CARACTERIZACION GENÉTICA Y EVALUACIÓN DE LOS GENES DE FOSFOLIPASA C DE *Mycobacterium tuberculosis* COMO FACTOR DE CRECIMIENTO INTRACELULAR EN UNA LINEA DE MACRÓFAGOS

RESUMEN

La tuberculosis es causada principalmente por *M. tuberculosis*. En *M. tuberculosis* se han identificado tres genes arreglados en tandem que codifican para fosfolipasa C, los que han sido nombrados *plcA*, *plcB* y *plcC*. Enzimas de este tipo han sido demostradas como factor de virulencia en bacterias intracelulares por su capacidad de destrucción del fagolisosoma, y escape a los mecanismos de destrucción, sin embargo aún no se conoce su importancia en la patogenia de la tuberculosis. Aislados clínicos de *M. tuberculosis* presentan la presencia de variaciones en el patrón de RFLP de los genes *plcA* y *plcB* (Vera-Cabrera, et al, 1997. J. Clin. Microbiol. 35:1190-1195). En el presente trabajo se investigó el origen de este polimorfismo por análisis de secuencia de la región de fosfolipasa de doce aislados clínicos polimórficos. Mediante PCR larga se amplificó un fragmento de 5,131 pb que contiene los genes *plcA* y *plcB* completos y parte del gene *plcC*. Los aislados estudiados produjeron un amplicon de ≈1,400-pb más grande de lo esperado. El análisis de secuencia nucleotídica de los productos de PCR indicaron la presencia del elemento de inserción IS*6110* insertado en cualquiera de los tres genes *plc*, siendo el gene *plcB* el de mayor incidencia (5 de 10 aislados). En dos cepas el elemento de inserción se encontró en el gene *plcA* en la misma posición nucleotídica. En todos los casos, IS*6110* estaba insertado en la misma orientación. El alto índice de transposición en la región de fosfolipasa puede llevar a la excisión de fragmentos de ADN genómico por recombinación de elementos IS*6110* cercanos como lo demuestra la existencia de dos cepas con una deleción de 2,837-pb que incluye *plcA* y la mayor parte de *plcB*. El efecto de la transposición de IS*6110* en la región de las fosfolipasas de cepas de *M. tuberculosis* con genotipos *plcA*::IS*6110*, *plcB*::IS*6110*, *plcC*::IS*6110*, Δ*plcA-plcB* y Δ*plcA-plcB-plcC* sobre la actividad enzimática y su capacidad citotóxica *in vitro* también fue estudiado. La actividad de fosfolipasa C se determinó usando como sustrato 1, 2 dipalmitolil-3-gliceril-fosfatidil-[^{3}H]-colina. La separación del producto de hidrólisis se realizó por cromatografía de capa fina. La radioactividad correspondiente a cada compuesto se determinó en un contador de centelleo líquido. La actividad enzimática mostrada por las cepas de *M. tuberculosis* polimórficas presentó variaciones sin mostrar un decremento significativo. La cepa con la delección de 2,837-pb y la carente de la región de fosfolipasa (Δ*plcA-plcB* y Δ*plcA-plcB-plcC* , respectivamente), mostraron menor actividad enzimática de PLC. Para determinar la capacidad citotóxica se usaron células humanas de la línea THP-1 transformadas a macrófagos con forbol-12-miristato-13-acetato (6.25 pg/ml) en microplacas de 24 pozos. Los cultivos se infectaron con diferente multiplicidad de infección (MDI). La citotoxicidad se monitoreo por microscopía a las 24 h, 48 h y 72 h después de la infección. La citotoxicidad de las cepas polimórficas se vió disminuida. Esta citotoxicidad fue menor con las cepas carentes de los genes de PLC. Estos resultados confirman la importancia de las PLC para la virulencia de *M. tuberculosis*.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una infección bacteriana crónica causada por *Mycobacterium tuberculosis* y en menor porcentaje por *M. bovis*, la cual se caracteriza por la formación de granulomas en los tejidos. Se trata principalmente de una enfermedad pulmonar pero también puede afectar a otros órganos. Aunque esta enfermedad es bien conocida desde la antigüedad, con la aparición del SIDA, ha cambiado su epidemiología y existe una enorme preocupación en todo el mundo por su resurgimiento y por el incremento de resistencia a los fármacos utilizados para su tratamiento (Brosh et al., 2000). Aunque *M. tuberculosis* es uno de los patógenos humanos más importantes, poco se sabe acerca de sus factores de virulencia y de los mecanismos que le permiten resistir la destrucción por el hospedero y multiplicarse dentro de las células fagocíticas mononucleares.

M. tuberculosis posee una secuencia llamada *mtp*40, la cual es una región que es parte de un marco de lectura abierta que codifica para una fosfolipasa C (*plc*A). Este fragmento había sido utilizado en el diagnóstico de PCR para la identificación de *M. tuberculosis* (Sritharan et al., 1994; Weil et al., 1996). Parra *et al.*, (Parra *et al.*,1991) sugirieron que las secuencias de DNA que codifican para *mtp*40 son únicas para *M. tuberculosis* y que no están presentes en otras especies de Micobacterias. Leão *et al.*, (Leão *et al.*, 1995) describieron la clonación y caracterización del gene completo e identificaron un segundo marco de lectura abierto

(ORF) que son homólogos a los genes PLC de *P. aeruginosa*. Los extractos celulares conteniendo este gen clonado en un vector de expresión sobrexpresaron esta proteína y causaron beta hemólisis, sugiriendo una actividad de fosfolipasa (Leao *et al.*, 1995). Johansen *et al.*, (Johansen *et al.*, 1996) obtuvieron la secuencia completa del segundo marco de lectura denominado a estos genes como *plc*A y *plc*B . Estos genes micobacterianos están arreglados en la misma orientación separados por 191 pares de bases. Ambos genes fueron clonados en *M. smegmatis* y la actividad fosfolipasa de cada gen fue expresada. Utilizando los genes *plc*A y *plc*B como sondas bajo condiciones de moderada astringencia se identificaron secuencias homólogas de *M. bovis*, *M. bovis* BCG y *M. marinum*, pero no en otras especies de *Mycobacterium*. Los autores encontraron que extractos celulares de *M. tuberculosis* contienen actividad de fosfolipasa C (PLC) y de fosfolipasa D (PLD), pero esta actividad no la encontraron en sobrenadantes libres de células de estos microorganismos. Por estos resultados ellos asociaron la presencia de la actividad de PLC con las especies de *Mycobacterium* de mayor virulencia (Johansen *et al.*, 1996).

Vera-Cabrera *et al.*, (Vera-Cabrera *et al.*, 1997) estudiaron la distribución de *mtp*40 por PCR utilizando una colección de aislados clínicos de *M. tuberculosis* y observaron que algunas de las cepas no producían el amplicon (Vera-Cabrera *et al.*, 1997). Con el fin de descartar la presencia de mutaciones o deleciones en los sitios de alineamiento de los iniciadores que explicaran estos resultados negativos, realizaron un

ensayo de Southern blot usando la enzima de restricción *Pvu*II y como sonda un producto de PCR correspondiente al gene *plcA*. Observaron que tanto la cepa H37Rv como la H37Ra presentaron dos bandas: una de 0.75 kpb que corresponde a *plcA* y una banda de 2.1 kpb que corresponde a *plcB* y tiene una hibridación cruzada con la sonda para *plcA*. Algunas de las cepas analizadas presentaron variaciones de este patrón, presentando bandas extras o un cambio en el peso molecular de la banda correspondiente al gene *plcB* de 2.1 a 2.5 kpb, a estas cepas las agruparon en un grupo denominado D (Vera-Cabrera *et al.*, 1997). Otros de los aislados clínicos presentaron cambios en ambos genes o fueron negativos en el análisis de Southern blot.

Las fosfolipasas son importantes factores de virulencia en bacterias intracelulares como, *Clostridum perfingens*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes* y el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*. Además considerando que en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* existen diferencias importantes en esta región de PLC, en este trabajo se planteó estudiar la importancia de estas enzimas en la virulencia de *M. tuberculosis*. Analizamos la secuencia nucleotídica de un amplicon conteniendo los genes *plc*A, *plc*B y parte de *plc*C para determinar el origen del polimorfismo. Las cepas estudidas presentaron un amplicon de 1,400-pb más grande que el esperado de 5,131-pb, y al realizar el análisis de la secuencia nucleotídica de los productos de PCR indicaron la presencia de elementos de inserción IS*6110*. Estos elementos fueron encontrados en la

misma dirección e interrumpiendo cualquiera de los tres genes de PLC de las cepas polimórficas de *M. tuberculosis.* El alto indice de transposición en la región de PLC puede llevar a la excición de fragmentos de ADN genómico por recombinación homóloga de dos elementos IS*6110* cercanos , como lo demuestra dos cepas con una deleción de 2,837-pb, que incluye el gen *plc*A y parte del gen *plc*B. Esta interrupción, se manifestó en cambios de la actividad enzimática de las cepas y disminución del efecto citotóxico en una monocapa de macrófagos de la línea THP-1.

1.- ANTECEDENTES

1.1 Características generales del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Las especies *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *M. canetti* y *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto*, forman el grupo bacteriano denominado complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Imaeda,1985; O'Reillg y Daborn,1995). Distinguir entre los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* es importante para realizar estudios epidemiológicos. La diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* permite descartar casos producidos por *M. tuberculosis* resistentes a pirazinamida (*M. bovis* es resistente natural a esta droga), y para identificar animales infectados que actúen como reservorios y que por lo tanto constituyan un riesgo a la salud pública (Mahairas *et al.*,1996).

Los métodos clásicos para diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis* se basan en sus características fenotípicas, las cuales incluyen morfología de la colonia, tasa de crecimiento y propiedades bioquímicas distintivas. En medios de cultivo a base de huevo, *M. tuberculosis* tiene un crecimiento exuberante junto con una alta producción de niacina, mientras que *M. bovis* no produce la vitamina y su crecimiento es pobre en el mismo medio de cultivo (Mahairas *et al.*,1996). Existen análisis adicionales como la actividad de la enzima nitrasa, donde *M. tuberculosis* reduce los nitratos, mientras que *M. bovis* no. Otra prueba adicional para la diferenciación es la determinación de la resistencia natural a la pirazinamida en *M. bovis* (Imaeda, 1985).

Por otro lado, la utilización de algunos marcadores genéticos, como es la identificación de secuencias de inserción tales como IS*6110*, IS*1081*, y secuencias como las DR (repeticiones directas), MPTR (repeticiones directas polimórficas en tandem), PGRS (secuencias ricas en GC polimórficas) y MIRU (unidades micobacteriales repetidas intercaladas) han sido útiles para estudios epidemiológicos y para relacionar fuentes de infección.

Aunque *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* y *M. tuberculosis* están designadas como especies separadas, los estudios clásicos en taxonomía y estudios de sus ácidos nucleicos relacionan a todas ellas como variantes de una sola especie (Liébana y col. 1996; Moda *et al.*,1996), de las cuales solo se consideran patógenos importantes para el hombre *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

M. tuberculosis es un parásito intracelular que se replica dentro de las células mononucleares encargadas de la fagocitosis del material extraño (King *et al.*,1993; McFadden,1990; Castro-Garza *et al.*,2002). *M. tuberculosis* produce lesiones granulomatosas, principalmente en pulmón, aunque también se ha observado invasión a otros tejidos, tales como el aparato genitourinario, los riñones, el aparato digestivo y el sistema nervioso central (Hopewell, 1994).

M. bovis es el responsable de la tuberculosis en bovinos y otros animales salvajes. El grado de virulencia de *M. bovis* se muestra no solamente para los bovinos sino también hacia el hombre, aunque con *M. bovis* han sido reportados, solo un pequeño porcentaje de casos de tuberculosis humana (Huebner y Castro, 1995; Singer *et al.*,1997; Saunders, 1995). Reportes de problemas de tuberculosis en humanos por *M. bovis* indican que se tienen una

mayor frecuencia en países en vías de desarrollo, donde existe una alta prevalencia de tuberculosis en el ganado, el cual tiene una estrecha relación con la población humana y el consumo de leche sin pasteurización (Moda *et al.*,1996). En los Estados Unidos de Norte América la proporción de casos de tuberculosis humana por *M. bovis* es del 0.1 hasta el 3%, del total de los casos reportados, sobre todo en la frontera con México (Huebner y Castro, 1995). En Egipto, las proporciones reportadas varian en el orden del 0.41 al 6% (Rook y Hernández-Pando, 1996).

1.2 Aspectos Clinicos y Epidemiológicos de la tuberculosis

M. tuberculosis se adquiere por vía respiratoria y pasa al tejido alveolar donde se establece como una infección primaria, que en el 90-95% de los casos permanece asintomática, y solo es reconocida por el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad tardía a un filtrado de cultivo de *Mycobacterium*, conocido como PPD (derivado proteico purificado). En el 5-10% de los casos restantes se desarrolla una infección de evolución crónica que se caracteriza por la producción de tos, fiebre, pérdida de peso, producción de esputo purulento y en ocasiones hemoptisis (Hopewell,1994). La tuberculosis pulmonar es una enfermedad tratable, sin embargo, se siguen produciendo un gran número de casos debido a diversos factores tales como la falta de accesibilidad a servicios de salud, la falta de instalaciones adecuadas para hacer un diagnóstico correcto oportuno, por la falta de continuidad del tratamiento y a la deficiencia de medicamentos en muchos casos. A nivel

mundial, la tuberculosis produce 3 millones de muertos y la aparición de aproximadamente 8 a 12 millones de casos nuevos por año; se considera que dos billones de personas en el mundo se encuentran infectadas con *M. tuberculosis*, y que esta cantidad se ha incrementado debido a la diseminación de cepas drogo resistentes y a la co-infección con el virus VIH-1. (Dolin *et al.*,1998 ;Kusner,2002; Penskivit *et al.*,2002; OMS, 2002).

