

Endosporulación en micobacterias

Ricardo León Vesga¹
Sebastián Camilo Duque-Palacios²

Resumen

La esporulación hace parte de un proceso complejo de defensa, reproducción y resistencia de algunos organismos, entre ellos las bacterias y más específicamente en algunos tipos de bacilos. Recientemente se han presentado diferentes publicaciones que evidencian la posible producción de esporas en un género bacteriano inusual como lo son las micobacterias, al que pertenecen algunas especies muy conocidas como *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. ulcerans*. En esta revisión mostramos algunas de las investigaciones más sobresalientes en el tema y discutimos sobre los estudios que demuestran la evidencia de la endosporulación en dichas bacterias y los que no; y finalmente, planteamos una posible hipótesis que relaciona el posible fenómeno de latencia de *M. tuberculosis* y su asociación con las endosporas.


Palabras clave: esporulación, micobacterias, latencia, tuberculosis.


Endosporulation in mycobacteria

Abstract

Sporulation is part of a complex process of defense, reproduction, and resistance of some organisms, including bacteria and, more specifically, in some bacilli types. Different publications have recently been presented that show the possible production of spores in an unusual bacterial genus such as Mycobacteria, to which well-known species belong to including *M. tuberculosis*, *M. leprae*, and *M. ulcerans*. The most outstanding research about the subject is shown in this review and is discussed studies that shown and no shown endosporulation. Finally, a possible hypothesis related to the likely latency phenomenon of *M. tuberculosis* and its association with endospores is discussed.

Key words: sporulation, Mycobacteria, latency, tuberculosis.

¹ Médico interno- Universidad de Caldas – Universidad de Caldas – Manizales (Caldas)-Colombia, E-mail: ricardo.521423669@ucaldas.edu.co.  0000-0002-3507-4160.

² Médico Interno – Universidad de Caldas – Manizales (Caldas)-Colombia, email: sebastian.521321440@ucaldas.edu.co.  0000-0001-9296-1463. **Google Scholar**

Introducción

El término espora deriva del griego “sporá”, que significa “semilla” y es empleado para definir una célula de reproducción asexual, generalmente haploide (1). La reproducción por esporas permite la dispersión y la supervivencia por largo tiempo en condiciones adversas. La espora produce un nuevo organismo al dividirse por mitosis sin fusión con otra célula, además es un elemento importante en los ciclos biológicos de plantas, hongos y algas (1). En contraste, en algunos géneros bacterianos, el término “endospora” se usa para definir una estructura de supervivencia similar a las esporas (2). Existen diferencias entre estos dos términos, ya que las esporas son propias de células eucariotas, clasificación a la que no pertenecen las bacterias; las esporas son estructuras principalmente de reproducción y en algunos casos permiten la supervivencia dispersándose en condiciones adversas a otros sitios (3, 4), mientras que la endospora bacteriana, es exclusivamente de resistencia al medio en el que se encuentra y en el caso particular de *Bacillus anthracis*, esta estructura es importante para infectar un hospedador y causar enfermedad; las bacterias no utilizan esta estructura como un método reproductivo y puede producir solo una endospora en su periodo de vida (2).

Las endosporas más estudiadas son las producidas por bacterias Gram positivas, de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, estas bacterias disponen de una notable estrategia adaptativa cuando se someten a cambios ambientales adversos o escasez de nutrientes que conducen a la diferenciación en el interior de la célula vegetativa original a una célula durmiente que se conoce como endospora (2, 5-7). La célula vegetativa que generó la endospora se libera liberándola, siendo capaz de permanecer en esta forma por mucho tiempo; algunos autores sugieren que estas estructuras podrían ser viables incluso por cientos de millones de años, como es el caso de *Bacillus circulans*, *Bacillus marismortui* y *Bacillus sphaericus* (3). Sin embargo, para constatar la edad de dichas esporas, algunos autores que

han estudiado el tema sugieren que para poder establecerla con exactitud, se deben cumplir con tres premisas fundamentales que serían: primero, la determinación fehaciente de la edad geológica de la muestra donde se ha encontrado o aislado el microorganismo o restos del mismo; segundo, la verificación mediante protocolos que eviten la contaminación por bacterias ubicuas que generen confusión o error y; tercero, la comprobación de que el microorganismo no haya entrado en la muestra geológica a través de fisuras o grietas (3, 4, 8). Las endosporas son fácilmente diseminadas por el aire y cuando se hallan en condiciones favorables, se desencadena su germinación, inician su actividad metabólica, de modo que cada endospora genera una nueva célula vegetativa, capaz de cumplir funciones metabólicas como su propia división binaria y la obtención de sus nutrientes, por lo tanto, la formación de endosporas es considerada un proceso de supervivencia bacteriana (2).

Proceso de endosporulación: la formación de las endosporas es inherente a algunos tipos de bacilos y se pueden observar en el interior de las bacterias o libremente, después de la desintegración de las células progenitoras (2, 9).

