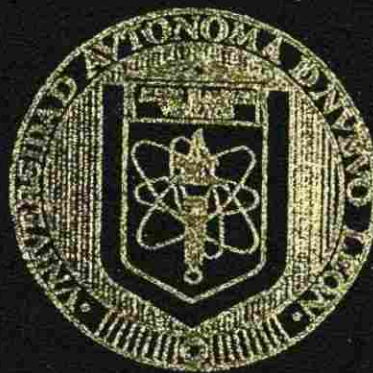


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS GENÉTICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS
DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS
A SUBCULTIVO.

Por

M.C. CARMEN AMELIA MOLINA TORRES

Como requisito parcial para obtener el Grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en
Microbiología

SEPTIEMBRE DEL 2007

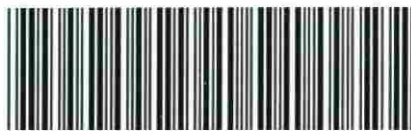
TD
Z5320
FCB
2007
.M64

ANÁLISIS GENÉTICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS

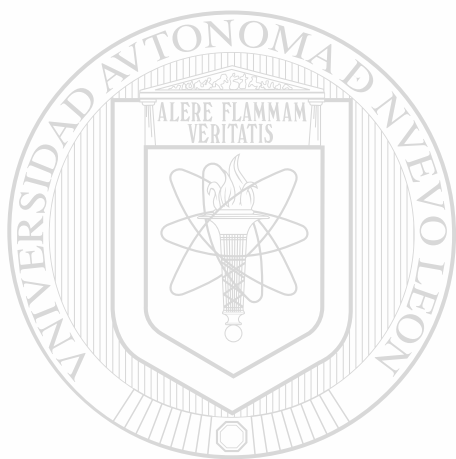
DE *Mycobacterium tuberculosis*

A SUBCULTIVO.

CS



1020160697



UANL

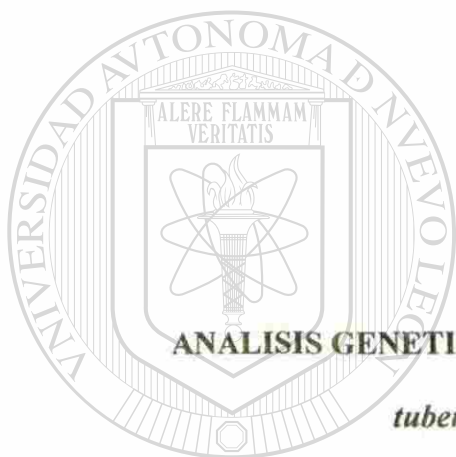
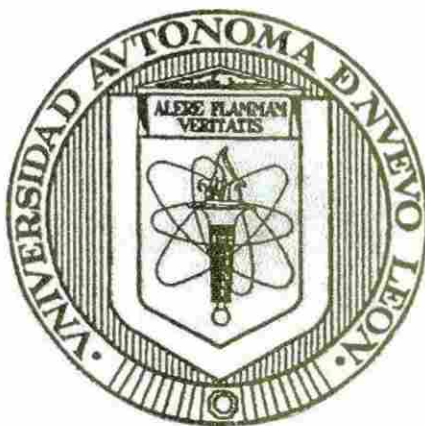
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS GENÉTICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS A SUBCULTIVO.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M.C. CARMEN AMELIA MOLINA TORRES

Como requisito parcial para obtener el Grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología

Septiembre de 2007

1045891



FONDO
TESIS

170908

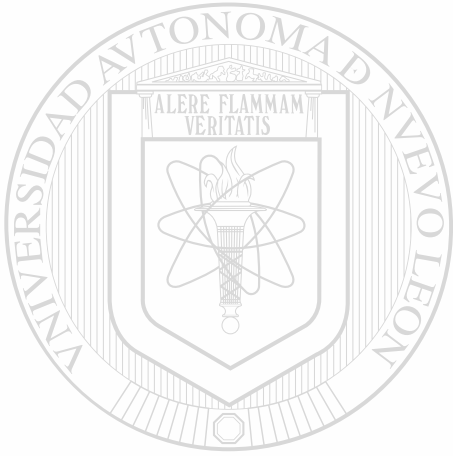
TD

Z5320

FCB

2007

.M64



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

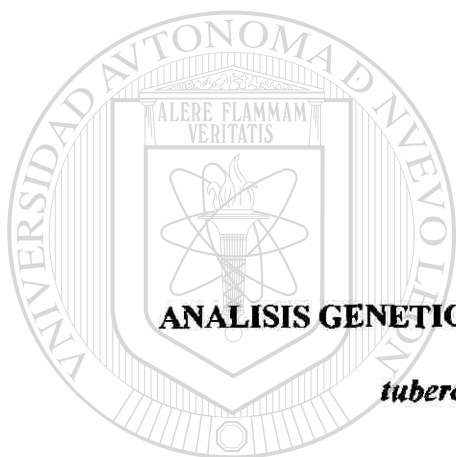
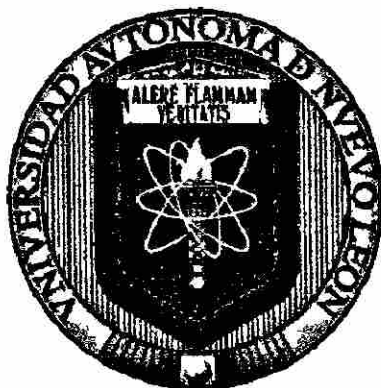
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- Septiembre - 08
Revisado por la C. C. C.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS GENÉTICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS A SUBCULTIVO.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
M.C. CARMEN AMELIA MOLINA TORRES

Como requisito parcial para obtener el Grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología

Septiembre de 2007

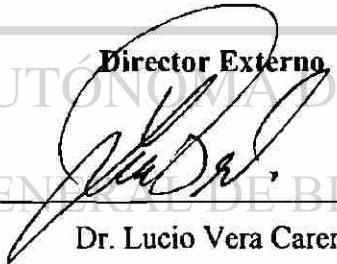
ANALISIS GENETICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS A SUBCULTIVO.

Presentado por:

M.C. CARMEN AMELIA MOLINA TORRES


Este trabajo se realizó en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “José Eleuterio González”, en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social y en la Unité de Génétique Moléculaire Bactérienne del Institut Pasteur en Paris, Francia bajo la dirección externa del Dr. Lucio Vera Cabrera, la dirección interna de la Dra. Licet Villarreal Treviño y la Co-dirección del Dr. Jorge Castro Garza

Director Externo



Dr. Lucio Vera Carera

Director Interno



Dra. Licet Villarreal Treviño

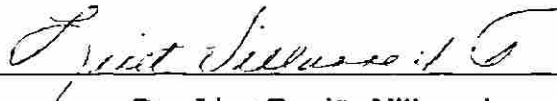
Co-Director



Dr. Jorge Castro Garza

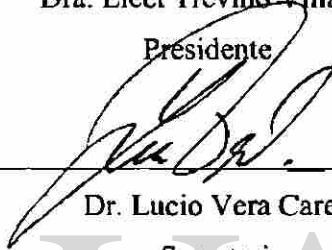
ANALISIS GENETICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS A SUBCULTIVO.

Comité de Tesis



Dra. Licet Treviño Villarreal

Presidente



Dr. Lucio Vera Carera

Secretario



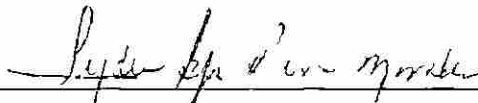
Dr. Jorge Castro Garza

Primer vocal



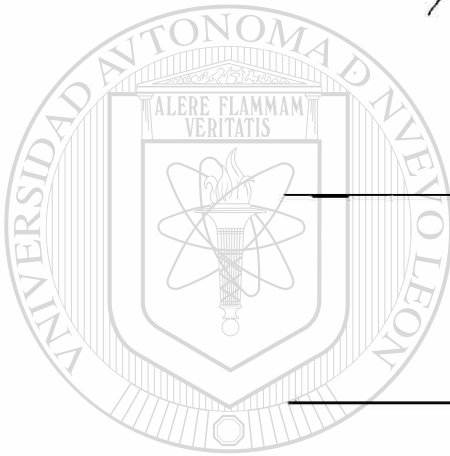
Dra. Norma Laura Heredia Rojas

Segundo vocal



Dra. Lidia Guadalupe Rivera Morales

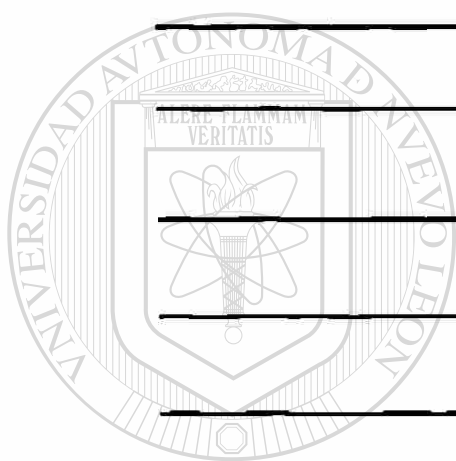
Tercer vocal



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**ANALISIS GENETICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium*
tuberculosis SOMETIDAS A SUBCULTIVO.**

Comité Académico de Doctorado



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dra. Diana Reséndez Pérez
Subdirector de Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

Principalmente a mi Director de tesis, Dr. Lucio Vera por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, por confiar en mí para participar en los distintos proyectos de investigación e impulsarme a crecer profesionalmente.

A la Dra. Licet Villarreal Treviño por haber colaborado en la dirección de esta tesis y por estar siempre al pendiente y con disposición para el seguimiento adecuado de este trabajo.

Al Dr. Jorge Castro quien figuró como colaborador importante de este trabajo, por los valiosos conocimientos compartidos y por su paciencia y minuciosidad en la revisión de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Doctorado.

A los miembros del Comité Tutorial, al Dr. José Santos Alvarado García y la Dra. Myriam Elías Santos por sus valiosas críticas al discutir los resultados cada semestre.

Al personal del Laboratorio de Dermatología del Hospital Universitario José E. González por haberme permitido utilizar su espacio de trabajo y por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el Laboratorio y especialmente a la Q.F.B. Wendy Escalante Fuentes.

A los compañeros y amigos de los diferentes laboratorios que formaron parte importante en mi estancia, a Pilar Carranza por su apoyo y confianza, a Charly Salinas y Hugo Barrios por colaborar con la preparación de las células, a Selene Nájera, Efrén Jaramillo, Ezequiel Viveros, Víctor Moreno y Víctor Velázquez. Fue una suerte conocerlos.

A los amigos que de una u otra forma me acompañaron en esta aventura: Elsa Ochoa, Teresa Pérez-Gavilán, Tania Medellín, Melba Torres, Raul Sandoval, Ofelia Sánchez, Pablo Armijo, Melissa Martínez, Ruben Domínguez, Abraham Montes, Diana Castillo, Marcos Guerrero, Norma Cordero y Anaelena de la Cruz.

A mi padre y mis hermanos por el apoyo moral y el cariño que siempre me han brindado, pero principalmente por ser mis amigos.

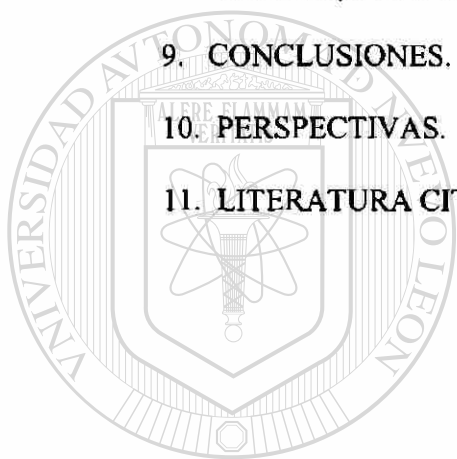
Y sobretodo, a Brandon por su apoyo y amor. Tu presencia es igual a una canción.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT.	1
2. INTRODUCCION.	3
2.1. Tuberculosis	3
2.2. Taxonomía.	3
2.3. Descripción del género.	4
2.4. Significado clínico de la infección con el complejo <i>M. tuberculosis</i>	5
2.5. Epidemiología global de la Tuberculosis.	6
2.6. Tuberculosis y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).	7
2.7. Situación en México.	8
<hr/>	
3. HIPOTESIS.	10
4. OBJETIVOS.	11 [®]
4.1. Objetivo principal.	11
4.2. Objetivos específicos.	11
5. ANTECEDENTES	12
6. MATERIAL Y METODOS.	20
6.1. Selección de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> provenientes de aislamientos clínicos con delección del locus PLC.	20
6.1.1. Cultivo y preparación del stock.	21
6.1.2. Determinación de la cuenta bacteriana de los stocks.	22
6.1.3. Extracción del ADN	22
6.2. Análisis de la región cercana al locus PLC.23	
6.2.1. Ensayo de PCR.	24
6.2.2. Determinación de la extensión de las delecciones en el locus PLC.	25

6.2.3. Ensayo de PCR larga.	26
6.3. Ensayo de microarreglos para determinar ausencia de Genes en los asilamientos con respecto a la cepa H37Rv.	27
6.3.1. Método para el marcaje de ADN con Cy3 y Cy5.	27
6.3.2. Protocolo de hibridación estándar.	27
6.4. Genotipificación de ADN basada en IS6110.	29
6.4.1. Digestión del ADN con PvuII.	29
6.4.2. Separación de los fragmentos de ADN por electroforesis.	30
6.4.3 Southern Blotting	30
6.4.4. Adhesión del ADN a la membrana por enlaces covalentes.	31
6.4.5. Preparación de la sonda por PCR.	31
6.4.6. Marcaje de la sonda.	31
6.4.7. Hibridación y detección.	32
6.5. Spoligotyping.	33
6.6. Ensayos de citotoxicidad.	33
6.6.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular THP-1.	34
6.6.2. Transformación de la línea celular THP-1.	34
6.6.3. Determinación de la capacidad citotóxica de las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	35
6.6.4. Cuantificación de la citotoxicidad por el Método del cristal violeta.	36
6.7. Subcultivo de las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	36
6.7.1. Determinación de la concentración ideal de bilis para el subcultivo.	36
6.7.2. Determinación del tiempo idóneo para el subcultivo de las cepas. Curvas de crecimiento.	37
6.7.3. Obtención de clones de las cepas.	38
6.7.4. Subcultivo de las cepas clonadas.	38
6.8. Determinación de los cambios genéticos y/o de virulencia de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> subcultivadas.	40
6.8.1. Verificación por PCR de las deleciones reportadas en el ensayo de microarreglos.	40
6.8.2. Ensayo de PCR.	40
7. RESULTADOS.	43
7.1. Análisis de la región cercana al locus PLC.	43
7.2. Caracterización genética de la deleción del locus PLC.	45
7.3. Análisis de microarreglos en las cepas parentales.	47
7.4. Subcultivo de las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	52
7.4.1. Determinación de la concentración ideal de bilis para el subcultivo.	52
7.4.2. Determinación del tiempo idóneo para el subcultivo de las cepas.	53
7.4.3. Estado del subcultivo.	55
7.5. Genotipificación de ADN basada en IS6110.	56
7.6. Spoligotyping.	57

7.7. Ensayo de citotoxicidad sobre la monocapa de macrófagos THP-1.	59
7.8. Análisis de microarreglos en el pase 100	62
7.8.1. Verificación por PCR de las deleciones reportadas en el ensayo de microarreglos.	66
7.9. Determinación de la cuenta bacteriana de los cultivos	67
8. DISCUSION	69
8.1. Análisis de la región cercana al locus PLC	70
8.2. Ensayo de microarreglos.	73
8.3. RFLP y Spoligotyping.	75
8.4. Ensayo de citotoxicidad en macrófagos.	78
9. CONCLUSIONES.	82
10. PERSPECTIVAS.	83
11. LITERATURA CITADA.	84



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



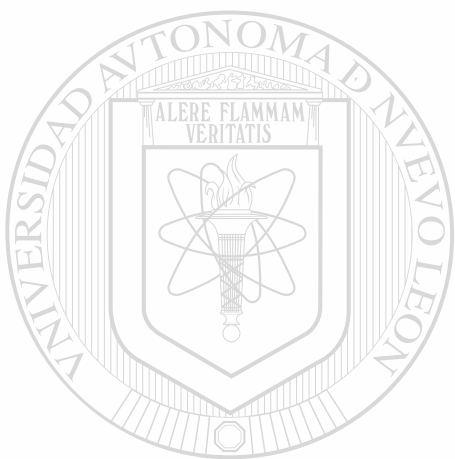
LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> utilizados en este trabajo.	21
2. Oligonucleótidos utilizados para analizar la región cercana al locus PLC.	24
3. Iniciadores para los genes adyacentes al locus PLC.	26
4. Oligonucleótidos utilizados para verificar las deleciones reportadas en el análisis de microarreglos de las cepas subcultivadas.	41
5. Amplificación de los genes más cercanos al locus de PLC	44
6. Genes ausentes de los aislamientos parentales de <i>M. tuberculosis</i> , aparte de la región PLC.	49
7. Crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> RIVM 97-0488 y H37Rv en distintos medios de cultivo.	52
8. Lectura de la absorbancia a 600 nm de los cultivos de <i>M. tuberculosis</i>	54
9. Estado del pasaje serial	56
10. Genes ausentes en los aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> parentales y los sometidos a pasaje serial.	63
11. Amplificación de los genes discordantes en el ensayo de microarreglos de las cepas parentales y las subcultivadas.	66
12. Cuentas bacteriana en UFC/ml de las cepas en estudio.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tinción de Ziehl-Neelsen de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . 100x	4
2. Casos reportados y muertes estimadas por tuberculosis en México, 1995-2005.	9
3. Región del locus PLC y genes contiguos.	25
4. Macrófagos derivados de la línea celular THP-1.	35
5. Condiciones de cultivo de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> para el pasaje serial.	39
<hr/>	
6. Representación esquemática de la localización del locus PLC en la cepa H37Rv.	43
7. PCR para la búsqueda de los genes más conservados adyacentes al locus PLC.	45
8. Región de PLC de las cepas <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y CDC1551 y cambios genéticos en las cepas Δ PLC usadas en este estudio.	47
9. Curvas de crecimiento de las diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> utilizadas en este estudio.	55
10. Análisis de RFLP para el elemento IS6110 de las cepas parentales y las subcultivadas.	57
11. Patrones de Spoligotyping de las cepas parentales y las subcultivadas.	59
12. Fotografía de una microplaca con macrófagos infectados con dos diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> a los 7 días de incubación.	60

13. Ensayo de citotoxicidad sobre una
monocapa de macrófagos THP-1. 61



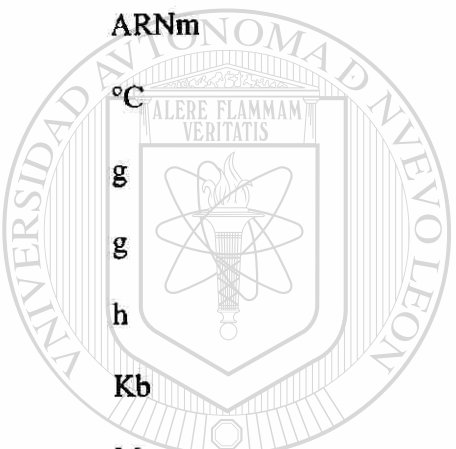
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

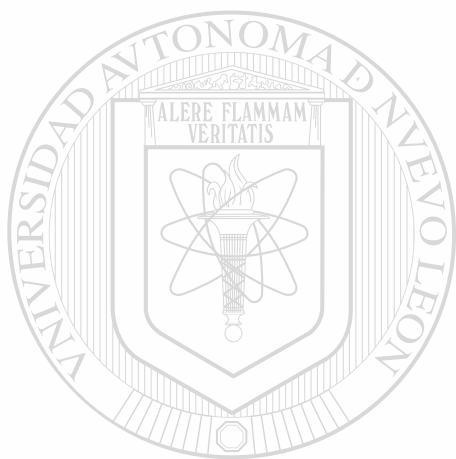
NOMENCLATURA



ADN	Acido desoxiribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
°C	Grados Celsius
g	Gramos
g	Unidades de fuerza centrifuga relativa
h	Hora
Kb	Kilobases
M	Concentración molar

min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milimetro
mM	Concentración milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ng	Nanogramos
nM	Concentración nanomolar
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonia
v	Volts



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1. RESUMEN

Se ha observado que el subcultivo produce cambios en la virulencia de los microorganismos, por ejemplo el virus de la rabia y *Mycobacterium bovis* BCG. Este último ha sido usado como vacuna contra la tuberculosis por los últimos 100 años, sin embargo en algunos casos su eficacia ha resultado ser muy baja. Estudios genómicos de *M. bovis* BCG y sus variantes han demostrado diversos cambios genéticos. Es posible que la baja eficacia de BCG sea debida a que este es un aislamiento de *M. bovis* y no de *M. tuberculosis per se*, las cuales son similares pero no son las mismas. El objetivo de este trabajo fue observar los cambios genéticos y de virulencia que se producen en aislamientos de *M. tuberculosis* sometidos a pasaje serial en medio líquido.

Para determinar si cambios similares pueden ser observados en *M. tuberculosis* se seleccionaron seis aislamientos, incluyendo *M. tuberculosis* H37Rv, una cepa Beijing y cuatro aislamientos que carecen del locus de fosfolipasa (*plcA-plcB-plcC*). Estas cepas fueron sometidas a subcultivo en medio líquido Middlebrook 7H9 con y sin bilis. Después de 100 pases llevamos a cabo un análisis de RFLP IS6110 para determinar de manera rápida si hubo cambios genéticos. Por otro lado se verificaron los cambios utilizando análisis de microarreglos de su ADN genómico. Los cambios en la virulencia fueron hechos midiendo el efecto citotóxico de las cepas parentales y aquellas sometidas a subcultivo sobre una monocapa de macrófagos THP-1. Solo se observaron pequeños cambios en la composición genética en algunos aislamientos, La citotoxicidad fue menor en aquellas cepas que se sometieron al pasaje serial, El cambio más visible fue el cambio de posición de una de las bandas de IS6110 de 1,400 pb a 1,600 pb en la cepa Beijing subcultivada en el medio con bilis.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



6.5. Spoligotyping.

El método descrito en este protocolo está basado en el polimorfismo de ADN presente en un locus cromosomal particular, la región del “Repetido Directo”. Esta región consiste de secuencias repetidas directas de 36 pb, las cuales están interdispersadas por espaciadores de ADN no repetitivos cada uno de 35-41 pares de bases en longitud. El método detecta la presencia o ausencia en la región DR un total de 43 espaciadores de secuencia conocida que son detectados por hibridación de espaciadores de ADN amplificados por PCR sobre un conjunto de oligonucleótidos inmovilizados. Ese método se denomina Spoligotyping (de “tipificación de oligonucleótidos de espaciadores”). Este ensayo se llevó a cabo con el mismo objetivo que el RFLP: analizar los cambios que se puedan producir en este locus por efecto del subcultivo (Hermans *et al.*, 1992).

Para la PCR se utilizaron iniciadores que reconocen las secuencias constantes del locus DR. El producto de PCR se hibridó en una membrana comercial que contiene inmovilizados de forma paralela 43 oligonucleótidos sintéticos, correspondientes a los espaciadores del locus DR de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG (ISOGEN Life Science, IJsselstein, The Netherlands). El resultado de la hibridación se detectó mediante quimioluminiscencia y exposición autorradiográfica. Se obtuvieron así los patrones característicos de cada cepa.

6.6. Ensayos de Citotoxicidad.

Para analizar el estado de virulencia de las cepas de *M. tuberculosis* se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre una monocapa de macrófagos humanos derivados de la línea celular monocítica THP-1.

6.6.1 Cultivo y Mantenimiento de la Línea Celular THP-1.

La línea celular THP-1 es una línea celular de monocitos humanos originada de un paciente con leucemia monocítica aguda (ATCC: TIB-202), y ha sido ampliamente usada para el estudio de la patogénesis de *M. tuberculosis* (Raynaud *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998, 1999; Riendeau y Kornfel, 2003; Theus *et al.*, 2004, 2006; Castro-Garza *et al.*, 2007).

La células THP-1 se mantuvieron en medio de cultivo RPMI (Gibco/Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA) adicionado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Equitech-Bio, Kerrville, Texas, USA) y 1 mM de piruvato de sodio (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). La línea celular crece en suspensión y el subcultivo se realizó cada 4 días con un inóculo de 1×10^5 células por mililitro. Los cultivos fueron observados diariamente al microscopio para comprobar su buen estado.

6.6.2. Transformación de la Línea Celular THP-1.

La línea celular THP-1 es transformada a células con características de macrófagos mediante la adición de ésteres de forbol (Tsuchiya *et al.*, 1980). Previo a la transformación, las células se cultivaron en ausencia de piruvato de sodio por al menos tres pases. Los cultivos de 4 días de crecimiento fueron concentrados por centrifugación en tubos cónicos de polipropileno de 50 ml a 1,000 X g por 5 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente la densidad celular se ajustó a 4×10^5 células/ml con medio RPMI-SFB adicionado con 2 μ l de una solución 10 μ M de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Calbiochem Bioscience, Darmstadt, Alemania) por cada mililitro de medio y se distribuyó 1 ml de la suspensión celular a cada pozo de una microplaca de 24 pozos. Los cultivos se incubaron a 37 °C por 48 h en atmósfera de CO₂ al 5 %, luego se retiró el medio de cultivo con vacío suave y se agregó 1 ml de medio RPMI-SFB fresco

incubándose por otras 48 h en las mismas condiciones, después de hacer este proceso los monocitos estaban transformados a macrófagos y listos para los ensayos a realizar (fig. 4)



Figura. 4. Macrófagos derivados de la línea celular

6.6.3. Determinación de la Capacidad Citotóxica de las Cepas de *M. tuberculosis*.

Las cepas de las micobacterias a utilizar se descongelaron y su densidad fue ajustada a 4×10^5 bacterias por ml con medio RPMI completo, previamente calentado a 37°C . La infección se llevó a cabo en microplacas de 24 pozos (Costar Corning, N.Y., USA) conteniendo 4×10^4 células por pozo, se agregó a cada pozo 1 ml de la suspensión bacteriana para lograr una multiplicidad de infección 1:10 (célula:bacteria) y se incubaron a 37°C y 5 % de CO_2 . A las 24 h post-infección los cultivos se lavaron dos veces con medio nuevo precalentado a 37°C . Posteriormente, a los días 1, 4 y 7 h de incubación se les retiró el medio y se les agregó 1 ml de formalina neutra al 10 % para fijar la monocapa para su posterior observación por microscopía de contraste de fases y medición del efecto citotóxico de las micobacterias sobre las células. Se utilizó una microplaca diferente en cada punto del tiempo para evitar que el vapor del formaldehído

afectara al resto de las células en cultivo. Los cultivos fijados se mantuvieron a 4°C hasta completar todos los tiempos de incubación. Posteriormente todos los cultivos infectados se procesaron juntos para cuantificar la citotoxicidad.

6.6.4 Cuantificación de la Citotoxicidad por el Método del Cristal Violeta.

Para determinar la citotoxicidad se utilizó la técnica de Cristal Violeta (CV) (Gillies, *et al.*, 1986) con modificaciones (Castro-Garza, *et al.*, 2007). El fijador se retiró de las microplacas y se tiñeron las células por 30 min con 500 µl de CV al 0.1 % a temperatura ambiente y moderada agitación. Posteriormente las placas se sumergieron por 15 min en flujo de agua. Las microplacas se dejaron secar al aire y el colorante tomado por las células se solubilizó con 1 ml de Tritón X-100 al 0.2 % por 30 min a temperatura ambiente y moderada agitación, y finalmente se pasaron 100 µl de cada pozo a una microplaca de 96 pozos y se leyó la Absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas (ELA multi-well reader, SIGMA Diagnostics, St. Louis, MO, USA). Se calculó el porcentaje de citotoxicidad teniendo como referencia cultivos testigo no infectados, el cual se define como un cultivo con 0 % de citotoxicidad.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6.7. Subcultivo de las Cepas de *M. tuberculosis*.

6.7.1. Determinación de la Concentración Ideal de Bilis para el Subcultivo.

Este experimento se realizó con la finalidad de determinar la concentración de bilis y glicerol con la cual se obtiene un buen crecimiento de las micobacterias. La adición de bilis (Difco, Detroit, MI, USA) tuvo el propósito de imitar el medio de cultivo en el que Calmette y Guerín desarrollaron el subcultivo y posterior atenuación de la cepa *M. bovis*

BCG (Calmette y Guerin, 1909). El uso de caldo papa dextrosa (Sigma) también se utilizó con el mismo objetivo.

Para lo anterior se prepararon los siguientes medios de cultivo:

- Middlebrook 7H9 (OADC), bilis de buey al 50 %
- Middlebrook 7H9 (OADC), bilis de buey al 25 %
- Middlebrook 7H9 (OADC), bilis de buey al 10 %
- Caldo papa-dextrosa, bilis de buey al 50 %
- Caldo papa-dextrosa, bilis de buey al 25 %
- Caldo papa-dextrosa, bilis de buey al 10 %
- Middlebrook 7H9 (OADC), bilis de buey al 7.5 %, glicerol al 5 %
- Middlebrook 7H9 (OADC), bilis de buey al 5 %, glicerol al 5 %
- Middlebrook 7H9 (OADC), bilis de buey al 2.5 %, glicerol al 5 %
- Middlebrook 7H9 (OADC), bilis de buey al 5 %, glicerol al 0.5 %
- Middlebrook 7H9 (OADC), bilis de buey al 2.5 %, glicerol al 0.5 %
- Middlebrook 7H9 (OADC), bilis de buey al 1 %, glicerol al 0.5 %
- Middlebrook 7H9 (OADC), bilis de buey al 0.5 %, glicerol 0.5 %
- Caldo papa-dextrosa, bilis de buey al 1 %, glicerol 0.5 %
- Caldo papa-dextrosa, bilis de buey al 0.5 %, glicerol 0.5 %

Para el cultivo en estos medios se tomó una asada del cultivo joven en medio Lowestein-Jensen y se depositó en 10 ml de medio líquido. Se incubaron los tubos a 37°C por 7, 14, 21 y 28 días. Se observó la presencia de turbidez y se registró el crecimiento por cruces.

6.7.2. Determinación del Tiempo Idóneo para el Subcultivo de las Cepas. Curvas de Crecimiento.

Las suspensiones bacterianas de un cultivo líquido se ajustaron a una absorbancia a 600 nm de 0.5 a 0.7 (equivalente a 10^7 UFC). De las suspensiones ajustadas se tomaron 10 μ l de cultivo y se sembraron en 10 ml de medio M7H9 contenidos en matraces erlenmeyer de 50 ml. Los cultivos se realizaron por triplicado. Se incubaron los matraces a 37°C en agitación constante. Posteriormente se tomaron alícuotas de 500 μ l cada 24 h y se midió la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro MBA 2000 (Perkin-Elmer,

Norwalk, CT, USA). Las lecturas se tomaron por espacio de 18 días. Finalmente se graficó la densidad óptica contra el tiempo.

6.7.3. Obtención de Clonas de las Cepas

Las cepas de *M. tuberculosis* se sembraron en medio líquido M7H9 hasta obtener un crecimiento comparable al estándar 1 de McFarland. Los tubos del cultivo líquido se agitaron para homogenizar y se hicieron diluciones seriadas tomando 100 µL del cultivo y 900 µL de solución salina. Se sembraron las diluciones 2, 3 y 4 sobre placas de medio Middlebrook 7H10. Se homogenizaron sobre la placa utilizando una varilla L. Las placas se incubaron por dos semanas a 37°C en incubadora de CO₂. Al cabo de este tiempo se inspeccionaron las placas y la presencia de colonias aisladas de *M. tuberculosis*. De cada cepa se tomó una colonia aislada como clona individual y ésta se resembró en medio líquido para amplificarla. Este procedimiento se realizó 3 veces.

