

## 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.

### **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.**

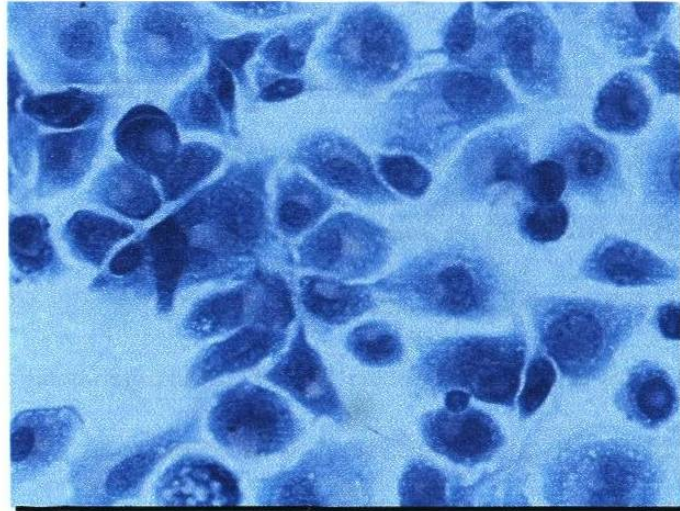
La línea celular THP-1 es una línea celular de monocitos humanos originada de un paciente con leucemia monocítica aguda (ATCC: TIB-202), y ha sido ampliamente usada para el estudio de la patogénesis de *M. tuberculosis* (Raynaud *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998, 1999; Riendeau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

Las 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  $1 \times 10^5$  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  $1,000 \times g$  por 5 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente la densidad celular se ajustó a  $4 \times 10^5$  células/ml con medio RPMI-SFB adicionado con 2  $\mu$ l de una solución 10  $\mu$ 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 CO<sub>2</sub> 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  $4 \times 10^5$  bacterias por ml con medio RPMI completo, previamente calentado a  $37^\circ\text{C}$ . La infección se llevó a cabo en microplacas de 24 pozos (Costar Corning, N.Y., USA) conteniendo  $4 \times 10^4$  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  $37^\circ\text{C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$ . A las 24 h post-infección los cultivos se lavaron dos veces con medio nuevo precalentado a  $37^\circ\text{C}$ . 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 (EIA 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.

### **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 Guérin 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 µl 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 µl cada 24 h y se midió la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro MBA 2000 (Perkin-Elmer,

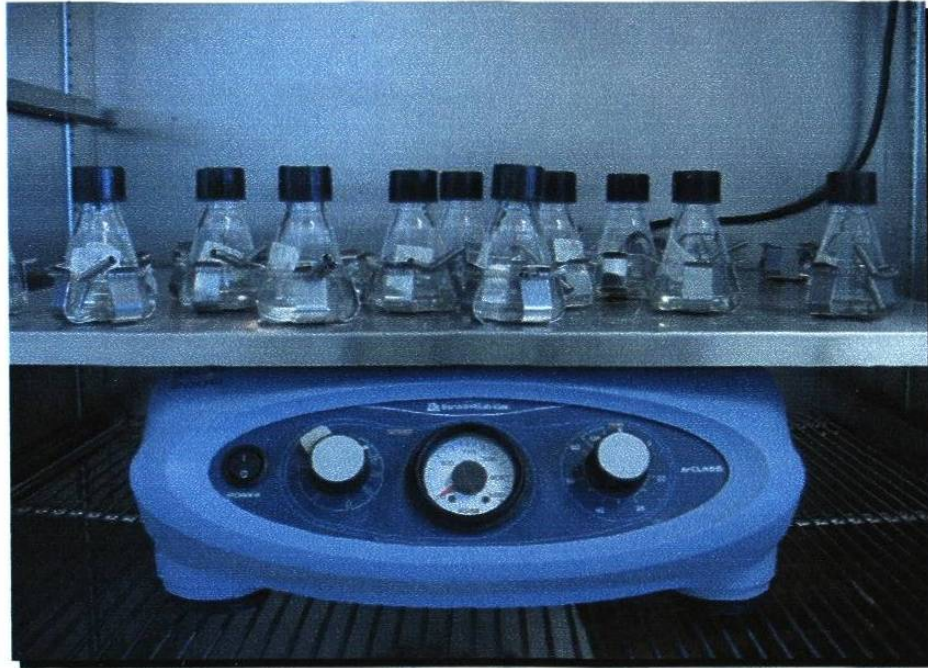
Norwalk, CT, USA). Las lecturas se tomaron por espacio de 18 días. Finalmente se graficó la densidad óptica contra el tiempo.

### **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 CO<sub>2</sub>. 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 MgCl<sub>2</sub>, 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**

