

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“EFECTO DE 150 SUBCULTIVOS CONTINUOS SOBRE LA
COMPOSICIÓN GENÉTICA Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis”**

Por
OFELIA SÁNCHEZ SALINAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con
acentuación en Microbiología

Director interno: Dra. Licet Villarreal Treviño

Asesor externo: Dr. Lucio Vera Cabrera

Co-asesor: Dra. Carmen A. Molina Torres

Junio del 2011

**“EFECTO DE 150 SUBCULTIVOS CONTINUOS SOBRE LA
COMPOSICIÓN GENÉTICA Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis”**

Comité de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño
Director de Tesis

Dr. Lucio Vera Cabrera
Secretario

Dra. Lydia Guadalupe Morales Rivera
Vocal

**“EFECTO DE 150 SUBCULTIVOS CONTINUOS SOBRE LA
COMPOSICIÓN GENÉTICA Y DE VIRULENCIA DE CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis”**

Comité Académico de Maestría

Dra. Diana Reséndiz Pérez
Subdirectora de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar un profundo agradecimiento a mis asesores: Dra. Licet Villarreal Treviño, Dr. Lucio Vera Cabrera y Dra. Carmen Molina Torres por su apoyo incondicional durante el desarrollo del presente trabajo, por sus consejos que más allá del plano profesional han marcado mi vida en lo personal.

Gracias a la Dra. Lydía Rivera quien formó parte del Comité de Tesis y al Dr. Jorge Castro por su colaboración y sugerencias para la mejora de este estudio, así como a todo el personal y estudiantes del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica por sus enseñanzas durante mi estancia en el mismo.

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

A todos mis maestros y compañeros del posgrado que durante mis estudios realizaron importantes aportaciones para la mejora de mi trabajo.

Finalmente me gustaría agradecer de una manera muy especial a mi familia, mi pareja y mis amigos, por todo el apoyo brindado durante esta etapa y por hacer mi vida mejor con su presencia.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT.....	10
2. INTRODUCCIÓN.....	12
3. HIPÓTESIS.....	15
4. OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos específicos.....	16
5. ANTECEDENTES.....	17
5.1 Tuberculosis.....	17
5.1.1 Etiología.....	17
5.1.2 Patogenia.....	19
5.1.3 Tratamiento y prevención.....	22
5.2 Virulencia.....	23
5.3 Atenuación por pasajes <i>in vitro</i>	29
6. MÉTODOS.....	33
6.1 Microorganismos de estudio.....	33
6.2 Cultivo y preparación del stock.....	34
6.3 Subcultivo de cepas.....	35
6.4 Determinación de las cuentas bacterianas de los stocks.....	35
6.5 Extracción del ADN.....	36
6.6 Genotipificación del ADN basada en IS6110.....	37
6.6.1 Digestión del ADN con <i>PvuII</i>	37
6.6.2 Separación de los fragmentos de ADN por electroforesis.....	37
6.6.3 Southern blotting.....	37
6.7 Espoligotipificación.....	40
6.8 Ensayos de citotoxicidad.....	41
6.8.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular THP-1.....	41
6.8.2 Transformación de la línea celular THP-1.....	41
6.8.3 Determinación de la capacidad citotóxica.....	42
6.8.4 6.8.4 Cuantificación de la citotoxicidad por el método del cristal violeta.....	43
6.9 Ensayo de rojo neutro.....	44
6.10 Análisis de lípidos mediante cromatografía de capa fina.....	46
6.10.1 Extracción de lípidos.....	46
6.10.2 Cromatografía de capa fina.....	47

6.10.3 Espectrometría de masas.....	47
6.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genes <i>pps</i>	48
7. RESULTADOS.....	49
7.1 Subcultivo de las cepas.....	49
7.2 Genotipificación del ADN basada en IS6110.....	50
7.3 Espoligotipificación.....	52
7.4 Ensayos de citotoxicidad.....	53
7.5 Ensayo de rojo neutro.....	55
7.6 Análisis de lípidos mediante cromatografía de capa fina.....	56
7.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genes <i>pps</i>	58
8. DISCUSIÓN.....	60
9. CONCLUSIONES.....	80
10. PERSPECTIVAS.....	81
11. LITERATURA CITADA.....	82

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Características de los aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> utilizados en este trabajo.....	34
2. Iniciadores para los genes <i>pps</i>	48
3. Estado de los subcultivos continuos.....	49
4. Resultados del análisis de lípidos por medio de la reacción del rojo neutro.....	55
5. Resultado del análisis de PCR para los genes <i>pps</i>	59

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tasa de incidencia de <i>M. tuberculosis</i> reportada en el 2009 en los distintos estados de México.....	13
2. Estructura de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	18
3. Tinción Ziehl – Neelsen.....	18
4. Estructura química de los dos grupos principales de lípidos metilados ramificados: los fenolglicolípidos (PGLs) y los ftiocerol dimicocerosatos (PDIMs).....	44
5. Estructura química del rojo neutro.....	44
6. Coloración de la solución de rojo neutro en distintas condiciones de pH.....	45
7. Cambios en el patrón de RFLP para el brazo derecho de IS6110.....	50
8. Cambios en el patrón de RFLP para el brazo izquierdo de IS6110...	51
9. Patrones de espoligotipo para la región DR de las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	52
10. Porcentajes de citotoxicidad para la cepa DR-689 a diferentes días post-infección.....	53
11. Apariencia microscópica de la monocapa de macrófagos THP-1 infectada con la cepa DR-689 y BCG como control negativo de la infección.....	54
12. Ensayo del rojo neutro.....	55

13. Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina para la detección de PDIMs.....	56
14. Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina para la detección de sulfolípidos.....	56
15. Confirmación de la presencia de sulfolípidos mediante análisis por espectrometría de masas.....	57
16. PCR para los genes <i>pps</i> de la cepa H37Rv.....	58
17. PCR para los genes <i>pps</i> de la cepa DR-689.....	58

NOMENCLATURA

Abs	absorbancia
AC	antes de Cristo
ADC	albúmina-dextrosa-catalasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
BCG	bacillo de Calmette-Guèrin
°C	grados Celsius
cm	centímetros
DR	repetido directo
g	gramos
h	horas
kb	kilobases
kg	kilogramos
LAM	lipoarabinomanano
MDR-TB	tuberculosis multifármaco-resistente
µg	microgramos
µM	micromolar
µl	microlitros
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
Mm	milimolar
ND	no detectado
ng	nanogramos
nm	nanómetros
nM	nanomolar
OADC	ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDIM	ftiocerol dimicocerosatos
PLC	fosfolipasa
%	por ciento
p.ej.	por ejemplo
PPD	derivado proteico purificado
RFLP	polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RN	rojo neutro
RN+	rojo neutro positivo
RN-	rojo neutro negativo
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundos
SL	sulfolípido
TA	temperatura ambiente
TLC	cromatografía de capa fina
UFC	unidades formadoras de colonias
V	voltios
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
v/v	volumen/ volumen
XDR-TB	tuberculosis extensivamente resistente a fármacos

1. RESUMEN

La tuberculosis, cuyo agente causal es la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, es considerada como una enfermedad infecciosa reemergente y un problema de salud pública mundial. Afecta al equivalente a un tercio de la población mundial (1.7 billones de personas). Una de las principales dificultades para el control de esta infección es la escasez de opciones terapéuticas adecuadas, y aunque se cuenta con la vacuna BCG como método de prevención, esta puede presentar una amplia variabilidad que va desde un 0 hasta 80% dependiendo de diversos factores. Esto es posiblemente debido a que se deriva de una cepa de *M. bovis*, que aunque es antigénicamente muy similar a *M. tuberculosis* no es idéntica, y a que en el mundo circulan linajes que pudieran comportarse diferentes inmunológicamente.

En diversos estudios se ha reportado que el pasaje serial *in vitro* induce cambios en la virulencia de diversos microorganismos como el virus de la polio y la misma *Mycobacterium bovis* que fue atenuada por Calmette y Guerin para producir la vacuna BCG. En un estudio previo realizado por nuestro grupo, se observó que después de 100 subcultivos continuos de 5 diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis* se indujeron algunos cambios en el patrón de RFLP del IS6110 así como en la citotoxicidad de las cepas en la línea celular THP-1. En el presente trabajo propusimos realizar estudios genéticos y de virulencia a los mismos aislados clínicos después de 150 subcultivos continuos, además de comprobar la virulencia de estas cepas mediante el análisis de lípidos metilados ramificados mediante la técnica del rojo neutro, cromatografía en capa fina (TLC) y PCR para los genes *pks*. Observamos diversos cambios genéticos nuevos en el patrón de RFLP del IS6110 así como en el espoligotipo para la región DR de algunas de nuestras cepas. Además, hemos detectado una disminución en la virulencia de algunas cepas tanto en los ensayos de citotoxicidad como en el análisis de lípidos.

