel Bentancour, Silvana Gramajo y a Mariana Calandria por la energía y por todo el aprendizaje que me dieron.

Al Instituto Pasteur de Montevideo por permitirme realizar el trabajo final de carrera en la Unidad de Biología Molecular. A toda la UBM y muy especialmente al Dr. Carlos Robello y a mi tutor Dr. Gonzalo Greif.

Al Hospital Español por brindarnos las muestras con las cuales se pudieron realizar los distintos estudios. Especialmente a los Dres/as Nicolás Nin, María Buroni y Álvaro Giordano.

A la ANII por la financiación del proyecto donde se enmarca esta Tesina de Grado.

A la Facultad de Ciencias por todos estos años.

A mi padre, a mi madre, a mis hermanos.

Gracias.

Tabla de contenidos

I. RESUMEN 4

II. INTRODUCCIÓN 7

1. Importancia de la infección por TB 7

2. Estado actual de la TB a nivel mundial 12

3. Estado actual de la TB en Uruguay 15

4. Fundamentación de la aproximación experimental: Tipificación de las cepas. 17

5. Fundamentación de la aproximación experimental: Marcadores moleculares en el hospedero. 21

III. OBJETIVOS 25

IV. MATERIALES Y MÉTODOS 26

A. Tipificación de cepas 26

1. Población de estudio. 26

2. Extracción de ADN 26

3. MIRU-VNTR 27

4. Análisis de los productos de PCR por electroforesis capilar. 28

5. Spoligotyping 29

B. Marcadores moleculares en el hospedero 32

1. Población de estudio 32

2. Extracción de microARNs 32

3. Secuenciación de microARNs purificados 35

V. RESULTADOS 36

1. Tipificación de cepas - MIRU-VNTR 36

2. Tipificación de cepas - Spoligotyping 38

3. Marcadores moleculares en el hospedero 43

4. Marcadores moleculares en el hospedero - Análisis de expresión diferencial. 46

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 49

1. Tipificación de cepas 49

2. Marcadores moleculares en el hospedero 53

VII. PERSPECTIVAS 55

VIII. BIBLIOGRAFÍA 57

ANEXO I. Composición de buffers. 62

ANEXO II. Tablas de MIRU-VENTR y Spoligotyping 63

ANEXO III. Árbol filogenético UPGMA de aislados. 69

I. RESUMEN

La tuberculosis (TBC) es una infección bacteriana contagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Es una de las enfermedades infecciosas más prevalente y la primera causa de muerte debida a un agente infeccioso en el mundo, superando desde el año 2016 a las muertes provocadas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Esta enfermedad compromete principalmente al aparato respiratorio y se transmite de persona a persona a través de partículas expedidas con la tos por pacientes con tuberculosis activa. El riesgo de contraer la infección aumenta si el sistema inmunitario de la persona se ve comprometido por medicamentos inmunosupresores, abuso de drogas, malas condiciones socioeconómicas, VIH, diabetes etc. En Uruguay, el Programa Nacional de Control de la Tuberculosis ha registrado una incidencia actual de 26,7 por cada 100.000 habitantes. Sin embargo, desde el año 2006 la tendencia de TB ha venido en aumento.

En este trabajo se estudió una población de pacientes que desarrollaron formas graves de tuberculosis pulmonar, por lo cual fueron internados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Español (UCI). Muchos de estos casos requirieron ventilación artificial por presentar insuficiencia respiratoria aguda, shock circulatorio, sepsis y/o disfunciones multiorgánicas. Hasta el momento no existía, en nuestro medio, reportes acerca del comportamiento clínico ni sobre factores predictores de mortalidad en esta población.

El primer objetivo de esta Tesina de grado fue realizar la tipificación molecular de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en estos pacientes críticos. Se realizó la tipificación mediante análisis de microsatélites por la técnica de MIRU-VNTR y Spoligotyping. Esta última técnica nunca antes se había realizado en nuestro país.

El segundo objetivo fue la secuenciación de ARNs pequeños (principalmente microARNs, y otros ARNs nc) en suero de un subgrupo de estos pacientes graves incluidos en este estudio. En la última década se ha visto que los microARN cumplen una función esencial en la comunicación a distancia, a través de su secreción en forma libre o en distintos tipos de vesículas extracelulares. En búsqueda de posibles marcadores moleculares de patogenicidad y virulencia se realizó el secuenciado profundo en muestras de plasma

mediante el método de Illumina de bibliotecas de ARNs pequeños. Se realizó el análisis bioinformático primario de los resultados.

Palabras Clave: *Mycobacterium tuberculosis*; tipificación; marcadores moleculares; microARNs.

Abreviaturas:

TBC: infección por *Mycobacterium tuberculosis*

MIRU: Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (unidades repetidas interespaciadas de mycobacterias)

VNTR: Variable Number Tandem Repeat (número variable de repetidos en tandem)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

pb: Pares de Bases

nt: Nucleótidos

ARNm: ARN mensajero

microARN: microARN

ARNnc: ARN no codificante

ARNr: ARN ribosomal

ARNt: ARN de transferencia

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

HE: Hospital Español

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

MBL: Mannose Binding Lectin

MAC: Membrane Attack Complex

II. INTRODUCCIÓN

1. Importancia de la infección por TB

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria patógeno-obligado de humanos que puede causar infección pulmonar y menos frecuentemente puede infectar otros órganos o tejidos (intestino, meninges, sangre, etc.). Sin embargo lo más común es que la infección se desarrolle en el aparato respiratorio.

El género *Mycobacteria* pertenece al filo *Actinobacteria* (figura 1), uno de los filos más grandes dentro del reino de las Bacterias contendiendo a muchos organismos patógenos de humanos así como también organismos productores de antibióticos y otros productos de interés biotecnológico[1]. Dentro del género *Mycobacterium,* las especies se pueden dividir en *Mycobacterias* de crecimiento rápido y de crecimiento lento. Estas últimas constituyen un grupo particular de estudio porque allí se encuentran las especies y cepas causantes de enfermedades en animales (figura 2).

Más específicamente, el género *Mycobacterium* contiene aproximadamente 169 especies diferentes pudiéndose agrupar en tres grandes grupos: el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), *Mycobacterium leprae* y micobacterias no tuberculosas (NTM). Son los miembros del MTBC los causantes de la tuberculosis (TBC). Dentro del complejo las especies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium canetti* están asociadas a la patogenicidad en humanos, y otras especies como *Mycobacterium bovis, Mycobacterium caprae, Mycobacterium microti* se asocian a la enfermedad en animales tanto domésticos como salvajes[2].

El contagio de TBC se produce de persona a persona por vía aérea, de una persona con tuberculosis pulmonar activa a otra persona sana. Se estima que un 23%[3,4] de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* y de ese porcentaje en torno a un 5-10% desarrolla la enfermedad[5,6]. Además el período de incubación para que esto suceda puede ser de pocos meses o décadas.

Mientras la persona no desarrolle TBC no presenta los síntomas que son característicos de la TBC-activa (tos, fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna, etc.) y se considera que dicha infección está latente (LTBI). La LTBI puede ser detectada por el test de tuberculina en piel o por ensayo de interferón gamma[7]. En general el organismo hospedero puede neutralizar la TBC con su sistema inmune y detiene la infección. Si por cualquier

circunstancia la persona presenta una depresión de su sistema inmunitario (malnutrición, quimioterapia, VIH, etc.), la infección vuelve a activarse y se desarrolla la enfermedad.

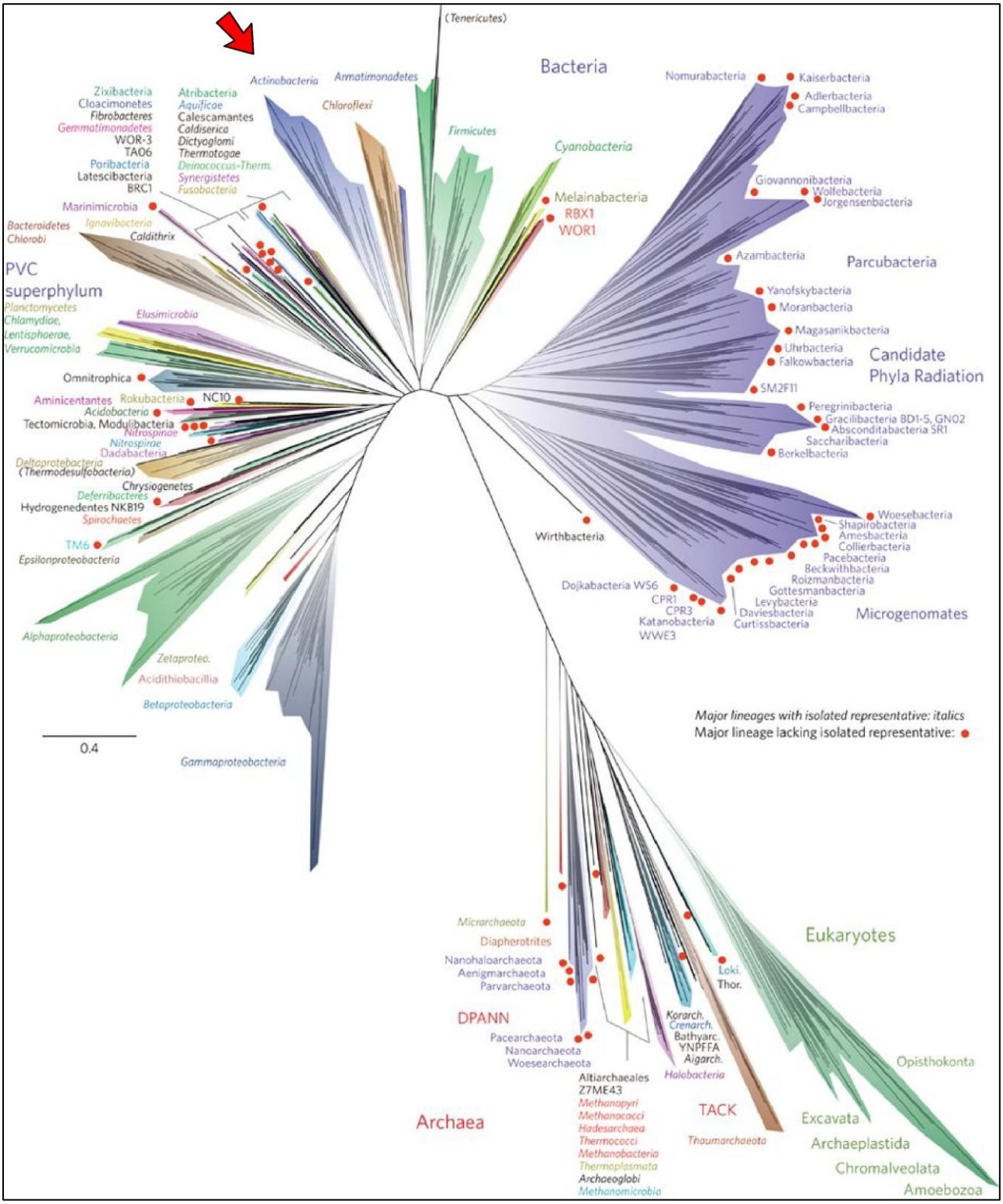


Figura 1. Árbol de la vida. La flecha roja indica el filo *Actinobacteria* al cual pertenece *M. tuberculosis*. Imagen tomada de [8].

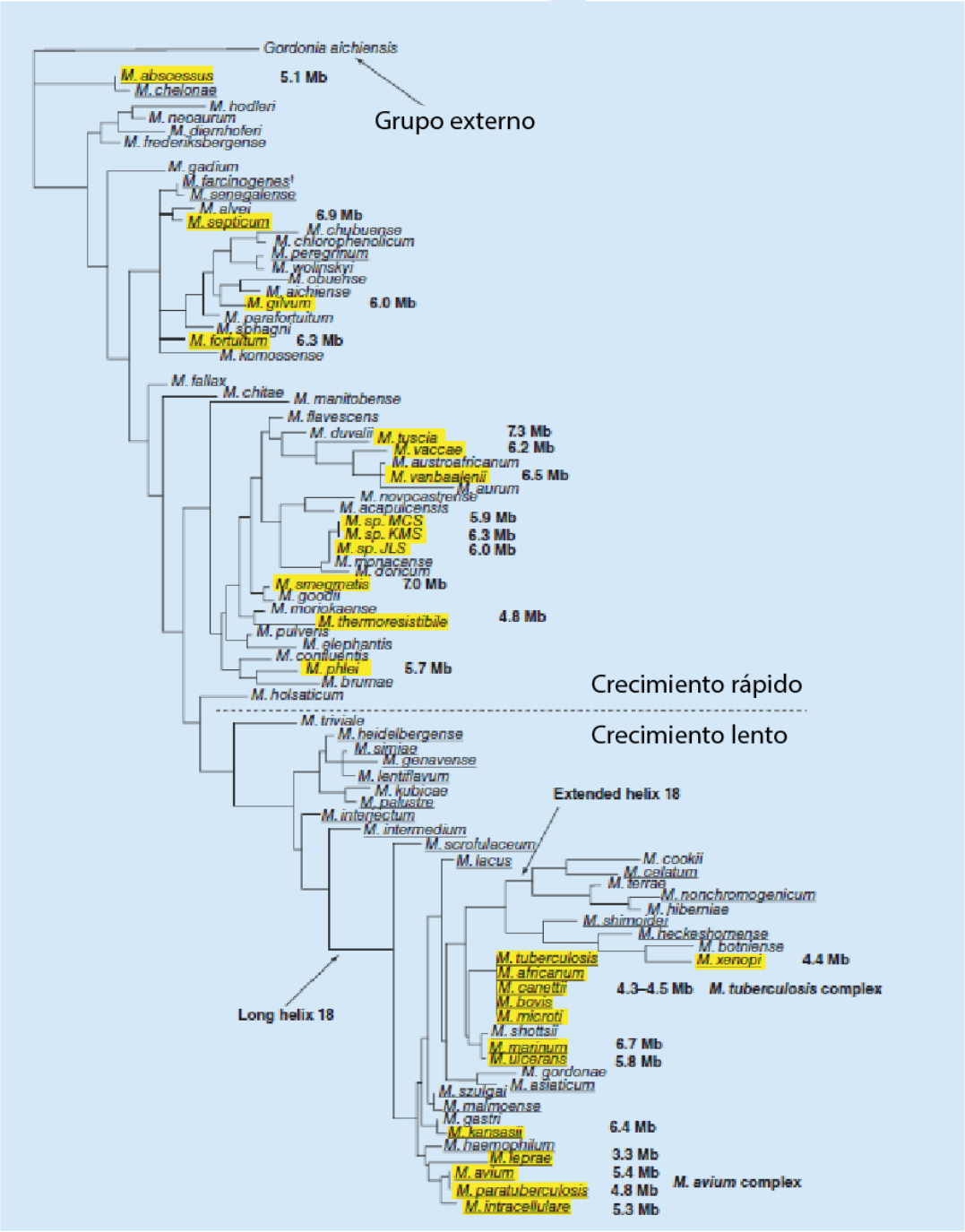


Figura 2. Árbol filogenético de los miembros del género *Mycobacterium*. Los genomas secuenciados están en amarillo. Dentro de las especies de crecimiento lento se encuentran especies patógenas para humanos y animales domésticos, así como especies patógenas oportunistas en humanos. Imagen tomada de [9].

En general las micobacterias son ricas en contenido de G-C en su ADN genómico, son ácido alcohol resistentes, presentan extrema hidrofobicidad y a diferencia de las bacterias

Gram-positivas se caracterizan por tener una envoltura celular muy rica en lípidos con una membrana interior y una membrana exterior, llamada mycomembrana (figura 3).

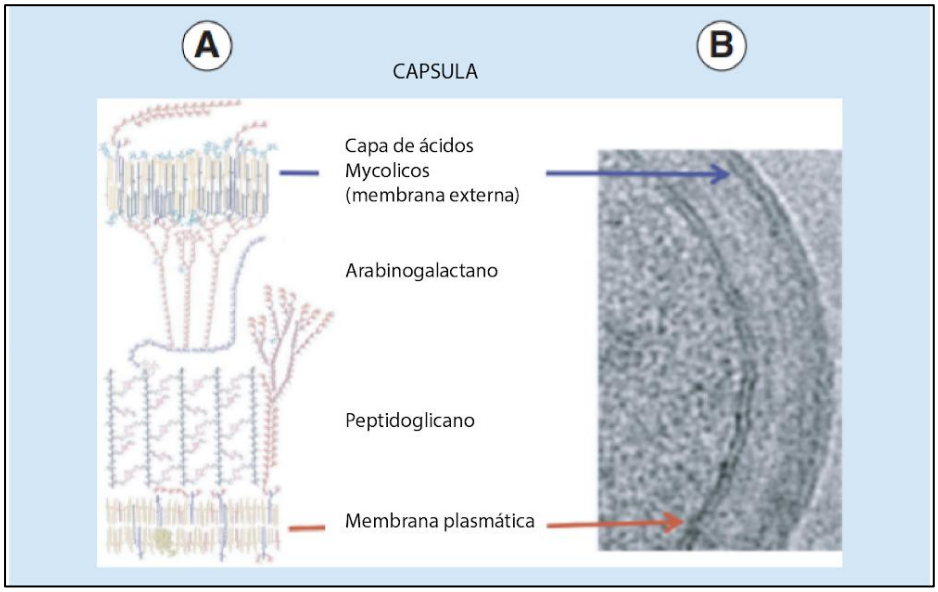


Figura 3. Organización de la envoltura celular de *Mycobacterium*. **A.** Modelo de la envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis* y otros bacilos tuberculosos. **B**. Microscopía crioelectrónica de la envoltura de *Mycobacterium bovis* BCG. Imagen tomada de [9].

Como se mencionaba anteriormente, la envoltura celular es una estructura compleja donde el lipoarabinomanano cubierto de manosa (ManLAM) se encuentra presente en las membranas de todos los miembros del MTBC. ManLAM está bien caracterizado en *M. tuberculosis* por su importancia para entrar al fagocito, regulando el tráfico intracelular, así como la respuesta inmunitaria de las células hospederas[10].

La complejidad en la membrana también le permite a la bacteria sortear los mecanismos de la inmunidad innata. Al ingresar por las vías aéreas y depositarse principalmente en los bronquiolos y alvéolos pulmonares, la bacteria es reconocida por los factores del complemento como MBL (ligandos de unión a manosa) y probablemente existan anticuerpos naturales contra la bacteria pudiendo activar una respuesta innata por la vía clásica y por la vía alternativa. Sin embargo la estructura compleja de la pared celular no permite que el complejo de ataque a la membrana (MAC), por el cual ocurriría la lisis de la bacteria, funcione efectivamente. Por otra parte los macrófagos tienen distintos receptores que reconocen motivos característicos en los patógenos. Los receptores de lectina tipo-C (CLR) como MMR (del inglés: macrophages mannose receptor) y DC-SIGN (del inglés:

Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) son asociados con el reconocimiento de *M. tuberculosis* y este reconocimiento está implicado en la fagocitosis de la bacteria[11].

Los macrófagos son el nicho preferencial donde puede sobrevivir en condiciones de hipoxia y pH ácido. La inhibición de la maduración del fagosoma y el bloqueo de la fusión con los lisosomas son claves en la patogenicidad[12]. *M. tuberculosis* expresa un sistema de secreción de proteínas ESX-1, altamente caracterizado en la bibliografía[13,14,15], ya que permite la salida de factores de virulencia, como las proteínas ESAT-6 y CFP-10 entre otras, que causan daño al fagosoma e impiden su maduración, siendo así uno de los mecanismos necesarios para la replicación de la bacteria dentro de la célula hospedera. Cuando ESAT-6 es secretado puede penetrar dentro del retículo endoplasmático de la célula hospedera y secuestra a la microglobulina-β2 necesaria para el ensamblaje del complejo de histocompatibilidad mayor de tipo 1 (MHC-I), por lo que la presentación de antígeno en la superficie de la célula se ve disminuida y esto contribuye a la lentitud de la respuesta adaptativa[16]. Así mismo, PknG es una quinasa que regula procesos críticos en la sobrevida de la mycobacteria. Es un factor de virulencia que media la sobrevida de *M. tuberculosis* dentro de la célula hospedera al prevenir la unión del fagolisosoma con los lisosomas en los macrófagos infectados[17]. Debido a su rol crítico, varios estudios se han llevado a cabo en la búsqueda de un método eficaz de inhibición de PknG. La interacción de un dominio no catalítico (Rbx) de PknG con un ácido graso nitrado (OA-NO_2), inhibe la actividad quinasa y ha surgido como un posible candidato en la exploración de nuevas drogas anti-tuberulosas[18].

M. tuberculosis también inhibe el reclutamiento de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y expresa enzimas detoxificantes de O_2. Inhibe la apoptosis y favorece la necrosis generando en el medio extracelular patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), lo que provoca una respuesta inflamatoria que culmina con el reclutamiento de más monocitos a los que *M. tuberculosis* puede infectar. También inhibe la producción de IL-12 (interleuquina proinflamatoria) por lo que disminuye la migración a ganglios linfáticos[19]. Esto último en suma con el efecto de ESAT-6, le da tiempo a la bacteria para proliferar antes de que aparezcan los linfocitos T efectores.

Al avanzar la infección se forma el granuloma, que es una estructura típica de la infección por TB. Es un cúmulo de macrófagos y células T en una estructura compacta que funciona

como barrera de contención de la infección, con un centro necrótico, donde son contenidos los bacilos y no pueden diseminarse[20]. El granuloma se forma a los 2-3 días posteriores a la infección, una vez que los macrófagos infectados alcanzan los tejidos más profundos[21]. En la mayoría de los hospederos esta estructura se mantiene en equilibrio y no se logra eliminar. Como ha sido mencionado *M. tuberculosis* puede permanecer latente, pero si en algún momento la inmunidad del hospedero se compromete, el equilibrio se rompe y los bacilos vuelven a activarse y diseminarse.

2. Estado actual de la TB a nivel mundial

En la actualidad la tuberculosis es una de las 10 primeras causas de muerte a nivel mundial y es de las infecciones más prevalentes. Es la primera causa de muerte por un agente infeccioso, ubicándose desde 2016 por encima del VIH (figura 4).