6.7.4. Subcultivo de las Cepas Clonadas.

Una vez determinado que el tiempo al cual las mayoría de las cepas alcanzan una densidad óptica detectable era de aproximadamente 5 días y que la concentración de bilis en el medio líquido que permitió el crecimiento de las bacterias fue de 0.5 %, se procedió a iniciar el pasaje serial. A partir de las cepas clonadas se tomó una asada y inocularon en 7.5 ml de medio líquido M7H9 conteniendo Tween 80 y adicionado con el suplemento ADC en matraces erlenmeyer de 50 ml. De la misma manera se sembró otra asada en el mismo medio líquido pero conteniendo bilis de buey al 0.5 %. Los cultivos se incubaron a 37°C y se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm (fig. 5).



Figura. 5. Condiciones de cultivo de las cepas de *M. tuberculosis* para el pasaje serial. Fotografía del agitador donde se llevó a cabo el pasaje serial de las cepas de *M. tuberculosis*.

Una vez que se observó crecimiento visible en cada matraz se retiró del agitador y se mantuvo sin agitación hasta que todos los matraces mostraron una densidad bacteriana similar (aproximadamente 5 días). Para realizar el pasaje se tomó una gota con una pipeta pasteur estéril del cultivo en fase logarítmica y se transfirió a un matraz conteniendo medio nuevo. Nuevamente se incubó en agitación constante y así sucesivamente hasta que todos los cultivos, tanto los normales como los adicionados con bilis, completaron un total de 100 pasajes. Cada 10 pases se tomó una alícuota de cada cepa y se depositó en medio M7H9 con glicerol al 5 % para criopreservar las cepas a -70°C.

6.8. Determinación de los Cambios Genéticos y/o de Virulencia de las Cepas de *M.*

***tuberculosis* Subcultivadas.**

Una vez completado el pasaje serial 100 veces, las cepas de *M. tuberculosis* fueron sometidas, al igual que su contraparte parental, a la extracción de ADN, preparación de un stock y conteo de las UFC/ml.

Para conocer los cambios genéticos y de virulencia que sufrieron las cepas de *M. tuberculosis* por efecto del pasaje serial se llevaron a cabo los siguientes ensayos; todos ellos fueron ya descritos anteriormente.

- RFLP para IS6110
- Spoligotyping
- Ensayos de citotoxicidad
- Análisis de Microarreglos

6.8.1. Verificación por PCR de las Deleciones Reportadas en el Ensayo de Microarreglos.

Para verificar las deleciones reportadas en el ensayo de microarreglos se diseñó una serie de iniciadores utilizando el software Primer Select (Lasergene DNASTAR, Inc.)(tabla 4)

6.8.2. Ensayo de PCR.

Para amplificar los genes ausentes según el análisis de los microarreglos se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando 25 µl de mezcla de reacción la cual contenía 50 nM de cada primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de la mezcla de nucleótidos, 1 U de Taq polimerasa y 50 ng del templado de ADN; el volumen se ajustó con agua miliQ estéril. Como control positivo se utilizó ADN de *M. tuberculosis* H37Rv. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MJ Research (MJ

TABLA 4

Oligonucléotidos utilizados para verificar las delecciones reportadas en el análisis de microarreglos de las cepas subcultivadas.

Gen	Iniciadores	Producto esperado en pb	Programa de amplificación
Rv3737	3737A 5' CGACTGGGCGGCTGCTGAAAC 3' 3737B 5' GCCGCGCCGAGTCCGATGAG 3'	500	C
Rv3323	3323A 5' GACAACCGCCGATCACC 3' 3323B 5' GGCCGTTAACGAATCCATAGC 3'	367	B
Rv0552	0552A 5' GGGTGCCGGGTGCGTCAT 3' 0552B 5' CGGCCAAAAGCGGAAGAATC 3'	434	B
Rv0064	0064A 5' CGACCCGACCAACAACGCTAACG 3' 0064B 5' GTGCCGGGCCAAAATACCTGAT-3'	513	C
Rv2102	2102A 5' CCGCCCGAGAGCTATCACTGGACT 3' 2102B 5' CCGCGGGCTGGGGACATT 3'	288	C
Rv3017	3017A 5' ACCCCGGAACGACCCACCCCTAAT 3' 3017B 5' TACAGTACCCGGCGATGACG 3'	291	C
Rv3018	3018A 5' GCCGCGCAACCATAACCCCATTC 3' 3018B 5' CGACACCGGCGCCACACTGC 3'	471	C
Rv3019	3019A 5' GCCCATCTCGAGCCAACAT 3' 3019B 5' GCCGATATCGCCAGTGAGCA 3'	179	C
Rv2951	2951A 5' GCCGGACGCGACCCAAATG 3' 2951B 5' TGAGCCCGCGCAAAACCTT 3'	430	B
Rv2952	2952A 5' TGGGCGGCAAGCAGGTG 3' 2952B 5' GCAGGTCGGCGTATGGGAAGTA 3'	315	B
Rv2953	2953A 5' CGGGGCGTGCGGATGAT 3' 2953B 5' AGACCCAGCGTTGCCGAGAATGA 3'	406	B
Rv2954	2954A 5' GCGGCTGGCGTGGATGTGT 3' 2954B 5' CCAGGTCGGCAGGTTTCAGC 3'	326	C
Rv2955	2955A 5' GGGCGATCCGGATGTTAGAGT 3' 2955B 5' CGGCCGCCACGAAAAAGT 3'	444	A
Rv2956	2956A 5' GAGGTTTCGGCCCGCTATTCTG 3' 2956B 5' ACTGCTCTGACCGCGTTTCTCTG 3'	297	C
Rv2957	2957A 5' CATGAACCGCGCGTGGACCT 3' 2957B 5' GAGCCCGCGAATTTCGTTGTAGCT 3'	391	C
Rv2958	2958A 5' GACAGACCGGCGGATTATTTATGC 3' 2958B 5' TGCCGCCACGCCTTCAGT 3'	373	B
Rv3738	3738A 5' CAGGCGGCCACCACGATGAGTAT 3' 3738B 5' CGCCAGGACCGCAAAGACGAT 3'	303	C
Rv2226	2226A 5' GTGCCGGCCGAGTTGTTGGA 3' 2226B 5' CGGATCTTGCGGGTCGTAC 3'	515	C
Rv2222	2222A 5' CACCCGGCCAGCAGGAGAT 3' 2222B 5' GCAGCACGGCGAATGTCAGATA 3'	489	C
Rv2942	2942A 5' TGCCGGGCTAGGTGTCTTTGTG 3' 2942B 5' ACCGCGCCGCTCATCTGTT 3'	546	C
Rv2944	2944A 5' GCCCGCGCCGAGAAGT 3' 2944B 5' CGGGGCCAAAACACGAC 3'	238	B
Rv2945	2945A 5' GTCCGCTGTTCTGGTGGTGCTA 3' 2945B 5' TTGCGCTTGAGGTTTCGTGAC 3'	454	C
Rv2946	2946A 5' TTGCGGATTGGGGTGTGCT 3' 2946B 5' GCGCGGCTCGATGAAAGT 3'	571	C
Rv2947	2947A 5' GCCGGGGTGGTTGTGCT 3' 2947B 5' CCGCGGGGAAGGCTCAT 3'	429	B
Rv2948	2948A 5' CGGCGCCGTAACCTCAGA 3' 2948B 5' GCCGATTCCAATAGCCCTTAGC 3'	471	C
Rv2949	2949A 5' AGGTCGGAAGTCCGGAACACTTATT 3' 2949B 5' GGCGGGCAACGGCTCTC 3'	233	B
Rv2950	2950A 5' ACCGGCGCCGAACGAGTA 3' 2950B 5' GGCCCCATCCACCACCA 3'	522	A
Rv2650	2650A 5' CTACCTGGGGCGGTTTCGTC AAG 3' 2650B 5' GGCGGCGTCAACCTCAATC 3'	406	C
Rv2651	2651A 5' ACGAGCCCTGGCGAATGTGAA 3' 2651B 5' CGGCTAGCGAACGGGAAACGACT 3'	210	C

TABLA 4 (continuación)

Gen	Incluidores	Producto esperado en pb	Programa de amplificación
Rv0074	0074A 5' GCGCTGCGGGAGGAGTATC 3' 0074B 5' TGGCAACAATCGCTTCAACAAC 3'	426	C
Rv1672	1672A 5' GGCAAGCCCCACGCACAAT 3' 1672B 5' GCCGACGATCAGCCCAGACA 3'	490	B
Rv1673	1673A 5' CCGGCGCCATGGACTACGA 3' 1673B 5' GGTGGGGCAGCAGGATGT 3'	358	C
Rv1674	1674A 5' CGGGACGGCAAACGGGTGAT 3' 1674B 5' CGTCGAGTCGGCGGGCAGAA 3'	403	C
Rv2434	2434A 5' TCGCGCTGATCGGCATAGGTT 3' 2434B 5' CGGCCGGCTGAGATTGTA AAA 3'	319	C
Rv2544	2544A 5' CTCACCGCCACCGCCAGAT 3' 2544B 5' CGCCGAGAATGTGCTACCGAAGTC 3'	188	C
Rv3141	3141A 5' GCGCCGATAACAGCCAA 3' 3141B 5' GAATCTCGCCGCCAGTGAA 3'	516	A
Rv1765	1765A 5' AGGCGTTTCTGCGTCTGGTTGAG 3' 1765B 5' GGTGTGCCCGGTGTTGATACG 3'	404	C

Research Inc., Watertown, MA) utilizando los siguientes programas de amplificación:

A: desnaturalización a 95°C por 4 min, 30 ciclos a 95°C por 30s, 55°C por 30s y 72°C por 45 s, seguido por 72°C por 5 min.

B: desnaturalización a 95°C por 4 min, 30 ciclos a 95°C por 30s, 58°C por 30s y 72°C por 45 s, para finalizar con un paso a 72°C por 5 min.

C: desnaturalización a 95°C por 4 min, 30 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 30s y 72°C por 45 s, para finalizar con un paso a 72°C por 5 min.

Los amplicones fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % en solución Tris-acetato-EDTA y los tamaños de los amplicones se compararon con un marcador de 100 pb (Promega).

7. RESULTADOS

7.1. Análisis de la Región Cercana al Locus PLC.

El genoma de *M. tuberculosis* contiene cuatro genes altamente relacionados que codifican enzimas fosfolipasa C. Los tres genes que codifican para estas proteínas, *plcA*, *plcB*, y *plcC*, están localizados en la posición 2351 del mapa genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y están arreglados en tandem (fig. 6). El cuarto gen, *plcD*, está localizado en una región diferente.

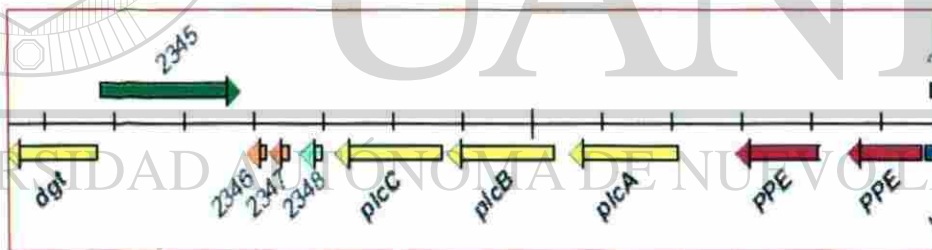


Figura 6. Representación esquemática de la localización del locus PLC en la cepa H37Rv.

Para determinar la extensión de la deleción del locus PLC se amplificaron primero los genes más cercanos a este locus. En la tabla 5 se muestran los resultados de la amplificación, encontrándose que en todas las cepas de *M. tuberculosis* seleccionadas los genes estaban presentes, a excepción del gen Rv2352 que no amplificó en la cepa

DR-689. Esto indica que la delección en el locus PLC no involucró otros genes conservados adyacentes (fig 7).

TABLA 5

Amplificación de los genes más cercanos al locus de PLC.

Gen	0488	1177	1289	1389	DR689
<i>cysK</i>	+	+	+	+	+
<i>moew</i>	+	+	+	+	+
<i>dnaG</i>	+	+	+	+	+
<i>dgt</i>	+	+	+	+	+
<i>glyS</i>	+	+	+	+	+
<i>amiA2</i>	-	+	+	+	-
<i>bex</i>	+	+	+	+	+
<i>phoH</i>	+	+	+	+	+
<i>narkU</i>	+	+	+	+	+
Rv2326	+	+	+	+	+
<i>dnaJ</i>	+	+	+	+	+
<i>hrcA</i>	+	+	+	+	+
Rv2345	+	+	+	+	+
Rv2346	+	+	+	+	+
Rv2347	+	+	+	+	+
Rv2348	+	+	+	+	+
Rv2352	+	+	+	+	+

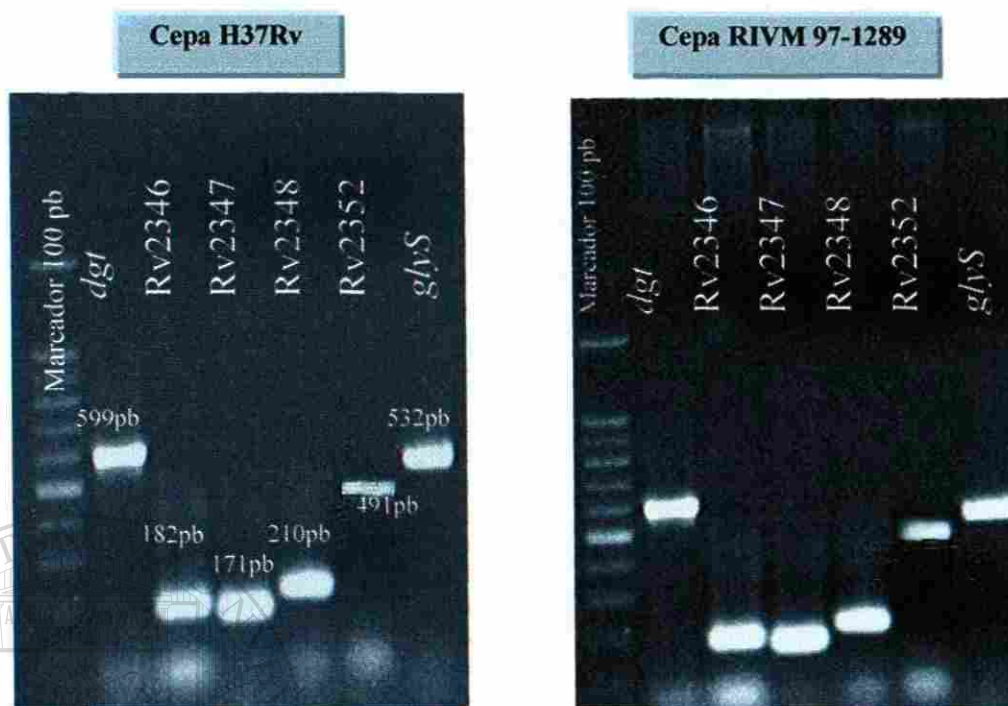


Figura 7. PCR para la búsqueda de los genes más conservados adyacentes al locus PLC en la cepa de referencia H37Rv y una de las cepas en estudio RIVM 97-1289.

7.2. Caracterización Genética de la Delección del Locus PLC:

El prefijo Rv o Mt para los ORF's descritos en el siguiente texto se refieren a la designación de genes de *M. tuberculosis* H37Rv o *M. tuberculosis* CDC1551, respectivamente. Para determinar la extensión de la delección en el locus PLC en las cepas de *M. tuberculosis* estudiadas se amplificó y secuenció la región cercana usando los iniciadores LGB-L y LGB-U como se muestra en la figura 8. La cepa DR-689 presentó un elemento IS6110 con la secuencia repetida e invertida derecha insertada en el nucleótido 201993 correspondiente a RV2348 y la completa pérdida de la región *plcA plcB-plcC*. Se intentó amplificar el otro extremo de la secuencia IS6110 y no se consiguió, aunque los ORF's de los genes adyacentes Rv2352, Rv2353 y *glyS* fueron identificados por PCR (ver fig. 8). *M. tuberculosis* RIVM 971289 presentó la región

repetida e invertida derecha insertada en la posición 212117 que corresponde a la región intergénica cercana a PPE40 (Rv2356). En ninguno de los casos se observó que el proceso de transposición de *IS6110* produjera una secuencia repetida e invertida. La localización de las inserciones *IS6110* en el gen *plcC* del resto de las cepas del Laboratorio de Kristin Kremer ya había sido publicada (Viana-Niero et al., 2004) y fue confirmada en el laboratorio para este trabajo; también reportamos los cambios de secuencia del ADN en el otro extremo (fig. 8). La cepa RIVM 97-0488 tiene el elemento *IS6110* insertado en el nucleótido 2630531 de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* CDC1551 de un ORF denominado MT2421. El resto de la secuencia es casi idéntico al gen codificado por MT2422, con excepción de dos extensiones de 64 pb. El gen MT2422 idéntico en esta sección a RV2352 (PPE38) de H37Rv. La secuencia repetida e invertida del elemento *IS6110* en RIVM 97-1389 fue localizado en el nucleótido 2630123 (secuencia de CDC1551) la cual corresponde a una región intergénica, seguida por los ORF's completos de MT2420, MT2421 y MT2422.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

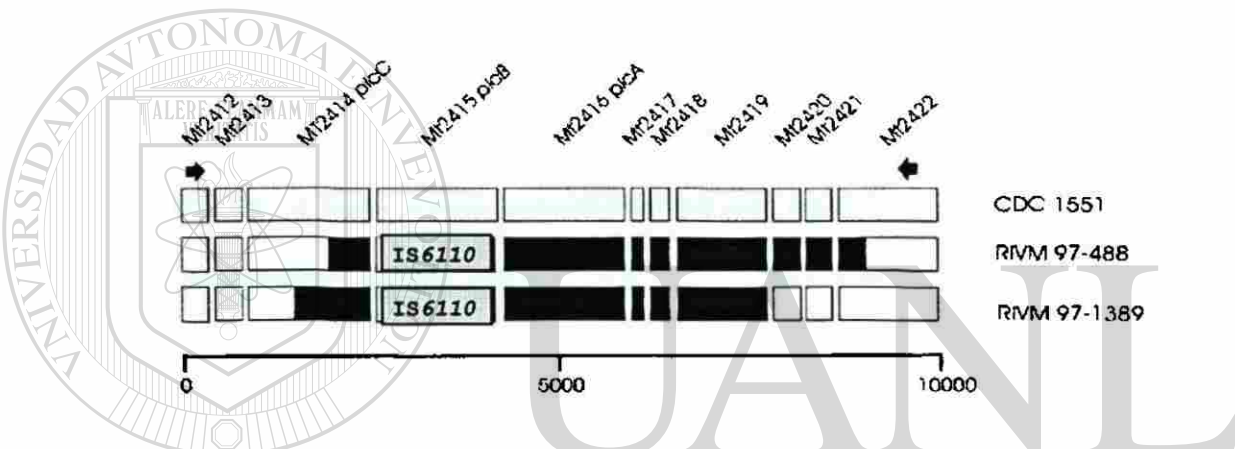
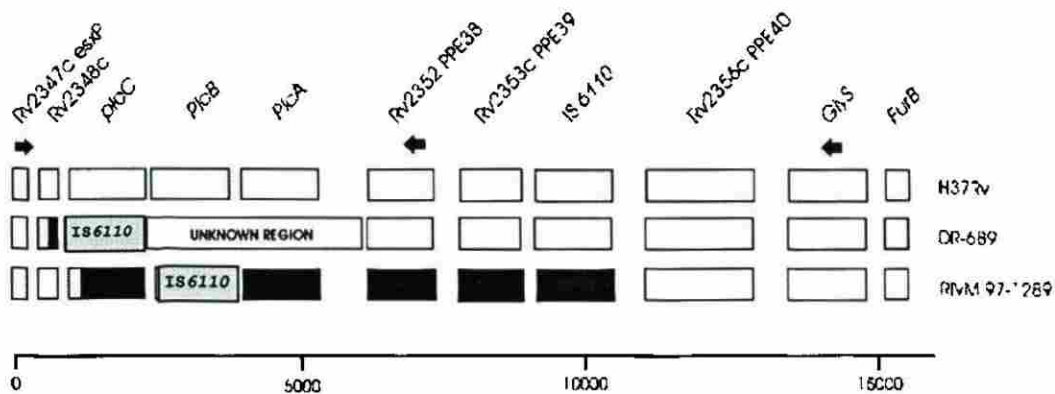


Figura 8. Región de PLC de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y CDC1551 y cambios genéticos en las cepas Δ PLC usadas en este estudio. Las regiones ausentes están representadas en cuadros negros; en cuadros grises se muestra la presencia del elemento repetitivo insertado. En el panel superior se presenta el mapa físico de los cambios en las cepas DR-689 y RIVM 97-1289 comparadas a H37Rv, y el panel inferior se presentará lo cambios en los aislamientos RIVM 97-488 y RIVM 97-1389, los cuales son mas similares a CDC1551.

7.3. Análisis de Microarreglos en las Cepas Parentales.

La tabla 6 presenta la lista de ORF's que por el análisis de microarreglos han sido probablemente suprimidos en las cepas parentales analizadas, con la excepción de la región *plcA-plcB-plcC* que ya se había descrito antes. La mayoría de ellos codifica para proteínas hipotéticas aunque algunos genes que están implicados en el metabolismo de los lípidos también se encontraron suprimidos como se muestra en la tabla 6. Se observó

que muchos de estos ORF's suprimidos estaban asociados con la inserción de elementos IS6110. Interesantemente, Rv2816c, ausente en DR-689, es el sitio de inserción para el único elemento IS6110 en BCG Pasteur (Kivi *et al.*, 2002). *M. tuberculosis* CDC1551 también comparte dos sitios de inserción con DR689, Rv1758 y Rv2816c. Algunas proteínas con importancia inmunológica o patogénica no se encontraron, entre ellas las proteínas similares a ESAT-6, *esxQ* y *esxR*, las cuales han demostrado ser altamente inmunogénicas. *M. tuberculosis* DR-689 presentó la delección del fragmento Rv2816c-Rv2820c, que incluye a Rv2819c. Este último gen codifica para una proteína con función desconocida que está sub-regulada en *M. tuberculosis* H37Ra con respecto a H37Rv y es la única proteína previamente asociada a posibles cambios en la virulencia que encontramos en este estudio (Rindi *et al.*, 2001). Comparando las delecciones ya publicadas por otros autores con las observadas en las cepas estudiadas aquí, encontramos un patrón similar a las reportadas en San Francisco (Tsolaki *et al.*, 2004).

Sin embargo cuando comparamos los patrones de RFLP para IS6110 de nuestras cepas con aquellas con similares delecciones de las reportadas en San Francisco no hubo relación entre ellas, con la excepción de DR-689, la cual posee un patrón de delección similar a las cepas 47, 55, 67, 69, 95 y 97. Todas estas cepas tienen delecciones de RD105, 149, 150, 152, 181, y 207. Todas estas cepas pertenecen a la familia Beijing aunque se desconoce su relación epidemiológica. Para corroborar estos resultados nosotros verificamos estas delecciones en una serie de cepas Beijing de la base de datos de Holanda (Kremer *et al.*, 2004), incluyendo NLA 009501317, NLA009600299, NLA009800636, NLA000017383, NLA009500592, NLA000017914, NLA000016362, NLA 000017583, y NLA009801500. La única cepa que compartió todas las delecciones cromosomales fue NLA009500592, la cual tenía un patrón de RFLP idéntico a DR-689.

TABLA 6

Genes ausentes de los aislamientos parentales de *M. tuberculosis*, aparte de la región PLC.

Aislamiento	Gen en H37Rv	Descripción del gen	Posible función o categoría funcional
RIVM 97-0488	Rv0005	<i>gyrB</i>	Almacén y procesamiento de información: replicación, recombinación y reparación de ADN
	Rv1354c	Proteína hipotética	Proceso celular: mecanismos de traducción de señales
	Rv1355c	<i>moeY</i>	Metabolismo: Metabolismo de coenzimas
	Rv1356c	Proteína hipotética	-
	Rv2101	<i>helZ</i>	Almacén y procesamiento de información: Transcripción, probable helicaza
	Rv2167c	Proteína hipotética	Probable transposasa (IS6110)
	Rv2271	Proteína hipotética	-
	Rv2272	Proteína hipotética	Probable proteína trans-membrana
	Rv2273	Proteína hipotética	Probable proteína trans-membrana
	Rv2274c	Proteína hipotética	-
	Rv2275	Proteína hipotética	-
	Rv2276	<i>cyp121</i>	citocromo P450 121 CYP121
	Rv2277c	Proteína hipotética	Metabolismo: Producción de energía y conversión
	Rv2278	Proteína hipotética	Transposasa putativa para IS6110 (fragmento)
	Rv2350c	<i>plcB</i>	fosfolipasa C 2 plcB
	Rv2357c	<i>ghyS</i>	Almacén y procesamiento de información: Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
	Rv2479c	Proteína hipotética	Probable transposasa (IS6110)
	Rv3017c	<i>Esq.</i>	Proteína como ESAT-6
	Rv3019c	<i>esxR</i>	proteína secretada como ESAT-6
	Rv3021c	PPE47	-
Rv3022c	PPE48	-	
Rv3135	PPE50	-	
Rv3323c	<i>moaX</i>	Metabolismo: Metabolismo de coenzima	
Rv3324c	<i>moaC3</i>	Metabolismo: Metabolismo de coenzima	
Rv3819	Proteína hipotética	-	
RIVM 97-1289	Rv0244c	<i>fadE5</i>	Metabolismo: Metabolismo de lípidos
	Rv0287	<i>esxG</i>	Proteína como ESAT-6
	Rv0516c	Proteína hipotética	Procesos celulares: Mecanismos de transducción de señales
	Rv0552	Proteína hipotética	Poco caracterizada: Predicción de función general
	Rv1037c	<i>EsxI</i>	Proteína putativa como ESAT-6
	Rv1519	Proteína hipotética	-
	Rv1520	Proteína hipotética	Procesos celulares: biogénesis de la envoltura celular: membrana externa
	Rv1755c	<i>plcD</i>	fosfolipasa C4 (fragmento) plcD
	Rv2226	Proteína hipotética	-
	Rv2283	Proteína hipotética	-
	Rv2284	<i>LipM</i>	probable esterasa
	Rv2285	Proteína hipotética	-
	Rv2286c	Proteína hipotética	-
	Rv2350c	<i>plcB</i>	fosfolipasa C4 (fragmento) plcD
	Rv2353c	PPE39	-

TABLA 6 (continuación)

Aislamiento	Gen en H37Rv	Descripción del gen	Posible función o categoría funcional
	Rv2357c	<i>glyS</i>	Almacén y procesamiento de información: Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
	Rv2596	Proteína hipotética	-
	Rv3017c	<i>Esq.</i>	Proteína como ESAT-6 I
	Rv3019c	<i>esxR</i>	proteína secretada como ESAT-6
	Rv3021c	PPE47	-
	Rv3022c	PPE48	-
	Rv3142c	Proteína hipotética	-
	Rv3516	<i>echA19</i>	Metabolismo: Metabolismo de los lípidos
	Rv3517	Proteína hipotética	-
	Rv3611	Proteína hipotética	-
	Rv3737a (PPE)		
	Rv3737b (PPE)		
RIVM 97-1389	Rv1524	Proteína hipotética	Metabolismo: Transporte y metabolismo de carbohidratos
	Rv1525	<i>wbbI2</i>	Probable ramnosil transferasa
	Rv1526c	Proteína hipotética	Metabolismo: Transporte y metabolismo de carbohidratos
	Rv1527c	<i>pks5</i>	Metabolismo: Metabolismo de los lípidos
	Rv1731	<i>gabD1</i>	Metabolismo: Producción y conversión de energía
	Rv1755c	<i>plcD</i>	fosfolipasa C4 (fragmento) plcD
	Rv2350c	<i>plcB</i>	fosfolipasa C4 (fragmento) plcD
	Rv2645	Proteína hipotética	-
	Rv2646	Proteína hipotética	Almacén y procesamiento de información: Replicación, recombinación y reparación del ADN
	Rv2650c	Proteína hipotética	Esta sección es RD11 -e) fago phiRV2 (Rv2650c-Rv2659c)
	Rv2651c	Proteína hipotética	-
	Rv2652c	Proteína hipotética	-
	Rv2653c	Proteína hipotética	-
	Rv2655c	Proteína hipotética	-
	Rv2656c	Proteína hipotética	-
	Rv2657c	Proteína hipotética	-
	Rv2658c	Proteína hipotética	-
	Rv2659c	Proteína hipotética	Almacén y procesamiento de información: Replicación, recombinación y reparación del ADN.
	Rv3017c	<i>Esq.</i>	Proteína como ESAT-6 I
	Rv3019c	<i>esxR</i>	Proteína secretada como ESAT-6
	Rv3021c	PPE47	-
	Rv3022c	PPE48	-
	Rv3135	PPE50	-
	Rv3425	PPE57	-
	Rv3651	Proteína hipotética	-
DR-689	Rv0065	Proteína hipotética	-
	Rv0071	Proteína hipotética	Posible madurasa
	Rv0072	Proteína hipotética	probable proteína de transporte transmembranal de glutamina. Transportador ABC
	Rv0073	Proteína hipotética	Procesos celulares: Mecanismos de transducción de señales, probable proteína transportadora de glutamina con unión a ATP transportador ABC

TABLA 6. (continuación)

Aislamiento	Gen en H37Rv	Descripción del gen	Possible función o categoría funcional
	Rv0788	<i>purQ</i>	Metabolismo: Metabolismo y transporte de nucleótidos
	Rv1316c	<i>Ogt</i>	Almacén y procesamiento de información: Replicación, Reparación y recombinación de ADN
	Rv1573	Proteína hipotética	probable proteína de fago phiRV1
	Rv1574	Proteína hipotética	
	Rv1575	Proteína hipotética	Esta sección es RD 3 – el fago phiRV1 (Rv1573-1586c)
	Rv1576c	Proteína hipotética	-
	Rv1577c	Proteína hipotética	-
	Rv1578c	Proteína hipotética	-
	Rv1579c	Proteína hipotética	-
	Rv1580c	Proteína hipotética	-
	Rv1581c	Proteína hipotética	-
	Rv1582c	Proteína hipotética	-
	Rv1583c	Proteína hipotética	-
	Rv1584c	Proteína hipotética	-
	Rv1585c	Proteína hipotética	-
	Rv1586c	Proteína hipotética	Almacén y procesamiento de información: Replicación, recombinación y reparación de ADN
	Rv1672c	Proteína hipotética	Metabolismo: Transporte y metabolismo de carbohidratos
	Rv1673c	Proteína hipotética	Metabolismo: Producción y conversión de energía
	Rv1755c	<i>plcD</i>	fosfolipasa C4 (fragmento) <i>plcD</i>
	Rv1758	<i>cutI</i>	probable cutinasa
	Rv1760	Proteína hipotética	-
	Rv1761c	Proteína hipotética	-
	Rv1762c	Proteína hipotética	-
	Rv1765c	Proteína hipotética	-
	Rv1793	<i>esxIV</i>	Proteína como ESAT-6
	Rv2015c	Proteína hipotética	-
	Rv2263	Proteína hipotética	Posible oxidoreductasa
	Rv2337c	Proteína hipotética	-
	Rv2349c	<i>plcC</i>	fosfolipasa C 3 <i>plcC</i>
	Rv2350c	<i>plcB</i>	fosfolipasa C 2 <i>plcB</i>
	Rv2357c	<i>glyS</i>	Almacén y procesamiento de información: Traducción estructura ribosomal y biogénesis
	Rv2434c	Proteína hipotética	Poco caracterizada: función desconocida
	Rv2544	<i>lppB</i>	Posible lipoproteína conservada
	Rv2774c	Proteína hipotética	-
	Rv2816c	Proteína hipotética	Poco caracterizada: función desconocida
	Rv2817c	Proteína hipotética	Poco caracterizada: función desconocida
	Rv2818c	Proteína hipotética	-
	Rv2819c	Proteína hipotética	Poco caracterizada: función desconocida
	Rv2820c	Proteína hipotética	Poco caracterizada: función desconocida

160697

7.4. Subcultivo de las Cepas de *M. tuberculosis*.

7.4.1. Determinación de la Concentración Ideal de Bilis para el Subcultivo.

Para probar la concentración de bilis en los medios de cultivo en que se llevaría a cabo el subcultivo se eligió la cepa de laboratorio H37Rv y al azar otra de las cepas a estudiar: RVM 97-0488. En la tabla 7 se muestra el resultado, la turbidez se registró de manera visual y se expresó en cruces. El medio más adecuado para el crecimiento de las micobacterias fue el M7H9/OADC con una concentración de bilis y de glicerol de 0.5 % ya que como se muestra en la tabla 7, en el día 7 ya se observó crecimiento. Esta concentración de bilis fue la elegida para llevar a cabo el subcultivo y así tener un medio líquido que emule el medio utilizado por Calmette y Guérin en el que subcultivaron *M. bovis* BCG (Calmette y Guérin, 1909). No se observó crecimiento en los medios en que se utilizó caldo papa.-dextrosa por lo que esta base fue descartada.