ABSTRACT

Tuberculosis, whose causal agent is the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*, is considered a reemerging infectious disease and public health problem worldwide. It affects the equivalent of one-third of the world population (1.7 billion people). One of the main difficulties in controlling this infection is the lack of adequate therapeutic options and although it has the BCG vaccine as a prevention method, its protection range is very variable from 0 to 80%. This is possibly because it is derived from a strain of *M. bovis*, which although is very similar antigenically to *M. tuberculosis* is not identical.

Several studies have reported that serial passage in vitro induces changes in the virulence of microorganisms such as poliovirus and the same *Mycobacterium bovis* that was attenuated by Calmette and Guerin to produce the BCG vaccine. In a previous study by our group, we observed that after 100 subculturing 5 different clinical isolates of *M. tuberculosis* induced changes in the IS6110 RFLP pattern and in the cytotoxicity of strains in THP-1 cell line. In this work we studied changes in virulence and in the genetic composition after 150 continuous passages; we also analyzed the virulence of these strains by analysis of methylated branched lipid by neutral red technique, thin layer chromatography (TLC) and PCR for genes pks. We observed several novel genetic changes in the IS6110 RFLP pattern and spoligotype in the DR region for some of our strains. In addition, we detected a decrease in the virulence of some strains in both cytotoxicity assays and the analysis of lipids.

2. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis deriva del latín *tuberculum* (que significa pequeña protuberancia o pequeño nódulo) es una infección bacteriana crónica causada por un grupo de bacterias del orden Actinomycetales de la familia *Mycobacteriaceae*. El complejo *M. tuberculosis* incluye *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii* y *M. pinnipedii*. Siendo *Mycobacterium tuberculosis* la principal causante de tuberculosis en humanos (OMS, 2011).

Habitualmente, la enfermedad se localiza en pulmones pero puede afectar cualquier órgano del cuerpo humano incluyendo los sistemas nervioso central (causando meningitis), linfático, circulatorio (causando tuberculosis miliar), y genitourinario así como huesos y articulaciones (Robbins, 2002).

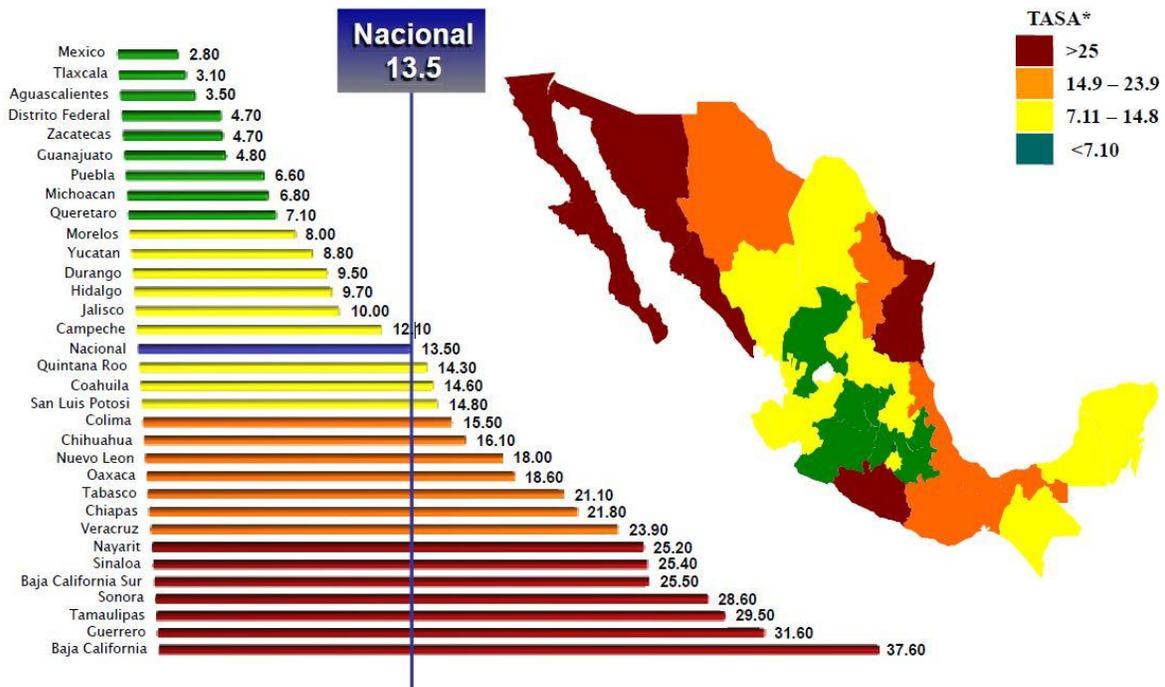
Ésta enfermedad es considerada como una enfermedad infecciosa reemergente y un problema de salud pública mundial. Afecta a cerca de 2 billones de personas por año, es decir, un tercio de la población mundial. Se estima que es la enfermedad que causa más muertes que cualquier otra enfermedad infecciosa curable y fue declarada una emergencia global desde 1993 por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2003).

De acuerdo con la OMS, en el 2009 hubo 1.7 millones de muertes como resultado de la infección por tuberculosis en el mundo y más de 9 millones desarrollaron la enfermedad en este año, constituyendo el 18.5% de todas las defunciones entre adultos de 15 a 59 años de edad. De estos casos 4.1 millones fueron positivos para baciloscopia (44% del total) (OMS, 2011).

Las regiones de África, el sureste de Asia y el oeste del Pacífico presentan el 83% de los casos mundiales de infección por tuberculosis notificados. India, China, Sudáfrica, Nigeria e Indonesia son los cinco primeros países respectivamente en términos de número de casos absolutos (OMS, 2011).

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. En el 2009 se notificaron casi 17,598 casos de tuberculosis en todas sus formas. Las tasas de incidencia por estado se muestran en la figura 1 (Secretaría de Salud México, 2011).

Morbilidad por Tuberculosis Pulmonar, 2009*



• Fuente: SINAVE, DGE, SSA. Población a mitad del año. Indicadores demográficos 1990-2030. CONAPO.
 • *Tasa por 100 mil habitantes. Información Preliminar

Figura 1. Tasa de incidencia de *M. tuberculosis* reportados en el 2009 en los distintos estados de México

Entre los principales factores causantes del incremento en el número de casos de ésta enfermedad se encuentran las deficiencias tanto en la infraestructura de salud pública como de los programas de control, el movimiento poblacional desde las zonas de alta prevalencia, la co-infección con el VIH y el surgimiento de cepas de tuberculosis multifármaco resistentes (MDR-TB); más recientemente las cepas identificadas como extensivamente fármaco-resistentes (XDR-TB). Siendo quizá la infección epidémica por el VIH el factor más importante para el aumento de la frecuencia de tuberculosis, además de aumentar de manera notoria la tasa de tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB). En el 2009, aproximadamente 1 millón de los casos de tuberculosis fueron VIH-positivos representando el 8% del total de nuevos casos (OMS, 2011).

De acuerdo con diversos estudios realizados por la OMS, se estima que el impacto mundial de la tuberculosis continuará incrementándose si no hay un programa de control efectivo de la enfermedad (OMS, 2011).

La infección puede tratarse de manera adecuada si se realiza un diagnóstico temprano y se administra la terapia adecuada. Sin embargo, en la actualidad las opciones terapéuticas para ésta enfermedad son escasas (Vera *et al.*, 2005).

A pesar de contar con la vacuna BCG y aunque esta es todavía la vacuna más ampliamente utilizada en el mundo, no es derivada de la cepa original, ya que 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 que han resultado en una variabilidad en la capacidad para inducir protección contra TB (Clemens *et al.*, 1983; Brosch *et al.*, 2007).

3. HIPÓTESIS

Después de 150 subcultivos continuos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* se inducen cambios en su composición genética y virulencia.

4. OBJETIVOS

Objetivos generales

Estudiar el efecto de 150 subcultivos continuos sobre la composición genética y la virulencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, como paso previo para la obtención de una cepa vacunal.