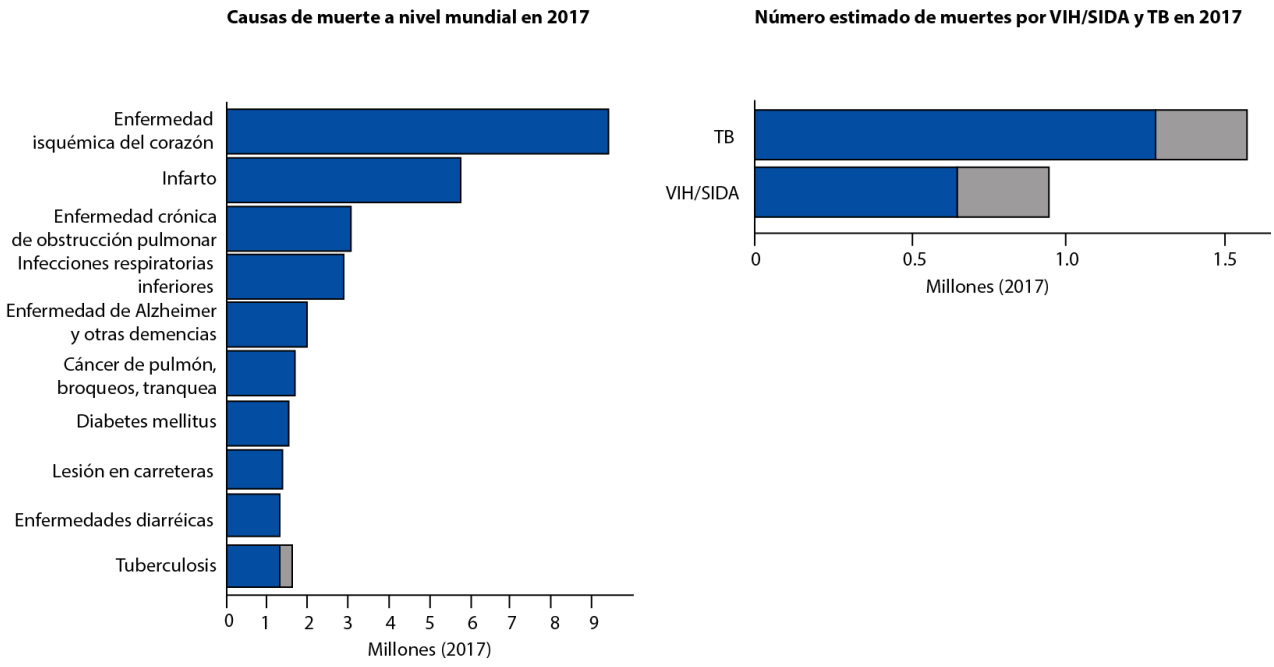


Figura 4. Izquierda: principales causas de muerte a nivel mundial en 2017. Derecha: números de muerte estimados (en millones) entre VIH/SIDA y TB en 2017. En gris se muestran las muertes por TBC entre personas VIH-positivas. Gráficos obtenidos de [4].

La organización mundial de la Salud (OMS) estima que en 2018 14,4 millones de personas en el mundo enfermaron de TBC y de ellas 1,7 millones murieron por esta enfermedad[4]. Las tasas de incidencia y de mortalidad se ven aumentadas si la persona pertenece a contextos sociales vulnerables y/o a contextos económicos de bajos ingresos. En la distribución de la incidencia de TBC a nivel global (figura 5) se ve que los países más afectados se ubican en el sureste asiático con el 45% de los casos y en el sur africano con 25%. El aumento en las tasas de incidencia coincide con poblaciones en países de bajos ingresos.

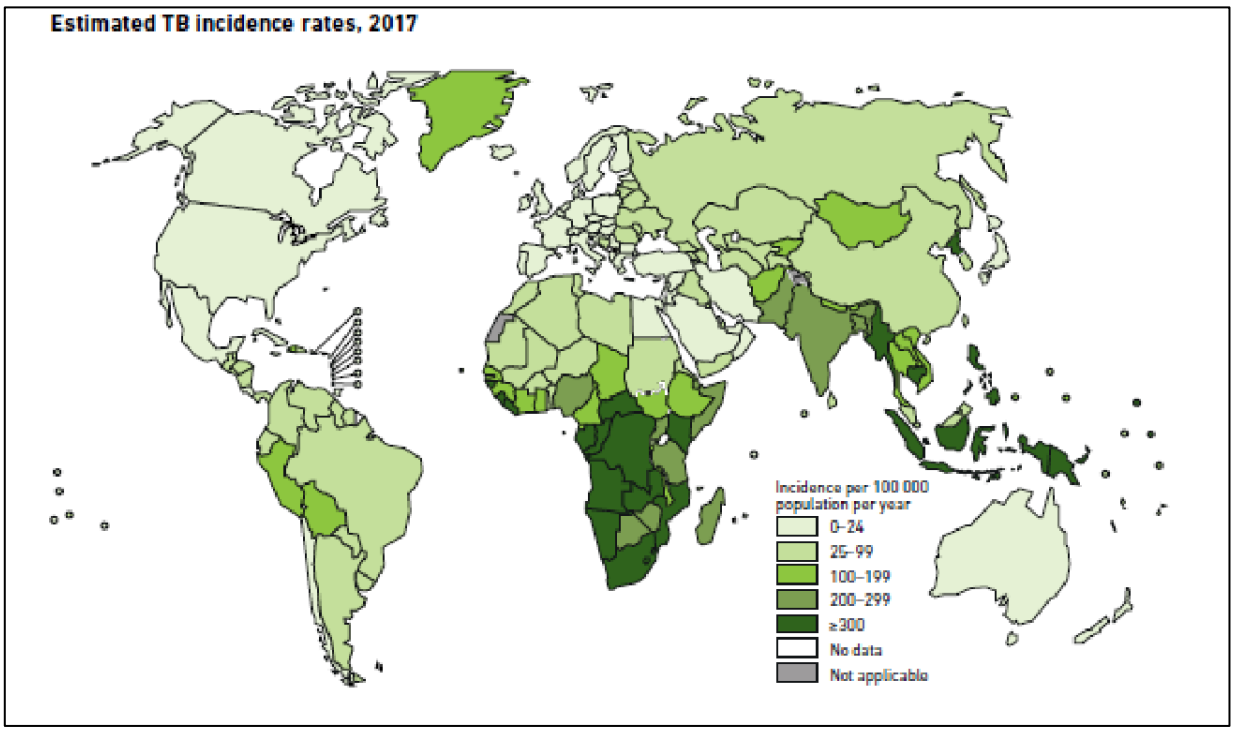


Figura 5. Incidencia de la Tuberculosis a nivel Mundial, 2017. Imagen tomada de [4].

La coinfección con VIH agrava la enfermedad. En 2016, 40% de las muertes de personas con VIH se debieron a la infección por *M. tuberculosis*. Las personas con TBC latente tienen entre 5 a 10% de probabilidades de desarrollar la enfermedad, esta probabilidad se incrementa en 20 o 30 veces en personas VIH positivas[22].

Otro de los factores a tener en cuenta es la resistencia a drogas contra TBC. Según cifras de la OMS en 2016 hubo 600.000 casos resistentes a rifampicina, droga antituberculosa de

primera línea. De ellos el 80% también era resistente a isoniazida, siendo entonces multirresistente (TB-MDR). En la figura 6 se muestra la distribución de nuevos casos MDR registrados al 2017.

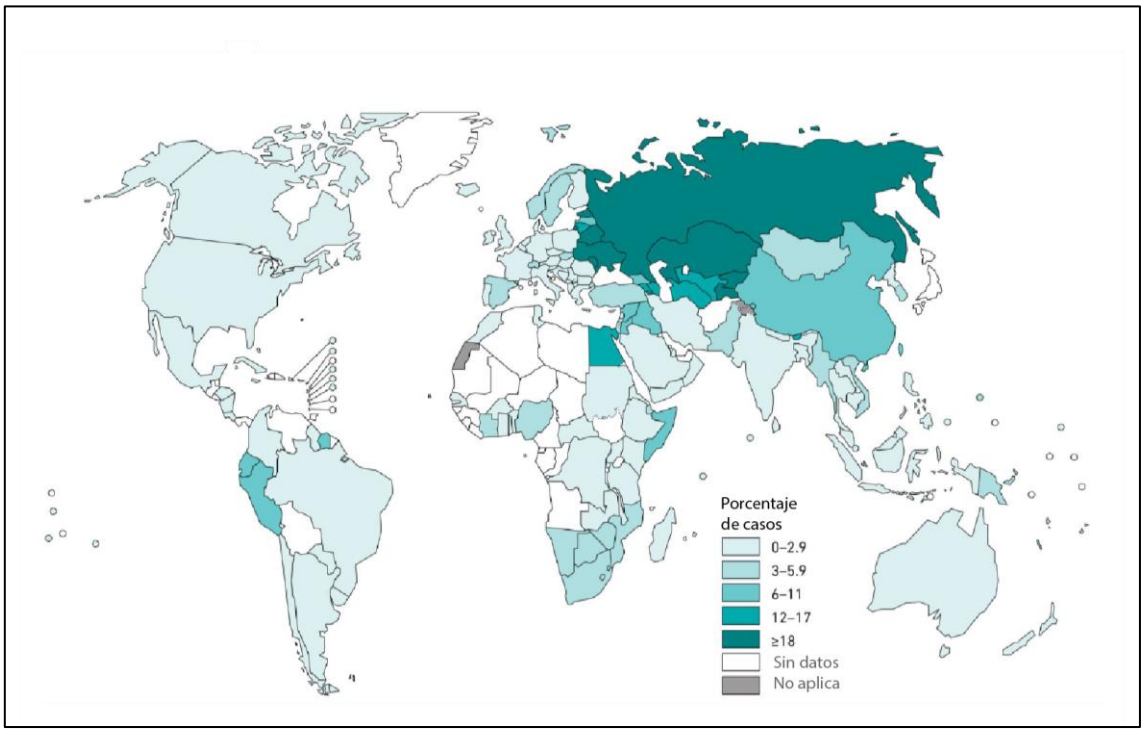


Figura 6. Distribución mundial de los porcentajes de nuevos casos de TB MDR/RR, 2017. Imagen tomada de [4].

Una de las metas de la OMS para el período 2016-2035 es el desarrollo de la Estrategia de Fin de la Tuberculosis con el objetivo de terminar con la epidemia de TBC a escala mundial. Esta estrategia plantea disminuir en un 90% la mortalidad, y reducir en 80% la cantidad de casos nuevos anuales. Para lograrlo se necesita mejorar la prestación de servicios sanitarios y mejorar la prevención de TBC así como desarrollar avances tecnológicos que permitan llegar a dichos objetivos. La tuberculosis es una enfermedad prevenible y curable pero necesita especial atención en sectores socio-económicos comprometidos donde el acceso a la salud está limitado o incluso, donde el relevamiento de los nuevos casos de TBC anuales no es conocido con exactitud.

3. Estado actual de la TB en Uruguay

Uruguay se encuentra actualmente por encima del promedio regional de incidencia estimada de TBC. La tasa de incidencia en 2017 se ubica en 26,7 casos cada 100.000 habitantes[23]. Desde 2006 hasta la fecha se observa un aumento sostenido en la incidencia y también desde 2014 se observa que la mortalidad continúa aumentando (figura 7).

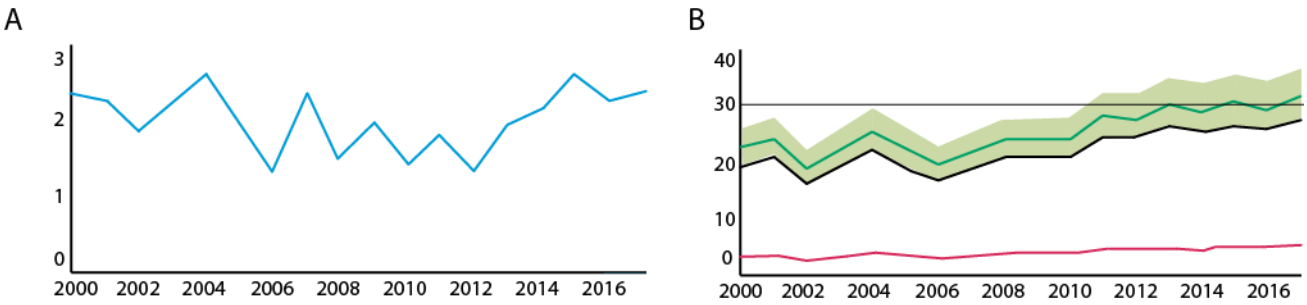


Figura 7. Datos de incidencia y mortalidad por TB en Uruguay. **A** Tasa de mortalidad en Uruguay por cada 100.000 habitantes. **B** Tasa de incidencia en Uruguay por cada 100.000 habitantes. En verde: incidencia, negro: notificados (nuevos y recaídas), rojo: incidencia TB asociada a VIH. Fuente: http://www.chlaep.org.uy.

Esta tendencia contrasta con la disminución notoria de la enfermedad hacia fines de los años 90, como fue registrada por el Programa Nacional de Tuberculosis. Según datos de la Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLA-EP), los departamentos de Montevideo, Soriano, Maldonado y Paysandú en orden decreciente, son los de mayor incidencia, ubicándose por encima del promedio del país. Dentro de Montevideo los Municipios A y D tienen una incidencia alta (mayor a 50 cada 100.000). Por otra parte la TB en nuestro país afecta principalmente a hombres de entre 30 a 40 años (figura 8).

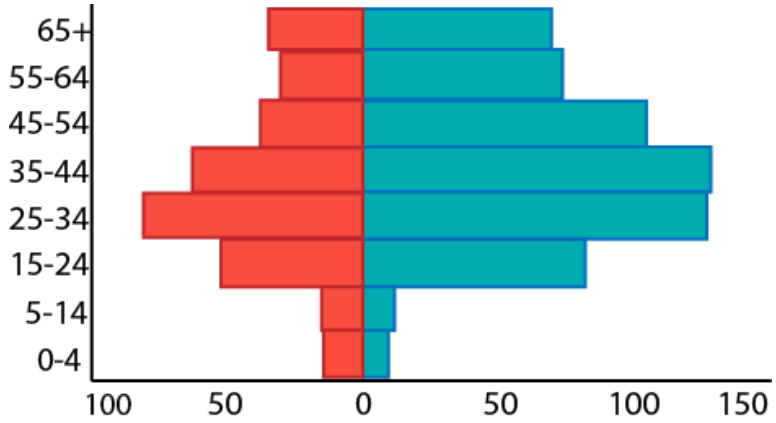


Figura 8. Incidencia estimada de TBC (casos en miles), por edad y sexo (rojo: mujeres, celeste: hombres) a 2017. Fuente: http://www.chlaep.org.uy.

En el período 2000-2018 se registró en el país un aumento de la incidencia de TBC en personas con VIH-positivo (figura 9) así como letalidad de la enfermedad en estos casos.

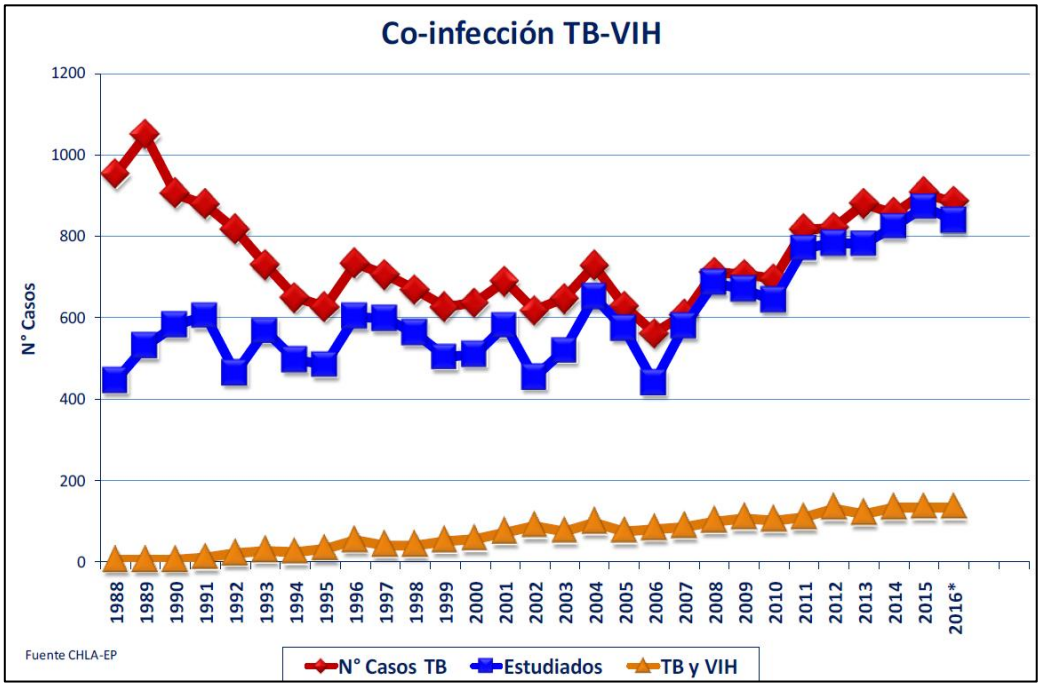


Figura 9. Tasa de incidencia en la co-infección de TB y VIH. Fuente: http://www.chlaep.org.uy.

Siguiendo los tres pilares en la estrategia mundial para terminar con la tuberculosis en 2035, el Programa Nacional de Tuberculosis busca mejorar el diagnóstico precoz de la enfermedad, realizar tratamientos preventivos y fomentar la vacunación con BCG, sobre todo en niños menores de 5 años. También se busca generar más oportunidades para

realizar el tratamiento y promover la adherencia al mismo. La interrupción del tratamiento puede llevar a una evolución desfavorable de la enfermedad para el paciente, pudiendo generar resistencia primaria contra las drogas utilizadas. En segunda instancia se busca compromiso político y de los prestadores de salud en la toma de políticas audaces y un sistema que dé soporte a quien lo necesite. Por último, se busca intensamente nuevas estrategias de investigación e innovación para revertir la situación que permita controlar y descender el preocupante aumento de la incidencia observado en los últimos años.

La CHLAT-EP en colaboración con el Instituto Pasteur de Montevideo han realizado la caracterización molecular de distintas cepas que circulan en nuestro país. En este marco se han analizado hasta el momento cepas de un brote en una población de bajo riesgo[24], secuenciación de todo el genoma de un aislado de *M. tuberculosis* resistente a isoniazida[25] y genotipificación de aislados de *M. tuberculosis* de una población carcelaria (no publicado aún).

4. Fundamentación de la aproximación experimental: Tipificación de las cepas.

Dentro de complejo *Mycobacterium tuberculosis* se pueden encontrar diferentes linajes que han divergido evolutivamente debido a distintos eventos de inserción-deleción de genes[26], conformándose así poblaciones grandes, genéticamente diferenciadas que están asociadas de manera directa y estable con poblaciones hospederas delimitadas según su lugar de origen[27]. Se pueden encontrar seis grandes linajes: Indo-Oceánico, Este-Asiático (Beijing), Este Indio-Africano, Euro-Americano (Haarlem, LAM, T, X1, X2, X3) y dos linajes Oeste-Africanos (*M. africanum*)[28].

Haarlem, Beijing, LAM, etc. son las familias contenidas dentro de los anteriores linajes. Algunas de ellas se han descrito como más virulentas que otras por contar con una mayor tendencia a presentar resistencia a antibióticos y algunas se han asociado con brotes epidemiológicos[29]. Para la epidemiología de la tuberculosis es importante saber cuál es la fuente de infección y cómo se transmite y disemina en el ambiente. Para ello es importante saber y rastrear una a una las cepas circulantes en una población. La tipificación es útil para determinar si un aislamiento particular es de transmisión reciente, o si fue reactivación de la enfermedad que se encontraba como LTBI.

Fenotípicamente se las caracteriza de acuerdo a la morfología de cada colonia y a la susceptibilidad a antibióticos antituberculosos. Sin embargo esta caracterización carece de discriminación ya que, por ejemplo, un mismo cultivo podría adquirir resistencia a un

antibiótico que en principio no tenía. Por ello se desarrollaron técnicas basadas en el estudio de ADN para identificar las distintas cepas, que a nivel genético se diferencian por presentar particulares polimorfismos en su secuencia.

A lo largo de la historia han surgido diferentes técnicas moleculares para la clasificación de las cepas. La primera técnica utilizada estaba basada en el análisis de fragmentos digeridos por enzimas de restricción en una electroforesis en gel. El patrón de fragmentos de ADN (fingerprint o huella genómica) es característico de cada cepa. Sin embargo el análisis se vuelve difícil ya que el poder de resolución es muy reducido y si se utilizan muchas enzimas de restricción, la cantidad de fragmentos a considerar vuelve el método muy complicado[30].

Más adelante se comenzaron a utilizar sondas de hibridación al ADN. La técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphism) consistía en la hibridación de fragmentos resueltos en un gel de electroforesis contra una membrana que contenía sondas marcadas radiactivamente (southernblot). Los primeros estudios realizados de esta forma llevaron a concluir que había poca diversidad genética entre las distintas cepas. Luego se entendió que en realidad las sondas estaban construidas en base a una región que era bastante conservada en tuberculosis. Esta técnica mejoró notoriamente cuando a principios de 1990, se identificaron secuencias de inserción (IS), que son regiones genéticas repetidas interespaciadas y móviles. Actualmente al cambiar la construcción de las sondas se pueden observar polimorfismos característicos de cada cepa. IS6110-RFLP es la secuencia de inserción más estudiada y se encuentra en la mayoría de los miembros del complejo de *M. tuberculosis* (figura 10). La cantidad de copias varía entre 0 a 25.