Cuando son intracelulares, las endosporas presentan una forma esférica, su diámetro puede ser esencialmente el mismo que el de la célula madre, o mayor, deformando en algunos casos la pared de la célula vegetativa, como en el caso de *Clostridium botulinum*. El tamaño y localización de las endosporas son relativamente constantes dentro de cada especie dándole una característica determinada y siendo esto importante para la identificación de la bacteria. Por ejemplo, las endosporas pueden estar en el centro de la bacteria como en el caso de *Clostridium perfringens*, subterminal para *Clostridium botulinum* y en el extremo o terminal como en el caso de *Clostridium tetani* (10, 11). Otro ejemplo importante de cómo la endospora confiere una morfología característica, es el caso del *C. tetani*, cuya endospora terminal grande confiere a la célula vegetativa una forma de “palillo de tambor” (11, 12).

Las endosporas son estructuras extremadamente resistentes, mucho más que las células vegetativas a los efectos nocivos del calor, la desecación, presión hidrostática, radiación UV, enzimas contra la pared celular, productos químicos tóxicos, incluidos agentes genotóxicos, agentes oxidantes, aldehídos, ácidos y álcalis entre otros (2, 13).

Algunas endosporas son resistentes a los procedimientos habituales de esterilización, pero pueden destruirse mediante periodos de casi tres horas por calor húmedo (4, 13). Se ha determinado que los mecanismos implicados en la destrucción incluyen daño al ADN, desnaturalización de proteínas cruciales para la formación de las endosporas, daño de constituyentes de la membrana interna y de uno o más componentes del aparato de germinación (2, 13).

Estudios realizados en 1963 empleando *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans* y *B. stearothermophilus* (5, 14); y otro reportado en 2002 con *B. anthracis* y *B. subtilis* (15), documentan que la endospora bacteriana es una especie de "escudo muy poderoso" constituido por cerca de treinta

proteínas diferentes, no descritas en otras estructuras ni tipos de bacterias.

Uno de los procesos de endosporulación sobre los cuales existen más estudios e investigaciones y se cuenta con más información, corresponde a los de *B. subtilis* y en menor cantidad a los del género *Clostridium*.

Tanto en bacilos como en clostridios, se pueden distinguir siete fases consecutivas que finalizan con la liberación de la endospora (6, 7, 15-19) y puede llegar a tener una duración entre 7 a 8 horas a una temperatura de 37°C. El proceso se describe a continuación de manera sucinta ya que el proceso celular y molecular no es objeto de esta revisión; se esquematiza en las figuras 1 y 2:

- Fase I: el material genético bacteriano se condensa formando un filamento central en la célula.
- Fase II: se forma un septo transversal cerca de un polo de la célula, por invaginación de la membrana citoplásmica. Se forman dos compartimentos con su respectivo nucleoide, en el pequeño se formará la endospora y en el grande la célula madre.

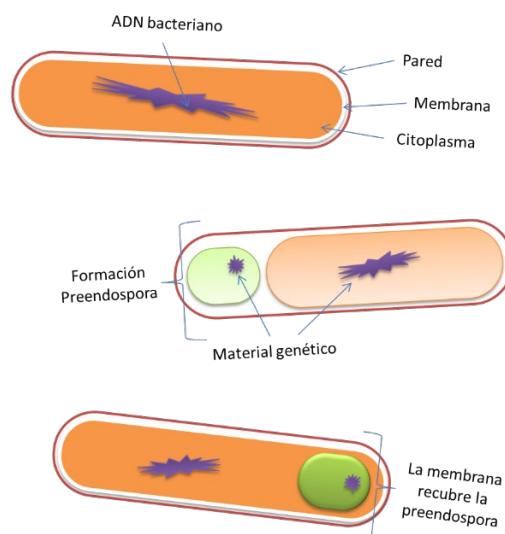


Figura 1. Proceso de endosporulación (imagen original de los autores).

•Fase III: se forma la preendospora. Para que esto ocurra, es necesaria la separación del compartimento preendospora de la célula madre dentro del citoplasma de la célula vegetativa. A partir de esta fase la generación de proteínas solo tendrá lugar en la célula madre, deteniéndose en el compartimento de la preendospora.

•Fase IV: entre las dos membranas que se encuentran en la célula se forma la corteza de la espora que está compuesta de peptidoglicano inmaduro, laxo y flexible.

•Fase V: síntesis de cubiertas, de naturaleza proteica rica en residuos de cisteína.

•Fase VI: maduración de la preendospora. Básicamente se dan dos procesos que comprenden la síntesis de ácido dipicolínico e ingreso de calcio y el desarrollo de la resistencia. Al madurar las cubiertas de la endospora, le confieren resistencia al calor, a las radiaciones ultravioleta (UV), a algunas enzimas como la lisozima y a agentes químicos como el cloroformo (10).

•Fase VII: en esta fase, ocurre la liberación de la endospora madura por autólisis de la célula madre (20, 21).