A pesar de que *M. tuberculosis* fue uno de los primeros organismos patógenos descritos para el humano (Koch, 1882), hasta ahora no se han obtenido métodos adecuados para su control. El bacilo Calmette y Guerin (*M. bovis* BCG) se ha utilizado como vacuna contra la tuberculosis desde 1921 pero el rango de protección obtenida varia del 80 al 0% (Clemens *et al.*,1983;). Por lo que es importante dilucidar los mecanismos de patogénesis de este microorganismo para poder desarrollar nuevas y más adecuadas formas para su control.

Se han descrito algunos genes que se consideran factores de virulencia en *M. tuberculosis*, entre ellos están el gene *kat*G que codifica para la enzima catalasa-peroxidasa (Stoeckle *et al.*,1993), el gene *erp* que codifica a una proteina repetitiva exportada (Wilson *et al.*,1998), el gene *acr* que codifica la proteina α-cristalina que inhibe la capacidad para crecer en líneas celulares de macrófagos (Yuan *et al.*,1998). Por otro lado, una mutación en el principal factor sigma (J) causa menor virulencia en cepas del complejo *M. tuberculosis* (Collins *et al.*,1995), un simple punto de mutación en la región del gene *rpo*V que regula la expresión génica es responsable de la pérdida de virulencia en *M. bovis*, y miembros del complejo *M. tuberculosis* (Steyn *et al.*,2002). Algunos

componentes lipídicos de la pared como el lipoarabinomanano y los sulfolípidos tienen un papel en la modulación de la respuesta inmune y protegen al organismo de las defensas del hospedero (Chan *et al.*,1991). El gene *AhpC* (alkyl hydroxiperoxio reductasa) le confiere mayor resistencia a la isoniazida (Heym *et al.*,1997). Otros genes codifican proteinas relacionadas a hemoglobina que lo protegen contra el estrés oxidativo y el gene *hmp* que le confiere resistencia al estrés oxidativo o nitrosativo (Hu *et al.*,1999).

Otro factor a considerar son las fosfolipasas presentes en *M. tuberculosis*. Estas enzimas son un factor importante de virulencia en un gran número de bacterias incluyendo *Clostridum perfingens* (Ninomiya *et al.*,1994, Naylor *et al.*,1999), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Titball *et al.*,1993), el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes* (Schwarzer *et al.*,1998) y el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* (Terada *et al.*,1999).

1.3- Fosfolipasas Bacterianas

Las fosfolipasas bacterianas comprenden un grupo diverso de proteínas que tienen un amplio espectro de efectos *in vivo* e *in vitro;* sus efectos van desde pequeñas alteraciones en la composición y función de la membrana celular hasta letalidad a bajas concentraciones (Songer,1997). A la fecha han sido descritas cinco tipos de fosfolipasas (PL), las cuales se clasifican dependiendo del punto de hidrólisis en el fosfolípido, como es mostrado en la siguiente figura:

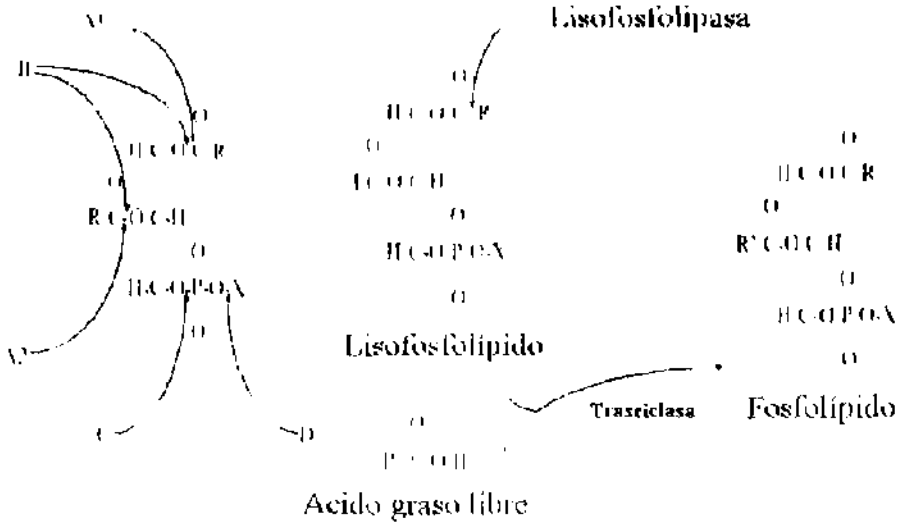


Figura 1. Punto de hidrólisis de las diferentes fosfolipasas

La fosfolipasa que hidroliza el acyl-ester del carbono de la posición 1 del glicerol es designada fosfolipasa A_1 (PLA_1) y la que hidroliza el enlace en la posición 2 del glicerol se denomina fosfolipasa A_2 (PLA_2). Aquellas enzimas que hidrolizan el enlace fosfodiéster del lado del glicerol se llaman fosfolipasa C (PLC) y las que cortan el enlace fosfodiéster del lado polar se nombran fosfolipasas D (PLD) (Dennis, 1983). Las PLC se han clasificado en dos grupos de acuerdo al principal fosfolípido que hidrolizan: un grupo de PLC hidroliza especificamente al fosfatidilinositol, no requieren de cationes divalentes para su actividad, su pH óptimo es el neutro y tienen un peso molecular de alrededor de 29-kDa. El segundo grupo lo componen las PLC que tienen un amplio espectro para hidrolizar diferentes fosfolipidos, son dependientes de cationes, presentan también un pH óptimo neutro y su peso molecular es de alrededor de 23-kDa (Meij y Panagia, 1992).

Las PLC se han descrito como factores de virulencia debido a varias caracteristicas tales como su capacidad destructiva tisular (Williamson y Titball,

1993), y a que actúan como factores de sobrevivencia y escape de los mecanismos fagocíticos (Songer, 1997). Un claro ejemplo ocurre en *Listeria monocytogenes*, un patógeno intracelular que posee dos PLC, una que degrada específicamente el fosfatidilinositol (FI-PLC ó PLC-A, codificada por el gen *plcA*) y una PLC de amplio espectro (FC ó PLC-B codificada por el gen *plcB*), que puede hidrolizar la mayoria de los fosfolipidos celulares. Su importancia en la virulencia de *L. monocytogenes* fue demostrada en un modelo en ratones con bacterias mutantes con deleción en el marco de lectura (ORF) en cada una de las PLC y una mutante doble con perdida de ambas PLC. El mutante sin el gen B (PLC-B) fue 20 veces menos virulento y perdió su capacidad de diseminarse de célula a célula, aunque no presentó un efecto medible en el escape de la vacuola primaria fagolisosómica. El mutante con inactivacion de ambos genes (PLC-A y PLC-B) fue 500 veces menos virulento que la cepa original, presentando una notable disminución es su capacidad para escapar de la vacuola primaria, y en su capacidad de diseminarse de célula a célula (Smith *et al.*,1995).

La actividad de PLC puede ser importante también para la generación de diacilglicerol (DAG), el cual es un producto de la hidrólisis de fosfolípidos que altera los procesos de señalización de la célula a través de la activación de la proteina cinasa C de la membrana celular (Songer,1997; Martin, 1998). A nivel de la respuesta inflamatoria, esta reacción puede ser amplificada a través de la producción de metabolitos del DAG, tales como los eicosinósidos, y también puede ser citotóxica o inducir apoptosis, como en el caso de la

fosfolipasa FLC-H de *P. aeruginosa* (Songer,1997 Costa, 1998; Ostroff *et al.*,1989).

1.4- Fosfolipasas C en *Mycobacterium tuberculosis*

El gene que codifica para una de las fosfolipasas C de *M. tuberculosis* contiene la región *mtp*40. Dada la especificidad de esta secuencia se había utilizado en el diagnóstico por PCR para la identificación de *M. tuberculosis*, aunque existía controversia en cuanto a su distribución en *M. tuberculosis* (Liébana *et al.*,1996). La secuencia fue clonada originalmente en un fragmento *BamHI* de 3.1-kbp (Parra *et al.*,1991). Posteriormente, Leão y col. (Leão *et al.*,1995) obtuvieron la secuencia completa de este fragmento y reportaron el hallazgo de un marco de lectura abierto (ORF), de 1584-pb , y los primeros 1004-pb de un segundo ORF, estos autores no reportan actividad de PLC en *E. coli* recombinante, pero si detectaron actividad hemolítica al clonarlo en *E.coli*; sugiriendo que se codifican proteínas con actividad similar a las PLC. Hasta esa fecha la actividad de las PLC no había sido demostrada plenamente en *M. tuberculosis*.

Johansen *et al.*, (Johansen *et al.*,1996) describieron el fragmento de *plc*B que faltaba y que tiene un total de 1563-pb, lo que codifica para un polipéptido de 521 aminoácidos, que presenta una homología del 75% con el gen *plcA*. Con la publicación de la secuencia completa del genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*,1998), se identifica otro gen al lado de *plc*B en la posición 2351 del genoma, el cual se denomino *plc*C; y una cuarta

secuencia trunca denominada *plc*D situada en la posición 1755 del genoma (Cole *et al.*,1998). En la secuencia de la cepa de *M. tuberculosis* CDC1551 existen cuatro genes completos (*plc*A, *plcB*, *plc*C y *plcD*) para fosfolipasa C (Fleischmann *et al.*,2002). Estos genes codifican enzimas con el 30 al 40% de homología en la secuencia de aminoácidos con las fosfolipasas de *P. aeruginosa* y una homología entre ellas del 70% (Raynaud *et al.*,2002). Los genes *plc*A, *plc*B y *plc*C no están presentes en *M. bovis* y *M. bovis* BCG, a diferencia del gen *plc*D que si se encuentra presente (Gordon *et al.*,1999); por lo que la actividad enzimática detectada por Johansen *et al.*, (1996) en *M. bovis* podría ser dada por el gen *plc*D.

Vera-Cabrera *et al.*,(Vera-Cabrera *et al.*,1997), al analizar la presencia de la secuencia *mtp*40 en *M. tuberculosis* de aislamientos clínicos, encontraron que existían cepas que no amplificaban el fragmento *mtp*40 por PCR. Para descartar que la falta de amplificación fuera debido a mutaciones puntuales o deleciones que interfirieran con un alineamiento adecuado de los iniciadores, realizaron ensayos de Southern blot utilizando como enzima de restricción *Pvu*II y una sonda para el gen *mtp40* (*plc*A) (Vera-Cabrera *et al.*,1997). La sonda utilizada también hibridó con el gen *plc*B debido a la similitud entre estos dos genes. Tomando en cuenta los puntos de corte de la enzima *Pvu*II en la región de fosfolipasa C, el mapa de restricción (Figura 2) indica la presencia de un fragmento de 0.75 y otro de 2.1 Kpb correspondientes a los genes *plc*A y *plcB* respectivamente. Vera-Cabrera *et al.*, (Vera-Cabrera *et al.*,1997) encontraron que la mayoría de las 140 cepas analizadas presentaban el patrón normal de 0.75 y 2.1 Kpb, sin embargo el 43% de las cepas mostraron

variación en su patrón, presentando bandas de hibridación adicionales de 0.6 o bien 1.2 kpb, y otras cepas presentaban bandas de 2.5 kpb en el lugar de la de 2.1 kpb.

En el grupo de cepas polimórficas a la región de fosfolipasa C denominado por Vera-Cabrera *et al.*, (Vera-Cabrera *et al.*,1997) como grupo E, en donde no se presenta un patrón definido de bandas de hibridación cuando se utilizó una sonda para el gen *plcA* y en misma membrana con una sonda para el gen *plcB*, observaron diferencias importantes.

Dada la importancia de las fosfolipasas como factor de virulencia en bacterias intracelulares y que en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* existen diferencias importantes en la región de PLC, en este trabajo nos planteamos estudiar la importancia de estas enzimas en la virulencia de *M. tuberculosis*. En la presente tesis de doctorado analizamos las diferencias que se producen en diversas cepas de *M. tuberculosis* y que se reflejan en un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de la zona de fosfolipasa C. Además estudiar, si estas diferencias modifican la expresión del fenotipo en cuanto a la actividad enzimática de PLC y su capacidad citotóxica en macrófagos humanos.

1.5-Hipótesis

La presencia o ausencia de genes que codifican para fosfolipasa C se reflejará en un cambio de la actividad enzimática, y si los productos de estos genes son importantes en la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* podremos analizarlo por la capacidad de la bacteria para producir efecto citotóxico en macrófagos.

1.6- Objetivos

1. Identificar las variaciones en la región de *plc* de cepas de *M. tuberculosis* con polimorfismo.

2. Conocer que gen específico esta alterado en las cepas polimórficas.

3. Determinar si los cambios genéticos en los genes de fosfolipasa C de las cepas polimórficas se refleja en la actividad enzimática.