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

<b>Gen</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Producto esperado en pb</b>	<b>Programa de amplificación</b>
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' CCGCCGAGAGCTATCACTGGACT 3' 2102B 5' CCGCGGGCTGGGGACATT 3'	288	C
Rv3017	3017A 5' ACCCCGGAACGACCCACCTAAT 3' 3017B 5' TACAGTACCCGGCGATGACG 3'	291	C
Rv3018	3018A 5' GCCGCCGAACCATAACCCCATTC 3' 3018B 5' CGACCCGGCGCCACACTGC 3'	471	C
Rv3019	3019A 5' GCCCATCTCGAGCCAACAT 3' 3019B 5' GCCGATATCGCCAGTGAGCA 3'	179	C
Rv2951	2951A 5' GCCGGACGCGACCCAAATG 3' 2951B 5' TGAGCCCGCGAAAACCTT 3'	430	B
Rv2952	2952A 5' TGGGCGGCAAGCAGGTG 3' 2952B 5' GCAGGTCGGCGTATGGGAAGTA 3'	315	B
Rv2953	2953A 5' CGGGCGTGCGGATGAT 3' 2953B 5' AGACCCAGCGTTGCGAGAATGA 3'	406	B
Rv2954	2954A 5' GGGCTGGCGTGGATGTGT 3' 2954B 5' CCAGGTCGGCAGGTTTCAGC 3'	326	C
Rv2955	2955A 5' GGGCGATCCGGATGTTAGAGT 3' 2955B 5' CGGCCGCCACGAAAAAGT 3'	444	A
Rv2956	2956A 5' GAGGTTTCGCGCCGCTATTCTG 3' 2956B 5' ACTGCTCTGACCCGCGTTTCTCTG 3'	297	C
Rv2957	2957A 5' CATGAACCGCGCGTGGACCT 3' 2957B 5' GAGCCCGCGAATTTCGTTGTAGCT 3'	391	C
Rv2958	2958A 5' GACAGACCGCCGATTATTTATGC 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' CGGATCTTGCGGGTCGTCAC 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' GCCCGCCCGAGAAGT 3' 2944B 5' CGGGGCCAAAACACGAC 3'	238	B
Rv2945	2945A 5' GTCCGCTGTTCTGGTGGTGCTA 3' 2945B 5' TTGCGCTTGGAAGTTTCGTGAC 3'	454	C
Rv2946	2946A 5' TTGCGGATTGGGGTGTGCT 3' 2946B 5' GGCCGGCTCGATGAAGTG 3'	571	C
Rv2947	2947A 5' GCCGGGGTGGTGTGCT 3' 2947B 5' CCGCGGGGAAGGCTCAT 3'	429	B
Rv2948	2948A 5' CGCGCCGGTAACTCCAGA 3' 2948B 5' GCCGATTCCAATAGCCCTTAGC 3'	471	C
Rv2949	2949A 5' AGGTCGGAACCTCGGAACACTTATT 3' 2949B 5' GGCGGGCAACGGCTCTC 3'	233	B
Rv2950	2950A 5' ACCGGCCCGAACGAGTA 3' 2950B 5' GGCCCCATCCACCACCA 3'	522	A
Rv2650	2650A 5' CTACCTGGGGCGGTTCTGCAAG 3' 2650B 5' GGCGGGTCAACCTCAATC 3'	406	C
Rv2651	2651A 5' ACGAGCCCTGGCGAATGTGAA 3' 2651B 5' CGGCTAGCGAACGGGAAACGACT 3'	210	C

**TABLA 4 (continuación)**

<b>Gen</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Producto esperado en pb</b>	<b>Programa de amplificación</b>
Rv0074	0074A 5' GGGCGTGGGGAGGAGTATC 3' 0074B 5' TGGGCAACAATCGCTTCAACAAC 3'	426	C
Rv1672	1672A 5' GGCAAGCCCCACGCACAAT 3' 1672B 5' GCCGACGATCAGCCCAGACA 3'	490	B
Rv1673	1673A 5' CCGGCGCCATGGACTACGA 3' 1673B 5' GGTGGGGCGAGCAGGATGT 3'	358	C
Rv1674	1674A 5' CGGGACGGCAAACGGGTGAT 3' 1674B 5' CGTCGAGTCGGCGGGCAGAA 3'	403	C
Rv2434	2434A 5' TCGCGCTGATCGGCATAGGTT 3' 2434B 5' CGGCCGGCTGAGATTGGTAAA 3'	319	C
Rv2544	2544A 5' CTCACCGCCACCGCCAGAT 3' 2544B 5' CGCCGAGAATGTGCTACCGAAGTC 3'	188	C
Rv3141	3141A 5' GCGCCGGATAACAGCCAA 3' 3141B 5' GAATCTCGCCGCCAGTGAA 3'	516	A
Rv1765	1765A 5' AGGCGTTTCTGCGTCTGGTTGAG 3' 1765B 5' GGTGTGCCCGGTGGTGATACG 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.

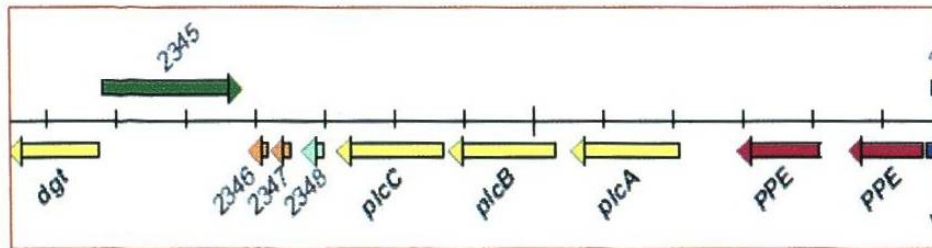
C: desnaturalización a 95°C por 4 min, 30 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 30s y 72°C por 45 s, para finalizar con un paso a 72°C por 5 min.

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.