Objetivos específicos

1. Subcultivar cepas de *M. tuberculosis* provenientes de aislamientos clínicos que tengan delección del locus PLC hasta el pase 150.
2. Analizar si hubo cambios genéticos mediante el análisis de RFLP para IS6110 y espoligotipo en el pase 150.
3. Determinar la capacidad citotóxica de los aislamientos de dicho pase en monocapas de macrófagos THP-1 y compararla con las cepas parentales.
4. Evaluar la virulencia de las cepas subcultivadas mediante el ensayo citoquímico del rojo neutro.
5. Analizar los lípidos de cepas parentales y subcultivadas mediante cromatografía en capa fina (TLC).
6. Confirmar la presencia de los genes *pks* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5. ANTECEDENTES

5.1 Tuberculosis

5.1.1 Etiología

La tuberculosis ha estado presente en la humanidad desde la antigüedad, los orígenes de la enfermedad se encuentran en la primera domesticación de ganado vacuno. Se han encontrado restos de esqueletos que muestran que los humanos prehistóricos sufrieron de la enfermedad (8000 AC). Debido a la variedad de síntomas, la tuberculosis no fue identificada como una enfermedad sino hasta el año 1820 y fue nombrada como tal hasta el año de 1839 por J.L. Schoenlein. (Tuberculosis Research Today, 2004)

El bacilo causante de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, fue descrito en el año de 1882 por Roberto Koch. Su morfología característica suele ser bacilar, ligeramente curvos, inmóviles y no esporulados. Miden de 1 a 10 μ de longitud y 0.2 a 0.6 μ de ancho. Es un patógeno intracelular facultativo que tiene la habilidad de persistir dentro de los macrófagos y otras células del sistema retículo endotelial. Es una bacteria aerobia cuyo crecimiento se ve favorecido por una atmósfera del 5-10% de CO₂, con una temperatura óptima de 37°C. Es un microorganismo de lento crecimiento que se divide cada 16 a 20 horas, observándose el desarrollo de colonias entre 3 y 5 semanas, tiempo extremadamente lento en comparación con otras bacterias lo cual probablemente sea debido al carácter hidrofóbico de la superficie celular, que hace las células muy impermeables a los nutrientes (Brock, 2004).

Al igual que otros miembros de éste género, *M. tuberculosis* presenta una estructura de la pared poco común, el complejo de la pared celular consta de tres capas: la capa interna, constituida por el peptidoglicano; la capa media, compuesta por el arabinogalactano en cuyos extremos distales están esterificados los ácidos micólicos de tamaño y estructura única para las micobacterias; y una capa externa, a la cual se le atribuye una estructura glucolípida sulfatada (Brock, 2004).

La pared celular aparece en secciones ultrafinas como una membrana trilaminar clásica, dos capas electrodensas separadas por una capa transparente. Sin embargo presentan algunos componentes distintivos como lipopolisacáridos, lipoarabinomano (LAM) lipomananos y fosfatidil inositol-manósidos. Por esta razón, sus células presentan una superficie externa cerosa que le confiere propiedades importantes como resistencia a muchos antibióticos y protección contra ambientes adversos (Schlossberg, 2000).

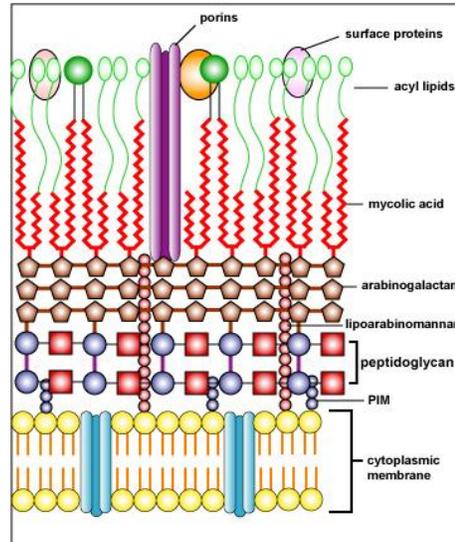


Figura 2. Estructura de la pared celular de *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis es identificado microscópicamente por sus características de tinción, ya que retiene ciertos colorantes después de ser tratado con una solución ácida, por lo cual es clasificada como un microorganismo “ácido alcohol resistente” o “AAR”. En la técnica de tinción más comúnmente utilizada, es decir, la tinción de Ziehl – Neelsen, los bacilos se tiñen de color rojo brillante en contraste con un fondo color azul (Brock, 1998).

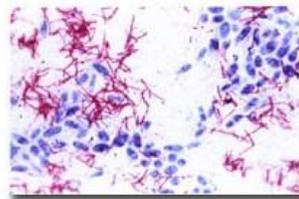


Figura 3. Tinción Ziehl – Neelsen.

Cuando crece en medio sólido, *M. tuberculosis* suele formar colonias apretadas, compactas y arrugadas, con los organismos que las componen amontonados en vez de estar esparcidos por la superficie del agar. Se cree que esta disposición es debida al gran contenido de lípidos y a la naturaleza hidrofóbica de la superficie celular. (Brock, 1998)

Al igual que la mayor parte de las micobacterias *M. tuberculosis* suele crecer en medios sencillos con sales minerales, con amonio como fuente de nitrógeno, y glicerol o acetato como única fuente de carbono y donador de electrones. Además su crecimiento es estimulado por lípidos y ácidos grasos, y suele añadirse a los cultivos yema de huevo para conseguir un mayor crecimiento (Brock, 1998).

5.1.2 Patogenia

La tuberculosis es una infección bacteriana necrosante crónica y transmisible con una gran variedad de manifestaciones clínicas y un amplio espectro de severidad. Algunos pacientes se encuentran en perfecto estado de salud, otros, tienen enfermedad crónica con recaídas mientras que otros son portadores de una enfermedad rápidamente progresiva. La transmisión se realiza, habitualmente, por inhalación de microgotas infectadas producidas por la tos o los estornudos de individuos infectados. Los factores predisponentes son cualquier situación debilitante o de inmunodepresión (p. ej., diabetes, alcoholismo, malnutrición, enfermedad pulmonar crónica) (Schlossberg, 2000).

Después de la inhalación de gotas de secreciones respiratorias que contienen unos cuantos bacilos, los macrófagos ingieren los bacilos inhalados, que son capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de estas células al inhibir la formación de fagolisosomas (Robbins, 2002), esto es debido a los lípidos y carbohidratos de la pared celular de *M. tuberculosis* los cuales parecen incrementar su virulencia (Schlossberg, 2000).

Transcurridas de 2 a 4 semanas desde la infección inicial, se desarrolla hipersensibilidad retardada (tipo IV) frente al bacilo tuberculoso. Esto se comprueba mediante la prueba de PPD o también llamada prueba de la tuberculina. Sin embargo, una

prueba positiva indica sensibilización más no necesariamente enfermedad activa (Robbins, 2002).

Existen varias formas de tuberculosis, según la hipersensibilidad y la resistencia del individuo:

I. Tuberculosis Primaria

La tuberculosis pulmonar primaria se produce en individuos que no han tenido contacto previo con el bacilo tuberculoso. Cerca del 90% de las personas que se infectan con *M. tuberculosis* manifiesta éste patrón clínico. En este patrón las células T CD4⁺ se activan dentro de las dos a seis semanas siguientes a la infección e inducen infiltración de grandes números de macrófagos activados. Estas células tabican el microorganismo dentro de una lesión granulomatosa denominada tubérculo, el cual consiste en unos cuantos linfocitos pequeños y una acumulación compacta de macrófagos activados que a veces se diferencian hasta células epitelioides o células gigantes multinucleadas (Goldsby, 2004).

La activación masiva de los macrófagos que ocurre dentro de los tubérculos suele ocasionar la liberación de concentraciones elevadas de enzimas líticas, las cuales destruyen las células sanas vecinas, lo que resulta en regiones circulares de tejido necrótico que por último se convierten en lesiones de consistencia caseosa. Al cicatrizar estas lesiones caseosas se calcifican y se tornan visibles en las radiografías, en las que se denominan complejos de Ghon. Como los macrófagos activados suprimen la proliferación de los bacilos fagocitados, la infección se frena (Goldsby, 2004).

II. Tuberculosis Secundaria

Este término designa la infección activa en un individuo previamente sensibilizado. La mayoría de los casos representan la reactivación de bacilos latentes de lesiones primarias. A veces, la enfermedad secundaria es de origen exógeno. La tuberculosis secundaria se localiza predominantemente en los vértices pulmonares, lo que refleja la predilección de *M. tuberculosis* por una PO₂ elevada. Estas lesiones pueden progresar a tuberculosis fibrocavitaria, a bronconeumonía tuberculosa o a tuberculosis miliar (Schlossberg, 2000).

III. Tuberculosis Diseminada

Cerca del 10% de los individuos infectados por *M. tuberculosis* manifiesta un patrón clínico distinto y la enfermedad progresa hasta tuberculosis pulmonar o extrapulmonar crónica. Este progreso puede ocurrir años después de la infección primaria. Bajo este patrón clínico, la acumulación de grandes concentraciones de antígenos micobacterianos dentro de los tubérculos produce activación crónica extensa de células T CD4⁺ y activación consecuente de los macrófagos. Las resultantes concentraciones elevadas de enzimas líticas hacen que las lesiones caseosas necróticas se licúen y conviertan en un medio rico que permite a los bacilos de la tuberculosis proliferar fuera de las células (Goldsby, 2004).