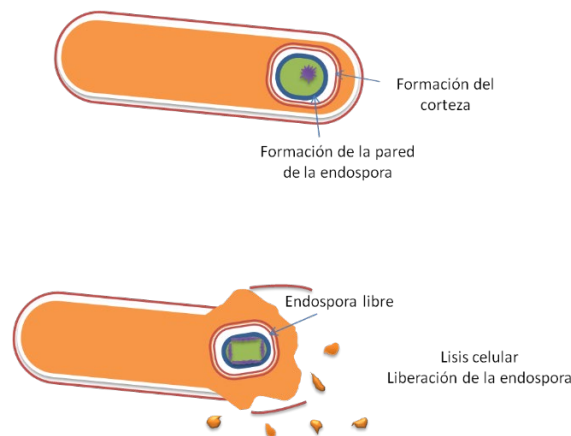


Figura 2. Proceso final, lisis de la célula madre y liberación de la endospora bacteriana.

Fuente: imagen original de los autores.

La síntesis de la cubierta y la corteza, la maduración de la endospora y la lisis de la célula madre son controladas por la expresión de genes específicos durante los últimos estadios. Estos pasos son consecutivos y actúan en cascada.

Genes implicados en la endosporulación

La endosporulación es un proceso de diferenciación celular muy conservado entre las bacterias, e involucra la regulación de la expresión temporal y espacial de varios genes a través de

la utilización de factores de transcripción sigma (σ) de la ARN polimerasa (11). En *B. subtilis* los factores σF y σG se expresan en la endospora, mientras que los factores σE y σK se expresan en la célula madre (5). De manera similar, en *B. thuringiensis* inmediatamente después de la división celular, el factor σF se activa en la preendospora y posteriormente se activa σE en la célula madre; éste a su vez activa al promotor BtI y BtII que se asocian al proceso en el cual la preendospora se recubre de dos membranas, en inglés “*engulfment*” y posteriormente se activan

σG y σK , para promover la transcripción de los genes *Cry* que subsecuentemente constituirán el “cristal proteico” que tiene propiedad de endotoxina (22).

Un estudio realizado en *M. tuberculosis* demostró la presencia de un fragmento de ADN cuya secuencia resultó homóloga a los factores sigma de esporulación SigF de *Streptomyces coelicolor* y *B. subtilis*; este gen es principalmente inducido en la fase estacionaria de crecimiento debido a la disminución en la concentración de nitrógeno y la disminución de la temperatura (23).

Hasta el momento, ya se han identificado 13 factores sigma en *M. tuberculosis*, dentro de ellos están los genes del factor σA y σB , diez factores sigma con función extracitoplasmática y un tipo de factor sigma relacionado con condiciones de estrés y esporulación, conocido como σF (24).

Generalidades sobre la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa y contagiosa producida por *M. tuberculosis*. La OMS considera que un proceso es tuberculoso, cuando se confirma la presencia de *M. tuberculosis* en cualquier sitio del organismo, en secreciones o productos patológicos originados a nivel de las lesiones (25).

La tuberculosis sigue siendo un importante problema de salud, a pesar de que existen importantes esfuerzos para su erradicación; dicha erradicación no ha sido posible y por lo tanto se han propuesto objetivos más plausibles, tales como en un futuro deje de considerarse como un problema de salud pública, lo que implica la reducción de la incidencia hasta el punto de que las acciones masivas y sistemáticas de los servicios de salud sean innecesarias (26).

A partir de los datos recolectados para el 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que 10,4 millones de personas contrajeron la tuberculosis y el número estimado de muertes por TB fue de 1,4 millones, más otros 0,4 millones

de muertes en personas VIH-positivas. Si bien las muertes por TB disminuyeron en un 22% entre 2000 y 2015, la TB continuó siendo una de las diez principales causas mundiales de muerte en 2015 (27).

El hombre es el principal reservorio del bacilo de Koch, y en los seres humanos se transmite principalmente por vía aérea. Las personas que albergan a *M. tuberculosis* en sus pulmones pueden contagiar a otras personas por medio de gotitas respiratorias cuando tosen (28), donde influyen diferentes factores como la virulencia del patógeno y la susceptibilidad del hospedador, pero en general, *M. tuberculosis* no es altamente infeccioso (29).

No todas las personas infectadas por *M. tuberculosis* se enferman. Por eso, existen dos afecciones relacionadas con la tuberculosis: la infección latente (LTBI, por sus siglas en inglés) y la progresión a la enfermedad que ocurre en aproximadamente el 10% de los infectados (30, 31).

En el caso de la LTBI, *M. tuberculosis* tiene la capacidad de persistir o estar presente dentro del hospedador humano sin causar enfermedad, esto gracias a que estos bacilos pueden permanecer en focos residuales en los pulmones, ganglios linfáticos o en otros órganos. Ellos se localizan dentro de los macrófagos del hospedero, de esta manera, permanecen en un estado de NO virulencia, fenómeno conocido como latencia (28, 30, 32, 33).