TABLA 7.

Crecimiento de *M. tuberculosis* RIVM 97-0488 y H37Rv en distintos medios de cultivo.

Medio de cultivo	Crecimiento 7 días	14 días	21 días	28 días
Middlebrook 7H9/OADC, bilis de buey 50%, glicerol 5%	—	—	—	—
Middlebrook 7H9/OADC, bilis de buey 25%, glicerol 5%	—	—	—	—
Middlebrook 7H9/OADC, bilis de buey 10%, glicerol 5%	—	—	—	—
Caldo papa-dextrosa, bilis de buey 50%, glicerol 5%	—	—	—	—
Caldo papa-dextrosa, bilis de buey 25%, glicerol 5%	—	—	—	—
Caldo papa-dextrosa, bilis de buey 10%, glicerol 5%	—	—	—	—
Middlebrook 7H9/OADC, bilis de buey 7.5%, glicerol 5%	—	—	—	—
Middlebrook 7H9/OADC, bilis de buey 5.0%, glicerol 5%	—	—	—	—
Middlebrook 7H9/OADC, bilis de buey 2.5%, glicerol 5%	—	—	—	—

TABLA 7. (continuación)

Caldo papa dextrosa, bilis de buey 7.5%, glicerol 5%	—	—	—	—
Caldo papa dextrosa, bilis de buey 5.0%, glicerol 5%	—	—	—	—
Caldo papa dextrosa, bilis de buey 2.5%, glicerol 5%	—	—	—	—
Middlebrook 7H9/OADC, bilis de buey 5%, glicerol 0.5%	—	—	—	—
Middlebrook 7H9/OADC, bilis de buey 1.0%, glicerol 0.5%	—	+	++	++
Middlebrook 7H9/OADC, bilis de buey 0.5%, glicerol 0.5%	+	++	+++	+++
Caldo papa dextrosa, bilis de buey 1.0%, glicerol 0.5%	—	—	—	—
Caldo papa dextrosa, bilis de buey 0.5%, glicerol 0.5%	—	—	—	—

7.4.2. Determinación del Tiempo Idóneo para el Subcultivo de las Cepas.

Todas las cepas de *M. tuberculosis* se cultivaron hasta por 18 días. A diferentes tiempos de incubación se obtuvieron las lecturas de absorbancia de los cultivos líquidos.

Los resultados se muestran en la tabla 8 y en la fig. 9.

De los datos obtenidos se desprende que para los cultivos en medio M7H9 sin bilis la

fase logarítmica de crecimiento ocurrió entre los días 4 y 8 de incubación y que los cultivos en medio con bilis alcanzaron su máxima densidad celular al quinto día aproximadamente. Como se muestra en la fig. 9, las cepas en el medio sin bilis se desarrollaron notablemente mejor que las cultivadas con adición de bilis. A pesar de que en este ensayo hay una diferencia en el desarrollo de las cepas en los distintos medios de cultivo, se determinó realizar el subcultivo cada 5 días aproximadamente, pues en este punto los cultivos de todas las cepas ya muestran un crecimiento visible en ambos medios.

TABLA 8

Lectura de la absorbancia a 600 nm de los cultivos de *M. tuberculosis*.

Día	Cultivo en M7H9 con bilis						Cultivo en M7H9				
	0488	1177	1289	1389	DR689	H37Rv	0488	1177	1289	1389	DR689
1	0.017	0.002	-	-	-0.045	0.005					
3	-0.011	0.004	0.036	0.052	-0.053	0.038	0.066	0.024	0.000	0.000	0.142
4	0.001	0.010	0.040	0.053	0.034	0.047	0.148	0.044	0.104	0.070	0.138
5	0.067	0.071	0.084	0.089	0.052	0.065					
6	0.161	0.051	0.074	0.073	0.039	0.040	0.258	0.144	0.442	0.060	0.184
7	0.055	0.049	0.076	0.054	0.047	0.067					
8	0.074	0.077	0.096	0.119	0.069	0.117	0.614	0.394	0.778	0.200	0.474
9						0.169	1.564	1.526	1.144	0.814	0.844
11			0.082								
12	0.069		0.137				3.120	2.590	1.790	1.780	1.470
14	0.199	0.051	0.189	0.054	0.043	0.200	3.770	2.200	2.240	3.300	2.120
18	0.243	0.076	0.109	0.114	0.075	0.249	2.640	1.610	5.200	1.640	

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

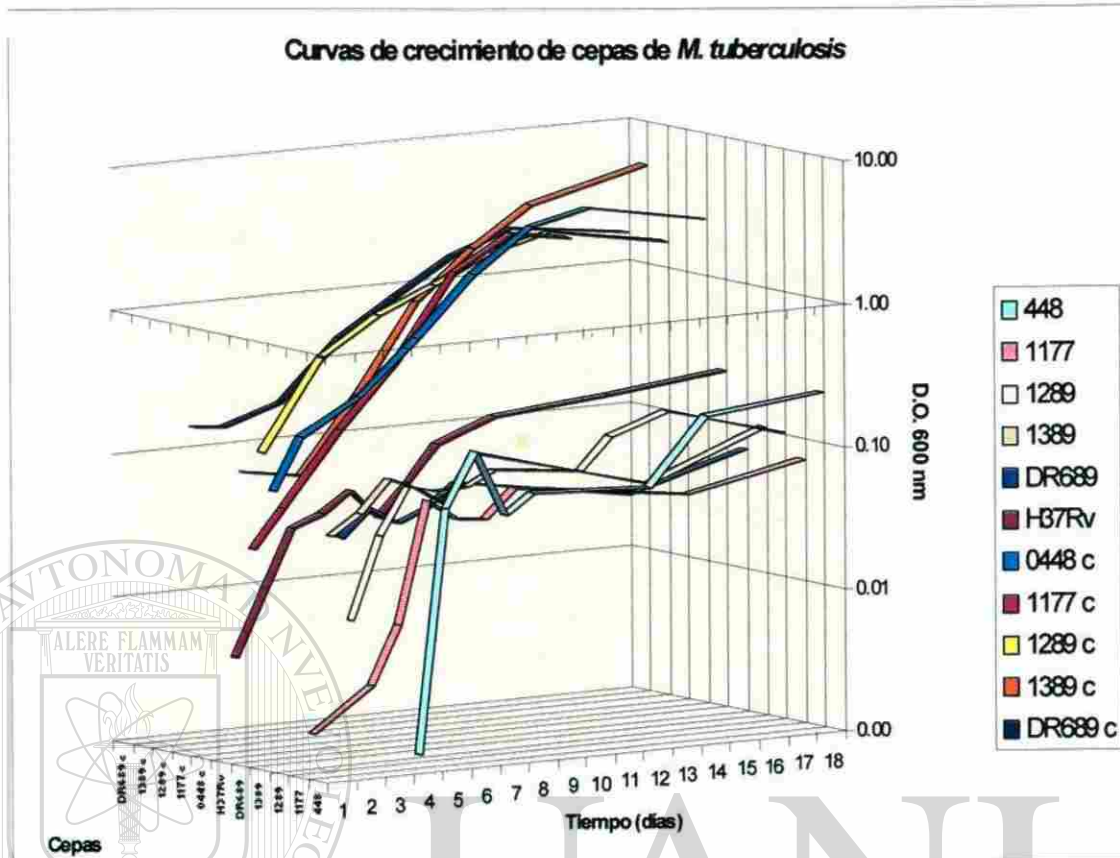


Figura 9. Curvas de crecimiento de las diferentes cepas de *M. tuberculosis* utilizadas en este estudio.

7.4.3. Estado del Subcultivo.

El pasaje serial de las cepas de *M. tuberculosis* con deleciones en el locus PLC fue concluido para este trabajo en el pase señalado en la tabla 9, la cepa RIVM 97-1177 cultivada en medio M7H9 con bilis no tuvo la misma capacidad de crecimiento *in vitro* durante todo el tiempo en que se llevó a cabo este ensayo y por lo tanto los cambios analizados se determinaron en el pase 90.

TABLA 9

Estado del pasaje serial.

Cepa	Cultivo en M7H9	Cultivo en M7H9 con bilis
RIVM 97-0488	100	100
RIVM 97-1177	100	90
RIVM 97-1289	100	100
RIVM 97-1389	100	100
DR689	100	100
H37Rv	100	100

7.5. Genotipificación de ADN Basada en IS6110.

La secuencia de inserción IS6110 es un elemento transponible presente en el complejo de *M. tuberculosis* y ha sido utilizada ampliamente en estudios de genotipificación y epidemiología de aislamientos clínicos (Hermans *et al.*, 1990; Cave *et al.*, 1991). Los elementos de transposición, en sus desplazamientos por el genoma suelen producir mutaciones (interrumpiendo regiones reguladoras o codificantes de genes esenciales) y tienen una frecuencia de transposición variable: 10^{-5} a 10^{-7} transposiciones por generación. Por lo anterior se decidió analizar si ocurrían cambios en los patrones de RFLP para IS6110 en las cepas sometidas a pasaje serial. En estudios previos el pasaje *in vitro* de cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG no generó cambios en los “fingerprintings” de IS6110, pero estos pasajes se realizaron en menor número que los llevados a cabo en este trabajo (van Soolingen *et al.*, 1991).

En la figura 10 se muestran los resultados de los patrones de RFLP para IS6110 de las cepas parentales y las subcultivadas. La cepa DR-689 (cepa Beijing) fue la única que

mostró un cambio en este patrón en el pasaje 100 en presencia de bilis. El cambio que ocurrió fue el desplazamiento de una de las bandas de IS6110 de 1,400pb a 1,600pb.

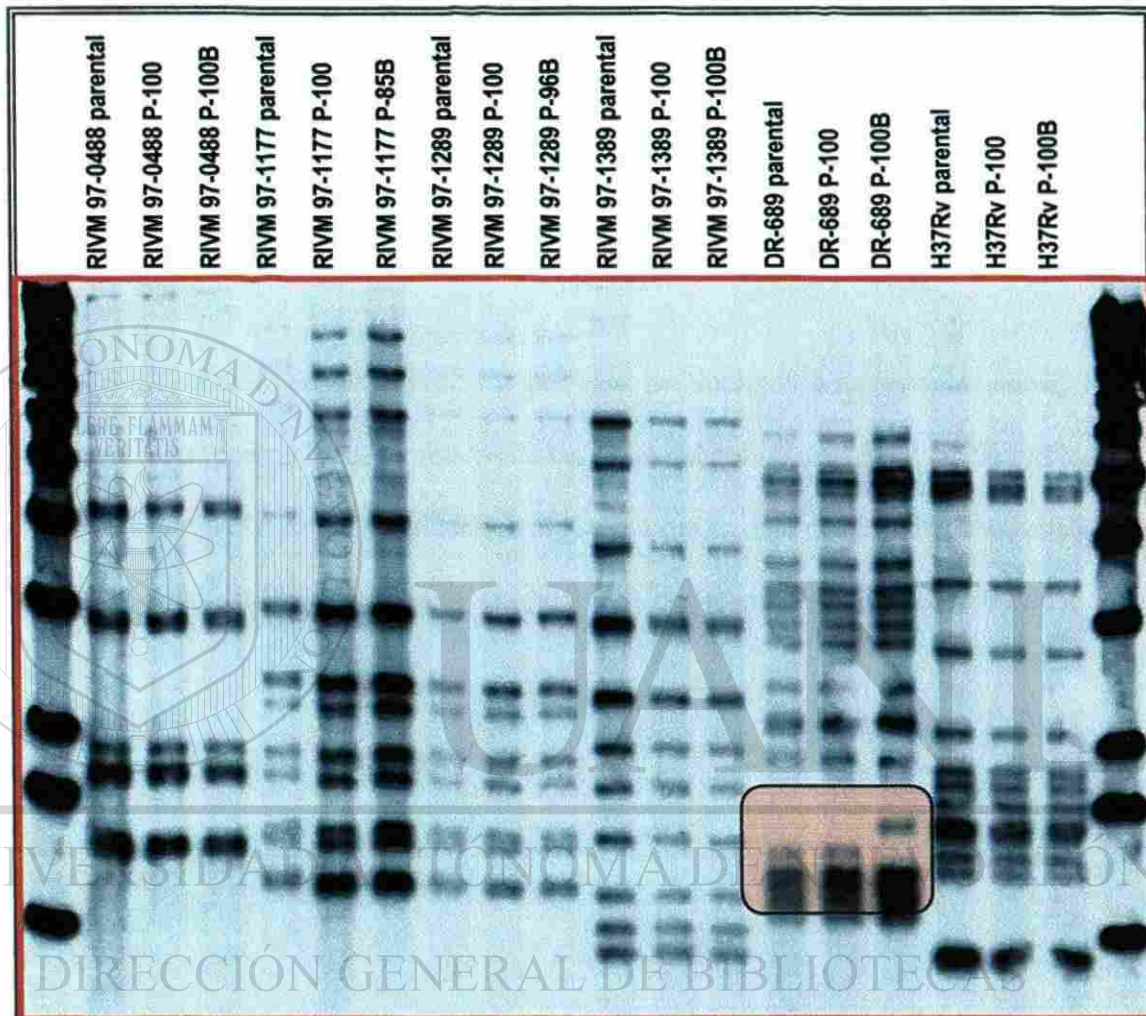


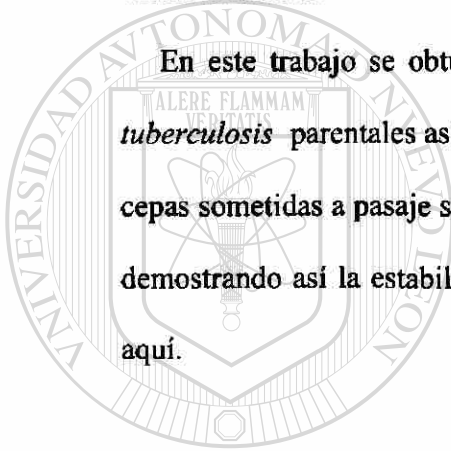
Figura 10. Análisis de RFLP para el elemento IS6110 de las cepas parentales y las subcultivadas. El único cambio observable es en la cepa DR-689 subcultivada en presencia de bilis.

7.6. Spoligotyping.

Los cambios en el locus DR analizado por este método, parecen ser muy lentos. Esto fue corroborado al analizar aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de los mismos pacientes que correspondían a recaídas o infecciones en diferentes sitios, todos

mostraron idénticos “spoligotypes” (Niemann *et al.*, 1999). Legrand *et al* en el 2001 determinaron que el locus DR constituye un locus preferencial de IS6110 permitiendo la inserción de dos o más copias de IS6110, lo cual sugiere que si ocurren cambios en IS6110-RFLP existe la posibilidad de cambios en el locus DR. Aranaz *et al* en el 2004 reportaron un cambio en el patrón de hibridación (spoligotyping) de un aislamiento clínico y el subcultivo generado en el laboratorio causado por la delección de un repetido variable directo.

En este trabajo se obtuvieron los patrones de Spoligotyping para las cepas de *M. tuberculosis* parentales así como los de las cepas subcultivadas (fig. 11). Ninguna de las cepas sometidas a pasaje serial mostró algún cambio en este método de genotipificación, demostrando así la estabilidad de la región DR del cromosoma de las cepas analizadas aquí.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



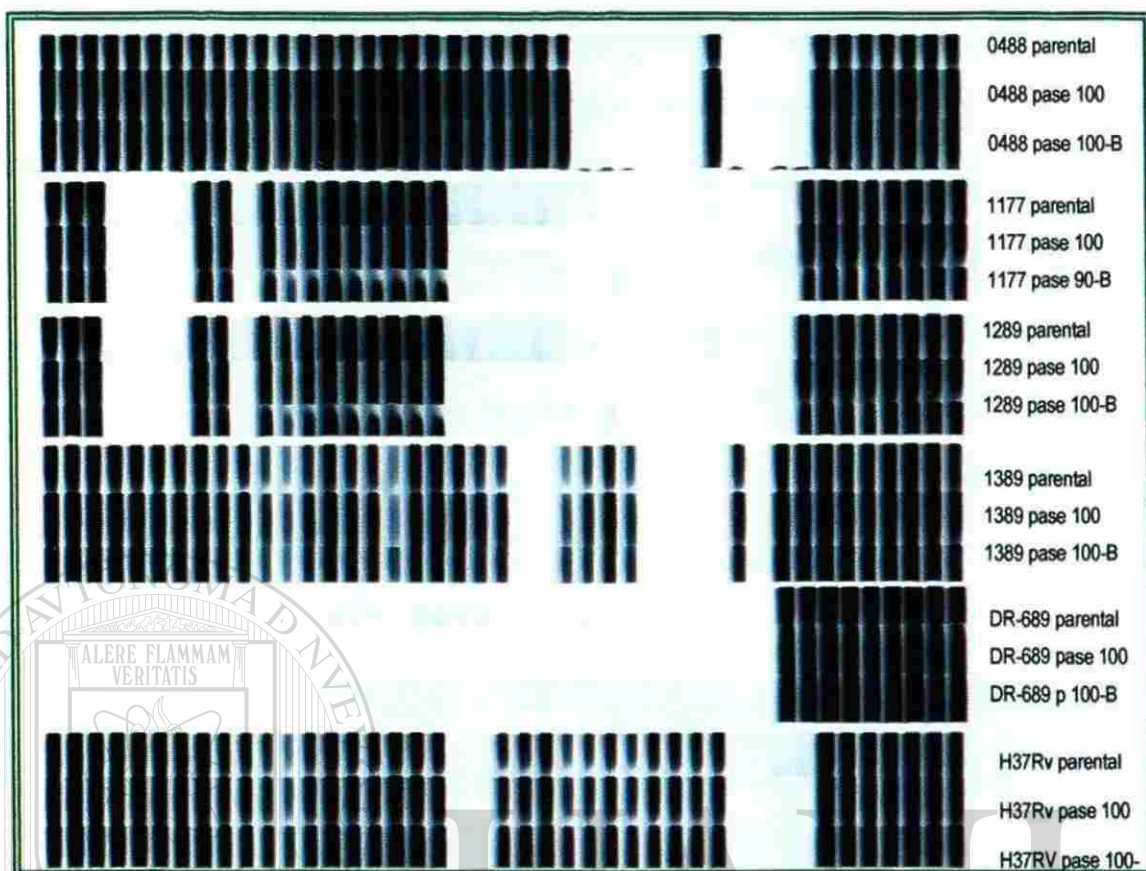


Figura 11. Patrones de Spoligotyping de las cepas parentales y las subcultivadas. No se observó cambio en el locus DR en los aislamientos probados.

7.7. Ensayos de Citotoxicidad Sobre la Monocapa de Macrófagos THP-1.

Los aislamientos de *M. tuberculosis* subcultivados con y sin bilis produjeron menos citotoxicidad que los aislamientos parentales. Esto fue cuantificado con el ensayo del cristal violeta (fig. 13). El ensayo de citotoxicidad sólo se realizó en tres de las cepas estudiadas: H37Rv, DR689 y RIVM 97-0448. Las cepas parentales de estos aislamientos produjeron un efecto citotóxico sobre la monocapa de macrófagos mayor a 85 % al día 7 post-infección, pero las cepas sometidas a pasaje serial produjeron un efecto citotóxico menor al 50 %. La cepa utilizada como control negativo de infección, *M. bovis* BCG, tuvo un porcentaje de citotoxicidad de 0 % al día 7 post-infección. El efecto se pudo

estimar visualmente por la disrupción de la monocapa y el agregado de una mezcla de células despegadas y bacterias (fig. 12). Aquí se puede observar a simple vista como la cepa parental de H37Rv muestra una acumulación de crecimiento bacteriano y células despegadas al día 7 post-infección, mientras que los aislamientos que fueron sometidos a pasaje serial en medio M7H9 con y sin bilis presentan aún la integridad de la monocapa de macrófagos. El mismo efecto se observa en la cepa DR-689 aunque es menos evidente que en H37Rv. Los controles y la cepa *M. bovis* BCG también muestran la conservación de la integridad de la monocapa.

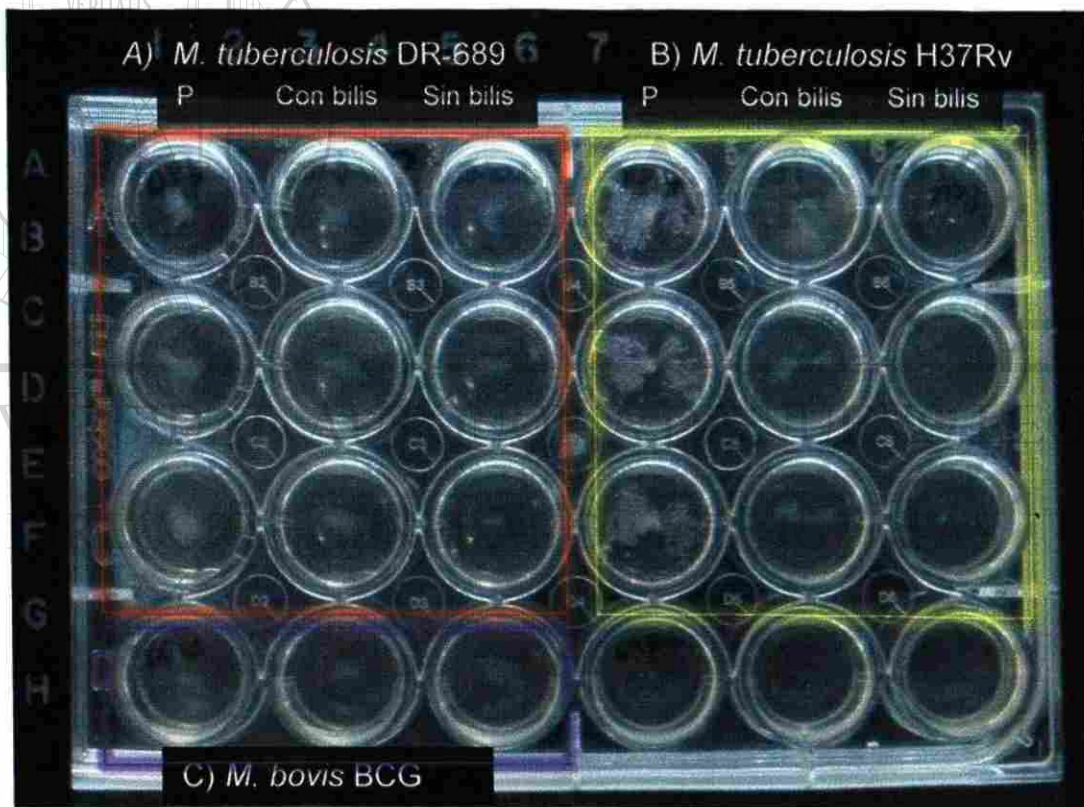


Figura 12. La fotografía muestra una microplaca con macrófagos infectados con dos diferentes cepas de *M. tuberculosis* a los 7 días de incubación. La cepa parental H37Rv muestra un daño visible sobre la monocapa de macrófagos. A) H37Rv, B)DR-689 y C)*M. bovis* BCG.

7.8. Análisis de Microarreglos en el pase 100.

Los análisis de microarreglos de las cepas de *M. tuberculosis* en el pase # 100 fueron realizados por Stuart Cole y colaboradores en la Unité de Génétique Moléculaire Bactérienne del Instituto Pasteur en Paris, Francia. La tabla 10 muestra la comparación de las secuencias suprimidas en las cepas parentales (Vera-Cabrera *et al.*, 2007) y en las cepas sometidas a pasaje serial. Los resultados son similares para las cepas crecidas en M7H9 con y sin bilis. Como podemos observar existen una cantidad significativa de genes que parecen haber sido suprimidos por efecto del subcultivo como en la cepa RIVM 97-1289 donde la delección abarca desde el gen RV2942 hasta el gen Rv2948. También la cepa DR-689 muestra una delección importante en el gen que codifica para la fosfolipasa D. Por otro lado también se muestra la presencia de genes que anteriormente habían sido reportados como ausentes. Para corroborar estas diferencias se llevó a cabo una reacción de amplificación de cada uno de los genes discordantes (marcados en **negritas**).

TABLA 10.

Genes ausentes en los aislamientos de *M. tuberculosis* parentales y los sometidos a pasaje serial.

Aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	Lucio Vera-Cabrera	Cole (Monot M.)	Descripción
RIVM 97-0488	-	Rv0064	Rv0064 (middle)
	Rv1354c	Rv1354c	-
	Rv1355c	Rv1355c	<i>moeY</i>
	Rv1356c	Rv1356c	-
	Rv2101	Rv2101	<i>helZ</i>
	-	Rv2102	-
	Rv2271	Rv2271	-
	Rv2272	Rv2272	-
	Rv2273	Rv2273	-
	Rv2274c	Rv2274c	-
	Rv2275	Rv2275	-
	Rv2276	Rv2276	<i>cyp121</i>
	Rv2277c	Rv2277c	-
	Rv2349c	Rv2349c	<i>plcC (end)</i>
	Rv2350c	Rv2350c	<i>plcB</i>
	Rv2351c	Rv2351c	<i>plcA</i>
	Rv3017c	-	-
	-	Rv3018c	PE27a
	-	Rv3019c	<i>exxR</i>
	-	Rv3020c	<i>exxS</i>
	Rv3021c	Rv3021c	PPE47
	Rv3135	Rv3135	PPE50
	-	Rv3323c	<i>moaX</i>
	Rv3324c	Rv3324c	<i>moaC3</i>
RIVM 97-1289	Rv0552	-	-
	Rv1519	-	-
	Rv1520	Rv1520	-
	Rv2226	-	-
	-	Rv2222c	<i>ginA2</i>
	Rv2283	Rv2283	-
	Rv2284	Rv2284	<i>lipM</i>
	Rv2285	Rv2285	-
	Rv2286c	Rv2286c	-
	Rv2349c	Rv2349c	<i>plcC</i>
	Rv2350c	Rv2350c	<i>plcB</i>
	Rv2351c	Rv2351c	<i>plcA</i>
	Rv2353c	Rv2353c	PPE39
	-	Rv2942	<i>mmp17</i>
	-	Rv2943	-
	-	Rv2944	-
	-	Rv2945	<i>lppX</i>
	-	Rv2946	<i>pkS1</i>

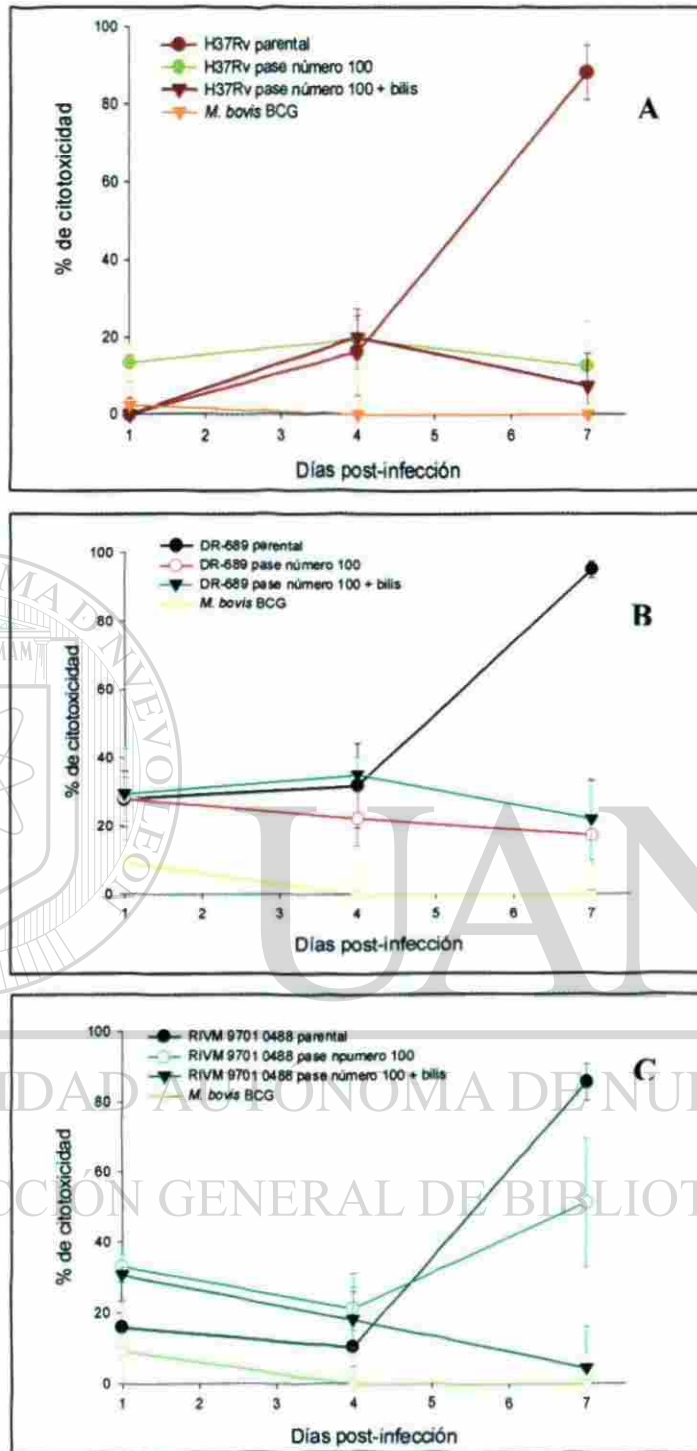


Figura 13. Ensayo de citotoxicidad sobre una monocapa de macrófagos THP-1. El porcentaje de citotoxicidad en las cepas parentales es menor que las cepas sometidas a pasaje serial. A) cepa H37Rv, B) cepa DR-689, C) cepa RIVM 97-0488.