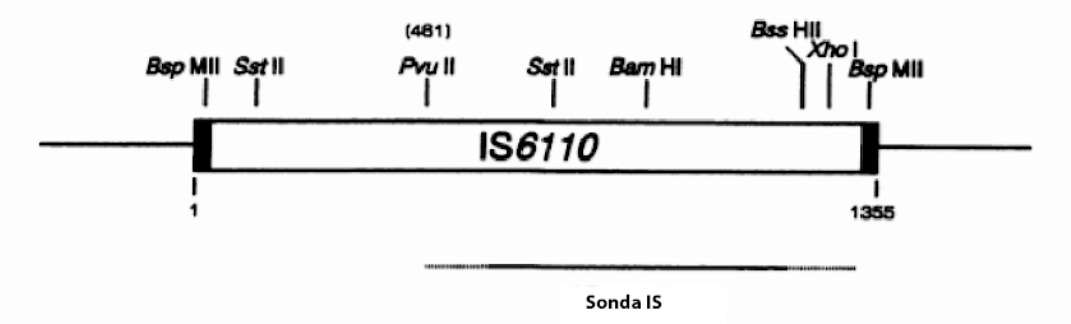


Figura 10. Mapa del elemento de inserción IS6110 de 1,35 Kb de Mycobacterium tuberculosis. Se describe el lugar de corte de varias enzimas de restricción. Imagen tomada de [31].

En 1991 se desarrolló por primera vez la técnica de Spoligotyping[32] que es un método molecular basado en amplificación por PCR de un loci en particular llamado repetido directo (DR). El loci se conforma de sucesivas repeticiones de DRs de 36 pb interespaciadas por secuencias únicas y no repetidas de entre 34 a 41 pb. El locus DR forma parte de las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPRs). Los cebadores para la PCR se diseñan complementarios a la secuencia de DR por lo que la amplificación dará como resultado productos diferentes tamaños que contienen los diferentes espaciadores (figura 11).

El producto de amplificación se hibrida contra una membrana que contiene unidos covalentemente a 43 oligonucleótidos correspondientes a 43 espaciadores y luego se revela la presencia o ausencia de cada señal mediante la amplificación de la misma por métodos quimioluminiscentes. Por ejemplo la cepa control H37Rv se define así ya que tiene 37 de los 43 espaciadores en su secuencia. Las diferentes cepas se diferencian entre ellas de acuerdo a los diferentes espaciadores que contienen.

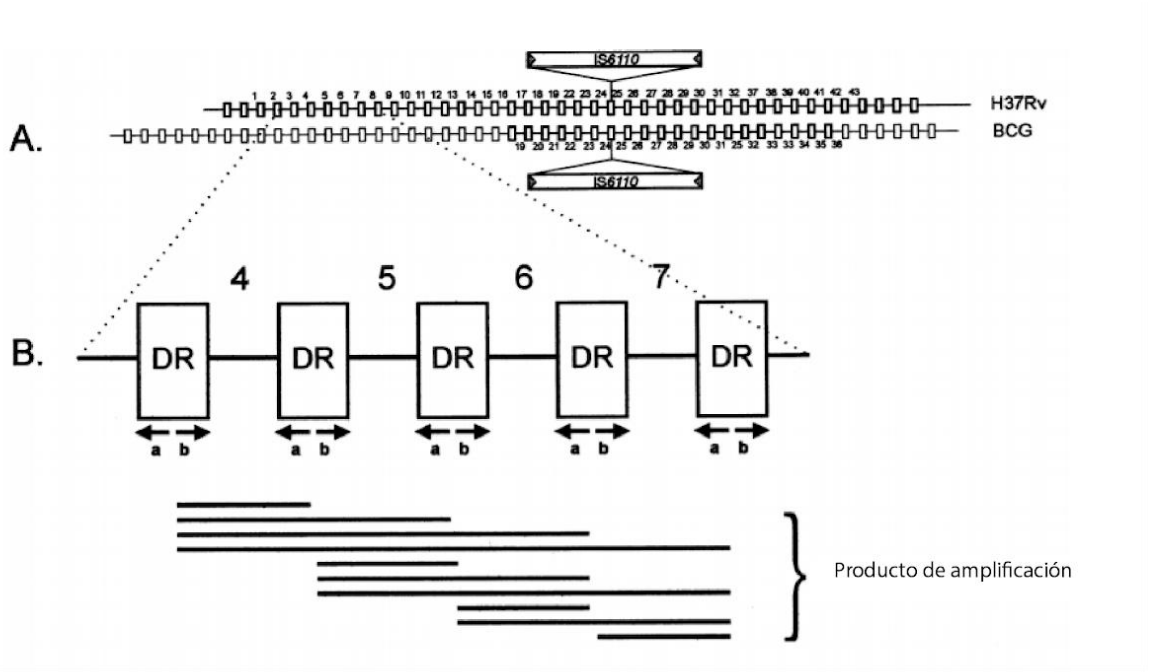


Figura 11. A. Estructura del locus DR en el genoma de *M. tuberculosis*. El número de espaciadores es 37 para H37Rv y 6 para BCG. **B** Mecanismo de amplificación por PCR. Los locus DR sirven como diana para los cebadores. Por lo tanto se obtienen distintos fragmentos de distintos largos. Imagen tomada de [32].

Más recientemente se desarrollaron métodos basados en el estudio de minisatélites. Con el secuenciado del genoma de referencia H37Rv[33] (1998) se descubrieron nuevas secuencias repetidas, altamente polimórficas, llamadas unidades repetidas interespaciadas de mycobacterias (MIRU), de la familia de los repetidos en tándem de número variable (VNTR)[34,35].

Los MIRU-VNTR, también llamados minisatélites, oscilan en el rango de 50 a 100 pb de longitud y pueden presentar entre 1 a 8 repeticiones de cada unidad (figura 12). La metodología consiste en diseñar cebadores que flanquean dichas regiones y amplificarlas por PCR. Luego en un gel de electroforesis o en un secuenciador automático se evalúan los tamaños de los productos. Como el tamaño está dado por el número de copias para cada MIRU, se establece un código de números que describe cuántos alelos tiene cada MIRU.

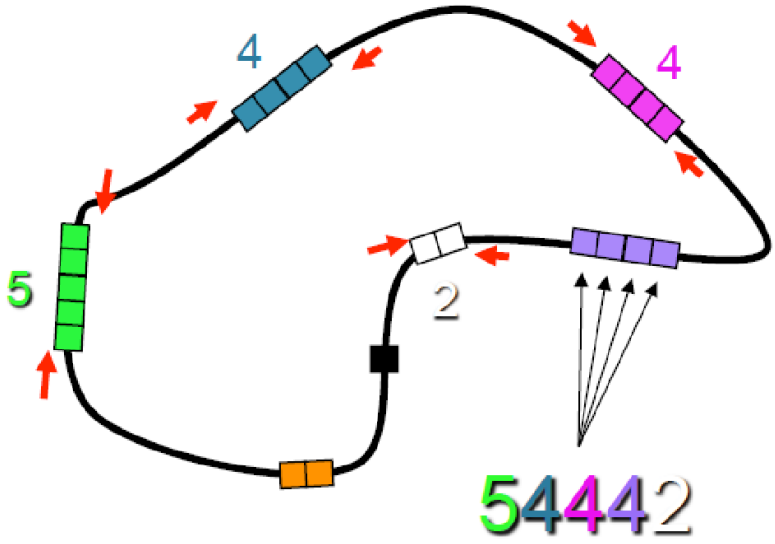


Figura 12. Esquema de la tipificación por VNTR. Cada color representa un minisatélite, cada rectángulo representa una copia de ese minisatélite. De esta forma cada cepa forma un código numérico único. Imagen tomada de [36].

En la actualidad se describieron 24 locus de estas unidades altamente polimórficas, y la variación en la cantidad de repetidos es característica de cada cepa. Es posible utilizar un set de 12, 15 o 24 locus. Un set de 12 locus en combinación con otro método de genotipificación da buenos valores de discriminación[37]. En la actualidad la técnica "gold standard" es utilizar 24 locus de MIRU-VNTR. Esta metodología es utilizada actualmente como poderosos marcadores moleculares a nivel epidemiológico y a nivel del estudio de genéticas de poblaciones.

Últimamente, con el desarrollo de la secuenciación masiva, la secuenciación de genomas completos ha mostrado diferencias con los métodos previos. Actualmente se está evaluando el cambio en los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) como estrategia de tipificación de los aislados[38].

5. Fundamentación de la aproximación experimental: Marcadores moleculares en el hospedero.

Recién en los últimos años se han empezado a describir más indicadores de TBC enfocados en el hospedero. Existe en la literatura evidencia de marcadores biológicos en células hospederas, que se expresan diferencialmente cuando por ejemplo los macrófagos,

son infectadas por *M. tuberculosis*[39]. Más recientemente se está explorando el análisis de exosomas como una nueva y poderosa aproximación en la búsqueda de marcadores biológicos de enfermedad[39].

Las vesículas extracelulares tienen un importante rol en la comunicación célula a célula y se los considera valiosos ya que su contenido podría ser indicativo del estado de una enfermedad o de una condición fisiológica en particular. Por ejemplo: los exosomas y microvesículas derivados de células tumorales llevan firmas moleculares y efectoras de la enfermedad, como oncoproteínas mutantes y transcritos oncogénicos[40].

Días, G. *et al.* analizaron por primera vez la composición proteica de exosomas de macrófagos infectados por *M. tuberculosis* y determinaron que ocurren cambios significativos en la expresión de proteínas dentro de los mismos cuando se comparan macrófagos infectados contra no infectados[41]. Se ha demostrado también que en general los exosomas durante una enfermedad infecciosa pueden contener componentes derivados de los mismos patógenos y que estas vesículas extracelulares pueden contribuir a la diseminación de la infección[42]. En el caso de la tuberculosis se ha visto que exosomas derivados de macrófagos infectados inducen un efecto inhibitorio en la respuesta inmune al bloquear el mecanismo de interferón gamma (INF-γ)[43]. Aunque también hay estudios que muestran lo contrario: aumento de la respuesta inflamatoria al incrementar la producción de INF-γ y del factor de necrosis tumoral-alpha (TNF-α)[44]. Por lo que el rol de los mismos en TBC todavía no está claro[45].

Las vesículas extracelulares son originadas por el sistema endosomal (exosomas) o pueden desprenderse de la membrana celular (microvesículas) (figura 13). En cualquier caso, estas vesículas esféricas rodeadas de membrana celular, contienen en su interior proteínas, lípidos y ácidos nucléicos (ARNm, ARNnc, ADN). Son encontradas en la mayoría de los fluidos biológicos, incluyendo suero, orina, leche materna, saliva, lavado bronquioalveolar y fluido sinovial[46]. Dentro de los ARNnc se encuentran los microARN que han surgido en los últimos tiempos como los candidatos ideales para el desarrollo de biomarcadores de valor diagnóstico. Esto se debe a su importante rol regulador de la expresión génica y a su importancia en la comunicación a distancia. Los microARNs se encuentran presentes en los exosomas[47] donde su degradación por RNasas es más difícil, aunque también pueden ser encontrados en sangre[48] y en esputo[49].

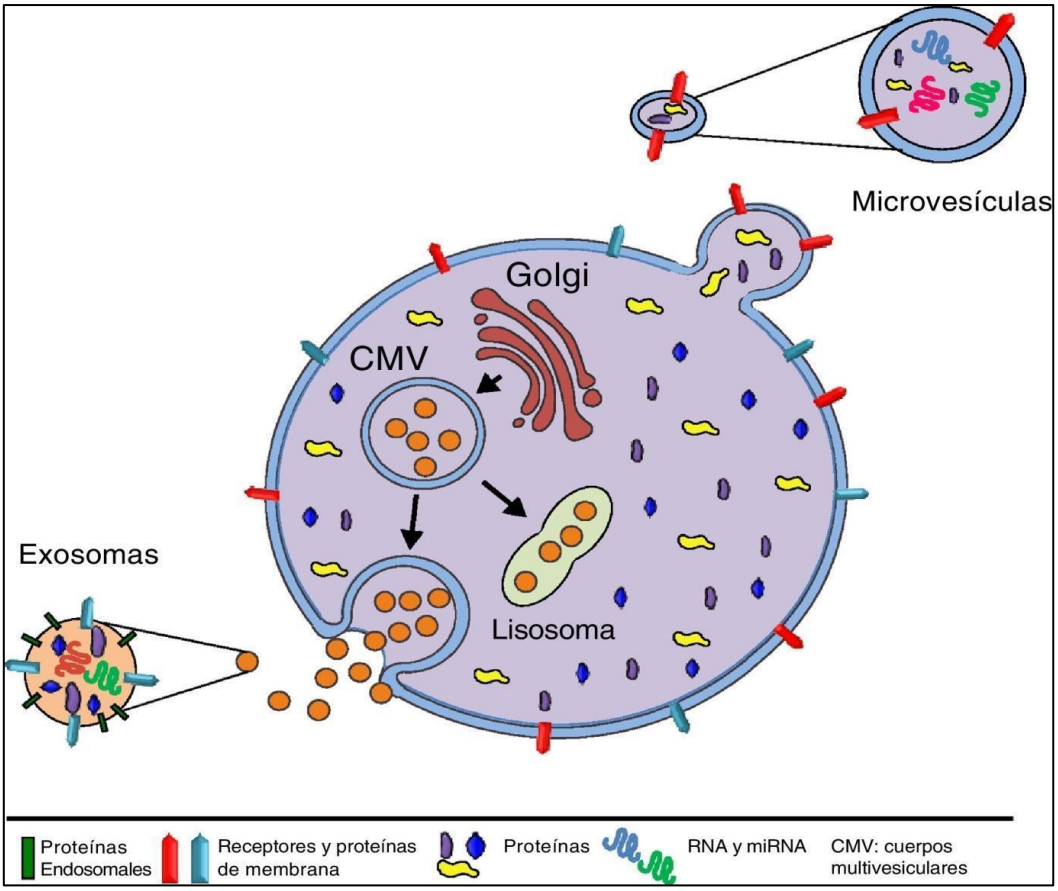


Figura 13. Esquema explicativo de la generación de exosomas y microvesículas. Imagen tomada de [50].

Los microARNs son secuencias cortas (21-23 nucleótidos) de ARN no codificante. Son muy importantes en la regulación post-transcripcional de varios procesos biológicos dentro de la célula (e. g. diferenciación celular, apoptosis). El microARN maduro se une al complejo silenciador inducido por ARN (RISC) que interfiere directa o indirectamente en la regulación postranscripcional de la expresión de un gen determinado. Un mecanismo directo ocurre cuando el microARN unido a RISC puede bloquear el inicio de la traducción al interferir con eIF4F o puede interferir con el ensamblaje del ribosoma. Un mecanismo indirecto implica deadenilación y consecuente degradación del ARNm. Generalmente el microARN se unen a la región 3´ UTR (**un**translated **r**egion) de los ARNm diana por complementariedad de base haciendo que el mensajero sea degradado[51].

Un solo microARN puede regular hasta 200 transcritos diferentes[52]. La expresión de microARN tiene diferentes perfiles dependiendo si los tejidos se encuentran en condiciones normales o en enfermedad. Por ejemplo se ha descrito al miR-21 en vesículas

extracelulares en líquido cerebro-espinal como biomarcador del desarrollo de glioblastoma[53].

Los diferentes perfiles de ARN en exosomas de macrófagos infectados por *M. tuberculosis* muestran ARNm específicos como firma molecular de infección por TBC así como de algunos microARNs del hospedero particulares[54]. Se han reportado expresiones diferenciales de por lo menos tres microARNs exosomales en TBC, incluyendo miR-148a-3p, miR-451a y miR-150-5p[55].

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Tipificación de las cepas de *M. tuberculosis* de pacientes graves de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Español y búsqueda de marcadores moleculares de patogenicidad y virulencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterización genotípica de *Mycobacterium tuberculosis* estudiando la prevalencia de cepas responsables de la enfermedad en los pacientes tuberculosos críticos y su relación con cepas circulantes en la población general.

2. Caracterización de ARNs pequeños circulantes en suero de pacientes con tuberculosis grave mediante secuenciación profunda.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Tipificación de cepas

1. Población de estudio.

El estudio de la tipificación fue realizado con cepas aisladas de pacientes críticos de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Español de ASSE, donde ingresaron por TBC pulmonar grave. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Hospital Español (Agosto 2015 y Julio 2017). Los pacientes ingresaron a dicha Unidad entre los años 2010 a 2018, todos ellos mayores de 18 años y todos desarrollaron cuadros graves de infección por *M. tuberculosis*.

El diagnóstico de TB pulmonar se realizó ante la evidencia de un cuadro clínico-radiológico compatible o de alta sospecha de TBC y/o por confirmación de laboratorio por cultivos positivos para *M. tuberculosis*, baciloscopías positivas para bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) o Gene-XPERT positivo para TBC en secreciones respiratorias.

En el período mencionado se incluyó una población de 91 pacientes diagnosticados de la manera ya mencionada, realizándose en casi todos ellos la extracción de material biológico para cultivo de los bacilos. Las extracciones fueron en su mayoría en muestras de esputo o aspirado traqueal, pero también se realizaron algunas biopsias pulmonares y lavados broncoalveolares.

La población utilizada como control consta de 80 aislados de *M.tuberculosis* seleccionados al azar, obtenidos de la población general, no crítica. A partir del Banco de ADN de la Unidad de Biología Molecular de la CHLAT-EP, se eligieron estas muestras en un mismo período de tiempo y en una proporción similar por años a las muestras obtenidas de la población de estudio.

2. Extracción de ADN

La CHLAT-EP en su laboratorio bacteriológico centraliza toda la bacteriología de la tuberculosis del país. Se realizan cultivos en medio sólido a partir de diferentes muestras biológicas (esputo, aspirado traqueal, lavados broncoalveolares, etc), se estudia la

sensibilidad a fármacos antituberculosos y realiza la dosificación de adenosín deaminasa (ADA).

Un vez que hay un cultivo positivo se procede a la extracción del ADN con el Kit Genolyse (Hain, Alemania). Brevemente, se centrifuga la muestra de cultivo, el pellet obtenido se incuba por 5 minutos a 95°C y luego se agrega buffer de neutralización. El ADN extraído se utiliza directamente y se conserva una alícuota a -20°C formando parte del banco de ADN de aislados de la CHLAT-EP.

3. MIRU-VNTR

A partir del ADN extraído de cada cultivo se realizó la técnica de MIRU-VNTR[56].La amplificación por PCR de los diferentes microsatélites analizados se realizó con cebadores específicos que contienen esas regiones. Se utilizó un set de 15 cebadores en cuatro mixes diferentes como se observa en la tabla 1. Generalmente el cebador reverso se encuentra marcado fluorescentemente en su extremo 3´. Cuatro fluoróforos distintos (Fam, Hex, Ned y Pet) hacen posible su detección conjunta en el secuenciador automático. También es posible la resolución del tamaño en un gel de agarosa 3%. En una zona libre de ácidos nucleicos se preparan los pre-mixes para la reacción de PCR como se observa en la siguiente tabla (tabla 1).

Tabla 1: Composición de los Pre-Mixes para 15 loci MIRU-VNTR. Volúmen en uL.

Pre-Mix	A	B	C	D
Loci	MIRU40 MIRU04 MIRU26 MIRU10	VTNR577 VNTR424 VNTR1955 MIRU31	VNTR2165 VNTR2401 VNTR4156 MIRU16	VNTR2163b VNTR3690 VNTR4052
H_2O	c.s.p. 20uL	c.s.p. 20uL	c.s.p. 20uL	c.s.p. 20uL
10X Buffer	2	2	2	2
dNTPs [a]	2	2	2	2
$MgCl_2$ [b]	1,8	1,2	2,4	1,8
Primers [c]	0,125 (Fam) 0,05 (Hex) 0,25 (Ned) 0,25 (Pet)	0,0625 (Fam) 0,0625 (Hex) 0,125 (Ned) 0,25 (Pet)	0,125 (Fam) 0,0625 (Hex) 0,25 (Ned) 0,125 (Pet)	0,125 (Fam) 0,25 (Hex) 0,25 (Ned)
TaqDNA Polimerasa [d]	0,4	0,4	0,4	0,4
Volumen final	18	18	18	18

El volumen total de cada mix es de 20ul, 18ul corresponden al pre-mix y 2ul corresponden al ADN de la muestra a amplificar **a.** Se realiza un stock 2,5mM de dNTPS. **b**. Se utiliza un stock de 25mM. Las concentraciones finales de $MgCl_2$ son diferentes para cada mix, ya que su concentración varía en función del MIRU-VNTR que se emplea en cada reacción. **c.** Los diferentes pares de cebadores fueron alicuotados a una concentración de 10uM para VNTR577 y VNTR424 y 5uM para el resto. Se almacenan a -20°C protegidos de la luz. **d.** La TaqDNA Polimerasa empleada es de 5 U/ul (Invitrogen, USA).

En otra zona libre de productos de PCR se dispensan 2ul de ADN genómico extraído del cultivo bacteriano. Se incluye para cada mix un control negativo con agua esterilizada y dos controles positivos, uno con H37Rv y otro con una cepa particular caracterizada por la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur. Las condiciones de ciclado son las especificadas en la tabla 2, se realizaron 37 ciclos de PCR y los productos son guardados a 4°C para su futuro uso.

Tabla 2: Condiciones de ciclado MIRU-VNTR

10 minutos	95°C	
30 segundos	95°C	
30 segundos	59°C	37 ciclos
30 segundos	72°C	
10 minutos	72°C	
Hold	4°C	

4. Análisis de los productos de PCR por electroforesis capilar.

Los fragmentos amplificados son combinados con formamida y un marcador de peso molecular. El agregado de formamida se utiliza para estabilizar las hebras individuales que son separadas en la desnaturalización térmica (esquema de corrida, figura 14).

La separación de estos fragmentos se realiza en el secuenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher, USA), mediante electroforesis capilar. Cada fragmento amplificado corresponde a la reacción de uno de los cuatro cebadores que componen un Mix. Se puede relacionar el tamaño con el número de repetidos de ese alelo.