La LTBI puede activarse después de años o incluso décadas de persistencia subclínica, lo que lleva a la enfermedad progresiva y a la transmisión activa del patógeno. Además, se ha descrito en modelos *in vitro* el crecimiento de *M. tuberculosis* bajo tensión limitante de oxígeno. También se sabe, gracias a modelos experimentales en pulmones de ratón, que la cinética de replicación comprende un periodo inicial de crecimiento exponencial seguido por un periodo de meseta en el cual los bacilos permanecen estables (28, 30).

Otro concepto que se encuentra en la literatura es el de la persistencia, que hace alusión a la supervivencia de la micobacteria frente a la oposición o adversidad, *M. tuberculosis* logra “persistir” entre otras maneras, principalmente residiendo a nivel intracelular en los macrófagos, evadiendo la respuesta inmune celular y por la escasa respuesta a la quimioterapia (30).

Latencia

La latencia en la infección por *M. tuberculosis* es un término definido por Amberson (34) como la presencia de cualquier lesión tuberculosa incapaz de producir síntomas que indiquen su presencia. Cuando la infección inicial se da en personas con un sistema inmune competente, las personas expuestas a *M. tuberculosis* desarrollan una elevada respuesta inmune mediada por células que contrarresta el progreso de la infección, limitándolo así al sitio de invasión inicial en el parénquima del pulmón y los linfonodos locales, estructura también llamada como “complejo de Ghon” (35). Tanto las células T CD4+ como CD8+ y las citoquinas (IFN-Gamma y TNF-alfa) desarrollan un papel importante en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis* y en el control de la infección latente (36).

Durante este estado latente los organismos vivos de *M. tuberculosis* pueden alojarse en el organismo durante muchos años sin causar síntoma alguno, no pueden transmitir las bacterias a los demás y pueden presentar la enfermedad, si no reciben un tratamiento adecuado para la infección latente (37).

El establecimiento de una LTBI se da como consecuencia de la resolución incompleta de las lesiones tuberculosas, las cuales constituyen los sitios de persistencia del bacilo de la LTBI y donde la relación entre el hospedero y la bacteria estimula el proceso de reactivación (38).

Durante la infección latente, el bacilo tuberculoso capaz de persistir en el organismo se somete a condiciones adversas, como carencia de

nutrientes y oxígeno, así como de moléculas microbicidas (intermediarios del nitrógeno y de oxígeno reactivo) (37).

El ambiente hostil generado por las condiciones adversas y además, la adecuada respuesta inmune del hospedador, parece no ser suficiente para la eliminación definitiva del bacilo tuberculoso (39). Poco se sabe sobre la interacción que se produce durante el período infeccioso y la latencia, la relación entre el hospedero y el agente patógeno (29) y de llegar a entenderla podría darnos la clave para desarrollar nuevas formas de prevenir o combatir la enfermedad, incluso de propuestas terapéuticas que permita combatir el estado de latencia (40), erradicando casi por completo esta enfermedad. Otros estudios muestran cómo la presión ambiental, por lo menos *in vitro*, presionan selectivamente a los microorganismos en la formación de estructuras de resistencia. Un estudio francés así lo demuestra, donde apoya la hipótesis de la relación genética entre las *M. tuberculosis* y *S. coelicolor* y los genes involucrados en el control del estrés y el desarrollo de estructuras de resistencia como las endosporas (41).

En los últimos años, algunos científicos suecos, encabezados por el Dr. Ghosh y colaboradores, han reportado que algunas especies del género *Mycobacterium*, logran fortalecerse en el organismo hospedador gracias en parte a su capacidad para formar endosporas durante su estado latente. Los descubrimientos, sobre los cuales se ha publicado un artículo en la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences* (3); de comprobarse estos estudios, podría establecerse una conexión entre la formación de esporas y la latencia de micobacterias en el hospedero como en el caso de *M. tuberculosis* y LTBI.

Es importante tener presente que la latencia es un término clínico que se define únicamente por la falta de indicadores de enfermedad. El estado real de la micobacteria en la latencia humana no se entiende bien. Algunas revisiones (42)

evalúan los resultados de varios modelos in vitro de latencia y consideran la aplicabilidad de varios modelos animales para estudiar aspectos de la latencia humana y la resistencia a la muerte por antibióticos, así como parte de la fisiopatología que contribuye a la resistencia antibiótica y a que combatir infecciones como la producida por *M. tuberculosis*, sea considerada una enfermedad tan compleja como lo es.

Otros autores (43) definen a la TB latente, no por la presencia confirmada de *M. tuberculosis*, sino por la presencia de una respuesta inmune dirigida contra los antígenos de *M. tuberculosis*. Por lo tanto, la TB latente refleja un grupo heterogéneo de individuos, aquellos que tienen enfermedad subclínica.

Esto demuestra que hablar de latencia en *M. tuberculosis* debe dejar de ser un tabú en el campo médico y científico y debería dejarse la posibilidad como un nuevo campo de investigación, que permita seguir esclareciendo lo que ocurre a nivel microscópico.