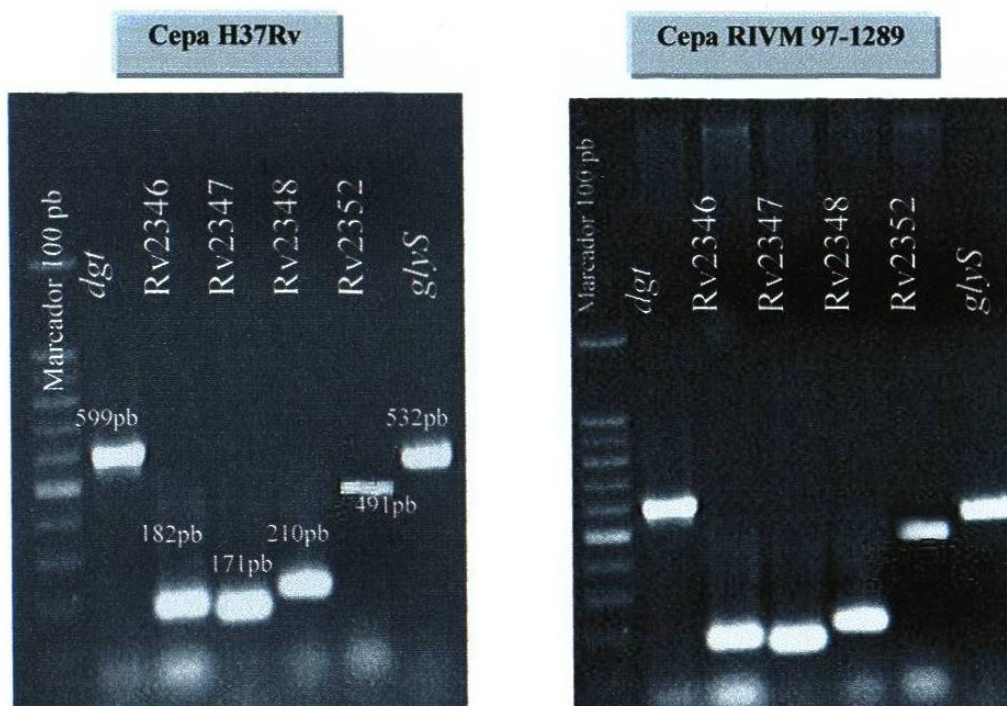
Para determinar la extensión de la delección del locus PLC se amplificaron primero los genes más cercanos a este locus. En la tabla 5 se muestran los resultados de la amplificación, encontrándose que en todas las cepas de *M. tuberculosis* seleccionadas los genes estaban presentes, a excepción del gen 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.

<b>Gen</b>	<b>0488</b>	<b>1177</b>	<b>1289</b>	<b>1389</b>	<b>DR689</b>
<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	+	+	+	+	+

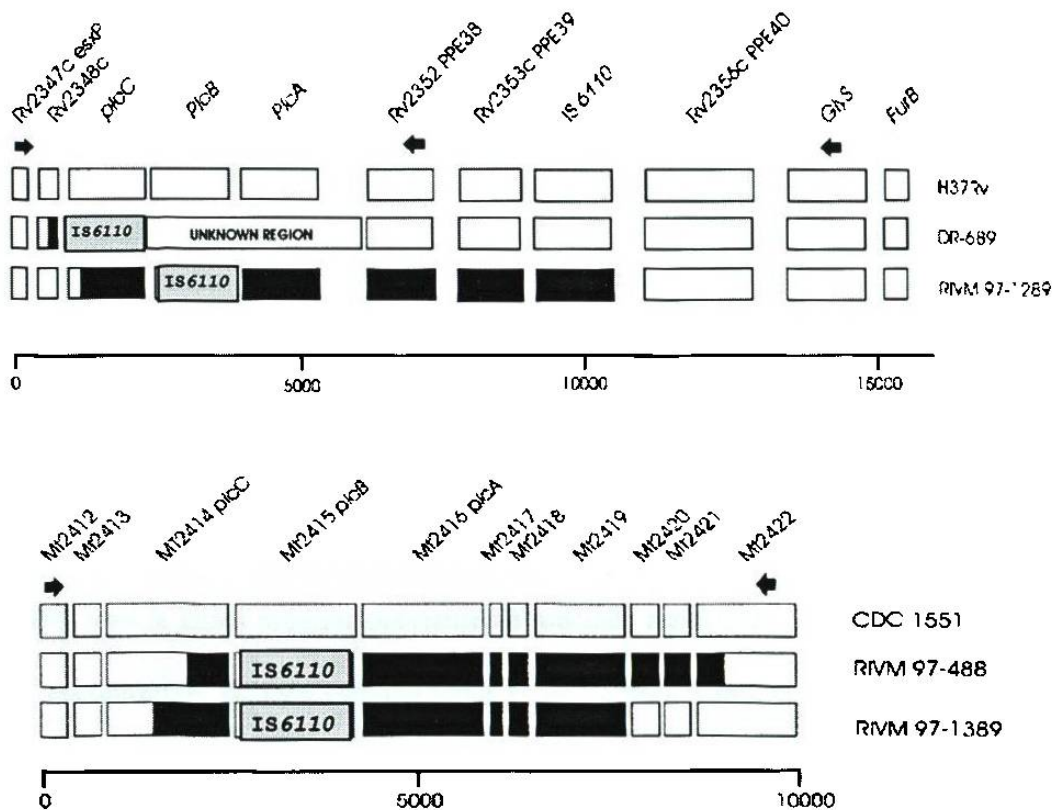


**Figura 7.** PCR para la búsqueda de los genes más conservados adyacentes al locus PLC en la cepa de referencia H37Rv y una de las cepas en estudio RIVM 97-1289.