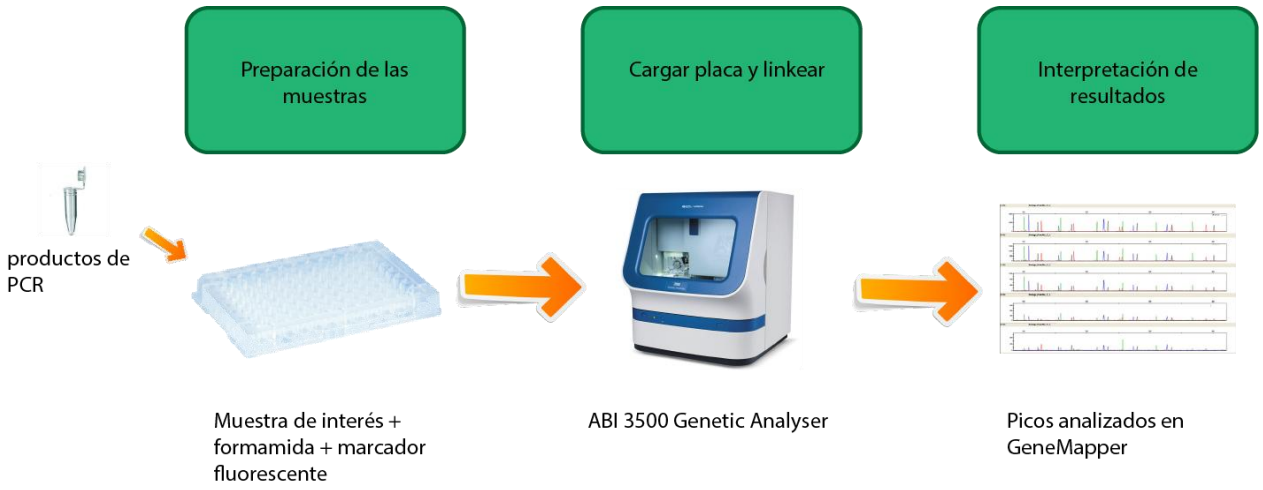


Figura 14. Esquema de corrida para electroforesis capilar en ABI 3500 Genetic Analyzer. Luego de la preparación de la placa se desnaturaliza por calor y se coloca en hielo mientras se prepara el instrumento. Se realiza la corrida de análisis de fragmentos estándar y se analizan los resultados con el software GeneMapper (Life Technologies, USA).

También es posible resolver en un gel de agarosa 3% los distintos productos de amplificación. Como ya se mencionó, los MIRU-VNTR o microsatélites tienen un largo entorno a los 100 pb, y además el número de repeticiones de estos alelos puede variar entre 1 a 8 copias. Se carga en un gel de agarosa 3% y se revela con bromuro de etidio. Cada 5 pocillos en el gel se agrega un marcador de peso molecular de 100pb y se deja correr a 100V por aproximadamente 1 hora. Luego el gel es llevado a un transiluminador y se fotografía con una cámara de fotos para generar un registro y realizar el análisis de la imagen para determinar el tamaño del amplicón.

5. Spoligotyping

La técnica de Spoligotyping se basa en la amplificación por PCR de un locus del genoma de la bacteria llamada DR (repetido directo en inglés). Se observa la ausencia o presencia de 43 regiones inter DR lo que determina el perfil de cada cepa analizada (figura 15).

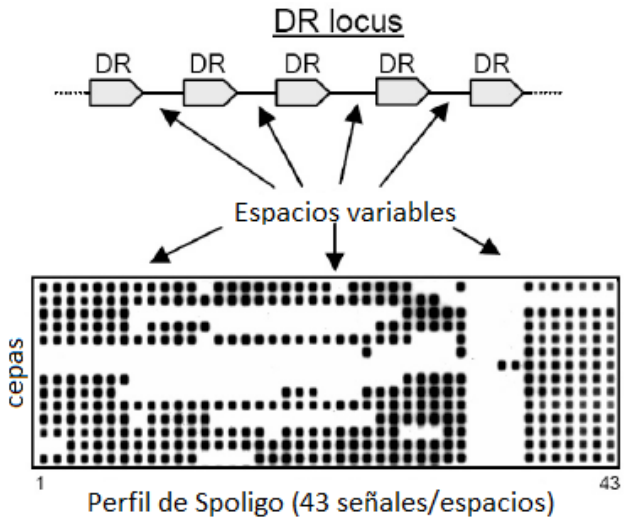


Figura 15. Perfil de Spoligotyping. Ausencia (blanco) o presencia (punto negro) de los espacios variables inter DR.

El protocolo que se utilizó fue "SpoligoTB User's Manual" (Mapmygenome, India). Brevemente, se realiza la amplificación de las regiones inter-DR, luego se realiza la hibridación con una membrana que contiene los 43 oligonucleótidos (correspondientes a las regiones inter-DR) y por último se revela la presencia o ausencia de cada región mediante la amplificación de la señal con un sustrato de peroxidasa para quimioluminiscencia mejorada (ECL). Uno de los cebadores se encuentra biotinilado para este propósito.

La reacción de amplificación fue como se describe en la tabla 3 y el tiempo de ciclado en la tabla 4. Todos los buffers utilizados en el protocolo son precalentados antes de usarse.

Tabla 3. Mix de reacción de PCR para Spoligotyping

DRa primer 20pmol(*)	2 uL
DRb primer 20pmol	2 uL
Buffer E 2X Fail Safe	12,5 uL
Polimerasa Fail Safe (5 unidades/uL)	0,2 uL
H_20 MQ	6,3 uL
DNA molde	2 uL

Volumen final 25 uL. (*)El primer DRa está biotinilado.

Tabla 4. Ciclo de Amplificación para Spoligo

3 min	96°C	
1 min	96°C	
1 min	55°C	20 ciclos
30 sec	72°C	
5 min	72°C	

A partir de la amplificación se procede a la incubación con la membrana. Primero se agrega 150uL de buffer 2x SSPE/0,1% SDS a los productos de PCR y se desnaturaliza 10 minutos a 99°C. Paralelamente se hace un lavado de la membrana con 250 mL 2XSSPE/0,1 SDS por 5 minutos a 60°C (ver composición de los bufferes en ANEXO I). A continuación se ensambla el soporte como se ilustra en la figura 16 dentro del blotter MN 45minibloter (Immunetics, USA).

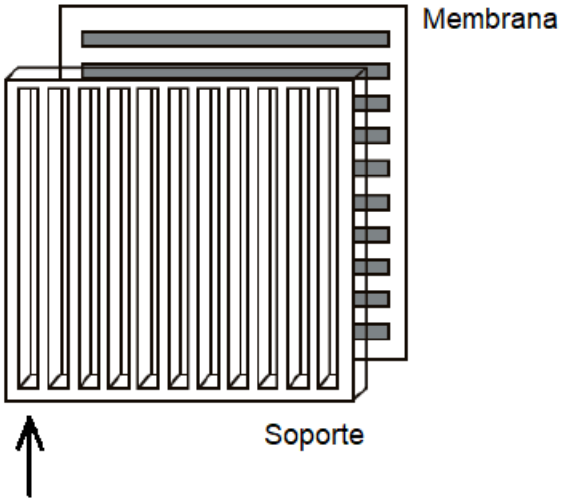


Figura 16. Representación del armado del soporte para Spoligotyping. Las líneas grises horizontales de la membrana representan cada una, sondas de un oligonucleótido conocido pegado a la misma. La flecha indica la primer ranura por donde se coloca la primer muestra. El soporte incluye una base que no se muestra en la figura, de modo que la membrana queda entre medio.

El siguiente paso es incubar durante una hora a 60°C. A continuación se realizan dos lavados con 250mL 2xSSPE/0,5% SDS de 10 minutos a 60°C y luego se incuba con estreptavidina conjugado a peroxidasa (500U/mL) durante 1 hora a 45°C. La estreptavidina reconoce los fragmentos biotinilados. Por último se realizan dos lavados con 250mL 2xSSPE/0,5% SDS 10 minutos a 45°C y se releva la presencia de los productos con el Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA) donde la peroxidasa conjugada reacciona con el sustrato del Kit.

B. Marcadores moleculares en el hospedero

1. Población de estudio

Para la búsqueda de marcadores moleculares en el hospedero se realizó la extracción de ARN total a partir de suero de una subpoblación de los pacientes críticos mencionados anteriormente. Esta subpoblación está comprendida por 29 pacientes a los cuales se les inició el tratamiento luego del diagnóstico clínico y/o confirmación bacteriológica para TBC-activa grave. Se utilizaron los sueros del primer día de tratamiento, antes de administrarles antibióticos.

2. Extracción de microARNs

La extracción de ARN total de suero, se realizó con el Kit comercial Quick-cfRNA Serum and Plasma (ZYMO Research, USA), que incluye también la extracción de los ARNs pequeños de interés. A partir de ahí se fabricaron las bibliotecas para secuenciar microARNs en el secuenciador MiSeq (Illumina, USA). Se construyeron las bibliotecas con el kit NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (Multiplex Compatible)" (New Englands BioLabs, USA) que implica la hibridación de los ARNs pequeños con una serie de adaptadores en el extremo 3´y 5´de la secuencia a analizar y además un índice con el cual se identifica cada muestra.

El protocolo de trabajo comienza a partir del ARN purificado de cada muestra, donde el primer paso para la construcción de las bibliotecas implica la unión de un adaptador 3´ para Illumina (figura 17 a)

Figura 17-a. Esquema de trabajo para la construcción de librerías de ARNs pequeños. ARN de partida (rojo) Ligación del adaptador 3´ (azul). Modificación del esquema original del Manual "NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (Multiplex Compatible)" (BioLabs, USA).

El siguiente paso es importante para prevenir la formación de dímeros de adaptadores, para ello se agrega el cebador RT (figura 17 b). Este cebador se une al adaptador ya hibridado con los fragmentos de ARN pero también con adaptadores libres del primer paso

que no pudieran unirse, de esta forma se generan moléculas doble hebra de los adaptadores.

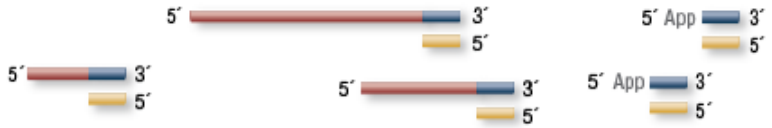


Figura 17-b. Esquema de trabajo para la construcción de librerías de ARNs pequeños. Cebador RT (amarillo). Se une tanto al adaptador 3´ que se encuentra unido al ARN como a adaptadores libres.

En el siguiente paso, se realiza la ligación del adaptador 5´ para Illumina y la enzima que cataliza la reacción no toma como sustrato ADN doble hebra, por lo que finalmente se obtendrán hebras simples de ARN con adaptadores 3´y 5´hibridados (figura 17-c).

Figura 17-c. Esquema de trabajo para la construcción de librerías de ARNs pequeños. Adaptador 5´(verde).

El próximo paso es la reacción de la retrotranscriptasa reversa que generará ADN copia de los ARN de interés (figura 17-d) y luego se realiza la amplificación por PCR con el agregado de los índices que son secuencias de reconocimiento particulares, que permiten incluir diferentes muestras en una misma corrida de secuenciación.

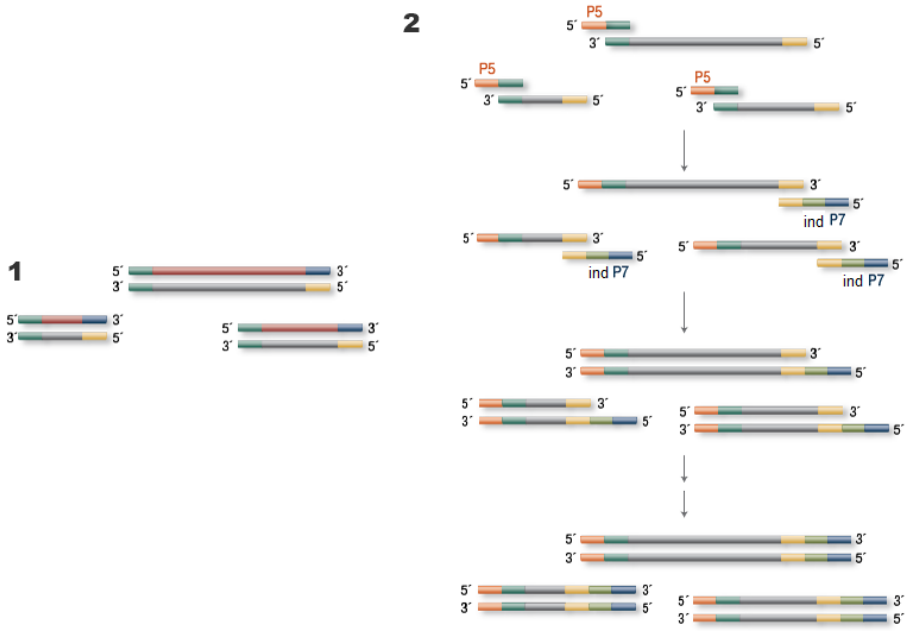


Figura 17-d. Esquema de trabajo para la construcción de librerías de ARNs pequeños. **1-** ADN copia (gris) generado por la acción de la retrotranscriptasa reversa. **2-** amplificación por PCR del ADN copia junto con los índices (azul oscuro). Al final se obtienen varios tamaños de ADN copia con sus correspondientes índices.

Las bibliotecas obtenidas (ADN copia) se purificaron con el Kit comercial PureLink (Invitrogen, USA) y para seleccionar el tamaño correspondiente a los microARNs, se corren las muestras en un gel de poliacrilamida 6% a 120V durante 1 hora. Luego se recortan las bandas a la altura de ~150 pb (figura 18), se purifica y se precipita el ADN. Finalmente se resuspende en 12 uL de H_2O MQ.

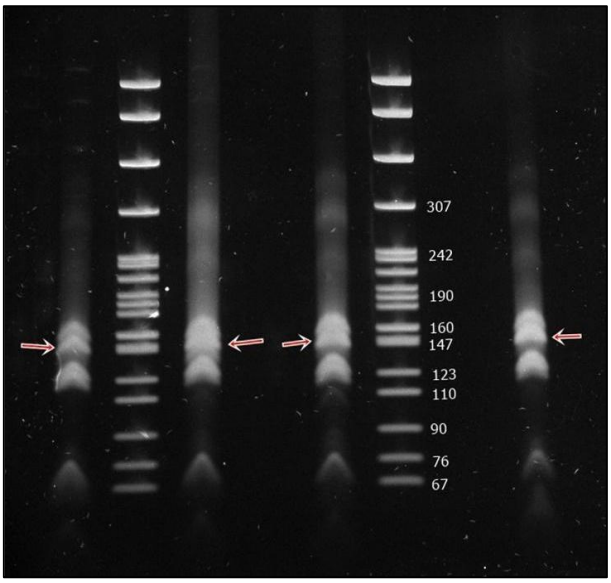


Figura 18. Gel de poliacrilamida 6%, corrida de librerías de ARN total. Las flechas en rojo indican el tamaño de las librerías para microARNs (~150pb). Se utilizó el marcador de peso molecular Quick-Load pBR322 DNA-MspI Digest. El tamaño está en pares de bases.

Se realizaron controles de calidad, tamaño y concentración de cada biblioteca utilizando un chip de ADN de alta sensibilidad (High Sensitivity DNA chip, Agilent, USA) en un Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA), de acuerdo a las instrucciones del equipo (figura 19).

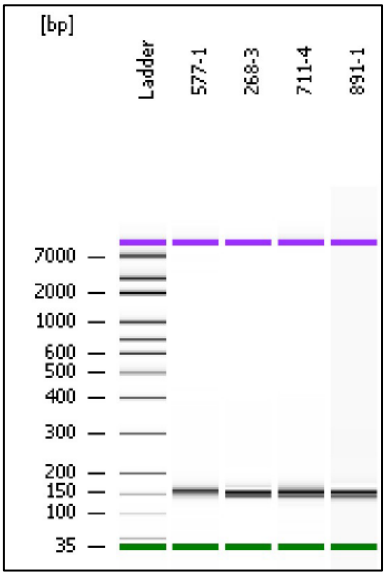


Figura 19. Corrida electroforética de librerías ADNc purificada de interés en Bioanalyzer 2100. El marcador de peso molecular indica que las bandas presentes en las cuatro librerías corresponden a ~150pb (tamaño esperado de bibliotecas).

3. Secuenciación de microARNs purificados

Luego de la obtención de las bibliotecas, las mismas fueron cuantificadas en un fluorómetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher, USA), de acuerdo al protocolo del fabricante, para determinar su concentración (en ng/ml) y en base a ello determinar también la proporción de cada muestra a secuenciar.

Se corrió un pool de librerías en una flow-cell para el secuenciador Miseq (Illumina, USA) y las secuencias obtenidas se analizaron con las herramientas disponibles de http://bioinfo5.ugr.es/srnatoolbox[57]. sRNAtoolbox cuenta con diferentes tipos de análisis para generar perfiles de expresión diferencial de microARN a partir de datos de secuenciación de alto rendimiento. Permite entre otras cosas utilizar flujos de trabajo para visualizar el contexto genómico en función del largo, puede predecir genes diana y mapeo de lecturas sin asignar, etc.

V. RESULTADOS

1. Tipificación de cepas - MIRU-VNTR

Se recolectaron datos de los pacientes críticos, como la edad, el sexo, año de internación, necesidad de ventilación artificial, comorbilidades y mortalidad. La mayoría de las veces presentaron disfunciones multiorgánicas y una mortalidad elevada. En algunos casos donde se realizó la autopsia, se observó una destrucción notoria del parénquima pulmonar y se confirmó el diagnóstico clínico por estudio anatomopatológico.

En la tabla 5 se resumen las principales características de los pacientes y los desenlaces. Se desprende de esta tabla que la población con TB grave tiene un promedio de edad entorno a los 40 años y el 67% de pacientes fueron hombres. Se constató que en el 70% de los casos requirieron ventilación artificial por la severidad de la insuficiencia respiratoria. Además las comorbilidades más frecuentes fueron desnutrición (73%), tabaquismo (70%) y abuso de drogas (42%). También es importante mencionar que hubo coinfección con VIH en el 19% de los casos y que el 21% del total de pacientes se encontraban en situación de calle. Por último se constata una mortalidad del 45% de los pacientes analizados.

Tabla 5. Principales características de los pacientes y sus desenlaces

	n=91
Edad, media (DS)	41 (15)
Hombres, n (%)	61 (67)
APACHE, media (DS)	19 (10)
Ventilación mecánica, n (%)	62 (70)
Localización pulmonar	75 (82)
Comorbilidades	
Tabaquismo, n (%)	62 (70)
Consumo de drogas, n (%)	38 (42)
HIV, n (%)	17 (19)
Desnutrición, n (%)	66 (73)
Condiciones Socio-económicas	
Situación de calle, n (%)	19 (21)
Hacinamiento/privación de libertad, n (%)	19 (21)
Desenlaces	
Ventilación Mecánica, días (mediana, RIQ)	4 (0-12)
Estancia en UCI, días (mediana, RIQ)	8 (5-19)
Mortalidad en UCI, n (%)	41 (45)

Del total de 91 pacientes estudiados se pudo obtener 61 muestras de ADN del cultivo de los bacilos. El resto de los ADNs no fue posible obtenerlos ya que en algunos casos los cultivos fueron negativos o hubo material insuficiente para cultivo. En pocos casos, hubo inconsistencia en la identificación de los pacientes en la base de datos de la CHLAT-EP y finalmente existieron pacientes repetidos en los cultivos.

Para la anotación de los resultados de MIRU-VNTR y en particular para el análisis de los mismos se construyó un código de números. Cada número representa el alelo amplificado para un MIRU-VNTR dado. El análisis de todos los MIRU-VNTR para todas las muestras en el secuenciador automático es más rápido de analizar y de mucha mayor sensibilidad que el gel ya que mide la fluorescencia de los productos amplificados. La electroforesis capilar se analiza con el software GeneMapper y el resultado se visualiza como un gráfico de intensidad en función de tiempo de corrida (figura 20). A cada MIRU de cada muestra le corresponde un pico de color (correspondiente a un cromóforo). Finalmente se obtiene para cada cepa analizada un código numérico. Las tablas 1 y 2 del ANEXO II resumen los resultados de tipificación por MIRU-VNTR para las cepas de la población de estudio y población general respectivamente.

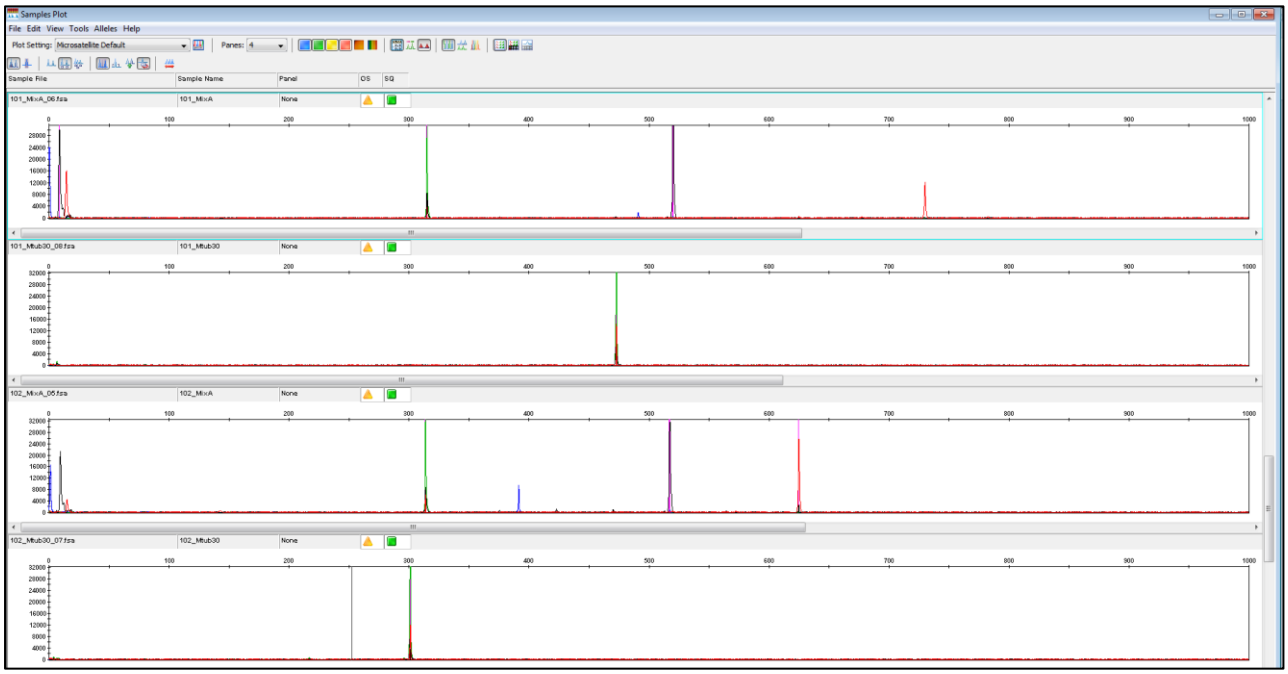


Figura 20. Visualización de los picos de una corrida de fragmentos para MIRU-VNTR. Software utilizado GeneMapper. Cada panel indica una muestra. En el ejemplo se analizan los picos para el MixA. Los picos azules corresponden al alelo amplificado para el MIRU 40, los verdes al MIRU 04, los negros al MIRU 26 y los rojos al MIRU 10. En la figura se muestra el resultado de cuatro pacientes.