TABLA 10 (continuación)

Aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	Lucio Vera-Cabrera	Cole (Monot M.)	Descripción
-	-	Rv2947	<i>pks15</i>
-	-	Rv2948	<i>fadD22</i>
-	-	Rv2949	
-	-	Rv2950	<i>fadD29</i>
-	-	Rv2951	
-	-	Rv2952	
-	-	Rv2953	
-	-	Rv2954	
-	-	Rv2955	
-	-	Rv2956	
-	-	Rv2957	
-	-	Rv2958	
Rv3017c	-	-	
-	-	Rv3018c	PE27a
Rv3019c	-	Rv3019c	<i>esxR</i>
-	-	Rv3020c	<i>esxS</i>
Rv3021c	-	Rv3021c	PPE47
Rv3022c	-	-	
-	-	Rv3141	<i>fadB4</i>
Rv3142c	-	Rv3142c	
Rv3516	-	Rv3516	<i>echA19</i>
Rv3517	-	Rv3517	
Rv3737a	-	-	
-	-	Rv3738c	PPE66
-	-	Rv3739c	PPE67
<hr/>			
RIVM 97-1389	Rv1524	Rv1524	
	Rv1525	Rv1525	<i>wbb12</i>
	Rv1526c	Rv1526c	
	Rv1731	Rv1731	<i>gabD2</i>
	Rv2349c	Rv2349c	<i>plcC</i>
	Rv2350c	Rv2350c	<i>plcB</i>
	Rv2351c	Rv2351c	<i>plcA</i>
	Rv2645	Rv2645	RD11
	Rv2646	Rv2646	RD11
	-	Rv2647	RD11
	-	Rv2648	RD11
	-	Rv2649	RD11
	-	Rv2650c	RD11 profago phiRv2
	-	Rv2651c	RD11 profago phiRv2
	Rv2652c	Rv2652c	RD11 profago phiRv2
	Rv2653c	Rv2653c	RD11 profago phiRv2
	Rv2654c	Rv2654c	RD11 profago phiRv2
	Rv2655c	Rv2655c	RD11 profago phiRv2
	Rv2656c	Rv2656c	RD11 profago phiRv2
	Rv2657c	Rv2657c	RD11 profago phiRv2
	Rv2658c	Rv2658c	RD11 profago phiRv2
	Rv2659c	Rv2659c	RD11 profago phiRv2

TABLA 10 (continuación)

Aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	Lucio Vera-Cabrera	Cole (Monot M.)	Descripción
	Rv3017c	-	
	-	Rv3018c	PE27a
	Rv3019c	Rv3019c	<i>esxR</i>
	-	Rv3020c	<i>esxS</i>
	Rv3021c	Rv3021c	PPE47
	Rv3135	Rv3135	PPE50
	Rv3651	Rv3651	
DR-689	Rv0065	-	
	Rv0071	Rv0071	
	Rv0072	Rv0072	
	Rv0073	Rv0073	
	-	Rv0074	(<i>Beg</i>)
	Rv1573	Rv1573	
	Rv1574-Rv1584	Rv1574-Rv1584	RD3
	Rv1585c	Rv1585c	
	Rv1586c	Rv1586c	
	Rv1672c	-	
	-	Rv1673c	
	-	Rv1674c	
	-	Rv1755c	<i>plcD</i>
	Rv1758	Rv1758	<i>cut1</i>
	Rv1760	Rv1760	
	Rv1761	Rv1761	
	Rv1762	Rv1762	
	Rv1765	-	
	Rv2349c	Rv2349c	<i>plcC</i>
	Rv2350c	Rv2350c	<i>plcB</i>
	Rv2351c	Rv2351c	<i>plcA</i>
	Rv2434c	-	
	Rv2544	-	
	Rv2816c	Rv2816c	
	Rv2817c	Rv2817c	
	Rv2818c	Rv2818c	
	Rv2819c	Rv2819c	
	Rv2820c	Rv2820c	
97-1177*	-	Rv2349c	<i>plcC</i>
	-	Rv2350c	<i>plcB</i>
	-	Rv2351c	<i>plcA</i>
	-	Rv2353c	PPE39
	-	Rv3018c	PE27a
	-	Rv3019c	<i>esxR</i>
	-	Rv3020c	<i>esxS</i>
	-	Rv3021c	PPE47
	-	Rv3141	<i>fadB4 (end)</i>
	-	Rv3142c	

TABLA 10 (continuación)

Aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	Lucio Vera-Cabrera	Cole (Monot M.)	Descripción
-	-	Rv3516	<i>echA19 (end)</i>
-	-	Rv3517	
-	-	Rv3738c	PPE66
-	-	Rv3739c	PPE67

* 97-1177 tiene las mismas deleciones que RIVM 97-1289 sin 2 RD (Rv2283-2286, Rv2942-2958)

7.8.1. Verificación por PCR de las Deleciones Reportadas en el Ensayo de Microarreglos.

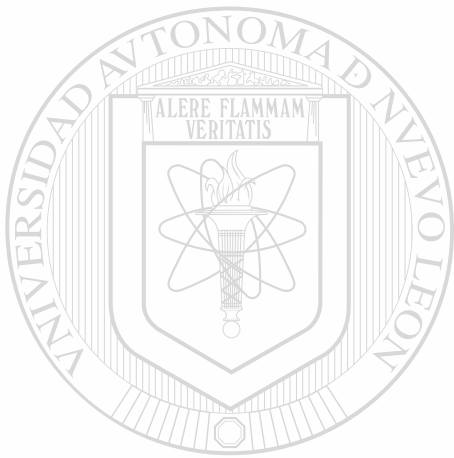
En la tabla 11 se muestran los resultados de la amplificación de los genes discordantes en el ensayo de microarreglos de las cepas parentales y aquellas sometidas a subcultivo en los dos medios de cultivo utilizados. Las reacciones de PCR para todos los fragmentos analizados tuvieron el mismo resultado en las cepas parentales y en las cepas sometidas a pasaje serial. De lo anterior deducimos que por el análisis de microarreglos no se detectaron deleciones en las cepas de *M. tuberculosis* sometidas a subcultivo.

TABLA 11.
Amplificación de los genes discordantes en el ensayo de microarreglos de las cepas parentales y las subcultivadas.

	<i>M. tuberculosis</i> RIVM 97-1389			<i>M. tuberculosis</i> DR-689		
	Parental	Pase 100	Pase 100b	Parental	Pase 100	Pase 100b
Rv2647	+	+	+	Rv0074	+	+
Rv2648	+	+	+	Rv1673c	-	-
Rv2649	-	-	-	Rv1674c	-	-
Rv2650c	-	-	-	Rv1755c		
Rv2651c	-	-	-	Rv1765c	+	+
Rv3018c	+	+	+	Rv2434c	+	+
Rv3020c	+	+	+	Rv2544	-	-

TABLA 11 (continuación)

<i>M. tuberculosis</i> RIVM 97-0488				<i>M. tuberculosis</i> RIVM 97-1289 y RIVM 97-1177			
Gen	Parental	Pase 100	Pase 100b	Gen	Parental	Pase 100	Pase 100b
Rv2102	+	+	+	Rv2222c	+	+	+
Rv3018c	+	+	+	Rv2942	+	+	+
Rv3019c	-	-	-	Rv2943	+	+	+
Rv3020c	+	+	+	Rv2944	+	+	+
Rv3323c	-	-	-	Rv2945	+	+	+
				Rv2946	+	+	+
				Rv2947	+	+	+
				Rv2948	+	+	+
				Rv2949	+	+	+
				Rv2950	+	+	+
				Rv2951	+	+	+
				Rv2952	+	+	+
				Rv2953	+	+	+
				Rv2954	+	+	+
				Rv2955	+	+	+
				Rv2956	+	+	+
				Rv2957	+	+	+
				Rv2958	+	+	+
				Rv3018c	+	+	+
				Rv3020c	+	+	+
				Rv3141	-	-	-
				Rv3738c	-	-	-
				Rv3739c	-	-	-



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

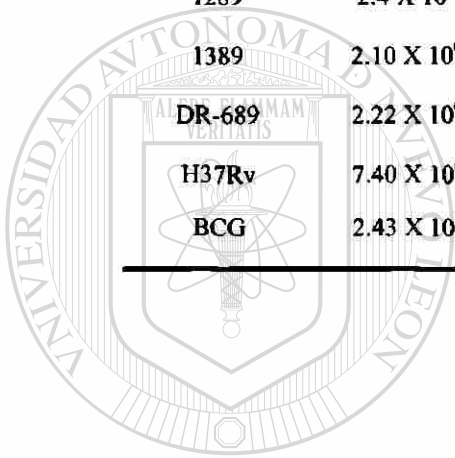
7.9. Determinación de la Cuenta Bacteriana de los Cultivos Criopreservados.

En la tabla 12 se muestra la cuenta bacteriana determinada para todas las cepas de *M. tuberculosis* utilizadas en este estudio, tanto las parentales como las cepas del pase # 100 subcultivadas en medio líquido M7H9 con y sin bilis. Este resultado fue considerado para realizar los estudios posteriores de infección en macrófagos. En esta tabla también se incluye el resultado para *M. bovis* BCG Pasteur que fue utilizada como control de infección nula sobre la monocapa de macrófago THP-1.

TABLA 12.

Cuentas bacteriana en UFC/ml de las cepas en estudio.

Cepas parentales	UFC/ml	Cepas subcultivadas en M7H9	UFC/ml	Cepas subcultivadas en M7H9 + bilis	UFC/ml
0488	3.84 X 10 ⁶	0488-100	2.68 X 10 ⁷	0488-100B	8.87 X 10 ⁶
1177	1.73 X 10 ⁶	1177-100	5.33 X 10 ⁷	1177-90B	2.46 X 10 ⁷
1289	2.4 X 10 ⁶	1289-100	3.38 X 10 ⁷	1289-100B	1.87 X 10 ⁹
1389	2.10 X 10 ⁶	1389-100	2.37 X 10 ⁷	1389-100	2.60 X 10 ⁷
DR-689	2.22 X 10 ⁶	DR-689-100	2.40 X 10 ⁸	DR-689-100B	2.51 X 10 ⁸
H37Rv	7.40 X 10 ⁶	H37Rv-100	3.07 X 10 ⁷	H37Rv-100B	1.29 X 10 ⁷
BCG	2.43 X 10 ⁸				



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

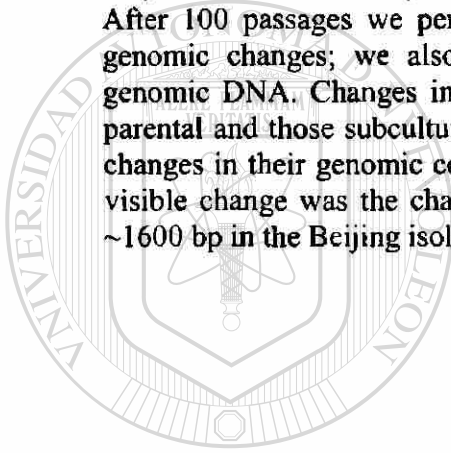


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABSTRACT

Serial passage has been observed to produce changes in the virulence of microorganisms, e.g. rabies virus, and BCG. The latter has been used as a vaccine for tuberculosis for the last 100 years, however in some instances its efficacy has been observed to be very low. Genomic studies of *M. bovis* BCG have demonstrated severe genomic changes. It is possible that the low efficacy of BCG is due to it is actually an *M. bovis* isolate, but not an *M. tuberculosis per se*, which are similar but not completely the same.

In order to determine if similar changes can be observed in *M. tuberculosis*, we selected six isolates, including *M. tuberculosis* H37Rv, a Beijing strain (DR-689), and four more isolates with deletion of the phospholipase C locus (*plcA-plcB-plcC*), and subjected them to serial passage on Middlebrock 7H9 medium, with and without ox bile. After 100 passages we performed RFLP-IS6110 analysis to determine if there were genomic changes; we also checked the changes with microarray analysis of their genomic DNA. Changes in virulence were made by measuring the citotoxic effect of parental and those subcultured isolates on a THP-1 macrophage monolayer. Only small changes in their genomic composition were observed in some of the isolates. The most visible change was the change of position of one of the IS6110 band of ~1400 bp to ~1600 bp in the Beijing isolate subcultured in the ox bile medium.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por diversas especies del género *Mycobacterium*, todas ellas pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La especie más importante y representativa es *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch. Los diversos agentes etiológicos de la TB tienen distintos hospederos y reservorios. *M. tuberculosis* y las variantes regionales o subtipos *M. africanum* y *M. canetti* son principalmente patógenos en humanos. *M. bovis* y *M. microti* son los agentes causales de TB en animales y pueden ser transmitidos a humanos. Algunas cepas particulares aisladas de cabras y focas han sido llamadas *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium pinnipedi*, aunque algunas veces se han identificado como subespecies o variantes de *M. bovis* (Hopewell, 1994; Palomino *et al.*, 2007).

2.2. Taxonomía

El género *Mycobacterium* es el único en la familia *Mycobacteriaceae*. Las especies de *Mycobacterium* tienen un alto contenido de guanina y citosina (61-71 %) en su ácido desoxirribonucleico genómico (ADN) y un alto contenido lipídico en la pared, probablemente el más alto entre todas las bacterias. *Mycobacterium* y otros géneros relacionados (i.e. *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y

Dietzia) tienen estructura y compuestos similares en la pared celular y por lo tanto muestran algunas semejanzas fenotípicas (Metchock *et al.*, 1999).

2.3. Descripción del Género

Las micobacterias son bacilos rectos o ligeramente curvados que miden 1- 10 μm de largo y 0.2-0.6 μm de ancho, algunas veces con ramificaciones. Los organismos tienen pared celular con alto contenido lipídico, incluyendo ceras que tienen ácidos micólicos característicos con largas cadenas ramificadas.

El alto contenido lipídico de la pared celular excluye los colorantes usuales de anilina. Las micobacterias no se tiñen fácilmente con el método de Gram pero son consideradas gram positivas. Para promover la absorción de colorante se utilizan procedimientos especiales de tinción, y una vez teñidas, las micobacterias no son decoloradas fácilmente aun con una mezcla de ácido-alcohol (fig. 1). Esta resistencia a la decoloración es llamada ácido-alcohol-resistencia. La ácido-alcohol-resistencia es perdida parcial o

completamente en algunas etapas de crecimiento por un porcentaje de las células de algunas especies (Metchock *et al.*, 1999).

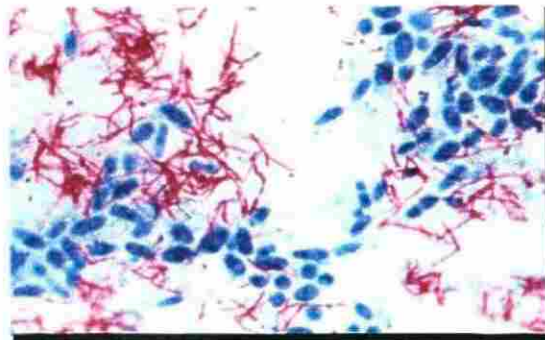


Figura 1. Tinción de Ziehl-Neelsen de *Mycobacterium tuberculosis*. 100x.

Las micobacterias son bacilos no móviles, aeróbicos y no formadoras de esporas. La morfología colonial varía entre las especies, variando de lisas a rugosas y de pigmentadas a no pigmentadas. Algunas especies producen pigmentos que van de color naranja, amarillo, hasta ligeramente rosa. Algunas especies requieren luz para formar pigmento (fotocromógenas) y otras forman pigmento en la luz o en la oscuridad (escotocromógenas). El tiempo de generación varía entre las diferentes especies de 2 y hasta más de 20 h. Bajo condiciones óptimas se pueden observar colonias visibles después de 2 días a 8 semanas de incubación dependiendo de la especie. La mayoría de las especies se adapta fácilmente al crecimiento sobre sustratos simples usando fuentes de nitrógeno como amonio o aminoácidos y glicerol como fuente de carbono en presencia de sales minerales. Algunas especies requieren suplementos en medio tales como hemina, micobactinas u otros compuestos transportadores de hierro. *M. leprae* no ha sido cultivada fuera de células vivas (Metchock *et al.*, 1999).

2.4. Significado Clínico de la Infección con el Complejo *M. tuberculosis*.

Robert Koch fue el primero en establecer la relación causal del bacilo tuberculoso a la enfermedad tuberculosis. El organismo fue nombrado *Mycobacterium tuberculosis* en 1886, presumiblemente porque el organismo semeja a los hongos en su lento crecimiento y morfología colonial (Metchock *et al.*, 1999).

M. tuberculosis es transportada en partículas aéreas conocidas como “núcleos gotita” que son generados cuando tosen los pacientes con TB pulmonar. Estas partículas tienen un diámetro de 1 a 5 μm . La infección ocurre cuando una persona susceptible inhala las partículas de micobacteria las cuales alcanzan las vías aéreas terminales de los pulmones. En los alvéolos los microorganismos son tomados por los macrófagos

alveolares y pueden diseminarse por vía sanguínea a todo el organismo. Usualmente la respuesta inmune mediada por células limita la multiplicación y diseminación de *M. tuberculosis*. Sin embargo, algunos bacilos permanecen viables pero inactivos por muchos años después de la infección inicial. Los pacientes con infección latente usualmente dan positiva la prueba cutánea del derivado de proteína purificada (PPD) pero son asintomáticos y no infecciosos. En general, las personas con infección latente tienen un 10 % de riesgo de desarrollar tuberculosis activa durante toda su vida. El riesgo es mayor dentro de los primeros dos años de infección (Hopewell, 1994; Metchock *et al.*, 1999).

La TB pulmonar en adultos es un proceso inflamatorio lentamente progresivo caracterizado por inflamación crónica intensa, necrosis y caseificación. Las cavidades que se forman en los pulmones pueden producir ruptura en los bronquios, permitiendo que un gran número de microorganismos se disemine a otras partes de los pulmones y sean aerosolizadas al toser, infectando así a otras personas. Los signos y síntomas clínicos usuales de la TB incluyen tos, pérdida de peso, fiebre de bajo grado, disnea y dolor de pecho. La TB en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA) progresa más rápidamente y a menudo se disemina sin la formación de los típicos granulomas. Otras manifestaciones clínicas de la infección con *M. tuberculosis* incluyen: adenitis cervical, infecciones en piel, pericarditis, sinovitis y meningitis (Hopewell, 1994; Metchock *et al.*, 1999).

2.5. Epidemiología Global de la Tuberculosis.

Las consecuencias de la TB en la sociedad son inmensas. Mundialmente, una de cada tres personas está infectada con *M. tuberculosis*; 2 billones de personas en total. La TB

en todas sus formas representa 2.5 % de la carga global de enfermedades y es la causa más común de muerte en mujeres jóvenes, causando más muertes que todas las formas de mortalidad maternal combinadas. La TB actualmente ocupa el séptimo lugar en la clasificación global de causas de muerte. A menos que se hagan esfuerzos intensos, es probable que se mantenga esta posición hasta el 2020 a pesar de que se ha proyectado un descenso sustancial en la incidencia de la TB (Dye *et al.*, 1999; Smith, 2004).

Aunque los medicamentos para tratar y curar la enfermedad han estado disponibles por más de 50 años, todavía cada 15 segundos alguien en el mundo muere de TB. Todavía más alarmante, una persona es infectada con *M. tuberculosis* cada segundo de cada día. Una persona infectada con TB activa que no es tratada, infectará en promedio de 10 a 15 personas por año (Dye *et al.*, 2005).

Según estimaciones de la Organización mundial de la Salud (OMS) en el 2005 hubo 1.6 millones de muertes como resultado de la infección por TB en el mundo (OMS, 2007a). El mayor número de defunciones y la más alta mortalidad *per capita* están en la región de África, aunque el mayor número de nuevos casos de TB en el 2005 ocurrió en la región sureste de Asia, lo cual representa el 34 % de los casos mundiales. La epidemia de TB en África creció rápidamente en la década de 1990 pero su crecimiento ha disminuido cada año y la tasa de incidencia ahora parece haberse estabilizado o empieza a descender (OMS, 2007a).

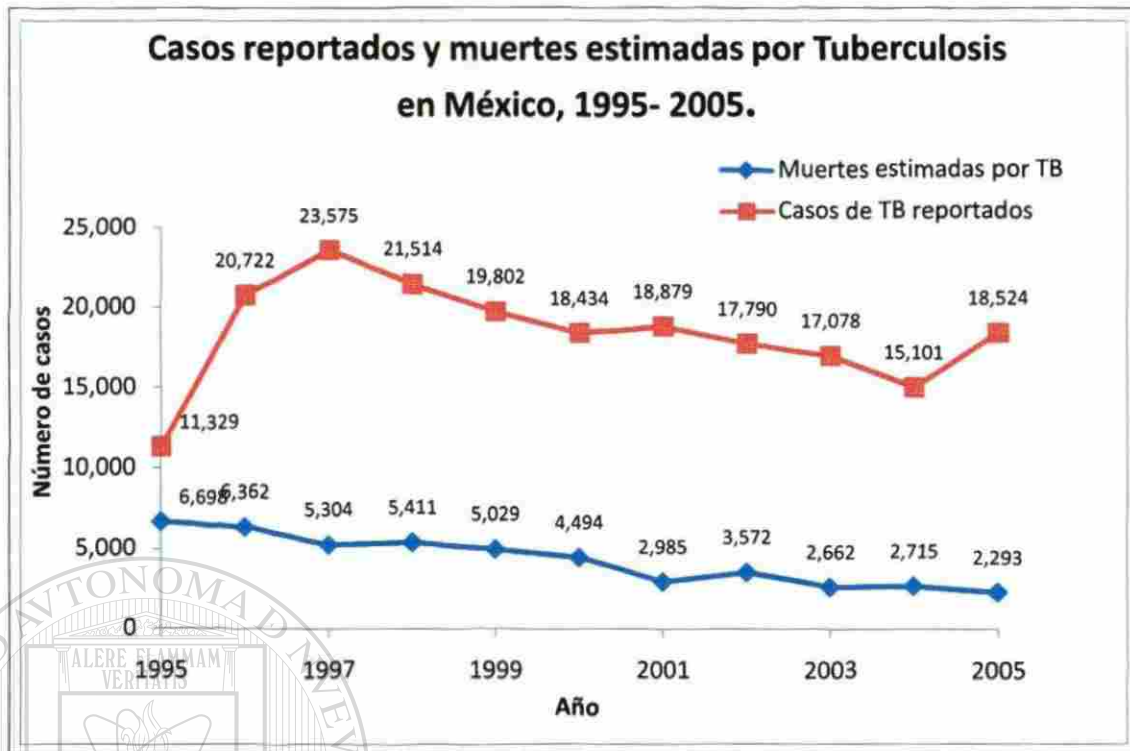
2.6. Tuberculosis y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

La TB y el VIH forman una combinación letal, cada una acelerando el progreso de la otra. El VIH debilita el sistema inmunológico. Las personas que son VIH positivos y están infectadas con el bacilo de la TB tienen más probabilidad de enfermarse que

alguien que es VIH-negativo. La TB es la principal causa de muerte entre personas VIH-positivas. En África, el VIH es el agente simple mas importante que contribuye al incremento en la incidencia de la TB desde 1990 (OMS, 2007a).

2.7. Situación en México

Durante el 2005 en la región de América se notificaron 227,616 casos de TB en todas sus formas con una morbilidad de 32 casos por cada 100,000 habitantes. México ocupa el lugar número 14 de 34 países que integran esta región (OMS, 2007b). En México, durante los últimos diez años, la morbilidad por tuberculosis tuvo una cifra máxima en 1997 con 23,575 casos en total, luego ha descendido y mantenido una tendencia estacionaria a lo largo de la década (fig. 2). En el 2005 se notificaron 18,524 casos de tuberculosis en todas sus formas (OMS, 2007b). Aunque la mortalidad por tuberculosis ha descendido considerablemente en los últimos años sigue siendo la segunda causa de muerte ocasionada por un sólo agente etiológico (sólo superada por el VIH/SIDA) y se encuentra entre las principales causas de muerte en adultos en edad productiva (Secretaría de Salud, 2007) (fig. 1). En los últimos 10 años, los Estados con mayor tasa de mortalidad fueron Chiapas, Baja California Norte y Veracruz. La inclusión de México en los últimos años en los programas de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado ha permitido reducir la tasa de mortalidad en nuestro país (Secretaría de Salud, 2007).



Fuente: OMS. Base de datos global de Tuberculosis (<http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/default.asp>).

Figura 2. Casos reportados y muertes estimadas por tuberculosis en México, 1995-2005.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3. HIPOTESIS

El pasaje serial de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* puede producir cambios que afecten su composición genética y de virulencia.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Principal:

Estudiar el efecto del subcultivo en la composición genética y la virulencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con deleciones en su genoma.

4.2. Objetivos Especificos:

1. Seleccionar cepas de *M. tuberculosis* provenientes de aislamientos clínicos que tengan deleción del locus PLC.
2. Determinar la composición génica de las regiones adyacentes al locus PLC mediante PCR.
3. Determinar mediante microarreglos si existen otros genes ausentes con respecto a la cepa H37Rv.
4. Realizar ensayos de citotoxicidad en la línea celular monocítica THP-1 en las cepas parentales para determinar su capacidad citotóxica.
5. Subcultivar de manera seriada por 100 pases las cepas seleccionadas en medio líquido Middlebrook 7H9 y Middlebrook 7H9 con bilis.
6. Determinar los cambios genéticos y/o de virulencia de las cepas de *M. tuberculosis* subcultivadas

5. ANTECEDENTES

A pesar de que *M. tuberculosis* fue uno de los primeros organismos patógenos humanos en ser descrito (Koch, 1882), hasta ahora no se han desarrollado métodos adecuados de control. Los esfuerzos por combatir las enfermedades producidas por micobacterias se han visto obstaculizados por un entendimiento incompleto de sus mecanismos esenciales de patogenicidad.

M. tuberculosis es un patógeno intracelular que sobrevive y se replica dentro de las células del sistema inmune del hospedero, principalmente macrófagos. El parasitismo de esta bacteria en los macrófagos es central para la infección, latencia, activación de la enfermedad y transmisión (Russell, 2001). *M. tuberculosis* entra al macrófago y reside en un fagosoma que no madura a fagolisosma (Armstrong y Hart, 1971); Clemens y Horwitz, 1995; Vergne *et al.*, 2003). Las interacciones de *M. tuberculosis* con el macrófago son dominadas por la capacidad del patógeno de prevenir la biogénesis fagolisosomal (Vergne *et al.*, 2003) referido anteriormente como bloqueo de la fusión fagosoma-lisosoma. Es un patógeno exitoso porque puede evadir las defensas del hospedero y las drogas antibacterianas.

La identificación de los factores de virulencia es esencial para entender la patogénesis de la TB y puede revelar los componentes principales de la defensa del hospedero. A la fecha no se ha descrito un factor de virulencia definitivo para *M. tuberculosis* y se han

reportado distintos fenotipos de virulencia en células humanas pues no tiene los factores de virulencia clásicos como los de otros patógenos bacterianos que también son causa de enfermedad, por ejemplo las toxinas producidas por *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae* y *Vibrio cholerae* (Smith, 2003). La virulencia de *M. tuberculosis* es un fenómeno multifacético en el que se encuentra involucrada la expresión de múltiples genes en las diferentes etapas de las interacciones hospedero-patógeno incluyendo la adhesión, invasión, replicación intracelular y diseminación a otros sitios (Singh *et al.*, 2005). Varios genes de *M. tuberculosis* como *katG* (catalasa peroxidasa), *ahpC* (alquil-hidroperóxido reductasa), *sodA*, *sodA* (superóxido dismutasa) y *noxR* (óxido nítrico reductasa) han sido implicados en la protección contra intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno (Wilson *et al.*, 1995; Dussurget *et al.*, 2001; Sherman *et al.*, 1996; Ruan *et al.*, 1999). Se han postulado algunas proteínas que juegan un papel en la síntesis de varias moléculas de la superficie celular como ESAT6/CFP10 y *hspX*; la interrupción de los genes ESAT6/CFP10 en una cepa de *M. bovis* resultó en atenuación en un modelo infección en cobayos (Wards *et al.*, 2000). La interrupción del gen *hspX* también conocido como *acr*, que codifica la proteína α -cristalina de 16-kDa producida por *M. tuberculosis*, inhibe la capacidad del mutante para crecer en líneas celulares de macrófagos (Yuan *et al.*, 1998). Debido a que los reguladores transcripcionales controlan la expresión de muchos genes constitutivos se ha observado que son importantes para la virulencia. Sigma A (Rv2703, *sigA*) fue identificado como un factor de virulencia por la complementación de una cepa atenuada de *M. bovis* con una genoteca de cósmidos de *M. tuberculosis* (Collins *et al.*, 1995). También los componentes lipídicos de la pared micobacteriana tal como el

lipoarabinomano y los sulfolípidos han demostrado un papel en la modulación de la respuesta inmune y protegen al organismo de las defensas del hospedero (Chan *et al.*, 1991). Otros genes que podrían estar involucrados en el aumento del crecimiento del bacilo dentro de los macrófagos son dos genes que codifican para proteínas relacionadas a hemoglobina que lo protegen contra el estrés oxidativo y un tercer gen, *hmp*, que le confiere resistencia al estrés oxidativo producido por compuestos reactivos de nitrógeno (Hu *et al.*, 1999). Algunos investigadores han creado mutaciones en genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo celular de las micobacterias (Smith, 2003). Tal es el caso de las fosfolipasas C.

Al igual que en otros microorganismos, se ha demostrado que las fosfolipasas son un importante factor de virulencia (Raynaud *et al.*, 2002). En *M. tuberculosis* los genes que las codifican están situadas en un locus constituido por los genes *plcA*, *plcB* y *plcC*. En algunas bacterias como *M. tuberculosis* CDC1551 existen otros genes homólogos, o

fragmentos de estos (Hernández-Vera *et al.*, 2002). La zona de fosfolipasas ha sido descrita como una zona de alta incidencia de transposición de elementos *IS6110*, lo cual da lugar a polimorfismo (Vera-Cabrera *et al.*, 1997, 2001). En ocasiones cuando dos elementos *IS6110* se insertan cercanamente se produce la pérdida de fragmentos del genoma por recombinación homóloga resultando en cepas con deleciones de alguno o todos los genes *plc*. Una forma de demostrar la importancia de las fosfolipasas C en *M. tuberculosis* es utilizando cepas con los genes inactivados o utilizando las mutantes con deleciones naturales (Vera-Cabrera *et al.*, 1997, 2001). Recientemente Raynaud *et al* en el 2002 construyeron cuatro cepas mutantes de *M. tuberculosis* cada una inactivada en uno de los genes *plc*, un triple mutante *plcABC* y un cuádruple mutante *plcABCD*. La

disrupción de los genes *plcABCD* y *plcABC* disminuyó la capacidad de *M. tuberculosis* para multiplicarse en los pulmones y el bazo de ratones infectados. La virulencia fue parcialmente restablecida cuando el triple mutante *plcABC* fue complementado con cada uno de los genes. Interesantemente, la virulencia no decreció con el mutante cuádruple, sugiriendo que la fosfolipasa D no contribuye significativamente a la virulencia de *M. tuberculosis* o que actúa de manera sinérgica con las otras enzimas FLC (Raynaud *et al.*, 2002). Hernández-Vera *et al* en el 2002 reportaron que una cepa $\Delta plcA-plcB-plcC$ natural producía una cantidad menor de fosfolipasa que la cepa H37Rv; al realizar ensayos de infección en una monocapa de macrófagos THP-1, la cepa $\Delta plcA-plcB-plcC$ no muestra efecto citotóxico en la monocapa, como el observado con la cepa H37Rv que tiene el locus PLC intacto.

Por otro lado, en 1998 se determinó y analizó la secuencia completa del genoma de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998). El genoma comprende

4,411,529 pares de bases, contiene alrededor de 4,000 genes y tiene un alto contenido guanina-citosina. *M. tuberculosis* difiere radicalmente de otras bacterias en que una gran porción de capacidad codificante está dedicada a la producción de enzimas involucradas en la lipogénesis y lipólisis y a dos nuevas familias de proteínas ricas en glicina con una estructura repetitiva que puede representar una fuente de variación antigénica (Cole *et al.*, 1998). *M. tuberculosis* H37Rv fue originalmente aislada de un paciente con TB y ha sido pasada *in vitro* por aproximadamente 100 años. En el 2002 se completó la segunda secuencia genómica de *M. tuberculosis*: el aislamiento clínico CDC1551 que previamente se había asociado a un brote de TB. La cepa fue considerada altamente transmisible y virulenta para el ser humano (Fleischmann *et al.*, 2002). Hasta la fecha se

han secuenciado los genomas de: *Mycobacterium avium* 104, *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis*, *Mycobacterium leprae* TN, *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium* spp. MCS (<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared/Genomes.cgi>). La comparación de estos genomas secuenciados ha sido un medio para empezar a elucidar los mecanismos involucrados en la virulencia y para analizar la evolución de *M. tuberculosis*. Brosch *et al* en 1999 llevaron a cabo un estudio para identificar diferencias genéticas entre H37Rv y H37Ra. El patrón de restricción con la enzima *DraI* mostró dos polimorfismos entre H37Rv y H37Ra. Este estudio reveló que *IS6110* es la causa de estos polimorfismos. Fleischmann *et al* en el 2002 desarrollaron una comparación completa del genoma de la cepa clínica CDC1551 con la cepa de laboratorio H37Rv encontrando polimorfismos de simples nucleótidos y de secuencias largas en numerosos genes. El locus polimórfico incluyó una fosfolipasa C, una lipoproteína de membrana, miembros de una familia génica de adenilato ciclasa y

miembros de la familia génica PE/PPE, algunos de los cuales han sido implicados en la virulencia o la respuesta inmune del hospedero. Kato-Maeda *et al* en el 2001 utilizaron genómica comparativa basada en hibridación con microarreglos para detectar deleciones genómicas a pequeña escala entre 19 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* epidemiológicamente bien caracterizados. Se encontró que cada aislamiento clínico perdió en promedio 0.3 % de su genoma y que conforme la cantidad de deleciones genéticas aumentó, la probabilidad de que la bacteria causara cavidades pulmonares descendió. Los autores interpretaron que estos datos indican que la acumulación de deleciones en *M. tuberculosis* resulta en una disminución de la virulencia.