## 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.



**Figura 8.** Región de PLC de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y CDC1551 y cambios genéticos en las cepas  $\Delta$ 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 a.*, 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 helicasa
	Rv2167c	Proteína hipotética	Probable transposasa ( <i>IS6110</i> )
	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 <i>IS6110</i> (fragment0)
	Rv2350c	<i>plcB</i>	fosfolipasa C 2 plcB
	Rv2357c	<i>glyS</i>	Almacén y procesamiento de información: Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
	Rv2479c	Proteína hipotética	Probable transposasa ( <i>IS6110</i> )
	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>fadES</i>
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)**

<b>Aislamiento</b>	<b>Gen en H37Rv</b>	<b>Descripción del gen</b>	<b>Posible función o categoría funcional</b>
	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)		
<b>RIVM 97-1389</b>	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 –el 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	-
<b>DR-689</b>	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	Posible 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 phRV1 (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>esxN</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 Guerin, 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.**

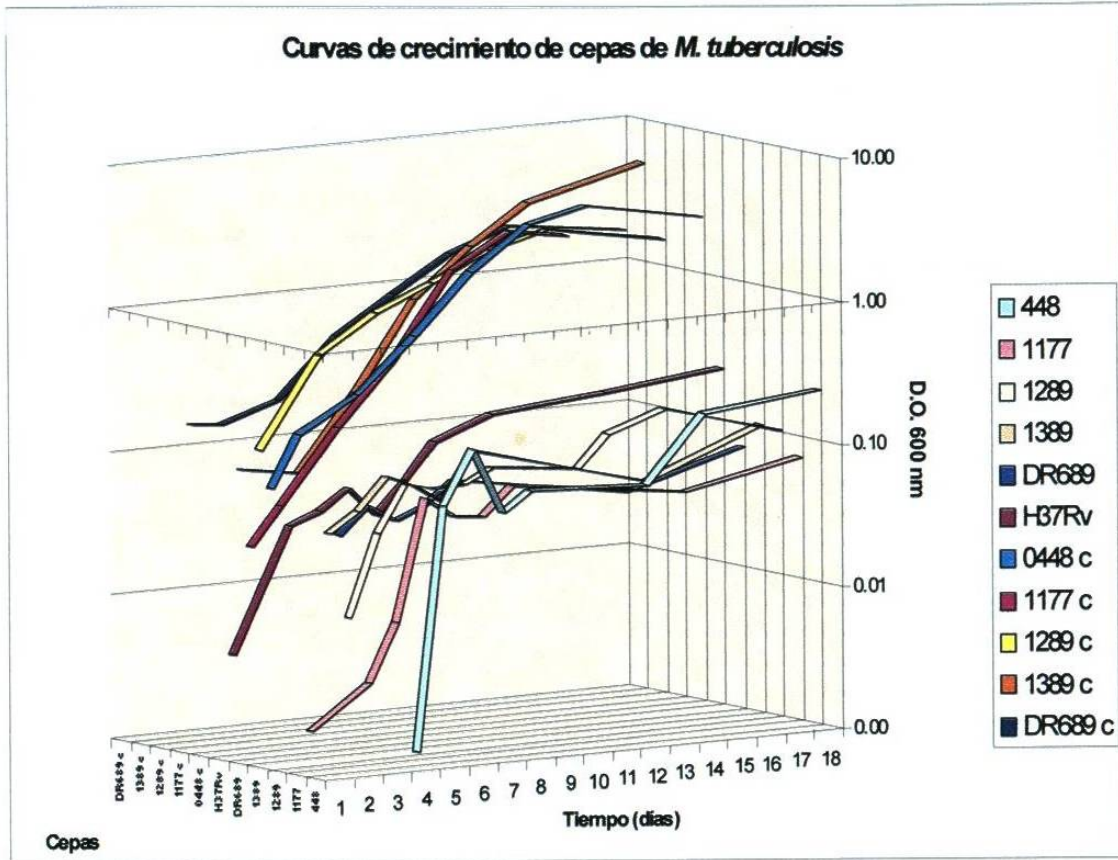
Todas las cepas de *M. tuberculosis* se cultivaron hasta por 18 días. A diferentes tiempos de incubación se obtuvieron las lecturas de absorbancia de los cultivos líquidos. Los resultados se muestran en la tabla 8 y en la fig. 9.

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



**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 *P<sub>LC</sub>* 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.