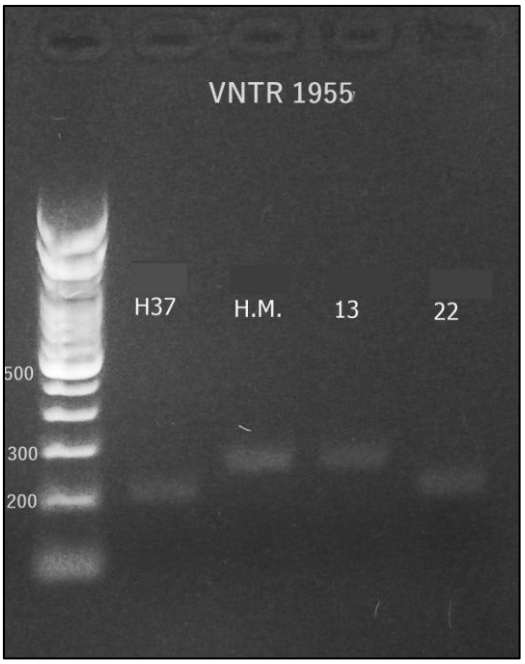


Figura 21. Gel de electroforesis 3% agarosa del MIRU-VNTR 1955. Las bandas reveladas con bromuro de etidio dejan ver el alelo amplificado para las muestras 13 y 22. Los primeros dos carriles corresponden a los controles H37 y HM.

El tamaño de los repetidos también puede verse claramente en un gel de electroforesis como el de la figura 21. En este caso se amplificó individualmente el MIRU-VNTR 1955 para dos muestras de pacientes que no habían amplificado en la primera ronda de PCR. En este caso se obtuvo el alelo 2 y el alelo 3 para las muestras 22 y 13 respectivamente.

En algunos casos no se pudieron determinar los alelos y en las tablas se anota como un guión (-). En particular, para el MIRU04, el alelo correspondiente para la cepa control H37 se anota 3´, y en general hay algunas muestras que presentan el mismo alelo.

2. Tipificación de cepas - Spoligotyping

Los resultados del Spoligotyping se observan como los obtenidos en la figura 22 una vez que la membrana es revelada por fotografía de larga exposición en el equipo G:Box utilizando el control de luz Blue epi. Cada rectángulo blanco significa presencia de región inter DR. La ausencia de esta región se ve como un rectángulo vacío o negro. La presencia se anota con 1 y la ausencia con 0, generando al igual que en MIRU-VNTR, un código numérico que facilita el análisis comparativo entre las distintas poblaciones.

La cepa BCG (Bacillus de Calmette y Guérin) fue utilizada en conjunto con H37Rv como controles positivos de los experimentos ya que se conocen los perfiles de Spoligotyping para ambas (figura 23)[32]. Los resultados obtenidos para todas las muestras incluyendo la población control, se resume en la tabla 3 del ANEXO II.

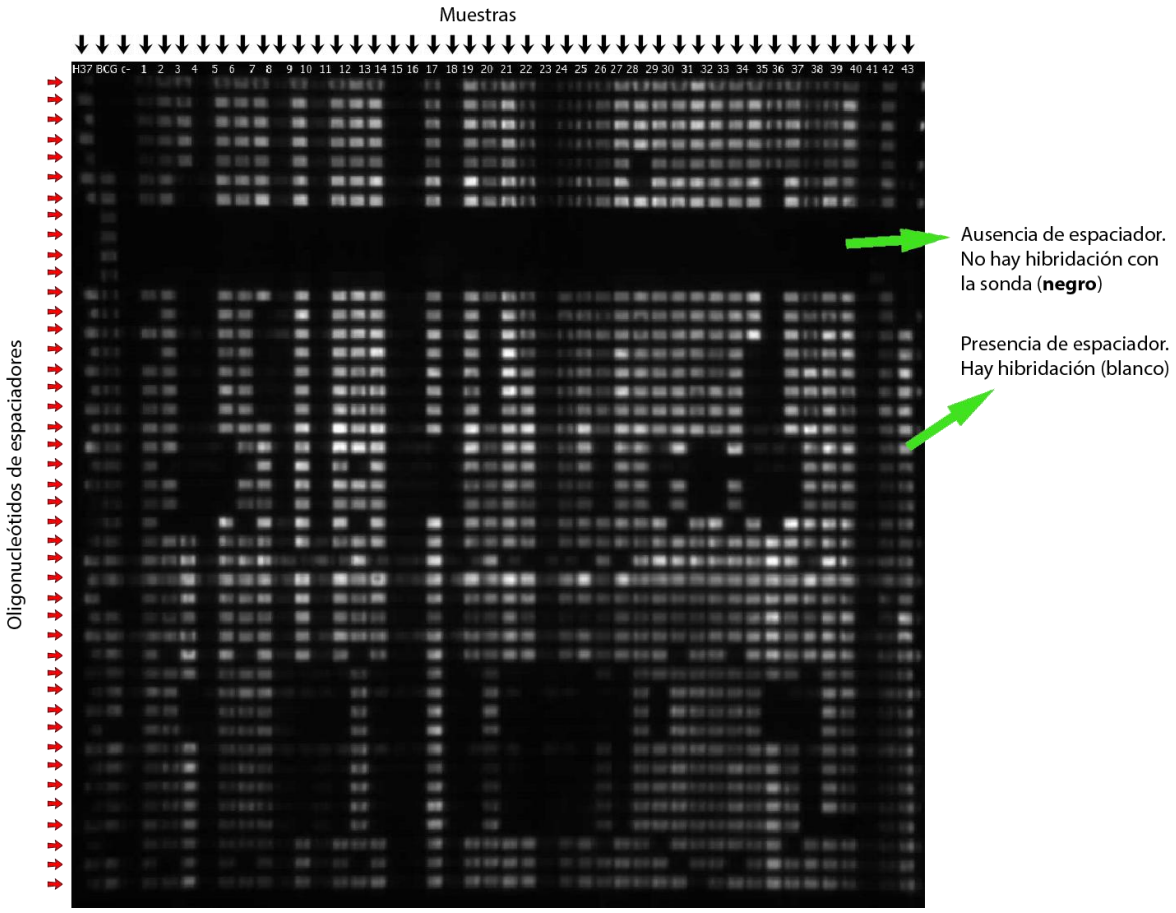


Figura 22. Revelado Spoligotyping. Rectángulo blanco significa presencia de la región intra DR. En negro ausencia de la región. La flecha negra vertical indica dónde se colocó cada muestra (de izquierda a derecha cada columna corresponde a H37Rv, BCG control negativo (c-) y las muestras de ID: 1 a 43). La flecha roja horizontal indica cada uno de los oligonucleótidos (espaciadores) pegados a la membrana.

Se realizaron un total de seis Spoligotyping para completar el total de muestras de pacientes críticos (n=61) y de la población control (n=80). A simple vista se puede observar que existen distintos tipos de patrones de hibridación, lo que habla de la variedad de cepas presentes en las poblaciones analizadas.

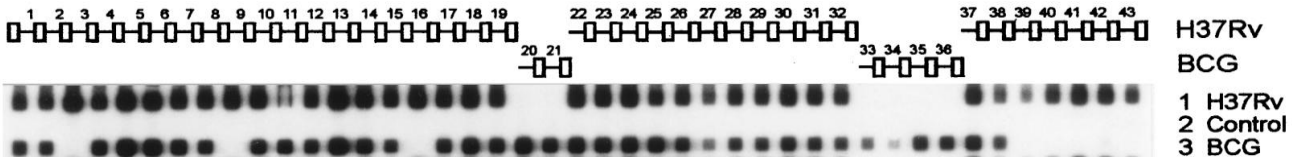


Figura 23. Patrón de Spoligotyping para H37Rv y BCG. El orden de los espaciadores numerados, corresponde al orden en el genoma. Imagen obtenida de Kamerbeek et al. J. Clin. Microbiol 1997.

Se analizaron los datos descritos en las tablas anteriores, tanto de MIRU-VNTR como de Spoligotyping, en el servidor online www.miru-vnterplus.org para obtener un árbol filogenético de tipo UPGMA (figura 24). Este árbol agrupa las cepas en familias de acuerdo a la similitud entre ellas. Se puede observar a la derecha el patrón de Spoligotyping y no se muestran aquí los datos de MIRU para simplificar la interpretación. Las cepas en amarillo corresponden a las poblaciones analizadas y de ellas se identificaron con una flecha las cepas agrupadas de los pacientes críticos.

A partir del árbol se obtuvieron las proporciones de familias que se resume en la tabla 6, y en la figura 25 se ordenan por el año de internación y por poblaciones (HE para los pacientes críticos y CTL para la población en general).

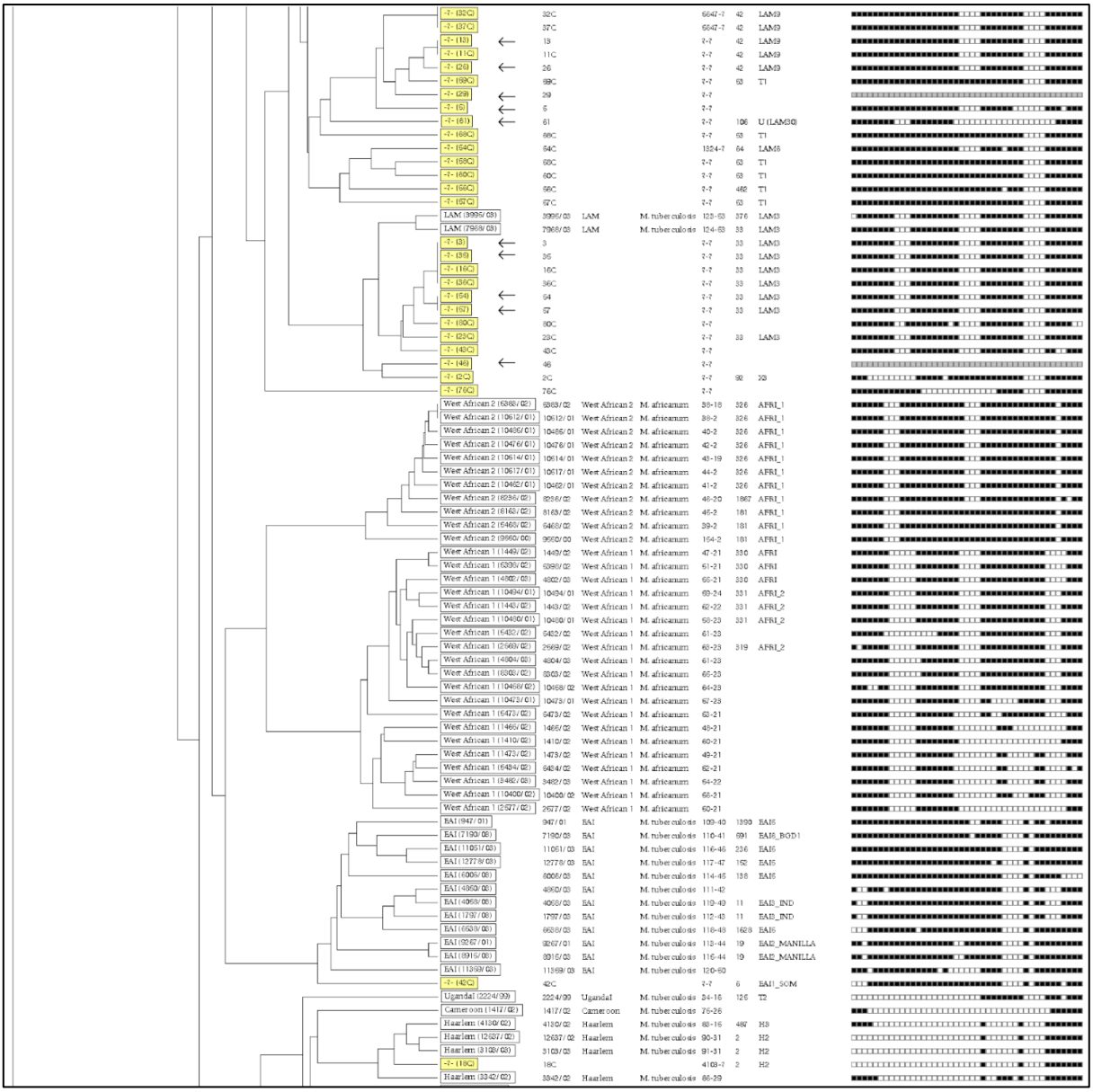


Figura 24. Se muestra parte del árbol filogenético del tipo UPGMA. El árbol completo se encuentra en el ANEXO III. Los datos de MIRU (no mostrado) y Spoligotyping (columna derecha) se combinan para generar el árbol. Se indica en amarillo tanto las cepas de la población de estudio como las cepas de la población general. Las flechas negras indican las cepas que corresponden a la población de pacientes graves. Árbol generado en www.miru-vnterplus.org.

De estos gráficos se observa un aumento significativo de la cepa Haarlem en los pacientes graves en comparación con las cepas circulantes de la población general (T-test $p < 0.05$). También se observa que esta familia está presente entre las cepas circulantes en todo el período de estudio (figura 25), pero en los últimos 4 o 5 años hay mayor cantidad de Haarlem en los pacientes de cuidados intensivos que en la población general.

También se puede notar que no hay cepas de la población general en el año 2014. Esto ocurrió en la selección al azar de la población general, cuando no se había considerado un criterio de cantidad mínima de cepas por año. Igualmente las muestras de pacientes críticos en esos años son muy bajas, registrándose únicamente tres casos. Es necesario aumentar el número de casos en ese año particular y mejorar los números de casos totales para un análisis poblacional más significativo.

Tabla 6. Familias de *Mycobacterium tuberculosis* de la población en estudio del Hospital Español (HE) y de la población en general (CTL).

Genotipo	HE	CTL	% HE	% CTL
EAI	0	1	0	1.25
Ghana	1	0	1.64	0
Haarlem	30	33	49.18*	41.25
Lam10	7	14	11.48	17.50
Lam9	6	9	9.84	11.25
Lam3	17	21	27.87	26.25
S	0	1	0	1.25
X	0	1	0	1.25
Total	61	80	100	100

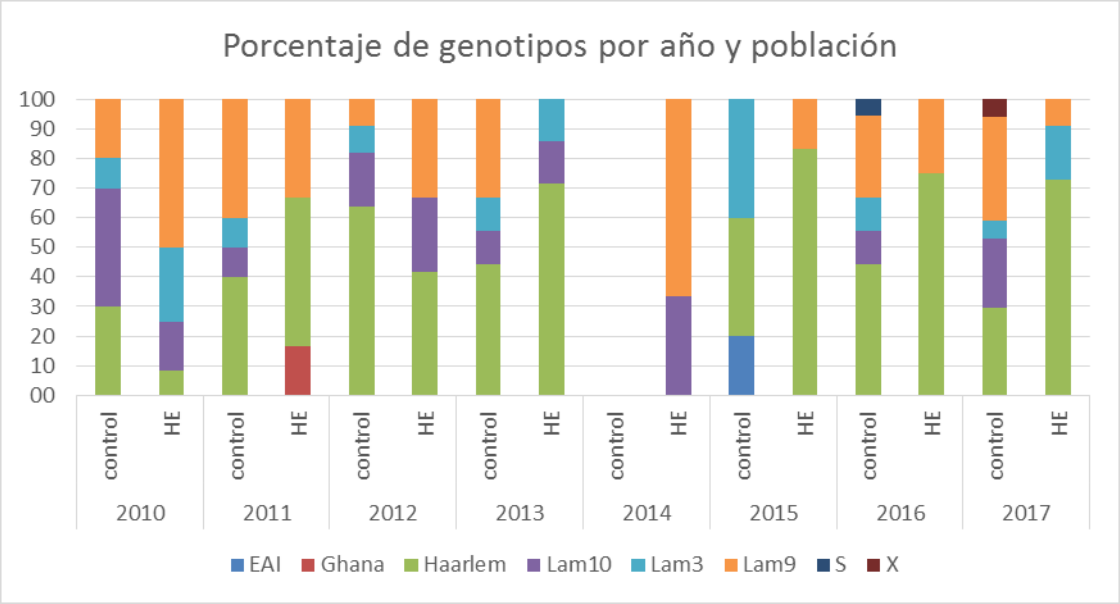


Figura 25. Gráfico de barras de las familias presentes en las dos poblaciones por año de muestreo. No hay muestras controles del año 2014.

3. Marcadores moleculares en el hospedero

Luego del diagnóstico y la confirmación de TBC-activa en los pacientes estudiados, en la UCI del HE se recolectó distintos tipos de muestras biológicas. Se extrajo suero, sangre y orina de 29 pacientes, antes de iniciar el tratamiento (día 1) y a los tres y siete días de iniciado el mismo. Para la búsqueda de marcadores moleculares solamente se trabajó con el suero extraído en el día 1, antes de recibir antibióticos. Todas las muestras biológicas fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

Se realizaron 32 corridas de las cuales la gran mayoría supera el millón de lecturas. Luego se removieron las secuencias correspondientes a los adaptadores con el programa Cutadapt[58] y se seleccionaron aquellas corridas que tuvieran una calidad buena (Q>30) luego de haber quitado los adaptadores. En general las secuencias mapearon en el entorno de 80% contra el genoma humano (g.h.38). En la tabla 7 se resaltan las 16 corridas seleccionadas (promedio de 1 millón de lecturas) sobre las cuales se realizaron los siguientes análisis informáticos.

Tabla 7. Tabla informativa de las corridas de secuenciación.

	Nombre Secuencia	Cantidad de Secuencias Iniciales	Cantidad de secuencias después de trimming	Porcentaje de trimming (%)	Cantidad de secuencias que mapean contra genoma humano (1 vez)	Secuencias que no mapean	Porcentaje de mapeo
1	34949236D1.fastq.gz	737423	228847	31			
2	34949236D7.fastq.gz	512056	138880	27			
3	4758660D1.fastq.gz	279890	109892	39			
4	4758660D3.fastq.gz	647635	258019	40			
5	34942363D1.fastq.gz	399400	248290	62			
6	3494236D71.fastq.gz	181647	11191	6			
7	34949236D1.fastq.gz	245249	20770	8			
8	40851756D1.fastq.gz	192093	51498	27			
9	43052246D1.fastq.gz	1237810	1090344	88	132136	75778 (6.95%)	93.05%
10	47577616D1.fastq.gz	288506	153466	53			
11	4758660D1.fastq.gz	113396	32923	29			
12	4758660D3.fastq.gz	257689	41712	16			
13	101-8.fastq.gz	3080508	2947932	96	1363826	188070 (6.38%)	93.62%
14	127-5.fastq.gz	1689659	1485199	88	298779	97132 (6.54%)	93.46
15	203-0.fastq.gz	1431326	1373432	96	416951	82041 (5.97%)	94.03%
16	206-3.fastq.gz	1758656	1685161	96	759596	76772 (4.56%)	95.44%
17	615-5.fastq.gz	2694815	2188503	81	783460	139064 (6.35%)	93.65%
18	236-4.fastq.gz	540176	246726	46			
19	268-3.fastq.gz	355433	82678	23			
20	455-4.fastq.gz	726486	657240	90	235846	81772 (12.44%)	87.56%
21	711-4.fastq.gz	618608	170551	27			
22	891-6.fastq.gz	845079	296206	35			
23	891-6.fastq.gz	373134	323259	87			
24	268-3.fastq.gz	454667	449730	99	18835	30452 (36.83%)	63.17%
25	577-1.fastq.gz	241425	233312	97	11129	55022 (23.58%)	76.42%
26	711-4.fastq.gz	907365	893914	98	218330	46466 (5.20%)	94.80%
27	891-1.fastq.gz	426722	417481	98	89519	30231 (7.24%)	92.76%
28	175-6.fastq.gz	776331	732711	94	235182	136329 (18.61%)	81.39%
29	224-6.fastq.gz	160208	159663	99	90855	7355 (4.61%)	95.39%
30	397-7.fastq.gz	1184486	1084470	92	15139	61525 (5.67%)	94.33%
31	522-0.fastq.g	724835	686458	95	328048	76300 (11.12%)	88.88%
32	707-6.fastq.gz	521069	394322	76	44703	20124 (5.10%)	94.90%

En verde se marcan las 16 corridas que se utilizaron para el análisis diferencial. Las columnas indican la cantidad de secuencias iniciales, la cantidad de secuencias luego de haber cortado los adaptadores y el porcentaje de secuencias remanentes luego del trimming. Un porcentaje bajo es indicativo de un mal reconocimiento de adaptadores.

La herramienta sARNbench fue utilizada para mapear las secuencias de microARNs de suero contra el genoma humano (GRCh38.p10). En la figura 26 se muestra la composición de los tamaños de ARN en una muestra. Entre otras asignaciones, se observa que las secuencias de longitudes de 21 a 23 nucleótidos corresponden con secuencias anotadas como microARN en la base de datos miRBASE. Asimismo, se secuenciaron fragmentos de mayor tamaño y menor tamaño, donde se destacan algunos correspondientes a ARNr y ARNt. Un porcentaje alto de secuencias mayores a 40 nt no son asignadas por el programa, pudiendo corresponder a secuencias de *M. tuberculosis*.