La atenuación de microorganismo por pasajes *in vitro* ha sido ampliamente utilizada. La mayoría de las vacunas virales utilizadas en animales y humanos han sido derivadas

de esta forma (Jennings y Potter, 1999), aunque poco se sabe acerca del proceso por el cual las mutaciones atenuantes se originan. Los polio virus fueron atenuados por un pasaje rápido de altos títulos del virus en células de riñón de mono y la vacuna clásica contra el sarampión fue atenuada pasándola 24 veces en células humanas de riñón seguida de 28 pases en células amnióticas humanas y 6 en células embrionarias de pollo. La vacuna de la rubéola se desarrolló por atenuación en células embrionarias de pato y en células de riñón de conejo y perro, mientras que la vacuna RA 27/3 comúnmente usada contra la rubéola fue atenuada por 8 pasajes en fibroblastos diploides humanos a 37°C seguido por 7 pasajes a 30°C (Jennings y Potter, 1999).

La vacuna original contra la tuberculosis fue desarrollada por Calmette y Guerin subcultivando una cepa de *M. bovis* 230 veces entre 1908 y 1921 (Calmette y Guerin, 1909). Sin embargo debido al requerimiento de cepas derivadas de la cepa original, se han obtenido varias cepas derivadas que han sufrido hasta la fecha más de 1000 pasajes desde que se prepararon los stocks liofilizados en 1960. Esto ha resultado en muchas diferencias fenotípicas lo que conlleva a una variabilidad en la capacidad para inducir protección contra TB (Clemens *et al.*, 1983; Brosch *et al.*, 2007). A pesar de esto, la vacuna BCG es todavía la vacuna más ampliamente usada en el mundo. Para investigar las bases genéticas de la variación en la eficacia de las cepas derivadas de *M. bovis* BCG, Behr *et al* en 1999 analizaron por microarreglos de ADN 12 cepas de diferentes orígenes geográficos. Se identificaron un total de 16 regiones ausentes entre las cepas estudiadas. Una de estas regiones, RD1, estaba ausente en todas las cepas BCG pero presentes en los demás miembros del complejo de *M. tuberculosis*. Con esto se concluyó que la razón más obvia para la atenuación de BCG fue la pérdida del sistema de secreción de proteínas ESX-1 debido a la delección de RD1.

En un estudio de genómica comparativa y análisis transcripcional de varias vacunas del “bacilo de Calmette y Guérin” (BCG), reveló que el genoma de BCG de 4,374,522 pb contiene 3954 genes que codifican proteínas, 58 de los cuales están presentes en dos copias como resultado de dos duplicaciones en tandem, DU1 y DU2. DU1 está restringida a BCG Pasteur aunque existen cuatro formas de DU2; DU2-I está confinada a las vacunas BCG iniciales, como BCG Japón, mientras que DU2-III ocurre en las vacunas más recientes. El gen glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa, *glpD2*, es uno de los únicos tres genes comunes a las cuatro variantes, implicando que BCG requiere niveles altos de enzima para crecer en glicerol (Brosch *et al.*, 2007). Los hallazgos combinados de este trabajo sugieren que las vacunas iniciales pueden ser superiores, en cuanto al nivel de protección, a las últimas que son las que se utilizan más ampliamente y que por lo tanto su atenuación ha sido mayor.

El único trabajo reportado del efecto del pasaje serial *in vitro* en cepas de *M. tuberculosis* se realizó para evaluar la estabilidad del elemento IS6110 (van Soolingen *et al.*, 1991). En este estudio se hizo un pasaje *in vitro* cada semana por 6 meses en un medio de cultivo líquido de 6 cepas de *M. tuberculosis* y 2 cepas de *M. bovis* BCG. Además se investigó si el pasaje serial en medios a los que se les incrementó la concentración de drogas antifímicas modificaba el mismo patrón. Ninguna de las cepas mostró cambio en sus patrones de RFLP para IS6110 después de ese tiempo de pasaje serial (van Soolingen *et al.*, 1991). Aranaz *et al.* en el 2004 reportaron un cambio en los perfiles de hibridación (Spoligotyping) de cepas isogénicas (un aislamiento clínico y un derivado del subcultivo en el laboratorio) causado por la delección de un repetido variable directo. En este estudio el pasaje serial se había dado solamente 8 veces.

Basados en estas observaciones se consideró que *M. tuberculosis* podía ser sometida a pasaje serial *in vitro* para inducirla a sufrir mutaciones que afecten sus características genéticas y su virulencia. Para esto se seleccionaron cepas que tuvieran una delección importante (PLC) en su genoma, hipotetizando que estas cepas serían más propensas a sufrir delecciones. Además las cepas utilizadas en este proyecto tienen características fenotípicas y filogenéticas distintas entre ellas.

Como se describió anteriormente, cepas con mayor número de delecciones son relacionadas con pacientes con menor número de cavidades pulmonares; sin embargo todas estas cepas, tanto las del estudio de Kato-Maeda *et al* del 2001, como las utilizadas por Vera-Cabrera *et al* en el 2007, provienen de aislamientos clínicos, por lo que son capaces de producir enfermedad, aunque sea limitada. Por lo que es necesario tener cepas con mayor pérdida de virulencia. Estos estudios podrían tener importantes implicaciones para el diseño de una vacuna más efectiva para la protección contra la TB.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Selección de las Cepas de *M. tuberculosis* Provenientes de Aislamientos Clínicos con Delección del Locus PLC

Para este proyecto se utilizaron cinco cepas de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* donadas por la Dra. Kristin Kremer del National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, Países Bajos. Estos aislamientos tienen la particularidad de tener una delección parcial o total del locus de fosfolipasa C y sus características genéticas fueron descritas por Vera-Cabrera *et al* en el 2007. En la tabla 1 se muestran los nombres y las características del locus de fosfolipasa C para cada una

de las cepas utilizadas en este proyecto, también se incluye otra cepa $\Delta plcA-plcB-plcC$ de *M. tuberculosis* de la colección del laboratorio en donde se llevó a cabo la investigación. Las cepas utilizadas en este estudio tienen diferentes características filogenéticas que hacen suponer que su comportamiento en el pasaje serial será distinto. La cepa RIVM-9701 1389 corresponde al grupo filogenético denominado cepas “Manila” o cepas “ancestrales” que tienen un patrón característico de Spoligotyping y contienen la delección específica de tuberculosis “TbD1” (Brosch *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2003). La cepa DR-689 corresponde a la familia “Beijing” cuya principal característica genética es que comparten un patrón común de RFLP para IS6110 con un elevado número de copias de IS6110. Las cepas de la familia “Beijing” han sido

asociadas a brotes y a multidrogorresistencia (van Soolingen *et al.*, 1995). En este trabajo se utilizó también la cepa H37Rv que es la cepa de laboratorio más estudiada. Desde su aislamiento en 1905 ha sido pasada continuamente y su virulencia en humanos se desconoce aunque sigue manteniendo su virulencia en modelos animales (Brennan *et al.*, 1996).

TABLA 1.

Aislamientos de *M. tuberculosis* utilizados en este trabajo.

Cepa	Fenotipo	PCR mtp 40	PCR <i>plcA</i>	PCR <i>plcB</i>	PCR <i>plcC</i>	Secuencia IS6110 sitio de inserción Sitio 3' y 5'	Sitios de inserción	PCR <i>plcD</i>
RIVM- 9701 0488	Moderna	-	-	-	-	GTCTGGGTCGTTG ND	ND	+
RIVM- 9701 1177	Moderna	-	-	-	-	CCTGCGCCGGCAG CCCTCCTCTAAC	19916 (<i>plcC</i>) y ND	-
RIVM- 9701 1289	Moderna	-	-	-	-	CCTGCGCCGGCAG CCCTCCTCTAAC	19849 (<i>plcC</i>) y 288509	-
RIVM- 9701 1389	Ancestral	-	-	-	-	ND	19849 (<i>plcC</i>) y 288509	+
DR-689	Beijing	-	-	-	-	ND	ND	ND

6.1.1. Cultivo y Preparación del Stock.

Las cepas de *M. tuberculosis* seleccionadas se sembraron en agar Lowenstein-Jensen (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) y se incubaron a 37°C por 10-20 días, hasta obtener suficiente crecimiento.

Para el stock del cultivo se utilizó una asada del cultivo joven en Lowstein-Jensen y se inoculó en 100 ml de medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) con Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) en frascos de cultivo de 490 ml y se incubaron por 7 días a 37 °C con agitación continua.

Después se distribuyeron 1.5 ml de la suspensión bacteriana en criotubos de 2 ml con tapón de rosca estériles y se congelaron a -70 °C hasta su uso.

6.1.2. Determinación de la Cuenta Bacteriana de los Stocks.

Al menos una semana después de haber congelado las micobacterias, se tomaron al azar de 2 a 3 tubos de los cultivos mantenidos a -70 °C, y una vez descongelados, se agitaron vigorosamente los tubos en vórtex por 5 min. Posteriormente se hicieron diluciones 1:10 por triplicado en medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) con tween 80. De las diluciones se tomaron 50 µl y sembraron en placas Petri conteniendo 10 ml de agar Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) suplementado con OADC. Se incubaron por 10-21 días a 37 °C en 5-10 % de CO₂. Finalizado el tiempo de incubación se contó el número de colonias por placa de cada dilución, tomando en cuenta los rangos entre 20 y 200 colonias por placa. Finalmente se realizó el cálculo de acuerdo al factor de dilución usado y se determinó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

6.1.3. Extracción del ADN.

El ADN se extrajo mediante la técnica de CTAB-NaCl con modificaciones que serán descritas a continuación (Wilson, 1987). Partiendo del cultivo joven en medio sólido Lowestein-Jensen, se recolectaron las bacterias con un asa estéril en un tubo de microcentrífuga conteniendo 500 µl de solución TE 1X y se calentaron por 30 min a 80°C para inactivarlas. Se añadieron 50 µl de lisozima (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MI, USA) mezclando por inversión (20 veces) y se incubó a 37°C toda la noche. Posteriormente se adicionaron 70 µl de SDS al 10 % y 6 µl de proteinasa K (10 mg/ml)(Promega, Madison, WI, USA), de la misma forma se mezcló por inversión (20 veces) y se realizó una incubación a 65°C por 10 min. Se añadieron 100 µl de NaCl 5M

(Sigma), se mezcló por inversión (20 veces), para después agregar 80 µl de bromuro de hexadecil-trimetilamonio (CTAB) (Sigma) precalentado a 65°C. La mezcla se agitó en un vórtex hasta que la suspensión se observó lechosa, se incubó a 65°C por 10 min. Se añadió un volumen igual (0.7 ml) de una mezcla (24:1) de cloroformo/alcohol isoamílico (Sigma) y se agitó en un vórtex por 10 s, se centrifugó a temperatura ambiente por 5 min a 12,000 X g y la capa acuosa fue transferida a un nuevo tubo de microcentrífuga con una micropipeta. Se agregaron 500 µl de isopropanol (Sigma); después de agitar levemente los tubos se dejaron a -20°C por lo menos 1 hora, se centrifugó por 15 min a temperatura ambiente a 12,000 X g y se descartó el sobrenadante. La pastilla de ADN se lavó con 1 ml de etanol frío para remover el CTAB residual y el isopropanol. Los tubos se centrifugaron por 5 min a temperatura ambiente a 12,000 X g, se descartó el sobrenadante y la pastilla de ADN se dejó secar al aire. El ADN se disolvió en 50 µl de buffer TE 1X, dejando en incubación a 37°C por 30-60 min.

Para evaluar la cantidad y la calidad del ADN se utilizó un biofotómetro (Biophotometer Eppendorf, Hamburg, Germany) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

6.2. Análisis de la Región Cercana al Locus PLC.

Para llevar a cabo este objetivo primero se diseñó con el programa Primer Select (Lasergene DNASTAR, Madison, WI, USA), una serie de oligonucleótidos (tabla 2) para amplificar por PCR los genes adyacentes al locus PLC. Las secuencias utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos correspondieron a las secuencias de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* CDC1551 (<http://www.tigr.org/index.shtml>).

TABLA 2

Oligonucleótidos utilizados para analizar la región cercana al locus PLC.

Gen	Secuencia de los iniciadores	Producto esperado en pb
<i>cysK</i>	Up1 5'-GAG CAT CGC CGA GGA CAT CA -3'	154
	LoA 5'-GGA GCA TGG CAA CCC CGA TA-3'	
<i>moeW</i>	Up2 5'-CCA GGC CAA GGC AGA GGT C-3'	307
	LoB 5'-CCG TGT TCA TCG CAT CAG ACA G-3'	
<i>dnaG</i>	Up4 5'-GGT GCC CGG CGA CGT TTC-3'	387
	LoD 5'-GAG CCA CCG CGA CGA AAG AC-3'	
<i>glyS</i>	Up6 5'-ATC ACT CCG GGC AAC TTC ATC-3'	532
	LoF 5'-CGG GAC AGC GGC AAC AC-3'	
<i>amiA2</i>	Up7 5'-CGG ACT ACG GCC TAC GGT TGT-3'	437
	LoE 5'-GAT GAA CTG CAG CGC GAG GAT TT-3'	
<i>bex</i>	Up8 5'-GGC GAC CGG GTA GAC CTG TTG AT-3'	273
	LoF 5'-CGA TGA CGA TGC CCT TCT GAC TAT-3'	
<i>phoH</i>	Up9 5'-AGC AGG TGA CCC GCA TAA TCT T-3'	185
	Lo3 5'-GTG CCA CCT CGA TGA CTC CAG-3'	
<i>narkU</i>	NaU 5'-GGA ATT GCC GGT GGG GTA GG-3'	293
	NaL 5'-ACG AAG GAG AAG CCG ATG AAT GAG-3'	
Rv2326	RVU 5'-GGG TGC TGC TGG GCT ATT TCA ACA-3'	402
	RvL 5'-CTT TCC GGA TGC TGC AAG ACG AC-3'	
<i>dnaJ</i>	DJ-U 5'-CGC GGC GTC GGG GTG GTT-3'	340
	DJ-L 5'-GCT GCG TGC CGG GTG GAA TG-3'	
<i>hrcA</i>	HA-U 5'-CGG CCC GGC TGC TGA TGG-3'	404
	HA-L 5'-CAC CTT GCC GGC TTC CTG CTG A-3'	
Rv2345	2345-U 5'-CGC CGC GTC GAC CCT ACC A-3'	590
	2345-L 5'-GGC TTG CCG TCC GCT CAC TGC-3'	
Rv2346	2346-U 5'-GGA GCA TCA GGC CAT CGT TCG TG-3'	182
	2346-L 5'-TGT CGG TTT GTG CCA TGT TGT TGC-3'	
Rv2347	2347-U 5'-CGT CCG CGC AAA ACA TCT CG-3'	171
	2347-L 5'-AGG CCT GCT CTT GCT GCT CGT AGT-3'	
Rv2348	2348-U 5'-AAT GCT CGG CGG GTT GTC GGT TCC-3'	210
	2348-L 5'-CCT CAA AGC GGG GTT CAG CGT TCT-3'	
Rv2352	2352-U 5'-GTC GGT TTC GGC TGC GTT GTC TCC-3'	491
	2352-L 5'-CCA TAC CCA TCG GCA TCG GCA TCA-3'	
<i>Dgt</i>	DGT-U 5'-GCG CGA GTG AGC ACG ACC CCT ACG-3'	599
	DGT-L 5'-CGC GCC TTG CCG AAC CCA TAC C-3'	

6.2.1 Ensayo de PCR.

Para amplificar los genes cercanos a la región del locus PLC, el ensayo de PCR fue llevado a cabo con 25 µl de mezcla de reacción conteniendo 50 nM de cada primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de la mezcla de nucleótidos, 1 U de Taq polimerasa y 50 ng del templado de ADN; el volumen se ajustó con agua milliQ

estéril. Después de la desnaturalización a 95°C por 30 s, la mezcla de reacción se procesó por 30 ciclos más a 94°C por 1 min, 58°C por 1 min y 72°C por 1 min seguido por 72°C por 10 min en un termociclador PTC-200 MJ Research (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA). Los amplicones fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % en buffer Tris-acetato-EDTA y los tamaños de los amplicones se compararon con un marcador de peso molecular con fragmento de 100 pb de diferencia (Promega).

6.2.2 Determinación de la Extensión de las Deleciones en el Locus PLC.

Para determinar la extensión de la deleción en el locus PLC se utilizó PCR larga para mapear esta región seleccionando los genes presentes más cercanos al locus PLC (fig. 3 A) y en base a la secuencia de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* CDC1551 (<http://www.tigr.org/index.shtml>). También se utilizaron los iniciadores IS25 e IS26, localizados en los extremos de IS6110, debido a que estas cepas poseen una secuencia de inserción que interrumpe los genes PLC (fig. 3 B). Para la selección de

oligonucleótidos (tabla 3) se utilizó el software Primer Select (Lasergene DNASTAR).

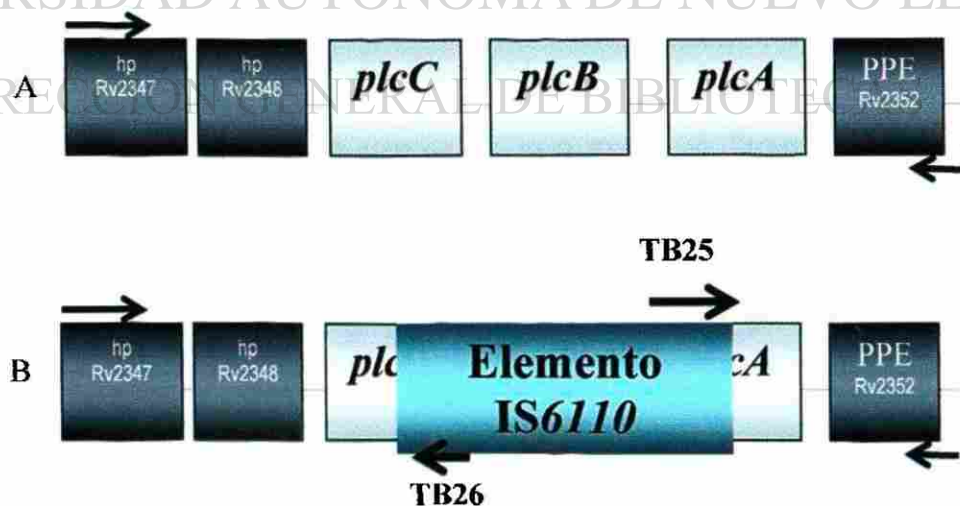


Figura 3. Representación esquemática de la región del locus PLC y genes contiguos.

TABLA 3

Iniciadores para los genes adyacentes al locus PLC

Localización	Iniciador
Rv2347	LGB-L 5'-CCA GCC CGC GCC CGA GAT GTT-3'
Rv2352	LGB-U 5'-GGG GTC GGG GCC GTT GTT TAT G-3'
Rv2352	LGB-U3 5'-GGG GGT GCT GGG GCG GGT AT-3'
Rv2357	LGB-UP6 5'-ATC ACT CCG GGC AAC TTC ATC-3'
IS6110	IS25 5'-CTC CGG CGG GTA CCT CG-3'
IS6110	IS26 5'-AGG CTG CCT ACT ACG CTC AAC G-3'

6.2.3. Ensayo de PCR Larga.

El ensayo de PCR larga fue llevado a cabo con 100 ng de ADN genómico en un termociclador PTC-200 MJ Research utilizando el kit comercial para ensayos de PCR larga XL (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) bajo las siguientes condiciones: 94°C por 2 min y 15 ciclos de 94°C por 15 s, 65°C por 30 s, y 68°C por 4.5 min. Se llevó a cabo una segunda ronda de 14 ciclos a 94°C por 15 s, 65°C por 30 s, y 68°C por 4.5 min, añadiendo 15 s a cada ciclo. Al final se añadió un paso de extensión a 72°C por 10 min.

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % y teñidos con bromuro de etidio. Posteriormente los productos amplificados fueron aplicados a un gel de agarosa de bajo punto de fusión y después de la electroforesis, los fragmentos de gel que contenían las bandas más fuertes fueron extraídas y purificadas utilizando el sistema de purificación de ADN Wizard Genomic (Promega, Madison, Wi, USA). El ADN se cuantificó espectrofotométricamente y los productos se enviaron a secuenciación utilizando un kit de secuenciación DyeDeoxy (dRhodamine) en un secuenciador automático ABI Prism 373 DNA sequencer (Applied Biosystems). Para encontrar la similitud entre las secuencias de los productos

amplificados con las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y CDC1551 se utilizó la base de datos genómica Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

6.3. Ensayo de Microarreglos para Determinar Ausencia de Genes en los Asilamientos con Respecto a la cepa H37Rv.

Los microarreglos caseros fueron producidos para las especificaciones de este estudio por Oxford Gene Technology (OGT) usando la tecnología Agilent y conteniendo 21,725 oligonucleótidos no redundantes (60-mers) cubriendo esencialmente todas las partes de los genomas de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y CDC1551 y *M. bovis* cepas AF2122/97 y BCG Pasteur. En promedio hay una sonda de oligonucleótidos cada 203 bases.

6.3.1 Método para el Marcaje de ADN con Cy3 y Cy5.

El ADN fue extraído como se menciona en la sección 3.1x; 1 µg de cada muestra de ADN se colocó en un tubo de microcentrifuga (0.5 ml) con 3 µg de iniciadores aleatorios (1 ml) y se llevaron a un volumen final 42.5 ml con H₂O (grado biología molecular, libre de Dnasas y Rnasas). El ADN se calentó a 95°C, se colocó de inmediato sobre hielo y se centrifugó. Se añadieron 5 µl de buffer REact 2 (10 X), 1 µl de dNTP's (5 mM dA/G/TTP, 2 mM dCTP), 1.5 µl de Cy3 o Cy5 dCTP (1 mM) y 1 µl de enzima Klenow (3-9 U/ml) para dar un volumen final de 50 µl. La solución se incubó en la oscuridad a 37°C por 90 min.

6.3.2. Protocolo de Hibridación Estándar

El exceso de Cy3 y Cy5 dCTP fue removido del ADN y las muestras marcados usando el kit MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen, Nattermannallee, Germany). Las muestras de ADN marcado con Cy3 y Cy5 se combinaron en un tubo (1.5 ml) y se

añadieron 5 volúmenes de buffer PB. La solución se pasó a través de una columna MiniElute, recolectada en un tubo y centrifugada a 13,000 rpm por 1 min. El eluido se descartó y la columna MiniElute se puso nuevamente en el mismo tubo de recolección. Se añadieron 500 ml de buffer PE a la columna MiniElute, se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min y se descartó el eluido. La columna MiniElute se colocó de nuevo en el mismo tubo de recolección y el paso previo se repitió con 250 µl de PE. La columna miniElute se puso en un tubo nuevo de 1.5 ml, se añadieron al centro de la membrana 15.9 µl de agua (22 x 22mm LifterSlip) o 30.2 µl (22 x 50mm LifterSlip), se dejó reposar por 1 min y entonces se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min

La solución de prehibridación (50 ml de 3.5X SSC, 0.1 % SDS, 10 mg/ml BSA) fue colocada en una jarra Coplin e incubada a 65°C para pre-calentar por 90 min. El microarreglo se colocó en la solución de pre-hibridación y se incubó a 65°C por 20 min. El arreglo se enjuagó subsecuentemente en 400 ml de agua por 1 min y en 400 ml de isopropanol por 1 min. Se colocó luego en un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifugó a 1,500 rpm por 5 min para secar. Cada microarreglo se almacenó en la oscuridad en una caja libre de polvo hasta la hibridación (< 1 h).

La laminilla del microarreglo pre-hibridado se colocó en el casete de hibridación y se añadieron dos alícuotas de 15 ml de agua a los pozos del casete. Se preparó una solución de hibridación (4X SSC, 0.3 % SDS) conteniendo las muestras marcadas con Cy3/Cy5 con un volumen final de 23 ml (22 x 22 mm LifterSlips) o 45 ml (22 x 50 mm LifterSlips). La solución de hibridación se calentó a 95°C por 2 min, permitiendo que se enfriara ligeramente a temperatura ambiente y luego se centrifugó brevemente. Cuidadosamente se colocó una tapa LifterSlip sobre el área seleccionada de la laminilla para evitar ralladuras sobre su superficie. La solución de hibridación se pipeteó bajo una

esquina de la tapa LifterSlip, permitiendo que la solución entrara completamente a través del arreglo por acción capilar. Cualquier exceso de solución de hibridación se pipeteó bajo la esquina opuesta de la LifterSlip. El casete de hibridación se selló y se sumergió en un baño de agua a 65°C en la oscuridad por 16-20 h.

La solución de lavado A (1X SSC, 0.05 % SDS) se precalentó a 65°C y se colocó en un recipiente de tinción precalentada a 65°C. La laminilla del microarreglo se removió del casete de hibridación y se lavó cuidadosamente en el recipiente de tinción de la solución de lavado A a 65°C para remover la LifterSlip. La laminilla se puso entonces sobre un porta-laminillas y se agitó en solución de lavado A por otros 2 min. Las laminillas fueron transferidas a una rejilla de limpieza y se agitaron en un recipiente de 400 ml de solución de lavado B (0.06X SSC) por 2 min a temperatura ambiente. Las laminillas fueron transferidas a un segundo recipiente de 400 ml de solución de lavado B (0.06X SSC) y se agitaron por 2 min adicionales a temperatura ambiente antes del secado por centrifugación a 1,500 rpm por 5 min en un tubo de centrifuga de 50 ml.

6.4. Genotipificación de ADN Basada en IS6110.

Para determinar la relación epidemiológica de las cepas Δ PLC estudiadas, así como para analizar *grosso modo* el contenido genético de las cepas antes y después del subcultivo se realizaron ensayos de RFLP con *PvuII* como enzima de corte y una sonda que hibrida con el brazo derecho de la secuencia de inserción *IS6110* tal como se ha descrito anteriormente (van Soolingen *et al.*, 1991).

6.4.1. Digestión del ADN con PvuII.

Se digirieron aproximadamente 2 μ g de ADN genómico con la enzima *PvuII* en un

volumen final de 30 μ l en un tubo eppendorf, se centrifugaron los tubos por 5 s a 12,000 g y se incubaron 4 h a 37°C.

6.4.2. Separación de los Fragmentos de ADN por Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 0.8 % en solución TE adicionado con 5 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Amresco, Solon, OH, USA) y se montó en una cámara de electroforesis utilizando la misma solución para el corrimiento. Se aplicaron 25 μ l de las muestras mezcladas con solución de carga 5X a los pozos del gel así como también 4.5 μ l del marcador de 1 kb ((Gibco/Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA) en los carriles de los extremos. Se inició la electroforesis a 100 V por 10 min y posteriormente se decreció el voltaje a 35 V y se corrió toda la noche hasta una buena migración de los fragmentos.

6.4.3. Southern Blotting

Después de la electroforesis se desmontó el gel y se colocó por 20 min en 300 ml de solución desnaturalizante (NaCl 1.5M, NaOH 0.5M) y se lavó con agua destilada.

Posteriormente se colocó en 300 ml de solución de neutralización (NaCl 1.5M, Tris-base 0.5M pH 7.5,) por otros 20 min y se lavó finalmente con agua destilada. Se procedió a la transferencia del ADN por el método capilar como se detalla a continuación:

Se colocó un molde para geles boca abajo en una bandeja, se cubrió el molde con un pedazo de papel filtro Whatman ajustando el tamaño al molde. Cuidadosamente se empapó con solución de transferencia SSC 20X y se removieron las burbujas de aire. Se colocó el gel sobre el papel Whatman de tal forma que se ajustara exactamente sobre el molde para geles, se puso encima del gel la membrana de nylon Hybond N-plus (Amersham Biosciences Piscataway, NJ, USA) y después se colocaron 3 filtros gruesos Whatman sobre la membrana. Finalmente se puso una pila de papel absorbente de aproximadamente 5 cm y sobre éstos se colocó un objeto que pesara 1 kg. Se rellenó la

bandeja con solución SSC 20X y se llevó a cabo la transferencia durante 4 h a temperatura ambiente.

6.4.4. Adhesión del ADN a la Membrana por Enlaces Covalentes.

Llevada a cabo la electroforesis se sacó la membrana de nylon con mucho cuidado y se anotaron los datos en la esquina superior derecha, se dejó secar en papel filtro por 15 min. Con la finalidad de unir el ADN a la membrana de nylon, por medio de enlaces covalentes, se sometió la membrana a una exposición en luz ultravioleta utilizando el aparato Crosslinker (UVP, Upland, CA, USA).

6.4.5. Preparación de la Sonda por PCR

Se preparó una reacción de 50 μ l utilizando 50 nM de cada primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M de la mezcla de nucleótidos, 1 U de Taq polimerasa y 100 ng del templado de ADN de la cepa H37Rv; el volumen se ajustó con agua milliQ estéril. Se colocaron los tubos en el termociclador PTC-200 MJ Research con el siguiente programa: las muestras fueron desnaturalizadas por 3 min a 96°C seguidas por tres ciclos de 50 s a 95°C, 1 min a 70°C, 25 s a 72°C, luego tres ciclos de 50 s a 95°C, 1 min a 68°C, 20 s a 72°C y finalmente 25 ciclos de 1 min a 94°C, 40 s a 67°C, 20 s a 72°C. El fragmento obtenido de la PCR de 245 pb se purificó utilizando el kit de purificación de ADN Wizard Genomic (Promega).

6.4.6. Marcaje de la Sonda

Se preparó una solución conteniendo entre 600 a 800 ng del amplicón en 50 μ l de agua milliQ. El tubo con la sonda se colocó en agua hirviendo por 5 min, se sacó inmediatamente y se pasó a un baño de hielo por 5 min. Se centrifugó por 30 s a 10,000 X g y se agregó un volumen igual de reactivo de marcaje ECL (Amersham), se mezcló cuidadosamente y se añadió la misma cantidad de glutaraldehído (Amersham). Se

incubó a 37°C por 15 min quedando así lista la sonda para el experimento de hibridación.