Por último las lesiones se rompen, ocurriendo una diseminación pulmonar e inclusive hematógona y linfática de los bacilos tuberculosos, lo cual puede producir:

- Tuberculosis miliar, con infinidad de diminutos focos de infección en muchos órganos, especialmente en el hígado, la médula ósea, el bazo y los riñones.
- Tuberculosis de órganos aislados, cuando los microorganismos sólo se afianzan en uno o dos órganos, más frecuentemente las suprarrenales, los riñones, el hueso (osteomielitis tuberculosa) o el aparato genital femenino (salpingitis, endometritis). (Robbins, 2002)

5.1.3 Manifestaciones Clínicas

La tuberculosis primaria es habitualmente asintomática. La forma secundaria provoca con más frecuencia fiebre insidiosa, sudación nocturna, pérdida de peso, tos con expectoración hemoptoica o hemoptisis. El diagnóstico se basa en el cultivo de los microorganismos, o en la demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes en el esputo o en tejido obtenido por biopsia. El pronóstico y la evolución son variables, dependiendo de la extensión de la enfermedad, el nivel de salud inicial del paciente, entre otros factores. La quimioterapia es eficaz en todos los casos, salvo los muy abandonados, y los causados por cepas multirresistentes a fármacos (Robbins, 2002).

5.1.3 Tratamiento y Prevención

Existen cinco medicamentos de primera elección para el tratamiento de la tuberculosis. Estos son isoniacida, rifampicina, piracinamida, estreptomina y etambutol. Aunque estos fármacos son efectivos cuando se administran adecuadamente, la terapia antituberculosis con fármacos de primera línea tiene diversas desventajas. Entre ellas se encuentran: hepatotoxicidad potencial, duración a largo plazo y desarrollo de resistencia. (Schlossberg, 2000)

El método de prevención más utilizado contra la infección por *M. tuberculosis* es la vacuna BCG. Ésta vacuna fue creada por Calmette y Guèrin a partir de cultivos atenuados de *M. bovis* y se administró por primera vez en humanos en el año de 1921. A pesar de que todas las vacunas que se utilizan en la actualidad derivan de la cepa original, éstas difieren en sus características cuando se crecen en medios de cultivo y en su habilidad para inducir una respuesta inmune en contra de la tuberculina. Diferentes preparaciones de BCG líquida han sido utilizadas en estudios dentro de diversas comunidades a lo largo del tiempo, encontrando considerables diferencias en la eficiencia de esta vacuna contra la infección por *M. tuberculosis* que van desde un 0 hasta un 80% (Clemens *et al.*, 1983). El ensayo más grande de vacunación con BCG dentro de una comunidad se llevó a cabo desde 1968 a 1971 en el sur de India. Aunque se utilizaron dos diferentes cepas vacunales consideradas las mas potentes disponibles en ese tiempo, no se encontró eficacia protectora en adultos ni en niños después de 5 años de la vacunación. Los pacientes fueron re-evaluados 15 años después de ser vacunados, y se encontró una protección del 17% en los niños y ningún porcentaje de protección en personas vacunadas cuando eran adolescentes o adultos (CDC, 2010).

5.2 Virulencia

La virulencia de *M. tuberculosis* es extremadamente complicada y multifacética. A pesar de que este microorganismo no produce factores de virulencia clásicos como las toxinas producidas por *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae* y *Vibrio cholerae* (Smith, 2003), posee un amplio repertorio de propiedades estructurales y fisiológicas que han sido reconocidas por su contribución a la virulencia de las micobacterias y en la patología de la tuberculosis.

Se ha encontrado que en los determinantes de virulencia de este patógeno se involucra 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). Algunos de estos determinantes se citan a continuación.

Dentro de los mecanismos de entrada a la célula, los bacilos de *M. tuberculosis* pueden unirse directamente a los receptores de manosa en los macrófagos a través de los lipoarabinomananos (LAM), o indirectamente vía receptores del complemento o bien por los receptores Fc (Chan *et al.*, 1991). Dentro de las funciones de los LAMs se les ha reconocido como potentes inductores o citocinas quimioatrayentes (AraLAM), como promotores de respuestas proinflamatorias en macrófagos y células dendríticas (PILAM), se les ha involucrado también en la inhibición de la maduración del fagosoma, apoptosis y secreción de citocinas (Strohmeier *et al.*, 1999). Se han postulado algunas proteínas que juegan un papel en la síntesis de varias moléculas de la superficie celular como ESAT6/CFP10 y *hspX*; la interrupción de los genes ESAT6/CFP10 en una cepa de *M. bovis* resultó en atenuación en un modelo infección en cobayos (Wards *et al.*, 2000). Recientemente se demostró que *M. tuberculosis* produce un pili formado por proteínas de bajo peso molecular designado Rv3312A durante la infección en humanos; además se demostró que el aislado del pili de *M. tuberculosis* (MTP) se une *in vitro* a la proteína laminina de la matriz extracelular, sugiriendo que actúan como adhesinas y pueden ser factores importantes en la colonización del hospedero (Alteri *et al.*, 2007).

Como ya se mencionó anteriormente *M. tuberculosis* puede crecer intracelularmente, esto resulta altamente efectivo como mecanismo de evasión del sistema inmune. En particular, los anticuerpos y el complemento son completamente inefectivos. Una vez que el bacilo ha sido fagocitado, puede inhibir la fusión del fagolisosoma mediante la secreción de proteínas que modifican la membrana del fagosoma. De esta manera el microorganismo puede permanecer en el fagosoma o escapar, encontrando en cualquiera de los casos un ambiente protegido para su crecimiento dentro del macrófago (Todar, 2011). 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). 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).

En diversos estudios se 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).

Raynaud *et al* construyeron en el 2002 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.

En una revisión exhaustiva de los posibles determinantes de virulencia de *M. tuberculosis* Smith identificó cuatro enzimas de filtrados de cultivos, once proteínas de superficie, cuatro grupos de enzimas involucradas en el metabolismo celular (incluyendo metabolismo de lípidos, aminoácidos y biosíntesis de purinas, toma de metales, respiración anaerobia y estrés oxidativo) y tres juegos de reguladores transcripcionales a los cuales puede atribuirse en cierto grado la virulencia del microorganismo (Smith, 2003).

A partir de la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv en 1998 se han utilizado con mayor frecuencia diversos métodos genéticos para el estudio de la virulencia de esta bacteria (Cole *et al.*, 1998). El genoma comprende 4,411,529 pares de bases, contiene alrededor de 4,000 genes de los cuales 525 están involucrados en la pared celular y procesos celulares, 188 genes codifican proteínas reguladoras y 91 genes participan en la virulencia, detoxificación y adaptación. Además de contener 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. Se han identificado más de 200 genes que codifican enzima para el metabolismo de ácidos grasos. Éste gran número de enzimas de *M. tuberculosis* que presuntamente utilizan ácidos grasos puede estar relacionada con la habilidad del patógeno para crecer en los tejidos del hospedero infectado, en donde los ácidos grasos podrían ser la mayor fuente de carbono (Cole *et al.*, 1998).

A lo largo de los años se ha considerado que los lípidos juegan un papel muy importante en la patogénesis de *Mycobacterium tuberculosis*. Durante la infección, el microorganismo debe adquirir nutrientes y resistir la defensa del hospedero. Los lípidos son importantes para ambos: los derivados del hospedero proveen alimento, mientras que los derivados del patógeno funcionan como inmunosupresores (Ehrt y Schnappinger, 2007). En sus estudios Segal y Bloch encontraron que los ácidos grasos en lugar de los carbohidratos, estimulan la respiración de Mtb si la bacteria era aislada de los pulmones de ratones en lugar de cultivos líquidos. Por lo tanto se hipotetizó que el crecimiento *in vivo* o la persistencia de *M. tuberculosis* dependía de los ácidos grasos como fuente principal de nutrientes. Cuarenta y cuatro años más tarde, McKinney *et al* describieron una mutante en la cual un gen que codificaba una isocitrato liasa (ahora llamada *icl1*) había sido inactivado. En contraste con la cepa original, esta mutante mostró una supervivencia selectiva durante la fase crónica de la infección usando un modelo murino de tuberculosis; el crecimiento durante la fase aguda de la infección y en el medio líquido permaneció sin cambios.

Además de su papel como nutrientes, los ácidos grasos, principalmente en la forma de ácidos micólicos constituyen un componente clave en la envoltura celular del patógeno. Esta envoltura es responsable de muchas de las características microbiológicas únicas de las micobacterias, que además contiene moléculas inmunomoduladoras. Reed y colaboradores proporcionaron la primera evidencia de que un lípido particular de la cepa Beijing HN878 (miembro de la familia Beijing asociada a brotes de alta morbilidad y mortalidad alrededor del mundo) la cual tenía una disrupción del locus *pks1-15* que codifica una poliquétido sintetasa relacionada también con la producción de glucolípidos fenólicos (PGL), es capaz de suprimir respuestas inmunes del hospedero.