4. Determinar si los cambios genéticos de estos genes altera la citotoxicidad de *M. tuberculosis.*

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1 Cepas Bacterianas de *M. tuberculosis*

La mayoria de las cepas usadas en este estudio fueron obtenidas del Laboratorio Nacional de Referencia para la Tuberculosis en Winnipeg, Canadá. Todas las cepas fueron identificadas como *M. tuberculosis* por métodos convencionales. Las cepas se mantuvieron almacenadas a -70°C en leche descremada y fueron subcultivadas en medio Middlebrook 7H9 (DIFCO Sparks, MD). Una caracteristica de las cepas incluidas en el estudio fue el polimorfismo a la región de la fosfolipasa. La mayoria de las cepas mostraban un patrón de bandas distinto entre ellas en el análisis por Southern blot cuando se utilizó una sonda para el gene *plc*A y diferente al normal que presenta la cepa H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 3b). El ADN genómico de dos cepas que fueron publicadas como cepas polimórficas en un estudio realizado por Kremer *et al.*, (1999), y que denominamos RIVM-7 y RIVM-13, fueron gentilmente donadas por la Dra. Kristin Kremer del Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente en Bilthoven (RIVM), Holanda (Kremer *et al.*,1999) .

2.2 Extracción del ADN Genómico

Las bacterias se cultivaron en 5 mL de medio Middlebrook 7H9 (Gibco, Sparks, MD) por 14 días en incubación a 37°C. Después de la incubación, el cultivo se centrifugó (HermLe Z 2160 M, Hersteller Spintron Inc, Alemania) a

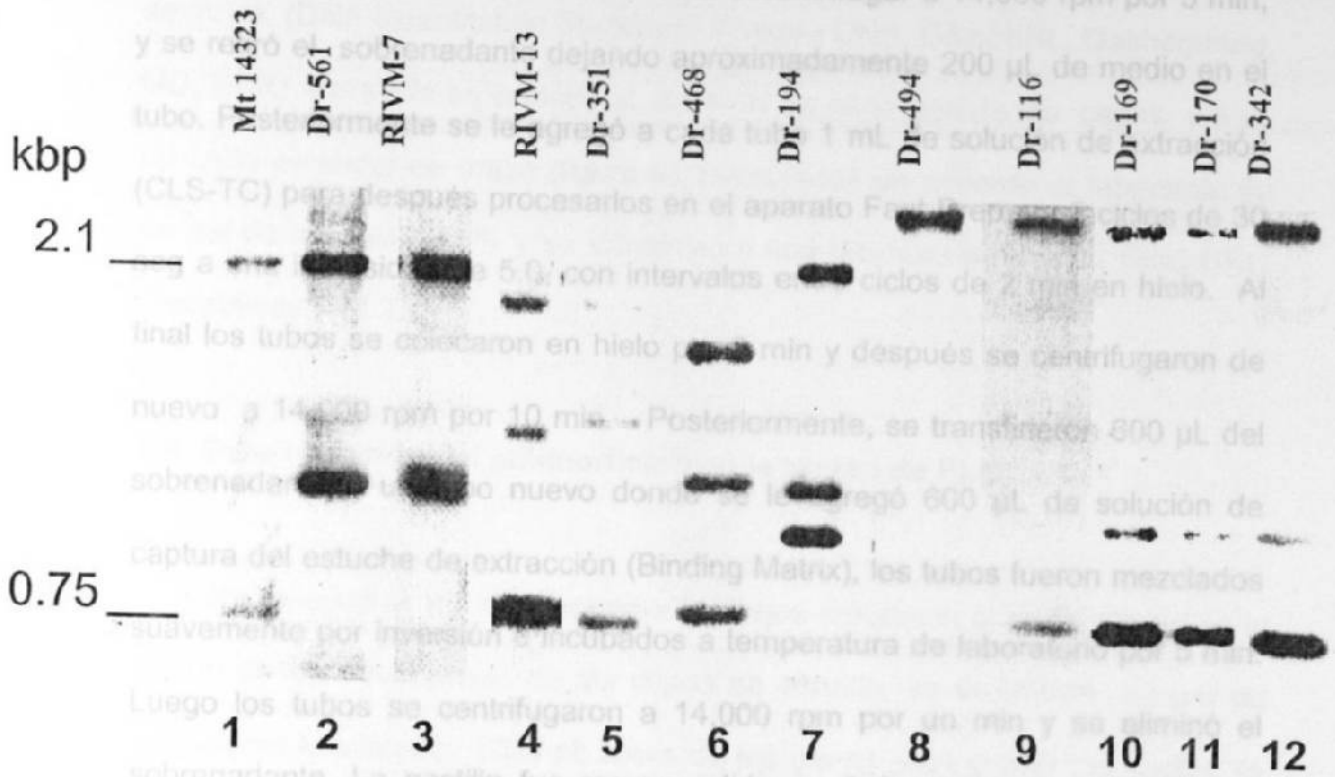


Figura 3.-Análisis por Southern blot de las cepas de *M. tuberculosis* estudiadas en este trabajo. Las membranas con el ADN transferido se incubaron con una sonda de PCR preparada con los iniciadores PT1 y PT2, que amplifica una región de 396-pb cercana al extremo 3, del marco de lectura de *plcA*. Esta sonda reacciona con el fragmento de 0.75-kbp que contiene *plcA* y con el fragmento de 2.1 -kbp que corresponde a *plcB* y parte de *plcC*. Como control mostramos en el carril 1 la cepa de M *tuberculosis* 14323 que muestra el patrón normal observado en la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* (>80%).

14,000 rpm durante un min y el sedimento se transfirió a un tubo de plástico de 2.0 mL que contenía una esfera de cerámica y perlas de vidrio que son parte del estuche de extracción Fast DNA-Kit (BIO101, Inc., Carlsbad, Ca). El cultivo ya en el tubo de 2.0 mL se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 5 min, y se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 200 µL de medio en el tubo. Posteriormente se le agregó a cada tubo 1 mL de solución de extracción (CLS-TC) para después procesarlos en el aparato Fast-Prep por 2 ciclos de 30 seg a una intensidad de 5.0, con intervalos entre ciclos de 2 min en hielo. Al final los tubos se colocaron en hielo por 5 min y después se centrifugaron de nuevo a 14,000 rpm por 10 min. Posteriormente, se transfirieron 600 µL del sobrenadante a un tubo nuevo donde se le agregó 600 µL de solución de captura del estuche de extracción (Binding Matrix), los tubos fueron mezclados suavemente por inversión e incubados a temperatura de laboratorio por 5 min. Luego los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por un min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en 500 µL de otra solución del estuche de extracción denominada SEWS-M y se centrífugo nuevamente a 14,000 rpm por un min para posteriormente eliminar el sobrenadante y centrifugar por otros 10 seg para remover todo el líquido residual. Para eluir el ADN de la matriz de unión, se resuspendió en 100 µL de la solución DES del estuche de extracción y se dejó incubar por 3 min a temperatura de laboratorio; se centrifugó a 14,000 rpm por un min, y el sobrenadante obtenido (que contiene el ADN), fue guardado a –20°C hasta su cuantificación y uso.

2.3 Cuantificación del ADN genómico de las cepas de *M. tuberculosis*

El ADN extraído se cuantificó por medio de comparación con estándares de masa (DNA Quantitation Standards Phage λ DNA, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, EUA). Para ello se colocó1 µL de ADN de cada una de las cepas y 6 µL de cada estándar de masa (figura 4), preparados de acuerdo al fabricante en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron con bromuro de etidio (GibcoBRL, Piscataway, N.J. EUA).

2.4 Determinación del polimorfismo en la región de PLC

Para determinar los cambios genéticos que conducen al polimorfismo en la región de las fosfolipasas de las cepas en estudio, se diseñaron un par de iniciadores localizados 1000-pb fuera de los genes *plcA* y *plcB* , lo cuales se muestran en la Tabla 1. El diseño de los iniciadores solo contempló los genes *plc*A y *plc*B ya que en el momento en que fueron diseñados todavía no se conocía que existiera el gen *plc*C. El tamaño esperado para el amplicon fue de 5,131 pb. El ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con 100 ng de ADN genómico en un termociclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, Massachussets, EUA) utilizando el sistema de XL P R Kit, de Perkin Elmer (Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, New Jersey, EUA) en un volumen de reacción de 50 µL, con las siguientes condiciones: 94°C por 2 min, seguidos por 10 ciclos de 94°C por 15 seg, 60°C por 30 min y

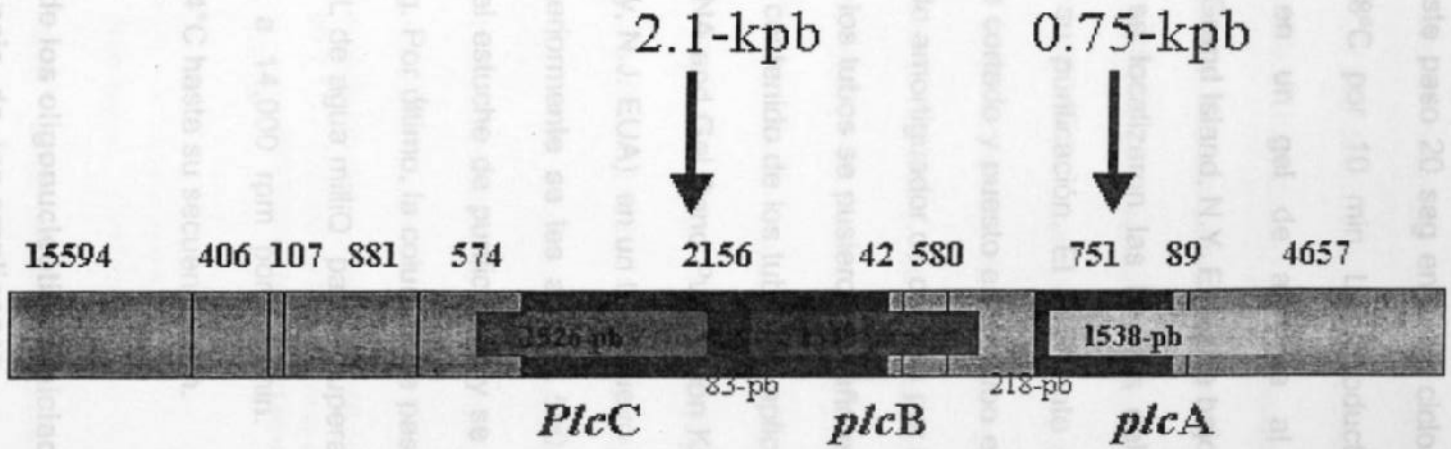


Figura 2.- Mapa físico de los puntos de corte con *Pvu*II en la región de fosfolipasa C en *M. tuberculosis*. Las flechas en 2.1 y o.75-kpb, indican los fragmentos del patrón normal de bandas que hibridizan con la sonda para el gene *plc*A. Los sitios de restricción son tomados del segmento 103/162 del genoma de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. (Cole y col. 1998)

68°C por 4 min. Enseguida se dio una segunda ronda de 20 ciclos a temperaturas de: 94°C por 15 seg, 60°C por 30 seg y 68°C por 4 minutos, añadiendo a este paso 20 seg en cada ciclo. Al final se aplicó un paso de extensión a 68°C por 10 min. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (L.M.P. Agarosa, Life Technologies, Grand Island, N.Y. EUA) de bajo punto de fusión. Después de la electroforesis, se localizaron las bandas del producto amplificado y fueron cortadas para su purificación. El fragmento de gel conteniendo el producto amplificado fue cortado y puesto en un tubo eppendorf de 1.5 mL donde se le agregó 10 µL de amortiguador de captura por cada 10 mg de gel cortado. Para la purificación, los tubos se pusieron a baño maría a una temperatura de 60°C por 10 min. El contenido de los tubos se aplicó a las columnas del estuche de purificación (DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, N.J. EUA) en un tubo nuevo y centrifugados a 14,000 rpm por 30 seg. Posteriormente se les agregó 500 µL de una solución de lavado contenida en el estuche de purificación y se volvieron a centrifugar a 14,000 rpm por 30 seg. Por último, la columna se pasó a tubos nuevos de 1.5 mL y se le agregó 30 µL de agua milliQ para recuperar el amplicon purificado después de centrifugar a 14,000 rpm por un min. Los amplicones purificados se refrigeraron a 4°C hasta su secuenciación.

2.5 Síntesis de los oligonucleótidos iniciadores y análisis de secuencia de los amplicones

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron preparados en un sintetizador 392 DNA-RNA (Applied Biosystems, Foster City, Cal. EUA) mediante el método estándar de la fosforoamidita. La secuencia de los productos de PCR fue determinada con el sistema de secuenciación Prism Dye Terminator (Applied Biosystems) en un secuenciador automático ABI377 en el DNA core facility del Federal Laboratories for Health, en Winnipeg, Canadá.

Cuando se realizó la secuenciación del amplicon de una de las cepas del estudio, la secuencia de uno de los extremos del amplicon TB20-TB21 correspondía a la de un elemento IS*6110*. Con la finalidad de que el análisis fuera más simple, se diseñaron otros iniciadores denominados TB25 y el TB26 (Operon Technologies, Inc, Alameda, CA. EUA), situados en la posición 90-71 y posición 1272-1293 de la secuencia de inserción IS*6110*, respectivamente (Thierry *et al.*,1990) (Tabla1). Estos iniciadores se alinean a una región cercana al final del elemento IS*6110* y están dirigidos hacia fuera del elemento, por lo que al realizar esta amplificación se detectó el sitio exacto de inserción con una sola corrida, como se muestra en la siguiente figura:

Figura 1a

Localización de los iniciadores TB-25 y TB-26 en la posición 71-90-pb y 1272-1293-pb de la secuencia del elemento móvil IS*6110* de *Mycobacterium tuberculosis* (Thierry y col, 1990)

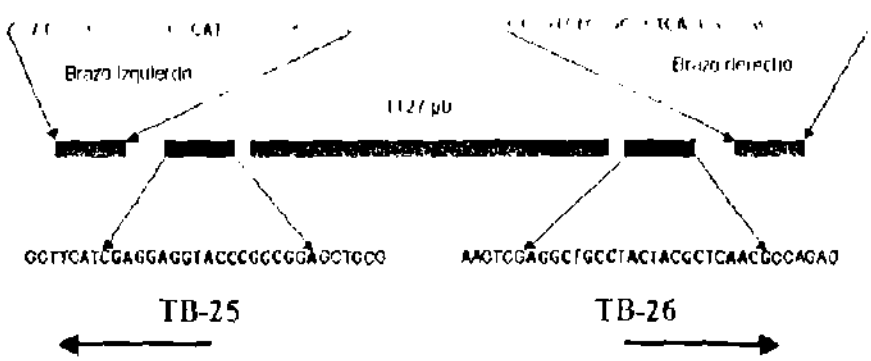


Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para las PCR realizadas en el presente trabajo.

INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO ESPERADO (pb)
PT1*	5'- CAA CGC GCC GTC GGT GG-3'	391
PT2*	5'- CCC CCC ACG GCA CCG C-3'	
INS1**	5' - CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3'	243
INS2**	5' - CGT AGG CGT CGG TGA CAA A-3'	
TB20***	5' - CGC AGC AAC CTT ATC AAG T-3'	5131
TB21***	5'- GTG ATT GTC GGC GAA ATG AAG T-3'	
TB25***	5' – CTC CGG CGG GTA CCT CCT CG-3'	Final brazo Izq. *IS*6110
TB26***	5' – AGG CTG CCT ACT ACG CTC AAC G-3'	Final brazo Der. *IS*6110

* Del Portillo y col., 1991 *** El presente estudio

** Van Embden y col.,1993

2.6 Preparación de la sonda del brazo derecho de IS*6110*.

La sonda utilizada fue amplificada por PCR con los iniciadores INS1 y INS2 (Tabla 1) en un volumen de reacción de 50 µL. Estos iniciadores amplifican un fragmento de 243-pb del brazo derecho de IS*6110*. El amplicón obtenido se corrió por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1% a 60 volts por 40 min. Después de identificar la banda de 243-pb, esta fue cortada del gel y depositada en un tubo eppendorf de 1.5 mL para ser purificada mediante el kit de purificación (DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech Inc,) Piscataway, N.J. EUA) siguiendo el mismo procedimiento explicado ya en el punto 2.4. Su cuantificación se realizó por comparación con estándares de masa (DNA Quantitation Standards Phage λ DNA, GibcoBRL, Gaithersburg, MD. EUA) en un gel de agarosa al 1% (GibcoBRL, Grand Island, N.Y. EUA). Para el marcaje de la sonda se colocaron 6 µL del amplicón (100 ng/µL) en tubo de 1.5 mL eppendorff. Al tubo se le agregaron 44 µL de agua miliQ estéril y se centrifugo a 14,000 rpm por 30 seg en una centrifuga 5417 Eppendorf (Brinkmann Instruments, Inc. Westbury, NY. EUA). El tubo se calentó hasta ebullición durante 5 min para desnaturalizar el amplicon. Después de este tiempo el tubo se pasó a hielo inmediatamente para conservar las cadenas del ADN abiertas, y se dejó ahi por 5 min. El tubo se centrifugó otra vez por 30 seg, se le agregaron 50 µL del reactivo de marcaje (peroxidasa) y se mezcló vigorosamente. Se le agregaron 50 µL de glutaraldehido, se mezcló bien y se centrifugó brevemente en la microcentrifuga para colectar el contenido en el

fondo del tubo. Después se incubó a 37° C por 10 min. La sonda marcada se agregó a los tubos de hibridación como se menciona enseguida.

2.7 Determinación de la clonalidad de las cepas en estudio

Para determinar el origen clonal de las cepas se utilizaron 2 µg de ADN genómico que fueron digeridos con 5U de la enzima *Pvu*II (Stratagene, la Jolla, Cal. EUA) por 4 h a 37ºC. La separación electroforética de los fragmentos digeridos se realizó en un gel de agarosa al 0.8% a 30 Volts durante toda la noche. Al día siguiente el gel se sumergió en HCl 0.25 M por un tiempo de 10 min con agitación suave y constante. El exceso de HCl 0.25 M se eliminó mediante lavados con agua bidestilada. Posteriormente el gel se colocó en un recipiente conteniendo NaOH 0.25 M y se incubó por 30 min con agitación constante. Después de los lavados del gel, el ADN, fue transferido a una membrana de nylon usando el sistema turboblotter (Schleicher & Schuell, Keene, NH. EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para pre-hibridizar, la membrana se humedeció con SSC 2X (citrato de Na_3 al 0.3 M, NaCl al 3M con pH 7.0) y se colocó en una malla. La membrana y la malla se colocaron en un tubo de hibridación en donde se agregaron 80 mL de SSC 2X para pegar la malla a la pared del tubo de hibridación y después se retiró el SSC 2X. Se añadieron 10 mL de solución de hibridación precalentada y el tubo se colocó en el horno a 42°C cuidando que no se formarán burbujas. Después de una hora de incubación se agregó la sonda (ver la preparación en el punto 2.6), para lo cual se tomaron 0.5 mL de solución de hibridación y se mezcló con

la sonda, la mezcla se agregó al se fondo del tubo de hibridación sin tocar el filtro, se lavó la puntilla en la solución de hibridación 1 ó 2 veces. La membrana se incubó toda la noche a 42°C en un horno de hibridación Autoblot (Bellco, Glass. Inc, Vineland, N.J. EUA), con la sonda marcada con peroxidasa de acuerdo al estuche ECL (ECL, Amersham, LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, Inglaterra). La hibridación, lavado y el revelado de las membranas se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.8 Preparación de los extractos celulares micobacterianos

Las cepas de *M. tuberculosis* fueron sembradas en tubos con 5 mL de medio Middlebrook 7H9 (DIFCO, Sparks, MD. EUA) enriquecido con OADC (Becton Dikinson and Co. Sparks, MD. EUA) y glicerol e incubadas por 14 días a 37°C . los cultivos se cosecharon por centrifugación a 3,000 g por 15 min y se concentraron para lograr una masa de aproximadamente 800 mg (peso húmedo); los cultivos fueron irradiados con rayos gamma por espacio de 48 h en un aparato Gammacell 3000 (Elan, Nordion, International Inc., Kanata, Ontario, Canadá). Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm (HermLe Z 160 M), y los botones celulares fueron lavados dos veces con 1 mL de PBS con 0.5 % Tritón X-100 y pasados a tubos de 1.5 mL para luego ser centrifugados a 14,000 rpm por 5 min y resuspendidos en 1 mL de un cóctel de inhibidor de proteasas libre de EDTA (Ac. Ethylenediamino tetracetico) (Roche, Mannheim, Alemania) disuelto en TBS 100 mM, pH 7.4, con 0.5 % Tritón X-100. Cada suspensión bacteriana se transfirió a tubos BioPulverizer

(Q-BIOgene, Carlsbad, CA, EUA) con tapa azul y se sometieron a 2 ciclos de 45 seg cada uno a una intensidad de 6 en un aparato FastPrep, FP120 (Bio101, SAVANT), con intervalos de 2 min cada uno, en los cuales las muestras se colocaron en hielo. Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por 8 min y el sobrenadante se repartió en alicuotas de 200 µL que se almacenaron a –70 °C hasta su uso.

2.9 Cuantificación de proteínas en los extractos celulares de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

La concentración de proteínas en los extractos biológicos de las diferentes cepas polimórficas usadas en este trabajo y de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (usada como control) fue determinada mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*,1951), el cual se realizó de la siguiente manera: en tubos de ensayo de 13 x 100 mm se colocaron 0.2 mL de las muestras que contenían entre 6 y 14 µg de proteínas totales mas 1 mL de reactivo C (1 mL de tartrato de sodio y potasio al 1% y sulfato de cobre al 0.5%, diluído en 50 mL de carbonato de sodio 2% en hidróxido de sodio al 0.1 N). Las muestras fueron agitadas con un vórtex e incubadas por 10 min a temperatura ambiente; después de este tiempo, a cada tubo se le añadió 0.1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteau 1N, diluído en HCl 1 N; los tubos se agitaron inmediatamente después con un vórtex, y las muestras se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se determinó la densidad óptica de cada muestra a 750 nm (DO_{750}) en un espectrofotómetro Zeiss, modelo PMQ III

(Jena, Alemania). La cantidad de proteínas de las muestras de las diferentes cepas de *M. tuberculosis* se calculó mediante la interpolación de los datos en una curva estándar de seroalbúmina bovina fracción V (Sigma Chem. Co. S L. M. EUA). La curva estándar fue calculada para cada una de las determinaciones realizadas.

2.10 Detección de la actividad fosfolipásica del tipo C de cepas polimórficas de *M. tuberculosis* y de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*

Para la detección de la actividad de PLC en los extractos celulares de las cepas polimórficas de *M. tuberculosis* y la cepa H37Rv, se utilizó un método de radioensayo que consistió en lo siguiente: para cada cepa polimórfica y la H37Rv se mezclaron en tubos de borosilicato de 15 x 15 mm (Bellco Glass Inc. Vineland, NJ. EUA), 10 µL de la mezcla de ensayo 2X (Tris-base, pH 7.5; $CaCl_2$ 5 mM; Tritón X 100 0.4%; y 1.5 µCi/mL de 1,2 dipalmitoil [colina-metil-^{3}H]-fosfatidilcolina ([^{3}H]-FC; que contenía 62 Ci/mmol) y 10 µL del extracto celular total de cada cepa. Se ensayaron tiempos variables de incubación y concentraciones diferentes de proteínas (según el ensayo). Al final de la incubación los tubos se pasaron a un baño con hielo para después aplicar cada mezcla de reacción en las placas cromatográficas de sílica gel (Wathman de borosilicato, 100 x 100 x 1 mm, Bellco Glass Inc. EUA) y se les aplicó calor para secar las muestras. Las muestras se eluyeron en las cromatoplacas con una mezcla de disolventes para lípidos polares (cloroformo, ácido acético,

Figura 4.- Cuantificación de ADN por medio de estándares de masa. En la parte izquierda se encuentran los estándares de masa de una concentración de 500, 250, 125, 63, 31 y 15 ng/6 µl.A la derecha se encuentra el AND extraído de las cepas polimórficas a la región de PLC.

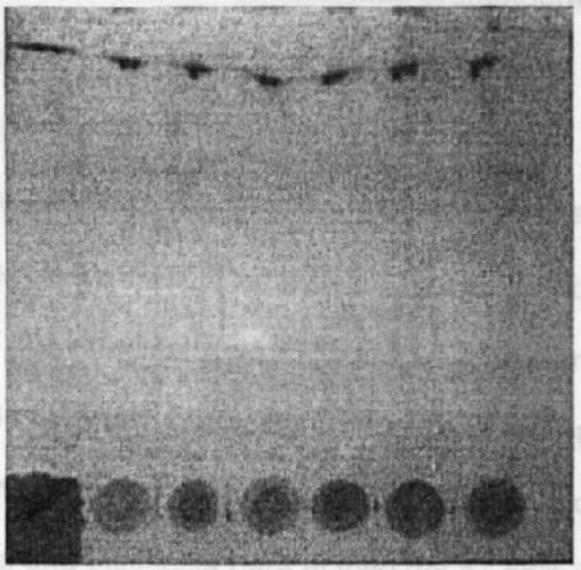


Figura 5.- Placa de sílica gel después de ser eluída con disolventes no polares. La placa fue eludía con una mezcla de Cloroformo, ácido acético, metanol y agua (10.6, 2.5, 1 y 0.5 v/v). Las marcas de la parte inferior corresponden al fosfatidil-[^{3}H]-colina que representa el sustrato hidrolizado por la fosfolipasa C. Estas marcas son reveladas con vapores de yodo.

metanol, agua; 10.6, 2.5, 1, 0.5 mL). Una vez que los disolventes alcanzaron la parte superior de las placas, estas se retiraron de la cámara y se secaron a temperatura de laboratorio para después colocarlas en una cámara saturada con vapores de yodo, con lo cual las manchas lipídicas se revelaron como puntos amarillos o cafés sobre el fondo blanco de la placa (Figura 5). Finalmente, la mancha lipídica correspondiente a la [^{3}H]-fosforilcolina fue raspada. Esta mancha se sitúa en el punto de aplicación en la cromatoplaca, teniendo un Rf= 0.0, mientras que la [^{3}H]-FC migra con un Rf = 0.43 (Figura 6). El sustrato utilizado (1,2 dipalmitoil [colina-metil-^{3}H]-fosfatidilcolina, [^{3}H]-FC) tiene el hidrógeno del grupo metilo de la colina substituido por tritio. Si la radioactividad se localizaba en las manchas cromatográficas correspondientes a [^{3}H]-fosforil-colina y no en 1,2-dipalmitoil-glicerol, la enzima sería una fosfolipasa del tipo C específicamente.

Una vez raspadas, la silica gel correspondiente a cada mancha se colocó en un vial de borosilicato de 20 mL conteniendo 5 mL de cóctel para centelleo líquido (2,5-difeniloxasole PPO al 6%; 2,2'-p-fenilen-bis-5-feniloxasole al 0.6% en 1 lt de tolueno). La cuantificación de la radioactividad se realizó en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Tri-Carb, Packard, modelo 1600 TR, Canberra, EUA) a una eficiencia para el tritio del 47.56%.