6.4.7. Hibridación y Detección

La membrana se humedeció en solución SSC 2X y se pasó a una malla de poletileno para colocarse en el tubo de hibridación utilizando 80 ml de solución SSC 2X para adherir la malla al tubo. Se retiraron los 80 ml de solución y se agregaron 10 ml de solución de hibridación precalentado a 42°C. Se pre-hibridó la membrana por 1 hora a 42°C en un horno de hibridación con movimiento de rotación constante. Después de este tiempo se retiró la solución de hibridación y se agregó a este la sonda marcada, se devolvió la solución de hibridación al tubo con la membrana y se dejó incubando toda la noche. Al siguiente día se precalentó la solución de lavado primario a 55°C y utilizando 50-80 ml, se procedió a hacer dos lavados a la membrana de 10 min cada uno. Se sacó la membrana con la malla y en un recipiente plástico se hicieron dos lavados a temperatura ambiente con solución de lavado secundario por 5 min. Se quitó el exceso de solución de lavado secundario y utilizando un recipiente limpio se agregaron sobre la membrana 10 ml de reactivo de detección. Se dispersó el reactivo de detección por toda la membrana rotando el recipiente por 2 min. Se retiró la membrana del recipiente y se colocó sobre un papel filtro Whatman para quitar el exceso de reactivo de detección, posteriormente se envolvió la membrana con papel saranwrap y se colocó en el casete de detección con el lado del ADN hacia arriba, se colocó un film para autoradiografía sobre la membrana, se cerró el casete por exactamente 5 min. Posteriormente se sacó el film del casete y se colocó en reactivo de revelado por 2 min, se enjuagó el film con agua corriente y se colocó en el recipiente del reactivo fijador por 5 min. Se sacó el film y se dejó secar a temperatura ambiente.

8. DISCUSIÓN

El pasaje serial *in vitro* de microorganismos ha producido en muchos casos una disminución en la virulencia o cambios en sus propiedades genéticas o fenotípicas, de tal forma que esta atenuación ha sido un factor importante para la producción de vacunas y el desarrollo de blancos terapéuticos. En este trabajo se llevó a cabo el pasaje serial de cepas de *M. tuberculosis* con deleciones en el genoma por 100 pases y se investigaron los efectos sobre su composición genética utilizando la tecnología de microarreglos y el análisis de RFLP para IS6110; además se estudió el efecto sobre la capacidad citotóxica en una monocapa de macrófagos THP-1.

El pasaje serial se llevó a cabo en un medio de cultivo líquido (M7H9) en dos versiones, a una de las cuales se le añadió bilis de buey; con el propósito de emular un componente del medio que utilizaron Calmette y Guérin. La bilis está compuesta de sales que actúan como detergentes emulsionando los ácidos grasos y se ha observado que causa daño en el ADN sobre *S. enterica* e induce rearreglos y mutaciones puntuales (Prieto *et al.*, 2004). La bilis puede tener efectos similares sobre el ADN de *E. coli* como se observó en un estudio donde la exposición a sales biliares indujeron genes de la cadena de estrés oxidativo y de daño al ADN (Bernstein *et al.*, 1999). Se han propuesto varios mecanismos por los cuales las sales biliares causan daño oxidativo sobre *S. enterica*: (a) la exposición a bilis induce transiciones CC↔ AT, b) el desoxicolato de

sodio activa la transcripción de genes que corresponden a la respuesta al daño oxidativo, los *oxyR* y *soxSR*, c) los mutantes de *S. enterica* carecen de exonucleasas que son extremadamente sensibles a la bilis (Prieto *et al.*, 2004).

De la misma manera, en este trabajo se consideró que la adición de bilis pudo ser un factor para que se dieran las mutaciones en las bacterias.

8.1. Análisis de la Región Cercana al Locus PLC.

Las fosfolipasas C son factores de virulencia de varios microorganismos incluyendo *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. (Songer, 1997). Actúan destruyendo los tejidos celulares como en las infecciones por *Clostridium* (Williamson y Titball, 1993) o lisando las membranas fagosomales y liberando microorganismos intracelulares al citoplasma como en el caso de *L. monocytogenes* (Tilney y Portnoy, 1989). *M. tuberculosis* posee 4 genes que codifican enzimas fosfolipasas tipo C: *plcA*, *plcB*, *plcC* y *plcD*. Este último está ausente o interrumpido en muchos aislamientos clínicos e incluso en la cepa H37Rv. Reynaud *et al* en el 2002 demostraron la importancia de las fosfolipasas en la virulencia. Ellos inactivaron de manera individual y en conjunto los ORF's de las fosfolipasas y analizaron la virulencia en un modelo murino. Los resultados mostraron que en los mutantes triples o cuádruples estaba disminuida su capacidad para multiplicarse en los pulmones y vaso de los animales infectados, sugiriendo su importancia para la supervivencia de *M. tuberculosis* en los tejidos. Se ha observado en humanos que a mayor presencia de deleciones genéticas en un aislamiento clínico de *M. tuberculosis* es menor la enfermedad cavitaria (Kato Maeda *et al.*, 2001). En este estudio, algunos de los genes ausentes incluyeron los genes de fosfolipasa. La deleción de fragmentos de ADN en los aislamientos clínicos de

M. tuberculosis se ha reportado previamente, con varios de ellos asociados a elementos de transposición IS6110 (Fleischmann *et al.*, 2002; Tsolaki *et al.*, 2004; Kato Maeda *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2000). En este trabajo se observó en todos los casos la inserción de IS6110 en la región PLC en los aislamientos $\Delta plcA-plcB-plcC$. Como se hipotetizó previamente (Vera-Cabrera *et al.*, 2001), es probable que las deleciones sean producidas por un mecanismo de recombinación homóloga ya que en ningún caso se asociaron repetidos invertidos al mecanismo de transposición. En el aislamiento DR-689, los tres genes estaban completamente ausentes y en el resto de los aislamientos se observó una copia incompleta de *plcC*. En los aislamientos RIVM 97-488 y RIVM 97-1389 se observó la presencia de secuencias de ADN similares a MT2421 y Mt2420 de *M. tuberculosis* CDC1551. MT2420 muestra homología con las proteínas de la familia ESAT-6 y MT2421 es idéntica en un 95 % a la familia de proteínas QILSS (Betts *et al.*, 200). Ambos genes están ausentes en H37Rv y su presencia varía en otros aislamientos clínicos (Fleischmann *et al.*, 2002). MT2420 y MT2421 tienen muchos genes ortólogos en *M. tuberculosis* H37Rv (Rv2436, Rv2437), *M. tuberculosis* CDC1551 (MT1066, MT1067, MT2411, MT2412, MT1841, MT1842), *M. bovis* (Mb1067, Mb1066) y *M. leprae* (Ml1181). Más que inserciones, la presencia de estas secuencias parece representar variación en arreglos genéticos entre los aislamientos de *M. tuberculosis* como se ha reportado anteriormente (Fleischmann *et al.*, 2002). Aunque se ha conjeturado que la transposición de elementos IS6110 ocurre al azar, existen varios sitios preferenciales, entre ellos los genes de fosfolipasa (Vera-Cabrera *et al.*, 2001). Estas secuencias parecen atraer los elementos IS6110 y cuando dos de ellos se encuentran cercanos entre sí, puede ocurrir una recombinación homóloga, como se ha visto en los aislamientos estudiados. El mecanismo de atracción es desconocido, aunque

probablemente estén implicadas secuencias repetitivas o palindrómicas. Otras secuencias repetitivas tal como las que codifican para proteínas PE y PPE, se han asociado también a deleciones en el genoma de *M. tuberculosis* (Tsolaki *et al.*, 2004), lo cual refuerza esta hipótesis. El papel de la transposición de IS6110 en la organización del genoma de *M. tuberculosis* es todavía materia de estudio, aunque esto podría ser importante ya que parece afectar los genes adyacentes (Safi *et al.*, 2004).

Tsolaki *et al* en el 2004 reportaron el análisis por hibridación con microarreglos de 100 cepas de aislamientos de *M. tuberculosis* del área de San Francisco y observaron patrones de deleción comunes, a los que llamaron regiones de diferencia (RD). Comparando los patrones de deleción presentados por las cepas de este estudio, se observaron patrones de deleción similares. Un grupo de cepas, las cuales presentaron la mayoría de las deleciones incluyendo RD's 105, 149, 150, 152, 181 y 207, fueron muy similares en el patrón de RFLP para IS6110 de una de las cepas analizadas en este trabajo (DR-689). La única característica en común fue que todas ellas correspondían a la familia Beijing. La familia Beijing es un grupo de cepas ampliamente diseminado que es muy dominante en Asia y otras partes del mundo (van Soolingen *et al.*, 1995). Estas cepas comparten patrones de RFLP-IS6110 similares con múltiples bandas así como un patrón de Spoligotyping idéntico (Kremer *et al.*, 2004). DR-689 comparte un patrón de RFLP casi idéntico con los aislamientos de San Francisco teniendo todas estas deleciones, aunque éstas no están relacionadas epidemiológicamente. Es posible que estas cepas tengan un ancestro en común que ya presentaba este patrón de deleciones y que fueron adquiridas y transmitidas hace mucho tiempo. Estas cepas representan un grupo muy bien adaptado de bacterias pues son muy dominantes en ciertas áreas (hasta 85 % en el área de Beijing), y los aislamientos con todas estas deleciones pueden

representar a los más adaptados de todos los grupos filogenéticos que circulan en el mundo.

8.2. Ensayo de Microarreglos.

El género *Mycobacterium* es uno de los que se han obtenido más secuencias completas de los genomas de sus especies (Cole *et al.*, 1998). La comparación de estos genomas ha resultado un medio muy útil y un inicio para elucidar los mecanismos involucrados en la virulencia y realizar el análisis de la evolución de *M. tuberculosis* y otras especies del género (Behr *et al.*, 1999; Brosch *et al.*, 2000; Fleischmann *et al.*, 2002; Kato Maeda *et al.*, 2001; Mahairas *et al.*, 1996; Brenan *et al.*, 1996; Vera-Cabrera *et al.*, 2007). Una de las tecnologías genómicas recientemente desarrollada son los microarreglos (Lashkari *et al.*, 1997). El microarreglo constituye un arreglo de secuencias de fragmentos de ADN inmovilizadas y bien ordenadas que están adheridas a una superficie sólida generalmente de cristal. Cada secuencia corresponde a un gene diferente. Los microarreglos han sido usados para el análisis de la expresión génica al comparar el ARNm producido para múltiples genes por un organismo en diferentes condiciones, así como para comparar la presencia o ausencia de genes entre dos diferentes cepas de un organismo. En este último caso, generalmente se tiene la secuencia completa de una de las cepas. (Butcher, 2004). La tecnología de los microarreglos es altamente confiable y existen varios formatos para el genoma de *M. tuberculosis* incluyendo conjuntos de oligonucleótidos comerciales para que el cliente realice sus propios microarreglos (Operon/Qiagen) y varios microarreglos caseros (Butcher, 2004). Salamon *et al* en el 2000 fueron los primeros en presentar una nueva

aplicación de un microarreglo (Affymetrix GeneChip) para efectuar una búsqueda extensa de polimorfismos de delección en el genoma de cepas de *M. tuberculosis*.

En este trabajo se llevó a cabo una comparación de genomas de cepas de *M. tuberculosis* sometidas a pasaje serial y su contraparte parental, utilizando un sistema de microarreglos. El análisis de microarreglos reveló algunas diferencias en la presencia o ausencia de genes entre las cepas parentales y aquellas sometidas a pasaje serial que suponían grandes deleciones generadas por efecto del subcultivo. Dado que el análisis de las cepas parentales fue realizado en un laboratorio distinto a donde se realizó el análisis de las cepas sometidas a subcultivo, fue necesario comprobar mediante reacciones de PCR la presencia o ausencia de los genes discordantes utilizando iniciadores específicos para cada gen. Esta discordancia pudo ser debida a las distintas condiciones de hibridación utilizadas en ambos laboratorios. En el ensayo de PCR se encontró que no había diferencia entre las cepas parentales y aquellas sometidas a pasaje serial, es decir que el subcultivo aparentemente no generó ninguna delección genética importante que involucrara los genes de *M. tuberculosis* H37Rv. La reacción de hibridación en los microarreglos que se utilizaron en este trabajo, se llevó a cabo entre el ADN de la muestra y una molécula de oligonucleótidos inmovilizado sobre la superficie del microarreglo. Estos arreglos contienen 25-80 oligonucleótidos y esto constituye una desventaja porque puede existir una delección en otra parte del gen que no está representada en el microarreglo, por lo que en nuestro estudio no fue posible determinar la presencia de otras deleciones distintas a las que estaban incluidas en el microarreglo.

8.3. RFLP y Sspoligotyping

Dentro del genoma de *M. tuberculosis* se han descrito varios elementos genéticos móviles o genes “saltarines” conocidos como secuencias de inserción (Gordon *et al.*, 1999). Estos elementos son capaces de moverse de un lado a otro en el cromosoma por un proceso llamado transposición y su dinámica natural ha sido implicada en las características fenotípicas de varias bacterias patógenas (Parkhill *et al.*, 2003; Brugger *et al.*, 2004). Debido a la cantidad y polimorfismo de posición dentro del genoma de *M. tuberculosis*, las secuencias de inserción (IS) 6110 han sido utilizadas ampliamente como marcadores genotípicos en estudios epidemiológicos (McEvoy *et al.*, 2007). Sin embargo, además de su invaluable papel en la epidemiología molecular no solo es un elemento genético pasivo y debido a su movilidad, es capaz de insertarse en la secuencia de uno o varios genes y alterar o evitar su expresión y de ese modo contribuir a una diversidad fenotípica entre distintas cepas de *M. tuberculosis* (McEvoy *et al.*, 2007). En

base a esta última hipótesis, en este trabajo se decidió analizar el efecto del pasaje serial de cepas de *M. tuberculosis* con deleciones en el locus PLC sobre el patrón de RFLP para IS6110. El análisis de RFLP para IS6110 de las cepas parentales y las cepas sometidas a pasaje en el medio M7H9 con y sin bilis reveló que 5 de las cepas estudiadas permanecieron sin cambio en sus patrones de bandas para IS6110. Sin embargo, en la cepa DR-689 (Beijing) subcultivada en el medio con bilis, se produjo un cambio que involucró el elemento transponible IS6110. El cambio generado en esta cepa fue el cambio de posición en el patrón de hibridación de IS6110 de ~1,400 pb a ~1,600 pb.

Previamente se había asumido que la tasa de transposición era constante entre cepas (McEvoy *et al.*, 2007). Un análisis para determinar si el pasaje serial *in vitro* de cepas de

M. tuberculosis producía cambios en el patrón de RFLP mostró que no se produjeron cambios después de aproximadamente 25 pases (van Soolingen *et al.*, 1991). Diferentes cepas de *M. tuberculosis* han mostrado variación en las tasas de transposición (de Boer *et al.*, 1991; Niemann *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 2002a,b) cuando se analizan aislamientos seriados de las cepas obtenidas de pacientes por lo que éste es el primer reporte de un evento de transposición generado *in vitro*. Una característica a resaltar en el aislamiento en el cual se generó el cambio, es el elevado número de copias de la secuencia de inserción. Los estudios en torno a la tasa de transposición dependiendo del número de copias de IS6110 en un aislamiento, sugieren que las cepas con un número de copias más alto tienen una tasa de evolución más alta y una ventaja potencialmente selectiva que las cepas con un bajo número de copias (Wall *et al.*, 1999). El resultado obtenido en este estudio para la cepa DR-689 avala esta hipótesis; coincidentemente esta es una cepa Beijing, esta cepa es dominante en el este y sureste de Asia así como en Euroasia norte y se ha diseminado rápidamente a otras partes del mundo donde también ha incrementado su incidencia (Bifani *et al.*, 2002). De esta forma el gran éxito en la adaptación de estas cepas con alto número de copias puede estar directamente relacionado al número de copias de IS6110. Esto sin embargo pasa por alto el hecho de que cepas con un bajo número de copias pueden causar brotes y desarrollo de algunos rasgos como drogoresistencia (Valway *et al.*, 1998; Victor *et al.*, 2007) y que otros miembros del complejo, como *M. bovis*, que generalmente contiene solo un elemento IS6110, todavía causa infección y se transmite de manera eficiente. Estos hallazgos son sugestivos de distintos mecanismos de evolución adaptativa exitosa (McEvoy *et al.*, 2007).

La variación en el número de copias parece ser debido en gran parte a la naturaleza de la región genómica donde el elemento se inserta (Wall *et al.*, 1999). Cuando reside en una región genética con transcripción silenciosa, IS6110 es inactivo y raramente sufre transposición. Sin embargo, cuando se inserta en una región del genoma transcripcionalmente activa, la tasa de transposición se aumenta considerablemente, debido muy probablemente al incremento en la expresión de la transposasa, enzima codificada en la secuencia del elemento IS6110 (Wall *et al.*, 1999). Este hallazgo sugiere que un simple evento de transposición (como el que observamos en nuestra investigación) puede generar un repentino estallido de actividad transposicional si el elemento es incorporado a un sitio activo de transcripción (Wall *et al.*, 1999). La localización exacta de la banda de IS6110 que se movió en la cepa DR689 no fue determinada y por lo tanto no conocemos el sitio de inserción. Las consecuencias de este evento de transposición pueden ser muy variadas. Dependiendo de la posición de la integración, un evento transposicional puede resultar en amplio rango de alteraciones fenotípicas sobre el hospedero que varían de la letalidad a la neutralidad o posibles efectos benéficos ocasionales (McEvoy *et al.*, 2007).

El hecho de que el movimiento de la banda IS6110 se haya dado en el medio conteniendo bilis y en la cepa con un mayor número de secuencias de inserción sugiere que la bilis puede ser una fuente de polimorfismo genético para este marcador.

Por otro lado también analizamos el efecto que podría tener el pasaje serial de cepas de *M. tuberculosis* en el polimorfismo de ADN presente en un locus cromosomal particular, la región del “Repetido Directo” (DR). El estudio de esta región también se ha hecho con fines epidemiológicos (Hermans *et al.*, 1992). El método para analizar el locus DR se conoce como Spoligotyping. El análisis de las cepas parentales y de sus

similares sometidas a subcultivo en M7H9 con y sin bilis no mostró algún cambio en el patrón de Spoligotyping, demostrando así la estabilidad de la región DR del cromosoma de las cepas analizadas aquí.

8.4. Ensayo de Citotoxicidad en Macrófagos.

Los macrófagos son la primera línea de defensa del hospedero contra los microbios. Los macrófagos son críticos tanto para la supervivencia de *M. tuberculosis* como para vincular la inmunidad innata y adaptativa del hospedero (Flynn y Chan, 2003). Ellos promueven la activación y reclutamiento de células T que son cruciales para contener a la micobacteria dentro de los granulomas en el pulmón. Las micobacterias virulentas pueden replicarse dentro del ambiente hostil de los macrófagos, secuestrados en los fagosomas pobremente acidificados que fracasan en la fusión con los lisosomas (Brown *et al.*, 1969; Mwandumba *et al.*, 2004; Russel, 2001). *M. tuberculosis* puede evadir la función bactericida inhibiendo la señalización mediada por IFN- γ (Flynn, 2004). Se ha reportado que *M. tuberculosis* interfiere con la presentación de antígenos, múltiples vías de señalización y respuesta transcripcional dentro del macrófago (Flynn y Chan, 2003).

La virulencia de cepas de tuberculosis ha sido tradicionalmente evaluada en términos de la capacidad de los organismos de replicarse dentro de órganos específicos de ratones y cobayos siguiendo la infección con aerosoles. También los modelos de monocitos y macrófagos humanos han sido utilizados para evaluar la virulencia de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (Laochumroonvorapong y Kaplan, 1996; Zhang *et al.*, 1998, 1999; Riendeau y Kornfel, 2003; Theus *et al.*, 2004, 2006). Para determinar si el pasaje serial tenía un efecto sobre la capacidad citotóxica producida por *M. tuberculosis*, en este trabajo se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad en macrófagos derivados de la

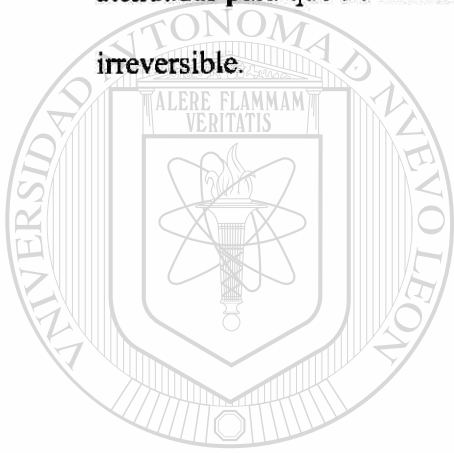
línea celular de monocitos THP-1 infectados con las cepas parentales y las sometidas a subcultivo en el medio de cultivo con y sin bilis. En tres de las cepas estudiadas sometidas a subcultivo se observó una disminución en la citotoxicidad sobre la línea celular TH-P 1 con respecto a sus contrapartes parentales que siguen conservando un efecto citotóxico mayor a 85 % al día 7 post-infección. Estos resultados corroboran que las cepas utilizadas tienen la capacidad de producir efecto citotóxico al día 7 post-infección aunque tienen una delección en el locus PLC y que siguen conservando los genes necesarios para su supervivencia en los macrófagos. Los resultados de la disminución en la capacidad citotóxica de las cepas sometidas a pasaje serial no representan necesariamente una atenuación de su virulencia. Probablemente este efecto fue debido a la adaptación de las bacterias a un medio diferente al hospedero en donde las bacterias dejan de expresar los genes necesarios para su crecimiento en macrófagos, aunque siguen conservando los genes constitutivos necesario para su supervivencia *in vitro*. Una estrategia para comprobar lo anterior es re-introducir la bacteria en un modelo de infección *in vivo* o a macrófagos tal como lo realizado por McDonough *et al* en el 2000. Ellos realizaron un pasaje intracelular de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv dentro de macrófagos y esto afectó el tránsito del bacilo virulento en la re-infección de otros macrófagos de una manera suero-dependiente. Es posible que la disminución en la virulencia de esta cepa sobre la monocapa de macrófagos haya sido derivada del efecto que tuvo el cambio de la secuencia de inserción aunque las demás cepas estudiadas mostraron el mismo efecto.

Una mayor caracterización de estas cepas es necesaria para determinar si la disminución en la capacidad de citotoxicidad sobre la monocapa de macrófagos no fue

solamente debida a un cambio en la expresión de ciertos factores producido por la adaptación de las micobacterias al cultivo *in vitro*.

La atenuación de microorganismo por pasajes *in vitro* ha sido reportada por varios autores. La mayoría de las vacunas virales utilizadas en animales y humanos han sido derivadas de esta forma (Jennings y Potter, 1999). El pasaje de *Entamoeba histolytica* en cultivos axenicos a largo plazo disminuyó algunas actividades relacionadas a la virulencia (González-Garza *et al.*, 2000). El cultivo prolongado *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* produjo sub-líneas con una baja infectividad para mamíferos (Basombrio *et al.*, 2000). En bacterias *Staphylococcus aureus*, donde el pasaje serial provocó cambios en la fisiología, producción de factores de virulencias y mutaciones dentro del operón agr (Somerville *et al.*, 2000). En *Borrelia anserina* (Sakharoff) que fue pasada 39 veces en un medio de cultivo líquido perdió su capacidad de infección en un modelo de pollos (Levine *et al.*, 1990). Pero el caso más representativo de la atenuación por pasaje serial es la obtención de la vacuna que se utiliza contra la tuberculosis: la cepa *M. bovis* BCG a partir de *M. bovis*. Sin embargo, debido al requerimiento para pasaje continuo de cepas derivadas, para cuando los stock liofilizados fueron preparados en 1960, diferentes cepa hijas habían sufrido hasta 1000 pases adicionales. El más reciente estudio sobre las diferentes vacunas circulando en el mundo concluye que las vacunas iniciales han sido las más efectivas para la protección contra la TB. Debido a la variable eficacia protectora de BCG contra la tuberculosis en adultos, que va de 0 a 90 % (Clemens *et al.*, 1983), se han hecho numerosos esfuerzos para desarrollar nueva vacunas con mejor efecto protector. Ya que una variedad de genes son necesarios para la virulencia *in vitro*, las cepas que carezcan de estos genes pueden ser posibles candidatos como vacunas. Por lo anterior nosotros hipotetizamos que las cepas de *M. tuberculosis* analizadas en este

trabajo y que disminuyeron su virulencia después de ser sometidas a pasaje serial pueden en un futuro ser utilizadas como vacuna, ya que a diferencia de *M. bovis* BCG pueden seguir conservando los antígenos de *M. tuberculosis* los cuales serían más especie-específicos y pueden proporcionar un mejor respuesta inmune protectora que BCG. Aunque también se considera que la obtención de una cepa atenuada de *M. tuberculosis* debe ser un proceso racional. Se requerirá que las cepas estén lo suficientemente atenuadas para que no induzcan efectos patológicos y que la pérdida de la virulencia sea irreversible.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

9. CONCLUSIONES

- 1 En la cepa DR-689 (Beijing) subcultivada en el medio con bilis se produjeron cambios genéticos que involucraron el elemento transponible IS6110.
- 2 El análisis de microarreglos reveló que a parte de las deleciones ya reportadas para estas cepas, no se produjeron nuevas deleciones importantes que involucraran los genes de *M. tuberculosis* H37Rv.
- 3 El subcultivo continuo produjo cambios en la citotoxicidad de *M. tuberculosis* sobre la monocapa de macrófagos THP-1. La adaptación de *M. tuberculosis* al crecimiento en medios artificiales induce al microorganismo a modificar la expresión de genes que no son esenciales para su supervivencia *in vitro*, cambiando algunas de sus propiedades biológicas y su virulencia.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

10. PERSPECTIVAS

☛ El pasaje serial de las cepas de *M. tuberculosis* tiene que continuarse para observar posteriores cambios.

☛ Para determinar si el subcultivo produjo cambios pequeños como mutaciones puntuales, SNP's, duplicaciones, etc, la alternativa es un análisis del transcriptoma o la secuenciación completa de los genomas.

☛ La relevancia de la evolución de *M. tuberculosis in vitro* no está clara, por lo que la continuación del pasaje serial y posteriores estudios de expresión de genes y estudios de virulencia serán de importancia para el entendimiento de la biología de este microorganismo.

12. LITERATURA CITADA

Aranaz A, Romero B, Montero N, Alvarez J, Bezos J, de Juan L, Mateos A, Dominguez L. 2004. Spoligotyping profile change caused by deletion of a direct variable repeat in a *Mycobacterium tuberculosis* isogenic laboratory strain. *J Clin Microbiol.* 42:5388-91

Armstrong, JA, Hart PD. 1971. Response of cultured macrophages to *M. tuberculosis* with observations of fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 134: 713–740.

Basombrio MA, Segura MA, Gomez L, Padilla M. 2000. Studies on the virulence and attenuation of *Trypanosoma cruzi* using immunodeficient animals. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95 Suppl 1:175-8.

Behr, MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small P. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284:1520-1523.

Bernstein H, Payne CM, Bernstein C, Schneider J, Beard SE, Crowley CL. 1999. Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein misfolding by the bile salt, deoxycholate. *Toxicol Lett.* 108(1):37-46.

Betts JC, Dodson P, Quan S, et al. 2000. Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. *Microbiology.* 12:3205–16.

Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. 2002. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.* 10:45–52.

Brennan WR, Curlin G, Ginsberg A, Adams M, Fleischmann R, Fraser C, Venter JC, Shinnick T, Bishai W, Smith H, Stover K, and Hatfull G. 1996. Comparative sequencing. *Science* 274:17–18.

Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5596-601.

Brosch R., Gordon SV, Eiglemer K, Garnier T, Tekaia F, Yeramian E, Cole ST. 2000. Genomics, Biology, and Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In *Molecular Genetics of Mycobacteria*. Edited by Hatfull G. F., W. R. Jacobs Jr. ASM Press. pp. 19-36

Brosch R., Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:3684–3689.

Brosch R., Philipp WJ, Stavropoulos E, Colston MJ, Cole ST, Gordon SV. 1999. Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the attenuated *M. tuberculosis* H37Ra strain. *Infect. Immun.* 67:5768-5774.

Brown CA, Draper P, Hart PD. 1969. Mycobacteria and Lysosomes: a Paradox. *Nature* 221:658–660.

Brugger K, Torarinsson E, Redder P, Chen L, Garrett RA. 2004. Shuffling of *Sulfolobus* genomes by autonomous and non-autonomous mobile elements. *Biochem Soc Trans.* 32:179–83.

Butcher PD. 2004. Microarrays for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 84:131-7. Review.

Calmette A., Guerin C. 1909. Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux d'origine, cultivé sur la bile de boeuf glycinée. *C. R. Acad. Sci.* 149:716-718

Castro-Garza J, Barrios-García HB, Cruz-Vega DE, Said-Fernández S, Carranza-Rosales P, Molina-Torres CA, Vera-Cabrera L. 2007. Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Med Microbiol* 56: 733-737.

Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT. 1991. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol. Cell. Probes* 5:73-80.

Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* 59:1755-1761.

Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* 175:1111-1122.

Clemens DL, Horwitz MA. 1995. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J. Exp. Med.* 181:257-270.

Clemens JD, Jackie JH, Chuong JH, Feinstein AR. 1983. The BCG controversy: a methodological and statistical reappraisal. *JAMA* 249:2362.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393:537-44.

Collins DM, Kwakami RP, de Lisle GW, Pascopella L, Bloom BR, Jacobs Jr WR. 1995. Mutation of the principal σ factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:8036-8040.

de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, Nagelkerke NJ, van Embden JD, van Soolingen D. 1999. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J Infect Dis.* 180:1238-44.

Douglas JT, Qian L, Montoya CJ, Musser JM, Van Embden JDA, Van Soolingen D, Kremer K. 2003. Characterization of the Manila Family of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin. Microbiol.* 41:2723-2726.

Dussurget O, Stewart G, Neyrolles O, Pescher P, Young D, Marchal GR. 2001. Role of *Mycobacterium tuberculosis* copper-zinc superoxide dismutase. *Infect Immun.* 69:529-33.

Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. 1999 Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA*. 282: 677-86.

Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Mehran Hosseini S, Raviglione MC. 2005. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA*. 293: 2767-75.

Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D, Hickey E, Kolonay JF, Nelson WC, Umayam LA, Ermolaeva M, Salzberg SL, Delcher A, Utterback T, Weidman J, Khouri H, Gill J, Mikula A, Bishai W, Jacobs Jr WR Jr, Venter JC, Fraser CM. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol*. 184: 5479-90.

Flynn JL, Chan J. 2003. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr. Opin. Immunol*. 15: 450-455.

Flynn JL. 2004. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis* 84: 93-101.

Gillies RG, Didier N, Denton M. 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem*. 159:109-113.

Gonzalez-Garza MT, Castro-Garza J, Cruz-Vega DE, Vargas-Villarreal J, Carranza-Rosales P, Mata-Cardenas BD, Siller-Campos L, Said-Fernandez S. 2000. *Entamoeba histolytica*: diminution of erythrophagocytosis, phospholipase A(2), and hemolytic activities is related to virulence impairment in long-term axenic cultures. *Exp Parasitol*. 96(2):116-9.

Gordon SV, Heym B, Parkhill J, Barrell B, Cole ST. 1999. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*. 145:881-92.

Hermans PWM, van Soolingen D, van Embden JDA. 1992. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J. Bacteriol*. 174:4157-4165.

Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, Schuitema ARJ, McAdam RA, Catty D, van Embden JDA. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol*. 28:2051-2058.

Hernández-Vera M.A, Barrios García HB, Castro-Garza J, Vargas-Villareal J, Said-Fernández S, Welsh O, Vera Cabrera L. 2002. The phospholipase genes are essential for macrophage infection. In press.

Ho TB, Robertson BD, Taylor GM, Shaw RJ, Young DB. 2000. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* genomes reveals frequent deletions in a 20 kb variable region in clinical isolates. *Yeast*.17:272–82.

Hopewell PR. 1994. Overview of clinical tuberculosis. In Bloom BR Ed. Tuberculosis pathogenesis, protection and control. Washington D.C.: ASM Press. 25.

Hu Y, Butcher PD, Mangan JA, Rajandream MA, Coates AR. 1999. Regulation of *hmp* gene transcription in *Mycobacterium tuberculosis*: effects of oxygen limitation and nitrosative and oxidative stress. *J. Bacteriol.* 181:3486-3493

Jennings R, Potter W. 1999. Virus vaccines en: Virus culture: a practical approach. Alan Cann. Oxford University Press, pp. 156-160

Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, Salamon H, Drenkow J, Smittipat N, Small P. 2001. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* 11:547-554

Kivi M, Liu X, Raychaudhuri S, Altman RB, Small PM. 2002. Determining the genomic locations of repetitive DNA sequences with a whole-genome microarray: IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 40:2192–8.