Reporte de esporulación en micobacterias

Algunos estudios (3, 33) sobre el ciclo vital de *Mycobacterium marinum* (una micobacteria que provoca enfermedades semejantes a la tuberculosis en peces y ranas), refieren que realizaron un seguimiento de los cambios en el tamaño celular y en la distribución del contenido de ADN en estas bacterias mediante citometría de flujo, el cual se utilizó para contar y examinar las partículas microscópicas; además, se realizó microscopía de contraste de fases, durante todo el ciclo vital de la micobacteria, desde la inoculación en el medio de cultivo, hasta la fase estacionaria; allí identificaron que durante esta fase los cultivos de *M. marinum* contenían un gran número de células en las que se distinguían dos poblaciones, unas pequeñas y otras más grandes; por microscopía electrónica de barrido se confirmó la presencia

de gran cantidad de partículas uniformes, brillantes y pequeñas. Para confirmar que estas partículas eran endosporas, utilizaron una tinción diferencial con verde de malaquita en donde estas retuvieron el color verde; además, realizaron una prueba de tolerancia al calor para determinar la termorresistencia y un tratamiento con glutaraldehído para evaluar la resistencia química, ya que las endosporas poseen gran tolerancia tanto al estrés físico como químico. De estos ensayos se obtuvo que el 40% de las células que se encontraban en fase estacionaria, sobrevivieron al tratamiento térmico y al agente químico.

En las siguientes imágenes (figura 3), tomadas de los estudios de Gosh et al. (3), se puede apreciar la presencia de partículas de endosporas en un cultivo de *M. bovis* Calmette-Guerin (MBCG): A. Imagen de fluorescencia de un cultivo de 6 meses (Barra de escala: 5 microm.). B. Partículas teñidas con coloración especial para endosporas tomadas del cultivo anterior. C. Imagen por microscopía electrónica de barrido de cultivo de MBCG (Barra de escala: 1 microm.). D. Imagen por microscopía electrónica de transmisión de cultivo de MBCG (Aumento: 60,000 X).

También emplearon técnicas de bioinformática para discernir si las partículas poseían los mecanismos genéticos adecuados para entrar y salir del estado de endospora, encontrando algunos de los genes específicos que favorecen la esporulación como lo son SpoVK, SpoIIIE, CotSA SpoVE, Soj. Estos genes están presentes en *Bacillus subtilis* y básicamente tienen como función la síntesis de la corteza, la maduración y, por último, crear una capa de proteínas que recubre a la endospora (proceso descrito anteriormente). Sin embargo, algunos de los genes que juegan un papel clave en la esporulación de *B. subtilis* (44), por ejemplo, spoIVA y spoIIIG (que codifica el factor sigma rG), aún no han sido identificados en el genoma de *M. tuberculosis*.

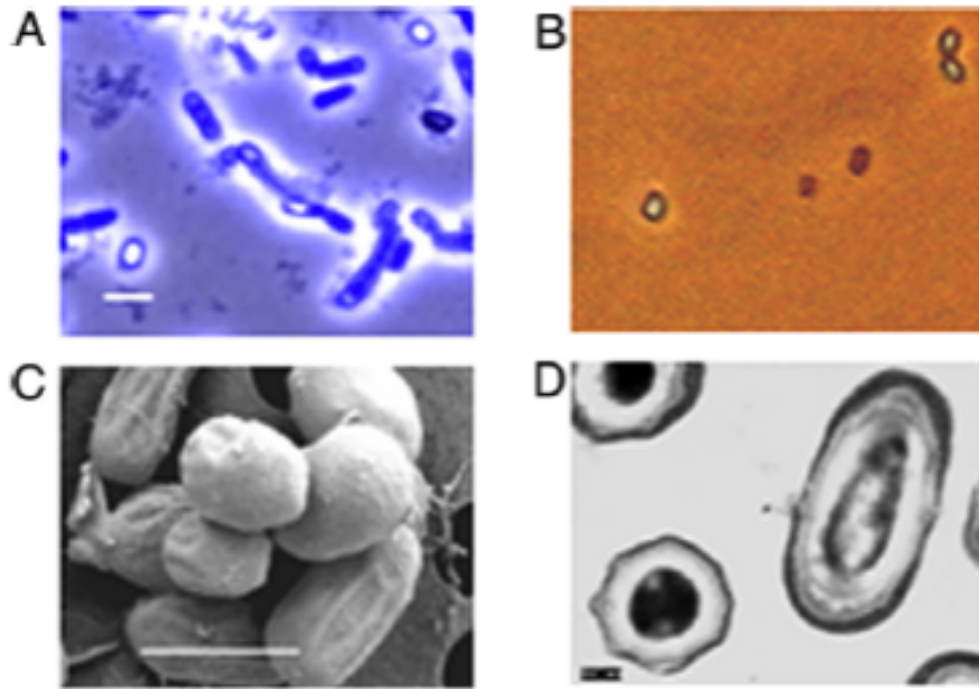


Figura 3.