Uno de los primeros ejemplos de la aplicación de un acercamiento “post-genómico” a la investigación de la patogénesis de *M. tuberculosis* fue la demostración de que el compuesto tipo cera ftiocerol dimicocerosato (PDIM) era necesario para la virulencia completa en un modelo murino de tuberculosis (Camacho *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 1999). Este lípido asociado a la pared celular está compuesto de una cadena larga de β -diol (ftiocerol) esterificado a dos ácidos grasos ramificados multi-metilados (ácidos micocerósicos). Los PDIMs pertenecen a la familia de los lípidos complejos llamados poliQUÉTIDOS (PKs) que incluye además los compuestos (fenol)ftiocerol (POL) y ftiodiolonas (PONE). El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv contiene 24 genes de PK sintetasas (genes *pks*) organizados en diversos loci, algunos de los cuales son relevantes para la virulencia. Modelos recientes proponen al menos tres sistemas de genes *pks* involucrados en la síntesis de PDIMs: (1) *ppsA-E* requeridos para la síntesis de POL y PONE, (2) *mas*, requerido para la síntesis de ácidos micocerósicos y (3) *pks15/1*, necesario para la incorporación del grupo fenólico en los variantes de PDIMs. En estudios recientes se sugiere que existen otros genes *pks* involucrados en la síntesis de PDIMs además de los mencionados (Onwueme *et al.*, 2003).

Al menos tres estudios independientes han confirmado que los mutantes de *M. tuberculosis* deficientes o con alguna translocación en la síntesis de PDIM se encuentran severamente atenuadas *in vivo* (Camacho *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 1999; Domenech *et al.*, 2005). La importancia de este lípido en la biología de la infección por *M. tuberculosis* puede inferirse a partir de que se conoce que aproximadamente 50 kb (>1%) de su genoma está dedicado a la biosíntesis y el transporte de esta compleja molécula (Cole *et al.*, 1998; Onwueme *et al.*, 2005). Aunque existen publicaciones referentes al papel de los PDIMs dentro de la patogénesis de TB que datan desde inicios de 1970, aún en la actualidad su modo de acción no está completamente claro. Entre las funciones que han sido sugeridas se encuentran desde la modificación de la membrana plasmática del hospedero hasta la inmunomodulación inata y la protección de la bacteria contra intermediarios reactivos del nitrógeno derivados de la célula hospedera (Domenech y Reed, 2009).

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).

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.

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.

5.3 Atenuación por Pasajes *in vitro*.

A pesar de que la atenuación de microorganismos por pasajes *in vitro* es en la actualidad considerada como una técnica antigua para la generación de vacunas, esta ha sido ampliamente utilizada a lo largo de la historia. Muchas de las preparaciones vacunales más prominentes de uso médico en la actualidad consisten de partículas virales atenuadas (Walsh, 2003), 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).

El Bacilo Calmette-Guérin (BCG), la vacuna original contra la tuberculosis, es un mutante atenuado de *Mycobacterium bovis* aislado después de 230 subcultivos seriados en medio de cultivo conteniendo bilis de buey realizados por Albert Calmette y Jean Marie Camille Guérin entre 1908 y 1921 (Calmette y Guerin, 1909). Después de 39 pasajes, se observó que la cepa era incapaz de matar animales experimentales, y mostró desde entonces y hasta el último pasaje realizado no tener reversión a su estado virulento. Se estima que aproximadamente 3 billones de dosis han sido utilizadas para vacunar a la población mundial contra la tuberculosis. Por esta demanda de vacunas derivadas de la BCG 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 las cuales pudieron haber sido causadas por cambios genéticos ocurridos en las cepas bacterianas durante el paso del tiempo, además de las diferencias en las técnicas de producción (Clemens *et al.*, 1983; Brosch *et al.*, 2007).

Por medio de la propagación de la bacteria en el laboratorio sin selección de hospedero por más de cinco décadas, como es el caso de BCG Pasteur, se espera la emergencia de mutantes que no tienen ninguna necesidad de mantener factores bacterianos requeridos durante la infección. En trabajos previos se confirmó esta predicción, a través del estudio de la región de diferencia 1 (RD1), una delección de 9.8 kb que ocurrió durante el período de subcultivo de la BCG. Esta delección mostró una contribución a la atenuación de BCG tanto por disrupción de genes como por experimentos de complementación. La cepa BCG Pasteur no solo carece de RD1 sino que también ha incurrido otras mutaciones, incluyendo la región de diferencia 2 (RD2), perdida durante los años de 1927 y 1931, época en la que los investigadores de vacunas reportaron futuras atenuaciones de la vacuna BCG. Para evaluar el papel de RD2 asociada a la virulencia, Kozak *et al* construyeron en el 2010 un knock-out dirigido en la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y condujeron una serie de estudios *in vitro* e *in vivo* demostrando que la pérdida de RD2 conduce a la reducción de la virulencia, proporcionando evidencia de que el perfil de seguridad de la BCG Pasteur resulta a partir del efecto acumulativo de múltiples mutaciones atenuantes.

En un estudio de genómica comparativa y análisis transcripcional de varias vacunas del “bacilo de Calmette y Guérin” (BCG), se 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; DU2-1 está confinada a las vacunas BCG iniciales, como BCG Japón, mientras que DU2-III ocurre en las vacunas mas recientes. (Brosch *et al.*, 2007).

El 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.

Un ejemplo de atenuación *in vitro* ha sido descrito recientemente para el aislado clínico *M. tuberculosis* MT103. Esta cepa perdió su virulencia después de 18 meses de pasaje continuo en medio de cultivo. Esta atenuación fue relacionada con un resultado negativo en la reacción del rojo neutro (NR-) y a su deficiencia en la síntesis de ftiocerol dimicocerosatos (PDIMs). En contraste, la cepa de laboratorio *M. tuberculosis* H37Rv mostró estabilidad presentando una reacción rojo neutro positiva (NR+), indicador de virulencia, después de 2 años de pasajes seriados *in vitro* (Cardona *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Andreu y Gibert en el 2008, se reportó que después de aproximadamente 20 subcultivos en Middlebrook 7H9 y 7H10 durante 2 años, la cepa *M. tuberculosis* H37Rv mostró el establecimiento de poblaciones mixtas tanto en el rojo neutro como en la síntesis de PDIMs, dos fenotipos ampliamente relacionados con la virulencia de este microorganismo.

En un trabajo más reciente se reveló que la cepa H37Rv es altamente susceptible a perder la habilidad de sintetizar los PDIMs durante períodos largos de cultivo *in vitro*. Aquí se demostró que después del subcultivo semanal de aislados PDIM-positivos por un período de 20 semanas, la proporción de células PDIM-negativas incrementó en más de un 30%. La aparición de múltiples tipos de mutaciones indica que una tasa de crecimiento potenciado de bacterias PDIM-negativas asegura que estas clonas predominen rápidamente en los cultivos *in vitro* (Domenech y Reed, 2009).

En el 2007 Molina-Torres reportó el efecto del pasaje serial *in vitro* sobre la genética y virulencia de 5 cepas diferentes de *M. tuberculosis*, encontrando cambios genéticos que involucran al elemento transponible IS6110. El análisis de microarreglos reveló que no se produjeron nuevas deleciones importantes en estas cepas que involucraran los genes de *M. tuberculosis* H37Rv además de las deleciones ya reportadas. También se observó que el subcultivo continuo produjo cambios significativos en la citotoxicidad de *M. tuberculosis* sobre la monocapa de macrófagos THP-1 (Molina-Torres, 2007).

Debido a los antecedentes ya mencionados y a los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, realizamos en este trabajo diversos estudios que permitieron determinar los cambios genéticos y de virulencia de las cepas utilizadas por Molina-Torres pero ahora en el subcultivo 150. Incluimos en este estudio análisis genéticos del IS6110 y la región del repetido directo, así como diversos estudios de virulencia entre los que se encuentran: el efecto citotóxico de las cepas en una línea celular de macrófagos, la reacción del rojo neutro y análisis de lípidos metilados ramificados por cromatografía de capa fina y PCR.

6. MÉTODOS

6.1. Microorganismos de Estudio. 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 fueron seleccionados y utilizados previamente en nuestro laboratorio y tienen la particularidad de tener una delección parcial o total del locus de fosfolipasa C, 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 multi-drogoresistencia (van Soolingen *et al.*, 1995). En este trabajo se utilizará 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).

6.2. 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 10-15 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 fueron congeladas a -70 °C hasta su uso.

TABLA 1

Características de los 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	Sitios de inserción	PCR <i>plcD</i>
						<i>IS6110</i> sitio de inserción Sitio 3' y 5'		
RIVM-9701 0488	Moderna	-	-	-	-	GTCTGGGTCGTT G	ND	+
RIVM-9701 1177	Moderna	-	-	-	-	CCTGCGCCGGCA G CCCTCCTCTAAC	19916 (<i>plcC</i>) y ND	-
RIVM-9701 1289	Moderna	-	-	-	-	CCTGCGCCGGCA G CCCTCCTCTAAC	19849 (<i>plcC</i>) y 288509	-
RIVM-9701 1389	Ancestral	-	-	-	-	ND	19849 (<i>plcC</i>) y 288509	+
DR-689	Beijing	-	-	-	-	ND	ND	ND

(ND: no detectada)

6.3. Subcultivo de las Cepas. Las distintas cepas fueron inoculadas 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 fueron incubados a 37°C y se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm.