Koch R. 1882. Die aetiologie der tuberculose. *Berliner Klin Wochenschr.* 19:221.

Kremer K, Glynn JR, Lillebaek T, Niemann S, Kurepina NE, Kreiswirth BN, Bifani PJ, van Soolingen D. 2004. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J Clin Microbiol.* 42:4040–9.

Lashkari DA, McCusker JH, Davis RW. 1997. Whole genome analysis: experimental access to all genome sequenced segments through larger-scale efficient oligonucleotide synthesis and PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:8945-7.

Legrand E, Filliol I, Sola C, Rastogi N. 2001. Use of spoligotyping to study the evolution of the direct repeat locus by IS6110 transposition in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 39:1595-1599.

Levine JF, Dykstra MJ, Nicholson WL, Walker RL, Massey G, Barnes HJ. 1990. Attenuation of *Borrelia anserina* by serial passage in liquid medium. Res Vet Sci. 48:64-9.

Mahairas GG, Sabo PJ, HickeyMJ, Singh DC, Stover CK. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. J. Bacteriol. 178:1274-1282.

McDonough KA, Florczyk MA, Kress Y. 2000. Intracellular passage within macrophages affects the trafficking of virulent tubercle bacilli upon reinfection of other macrophages in a serum-dependent manner. Tuber Lung Dis. 80:259-71.

McEvoy CR, Falmer AA, van Pittius NC, Victor TC, van Helden PD, Warren RM. 2007. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb). 87:393-404.

Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. 1999. *Mycobacterium*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington: ASM Press; p.p. 399-437

Mwandumba HC, Russell DG, Nyirenda MH, Anderson J, White SA, Molyneux ME, Squire SB. 2004. J. Immunol. 172, 4592-4598.

Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. 1999. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. J Clin Microbiol. 37:409-12.

Organización Mundial de la Salud. Hoja de datos No. 104. Disponible en sitio de red: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> [Revisada el 28 de Marzo 2007]

Organización Mundial de la Salud. Atlas Global de la Tuberculosis en la Región de las Américas. Disponible en sitio de red: (<http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/default.asp>) [Revisada el 15 de Agosto de 2007]

Palomino J, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. www.TuberculosisTextbook.com, First Edition.

Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, *et al.* 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 35:32–40.

Paul S, Laochumroonvorapong P, Kaplan G. 1996. Comparable growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 174:105–112.

Prieto AI, Ramos-Morales F, Casadesús J. 2004. Bile-induced DNA damage in *Salmonella enterica*. *Genetics.* 168:1787-94.

Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, Manganelli R, Smith I, Gicquel B, Jackson M. 2002. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 45:203-217.

Riendeau CJ, Kornfeld H. 2003. THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection. *Infect. Immun.* 71:254-259.

Rindi L, Lari N, Garzelli C. 2001. Genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv downregulated in the attenuated strain H37Ra are restricted to *M. tuberculosis* complex species. *New Microbiol.* 24:289–94.

Ruan J, St John G, Ehrt S, Riley L, Nathan C. 1999. *noxR3*, a novel gene from *Mycobacterium tuberculosis*, protects *Salmonella typhimurium* from nitrosative and oxidative stress. *Infect Immun.* 67:3276-83.

Russell DG. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 569–577.

Safi H, Barnes PF, Lakey DL, *et al.* 2004. IS6110 functions as a mobile, monocyte-activated promoter in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 52:999–1012.

Salamon H, Kato-Maeda M, Small PM, Drenkow J, Gingeras TR. 2000. Detection of deleted genomic DNA using a semiautomated computational analysis of GeneChip data. *Genome Res.* 10:2044-54.

Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Información en Salud. Datos de Morbilidad en México. Disponible en sitio de red: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>, [Revisado el 15 de Agosto de 2007]

Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE 3rd, Stover CK. 1996. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 272:1641-3

Singh R, Singh A, Tyagi AK. 2005. Deciphering the genes involved in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 85:325-35.

Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*. 16:463-96. Review.

Smith I. What is the health, social, and economic burden of tuberculosis. p. 233-7, In: Frieden T. (ed). *Toman's tuberculosis case detection, treatment, and monitoring: questions and answers*. 2nd ed. Geneva, WHO, 2004. WHO/HTM/TB/2004.334.

Somerville GA, Beres SB, Fitzgerald JR, DeLeo FR, Cole RL, Hoff JS, Musser JM. 2002. *In vitro* serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and agr nucleotide sequence. *J Bacteriol*. 184:1430-7.

Songer JG. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol*. 5:156.

Theus SA, Cave MD, Eisenach KD, Walrath J, Lee H, Mackay W, Whalen C, Silver FC. 2006. Differences in the Growth of Paired Ugandan Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* within Human Mononuclear Phagocytes Correlate with Epidemiological Evidence of Strain Virulence. *Infect Immun*. 74: 6865–6876.

Theus SA, Cave MD, Eisenach KD. 2004. Activated THP-1 Cells: an Attractive Model for the Assessment of Intracellular Growth Rates of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Infect Immun*. 72:1169–1173.

Tilney LG, Portnoy AD. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 109:1597–608.

Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, Hannan M, Goguet de la Salmoniere YO, Aman K, Kato-Maeda M, Small PM. 2004. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:4865–70.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line /THP-1. *Int J Cancer*. 26:171-176.

Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF, Orme I, Agerton T, Hoy D, Jones JS, Westmoreland H, Onorato IM. 1998. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med*. 338:633-9.

van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 29:2578-86.

van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing HZ, Enkhsaikan D, Nymadawa P, van Embden JD. 1995. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol*. 33:3234-8.

Vera-Cabrera L, Molina-Torres CA, Hernandez-Vera MA, Barrios-Garcia HB, Blackwood K, Villareal-Trevino L, Ocampo-Candiani J, Welsh O, Castro-Garza J. 2007. Genetic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with deletions in the *plcA-plcB-plcC* locus. *Tuberculosis* 87:21-9.

Vera-Cabrera L, Hernández-Vera MA, Welsh O, Jonson WM, Castro-Garza J. 2001. Phospholipase Region of *Mycobacterium tuberculosis* is a preferential locus for *IS6110* transposition. *J. Clin. Microbiol*. 39:3499-3504.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Vera-Cabrera L, Howard ST, Laszlo A, Johnson WM. 1997. Analysis of genetic polymorphism in the phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*. 35:1190-1195.

Vergne I, Chua J, Deretic V. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking. *Traffic* 4:600-606.

Viana-Niero C, de Haas PE, van Soolingen D, Leao SC. 2004. Analysis of genetic polymorphisms affecting the four phospholipase C (*plc*) genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates. *Microbiology*. 150:967-78.

Victor TC, Streicher EM, Kewley C, Jordaan AM, van der Spuy GD, Bosman M, Louw H, Murray M, Young D, van Helden PD, Warren RM. 2007. Spread of an emerging *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistant strain in the western Cape of South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* 11:195–201.

Wall S, Ghanekar K, McFadden J, Dale JW. 1999. Context-sensitive transposition of *IS6110* in mycobacteria. *Microbiology.* 145:3169–76.

Wards BJ, de Lisle GW, Collins DM. 2000. An *esat6* knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. *Tubercle Lung Dis.* 80:185-189.

Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, Beyers N, Borgdorff MW, Behr MA, van Helden PD. 2002. Evolution of the *IS6110*-based restriction fragment length polymorphism pattern during the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 40:1277-82.

Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, Beyers N, Booyesen C, Behr MA, van Helden PD. 2002. Calculation of the stability of the *IS6110* banding pattern in patients with persistent *Mycobacterium tuberculosis* disease. *J Clin Microbiol.* 40:1705–8.

Williamson ED, Titball RW. 1993. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine.* 11:1253–8.

Wilson K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria, *In* Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman IG, Smith JA, Struhl K. Ed. *Current protocols in molecular biology*, Vol.1. New York, N.Y.: Wiley Interscience, 19: 2.4.1.

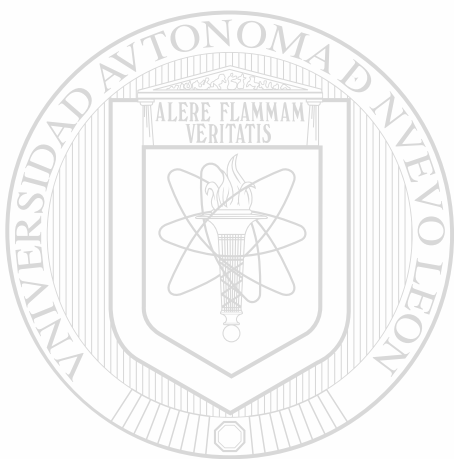
Wilson TM, de Lisle GW, Collins DM. 1995. Effect of *inhA* and *katG* on isoniazide resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Mol. Microbiol.* 15: 1009-1015.

Yeh RW, Ponce DL, Agasino CB, Hahn JA, Daley CL, Hopewell PC, Small PM. 1998. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J Infect Dis.* 177:1107–11.

Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR, Barry CE. 1998. The 16-kDa alpha-crystallin (*acr*) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:9578-9583.

Zhang M, Gong J, Lin Y, Barnes P. 1998. Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. *Infect. Immun.* 66:794–799.

Zhang M, Gong J, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. 1999. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J. Infect. Dis.* 179:1213–1217.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN CURRICULAR

Carmen Amelia Molina Torres

Candidato para el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología

Tesis: ANALISIS GENETICO Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* SOMETIDAS A SUBCULTIVO.

Campo de Estudio: Microbiología y Tuberculosis

Datos Personales: Nacida el 5 de Enero de 1975 en la ciudad de Monterrey N.L., hija de Ma. del Carmen Torres y Juan Antonio Molina Rocha.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Químicas con el grado de Químico Farmacéutico Biólogo en 1995, graduada por promedio con Título Honorífico. Egresada de la Facultad de Medicina en 2003 con el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología con Mención Honorífica.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Experiencia profesional: Maestro por horas de Farmacología y Química General en el CONALEP Dr. Arroyo de 1998 a 1999. Maestro por horas de Química Orgánica y Química Inorgánica I y II en la Preparatoria # 10 de la UANL de 1998 a 1999. Responsable del Laboratorio de Micobacterias del CIPTIR del Hospital Universitario José E. González de 2004 a 2006. Químico en el Laboratorio del Hospital Genera Dr. Arroyo de 1996 a la fecha.

Publicaciones en revistas indexadas: 6.



Genetic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with deletions in the *plcA–plcB–plcC* locus

Lucio Vera-Cabrera^{a,*}, Carmen A. Molina-Torres^a, Marco A. Hernández-Vera^a, Hugo B. Barrios-García^{b,d}, Kym Blackwood^c, Licet Villareal-Treviño^d, Jorge Ocampo-Candiani^a, Oliverio Welsh^a, Jorge Castro-Garza^b

^aServicio de Dermatología, Hospital Universitario “José E. González”, Madero y González, Col. Mitras Centro, Monterrey, N.L., México

^bDivisión de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Monterrey, N.L., México

^cNational Microbiology Laboratory, Health Canada Canadian Science Centre for Human and Animal Health, Winnipeg, Canada

^dFacultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., San Nicolás de los Garza, N.L., México

Received 24 June 2005; received in revised form 21 January 2006; accepted 31 January 2006

KEYWORDS

Mycobacterium tuberculosis;
Genomic deletions;
Phospholipases C

Summary

Setting: The basis for *Mycobacterium tuberculosis* virulence is not completely understood. Analysis of the genomic structure of clinical isolates will give information that can be related to biological activities involved in virulence.

Objective: To determine the extension of the deletion in the *plcA–plcB–plcC* locus of selected *M. tuberculosis* isolates, as well as other changes in the chromosome.

Design: In the present work we characterized a group of *M. tuberculosis* isolates devoid of the *plcA–plcB–plcC* locus by PCR, sequencing and microarrays.

Results: PCR amplification of this region demonstrated a complete lack of *plcA* and *plcB* ORF's in all of the isolates. The *plcC* gene was completely deleted in one of the strains (DR-689) and the other three isolates still conserved part of this ORF. The loss of lateral DNA sequences ranged from 3723 to 7646 bp. An IS6110 element was present in all tested strains cases, and some isolates presented the insertion of ORF's coding for proteins homologous to the ESAT-6 and QILSS families. Genomic DNA of all the strains was extracted and analyzed with an in-house microarray system to observe loss of other genes possibly implicated in attenuated virulence. Two of the strains presented novel deletions; the rest of the isolates showed deletions already reported for other *M. tuberculosis* strains. DR-689, a Beijing type *M. tuberculosis*

*Corresponding author. Tel.: +011 5281 8348 0383; fax: +011 5281 8348 4407.
E-mail address: luvera_99@yahoo.com (L. Vera-Cabrera).

strain isolated in Canada, showed an IS6110 RFLP and a genomic deletion pattern similar to a San Francisco family of strains, although completely unrelated epidemiologically.

Conclusion: Genomic changes in *M. tuberculosis* seem to occur in a controlled manner and they are possibly related to changes in its pathogenic properties.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious, primary pulmonary disease, caused by *Mycobacterium tuberculosis* that remains an important public health problem worldwide with approximately eight million new cases and three million deaths per year.¹ TB is considered the most important disease caused by a single infectious agent and its control has been difficult due to both the lack of an effective vaccine and the progressive development of resistance to anti-tuberculous drugs. Although it was considered that changes in the *M. tuberculosis* genome occur very rarely,² the recent determination of the complete genomic sequence and the development of microhybridization assays have made possible the comparative analysis of the whole genome of many *M. tuberculosis* clinical isolates^{3,4} showing that large sequences of DNA can be deleted more frequently than expected. Loss of DNA fragments ranging from 189 to 10,982 bp have been reported,⁵ most of them in intergenic regions, although the interruption of non-vital genes has also been reported.⁶ *M. tuberculosis* clinical isolates vary in their ability to spread and produce clinical infection (e.g. highly transmissible isolates 210, CDC1551).^{7,8} Additionally, it has been observed that the greater the deletions in their genome, the lesser the production of cavitory disease.⁹ Comparative studies of virulent properties of these clinical isolates can shed information on the bases of pathogenicity of *M. tuberculosis*.

In the present work we determined the extension of the deletion in the PLC region of five *M. tuberculosis* clinical isolates as well as the presence of other deletions in their entire genomes.

Methods

Mycobacterial strains, culture and growth conditions

Five clinical isolates of *M. tuberculosis* with deletion of the *plcA-plcB-plcC* region were utilized in this study. *M. tuberculosis* DR-689 was previously

described¹⁰; *M. tuberculosis* 97-448, 97-1389, 97-1177 and 97-1289 which are also Δ PLC, were kindly donated by Kristin Kremer from the Diagnostic Laboratory for Infectious Diseases and Perinatal Screening, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands. These strains have been partially characterized by Viana-Nero et al.¹¹

Stock cultures of mycobacterial strains were prepared in Middlebrook 7H9 OADC at mid-logarithmic-phase growth and stored at -70°C until needed. Colony Forming Units (cfu) for each stock culture was determined in triplicate using Middlebrook 7H10 agar.

Determination of the extension of the PLC locus deletions

In order to determine if there were other ORFs deleted than the PLC genes, we utilized a long-PCR assay to map this region based on the reported genes of *M. tuberculosis* H37Rv and *M. tuberculosis* CDC1551.^{3,4} Oligonucleotides were designed using the DNA Star program (Madison, WI) and included LGB-L (5'-CCA GCC CGC GCC CGA GAT GTT-3') located at Rv2347, LGB-U (5'-GGG GTC GGG GCC GTT GTT TAT G-3') located at Rv2352, LGB-U3 (5'-GGG GGT GCT GGG GCG GGT AT-3') located at Rv2352, and LGB-UP6 (5'-ATC ACT CCG GGC AAC TTC ATC-3') located at Rv2357. Primers IS25 and IS26, located at the extremes of the IS6110¹⁰, were used for internal sequencing analysis as it is known these strains possess an IS6110 element interrupting the PLC genes (Fig. 1).

Long PCR assay

The PCR assay was carried out with 100 ng of genomic DNA in a PTC-200 thermocycler (MJ Research, Watertown, MA) by utilizing PCR assay kit XL (Perkin-Elmer) under the following conditions: 94°C for 2 min and 15 cycles of 94°C for 15 s, 65°C for 30 s, and 68°C for 4.5 min. A second round of 14 cycles was carried out at 94°C for 15 s, 65°C for 30 s, and 68°C for 4.5 min, adding 15 s every cycle. A final extension step at 72°C for 10 min was

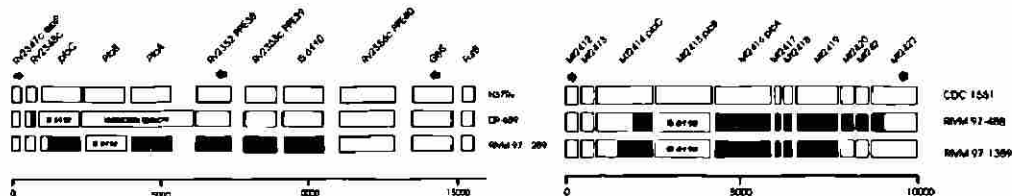


Figure 1 PLC region of *M. tuberculosis* strains H37Rv and CDC1551 and genetic changes in Δ PLC strains used in this study. Deleted regions are represented in black boxes; in gray boxes we show the presence of unexpected DNA sequences. In the left panel we present the physical map of the changes in strains DR-689 and RIVM 97-1289 compared to H37Rv, and in the right panel we present the changes in isolates RIVM 97-488 and RIVM 97-1389, which are more similar to CDC1551.

performed. The PCR products were applied to a 0.8% low-melting-point agarose gel, and after electrophoresis the gel slices containing the bands were excised and purified utilizing the GeneClean III (BIO 101, Inc., Vista, CA) kit. The DNA was quantified spectrophotometrically and stored at 4 °C. The products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

Microarray preparation

DNA microarrays were constructed with the *M. tuberculosis* ORFmer™ PCR Primer Pairs set (Sigma Genosys, The Woodlands, TX) which is based on the whole genome of *M. tuberculosis* strain H37Rv. The primer set was designed to amplify the most unique segment (≤ 500 bp) of 3876/3918 open reading frames (ORFs) known to H37Rv.¹² The remaining 42 ORFs have extensive homology, making the primers redundant. PCR reactions were prepared in 50- μ l reactions in 96-well plates as per manufacturer instructions and subsequent amplicons were evaluated by agarose gel electrophoresis to ensure they were the expected size. Only 29 (0.7%) ORFs were unable to be amplified, and were discarded from the experiment. Unpure products from the 96-well plates were transferred to 384-well plates, dried down and resuspended in a 1.5 M betaine/3X SSC solution as per Diehl et al.¹³ Amplicons were spotted in duplicate sets onto GAPS II slides (Gamma Amino Propyl Silane II, Corning Life Sciences, Fisher Scientific Canada) using VersArray ChipWriter robotic arrayer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

Sample preparation

DNA isolation was carried out by the method of van Embden et al.¹⁴ The concentration and quality of

DNA was measured with a Nanodrop (Nanodrop technologies, IL) and 2 μ g were used for labeling. Whole genomic DNA from H37Rv (control) and the test strain were used as templates for direct incorporation of fluorescent nucleotide analogs (Cy3 and Cy5 dCTP, Amersham Biosciences) by a randomly primed polymerization reaction. Labeling reactions were carried out with Bioprime kits (Invitrogen, ON) as per manufacturer's instructions and contained 2 μ g of template DNA, 20 μ l of 2.5 \times buffer/random primer mix, 5 μ l dNTPs, 2 μ l of concentrated Klenow (40 U/ μ l) and 3 μ l Cy dye. Yeast tRNAs (100 μ g) were added to the labeled DNAs and the samples were purified and concentrated with Micron YM30 filters (Millipore, ON.). The control and test strain were combined to a volume of 5 μ l to which 60 μ l DIG-Easy hyb buffer (Roche, Canada) was added. The mixture was heated at 95 °C for 5 min, cooled to 65 °C and applied to the microarray slide.

Microhybridization assays

Slides were prehybridized in DIG Easy Hyb buffer (Roche, Canada) with the addition of 0.1 mg/ml BSA for 1 h at 42 °C. The slides were washed in sterile distilled water, spun dry and used immediately for hybridization. The probe solution (65 μ l) was applied and covered with a plastic cover slip (Hybri-slips, Sigma-Aldrich, ON) cut to grid size. The slide was then placed in a waterproof Genetix hybridization chamber (Genetix USA Inc.) for hybridization overnight in a 42 °C water bath. Post-hybridization washes proceeded as follows: slides were washed briefly in 2 \times SSC+0.1% SDS that was pre-warmed to 42 °C to remove the cover slips, transferred to a fresh container with the same wash buffer, incubated with ~ 95 rpm agitation for 5 min and subsequently washed with a second wash buffer (0.1 \times SSC, 0.1% SDS) at room temperature

with ~95 rpm agitation for 10 min. Then the second wash buffer was replaced with wash buffer consisting of $0.1 \times$ SSC, incubated at room temperature for 1 min, and transferred to a $0.01 \times$ SSC wash buffer at room temperature for 15 s. Slides were then spun dry and taken for scanning.

Hybridization signal acquisition and data analysis

Microarray slides were scanned using the VersArray ChipReader laser scanner (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) with independent excitation of the Cy3 and Cy5 fluorophores. The mean signal and background hybridization intensities were calculated for each DNA spot using the Array-Pro Analyzer analysis software (Media Cybernetics, Carlsbad, CA) and the net signal intensity for each spot was calculated as the difference between the mean signal intensity and the mean background intensity. These net signal intensities were normalized using loess normalization by sub-grid. All hybridizations were repeated four times per experimental strain with half of these experimental replicates carried out as dye-reversal experiments.

To classify genes from the clinical strains as present or putatively divergent/absent, GACK analysis, which calculates a dynamic cutoff for deleted genes based on the shape of the signal-ratio distribution for each hybridization,¹⁵ was performed using 0, 50 and 100% Estimated Probability of Presence (EPP) parameters. Output was binary, from which a consensus ($\geq 6/8$ hybridizations per strain) was determined from the GACK output. Absent and present genes were visualized and clustered by strain using GeneMaths XT (Applied Maths Inc, Austin, TX,) software.

Results

Genetic characterization of the PLC locus deletion: The prefix Rv or Mt for ORFs described in the following text refers to the *M. tuberculosis* H37Rv or *M. tuberculosis* CDC1551 designation, respectively. In order to determine the extent of the deletions at the PLC locus in the studied *M. tuberculosis* strains, we amplified the nearby region using primers LGB-L, and LGB-U as shown in Fig. 1. Strain DR-689 presented an IS6110 element with the right inverted repeat inserted in nucleotide 201993 corresponding to Rv2348c, and the complete loss of the *plcA-plcB-plcC* region. Attempts to amplify the other end of the IS6110

were unsuccessful, although the neighboring ORFs Rv2352, Rv2353 and *glyS* genes were identified by PCR (see Fig. 1). *M. tuberculosis* RIVM 97-1289 presented the right inverted repeat inserted in 212117 which corresponds to an intergenic region close to PPE40 (Rv2356c). In none of the cases an inverted repeat produced by the transposition process of IS6110 was observed.

The location of the IS6110 insertions in the *plcC* gene of the rest of the strains from Kristin Kremer labs has already been published¹¹ and confirmed within our laboratory in this work; we also report the DNA sequence changes present in the other end (Fig. 1). Strain RIVM 97-488 has an IS6110 element inserted in nucleotide 2630531 of the genome sequence of *M. tuberculosis* CDC1551 of an ORF denominated MT2421. The rest of the sequence is almost identical to the gene encoding for MT2422, with exception of two stretches of 64-bp. MT2422 gene is identical in this section to Rv2352 (PPE38) of H37Rv.

The right inverted repeat of the IS6110 element in RIVM 97-1389 was located in nucleotide 2630123 (CDC1551 sequence) which corresponds to an intergenic region, followed by the complete ORFs of MT2420, MT2421 and MT2422.

Microhybridization analysis: Table 1 presents the list of putative ORFs deleted from the analyzed strains, with the exception of the *plcA-plcB-plcC* region that was described above. Most of them encode for hypothetical proteins although some genes implicated in metabolism were also deleted, e.g. *moeY*, *helZ*, etc. Upon analyzing the deleted ORFs, it was observed that many of these deleted ORFs have been associated with the insertion of IS6110 elements. Interestingly, Rv2816c, deleted from DR-689, is the insertion site for the unique IS6110 element in BCG Pasteur.¹⁶ *M. tuberculosis* CDC1551 also shares two insertion sites with DR-689, Rv1758 and Rv2816c.

Some proteins with immunological or pathogenic importance were deleted, among them ESAT-6 like proteins, *esxQ* and *esxR*, which have been observed to be highly immunogenic. *M. tuberculosis* DR-689 presented the deletion of the fragment Rv2816c-2820c, which includes Rv2819c. The latter gene encodes for a protein that is downregulated in *M. tuberculosis* H37Ra, and it was the only protein associated to possible changes in virulence in that study.¹⁷

Comparing the deletions already published by other authors with those observed in the strains studied here we found a similar pattern to those reported in 100 strains in San Francisco.⁵ However when comparing the IS6110-RFLP pattern for IS6110 of our strains with those with similar deletions

Table 1 Deleted sequences, other than in the PLC region, found in the *M. tuberculosis* isolates.

<i>M. tuberculosis</i> ISOLAT Rv no.	Gene designation	Possible function
RIVM 97-0488		
Rv1354c	Hypothetical protein	Cellular processes: signal transduction mechanisms
Rv1355c	<i>moeY</i>	Metabolism: coenzyme metabolism
Rv1356c	Hypothetical protein	—
Rv2101	<i>helZ</i>	Transcription, probable helicase
Rv2271	Hypothetical protein	—
Rv2272	Hypothetical protein	Probable transmembrane protein
Rv2273	Hypothetical protein	Probable transmembrane protein
Rv2274c	Hypothetical protein	—
Rv2275	Hypothetical protein	—
Rv2276	<i>cyp121</i>	Cytochrome P450 121 CYP121
Rv2277c	Hypothetical protein	Metabolism: energy production and conversion
Rv3017c	<i>esxQ</i>	ESAT-6 like protein
Rv3021c	PPE47	—
Rv3135	PPE50	—
Rv3324c	<i>moaC3</i>	Metabolism: coenzyme metabolism
RIVM 97-1289		
Rv0552	Hypothetical protein	—
Rv1519	Hypothetical protein	—
Rv1520	Hypothetical protein	Cellular processes: cell envelope biogenesis, outer membrane
Rv2226	Hypothetical protein	—
Rv2283	Hypothetical protein	—
Rv2284	<i>lipM</i>	Probable esterase
Rv2285	Hypothetical protein	—
Rv2286c	Hypothetical protein	—
Rv2353c	PPE39	—
Rv3017c	<i>esxQ</i>	ESAT-6 like protein
Rv3019c	<i>esxR</i>	Secreted ESAT-6 like protein
Rv3021c	PPE47	—
Rv3022c	PPE48	—
Rv3142c	Hypothetical protein	—
Rv3516	<i>echA19</i>	Metabolism: lipid metabolism
Rv3517	Hypothetical protein	—
Rv3737a (PPE)		
RIVM 97-1389		
Rv1524	Hypothetical protein	Metabolism: carbohydrate transport and metabolism
Rv1525	<i>wbb2</i>	Probable rhamnosyl transferase
Rv1526c	Hypothetical protein	Metabolism: carbohydrate transport and metabolism
Rv1731	<i>gabD1</i>	Metabolism: energy production and conversion
Rv2645	Hypothetical protein	—
Rv2646	Hypothetical protein	DNA replication, recombination and repair
Rv2652c	Hypothetical protein	—
Rv2653c	Hypothetical protein	—
Rv2655c	Hypothetical protein	—
Rv2656c	Hypothetical protein	—
Rv2657c	Hypothetical protein	—
Rv2658c	Hypothetical protein	—
Rv2659c	Hypothetical protein	DNA replication, recombination and repair

Table 1 (continued)

<i>M. tuberculosis</i> ISOLAT Rv no.	Gene designation	Possible function
Rv3017c	<i>esxQ</i>	ESAT-6 like protein
Rv3019c	<i>esxR</i>	Secreted ESAT-6 like protein
Rv3021c	PPE47	—
Rv3135	PPE50	—
Rv3651	Hypothetical protein	—
DR-689		
Rv0065	Hypothetical protein	Possible maturase
Rv0071	Hypothetical protein	Probable glutamine transport transmembrane ABC transporter
Rv0072	Hypothetical protein	Probable glutamine transport ATP binding protein ABC transporter
Rv0073	Hypothetical protein	Metabolism: Nucleotide transport and metabolism
Rv1573	Hypothetical protein	This section is RD 3 -the phRV1 phage (Rv1573-1586c)
Rv1574-Rv1584c	Hypothetical protein	
Rv1585c	Hypothetical protein	DNA replication, recombination and repair
Rv1586c	Hypothetical protein	Metabolism: carbohydrate transport and metabolism
Rv1672c	Hypothetical protein	Metabolism: energy production and conversion
Rv1758	<i>cut1</i>	—
Rv1760	Hypothetical protein	—
Rv1761c	Hypothetical protein	—
Rv1762c	Hypothetical protein	—
Rv1765c	Hypothetical protein	—
Rv2434c	Hypothetical protein	Poorly characterized: function unknown
Rv2544	<i>lppB</i>	Possible conserved lipoprotein
Rv2816c	Hypothetical protein	Poorly characterized: function unknown
Rv2817c	Hypothetical protein	Poorly characterized: function unknown
Rv2818c	Hypothetical protein	—
Rv2819c	Hypothetical protein	Poorly characterized: function unknown
Rv2820c	Hypothetical protein	Poorly characterized: function unknown

Those in bold show common deletions shared by at least two of the clinical strains.

reported by Tsolaki et al. there were no relationship among them, with the exception of DR-689, which possesses a deletion pattern similar to strains 47, 55, 67, 69, 95 and 97 (Fig. 2). All these strains have deletions of RD 105, 149, 150, 152, 181, and 207. All of them are Beijing strains although no epidemiological association was known. In order to corroborate these results, we checked these deletions in series of Beijing strains from the Dutch database,¹⁸ including NLA 009501317, NLA009600299, NLA009800636, NLA000017383, NLA 009500592, NLA000017914, NLA000016362, NLA 000017583, and NLA009801500. The only strain sharing all the same chromosomal deletions was NLA009500592, which has an identical RFLP pattern to DR-689.