Estas investigaciones conducirían a plantear que las micobacterias tendrían la capacidad de formar endosporas, dado los hallazgos encontrados en *M. marinum* (3).

Otros estudios posteriores fortalecen dicha hipótesis, en estos se encontraron los mismos resultados, en cuanto al hallazgo de las partículas brillantes que fueron teñidos con verde de malaquita en *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium kansasii* (32). Estos datos proporcionan una evidencia experimental a favor de la posibilidad de que la esporulación es una característica general de las micobacterias y no se limita a *Mycobacterium marinum* (3, 33), es decir, una relación del género *Mycobacterium*. Sin embargo, algunas especies como *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium chelonae* no tienen el grupo de genes específicos de la esporulación (32), y, aun así, estudios recientes han demostrado que *M. smegmatis* es capaz de formar diferentes

tipos de células morfológicamente distintas cuando se encuentra en condiciones de reposo e inanición y es capaz de salir de esta fase cuando las condiciones ambientales mejoran (45).

Debido a la cercanía filogenética entre *Mycobacterium marinum* y *Mycobacterium ulcerans* (51) el agente que provoca la úlcera de Buruli, de la que se sabe que es una de las enfermedades micobacterianas de mayor afectación en la actualidad (46), los descubrimientos pueden tener también implicaciones para la prevención de esta última.

Estudios adicionales realizados por uno de los grupos más prestigiosos en el campo de la esporulación de *Bacillus subtilis* liderado por el Dr. Richard Losick (44) realizó experimentos repetidos utilizando la metodología del Dr. Ghosh et al. (3), con el fin de confirmar y aportar nuevos descubrimientos, sin embargo, los resultados fueron opuestos a los iniciales.

De acuerdo con el estudio del Dr. Losick (44), en primer lugar, su grupo buscó genes ortólogos para la esporulación en especies del género *Mycobacterium* y *Streptomyces*. Una de las cosas que les llamó la atención es el extraordinario parecido entre las aparentes endosporas de *Mycobacterium* spp. con las endosporas de *Bacillus* spp., así que con buen criterio pensaron que unas estructuras tan parecidas bien podrían ser codificadas por genes muy similares. Incluyeron al género *Streptomyces* por ser un género productor de exosporas y que al igual que el género *Mycobacterium*, también pertenece al grupo de bacterias Gram Positivas con alto contenido en % G+C. En cambio, *Bacillus subtilis* pertenece al grupo de las de bajo contenido en % G+C.

Estudios posteriores, realizados por el Dr. Singh et al., se describió que había cinco genes de esporulación (similares a los de *B. subtilis*) presentes en *Mycobacterium* spp., pero cinco es un número muy bajo si se considera que hay cerca de 200 genes involucrados en el complejo proceso de esporulación (47). Además, esos cinco genes no son exclusivos de las micobacterias, sino que también están presentes en otros grupos que no esporulan; asimismo, la mayor parte de los genes principales involucrados en la esporulación no están presentes en los genomas de *Mycobacterium* spp. y de *Streptomyces* spp. (44).

Por otra parte, y continuando con las comparaciones entre los estudios, el Dr. Losick et al. (44), no consiguieron reproducir los resultados de termorresistencia demostrados por el Dr. Ghosh (3).

La termorresistencia es una de las características más llamativas en la investigación. Desde los tiempos de Pasteur se sabía que la cocción de la leche a 65°C era una de las formas seguras de eliminar al patógeno de la tuberculosis bovina y evitar su transmisión a los humanos (48). Para Singh et al. (49), la confirmación de la hipótesis de endosporas termorresistentes respondería a

la pregunta que hasta ahora no ha tenido una respuesta justificable sobre el fenómeno de la latencia causada por *M. tuberculosis*, mediante el cual, este patógeno permanece latente en los tejidos del hospedador y al cabo de un tiempo resurge.

Además, como indica el Dr. Losick et al. (44) al final de su publicación, los resultados obtenidos por el Dr. Ghosh pueden corresponder a una de dos posibilidades, un caso de convergencia evolutiva como nunca se había visto, o el grupo habría trabajado con cultivos contaminados con alguna especie de *Bacillus*.

Desde la aceptación de la teoría de la evolución propuesta por Darwin y para dar explicación a estos resultados, se estaría hablando muy probablemente de una convergencia evolutiva donde dos seres vivos llegan a desarrollar estructuras análogas pero que tienen distinto origen evolutivo; es decir, serían dos bacterias que habrían desarrollado la misma estructura de resistencia, pero a partir de genes completamente diferentes (50).

La posibilidad de la contaminación de los cultivos con *Bacillus subtilis* queda descartada principalmente por el tiempo de producción de las endosporas, ya que se reportó que la endosporulación se llevó a cabo a las 168 horas luego de inoculación; para el caso de *B. subtilis* este proceso no toma más de 12 horas (49).