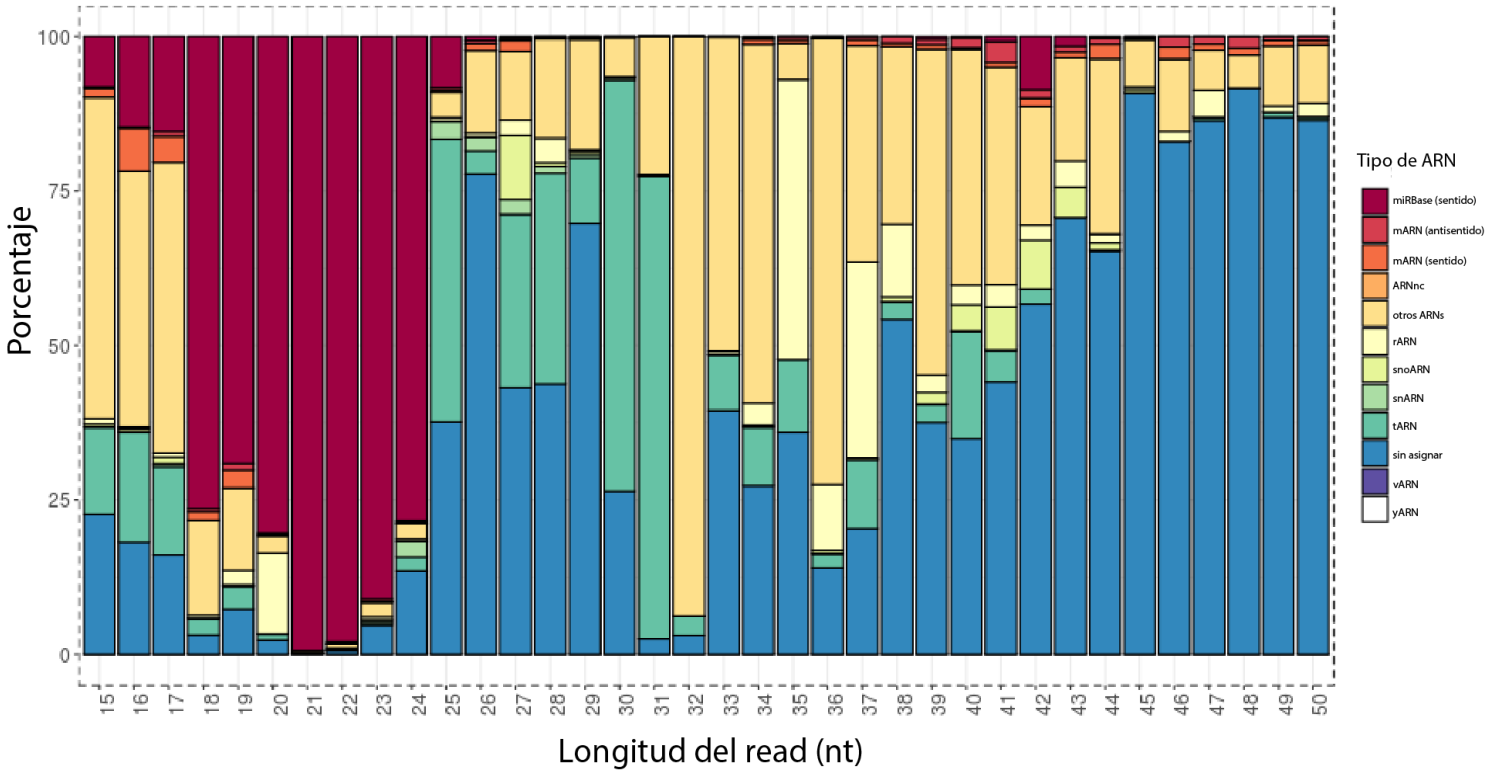


Figura 26. Distribución ARNs pequeños en función de la longitud del read para una muestra de suero en particular.

El programa también ofrece la visualización de los microARNs más expresados que mapean contra la base de datos miRBASE (figura 27). Para esta corrida el microARN más expresado corresponde al miR-451a (300000 secuencias por millón de secuencias mapeadas). Además en la amplia mayoría de las muestras analizadas (15/16) este microARN encabeza el top 10 de microARNs expresados en suero. Solamente en una de las 16 muestras analizadas, el miR-451a no aparece en el top 10 de microARNs expresados. Otros microARNs que aparecen sistemáticamente en el top 10 son miR-148a y miR-122.

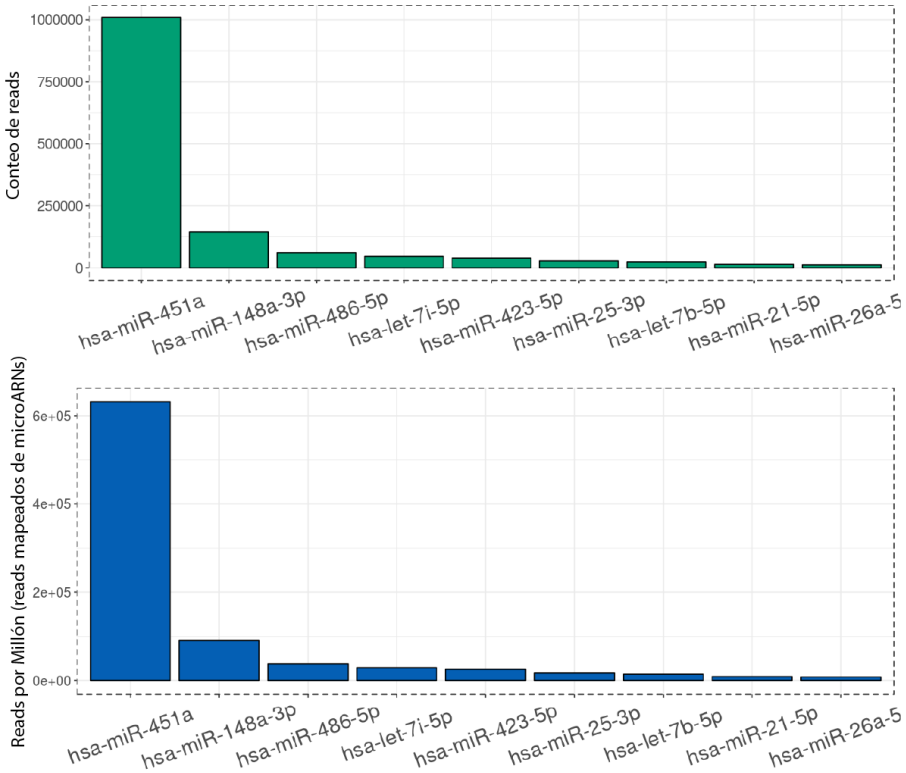


Figura 27. Top 10 de microARNs expresados en suero de una muestra particular. En verde se muestra el conteo de secuencias totales y en azul el número normalizado como total de secuencias por millón de secuencias mapeadas.

4. Marcadores moleculares en el hospedero - Análisis de expresión diferencial.

La herramienta de análisis de expresión diferencial de ARNs pequeños fue utilizada para 16 de las 61 muestras de pacientes graves y se cotejaron con 5 sueros de personas sin TB de una base de datos pública del Sequence Read Archive del NCBI (Número de acceso: PRJNA296772).

El software sRNAde permite este análisis y se obtienen dos tipos de resultados. Primero se genera un mapa de calor de expresión diferencial (figura 28) y en segundo lugar permite evaluar esta diferencia por medio de tres programas frecuentemente utilizados en otros estudios: edgeR, DESeq y NOISeq. Además se genera un archivo consenso para identificar sólo aquellos microARNs que son detectados como diferencialmente expresados en más de uno de los programas anteriores.

Los resultados muestran las expresiones diferenciales de microARNs entre las muestras y los controles. A simple vista se pueden diferenciar los dos grupos y algunos microARNs que se expresan en un grupo, pero no lo hacen en el otro.

La tabla 8 resume el archivo consenso generado por al menos 2 de los programas descritos anteriormente para la expresión diferencial de microARNs. Se muestra el p valor de aquellos diferencialmente expresados. Como se puede observar, los miR-451 y miR-375 son los únicos dos que fueron identificados por al menos 2 programas, como diferencialmente expresados.

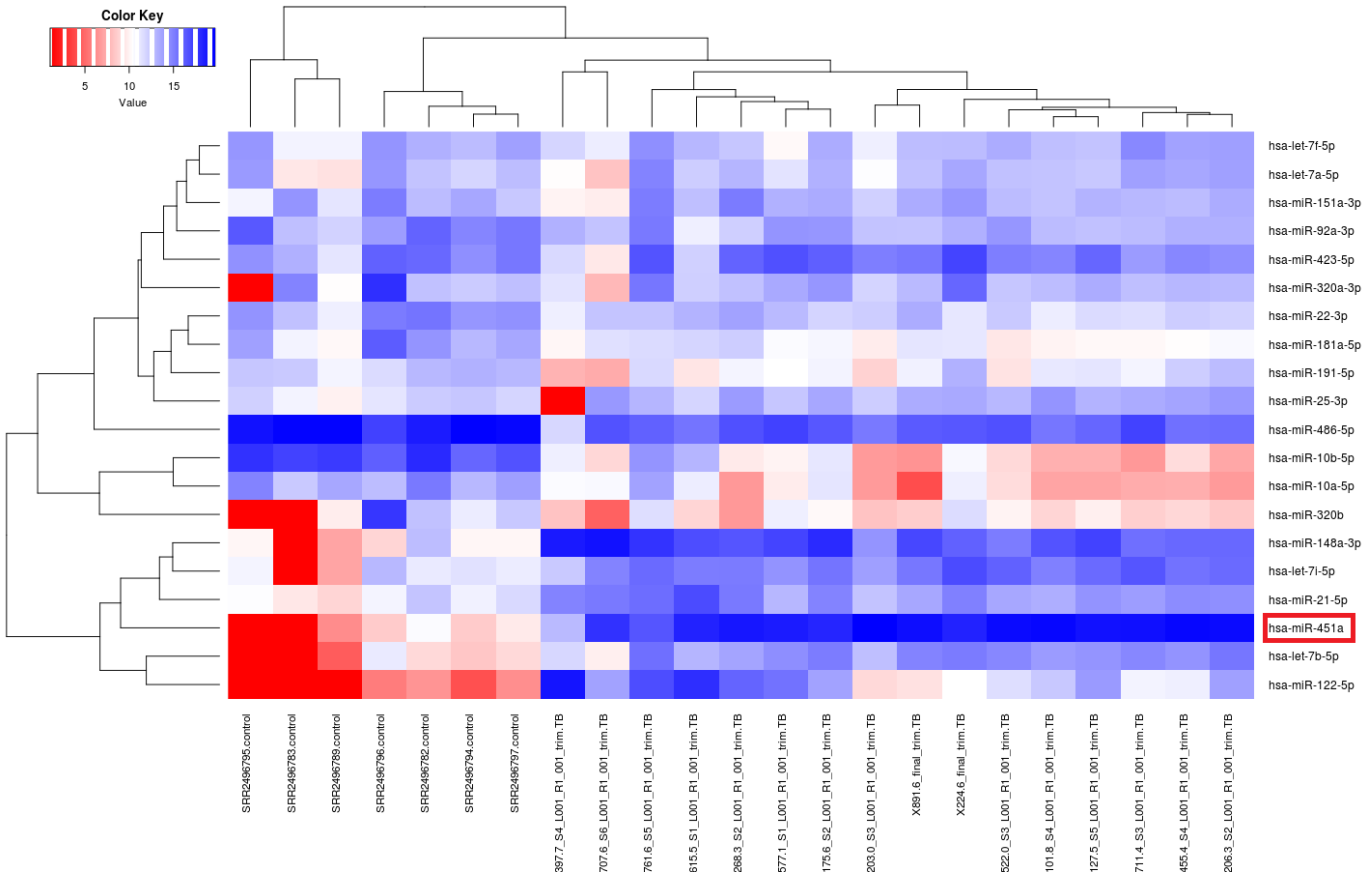


Figura 28. Heatmap del top 10 de microARNs en muestras de suero pacientes vs muestras de suero controles. El recuadro rojo enmarca al microARN hsa-miR-451a.

Tabla 8. p valor de la expresión diferencial del heatmap

	FoldChange	Log2FoldChange	pval	padj
Hsa-miR-451a	3470,37	11,76	0,000029	0,0014
Hsa-miR-375-3p	0,037	-4,75	0,0010	0,025

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

1. Tipificación de cepas

En primer lugar se destaca la puesta a punto de la técnica de Spoligotyping que nunca antes se había realizado en el país. Si bien se trata de una técnica con limitantes, como se comentará más adelante, presenta las ventajas de que es fácilmente reproducible y es una técnica robusta para la genotipificación de las cepas. Utilizar la técnica de Spoligotyping junto con MIRU 15 logra un análisis más preciso de los aislados en cuestión y como se observa en los resultados, se pudieron tipificar 61 muestras de pacientes con TBC grave y 80 muestras de personas con TBC no grave o de población general. Es importante notar que si bien el tamaño muestral no es suficientemente grande, y al separar las cepas por años disminuye el poder de análisis que se puede realizar, las dos poblaciones se comportan de forma diferente.

Como resultado de tipificar las cepas se constató una mayor presencia de la familia Haarlem en ambas poblaciones, siendo la población de pacientes graves la que tiene mayor cantidad de esta cepa (>49% vs 41% control). Haarlem es una de las familias más dispersas a nivel mundial y se la asoció con brotes epidemiológicos en Argentina[29]. Se la asocia también con una mayor tendencia a presentar multiresistencia a drogas de primera línea. Por otro lado en la figura 25 se puede apreciar que Haarlem es una cepa circulante en la población de Uruguay. Es posible afirmar que los pacientes críticos no experimentaron un brote de una cepa nueva y una posible explicación de la gravedad de los casos es que la misma Haarlem podría tener alguna mutación que la hiciera ser más virulentas o de mayor letalidad.

Otra posible explicación de la severidad de la enfermedad en los pacientes internados en la UCI del HE podría residir en el estado inmunitario que presentaban. Muchos de ellos estaban en situación de calle (21%) y algunos eran VIH-positivos (19%). De todas formas llama la atención la virulencia con la que *M. tuberculosis* se desarrolló en los pulmones de estos pacientes. Autopsias realizadas a algunos de ellos constatan un gran compromiso del parénquima pulmonar, con grandes granulomas y porciones necróticas, señales de una violenta propagación y destrucción producidas por la bacteria.

La genotipificación es importante para poder rastrear y ordenar los eventos en una cadena de transmisión y así determinar los focos de TBC y también poder diseñar e implementar estrategias específicas de control de la enfermedad. Desde hace varias décadas se implementaron varias técnicas clásicas como IS6110 fingerprinting, Spoligotyping y MIRU-VNTR y más recientemente se está empezando a realizar la secuenciación de todo el genoma para genotipificar y para determinar tiempos de transmisión reciente. Determinar estos tiempos de transmisión reciente (menos de 10 años) es clave sobre todo cuando se quiere controlar la transmisión de cepas MDR. Existe bibliografía que afirma que los métodos clásicos sobreestiman los tiempos de transmisión[59,60]. En general si dos pacientes tienen el mismo patrón de genotipificación, por ejemplo, el mismo código numérico en 24-loci de MIRU-VNTR se los considera en la misma cadena de transmisión y se los agrupa dentro de la misma cepa en un árbol filogenético como el de la figura 24. La práctica de genotipificación mejor aceptada es utilizar una combinación de 24-loci MIRU-VNTR y Spoligotyping. En este caso se utilizaron 15-loci MIRU-VNTR, que son de entre los 24 conocidos los que representan mayor diversidad alélica, y en suma con Spoligotyping dan un poder de resolución del 98% comparado con los 24-loci más Spoligotyping[61].

Sin embargo, existen casos en que dos pacientes no vinculados presentan el mismo patrón de genotipificación (15-loci MIRU-VNTR y Spoligotyping), lo que sugiere que el límite de detección de diversidad genética entre infecciones es demasiado amplio[59]. En otras palabras, hay polimorfismos en los genomas que no son identificados por esta combinación de técnicas. Los métodos clásicos de genotipificación, en comparación con los métodos basados en secuenciaciones de todo el genoma (WGS por sus siglas en inglés), son los que tienen menor resolución, es decir, que tienen una tasa de agrupación de las cepas mucho más alta.

Con las aproximaciones experimentales basadas en WGS se pueden observar eventos de transmisión reciente. Observando las distancias de al menos 5 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) se pueden agrupar aislados cuyos tiempos de transmisión se encuentran cerca de los 10 años.

Asimismo, un análisis más detallado de estas muestras, por ejemplo mediante la secuenciación de genomas completo, puede dar más pistas sobre la virulencia de estas cepas y sobre cómo se transmiten en la población.

Cabe destacar que la genotipificación de este grupo de pacientes críticos con TBC-activa no se había realizado antes en el país y que si bien la metodología aplicada para este estudio, de 15-loci MIRU-VNTR más Spoligotyping, no es la mejor estrategia para ver cambios genotípicos en cortos periodos de tiempo (10 años), se obtuvo información sobre cuáles son las cepas circulantes en este tipo de pacientes críticos así como en la población general, siendo de importancia para la estrategia de control de la TBC.

A partir de esta información, se propone seguir trabajo para aumentar el tamaño muestral de la población control y mejorar el análisis poblacional, sobre todo en aquellos años donde no se recolectaron muestras (e. g. año 2014 de la figura 25) o donde eran muy pocas y no tan representativas. Además, en algunos casos se encontraron pacientes con varios estudios posteriores. En particular se está analizando un caso de un paciente con cultivos positivos con 6 años de anterioridad, y se está buscando determinar si se trata de una recaída con la misma cepa o una reinfección a partir de una cepa diferente.

Dificultades de la técnica MIRU-VNTR:

En cuanto a la técnica de MIRU-VNTR se observaron algunas dificultades que se detallan a continuación. El 13% de las muestras no amplificaron en la primera ronda de amplificación, de hecho se probaron varias polimerasas con el fin de encontrar una que mejorara el porcentaje de las que no reaccionaron. Una posible razón podría estar en los ADNs con los cuales se trabajó, que no fueron purificados y pudieron contener inhibidores de la función enzimática. Al mismo tiempo, existen otros factores como la poca cantidad de ADN molde o la complejidad de cebadores que son utilizados en un multiplex, que pueden afectar la reacción. Para mejorar los productos se puede utilizar la ADN polimerasa IMMOLASE (Bioline, UK). Difiere de la Taq polimerasa en que es más específica por el ADN, puede eliminar productos no específicos como dímeros de cebadores y productos sin cebador. Además la enzima se encuentra disponible en mix, por lo que solamente se necesita agregar agua, cebadores y molde, facilitando el trabajo y aumentando la velocidad del mismo. Esta enzima fue utilizada en este trabajo para la tipificación de todo el grupo control y solo un 5% de las muestras no amplificaron en la primera ronda.

Otro de los problemas resulta al analizar los picos de los fragmentos en el secuenciador automático. Se realizó de forma manual por lo que se determinó pico por pico el tamaño de cada alelo. En algunos casos el tamaño de los picos esperados para un cierto MIRU se encontraba corrido del pico esperado. Se tomaron criterios arbitrarios sobre cómo anotarlos en base a lo que era más esperado (para algunos casos se realizó la confirmación del tamaño utilizando geles de agarosa, de modo de validar el ensayo). Algunas de las muestras presentaban varios picos para un mismo MIRU y en estos casos se eligió el pico de mayor intensidad y tamaño.

Dificultades de la técnica Spoligotyping:

Es una técnica muy fácil de reproducir en general, pero puede presentar inconvenientes en la interpretación de los resultados al revelar la membrana. En algunas de las imágenes obtenidas luego de la reacción con estreptavidina conjugada, se veían rectángulos poco claros, diferentes de los rectángulos “blancos” donde sí hibrida el oligonucleótido. Una posible explicación es la contaminación de los carriles aledaños. Si el soporte no es bien apretado o la superficie donde apoya la membrana es endeble, los carriles por donde se coloca la muestra pueden quedar flojos y dar lugar a filtraciones.

Se podría decir, como conclusión de la tipificación, que en esta primera aproximación experimental enfocada en el patógeno no permite explicar totalmente la gravedad de los casos internados en la UCI del HE. Por esto mismo, la búsqueda de una estrategia basada en la respuesta del hospedero resulta de gran importancia. En particular, a través de la expresión diferencial de microARNs en suero de estos pacientes.

2. Marcadores moleculares en el hospedero

Se realizaron un total de 32 corridas, de las cuales sólo se seleccionaron 16 que cumplían con los parámetros propuestos de calidad y de cantidad de secuencias por millón de secuencias mapeadas. Casi la mitad de las corridas no superó los límites establecidos y quedaron por fuera del análisis computacional. La poca cantidad de secuencias iniciales pudo deberse a la poca cantidad (ng/ml) de bibliotecas que se utilizó para la secuenciación. En algunos casos cuando se seleccionó el tamaño esperado de la biblioteca, la banda correspondiente a 150pb (figura 18) era difusa y difícil de distinguir del fondo y la cuantificación con el Qubit resultó baja (< 0,1 ng/ml). De todas formas, tratándose de muestras únicas, se continuó con la secuenciación.

Las 16 muestras de suero de pacientes graves del HE que tenían buena calidad (~Q 30) y cuya cantidad de secuencias luego del corte de los adaptadores fuera mayor al 85%, fueron analizadas con los programas informáticos descritos anteriormente. Asimismo, se analizaron estos resultados contra siete sueros control de personas sin TBC ya secuenciados y disponibles en la base de datos SRA (PRJNA296772).

El análisis de las secuencias con el software sRNAde permite ver diferencias en la abundancia diferencial de algunos microARNs respecto a los controles. La abundancia diferencial en este caso significa que hay mayor cantidad de microARNs en una población en estudio con respecto a otra, en este mismo sentido se utiliza también expresión diferencial para señalar la cantidad, y no hace referencia a los mecanismos de expresión.

En particular el miR-451a y miR-375 son los más abundantes en las muestras problema, seguidos por miR-148a. Para 15 de 16 muestras, el miR-451a se encuentra entre las primeras posiciones en el top 10 de microARNs del suero de pacientes pero no aparece en el top 10 de microARNs de los sueros control.