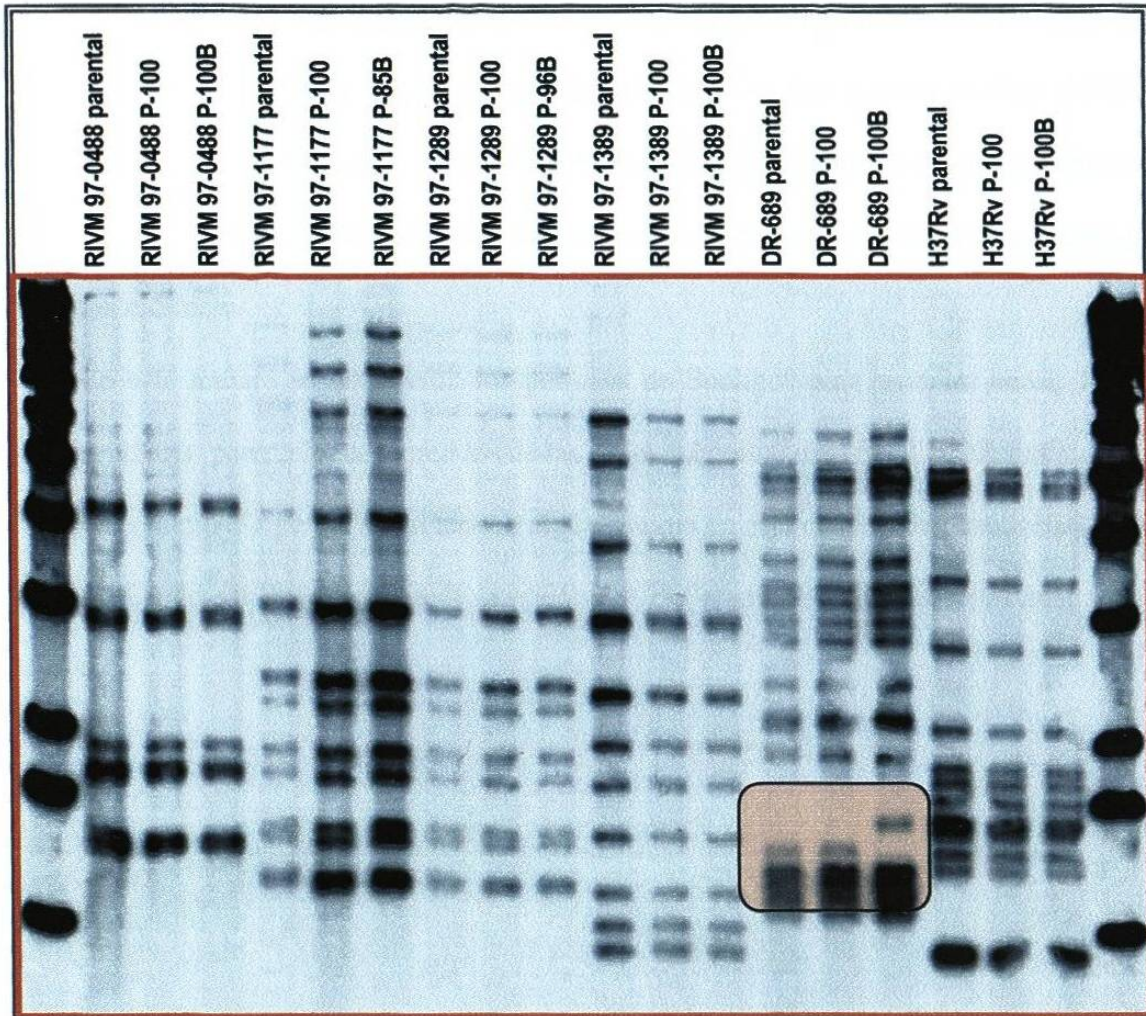
Cepa	Cultivo en M7H9	Cultivo en M7H9 con bilis
RIVM 97-0488	100	100
RIVM 97-1177	100	90
RIVM 97-1289	100	100
RIVM 97-1389	100	100
DR689	100	100
H37Rv	100	100

#### 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.



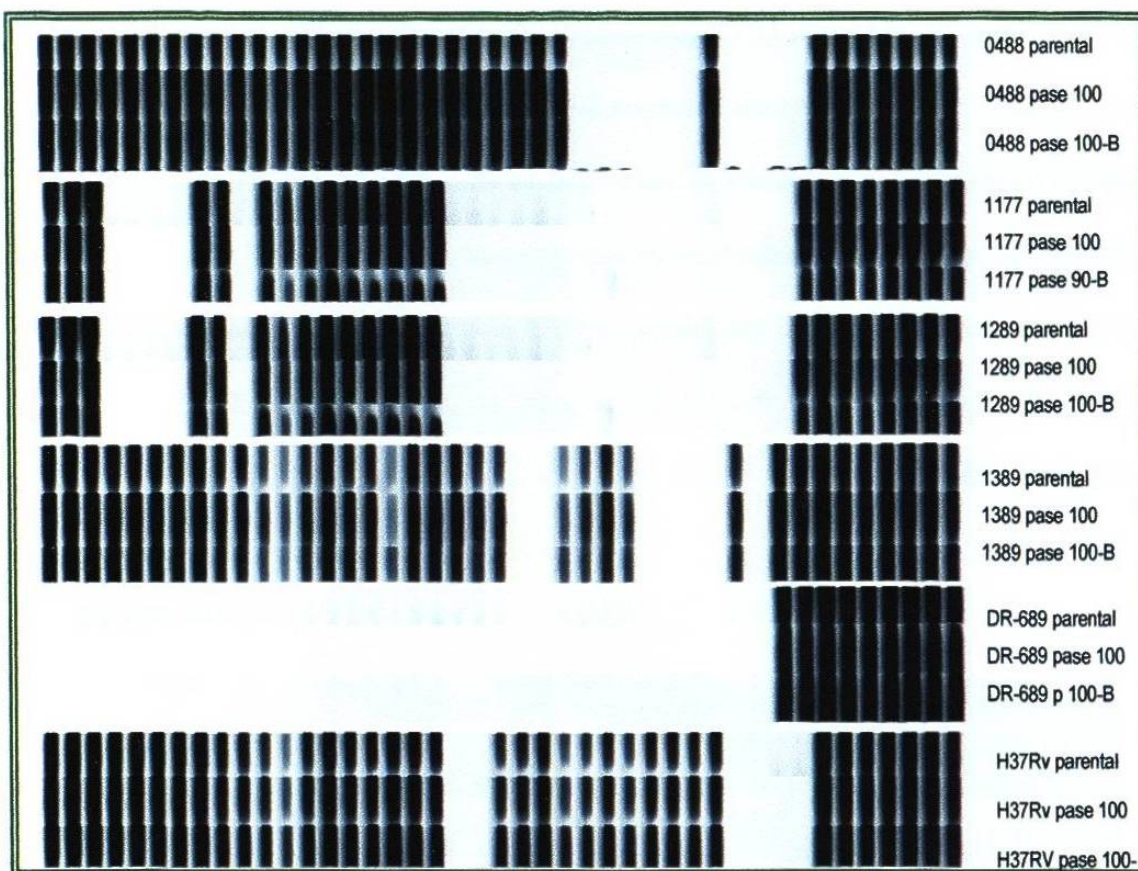
**Figura 10.** Análisis de RFLP para el elemento *IS6110* de las cepas parentales y las subcultivadas. El único cambio observable es en la cepa DR-689 subcultivada en presencia de bilis.