Con el ánimo de mantener la hipótesis planteada inicialmente por el grupo del Dr. Singh (49), al no encontrar una completa relación bioinformática de genes homólogos, se basaron en las observaciones empíricas de las endosporas y el establecimiento de sus propiedades. El hecho de que no haya genes homólogos entre las bacterias que esporulan como *B. subtilis* y las micobacterias, no descarta la posibilidad de que este proceso sea llevado a cabo por otro grupo de proteínas con estructura y función similar.

Además, Singh et al. plantean alternativas en cuanto al mecanismo de la esporulación,

teniendo en cuenta a las tradicionalmente conocidas como la de *B. subtilis*. Para apoyar esta idea, expone que algunas bacterias que realizan el proceso de esporulación como *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* carecen en su genoma de muchos de los genes relacionados con este proceso que sí están presentes en *B. subtilis* (49).

Como indica el grupo del Dr. Losick (44), la metodología propuesta por el Dr. Ghosh (3), no ha sido reproducible. Ante esta falta de uniformidad en los resultados, el grupo del Dr. Singh (49) sugiere que no se han conseguido probablemente debido a que no se han encontrado los mecanismos que enciendan correctamente este proceso de endosporulación; sin embargo, variando las condiciones de crecimiento se ha logrado el aumento de la frecuencia de la endosporulación y relatan que se encuentran trabajando en el planteamiento de nuevos protocolos.

Finalmente, y debido a estas investigaciones expuestas previamente, por ahora se evidencia que hay indicios que pueden relacionar a la endosporulación con el estado de latencia de las micobacterias y además explicar el mecanismo por el cual provoca infecciones crónicas.

Deberá seguir estudiándose para culminar con las hipótesis y establecer nuevos conocimientos, romper con los conceptos actuales que se tienen de las micobacterias y a partir de ahí plantear nuevos criterios que contribuyan a la erradicación de una enfermedad que día a día parece perpetuarse entre nosotros.

Agradecimientos

Al Dr. Jorge E. Pérez Cárdenas por su entrega, dedicación y grandes aportes a la elaboración de este escrito que contribuye a nuestra formación académica y científica.

Referencias Bibliográficas

1. Curtis H, Barnes S, Schnek A, Massarini A. Biología De Curtis 7ª Edición. Editorial Panamericana. 2008.
2. Prajapati RS, Cutting S. Spores, Sporulation and Germination. Cutting Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey, UK. 2001.
3. Ghosh J, et al. Sporulation in mycobacteria. Proc Natl Acad Sci USA 106:10781–10786.
4. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica; 25º ed., México DF, Editorial Manual Moderno. 2011
5. Errington J. Bacillus subtilis sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Rev* 57:1-33. 1993.
6. Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*. Curr. Opin. Microbiol. 7: 579-586. 2004.
7. Stragier P, Losick R. Molecular genetics of sporulation in Bacillus subtilis. Annu Rev Genet 30:297-341. 1996.
8. Guerrero R, Berlanga M. La "inmortalidad" procariótica y la tenacidad de la vida. Semáforo, boletín de la Sociedad Española de Microbiología. 32:16-23. 2001.
9. Piggot PJ, Coote JG. Genetic aspects of bacterial endospore formation. Bacteriol Rev 40:908-962. 1976.
10. Lee K, Bumbaca D, Kosman J, Setlow P, Jedrzejewski MJ. Structure of a protein – DNA complex essential for DNA protection in spores of *Bacillus* species. Proceedings of the National Academy of Sciences. 105 (8): 2806-2811. 2008.