En un artículo publicado por Yan Wang et al. en 2017[55], se identificó la expresión diferencial de microARN contenidos en exosomas en derrames pleurales (PE del inglés: pleural effusion) de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma (AD), tuberculosis (TPE) y en lesiones benignas (NPE). Este trabajo identificó tres microARNs diferencialmente expresados entre TPE y NPE: miR-148a, miR-451a y miR-150-3p, señalando además que los patrones de expresión diferencial de microARN son diferentes.

Esto afirma la hipótesis de que la expresión diferencial de microARN puede funcionar como marcador de enfermedad y que el miR-451 es un buen candidato como marcador molecular de TBC.

El miR-21 también aparece dentro del top 10 de microARNs en 14 de 16 muestras analizadas y tampoco se encuentra dentro de los microARNs expresados en suero de controles sin TBC. El software edgeR lo califica como uno de los microARNs expresados diferencialmente cuando se comparan todas las muestras contra todos los controles. En la literatura se lo vincula con la inhibición de la expresión de IL-12 por unirse directamente al extremo 3´ UTR del ARNm para IL-12[54]. Lo que reafirma la idea de que la respuesta adaptativa es demorada en la infección por *M. tuberculosis*.

Por último, cabe mencionar que los controles proporcionados por las bases de datos son importantes, pero faltaría realizar la construcción de bibliotecas, secuenciación y análisis de controles de suero de pacientes sin TBC ante las mismas condiciones de laboratorio en que se realizaron las muestras de suero de los pacientes en cuestión.

VII. PERSPECTIVAS

Es necesitaría aumentar la cantidad de muestras de la población general para obtener un conjunto de datos más representativo y así poder obtener estadísticas poblacionales más significativas cuando se estudian otras poblaciones de interés.

Por otra parte, es necesario validar los microARNs que fueron más abundantes en los pacientes críticos. Para verificar que se trata de un marcador molecular de TBC y no de otra infección, así como tampoco de un marcador inespecífico de inflamación, se podría cuantificar la presencia de los microARNs por real-time PCR en distintos escenarios (con TBC-activa, sin TBC, en enfermedades infecciosas no TBC, en TBC extra-pulmonar).

También, como contamos con muestras de orina del día 1 de ingreso a la UCI y en conocimiento de que existen referencias bibliográficas de la presencia de exosomas en varios líquidos extracelulares, sería de interés buscar estos marcadores en los mismos pacientes, para evaluar nuevos métodos de detección temprana de TBC-activa.

Igualmente, al contar con algunos sueros de días de tratamiento posterior (días 3 y días 7), también se podría evaluar la cantidad de estos microARN y si son característicos de alguna etapa de la infección. Por ejemplo si se encuentran mayormente expresados en pacientes fallecidos o sí son característicos de TBC-activa o LTBI.

Si se corrobora que los microARNs descritos más arriba fueran marcadores moleculares de TBC, restaría profundizar el estudio, diseñando nuevas situaciones experimentales donde investigar la procedencia de los mismos, qué células lo transcriben y qué efectos puede llegar a tener sobre las células hospederas. También se podrían buscar alguna relación entre la expresión de estos microARNs y la expresión de ARNm en células hospederas.

Los estudios realizados en esta Tesina se encuadran dentro del Proyecto financiado por Fondo Sectorial de Salud 2016 (ANII_FSS_X_2016_1_127692). Trabajo multidisciplinario: Instituto Pasteur de Montevideo, Hospital Español - ASSE, Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLAT-EP).

Resultados preliminares de este estudio fueron presentados y distinguidos con el Segundo puesto en el "Premio Internacional Latinoamericano en Neumología Fernando D. Gomez - Miguel Mello Aguerre" de la Academia Nacional de Medicina, en la convocatoria 2018.

Resultados preliminares en forma de trabajo libre fueron presentados en:

- XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, Santiago de Chile, Chile 2018.

-Congreso Uruguayo de Neumología, Montevideo 2018.

-Congreso Uruguayo de Medicina Intensiva, Montevideo 2018.

-Congreso Latioamericano de Medicina Interna, Punta del Este, 2019.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Gao, B., & Gupta, R. S. (2012). Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 76(1), 66–112.

2. Jagielski T., Minias A., van Ingen J., Rastogi N., Brzostek A., Z˙aczek A., Dziadekb J. (2016). Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and Other Mycobacteria. Clinical Microbiology Reviews, 29(2 PG-239-90), 239–290.

3. Houben, R. M. G. J., & Dodd, P. J. (2016). The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. PLoS Medicine, 13(10), 1–13.

4. Kasaeva, T., Floyd, K., Anderson, L., & Baddeley, A. (2018). Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. WHO Publication.

5. E., V., & PE., F. (2000). Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. American Journal of Epidemiology, 152(3 PG-247-63), 247–263. Retrieved from NS

6. Highsmith, H. Y., Starke, J. R., & Mandalakas, A. M. (2018). Tuberculosis. Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children, (36), 475–497.e5.

7. Chegou, N. (2010). Host markers in QuantiFERON supernatants differentiate active TB from latent TB infection: Preliminary report. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 14(6 SUPPL. 1), 1–12.

8. Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., Banfield, J. F., et al. (2016). A new view of the tree of life. Nature Microbiology, 1(5), 1–6.

9. Chevalier, F. Le, Cascioferro, A., Majlessi, L., Herrmann, J. L., & Brosch, R. (2014). Mycobacterium tuberculosis evolutionary pathogenesis and its putative impact on drug development. Future Microbiology, 9(8), 969–985.

10. Turner, J., & Torrelles, J. B. (2018). Mannose-capped lipoarabinomannan in Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. Pathogens and Disease, 76(4).

11. Philips, J. A., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 7(1), 353–384.

12. Armstrong, B. Y. J. A., & Hart, A. P. D. A. (1971). Response of Cultured Macrophages to Mycobac- terium tuberculosis , with Observations on Fusion of Lysosomes with phagosomes. The Journal of Experimental Medicine, 134(3), 713–740.

13. Wong, Ka-Wing. (2017). The Role of ESX-1 in Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis. Microbiology Spectrum. 5. 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0001-2015.

14. Kumar, V. A., Goyal, R., Bansal, R., Singh, N., Sevalkar, R. R., Kumar, A., & Sarkar, D. (2016). Espr-dependent ESAT-6 protein secretion of Mycobacterium tuberculosis requires the presence of virulence regulator phoP. Journal of Biological Chemistry, 291(36), 19018–19030.

15. Brodin, P., De Jonge, M. I., Majlessi, L., Leclerc, C., Nilges, M., Cole, S. T., & Brosch, R. (2005). Functional analysis of early secreted antigenic target-6, the dominant T-cell antigen of Mycobacterium tuberculosis, reveals key residues involved in secretion, complex formation, virulence, and immunogenicity. Journal of Biological Chemistry, 280(40), 33953–33959.

16. Sreejit, G., Ahmed, A., Parveen, N., Jha, V., Valluri, V. L., Ghosh, S., & Mukhopadhyay, S. (2014). The ESAT-6 Protein of Mycobacterium tuberculosis Interacts with Beta-2-Microglobulin (β2M) Affecting Antigen Presentation Function of Macrophage. PLoS Pathogens, 10(10).

17. Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Pieters, J., et al. (2004). Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. Science, 304(5678), 1800–1804.

18. Gil M., Graña, M., Schopfer, F. J., Wagnere, T., Denicola, A., Freeman, B. A., Alzarie, P. M., Batthyány C., Durán, R. (2015). NIH Public Access. Radic Biol Med, 65, 120–161.

19. Jasenosky, L. D., Scriba, T. J., Hanekom, W. A., & Goldfeld, A. E. (2015). T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans. Immunological Reviews, 264(1), 74–87.

20. Rubin, E. J., & Ph, D. (2009). Clinical implications of basic research The Granuloma in Tuberculosis — Friend or Foe? New England Journal of Medicine, 2471–2473.

21. Pagán, A. J., & Ramakrishnan, L. (2015). Immunity and immunopathology in the tuberculous granuloma. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 5(9), 1–19.

22. Lönnroth, K., Castro, K. G., Chakaya, J. M., Chauhan, L. S., Floyd, K., Glaziou, P., & Raviglione, M. C. (2010). Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development. The Lancet, 375(9728), 1814–1829.

23. CHLA-EP, Salud., M. de, & UdelaR- Facultad de Medicina. (2016). Guia Nacional para el manejo de la Tuberculosis.

24. Greif, G., Iraola, G., Berná, L., Coitinho, C., Rivas, C. M., Naya, H., Robello, C. (2014). Complete Genome Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Strain MtURU-001, Isolated from a Rapidly Progressing Outbreak in Uruguay. Genome Announcements, 2(1), e01220-13.

25. Berna, L., Iraola, G., Greif, G., Coitinho, C., Rivas, C. M., Naya, H., & Robello, C. (2014). Whole-Genome Sequencing of an Isoniazid-Resistant Clinical Isolate of Mycobacterium tuberculosis Strain MtURU-002 from Uruguay. Genome Announcements, 2(4), e00655-14-e00655-14.

26. Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D., … Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(6), 3684-9.

27. Jagielski, T., Minias, A., van Ingen, J., Rastogi N., Brzostek, A., Z˙aczek, A., Dziadek J. (2016). Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and Other Mycobacteria. Clinical Microbiology Reviews, 29(2 PG-239-90), 239–290.

28. Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., De Jong, B. C., Narayanan, S., Small, P. M., et al. (2006). Variable host–pathogen compatibility in MTB, 103(8), 2869–2873.

29. Commons, C. (2016). Genotipos de Mycobacterium tuberculosis prevalentes en Argentina y su relación con mutaciones de resistencia a isoniacida.

30. Jagielski, T., Ingen, J. Van, Rastogi, N., Mazur, K., & Bielecki, J. (2014). Current Methods in the Molecular Typing of. BioMed Research International, 2014, Article ID 645802

31. van Embden J. D. A., Cave D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., Mcadam, R., Shinnick, T. M., Small P., M.. (1993) Strain Identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology. Journal of Clinical Microbiology, 31(2), 406-409.

32. Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., Van Embden, J., et al. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. Journal of Clinical Microbiology, 35(4), 907–914.

33. Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Barrell, B. G., et al. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature, 393, 537.

34. Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S., & Locht, C. (1997). Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. Molecular Microbiology, 26(5), 991–1003.

35. Médigue, C., Cole, S. T., Camus, J.-C., & Pryor, M. J. (2002). Re-annotation of the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. Microbiology, 148(10), 2967–2973.

36. Takiff H. (2018). Tuberculosis.Institut Pasteur Sitio web: https://www.fun-mooc.fr/courses/course-v1:pasteur+96008+session01/about. Último acceso: 23/12/2018

37. Alonso-Rodriguez, N., Martínez-Lirola, M., Sánchez, M. L., Herranz, M., Peñafiel, T., Bonillo, M. D. C., De Viedma, D. G et al. (2009). Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to

characterize Mycobacterium tuberculosis isolates for fast identification of clustered and orphan cases. Journal of Clinical Microbiology, 47(7), 2026–2032.

38. Satta, G., Lipman, M., Smith, G. P., Arnold, C., Kon, O. M., & McHugh, T. D. (2018). Mycobacterium tuberculosis and whole-genome sequencing: how close are we to unleashing its full potential? Clinical Microbiology and Infection, 24(6), 604–609.

39. Sabir, N., Hussain, T., Shah, S. Z. A., Peramo, A., Zhao, D., & Zhou, X. (2018). miRNAs in tuberculosis: New avenues for diagnosis and host-directed therapy. Frontiers in Microbiology, 9(MAR), 1–14.

40. Rak, J. (2013). Extracellular vesicles - biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer. Frontiers in Pharmacology, 4 MAR(March), 1–14.

41. Diaz, G., Wolfe, L. M., Kruh-Garcia, N. A., & Dobos, K. M. (2016). Changes in the Membrane-Associated Proteins of Exosomes Released from Human Macrophages after Mycobacterium tuberculosis Infection. Scientific Reports, 6(July), 1–10.

42. Beatty, W. L., Ullrich, H. J., & Russell, D. G. (2001). Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event. European Journal of Cell Biology, 80(1), 31–40.

43. Singh, P. P., LeMaire, C., Tan, J. C., Zeng, E., & Schorey, J. S. (2011). Exosomes released from m.tuberculosis infected cells can suppress ifn-γ mediated activation of naïve macrophages. PLoS ONE, 6(4).

44. Wang, J. jun, Chen, C., Xie, P. fang, Pan, Y., Tan, Y. hong, & Tang, L. jun. (2014). Proteomic analysis and immune properties of exosomes released by macrophages infected with Mycobacterium avium. Microbes and Infection, 16(4), 283–291.

45. Hadifar, S., Fateh, A., Yousefi, M. H., Siadat, S. D., & Vaziri, F. (2018). Exosomes in tuberculosis: Still terra incognita? Journal of Cellular Physiology, (September), 1–8.

46. Liu, T., Zhang, Q., Zhang, J., Li, C., Miao, Y.-R., Lei, Q., Guo, A.-Y, et el. (2018). EVmiRNA: a database of miRNA profiling in extracellular vesicles. Nucleic Acids Research, 47(October 2018), 89–93.

47. Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., Marsh, C. B., et al. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. PLoS ONE, 3(11).

48. Mo, M. H., Chen, L., Fu, Y., Wang, W., & Fu, S. W. (2012). Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. Journal of Cancer, 3(1), 432–448.

49. Xie, Y., Todd, N. W., Liu, Z., Zhan, M., Fang, H., Peng, H., Jiang, F., et al. (2011). Altered miRNA Expression in Sputum for Diagnosis of Non-small Cell Lung Cancer. NIH Public Access. System, 67(2), 170–176.

50. Rovira, J., Diekmann, F., Campistol, J. M., & Ramírez-Bajo, M. J. (2017). Uso terapéutico de las vesículas extracelulares en insuficiencia renal aguda y crónica. Nefrología, 37(2), 126–137.

51. Harapan, H., Fitra, F., Ichsan, I., Mulyadi, M., Miotto, P., Hasan, N. A., Lisboa, U. De., et al. (2016). HHS Public Access. Tuberculosis, 93(6), 596–605.

52. Giner, M., Montoya, M. J., Vázquez, M. A., Miranda, C., Miranda, M. J., & Pérez-Cano, R. (2016). What are microRNAs? Potential biomarkers and therapeutic targets in osteoporosis. Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral, 8(1), 40–44.

53. Akers, J. C., Ramakrishnan, V., Kim, R., Skog, J., Nakano, I., Pingle, S., Chen, C. C., et al. (2013). miR-21 in the Extracellular Vesicles (EVs) of Cerebrospinal Fluid (CSF): A Platform for Glioblastoma Biomarker Development. PLoS ONE, 8(10), 1–13.

54. O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., & Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. Nature Reviews Immunology, 10(2), 111–122.

55. Wang, Y., Xu, Y. M., Zou, Y. Q., Lin, J., Huang, B., Liu, J., Wang, X. Z., et al. (2017). Identification of differential expressed PE exosomal miRNA in lung adenocarcinoma, tuberculosis, and other benign lesions. Medicine, 96(44), e8361.

56. Supply, P. (2005). Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of Mycobacterium tuberculosis. Institut Pasteur de Lille, (May), 73.

57. Rueda, A., Barturen, G., Lebrón, R., Gómez-Martín, C., Alganza, Á., Oliver, J. L., & Hackenberg, M. (2015). SRNAtoolbox: An integrated collection of small RNA research tools. Nucleic Acids Research, 43(W1), W467–W473.

58. Martin, M. (2013). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads kenkyuhi hojokin gan rinsho kenkyu jigyo. EMBnet.Journal, 17(1), 10–12.

59. Meehan, C. J., Moris, P., Kohl, T. A., Pečerska, J., Akter, S., Merker, M., de Jong, B. C., et al. (2018). The relationship between transmission time and clustering methods in Mycobacterium tuberculosis epidemiology. EBioMedicine, 37(2018), 410–416.

60. Gagneux, S. (2017). Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis complex: It´s Role in Biology, Epidemiology and Control. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1019.

61. Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsch-Gerdes, S., Willery, E., Van Soolingen, D., et al. (2006). Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology, 44(12), 4498–4510.

ANEXO I. Composición de buffers.

20xSSPE: 175,3g NaCl, 27,6g $NaH_2PO_4.H_20$, 7,4g EDTA en 1000ml H_20. Se ajusta el pH a 7,4 con NaOH Almacenar a temperatura ambiente por no más de 6 meses.

10% SDS: 10g SDS en 100ml agua destilada.

2xSSPE/0.1%SDS: 5ul 10%SDS, 50ul 20xSSPE, 445ul H_20

2xSSPE/0.5%SDS: 25ul 10%SDS, 50ul20xSSPE, 425ul H_20

ANEXO II. Tablas de MIRU-VENTR y Spoligotyping

Tabla 1. Resultados MIRU de la población de estudio.

ID	Miru 40	Miru 04	Miru 26	Miru 10	etrC	Mtub 04	Mtu b21	Miru 31	etrA	Mtub 30	415 6	Miru 16	Qub 11b	Mtub 39	Q 26
1	3	2	5	6	3	2	2	3	3	4	3	3	6	3	3
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1	2	5	4	2	3	3	3	2	2	2	2	4	1	6
4	6	2	5	3	4	3	3	3	2	1	3	3	2	2	4
5	6	2	5	4	4	3	3	3	2	1	3	4	2	2	7
6	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
7	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
8	3	2	4	4	3	2	4	3	3	4	3	3	5	3	7
9	1	2	6	4	3	7	3	3	2	1	2	2	3	2	6
10	3	2	5	5	3	2	3	3	2	3	2	3	4	3	6
11	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	3	3	5
12	1	2	5	4	4	5	3	3	2	1	2	2	4	2	8
13	6	2	5	4	3	3	3	3	2	1	3	3	2	2	6
14	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	3	3	5
15	2	2	3	4	4	5	2	3	2	2	2	3	4	1	1
16	4	2	2	4	3	2	3	3	2	4	3	3	3	4	7
17	1	2	4	3	4	4	2	3	2	1	2	1	3	2	8
18	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	3	3	5
19	4	2	2	4	3	2	3	3	2	4	3	3	3	4	6
20	5	2	5	3	4	2	2	2	2	1	2	1	2	2	5
21	4	2	5	3	3	4	3	3	3	4	3	3	2	4	3
22	2	2	3	4	4	4	2	3	2	2	2	3	4	1	5
23	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
24	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	3	3	5
25	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
26	6	2	5	4	3	3	3	3	2	1	3	3	2	2	3
27	1	2	5	4	4	4	3	3	2	1	2	2	3	2	6
28	4	2	5	3	3	4	3	3	3	4	1	3	2	4	3
29	-	4	5	-	3	3	-	3	2	1	3	-	2	2	-
30	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
31	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
32	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
33	4	2	4	3	4	2	2	3	3	3	2	3	5	2	-
34	1	2	5	4	4	5	3	3	2	1	2	2	4	2	7
35	1	2	5	4	2	3	3	3	2	2	2	2	4	1	6
36	1	2	6	4	3	4	3	3	2	1	2	2	3	2	6
37	4	2	5	5	3	2	3	3	3	2	3	3	4	3	5
38	4	3´	5	5	3	4	3	3	3	4	1	3	2	4	3
39	3	2	5	5	4	2	3	3	3	4	3	3	2	2	3
40	3	2	5	5	3	2	3	3	3	4	3	3	3	5	6

41	4	2	4	3	3	7	3	3	3	4	3	4	2	4	3
42	1	1	5	4	4	2	3	3	2	1	2	2	2	2	6
43	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
44	4	2	4	4	3	2	3	3	3	4	3	4	2	4	-
45	1	3´	5	4	4	5	3	3	2	1	2	2	4	2	8
46	1	2	5	5	2	3	3	3	2	2	2	3	4	1	6
47	4	2	5	3	3	4	3	3	3	4	3	3	2	4	3
48	4	2	2	5	3	2	3	3	2	4	3	3	3	4	7
49	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
50	3	2	5	3	3	4	3	3	3	4	3	3	2	4	3
51	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	4	2	4	3
52	4	2	4	3	3	2	2	3	3	4	3	3	2	1	3
53	4	2	4	3	3	3	3	4	3	4	3	3	2	4	3
54	1	2	5	4	2	2	3	3	2	2	2	2	4	1	6
55	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
56	3	2	4	4	3	2	3	3	3	4	3	3	5	3	7
57	1	2	5	4	2	2	3	3	2	2	2	2	4	1	6
58	4	2	5	3	3	2	2	3	3	2	2	3	3	3	-
59	1	2	5	4	3	2	3	3	2	1	2	2	3	2	6
60	4	2	5	4	4	2	2	3	3	2	2	3	3	3	5
61	6	2	5	4	3	2	3	3	2	1	3	3	2	2	6

Tabla 2. Resultados MIRU de la población general.