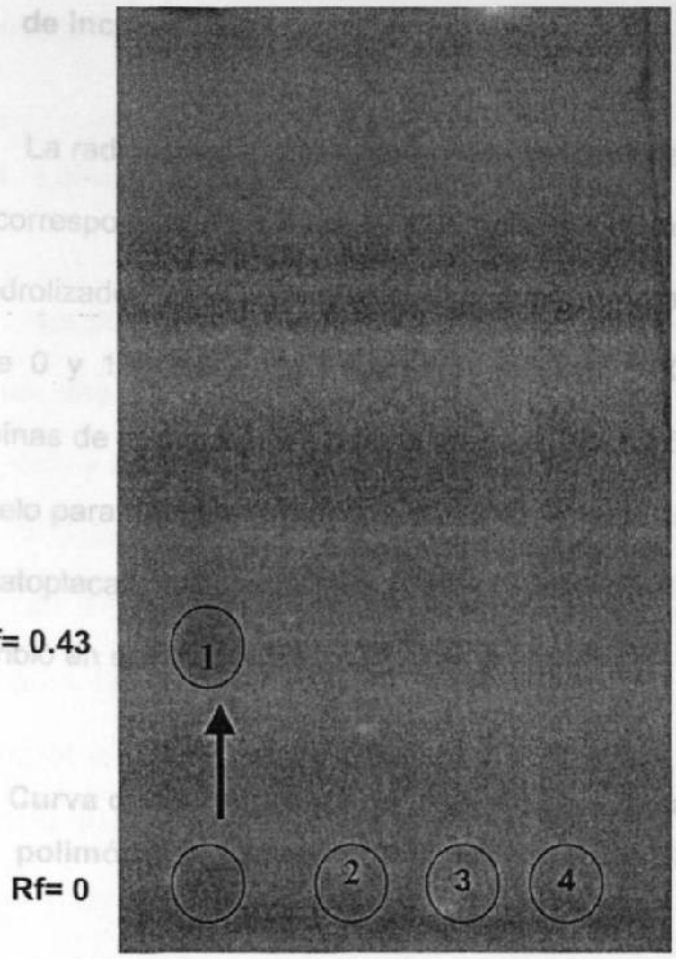


Figura 6.- Relación de frente (Rf) de fosfatidilcolina en una cromatoplaca. En la placa cromatográfica de silica gel, en el carril 1, 20 µL de Fosfatidil colina [1 mg/mL], carril 2, 20 µl de Fosforil colina [1µg/mL], carril 3, 5 µL de Colina [20ng/mL] y en el carril 4, 10 µL de Glicero Fosforil Colina [5mg/mL]. Los disolventes utilizados fueron: Cloroformo:metanol: Ac. Acético: agua (10.6,2.5,1 y 0.5 v/v)) y revelada por saturación de vapores de Yodo.

2.11 Cuantificación de la actividad de fosfolipasa C en el extracto de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* con respecto al tiempo de incubación

La radioactividad presente en las manchas de las cromatoplacas eluídas que corresponden a los productos de hidrólisis (fosforil-[^{3}H]-colina) y al sustrato no hidrolizado [^{3}H]-FC, se determinó a tiempos variables de incubación a 37 °C (entre 0 y 150 min). La mezcla de ensayo (160 µg del extracto total de proteínas de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv y 1.5 µCi de [^{3}H]-FC) se colocó en hielo para detener la reacción y posteriormente cada mezcla se aplicó a las cromatoplacas. La cuantificación de la radioactividad se realizó tal como se describió en el inciso 2.10.

2.12 Curva dosis respuesta de los extractos de las cepas polimórficas y la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv

La actividad de fosfolipasa tipo C de los extractos de las cepas polimórficas y la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv se determinó usando 10 µL de la mezcla de ensayo con concentraciones de 0 a 160 µg de proteína total de cada extracto. Los tubos se agitaron por 15 seg en un vórtex, se incubaron a 37 °C por 150 min, y se cuantificó la radioactividad.

Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* polimórficas con sus respectivos genotipos que se utilizaron fueron las siguientes: Dr-651 (*plc*A:IS*6110*), Dr-342 (*plc*B:IS*6110*),, Dr-468 (*plc*C:IS*6110*),, Dr-426 (Δ*plc*A-

*plc*B), y Dr-689 (Δ*plc*A-*plc*B-*plc*C) y como control se utilizo la cepa *M. tuberculosis* H37Rv que posee un locus PLC intacto.

2.13 Línea celular THP-1

La línea celular THP-1 proviene originalmente de la sangre de un niño de un año de edad con leucemia monocítica aguda (Tsuchiya S, 1980, Tsuyoshi y col.1998). Esta línea celular es inducida a transformarse en células con características de macrófagos en presencia de acetato de 12-forbol-13-miristato (PMA) (Asseffa A, 1993) y ha sido ampliamente utilizada en estudios de interacción con *M. tuberculosis* (Shattock *et al.*,1993; Friedland *et al.*,1993; Zhang *et al.*,1993; Lee y Horwitz, 1995; Tchou-Wong *et al.*,1999; Agranff *et al.*,1999; Kusner y Adams, 2000; Miller y Shinnick, 2000; Armitige *et al.*,2000; Lopez y col,2003 Riendeau y Kornfeld, 2003). El mantenimiento de la línea celular se realizó en medio RPMI 1640 (No. cat. Gibco BRL, Grand Island, N.Y.) con 2 mM L-glutamina, 1.5 g de bicarbonato de sodio, 4.4 g de glucosa, 1.0 mM piruvato de sodio, 50 μM 2-mercaptoethanol y 10% de Suero bovino fetal (SFB). Los cultivos se incubaron a 37°C por 4 días en una atmósfera de 5% de CO_2 y se resembraron cada 4 días con una densidad de inóculo de 3.5 $X10^5$ células / mL.

2.14 Transformación de células THP-1 a macrófagos

Para transformar las células THP-1 en macrófagos, los cultivos se crecieron en ausencia de piruvato de sodio por 4 pases en las mismas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. Al final del cuarto pase, los cultivos se lavaron con medio completo precalentado a 37°C y la densidad celular se ajustó a 5 X 10^5 células por mL en medio RMPI + 10% SFB. Luego, se distribuyó 1 mL por pozo en microplacas de 24 pozos (Costar, Corning Sc. Products, Acton, MA, EUA). A cada pozo se le adicionó 1 µL de acetato de 12-forbol-13-miristato (CALBIOCHEM, Biosciences, Inc, La Jolla, CA, EUA) a una concentración final de 6.25 ng/mL y las microplacas se incubaron a 37 °C en 5% CO_2. Cada 48 h se realizó un cambio de medio, luego del segundo cambio las células estaban listas para ser infectadas.

2.15 Infección de la línea THP-1 con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y cepas polimórficas de *Mycobacterium tuberculosis*

Después del segundo cambio de medio en los cultivos celulares, los cultivos celulares se infectaron con la cepa control *M. tuberculosis* H37Rv y con la cepa *M. tuberculosis* DR-689 (genotipo Δ*plc*A-*plc*B-*plc*C), ambas a una multiplicidad de infección de 0.1 (10 células:1 bacteria). Como control negativo se dejaron algunos pozos sin infectar. Las placas se incubaron por 72 h a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 5% de CO_2. A las 24 h de incubación, 3 pozos de cada grupo se les retiró el medio y se les agregó 1 mL

Cepa de *M. tuberculosis*	Genotipo	*plcC* *plcB* *plcA*
H37Rv	*plcA-plcB-plcC*	Rv2347c — PPE
DR-651	*plcA*::IS*6110*	Rv2347c — IS6110 — PPE
DR-342	*plcB*::IS*6110*	Rv2347c — IS6110 — PPE
DR-468	*plcC*::IS*6110*	Rv2347c — IS6110 — PPE
DR-426	Δ*plcA-plcB*	Rv2347c — IS6110 — PPE
DR-689	Δ*plcA-plcB-plcC*	Rv2347c — PPE

Figura 12.- Esquema que representa al segmento 103/162 del genoma de *M. tuberculosis* cepa H37Rv, conteniendo los genes de PLC y los cambios ocurridos en las cepas polimórficas (Cole y col. 1998)

de formalina al 10% para fijar la monocapa, este mismo procedimiento se realizó con otros tres pozos a las 72 h de incubación.

En otro ensayo de infección, los cultivos celulares THP-1 fueron infectados con las cepas *M. tuberculosis* polimórficas a una multiplicidad de infección de 1 (1 célula: 1 bacteria) y como control negativo se dejaron algunos pozos sin infectar. Las placas se incubaron por 72 h a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 5% de CO_2. Cada 24 h de incubación, 3 pozos de cada cepa se les retiró el medio y se les agregó 1 mL de formalina al 10% para fijar la monocapa. En otro ensayo similar al anterior, donde solo se utilizaron las cepas DR-689, H37Rv las observaciones fueron hechas hasta las 144 h de infección. Todas las placas con los cultivos fijados en formalina fueron observadas en un microscopio de contraste de fases (Zeiss, Axiovert 25, Jena, Alemania) para observar en la monocapa el daño citológico producido por la infección de las micobacterias.

3.- RESULTADOS

3.1 Análisis de los amplicones producidos por los iniciadores TB20-TB21

Al realizar PCR larga del ADN genómico de las cepas polimórficas con los iniciadores TB20-TB21, que amplifican la región comprendiendo los genes *plcA* y *plcB* completos y parte de *plcC*, se observó la presencia de amplicones más grandes que los producidos por la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 7); dos cepas presentaron un amplicon menor al esperado (Figura 8). Algunas bandas de menor intensidad también fueron visualizadas en los geles de agarosa junto con los productos principales. Al secuenciar algunas de estas bandas de baja intensidad, se observó que correspondían a sitios internos de la secuencia menos específicos que permitían el alineamiento de los iniciadores.

Los amplicones se comenzaron a secuenciar utilizando los iniciadores TB20 y TB21. En uno de los extremos del amplicon TB20-TB21 de una de las cepas, se encontró una secuencia que no pertenecía a los genes de fosfolipasa y que al ser analizada con el sistema BLAST del Nacional Center for Biotechnology Information (http:www4.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) resultó la secuencia de un elemento de inserción IS*6110*. Dado que el aumento de tamaño de los demás amplicones podía ser debido a este mismo fenómeno, se continuó el análisis de secuenciación utilizando los iniciadores que denominamos TB25 y el TB26 (Tabla1). Estos iniciadores se alinean a una región cercana al final del elemento IS*6110* y están dirigidos hacia fuera del

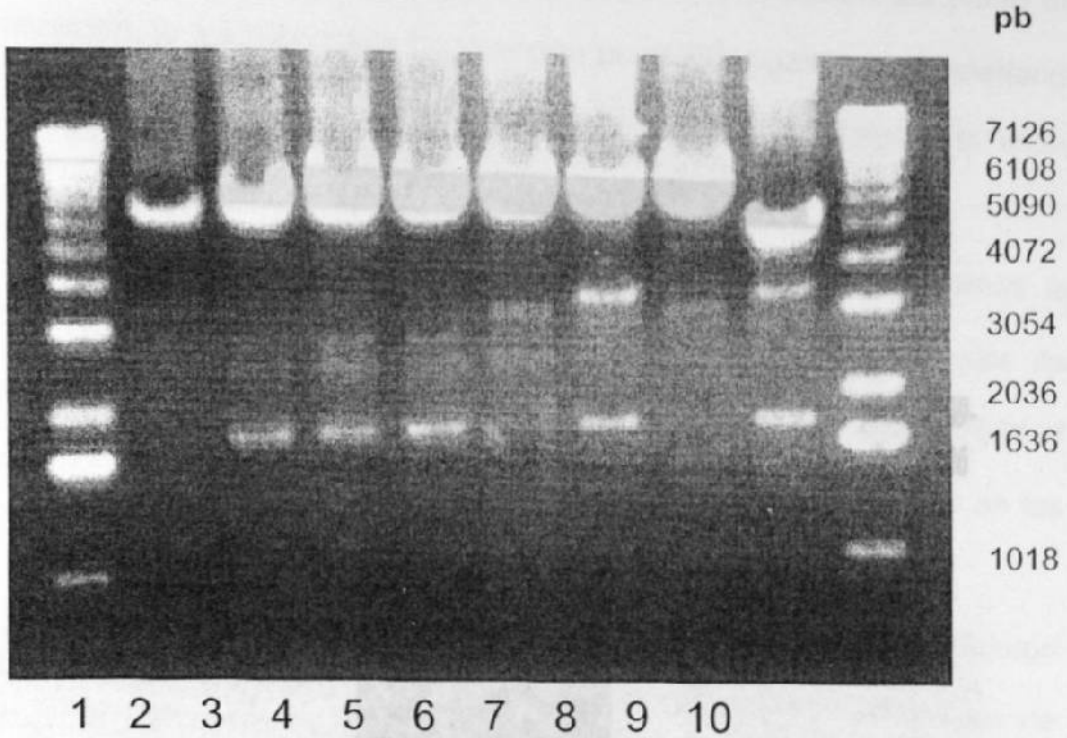


Figura 7.- Amplicones de PCR larga obtenidos con los iniciadoresTB20 y TB21 a partir de ADN genómico microbiano de cepas polimórficas para los genes de fosfolipasa C. Carriles:1 y 10, marcadores de 1-kb (Gibco); 2, Cepa RIVM-7; 3, Cepa Dr-169; 4, Cepa Dr-170; 5, Cepa Dr-342; 6, Cepa Dr-351; 7, Cepa Dr-561; 8, Cepa Dr-468; 9, M. *tuberculosis* H37Rv.