Una vez que se observó crecimiento visible en cada matraz (aproximadamente 5 días) se retiraron del agitador y se mantuvieron sin agitación hasta que todos los matraces mostraron una densidad bacteriana similar. 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 incubaron en agitación constante y así sucesivamente hasta que todos los cultivos, tanto los subcultivados en M7H9 como los adicionados con bilis, completaron un total de 150 pasajes. Cada 5 pases se tomó una alícuota de cada cepa y se guardó en medio M7H9 con glicerol al 5 % para criopreservar las cepas a -70°C, con la finalidad de realizar algún análisis retrospectivo de alguno de los pases intermedios en caso de ser necesario.

6.4. Determinación de las Cuentas Bacterianas 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 se sembraron en placas Petri conteniendo 10 ml de agar Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) suplementado con OADC. Fueron incubadas por 10-21 días a 37 °C en 5-10 % de CO₂. Finalizado el tiempo de incubación se contó el número de colonias por placa de cada dilución, tomando en cuenta los rangos entre 30 y 300 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).

6.5. Extracción del ADN. El ADN se extrajo mediante la técnica de CTAB-NaCl con las modificaciones mencionadas 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 μ l de solución TE 1X y se calentaron por 30 min a 80°C para inactivarlas. Se añadieron 50 μ l de lisozima (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MI, USA) mezclando por inversión (20 veces) y se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente se adicionaron 70 μ l de SDS al 10 % y 6 μ l 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 μ l de NaCl 5M (Sigma), se mezclaron por inversión (20 veces), agregando después 80 μ l de bromuro de hexadecil-trimetilamonio (CTAB) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). 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 Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se agitó en un vórtex por 10 seg, 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 μ l de isopropanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); 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 el sobrenadante fue descartado. La pastilla de ADN se lavó con 1 ml de etanol frío para remover el CTAB residual y el isopropanol. Los tubos fueron centrifugados 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 aproximadamente 50 μ l 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.

6.6. Genotipificación de ADN Basada en IS6110. Como parte del análisis del 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).

6.6.1. Digestión del ADN con *PvuII*.

Se digirieron aproximadamente 2 µg de ADN genómico con la enzima *PvuII* (Promega, Madison, WI, USA) en un volumen final de 30 µl en un tubo eppendorf, se centrifugaron los tubos por 5 s a 12,000 g y se incubaron por 4 h a 37°C.

6.6.2. Separación de los Fragmentos de ADN por Electroforesis.

Se preparó un gel de agarosa al 0.8 % en solución TE adicionado con 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se montó en una cámara de electroforesis utilizando la misma solución para el corrimiento. Se aplicaron 25 µl de las muestras mezcladas con solución de carga 5X a los pozos del gel así como también 4.5 µl 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.

6.6.3. 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 cubre el molde con un pedazo de papel filtro Whatman ajustando el tamaño al molde.

Cuidadosamente se empapa con solución de transferencia SSC 20X y se remueven las burbujas de aire. Se coloca el gel sobre el papel Whatman de tal forma que se ajuste exactamente sobre el molde para geles, se pone encima del gel la membrana de nylon Hybond-N+ (GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, UK) y después se colocan 3 filtros gruesos Whatman sobre la membrana. Finalmente se pone una pila de papel absorbente de aproximadamente 5 cm y sobre éstos se coloca un objeto de aproximadamente 1 kg de peso. Se rellena la bandeja con solución SSC 20X y se lleva a cabo la transferencia durante 4 h a temperatura ambiente.

6.6.3.1 Fijación 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).

6.6.3.2 Preparación de la Sonda por PCR.

Se preparó una reacción de 50 µl utilizando 50 nM de cada primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de la mezcla de nucleótidos, 1 U de Taq polimerasa y 100 ng del templado de ADN de la cepa H37Rv; el volumen se ajusta con agua milliQ estéril. Los tubos fueron colocados en el termociclador (PTC-200 MJ Research) con el siguiente programa: las muestras se desnaturalizaron durante 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, Madison, WI, USA).

6.6.3.3 Marcaje de la Sonda.

Se preparó una solución conteniendo entre 600 a 800 ng del amplicón en 50 µl de agua milliQ. El tubo con la sonda se colocó en agua hirviendo por 5 min, se retiró inmediatamente y se pasó a un baño de hielo por 5 min. Se centrifugó por 30s a 10,000 X g y se agregó un volumen igual de reactivo de marcaje ECL (GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, UK), se mezcló cuidadosamente y se añadió la misma cantidad de glutaraldehído (GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, UK). Se incubó a 37°C por 15 min quedando así lista la sonda para el experimento de hibridación.

6.6.3.4 Hibridación y Detección.

La membrana fue humedecida en solución SSC 2X y se pasó a una malla de polietileno 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-hibridizó 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 éste 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 la solución de lavado secundario por 5 min. Se retiró el exceso de solución de lavado secundario y utilizando un recipiente limpio se agregaron sobre la membrana 10 ml de reactivo de detección. El reactivo de detección fue dispersado por toda la membrana rotando el recipiente por 2 min. La membrana fue retirada 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 plástico y se colocó en el cassette de detección con el lado del ADN hacia arriba, se colocó un film para autoradiografía sobre la membrana, se cerró el cassette por exactamente 15 min.

Posteriormente se sacó el film del cassette y fue colocado 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. Finalmente se sacó el film y se dejó secar a temperatura ambiente.

6.7. Espoligotipificación.

El método descrito en este protocolo está basado en el polimorfismo de ADN presente en la región de “Repetición Directa” (Direct repeat, DR). Esta región consiste de secuencias repetidas directas de 36-pb, las cuales están inter-dispersadas 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. Este método se denomina “Spoligotyping” (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. De esta manera se obtuvieron los patrones característicos de cada cepa.

6.8. 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.

6.8.1. 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 1×10^5 células por mililitro. Los cultivos se observaron diariamente al microscopio para comprobar su buen estado.

6.8.2. 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 cultivan en ausencia de piruvato de sodio por al menos tres pases. Los cultivos de 4 días de crecimiento fueron concentrados por centrifugación en tubos cónicos de polipropileno de 50 ml a 1,000 X g por 5 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente la densidad celular se ajustó a 4×10^5 células/ml con medio RPMI-SFB adicionado con 2 μ l de una solución 10 μ M de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Calbiochem Bioscience, Darmstadt, Germany) por cada mililitro de medio y se distribuyó 1 ml de la suspensión celular a cada pozo de una microplaca de 24 pozos.

Los cultivos se incubaron a 37 °C por 48 h en atmósfera de CO₂ al 5 %, luego se retiró el medio de cultivo con vacío suave y se agregó 1 ml de medio RPMI-SFB fresco incubándose por otras 48 h en las mismas condiciones, después de hacer este proceso los monocitos estuvieron transformados a macrófagos y listos para los ensayos a realizar.

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

Las cepas de las micobacterias a utilizar se descongelaron y su densidad fue ajustada a 4×10^5 bacterias por ml con medio RPMI completo, previamente calentado a 37°C. La infección se llevó a cabo en microplacas de 24 pozos (Costar Corning, N.Y., USA) conteniendo 4×10^4 células por pozo, se agregó a cada pozo 1 ml de la suspensión bacteriana para lograr una multiplicidad de infección 1:10 (célula:bacteria) y se incubó a 37°C y 5 % de CO₂. A las 24 h post-infección los cultivos se lavaron dos veces con medio nuevo precalentado a 37°C. Posteriormente a los días 1, 4 y 7 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 para cada día (1, 4 y 7) para evitar que el vapor del formaldehído afectara al resto de las células en cultivo. Los cultivos fijados fueron mantenidos a 4°C hasta completar todos los tiempos de incubación. Posteriormente todos los cultivos infectados fueron procesados juntos para cuantificar la citotoxicidad.

6.8.4. 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). Se retiró el fijador de las microplacas y se tiñeron las células por 30 min con 500 μ l de CV al 0.1% a temperatura ambiente y moderada agitación. Posteriormente las placas fueron sumergidas 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. Finalmente se pasaron 100 μ l de cada pozo a una microplaca de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas (ELx808, Biotek, Winooski, VT, U.S.A.). Se calculó el porcentaje de citotoxicidad teniendo como referencia cultivos testigo no infectados, el cual se define como un cultivo con 0 % de citotoxicidad.

6.9. Ensayo de Rojo Neutro.

Esta es una técnica citoquímica que se basa en la presencia de lípidos metilados ramificados de la pared celular micobacteriana como indicadores de virulencia (DIMs).