### 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.

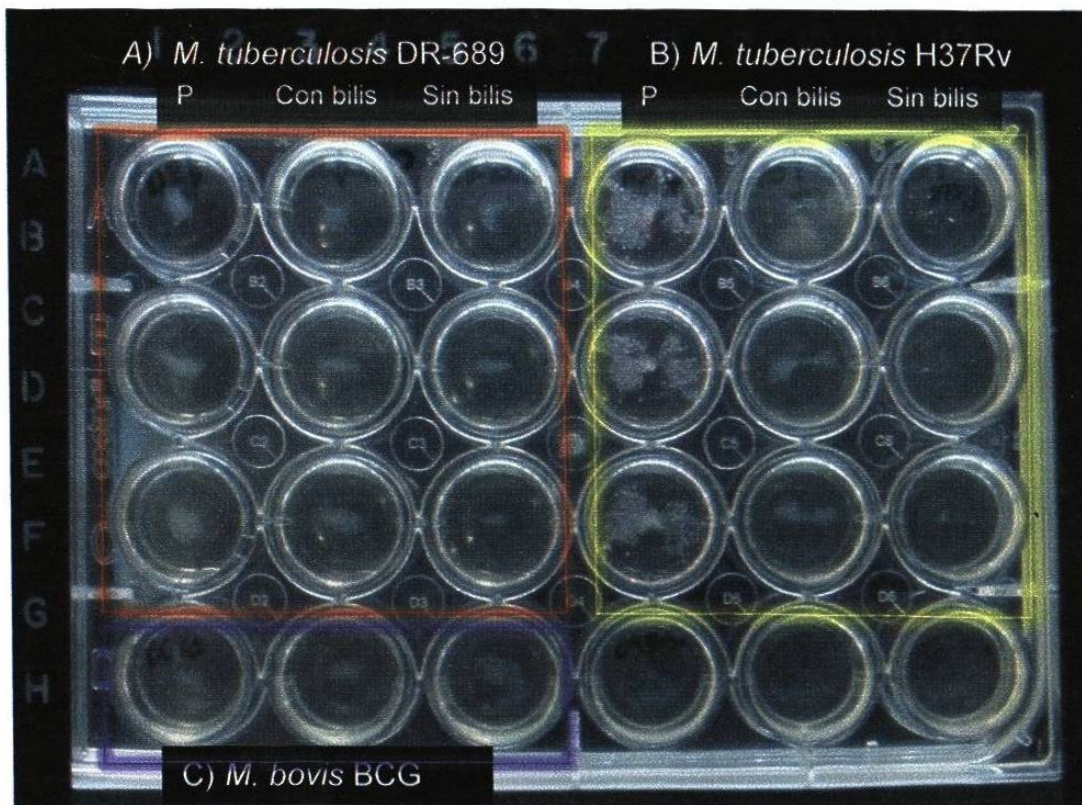


**Figura 11.** Patrones de Spoligotyping de las cepas parentales y las subcultivadas. No se observó cambio en el locus DR en los aislamientos probados.

### 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.

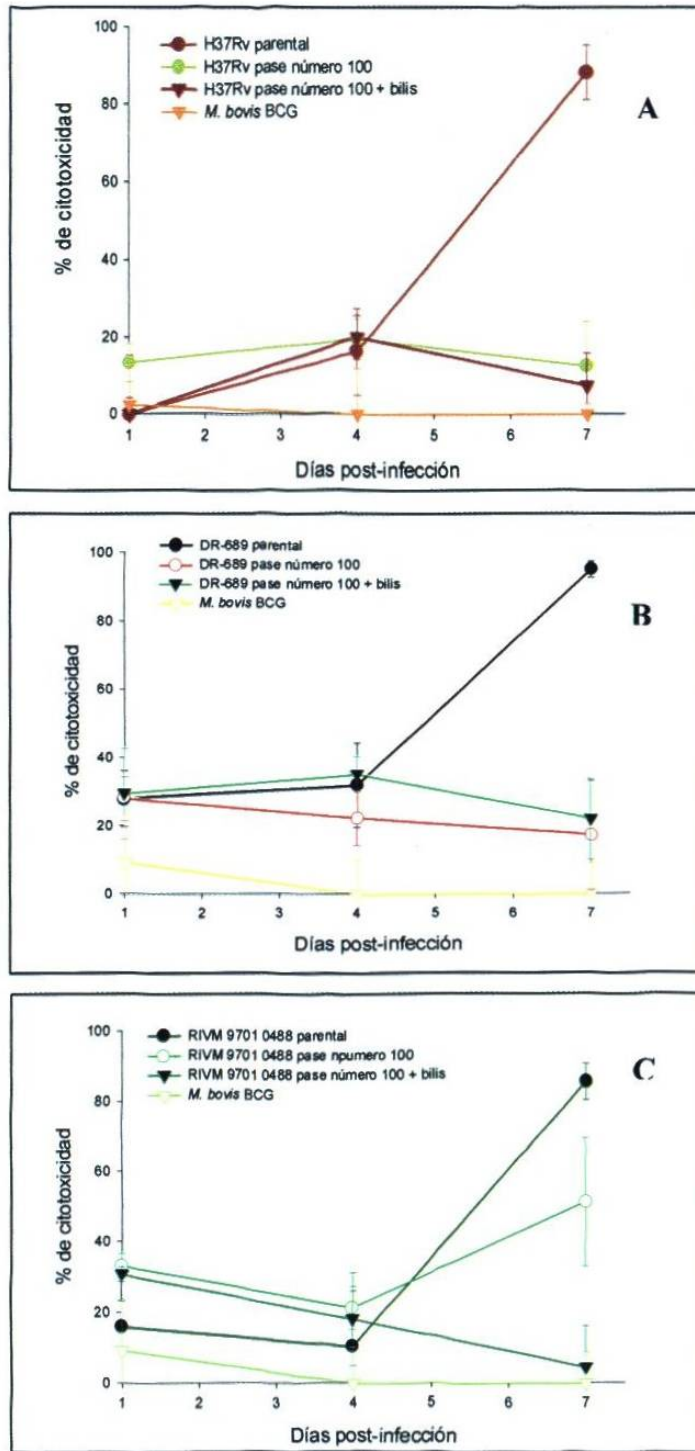
### **7.8. Análisis de Microarreglos en el pase 100.**