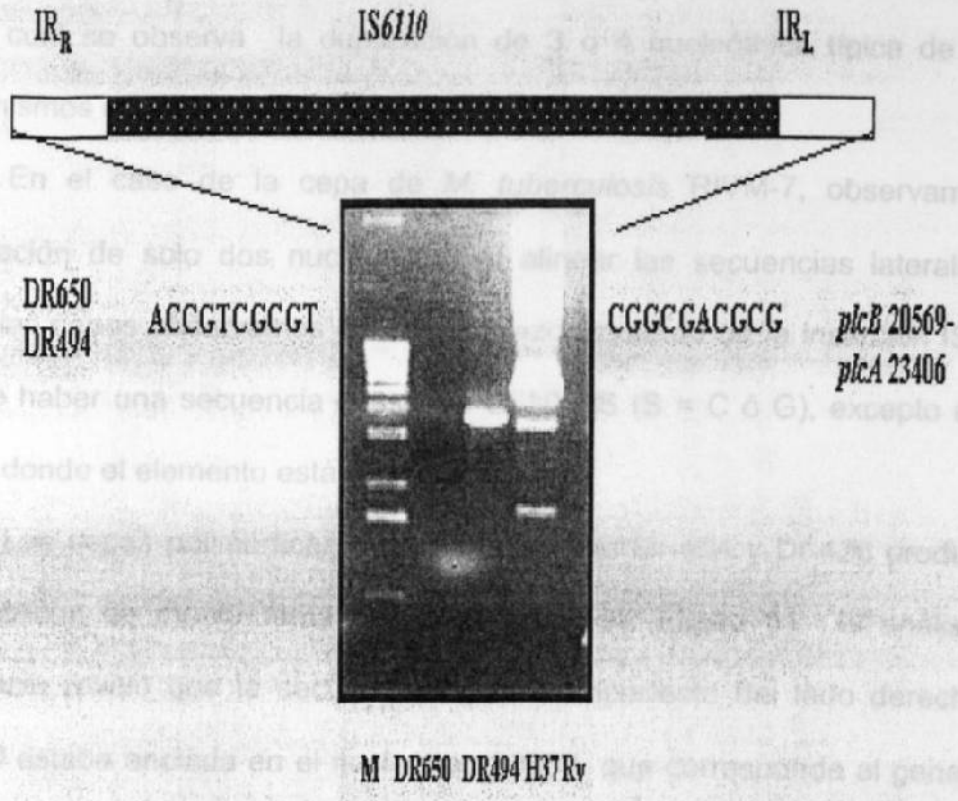


Figura 8.- Amplicones de menor tamaño al esperado en las cepas de *M. tuberculosis* polimórficas para los genes de fosfolipasa C con iniciadores TB20 y TB21. En el análisis de secuenciación mostraron un elemento IS*6110* insertado y una pérdida de 2.8-kpb.

elemento, de tal forma que al realizar esta amplificación se puede detectar el sitio de inserción en una sola corrida (ver Figura 1a) En todos las cepas con aumento de tamaño del amplicon TB20-TB21 encontramos elementos IS*6110*. En la Figura 10a se describen las secuencias y la localización del punto de transposición de los elementos de inserción en el ADN genómico bacteriano, en el cual se observa la duplicación de 3 o 4 nucleótidos típica de estos mecanismos de integración (Figura 9).

En el caso de la cepa de *M. tuberculosis* RIVM-7, observamos la duplicación de solo dos nucleótidos. Al alinear las secuencias laterales de todas las cepas observamos que en el brazo izquierdo de la inserción IS*6110* parece haber una secuencia consenso SSNNNS (S = C ó G), excepto en las cepas donde el elemento está insertado en *plcB*.

Las cepas polimórficas de *M. tuberculosis* Dr-494 y Dr-426 produjeron un amplicon de menor tamaño que el esperado (Figura 8). El análisis de secuencia reveló que la secuencia repetida imperfecta del lado derecho de IS*6110* estaba anclada en el nucleótido 20569 que corresponde al gene *plcB* y que el lado izquierdo se encontraba en el nucleótido 23406 correspondiente al gene *plcA* de la región de fosolipasa, perdiéndose por tal motivo un fragmento de 2837-pb. En los extremos de IS*6110* no se observaron la duplicación de los nucleótidos.

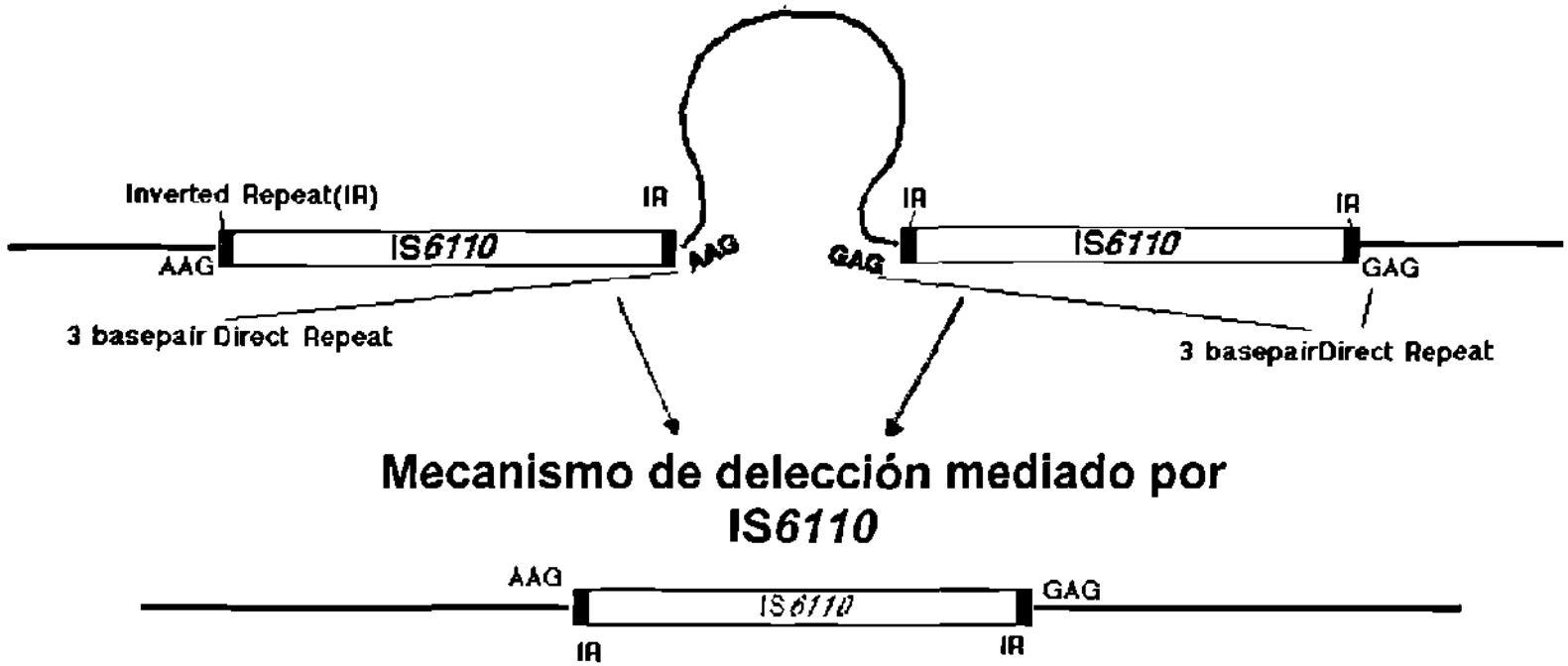


Figura 9.- Esquema de la duplicación de nucleótidos en el punto de inserción de IS*6110*. Es la región RvD2 de *M. tuberculosis* cepa H37Rv. En los extremos del esquema superior se observa la duplicación en cada extremo de la IS*6110*. En el esquema inferior ya no se observa la duplicación de nucleótidos debido a la recombinación homóloga entre dos elementos IS*6110* con pérdida de la secuencia intermedia.

3.2 Digestión con *Pvu*II de los amplicones TB20-TB21 obtenidos de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* polimórficas para el locus *plcABC*

Para confirmar que los cambios en los patrones observados en los análisis de Southern blot se debían únicamente a la inserción del elemento IS*6110*, se realizó la purificación de los amplicones y posteriormente fueron digeridos con la enzima de restricción *Pvu*II. La figura 10 muestra el mapa con los cambios posibles así como la separación por electroforesis en un gel de agarosa a 1 % de los amplicones digeridos. En todos los casos, se observó concordancia entre los fragmentos esperados y los obtenidos.

3.3 Análisis de RFLP para IS*6110* en cepas de *M. tuberculosis* polimórficas que presentaron el mismo sito de inserción

Al observar que los sitios de inserción del elemento IS6110 se repetían entre algunas cepas polimórficas, y para descartar de que esta selección del mismo sitio de inserción pudiera ser debido a que las cepas utilizadas tuvieran un mismo origen, se analizó el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para IS*6110* en aquellas cepas que mostraron sitios inserción idénticos. En la Figura 11, se presentan cuatro cepas de *M. tuberculosis* analizadas por este método; en el lado izquierdo, se muestra el análisis por Southern blot de dos cepas aisladas en la provincia de Columbia Británica, Canadá, que muestran nueve bandas similares y 6 bandas

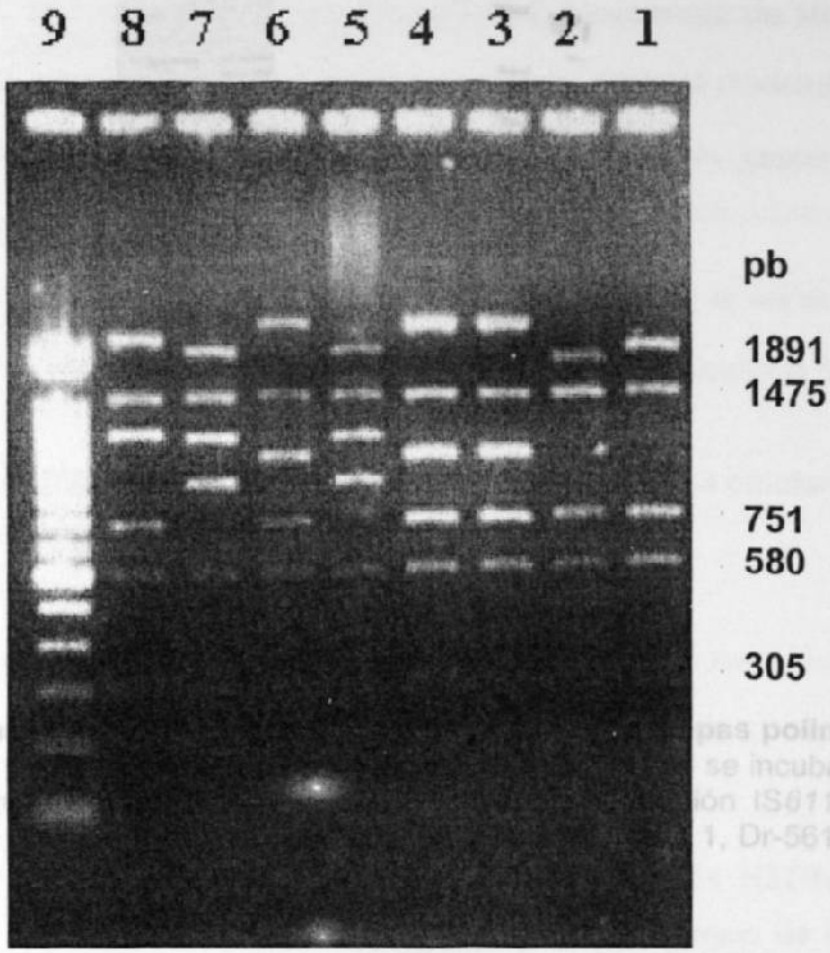


Figura 10.- Digestión amplicones con la enzima *Pvu*II producidos por PCR con los iniciadores TB20 y TB21 . La digestión es separada por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. En el carril 1, cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, carril 2, marcador de peso molecular de 100-pb (Gibco), los carriles del 2 al 8, son cepas de *M. tuberculosis* polimórficas que corresponden a DR-468, DR-170, DR-342, RIVM-7, DR-169, DR-561 y DR-352, respectivamente.

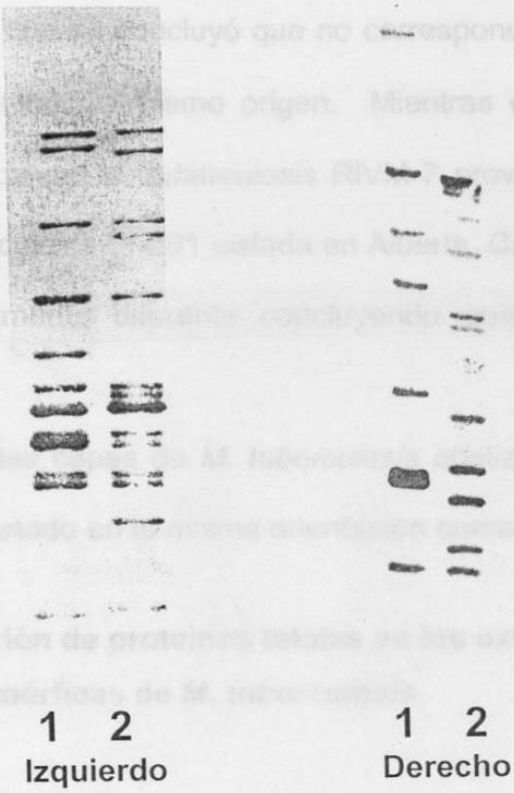


Figura 11.- . Análisis por Southern blot de algunas de las cepas polimórficas que mostraron sitios de inserción idénticos. Las membranas se incubaron con una sonda para el brazo derecho de la secuencia de inserción IS*6110*. Lado izquierdo, Carril 1, Dr-169, carril 2, Dr-170. Lado derecho, carril 1, Dr-561, y carril 2, RIVM-7.

diferentes, por lo que se concluyó que no corresponden a la misma cepa pero pueden haber tenido un mismo origen. Mientras en el lado derecho de la Figura 11, la cepa de *M. tuberculosis* RIVM-7 proveniente de Mongolia y la cepa de *M. tuberculosis* Dr-561 aislada en Alberta, Canadá muestran un patrón de bandas totalmente diferente concluyendo que estas cepas no tienen relación clonal.