ID	Miru 40	Miru 04	Miru 26	Miru 10	etrC	Mtu b 04	Mtub 21	Miru 31	etrA	Mtub 30	415 6	Miru 16	Qub 11b	Mtub 39	Q 26
1C	2	2	3	4	4	1	2	3	2	2	2	3	4	1	5
2C	1	2	5	4	2	3	3	3	2	2	2	2	4	1	6
3C	4	2	4	3	3	1	3	3	3	4	-	-	2	4	3
4C	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	2	3	5	5
5C	4	2	4	3	4	2	2	3	3	2	2	3	5	2	5
6C	2	2	4	2	4	2	2	3	3	2	2	3	5	2	5
7C	3	2	5	4	4	3	2	3	3	2	2	3	3	3	5
8C	3	2	5	5	3	2	3	3	3	2	3	3	4	3	4
9C	1	2	5	4	4	1	3	3	2	1	2	2	4	2	8
10C	8	2	5	4	4	2	3	2	2	1	2	3	2	2	3
11C	6	2	5	4	3	3	3	3	2	1	3	3	2	2	6
12C	5	2	5	3	3	4	3	3	3	4	3	3	2	4	3
13C	1	2	5	3	3	4	3	3	2	1	2	2	5	2	4
14C	1	1	4	4	4	2	3	3	2	1	2	2	3	2	9
15C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	5	3
16C	1	2	5	4	2	3	3	3	2	2	2	2	4	1	6
17C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
18C	3	2	5	5	3	2	2	3	3	4	3	3	7	3	7
19C	4	2	2	4	3	2	3	3	2	4	3	3	3	4	7
20C	5	3´	5	4	3	4	3	3	3	4	3	3	2	4	3
21C	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	3	3	5
22C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
23C	4	2	5	3	2	3	3	3	2	2	2	2	4	1	6
24C	1	2	5	4	3	2	3	3	2	4	3	3	3	4	2
25C	4	1	2	4	3	2	3	5	2	4	3	3	3	4	2
26C	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	3	3	5
27C	4	2	5	3	3	4	3	3	3	4	3	3	2	3	3
28C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
29C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
30C	6	2	5	3	4	3	3	3	2	1	3	3	2	2	4
31C	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	3	3	3	3	5
32C	6	2	5	3	4	3	3	3	2	1	3	3	2	2	4
33C	4	2	5	5	3	2	3	3	3	2	3	3	4	3	5
34C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
35C	1	2	5	4	3	5	3	3	2	1	2	2	4	2	8
36C	1	2	5	4	2	3	3	3	2	2	2	2	4	1	6
37C	6	2	5	3	4	3	3	3	2	1	3	3	2	2	4
38C	3	2	5	5	3	2	2	3	3	4	3	3	6	3	7
39C	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	3	3	5
40C	3	2	5	5	3	2	3	3	3	4	3	3	5	3	7
41C	4	2	5	4	2	3	2	2	2	1	2	3	2	2	6
42C	3	5	2	4	4	2	5	5	4	2	1	3	7	2	5
43C	4	2	5	4	2	2	3	3	2	2	2	2	4	1	6
44C	4	2	2	4	3	2	3	3	2	4	3	3	3	4	7

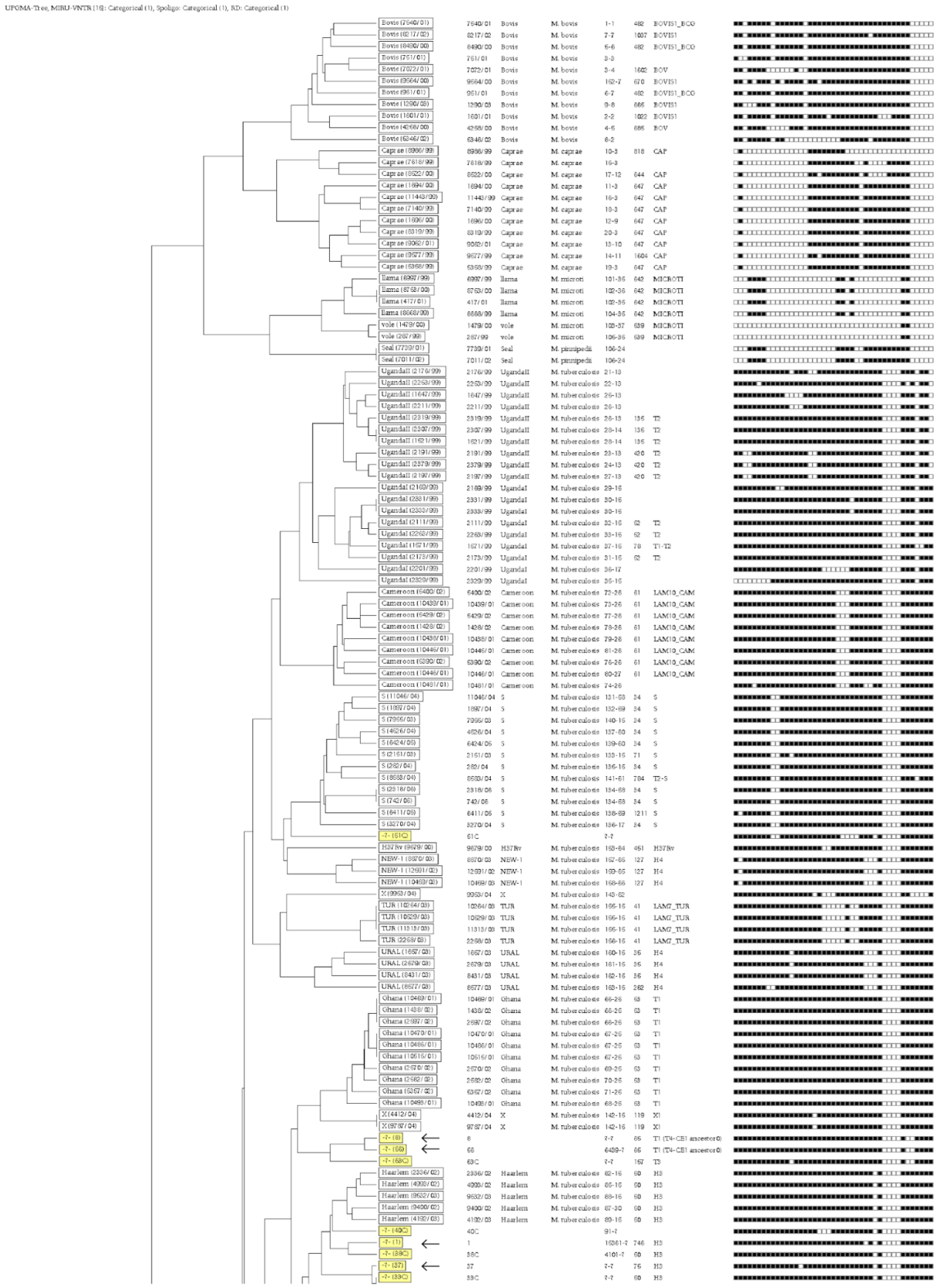
45C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
46C	1	2	6	4	4	4	2	3	2	1	2	2	2	2	5
47C	4	2	5	5	3	2	3	3	3	2	3	3	4	3	5
48C	4	2	5	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
49C	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	3	3	5
50C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	2	3
51C	4	3	5	3	4	3	1	4	3	2	2	3	3	3	9
52C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
53C	4	2	4	3	3	4	3	3	3	4	3	3	2	4	3
54C	2	2	4	4	4	1	3	3	2	1	3	2	2	1	7
55C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
56C	2	2	4	3	3	1	3	3	3	1	3	3	2	1	3
57C	1	2	5	4	3	2	3	3	2	2	2	2	2	1	3
58C	1	2	5	4	4	1	9	3	2	1	3	2	2	1	3
59C	6	2	5	4	3	3	3	3	2	1	3	3	2	2	3
60C	2	2	3	4	4	1	3	3	2	1	3	2	2	1	3
61C	1	2	6	4	4	4	3	3	2	1	2	2	2	2	6
62C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
63C	3	2	4	4	3	2	4	3	3	4	3	3	3	4	8
64C	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	3	3	5
65C	2	2	3	4	4	4	2	3	2	2	2	3	4	1	5
66C	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	2	3	3
67C	4	2	2	4	3	2	2	3	2	4	3	3	3	4	7
68C	6	2	5	4	4	3	2	1	1	1	2	3	2	2	3
69C	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	2	3	5
70C	4	1	5	5	3	3	3	3	3	4	3	3	4	3	6
71C	4	2	5	3	4	2	2	3	3	2	2	3	3	3	5
72C	3	2	5	3	4	2	2	3	3	4	3	3	2	3	3
73C	4	2	4	3	3	2	3	3	3	4	3	3	2	4	3
74C	1	2	5	3	4	1	2	2	2	1	2	2	2	2	4
75C	7	2	5	4	4	4	3	2	2	1	2	3	3	2	3
76C	4	2	4	2	4	4	2	3	2	1	3	3	2	2	6
77C	4	2	2	4	3	2	3	3	2	4	3	3	3	4	6
78C	4	2	4	3	4	2	2	3	3	2	2	3	5	2	5
79C	2	2	3	4	4	3	2	3	2	2	2	3	4	1	5
80C	1	2	5	4	2	3	3	3	2	2	2	2	4	1	6

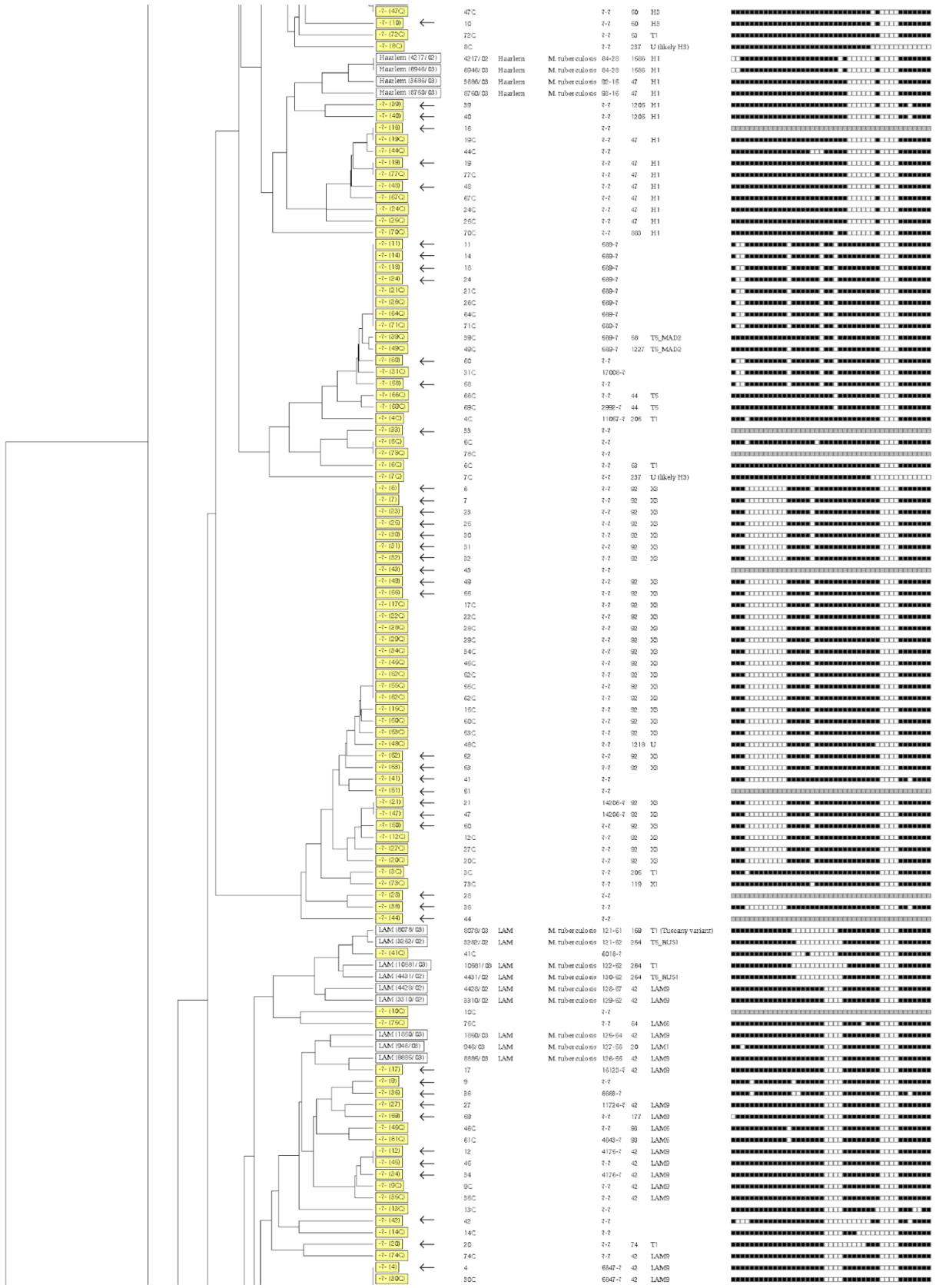
Tabla 3. Resumen de los perfiles de Spoligotyping de todas las muestras. Se anota con la letra C siguiendo al número del ID las muestras que son de la población general.

ID	Patrón de Spoligotyping	ID	Patrón de Spoligotyping
1	11111111111111111111111111101010000111111	**1C**	11011111000111111111000011111111000011111111
2	11100000000011111111111111111110000011111111	**2C**	11100000000011111011111111111111000011111111
3	11011111000111111111000011111111000011111111	**3C**	11101111111111111111111111111111000011111111
4	11111111111111111111000011111111000011111111	**4C**	11101111111111111111111111111111000011111111
5	11111111111111111111000011111100000001110111	**5C**	11101111111111111101111111111111000011111111
6	11100000000011111011111111111111000011111111	**6C**	11111111111111111111111111111111000011111111
7	11100000000011111011111111111111000011111111	**7C**	11111111111111111111111111111100000000000000
8	11111111111111111111111111111111000010011111	**8C**	11111111111111111111111111111100000000000000
9	11010111111110111111000011111111000011111111	**9C**	11111111111111111111000011111111000011111111
10	11111111111111111111111111111101000011111111	**10C**	-
11	10111111111101111101101111111111000011111111	**11C**	11111111111111111111000011111111000011111111
12	11111111111111111111000011111111000011111111	**12C**	11100000000011111011111111111111000011111111
13	11111111111111111111000011111111000011111111	**13C**	11011111111111111111000011111111000011110011
14	10111111111101111101101111111111000011111111	**14C**	11111111111111111111000011100000000011111111
15	11111111000111111110000000000000000000011111	**15C**	11100000000011111011111111111111000011111111
16	-	**16C**	11011111000111111111000011111111000011111111
17	11111111111111111111000011111111000011111111	**17C**	11100000000011111011111111111111000011111111
18	10111111111101111101101111111111000011111111	**18C**	00000000000000000000000010000001000011111111
19	11111111111111111111111100000001000011111111	**19C**	11111111111111111111111100000001000011111111
20	11111111111111111111000000000011000011111111	**20C**	11100000000011111011111111111111000011111111
21	11100000000011111011111111111111000011111111	**21C**	10111111111101111101101111111111000011111111
22	11100000000011111011111111111111000011111111	**22C**	11100000000011111011111111111111000011111111
23	11100000000011111011111111111111000011111111	**23C**	11111111000111111111000011111111000011111111
24	10111111111101111101101111111111000011111111	**24C**	11111111111111111111111100000001000011111111
25	11100000000011111011111111111111000011111111	**25C**	11111111111111111111111100000001000011111111
26	11111111111111111111000011111111000011111111	**26C**	10111111111101111101101111111111000011111111
27	11111111111111111111000011111111000011111111	**27C**	11100000000011111011111111111111000011111111
28	-	**28C**	11100000000011111011111111111111000011111111
29	-	**29C**	11100000000011111011111111111111000011111111
30	11100000000011111011111111111111000011111111	**30C**	11111111111111111111000011111111000011111111
31	11100000000011111011111111111111000011111111	**31C**	10111111111101111101101111111111000011111111
32	11100000000011111011111111111111000011111111	**32C**	11111111111111111111000011111111000011111111
33	-	**33C**	11111111111111111111111111111101000011111111
34	11111111111111111111000011111111000011111111	**34C**	11100000000011111011111111111111000011111111
35	11011111000111111111000011111111000011111111	**35C**	11111111111111111111000011111111000011111111
36	11010111111110011111000011111111000011011111	**36C**	11011111000111111111000011111111000011111111
37	11111111111111011111111111111101000011111111	**37C**	11111111111111111111000011111111000011111111
38	11100000000011111111111111111111000011011111	**38C**	11111111111111111111111111111101000011111111
39	11111111111111111111111100000010000011011111	**39C**	11111111111111111101101111111111000011111111
40	11111111111111111111111100000010000011011111	**40C**	11111111111111111000111111111101000011111111
41	11100000000011111111111111111111000011011111	**41C**	11111111111110001000000111111111000011111111
42	10001111111111111111000000000011000011011111	**42C**	00011111111111111111111111111000010111110111
43	-	**43C**	11111111000111111111000011111111000011100111

44	-	**44C**	11111111111111111000111110000001000011111111
45	11111111111111111111000011111111000011111111	**45C**	11100000000011111011111111111111000011111111
46	-	**46C**	11011111111101111111000011111111000011111111
47	11100000000011111011111111111111000011111111	**47C**	11111111111111111111111111111101000011111111
48	11111111111111111111111100000100001111111	**48C**	11100000000011111011111111111111000011111111
49	11100000000011111011111111111111000011111111	**49C**	11111111111101111101101111111111000011111111
50	11100000000011111011111111111111000011111111	**50C**	11100000000011111011111111111111000011111111
51	-	**51C**	11111111001111111111111000011101000011111111
52	11100000000011111011111111111111000011111111	**52C**	11100000000011111011111111111111000011111111
53	11100000000011111011111111111111000011111111	**53C**	11100000000011111011111111111111000011111111
54	11011111000111111111000011111111000011111111	**54C**	11111111111111111111000011110111000011111111
55	11100000000011111011111111111111000011111111	**55C**	11100000000011111011111111111111000011111111
56	11111111111111111111111111111111000011001111	**56C**	11111111111111111111111111111011000011111111
57	11011111000111111111000011111111000011111111	**57C**	11111111111111111111111111111111000011111111
58	10111111111101111110110111111111000011111111	**58C**	11111111111111111111111111111111000011111111
59	01111111111111111111000011111111000011111111	**59C**	11111111111111111111111111111111000011111111
60	10111111111101111110110111111111000011111111	**60C**	11111111111111111111111111111111000011111111
61	11111111000111111111000000000000000000011111	**61C**	11011111111101111111000011111111000011111111
		62C	11100000000011111011111111111111000011111111
		63C	11111111111101111111111111111111000011001111
		64C	10111111111101111110110111111111000011111111
		65C	11110011000110011110000000000000000000001111
		66C	11111111111111111111101111111111000011111111
		67C	11111111111111111111111100000010000111111111
		68C	11111111111111111111111111111111000011111111
		69C	11111111111111111111101111111111000011111111
		70C	11111111111111111111101100000010000111111111
		71C	10111111111101111110110111111111000011111111
		72C	11111111111111111111111111111111000011111111
		73C	11111111111111111011111111111111000011111111
		74C	11111111111111111111000011111111000011111111
		75C	11111111111111111111000011110111000011111111
		76C	11111111111110000000000000011111000011111111
		77C	11111111111111111111111100000010000111111111
		78C	-
		79C	11111111111111111000000111111111000011111111
		80C	11011111001111111101000011111111000011111100

ANEXO III. Árbol filogenético UPGMA de aislados.





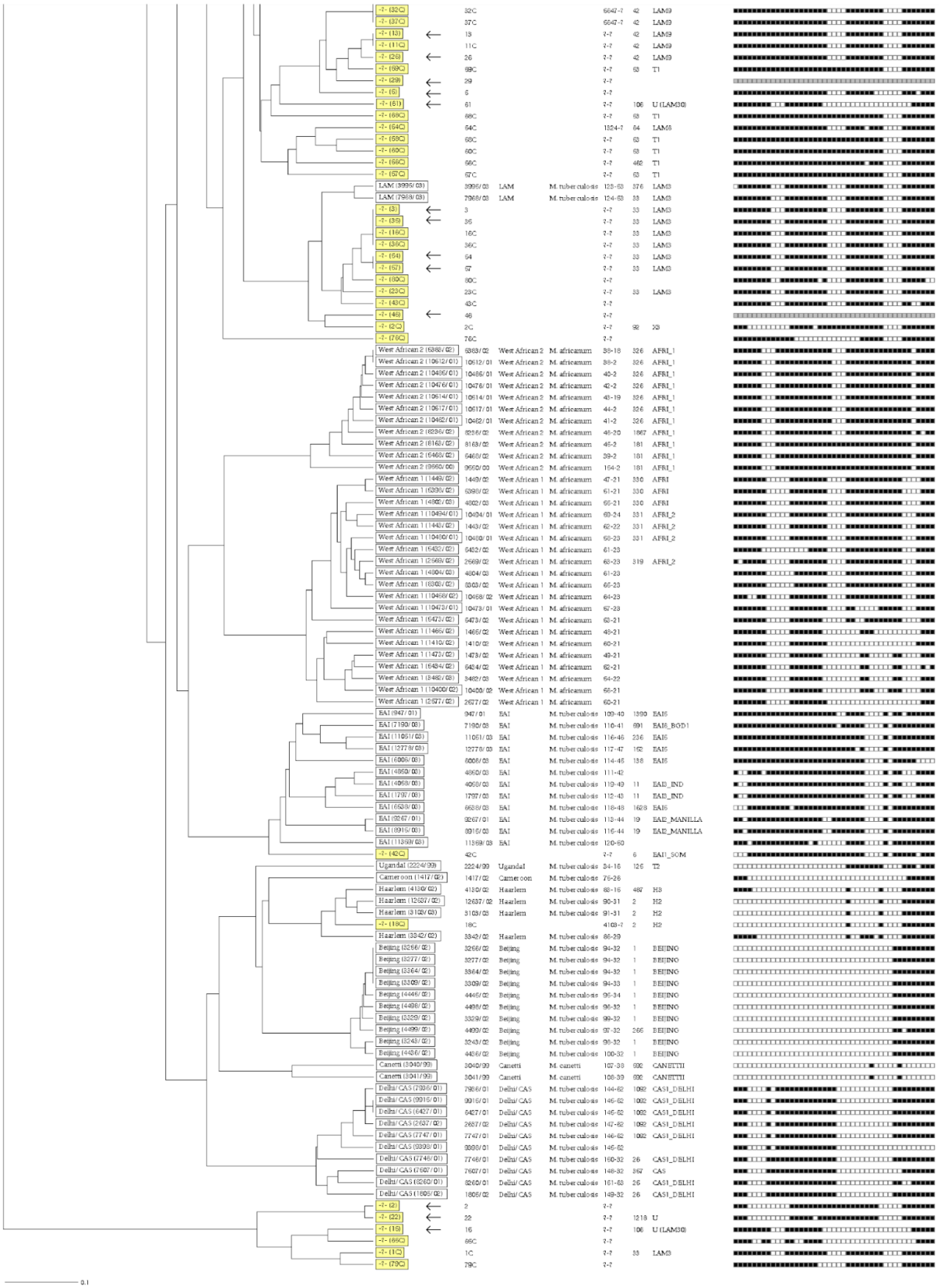


Figura 22. Se muestra el árbol filogenético del tipo UPGMA. Los datos de MIRU (no mostrado) y Spoligotyping (columna derecha) se combinan para generar el árbol. Se indica en amarillo tanto las cepas de la población de estudio como las cepas de la población general. Las flechas negras indican las cepas que corresponden a la población de pacientes graves. Árbol generado en www.miru-vnterplus.org.