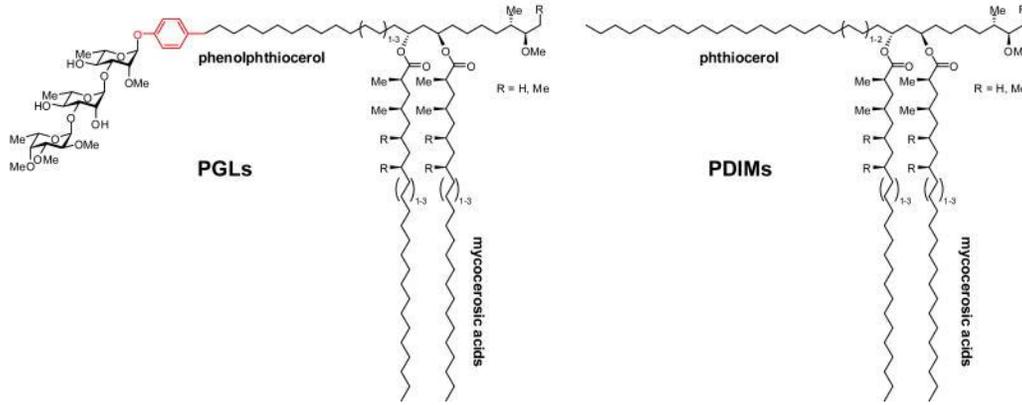


Figura 4. Estructura química de los dos grupos principales de lípidos metilados ramificados: los fenolglícolípidos (PGLs) y los ftiocerol dimicocerosatos (PDIMs).

La reacción del rojo neutro permite distinguir las cepas de H37Rv de las H37Ra, las cuales son positiva y negativa a esta reacción respectivamente (Dubos y Middlebrook, 1948). El rojo neutro es un colorante de fenazina que posee propiedades de indicador. Es amarillo en condiciones alcalinas, cambiando de rojo en soluciones acídicas hasta azul en ácidos fuertes. El cambio de color amarillo a rojo responde a la protonación en el nitrógeno del benceno central (Figura 5).

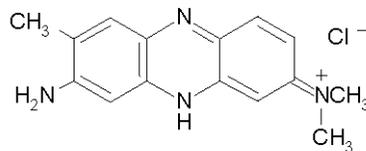


Figura 5. Estructura química del rojo neutro.

La solución de coloración de rojo neutro es amarilla, pero las cepas de *M. tuberculosis* fijan y reducen el pigmento, y sus células se tiñen de rojo (Figura 6). Por lo tanto, una reacción de rojo neutro positiva indica la presencia de compuestos con poder reductor en la superficie de las células de *M. tuberculosis* (Cardona, *et. al.*, 2006).



Figura 6. Coloración de la solución de rojo neutro en distintas condiciones de pH.

Las cepas en el pase 150 fueron cultivadas en agar Middlebrook 7H10 enriquecido con OADC (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por aproximadamente 2 semanas. Una vez observado el crecimiento, se tomaron varias asadas del cultivo y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml conteniendo 1 ml de metanol acuoso al 50% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). El tubo se vortexeó y se incubó por 1 h a 37°C.

Transcurrido este tiempo se removió el sobrenadante, y las células se lavaron de nuevo con metanol acuoso al 50% repitiendo el paso anterior. A continuación se añadió 1 ml de rojo neutro 0.002% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en buffer barbital (Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, MI, USA) se mezcló con las células lavadas manteniendo los tubos a temperatura ambiente.

Se realizó una lectura preliminar de los resultados después de 1 h, llevando a cabo la lectura definitiva después de 24 h. Los resultados se reportan como rojo neutro positivo (RN+) si la masa celular muestra una coloración roja, o rojo neutro negativo (RN-) cuando las colonias mantienen su color original.

6.10. Análisis de Lípidos Mediante Cromatografía de Capa Fina.

6.10.1 Extracción de Lípidos

Para este ensayo los microorganismos fueron cultivados en medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido con ADC (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), a 37°C y en agitación constante a 150 rpm, éstas condiciones se mantienen por aproximadamente 15 días. Una vez que observamos crecimiento visible se colectaron las bacterias por centrifugación a 3500 rpm por 10 min. A continuación se realizaron 3 lavados con 50 ml de solución salina al 0.85%, centrifugando 5 minutos a 3500 rpm. Una vez lavadas las células se disponen en matraces de vidrio de 100 ml con tapón de rosca y sello de teflón, y se realizó la primera extracción utilizando embudos Bunsen de tallo corto y 7.5 mm de diámetro (Kimble Kimax, Kansas City, MO, USA), añadiendo 30 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (1:1, v/v) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA/ J.T. Baker, Estado de México, México) durante toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día se recogió el extracto por filtración [utilizando papel Whatman #1 previamente deslipidado con una mezcla de cloroformo-metanol (1:1, v/v)] en un matraz similar al anterior. La fracción celular se dejó secar sobre el filtro durante 24 h y la fracción lipídica contenida en el solvente se secó por 3 días dentro de una campana de extracción de gases (LABCONCO, Kansas City, MO, USA). Una vez transcurrido este tiempo se recogió la fracción celular con una espátula y se colocó en el matraz inicial, realizando dos extracciones más con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v/v) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA/ J.T. Baker, Estado de México, México) durante 3 h a temperatura ambiente siguiendo el procedimiento anterior. Finalmente los extractos secos fueron colectados en tubos de vidrio de 10 ml (Kimble Kimax, Kansas City MO, USA) con tapón de rosca y sello de teflón debidamente rotulados. Todos los solventes utilizados durante la extracción de lípidos fueron al menos grado de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

6.10.2 Cromatografía de Capa Fina

Los extractos lipídicos fueron analizados utilizando cromatografía de capa fina (TLC) en placas de gel de sílice 10 x 10 (Merck, Germany). Para el análisis de los ftiocerol dimicocerosatos el procedimiento fue el siguiente: se utilizó una mezcla de éter de petróleo-éter 9:1 (v/v) y posteriormente se realizó el revelado con ácido fosfomolibdico en etanol (5% p/v) (Merck, Germany) durante 3 min a 140°C.

El análisis de TLC para los sulfolípidos se llevó a cabo utilizando placas de gel de sílice 10 x 10 (Merck, Germany), como solvente una mezcla de cloroformo-metanol-agua 60:12:1 (v/v/v). Las placas se revelaron con ácido fosfomolibdico en etanol (5% p/v) (Merck, Germany) durante 3 min a 140°C.

6.10.3 Espectrometría de Masas

Este ensayo se llevó a cabo con la finalidad de confirmar la presencia de sulfolípidos de las muestras H37Rv y H37Rv pase 150B las cuales mostraron muy baja concentración de estos compuestos en la cromatografía de capa fina. Se realizó la espectrometría de masas, en modo negativo, con ionización por electrospray y análisis en trampa iónica en un aparato Agilent (ESÍ-TRAP-MS).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para los Genes *pps*.

Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) intentamos detectar la presencia de los genes *ppsA-E*, los cuales codifican una poliquétido sintetasa involucrada en la síntesis de los ftioceroles dimicocerosatos (PDIMs), con la finalidad de correlacionar éstos resultados con los obtenidos en el análisis de éstos lípidos por TLC.

Se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando 15 µl de mezcla de reacción la cual contenía 50 nM de cada primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de la mezcla de nucleótidos, 1 U de rTh polimerasa y 20 ng del templado de ADN; el volumen se ajustó con agua milliQ estéril. Como control positivo se utilizó ADN de *M. tuberculosis* H37Rv. Los tubos fueron colocados en el termociclador (PTC-200 MJ Research, San Francisco, CA, USA) con el siguiente programa: desnaturalización durante 3 min a 94°C seguidas por 30 s a 94 °C, 30 s a 58 °C, 4 min a 68 °C y finalmente 35 ciclos de 30s a 94°C y 10 min a 68°C. Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % y teñidos con bromuro de etidio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). El fragmento obtenido de la PCR fue de aproximadamente 4 kb.

TABLA 2

Iniciadores para los genes *pps*

Gen	Iniciador
<i>ppsA</i>	5'CGGCTGCACACCTGACGAGG3'
	5'CGCGAGATCGACCAGTCCGC3'
<i>ppsB</i>	5'AGGGTCTCTCGCATCGCCGT3'
	5'CACGGACGCCGGCAAGAACT3'
<i>ppsC</i>	5'TCGATGATCTCACGGCGCGC3'
	5'CGCGAGTCGCCGACGTACTC
<i>ppsD</i>	5'GGTGGTGGGCATCGGCTGTC3'
	5'GCGCAATTGGCCCCAGACT3'
<i>ppsE</i>	5'CGATTTCCGGGCGCCAAGGA3'
	5'GGATCACGCCCGCATAACCGG3'

7. RESULTADOS

7.1 Subcultivo de las Cepas.

Todas nuestras cepas, a excepción de la 1177 cultivada con bilis que llegó hasta el pase 125, fueron llevadas hasta el pase 150 para su posterior análisis. En la tabla 3 se muestra el estado de los subcultivos hasta la fecha del cierre de este trabajo (junio 2011).