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.

<b>Aislamientos de <i>M. tuberculosis</i></b>	<b>Lucio Vera- Cabrera</b>	<b>Cole (Monot M.)</b>	<b>Descripción</b>
<b>RIVM 97-0488</b>	-	<b>Rv0064</b>	Rv0064 (middle)
	Rv1354c	Rv1354c	-
	Rv1355c	Rv1355c	<i>moeY</i>
	Rv1356c	Rv1356c	-
	Rv2101	Rv2101	<i>helZ</i>
	-	<b>Rv2102</b>	-
	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>
	<b>Rv3017c</b>	-	
	-	<b>Rv3018c</b>	PE27a
	-	<b>Rv3019c</b>	<i>esxR</i>
	-	<b>Rv3020c</b>	<i>esxS</i>
	Rv3021c	Rv3021c	PPE47
	Rv3135	Rv3135	PPE50
	-	<b>Rv3323c</b>	<i>moaX</i>
	Rv3324c	Rv3324c	<i>moaC3</i>
<b>RIVM 97-1289</b>	<b>Rv0552</b>	-	
	<b>Rv1519</b>	-	
	Rv1520	Rv1520	-
	<b>Rv2226</b>	-	
	-	<b>Rv2222c</b>	<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
	-	<b>Rv2942</b>	<i>mmp17</i>
	-	<b>Rv2943</b>	
	-	<b>Rv2944</b>	
	-	<b>Rv2945</b>	<i>lppX</i>
	-	<b>Rv2946</b>	<i>pksl</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)

<b>Aislamientos de <i>M. tuberculosis</i></b>	<b>Lucio Vera- Cabrera</b>	<b>Cole (Monot M.)</b>	<b>Descripción</b>
-	-	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
<b>RIVM 97-1389</b>	Rv1524	Rv1524	
	Rv1525	Rv1525	<i>wbbI2</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	
<b>DR-689</b>	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	
<b>97-1177*</b>	-	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	-	-	-

### 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	$3.84 \times 10^6$	0488-100	$2.68 \times 10^7$	0488-100B	$8.87 \times 10^6$
1177	$1.73 \times 10^6$	1177-100	$5.33 \times 10^7$	1177-90B	$2.46 \times 10^7$
1289	$2.4 \times 10^6$	1289-100	$3.38 \times 10^7$	1289-100B	$1.87 \times 10^9$
1389	$2.10 \times 10^6$	1389-100	$2.37 \times 10^7$	1389-100	$2.60 \times 10^7$
DR-689	$2.22 \times 10^6$	DR-689-100	$2.40 \times 10^8$	DR-689-100B	$2.51 \times 10^8$
H37Rv	$7.40 \times 10^6$	H37Rv-100	$3.07 \times 10^7$	H37Rv-100B	$1.29 \times 10^7$
BCG	$2.43 \times 10^8$				

## 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.

## 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

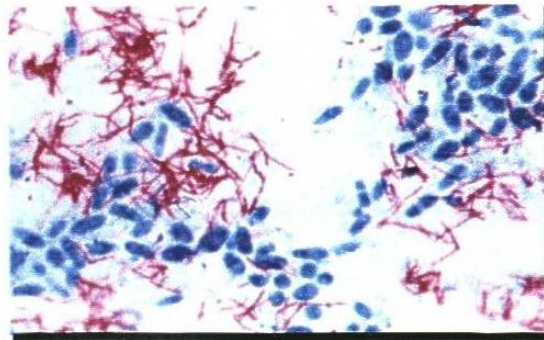
El género *Mycobacterium* es el único en la familia *Mycobacteriaceae*. Las especies de *Mycobacterium* tienen un alto contenido de guanina y citosina (61-71 %) en su ácido desoxirribonucleico genómico (ADN) y un alto contenido lipídico en la pared, probablemente el más alto entre todas las bacterias. *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  $\mu\text{m}$  de largo y 0.2-0.6  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ . 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).