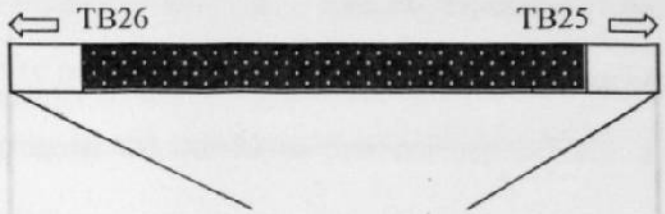
En todas las cepas de *M. tuberculosis* analizadas, el elemento IS*6110* se encontró insertado en la misma orientación como lo muestra la figura 10a.

3.4 Concentración de proteínas totales en los extractos celulares de las polimórficas de *M. tuberculosis*

La concentración de proteína total que se obtuvo de los extractos totales de los genotipos de *M. tuberculosis* se encuentra en la Tabla 2.

3.5- El extracto total de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv presentó actividad de fosfolipasa C. dependiente tanto del tiempo de incubación como de la dosis

Al incubar a 37°C las muestras por tiempos variables con 160 µg de proteínas totales, se observó que la liberación de fosforil-[^{3}H]-colina (medido por las desintegraciones por minuto del sustrato radioactivo, dpm) se incrementó en función del tiempo de incubación, entre 0 y 150 min. Lo que sugirió que la actividad presente en el extracto total de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv correspondía a la actividad de una fosfolipasa del tipo C



DR-351	GGCATGATG	ATGCGCCAG	*plcC*	19589
RIVM-13	GCGGCCCAC	CACCCTTGA	*plcC*	19645
DR-468	GCGCCGGCA	GCAGCCAGC	*plcC*	19848
DR-116	ACCGTCGCGT	GCGTCCCGCC	*plcB*	20569
DR-169	ACCGTCGCGT	GCGTCCCGCC	*plcB*	20569
DR-170	ACCGTCGCGT	GCGTCCCGCC	*plcB*	20569
DR-342	ACCGTCGCGT	GCGTCCCGCC	*plcB*	20569
DR-494	ACCGTCGCGT	CGGCGACGCG	*plcB*	20569
			plcA	23406
DR-426	ACCGTCGCGT	CGGCGACGCG	*plcB*	20569
			plcA	23406
Dr-561	GGACGGGTG	GTGTGGTTTC	*plcA*	22124
RIVM-7	CGGACGGGG	GTGTGGTTTC	*plcA*	22124
DR-194	GGCGCGACGG	ACGGCGTGGT	*plcA*	22334

Figura 10a.- Localización de los elementos IS*6110* insertados en la región de fosfolipasa C de las cepas de *M. tuberculosis* polimórficas estudiadas en el presente trabajo. Se observa la duplicación de nucleótidos en los extremos. En las cepas DR-494 y DR-426 , no se observa la duplicación de nucleótidos en el punto de inserción del elemento IS*6110*, estas cepas tienen una pérdida de su secuencia de 2.8-kpb

Cepas de *M. tuberculosis*	Genotipo	*Concentración de proteína total* µg/µl
H37Rv	*plcA-plcB-plcC*	7.44
DR-651	*plcA*::IS*6110*	5.45
DR-342	*plcB*::IS*6110*	7.92
DR-468	*plcC*::IS*6110*	7.93
DR-426	Δ*plcA-plcB*	9.8
DR-689	Δ*plcA-plcB-plcC*	9.82

Tabla 2.- Concentración de proteína total en extractos celulares de cepas de *M. tuberculosis* polimórficas.

(Figura 14). No se detectó radioactividad en las regiones correspondientes a 1,2-dipalmitoil-glicerol ni a las regiones intermedias entre las manchas cromatográficas. En las curvas dosis-respuesta la radioactividad en las manchas correspondientes a fosforil-[^{3}H]-colina se incrementaron proporcionalmente con concentraciones crecientes de las proteínas totales de la cepa H37Rv (Figura 15), donde las dpm correspondieron a 4,770 con 160 µg de proteínas totales.

3.6 Comparación de la actividad de fosfolipasa C de las cepas polimórficas y la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*

En este trabajo se utilizaron varias cepas de *M. tuberculosis* polimórficas que presentaron interrupciones en los genes de fosfolipasa C, las cuales son mostradas en la siguiente tabla:

Cepa de *M. tuberculosis*	Genotipo	*plcA*	*plcB*	*plcC*
H37Rv	*plcA-plcB-plcC*	+	+	+
DR-561	*plcA*::IS*6110*	-	+	+
DR-342	*plcB*::IS*6110*	+	-	+
DR-582	*plcC*::IS*6110*	+	+	-
DR-426	Δ*plcA-plcB*	-	-	+
DR-689	Δ*plcA-plcB-plcC*	-	-	-

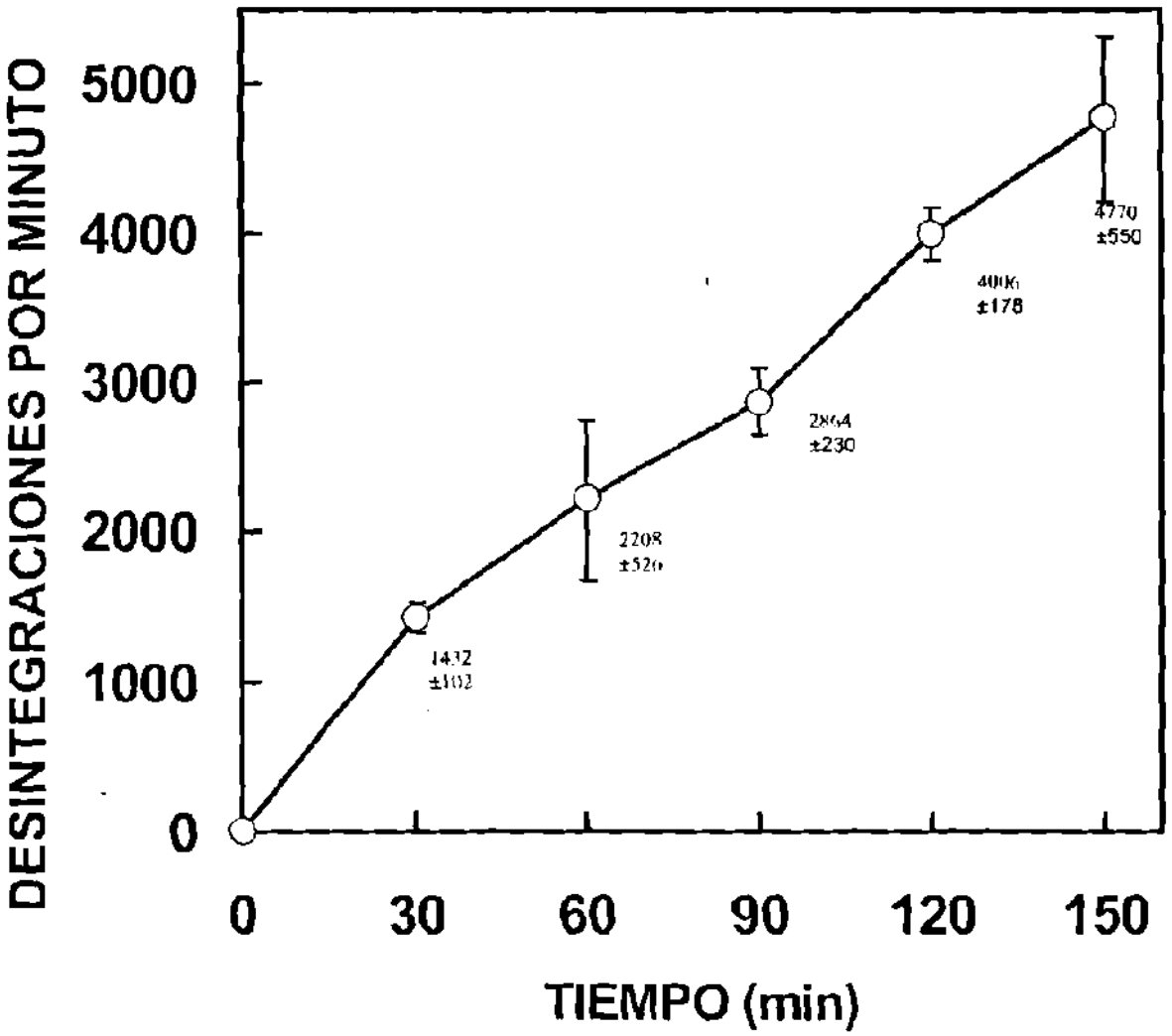


Figura 14. Relación temporal de la actividad de fosfolipasa de *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Extractos totales de *M. tuberculosis* con una concentración de 160 mg/mL fueron mezcladas con 1,2 dipalmitoil-3-gliceril-fosfatidil-[^{3}H]-colina e incubadas por tiempos variables. Luego de la incubación, la radiactividad presente en las manchas correspondiente al producto de hidrólisis, la fosfatidil-[^{3}H]-colina, fue cuantificada en un espectrofotómetro de centelleo líquido y determinada como desintegraciones por min.

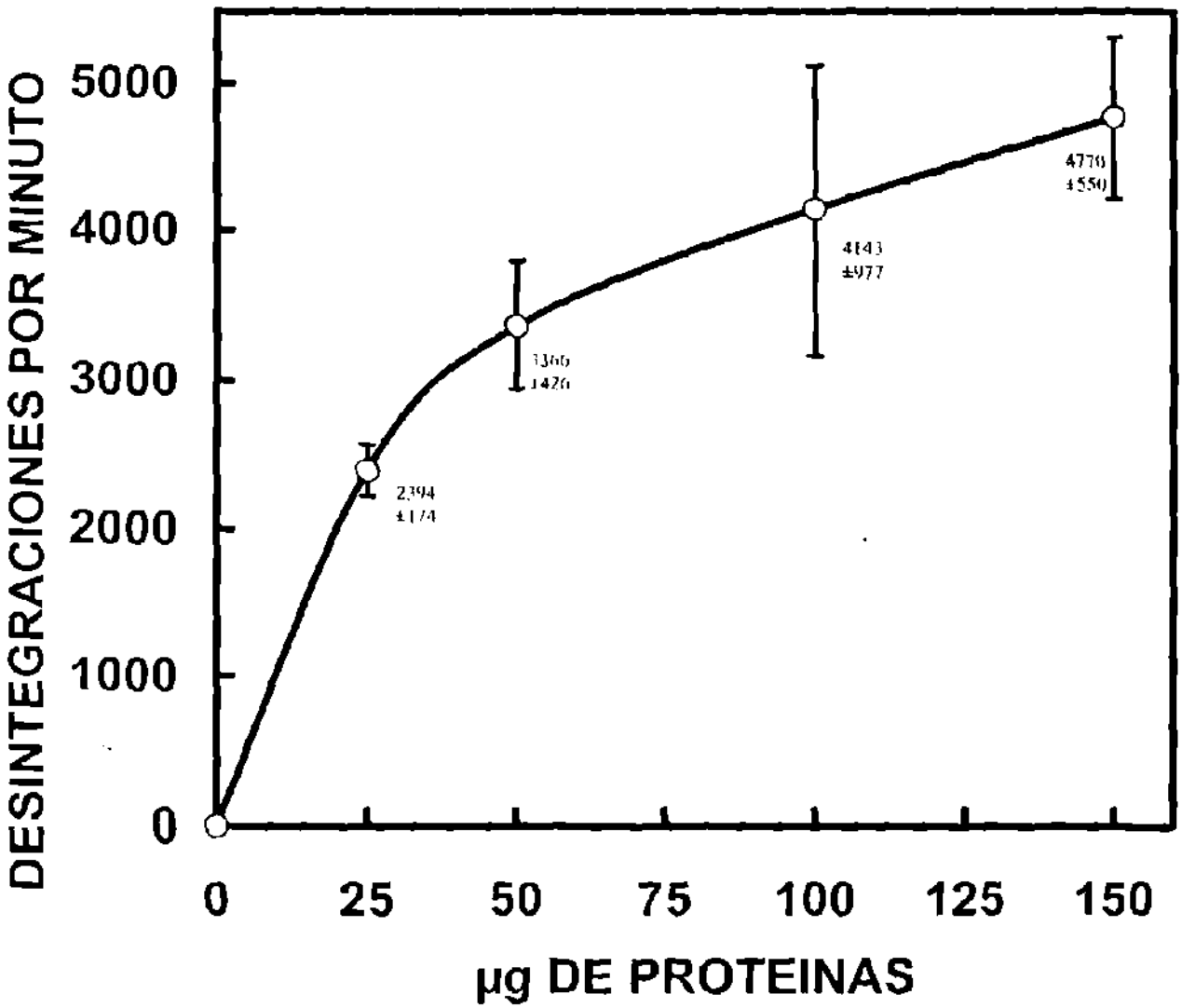


Figura 15. La actividad de fosfolipasa C de *M. tuberculosis* es dependiente de la dosis. Determinamos la actividad enzimática de los extractos micobacterianos usando cantidades variables de proteína total a un tiempo de incubación de 150 min.