11. Csillag A. Spore Formation and 'Dimorphism' in the Mycobacteria. *J. gen. Microbiol.* 26, 97-109, 1961.
12. Turenne C, Snyder J, Alexander D. Bacillus and Other Aerobic Endospore-Forming Bacteria*,. In Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition. 2015. p 441-461.
13. Setlow P. Spore Resistance Properties,. In Driks A, Eichenberger P (ed), *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems*. ASM Press, Washington, DC. p 201-215. 2016 doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012..
14. Warth AD, Ohye DF, Murrell WG. The composition and structure of bacterial spores. *J Cell Biol* 16:579-592. 1963.
15. Driks A. Maximum shields: The assembly and function of the bacterial spore coat. *Trends Microbiol* 10:251-254. 2002.
16. Atrih A, Foster S. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of applied microbiology.* 91(2): 364-72. 2001.
17. Labbé, R. Sporulation (Morphology) of Clostridia. In Peter Dürre (Ed.), *Handbook on Clostridia*. Boca Ratón, Florida: Taylor & Francis Group. 2005. pp. 647 – 658
18. Paredes CJ, Alsaker KV, Papoutsakis ET. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Reviews Microbiology.* 3 (12): 969-78. 2005.
19. Mancilla XP, Castaño DM. Formación de endosporas en Clostridium y su interacción con el proceso de solventogénesis. *Revista Colombiana de Biotecnología,* 15(1), 180-188. 2013.
20. Hilbert DW, Piggot PJ. Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 234-262. 2004.
21. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. *Prescott's Microbiology*, 10ed. New York. McGraw-Hill. 2017.
22. Agaisse H, Lereclus D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 177: 6027-6032. 1995.
23. Arráiz N. Sigma Factors and Stress Reactions in Micobacterias (Review). *Kasmera* 30(2): 112-125, 2002.
24. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393-537. 1998.
25. Toman, K. Tuberculosis: Detección de casos, tratamiento y vigilancia. Preguntas y respuestas. Organización Panamericana de la Salud, boletín técnico No. 617. 2006.
26. González-Ochoa E, Armas-Pérez L. Eliminación de la tuberculosis como problema de salud pública: consenso de su definición. *Revista Cubana de Medicina Tropical,* 67(1), 114-121. 2015.
27. Organización Mundial de la Salud (OMS). Control mundial de la TB - Informe 2016.
28. Abbate E, Ballester D, Barrera L, Brian MC. et al. Consenso argentino de tuberculosis. *Rev Arg Med Res.* 9:61-99. 2009
29. Morrison J, Pai M, Hopewell P. Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases.* 8(6):359-368. 2008.
30. Gomez JE, McKinney JDM. Tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis.* 84(1):29-44. 2004.
31. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). TB. Datos básicos sobre la tuberculosis Infección de tuberculosis latente y enfermedad de tuberculosis [Internet]. Citado 13 abril 2018. Cdc.gov. Available from: <https://www.cdc.gov/tb/esp/topic/basics/tbinfectiondisease.htm>
32. Parrish N, Dick J, Bishai W. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology.* 6(3): 107-112.1998.

33. Singh B, Ghosh J, Islam NM, Dasgupta S, Kirsebom LA . Growth, cell division and sporulation in mycobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 98:165-167. 2010
34. Amberson J. The significance of latent forms of tuberculosis. *N Engl J Med*, 219:572-6. 1938.
35. Ghon A. The primary complex in human tuberculosis and its significance. *Am Rev Tuberc* 7:314-7. 1923.
36. Leyten E, Lin MY, Franken K, Friggen A, Prins C, van Meijgaarden K, et al. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*; 8:2052-60. 2006.
37. Álvarez N, Borrero R, Reyes F, Camacho F, Mohd N, Sarmiento ME, Acosta A. Mecanismos de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente. *Vaccinmonitor*, 18(3):18-25. 2009.
38. Clark-Curtiss JE, Haydel SE. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis; 57:517-49. 2006.
39. Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R, Fernández C, Rivas-Santiago B. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico: Revisión. *Invest. clín.* 49(3): 411-441. 2008.
40. Peña C, Farga V. Nuevas perspectivas terapéuticas en tuberculosis. *Rev. chil. enferm. respir.* 2015.
41. Urem M, et al. OsdR of *Streptomyces coelicolor* and the dormancy regulator DevR of *Mycobacterium tuberculosis* control overlapping regulons. *mSystems* 1.3. 2016.
42. Chao MC, Rubin E. Letting sleeping dogs lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annual review of microbiology* 64 (2010): 293-311.
43. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP The immune response in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 31, 475-527. 2013.
44. Traag BA, Driks A, Stragier P, Bitter W, Broussard G, Hatfull G, Chu F, Adams KN, Ramakrishnan L, Losick R. Do mycobacteria produce endospores? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (2), 878-81. 2010.
45. Wu M, Gengenbacher M, Chung JCS, Chen SLin, Mollenkopf HJ, Kaufmann SHE. & Dick T. Developmental transcriptome of resting cell formation in *Mycobacterium smegmatis* (research article) *BMC genomics* 17:837. 2016.
46. Duker A, Portaels F, Hale M. Pathways of *Mycobacterium ulcerans* infection: A review. *Environ Int* 32:567-573, 2006.
47. Castañeda-Sandoval L, De La Torre M, Casas-Flores S, Islas-Osuna M. Regulación del inicio de la esporulación e histidina cinasas: un análisis comparativo entre *Bacillus subtilis* y el grupo *Bacillus cereus*, *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*. 34 (5), 315-321. 2009.
48. Cirone K, Morsella C, Colombo D, Paolicchi F. Viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in elaborated goat and bovine milk cheese maturity. *Acta de bioquímica clínica Latinoamericana*. 40(4): 507-513. 2006
49. Singh B, Ghosh J, Islam NM, Dasgupta S, Kirsebom LA Growth, cell division and sporulation in mycobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 98:165-177. 2010.
50. Custance A. Convergencia, y el origen del hombre. *El Pórtico*, No 7. 1977 available in: <http://www.sedin.org/doorway/07-doorway.html>
51. Stinear T, Jenkin A, Johnson P, Davies J. Comparative genetic analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* reveals evidence of recent divergence. *Journal of Bacteriology*, 182(22), 6322-6330. 2000.