Discussion

Phospholipases C are well-recognized virulence factors of several microorganisms, including *Clostridium spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. They act by either destroying cellular tissues, as in *Clostridium* infections,¹⁹ or by lysing the phagolysosomal membranes and releasing intracellular microorganisms in the cytoplasm, as in the case of *L. monocytogenes*.²⁰ In *M. tuberculosis*, there are several genes encoding phospholipase C-type enzymes: *plcA*, *plcB*, *plcC* and *plcD*.³ They are very similar, except for *plcD*. The latter is missing or interrupted in many *M. tuberculosis* isolates including H37Rv. Reynaud et al. demonstrated the importance of

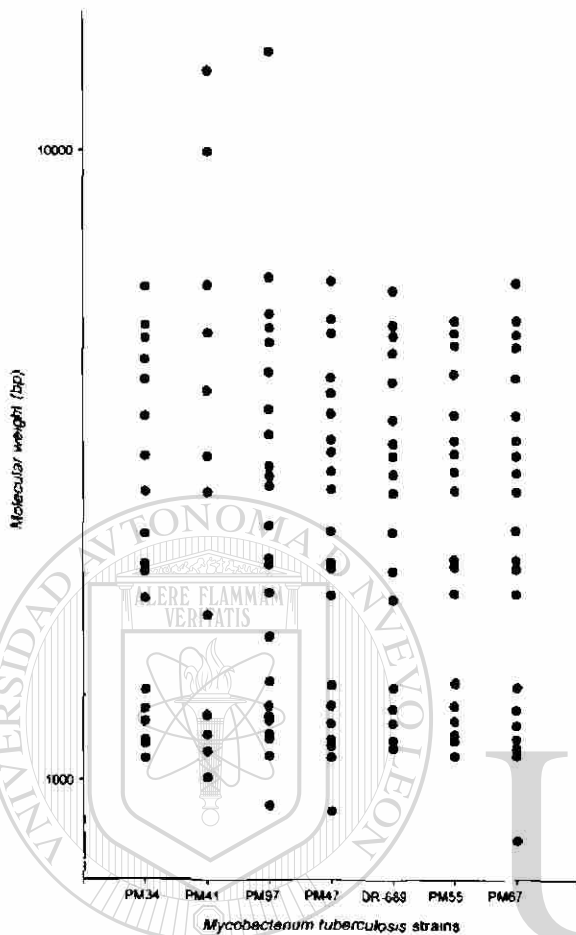


Figure 2 Comparison of the RFLP patterns for the IS6110 element of *M. tuberculosis* strains with similar deletion patterns. Strains PM34 and PM41 possess the deletions RD105, RD149, RD152, RD181 and RD207 reported by Tsolaki et al.⁵ The rest of the strains have all these deletions plus the loss of RD 150. The RFLP analysis of DR-689 was made in our lab. The RFLP data of the other strains were kindly donated by Dr. Peter Small and Dr. Midouri Kato Maeda.

phospholipases in virulence by inactivating either each individual ORF or all of them concurrently and testing their virulence to mice.²¹ They observed that triple or quadruple inactivated mutants were impaired in their ability to multiply in the lungs and spleen of infected animals, suggesting their importance for the survival of *M. tuberculosis* in tissues. It has been observed that the more genomic deletions in a clinical isolate of *M. tuberculosis* the less cavitory disease is observed in humans⁹; in that study some of the deleted genes included the PLC genes. However, an in vitro test of the virulence of these strains was not performed.

The deletion of DNA fragments in *M. tuberculosis* clinical isolates has been reported previously with many of them being associated to IS6110 elements transposition.^{4,5,9,22} In this study, in all the cases, an IS6110 inserted in the plc region was observed in the *ΔplcA-plcB-plcC* isolates. As hypothesized previously,¹⁰ it appears that deletions are produced by a homologous recombination mechanism since no inverted repeats associated to the transposition mechanism were observed in any case. In isolate DR-689, the three genes were completely absent, and in the rest of the isolates an incomplete copy of *plcC* was observed. In isolates RIVM 97-488 and RIVM 97 1389, we observed the presence of DNA sequences similar to MT2421 and MT2420 sequences of *M. tuberculosis* CDC1551. MT2420 shows homology to proteins of the ESAT-6 family and MT2421 is 95% identical to proteins of the QIL55 family.²³ Both of them are deleted from H37Rv, and its presence varies in other *M. tuberculosis* clinical isolates.⁴ MT2420 and MT2421 have many ortholog genes in *M. tuberculosis* H37Rv (Rv2346, Rv2347), *M. tuberculosis* CDC1551 (MT1066, MT1067, MT2411, MT2412, MT1841, MT1842), *M. bovis* (Mb1067, Mb1066) and *M. leprae* (Ml1181). More than insertions, the presence of these sequences seem to represent variation in gene arrangements among the *M. tuberculosis* isolates as reported before by Fleischmann et al.⁴

Although the transposition of IS6110 elements is supposed to occur randomly, there exist several preferential sites, among them the phospholipase genes.¹⁰ These sequences seem to attract the IS6110 elements and when two of them are close enough, a homologous recombination may occur as seen in the studied isolates. The mechanism of attraction is not known, although repetitive or palindromic sequences are probably implicated. Other repetitive sequences such as those encoding for PE and PPE proteins, have also observed to be associated to deletions in the *M. tuberculosis* genome,⁵ which strengthens this hypothesis. The role of IS6110 transposition in the modeling of the *M. tuberculosis* genome is still a matter of study, although it could be important since it seems to affect the expression of neighboring genes.²⁴

Tsolaki et al.⁵ reported the analysis by microarray hybridization of 100 strains of *M. tuberculosis* isolated from the San Francisco area, and observed common deletion patterns that they called regions of difference (RD). Comparing the deletion patterns presented by our strains to those, similar deletion patterns were observed. A group of strains, which presented the most regions deleted including RD's 105, 149, 150, 152, 181 and 207,

were very similar in the IS6110-RFLP pattern to one of our strains (DR-689). The only commonality was that all of them belong to the Beijing family. The Beijing family is a widespread group of *M. tuberculosis* which is quite dominant in Asia and other parts of the world.²⁵ They share a similar multibanded IS6110 RFLP patterns as well as an identical spoligotype pattern.¹⁸ DR-689 shares an almost identical RFLP pattern with the San Francisco isolates having all these deletions, although they are not epidemiologically related. It is possible that these strains have a common ancestor that already presented this deletions pattern and that they were acquired and transmitted long time ago. These strains represent a very well adapted group of bacteria since they are very dominant in certain areas (up to 85% in the Beijing area), and isolates with all these deletions can represent the most adapted of all them.

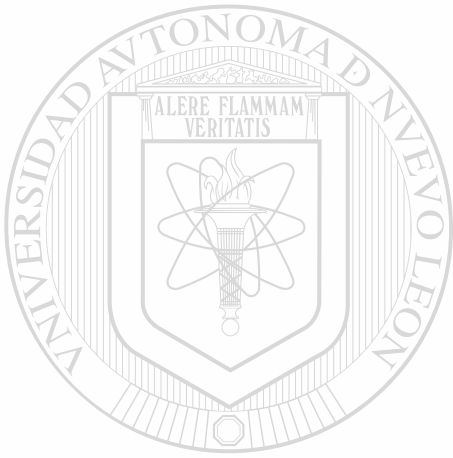
Free-living actinomycetes, a closely phylogenetically related group of bacteria to the *Mycobacterium* genus, possess giant chromosomes of about 6–8 mega bases, as in the case of *Streptomyces coelicolor*.²⁶ In contrast, *M. tuberculosis* has a chromosome of 4.1 million bases. It appears that when adapting to their hosts, the best way for the microorganisms to survive is to loss DNA material of non-essential genes, or even essential genes whose products can be provided by the host. This has been observed in *Mycobacterium leprae*²⁷ with a chromosome that has shrunk to about 3.1 mega bases, 1 mega base smaller than the *M. tuberculosis*.^{3,4} *M. leprae* has even lost part of the genes encoding for enzymes of the Krebs cycle, which explains in part its inability to grow in vitro. It is possible that adaptation of the most successful *M. tuberculosis* strains to their human host includes the loss of part of their genome even at the expense of a decrease in their virulence, although this theory deserves future studies.

References

1. Ravignone MC. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis* 2003;83:4-14.
2. Frothingham R, Hills HG, Wilson KH. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1994;32:1639-43.
3. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
4. Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, et al. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 2002;184:5479-90.
5. Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, et al. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4865-70.
6. Sampson SL, Warren RM, Richardson M, van der Spuy GD, van Helden PD. Disruption of coding regions by IS6110 insertion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 1999;79:349-59.
7. Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF, et al. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* 1998;338:633-9.
8. Zhang M, Gong J, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J Infect Dis* 1999;179:1213-7.
9. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, et al. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* 2001;11:547-54.
10. Vera-Cabrera L, Hernandez-Vera MA, Welsh O, Johnson WM, Castro-Garza J. Phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis* is a preferential locus for IS6110 transposition. *J Clin Microbiol* 2001;39:3499-504.
11. Viana-Niero C, de Haas PE, van Soolingen D, Leao SC. Analysis of genetic polymorphisms affecting the four phospholipase C (plc) genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates. *Microbiology* 2004;150:967-78.
12. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12712-7.
13. Diehl F, Beckmann B, Kellner N, Hauser NC, Diehl S, Hoheisel JD. Manufacturing DNA microarrays from unpurified PCR products. *Nucl Acids Res* 2002;30:e79.
14. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-40.
15. Kim CC, Joyce EA, Chan K, Falkow S. Improved analytical methods for microarray-based genome-composition analysis. *Genome Biol* 2002;3(11):17 (research 0065.1-0065.17).
16. Kim M, Liu X, Raychaudhuri S, Altman RB, Small PM. Determining the genomic locations of repetitive DNA sequences with a whole-genome microarray: IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002;40:2192-8.
17. Rindi L, Lari N, Garzelli C. Genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv downregulated in the attenuated strain H37Ra are restricted to *M. tuberculosis* complex species. *New Microbiol* 2001;24:289-94.
18. Kremer K, Glynn JR, Lillebaek T, et al. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J Clin Microbiol* 2004;42:4040-9.
19. Williamson ED, Titball RW. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine* 1993;11:1253-8.
20. Tilney LG, Portnoy AD. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 1989;109:1597-608.
21. Raynaud C, Guilhot C, Rautzier J, et al. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2002;45:203-17.
22. Ho TB, Robertson BD, Taylor GM, Shaw RJ, Young DB. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* genomes reveals

- frequent deletions in a 20 kb variable region in clinical isolates. *Yeast* 2000;17:272–82.
23. Betts JC, Dodson P, Quan S, et al. Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. *Microbiology* 2000;12:3205–16.
 24. Safi H, Barnes PF, Lakey DL, et al. IS6110 functions as a mobile, monocyte-activated promoter in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2004;52:999–1012.
 25. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol* 1995;33:3234–8.
 26. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature* 2002;417:141–7.
 27. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001;409:1007–11.

Available online at www.sciencedirect.com



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of *Mycobacterium tuberculosis* strains

Jorge Castro-Garza,¹ Hugo B. Barrios-García,^{1,2} Delia Elva Cruz-Vega,¹ Salvador Said-Fernández,¹ Pilar Carranza-Rosales,¹ Carmen A. Molina-Torres³ and Lucio Vera-Cabrera³

Correspondence
Jorge Castro-Garza
jorge.castro@biomedicas.net

¹División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, NL, Mexico

²Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, NL, Mexico

³Servicio de Dermatología, Hospital Universitario 'José E. González', Monterrey, NL, Mexico

Several techniques have been used to quantify the cytotoxicity produced by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli on cell monolayers; however, they are semi-quantitative or time consuming. Herein, a method based on crystal violet (CV) uptake by THP-1 cell monolayers is described. This colorimetric method quantifies the cytotoxic effect as a function of the number of remaining cells after the infection with *M. tuberculosis*. Since this micro-organism is not stained by the dye, it does not produce a background that affects absorbance readings. As determined by CV assay (CVA), *M. tuberculosis* strain H37Rv destroyed 10.5 % of THP-1 cell monolayers at 24 h and 50.52 % at 72 h, while *M. tuberculosis* strains lacking the complete phospholipase C locus produced a reduced cytotoxic effect. The damage estimated by microscopy corresponded to the effect quantified by CVA. The results show that the use of CVA is a rapid, sensitive and reliable quantitative assay to measure the cytotoxicity of different *M. tuberculosis* strains.

Received 25 August 2006

Accepted 3 March 2007

INTRODUCTION

Mycobacterium tuberculosis is a bacterial pathogen that produces a detrimental effect on mammalian cell cultures. This effect can be due to the induction of cell apoptosis or necrosis leading to cell death. The phenotype is reported as a cytotoxic or cytopathic effect (Castro-Garza *et al.*, 2002; Danelishvili *et al.*, 2003; Dobos *et al.*, 2000; McDonough & Kress, 1995) and it can be roughly quantified by analysing the altered cell morphology (cell rounding and loss of monolayer integrity) (Daniel *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 1996), setting up a scale to estimate the percentage of rounded or detached cells (Read *et al.*, 1974) or counting the amount of degraded cells by electron microscopy (McDonough & Kress, 1995). A more precise quantitative assay, such as measuring lactate dehydrogenase (LDH) release by using a colorimetric kit, has also been reported (Danelishvili *et al.*, 2003; Dobos *et al.*, 2000). However, most of the above experimental procedures are only semi-quantitative or are time-consuming.

Abbreviations: CV, crystal violet; CVA, crystal violet assay; PLC, phospholipase C; WST-1, 4-[3-(4-(iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulfonate].

There are other methods to quantify cytotoxicity; however, they are not practical for use with *M. tuberculosis* infection systems: exclusion or inclusion of vital dyes requires direct handling of samples, the release of radiolabelled substances increases the biosafety level, and the reduction of coloured compounds such as 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), 4-[3-(4-(iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulfonate (WST-1) and other tetrazolium salts by bacteria (Franzblau *et al.*, 1998; Gomez-Flores *et al.*, 1995) as well as macrophages (Ferrari *et al.*, 1990) in *in vitro* infection models would produce a high background and the results obtained would not be accurate.

Crystal violet (CV) is a triphenylmethane dye also known as gentian violet. The most commonly used application for this dye is as the primary stain in the Gram-staining procedure. Gillies *et al.* (1986) used CV to quantify the cell number in monolayer cultures as a function of the absorbance of the dye taken up by the cells. This method has been used with modifications for a wide number of applications, most of them to determine cytotoxicity or cell death produced by chemicals, drugs, or toxins from pathogens (Harhaji *et al.*, 2004; Shaik *et al.*, 2004;

Rothman, 1986), and to determine cell viability (Thomas *et al.*, 2004) or cell proliferation (Zivadinovic *et al.*, 2005) under different conditions.

A unique characteristic of *M. tuberculosis* bacilli is their outer lipid bilayer, which is the thickest biological membrane known. Because of its hydrophobic nature, the bacterial wall is not accessible to hydrophilic substances such as CV, and *M. tuberculosis* cannot be stained with the regular Gram-staining reagents, resulting in a remarkable Gram-neutral (neither positive nor negative) or Gram-ghost appearance of mycobacteria (Trifiro *et al.*, 1990). Therefore, the CV assay (CVA) becomes a very attractive method to quantify mycobacterial cytotoxicity, because CV will not react or be absorbed by the mycobacteria and any change in absorbance reading is due solely to the difference in the number of mammalian cells in a culture.

METHODS

Mycobacterial strains, culture and growth conditions. *M. tuberculosis* clinical isolates DR-689, DR-448 and DR-1289 lacking the *plcA-plcB-plcC* phospholipase C (PLC) locus were used for the present study. The extension of the deletions and the description of the changes in the locus are described in a previous paper (Vera-Cabrera *et al.*, 2007). *M. tuberculosis* H37Rv was included as a positive control for cytotoxicity. Stock cultures of mycobacterial strains were prepared in Middlebrook 7H9 broth supplemented with oleic acid/albumin/dextrose/catalase (OADC), grown to mid-logarithmic phase, and stored at -70°C until needed. Cell density for each stock culture was determined in triplicate as c.f.u. using Middlebrook 7H10 agar.

Cell cultures. Human monocyte cell line THP-1 was maintained in RPMI 1640 medium (Gibco-BRL) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS; Gibco-BRL) and 1 mM sodium pyruvate (Sigma). In order to transform the cells into macrophages, the cells were subcultured four times without sodium pyruvate and then seeded into 24-well microplates (Costar Corning) at a concentration of 5×10^5 cells per well in complete RPMI 1640 supplemented with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Calbiochem Biosciences) at a concentration of 6.25 ng ml^{-1} . Cell cultures were washed twice with RPMI 1640 every 48 h for no longer than 4 days. Before infecting the cell cultures, the number of viable cells per well was determined using the WST-1 (Roche Molecular Biochemicals) reduction assay (Ishiyama *et al.*, 1993), plotting the A_{545} obtained in a standard curve of cell density. WST-1 is a tetrazolium salt that is cleaved by viable cells into a coloured product that can be measured spectrophotometrically. A_{545} values have a linear relationship with the number of viable cells. The average cell density of three wells per plate determined by WST-1 was used as the number of cells per well for each plate.

CVA. Control and infected cell cultures were fixed at the time points indicated for each experiment in 10 % buffered formalin for 24 h at 4°C . In all cases, the volume added to each well of the different solutions was 500 μl . Fixative solution was discarded and a 0.1 % aqueous CV solution was added to each well. The samples were incubated at room temperature for 30 min with gentle shaking. The plates were washed by submersion in flowing tap water for 15 min. Microplates were allowed to air dry and 0.2 % Triton X-100 in water was added to each well and incubated for 30 min at room temperature with gentle shaking to dissolve the dye. Then, 100 μl from each well was transferred into a fresh 96-well microplate and the A_{600} read in a microplate reader (EIA Microwell Reader II, Sigma).

Mycobacterial cytotoxicity assay. Before the beginning of the experiment, bacteria were thawed at 37°C , mixed vigorously using a vortex, and diluted in tissue-culture medium to obtain the desired density to infect the cells with an m.o.i. of 1 : 10 (bacilli : cells). Bacterial c.f.u. from infected cultures was determined at the beginning and end of each experiment in 7H10 medium supplemented with OADC.

Macrophage (THP-1 cell line) monolayers were infected in triplicate with the *M. tuberculosis* strains tested. Infected cultures were incubated at 37°C and 5 % CO_2 for up to 72 h. Every 24 h, the culture media from three wells from each strain and controls was discarded and the cells fixed in 10 % buffered formalin for at least 24 h at 4°C . A different microplate was used for each time point, to avoid the effect of formaldehyde vapour on the rest of the cell culture. The cytotoxic phenotype was observed qualitatively as disruption of the confluent monolayers over time using a phase-contrast light inverted microscope Axiovert 25 (Carl Zeiss).

The quantitative analysis of cytotoxicity on the stained cultures infected with *M. tuberculosis* was based on the percentage of dead cells, employing the following equation:

$$\text{Percentage dead cells} = ((\text{control } A_{600} - \text{sample } A_{600}) / \text{control } A_{600}) \times 100$$

All experiments were repeated three times in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

A_{600} readings were proportional to the number of cells per well. Regression and correlation analysis of data ($1.5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ cells per well) showed a slope value of 0.2019 with an r^2 value of 0.9465 (Fig. 1). This result confirms the utility of CVA to determine viability or cell culture density, as reported previously (Gillies *et al.*, 1986).

In order to test a cytotoxic agent, we used Triton X-100, which is an anionic detergent that dissolves the cell membrane leading to cell death, and the effect depends on the concentration used. Triton X-100 produces a clear

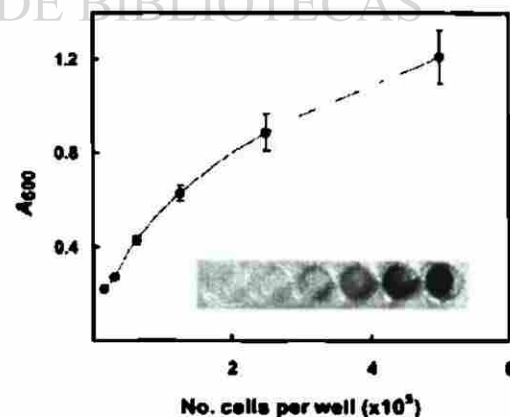


Fig. 1. CVA in the THP-1 cell line. Bars show mean \pm SD of three independent experiments done in triplicate. A row of an experimental microtitre plate is shown in which the wells correspond to the numbers of cells.

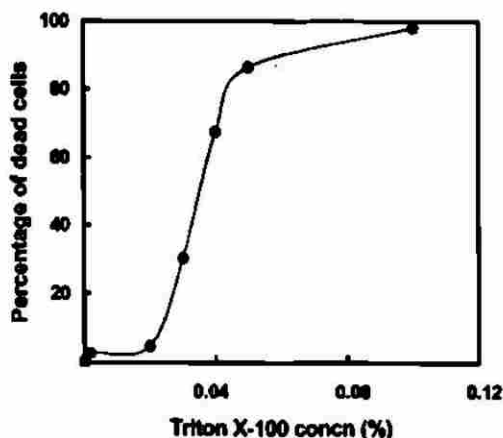


Fig. 2. Cytotoxic effect of Triton X-100 on the THP-1 cell line.

and increasing cytotoxic effect starting at a concentration of 0.05 % and reaching a maximum at 0.1 %, as measured with the CVA (Fig. 2). Regression and correlation analysis of data (three experiments each in triplicate) between 0.02 and 0.1 % Triton X-100 gave a slope value of 2821.5 and an r^2 value of 0.9865.

To test the ability of the method to quantify the cytotoxicity produced by *M. tuberculosis*, it was necessary that no background was caused by staining of the bacteria. As mentioned above, *M. tuberculosis* is not stained by CV and we found this feature very useful for this model. THP-1 cell monolayers were infected with a variable number of mycobacteria with an m.o.i. up to 10 : 1 (bacteria : cell), incubated for 6 h to allow the internalization of bacteria into the cells, and then immediately subjected to the CVA before any effect was produced by *M. tuberculosis* on the monolayers. Absorbance readings for all the different bacterial densities were very similar and no significant differences were found by an ANOVA one-way analysis ($P < 0.05$). This result supports the use of the CVA to quantify mycobacterial cytotoxicity, since no background was produced by the mycobacteria. Accordingly, any change in absorbance readings in infected monolayers would be produced exclusively by *M. tuberculosis* cytotoxicity.

In order to compare the cytotoxicity of different *M. tuberculosis* strains using the CVA, THP-1 cell monolayers were infected with *M. tuberculosis* H37Rv strain and *M. tuberculosis* clinical isolates DR-689, DR-448 and DR-1289

(all of them lacking the PLC locus). *M. tuberculosis* H37Rv produced a cytotoxic effect on THP-1 cell monolayers that was observed microscopically 24 h post-infection. After 72 h, it could be visually estimated that around 50 % of the cell monolayer was destroyed (Fig. 3). On the other hand, *M. tuberculosis* DR-689 and DR-1289 did not disrupt the cell monolayer 72 h post-infection. Strain DR-448 produced cytotoxicity at 72 h as determined by CVA. The CVA values obtained from these experiments are shown in Table 1. All the strains infected the cell cultures, as shown by the c.f.u. values for each strain determined at the end of the experiment, which were: DR-689, 3.5×10^4 ; DR-448, 2.3×10^4 ; DR-1289, 2.2×10^4 ; and H37Rv, 3.7×10^4 . The strain DR-689, with a yield of 3.5×10^4 c.f.u., produced no effect on cell cultures, while H37Rv, with a similar yield, had the highest cytotoxic effect. This result shows that the cytotoxicity is not only due to the intracellular growth but also the strain producing the activity. We have previously reported similar results with *M. tuberculosis* strains Erdman and CDC-1551, and *Mycobacterium bovis* BCG (Castro-Garza *et al.*, 1997). Although the clinical isolates used in this work lacked the PLC locus, they still had residual PLC activity (data not shown). There is a fourth phospholipase gene (*plcD*) in a different region of the genome. In H37Rv, the *plcD* gene is truncated and interrupted by a copy of the IS6110 insertion sequence. Raynaud *et al.* (2002) have demonstrated the importance of phospholipases in virulence by inactivating either each individual ORF or all of them concurrently and testing for virulence to mice; however, phospholipases are not the only mycobacterial product able to produce cytotoxicity.

Recently, Takii *et al.* (2005) have reported the use of CV to test the pyrazinamide susceptibility of *M. tuberculosis* in a fibroblast-based assay, in which the host-cell viability is reflected by the state of the bacilli inside the host cells. In this study, we demonstrated that the CVA can quantify the cytotoxicity produced by *M. tuberculosis* in a THP-1 cell monolayer. The ability of the CVA to measure this effect with other mycobacterial species remains to be tested, although a biofilm produced by *Mycobacterium avium* can be stained with CV (Carter *et al.*, 2003). Mycobacteria other than *M. tuberculosis*, such as *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum*, are natural pathogens of poikilothermic organisms (Trucksis *et al.*, 2005), but produce only localized skin infections in humans (Ranger *et al.*, 2006), while *Mycobacterium abscessus* is commonly associated with contaminated traumatic skin wounds and

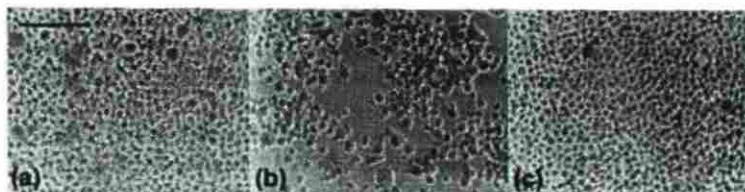


Fig. 3. Cytotoxicity of *M. tuberculosis* towards THP-1 cells. Cell monolayers 72 h post-infection are shown ($\times 250$). (a) Uninfected cells, (b) *M. tuberculosis* H37Rv infected cells, (c) *M. tuberculosis* DR-689 infected cells. Bar, 200 μ m.

Table 1. Cytotoxicity of *M. tuberculosis* strains

Values show the percentage of dead cells, and represent the mean \pm SD of three independent experiments done in triplicate.

Incubation time	<i>M. tuberculosis</i> strains			
	DR-689	DR-448	DR-1289	H37Rv
24 h	0	0	0	10.50 \pm 1.05
72 h	0	20.51 \pm 1.53	0	50.52 \pm 6.32

with post-surgical soft-tissue infections (Petrini, 2006). These mycobacterial species exhibit cytotoxicity towards cell cultures or have a necrotic effect in their pathologies (Torrado *et al.*, 2007; Ranger *et al.*, 2006). It would be very interesting to apply the CVA to measure and compare their activities, either between species or among mutant strains of a single species, such as the *M. ulcerans* mutant lacking the mycolactone toxin, which has only been analysed by altered cell morphology (Daniel *et al.*, 2004).

The results of this work support the use of the CVA as a rapid, sensitive and reliable quantitative assay to measure the cytotoxicity of *M. tuberculosis* and to compare differences in activity between strains that could potentially be related to virulence.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Fred Quinn for the critical review of the manuscript and his valuable comments, and Miguel Zuñiga Charles for his assistance with the statistical work. This work was supported by IMSS FOFOI FP2001-030 and FP2005/9/494 grants.

REFERENCES

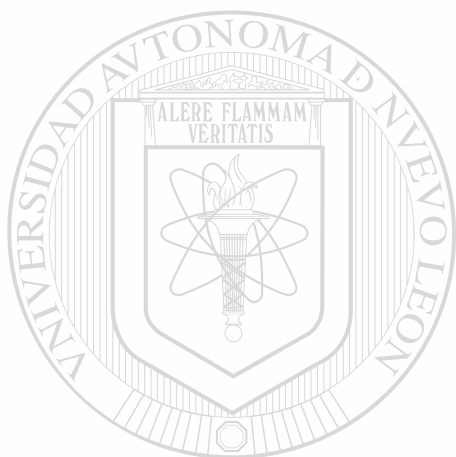
- Carter, G., Wu, M., Drummond, D. C. & Bermudez, L. E. (2003). Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J Med Microbiol* 52, 747–752.
- Castro-Garza, J., Quinn, F. D. & King, C. H. (1997). Assay to assess the cytotoxic effect of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG on human alveolar pneumocytes. Abstract no. A-50 in *Abstracts of the ASM Conference on Tuberculosis: Past, Present and Future, 1997*. Copper Mountain, CO: American Society for Microbiology.
- Castro-Garza, J., King, C. H., Swords, W. E. & Quinn, F. D. (2002). Demonstration of spread by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in A549 epithelial cell monolayers. *FEMS Microbiol Lett* 212, 145–149.
- Danelishvili, L., McGarvey, J., Li, Y. J. & Bermudez, L. E. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell Microbiol* 5, 649–660.
- Daniel, A. K., Lee, R. E., Portales, F. & Small, P. L. (2004). Analysis of *Mycobacterium* species for the presence of a macrolide toxin, mycolactone. *Infect Immun* 72, 123–132.
- Dobos, K. M., Spotts, E. A., Quinn, F. D. & King, C. H. (2000). Necrosis of lung epithelial cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation. *Infect Immun* 68, 6300–6310.
- Ferrari, M., Chiara, F. M. & Isotta, A. M. (1990). MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. *J Immunol Methods* 131, 165–172.
- Fischer, L. J., Quinn, F. D., White, E. & King, C. H. (1996). Intracellular growth and cytotoxicity of *Mycobacterium haemophilum* in a human epithelial cell line (Hec-1-B). *Infect Immun* 64, 269–276.
- Franzblau, S. G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Medico, G., Hernandez, A., Degan, M. T., Cook, M. B., Quenzler, V. K. & other authors (1998). Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol* 36, 362–366.
- Gilles, R. J., Didier, N. & Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 159, 109–113.
- Gomez-Flores, R., Gupta, S., Tamez-Guerra, R. & Mehta, R. T. (1995). Determination of MICs for *Mycobacterium avium* *M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. *J Clin Microbiol* 33, 1842–1846.
- Harheji, L., Vuckovic, O., Mijakovic, D., Stosic-Gruljic, S. & Trajkovic, V. (2004). Iron down-regulates macrophage anti-tumour activity by blocking nitric oxide production. *Clin Exp Immunol* 137, 109–116.
- Ishiyama, M., Shiga, M., Sesamoto, K., Mizoguchi, M. & He, P. (1993). A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 41, 1118–1122.
- McDonough, K. A. & Kress, Y. (1995). Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63, 4802–4811.
- Petrini, B. (2006). *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid growing potential pathogen. *APMIS* 114, 319–328.
- Ranger, B. S., Mehrous, E. A., Mosi, L., Adusumilli, S., Lee, R. E., Colomi, A., Rhodes, M. & Small, P. L. (2006). Globally distributed mycobacterial fish pathogens produce a novel plasmid-encoded toxic macrolide, mycolactone F. *Infect Immun* 74, 6037–6045.
- Raynaud, C., Guillot, C., Raugier, J., Bordet, Y., Pelicic, V., Mangano, R., Smith, I., Gicquel, B. & Jackson, M. (2002). Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 45, 203–217.
- Read, J. K., Heggie, C. M., Meyers, W. M. & Connor, D. H. (1974). Cytotoxic activity of *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* 9, 1114–1122.
- Rothman, S. W. (1986). Technique for measuring 50 % end points in cytotoxicity assays for *Clostridium difficile* toxins. *J Clin Pathol* 39, 672–676.
- Shah, M. S., Chatterjee, A. & Singh, M. (2004). Effects of monensin liposomes on the cytotoxicity, apoptosis and expression of multidrug resistance genes in doxorubicin-resistant human breast tumour (MCF 7/dox) cell-line. *J Pharm Pharmacol* 56, 899–907.
- Takii, T., Hamasaki, S., Hirano, K., Abe, C. & Onozaki, K. (2005). Simple fibroblast based assay to test pyrazinamide susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 804–807.
- Thomas, M., Finnegan, C. E., Rogers, K. M., Purcell, J. W., Trimble, A., Johnston, P. G. & Boland, M. P. (2004). STAT1: a modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 64, 8357–8364.
- Torrado, E., Fraga, A. G., Castro, A. G., Stragier, P., Meyers, W. M., Portales, F., Silva, M. T. & Pedrosa, J. (2007). Evidence for an intramacrophage growth phase of *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* 75, 977–987.
- Trifiro, S., Bourgauf, A. M., Lebel, F. & Rene, P. (1990). Ghost mycobacteria on Gram stain. *J Clin Microbiol* 28, 146–147.

Trucksis, M., Pritchett, C. L. & Reimschuessel, R. (2005). *Mycobacterium marinum* and fish and frog models of infection. In *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 529–535. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray & W. R. Jacobs, Jr. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Vera-Cabrera, L., Molina-Torres, C., Hernández-Vera, M. A., Barrios-García, H. B., Balckwood, K., Villarreal-Treviño, L.

Ocampo-Candiani, J., Welsh, O. & Castro-Garza, J. (2007). Genetic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with deletions in the *plcA-plcB-plcC* locus. *Tuberculosis (Edinb)* 87, 21–29.

Zivadnovic, D., Gametchu, B. & Watson, C. S. (2005). Membrane estrogen receptor alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses. *Breast Cancer Res* 7, R101–R112.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