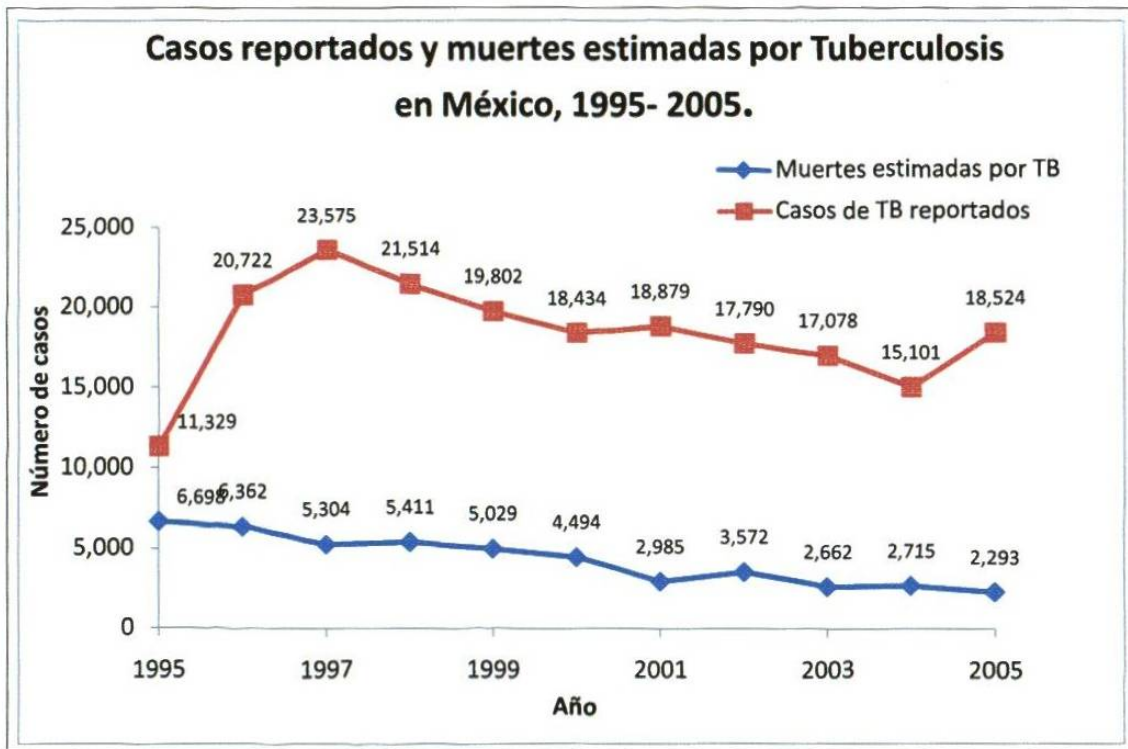
## **2.6. Tuberculosis y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).**

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).



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

### **3. HIPOTESIS**

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

## 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 Específicos:

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/CF10 y *hspX*; la interrupción de los genes ESAT6/CF10 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  $\alpha$ -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	+
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 Lowenstein-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 CO<sub>2</sub>. 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 Lowenstein-Jensen, se recolectaron las bacterias con un asa estéril en un tubo de microcentrífuga conteniendo 500 µl de solución TE IX 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.

## **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'	
<i>Rv2326</i>	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'	
<i>Rv2345</i>	2345-U 5'-CGC CGC GTC GAC CCT ACC A-3'	590
	2345-L 5'-GGC TTG CCG TCC GCT CAC TGC-3'	
<i>Rv2346</i>	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'	
<i>Rv2347</i>	2347-U 5'-CGT CCG CGC AAA ACA TCT CG-3'	171
	2347-L 5'-AGG CCT GCT CTT GCT GCT CGT AGT-3'	
<i>Rv2348</i>	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'	
<i>Rv2352</i>	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'	

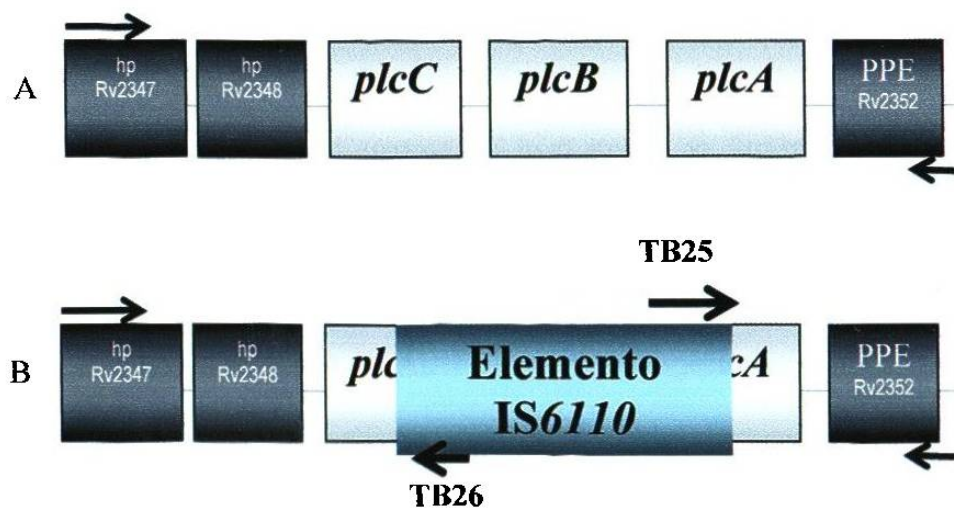
### 6.2.1 Ensayo de PCR.

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 MgCl<sub>2</sub>, 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 microcentrífuga (0.5 ml) con 3 µg de iniciadores aleatorios (1 ml) y se llevaron a un volumen final 42.5 ml con H<sub>2</sub>O (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  $\mu$ l de PE. La columna miniElute se puso en un tubo nuevo de 1.5 ml, se añadieron al centro de la membrana 15.9  $\mu$ l de agua (22 x 22mm LifterSlip) o 30.2  $\mu$ l (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  $\Delta$ 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  $\mu$ g de ADN genómico con la enzima *PvuII* en un

volumen final de 30  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l de las muestras mezcladas con solución de carga 5X a los pozos del gel así como también 4.5  $\mu$ 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  $\mu$ l utilizando 50 nM de cada primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ 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  $\mu$ 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.