Se encontró que todas las cepas polimórficas presentaron actividad de fosfolipasa del tipo C (Figura 16), mostrando variaciones con respecto a la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. La cepa de *M. tuberculosis* DR-651 presenta un período lag (0-25 µg) en que no existe liberación de radioactividad en la mancha correspondiente a fosforil-[^{3}H]-colina, después de este periodo las dpm encontradas presentaron una tendencia sigmoide alcanzando la máxima actividad de 3,543 dpm cuando se utilizó 160 µg de proteínas totales, valor muy cercano al máximo encontrado en la cepa H37Rv (Figura 15). La cepa de *M. tuberculosis* DR-342 presentó un incremento lineal desde 0 hasta 100 µg de proteínas totales; a un mayor aumento de proteína (160 µg) se observó que las dpm disminuyen un 18 % con respecto al máximo (Figura 16). Con las cepas de *M. tuberculosis* DR-468, DR-426 y DR-689 se encontró que estas presentaron su máxima actividad a los 25 µg de proteínas totales, alcanzando 1,872, 3,009 y 3,256 dpm respectivamente (Figura 16). Se observó que a mayores aumentos de proteína en estas cepas no incrementaron la acumulación de radioactividad en las manchas correspondientes a fosforil-[^{3}H]-colina.

3.7 Capacidad citotóxica en la monocapa de macrófagos THP-1

El ensayo para observar la capacidad citotóxica de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv y la cepa de *M. tuberculosis* DR689, carente en forma natural de los gene de fosfolipasa C (Δ*plc*A-*plc*B-*plc*C), fue realizado en placas de 24 pozos a una multiplicidad de infección de 0.1 (10 célula:1 bacterias) y se

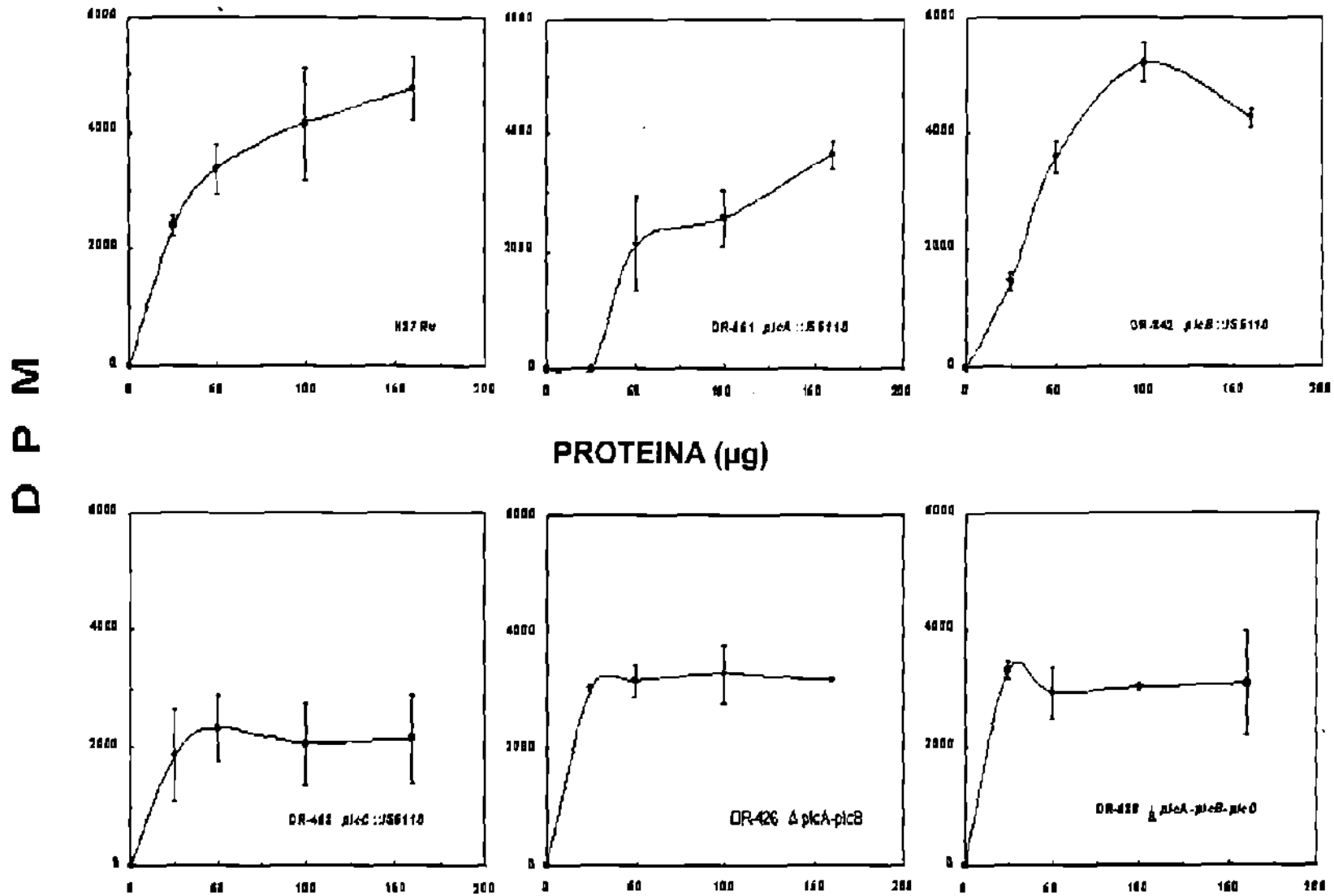


Figura 16.- La actividad de fosfolipasa C en *M. tuberculosis* varía en función de los genes funcionales que codifican para esta enzima. La actividad enzimática se determinó en las mismas condiciones para todas las cepas utilizando cantidades variables de proteína de los extractos bacterianos e incubadas a 150 min.

observaron microscópicamente cada 24 h. La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv utilizada como control produjo daño celular desde las 24 h de incubación, mientras que la cepa DR689 no causó el efecto a ese mismo tiempo (Figura 18). La citotoxicidad observada en la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv sugiere que los genes de fosfolipasa contribuyen al daño de los cultivos celulares. Aunque a las 144 h de infección de la monocapa (a la multiplicidad 1:1), se observa un daño similar por las dos cepas de *M. tuberculosis* (Figura 19). Mientras que en el ensayo de infección donde se utilizaron el resto de las cepas polimórficas, los efectos citotóxicos de cada cepa muestran grados variables de daño en la monocapa de macrófagos, sugiriendo una participación diferencial de los genes de PLC que depende del gene que se encuentra interrumpido por el elemento IS*6110* (Figura 20).

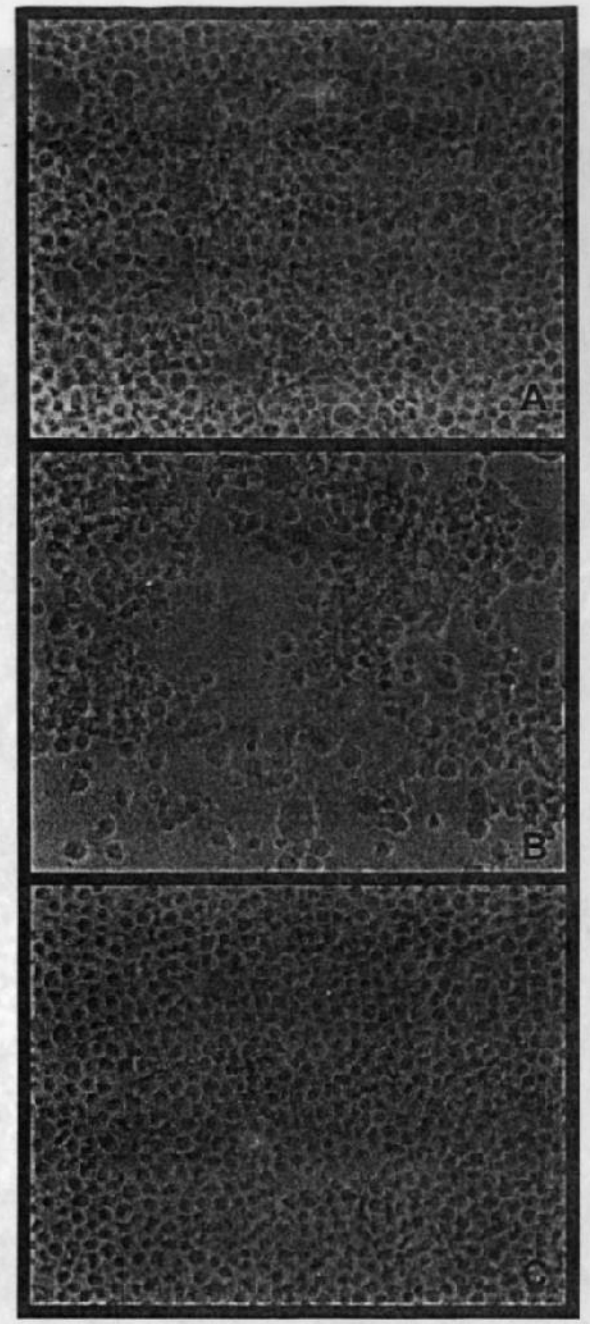


Figura 18. La ausencia de los genes *plc* inhiben el efecto citotóxico de *M. tuberculosis*. Células de la línea THP-1 fueron infectadas con *M. tuberculosis* con una multiplicidad de infección de 1:10 (bacteria:célula). Las fotos corresponden a cultivos con 72 h de incubación observados por microscopía de contraste de fases. (A) Células control sin infectar; (B) Células infectadas con la cepa H37Rv; (C) células infectadas con la cepa 689 (Δ*plc*A-*plc*B-*plc*C). Amplificación 250 X.

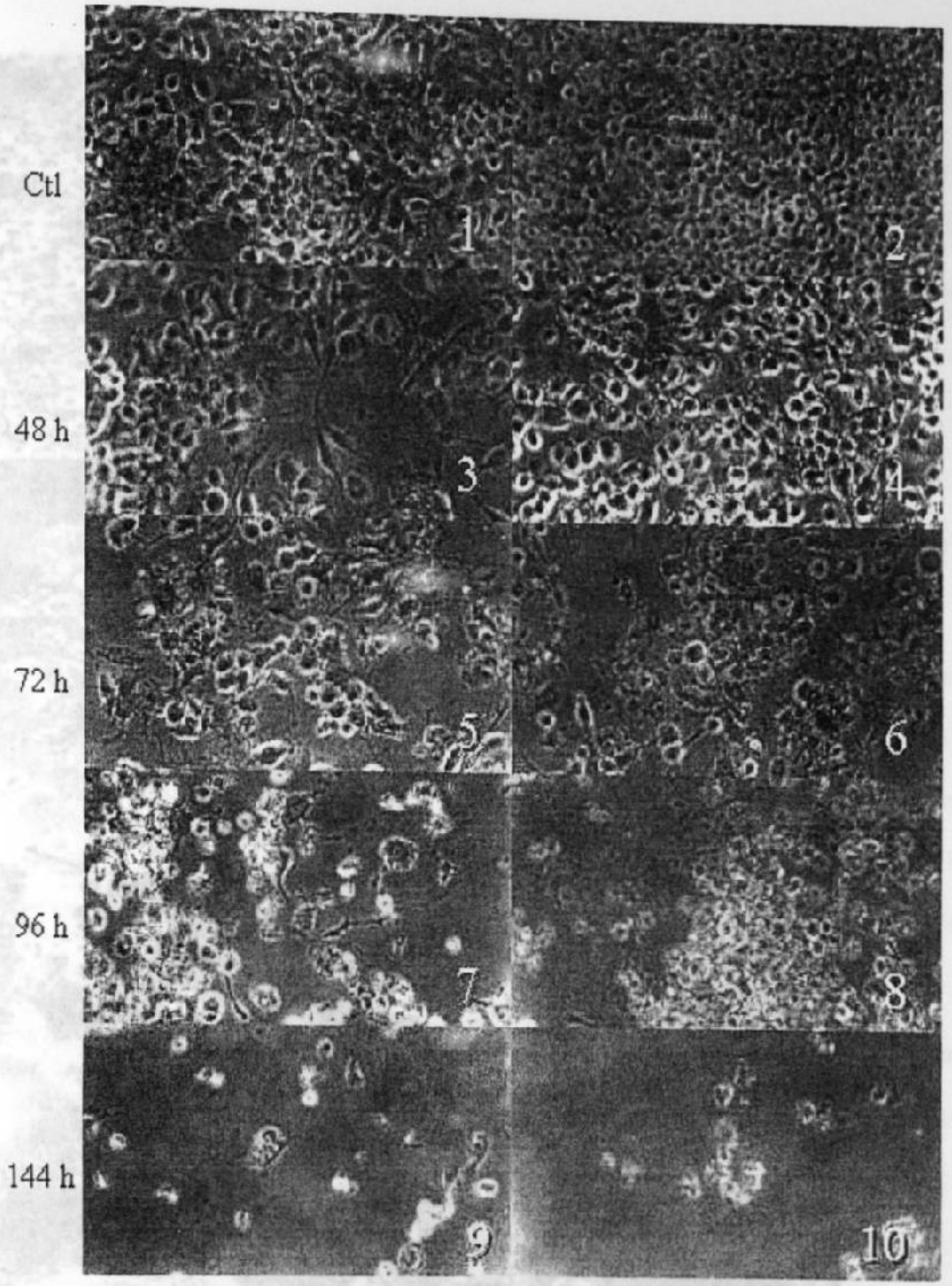


Figura 19.- Células de la línea THP-1 infectadas con *M. tuberculosis* a una multiplicidad de infección 1:1 (bacteria: célula). Las fotos corresponeden a cultivos de 48, 72, 92 y 144 horas de incubación. Fotos 1 y 2 células control sin infectar. Fotos 3,5,7y 9 células infectadas con la cepa H37Rv. Fotos 4,6,8 y 10 células infectadas con la cepa DR-689.