TABLA 3

Estado de los subcultivos continuos

Cepas de <i>M. tuberculosis</i>	Medio sin bilis	Medio con bilis
0488	182	177
1177	151	125
1289	178	187
1389	181	187
DR-689	183	183
H37Rv	179	183

7.2 Genotipificación de ADN Basada en IS6110.

Dentro de los análisis para detectar posibles cambios genéticos, observamos un cambio nuevo para las cepas 0488 subcultivadas al pase 150 tanto en medio con y sin bilis para el patrón de RFLP del brazo derecho de IS6110. Además pudimos observar otro cambio con la pérdida de una banda del patrón para la cepa DR-689 subcultivada sin bilis (figura 7). Estos cambios fueron confirmados con el análisis para el brazo izquierdo de la misma secuencia de inserción (figura 8). Cabe mencionar que el cambio presentado por la cepa DR-689 subcultivada en bilis en el análisis del subcultivo número 100 (Molina-Torres, 2007), se mantuvo también durante el subcultivo 150.

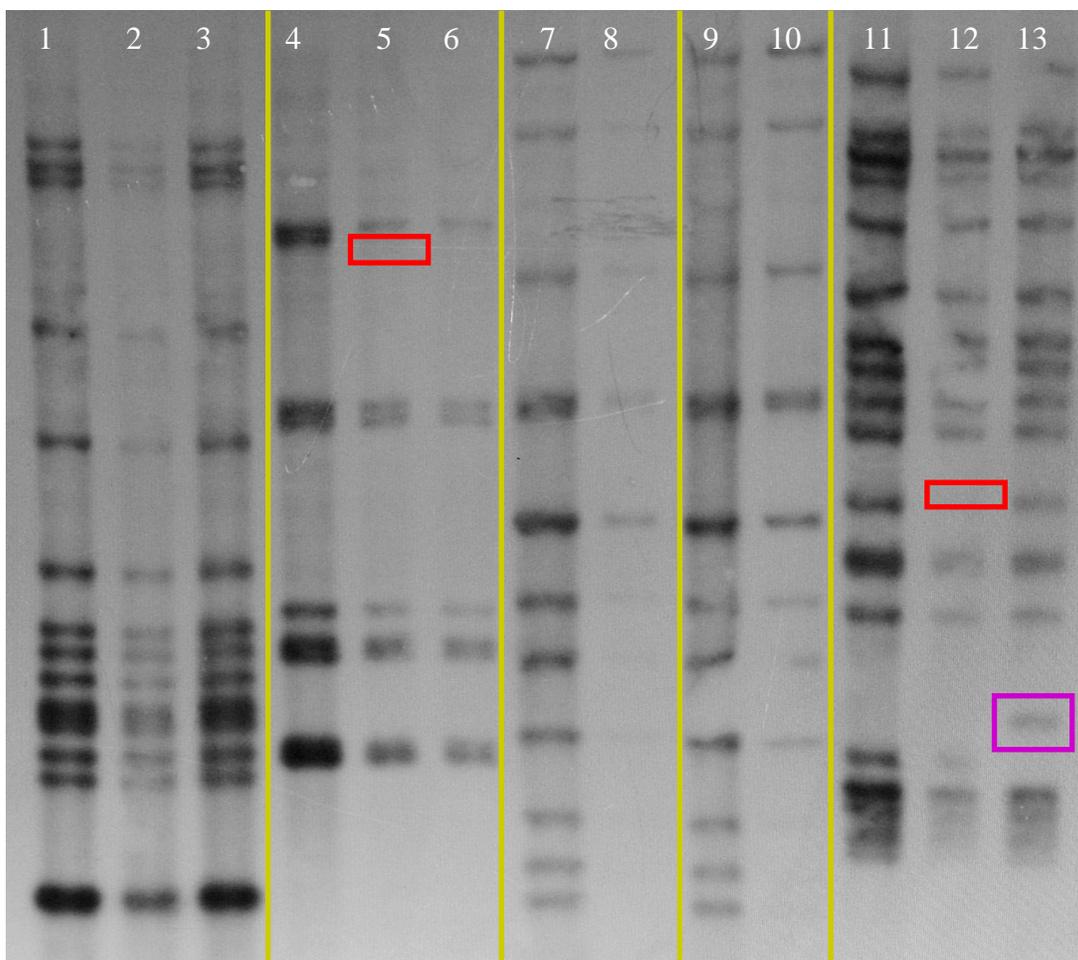


Figura 7. Cambios en el patrón de RFLP para el brazo derecho de IS6110. Los carriles corresponden a las diferentes cepas utilizadas en nuestro estudio (H37Rv, 0488, 1289, 1389 y DR-689). Los recuadros en color rojo muestran las cepas en las cuales se observó un cambio durante el pase 150: carril 5) 0488 pase 150, carril 6) 0488 pase 150 medio con bilis. En el recuadro fucsia se muestra un cambio observado previamente en el pase 100: carril 13) DR-689 pase 150 medio con bilis.

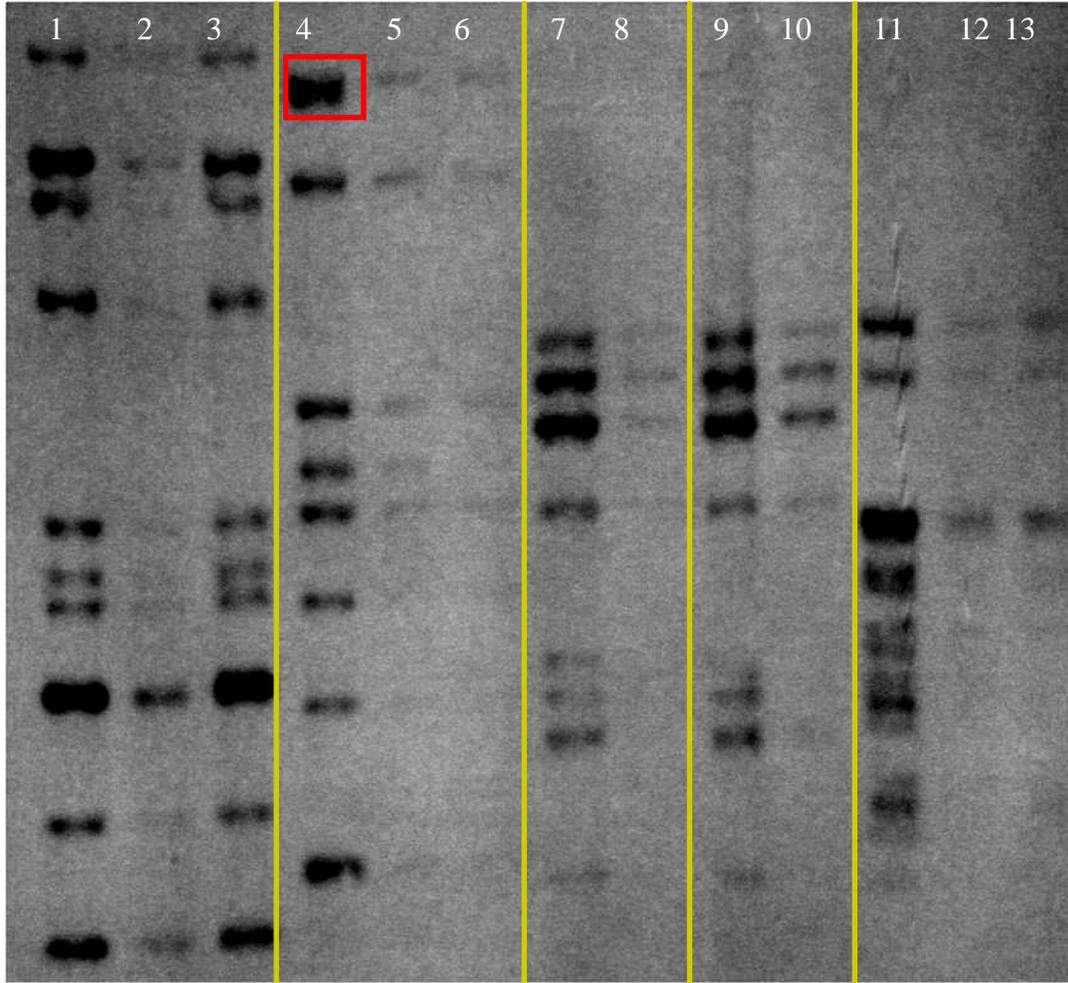


Figura 8. Cambios en el patrón de RFLP para el brazo izquierdo de *IS6110*. Los carriles corresponden a las diferentes cepas utilizadas en nuestro estudio (H37Rv, 0488, 1289, 1389 y DR-689). En el recuadro de color rojo podemos confirmar el cambio detectado en el patrón del brazo derecho de *IS6110* para la cepa 0488. Carril 4) 0488 parental mostrando ambas bandas que no se observan ni en el carril 5 ni el 6 que corresponden a las cepas 0448 pase 150 subcultivada sin bilis y 0448 pase 150 subcultivada con bilis respectivamente.

7.3 Espoligotipificación.

En cuanto al patrón de espoligotipo, pudimos observar un cambio en el patrón DR en nuestras cepas 1389 subcultivadas con y sin bilis (figura 9). Este cambio no se había detectado anteriormente en el análisis del subcultivo 100.

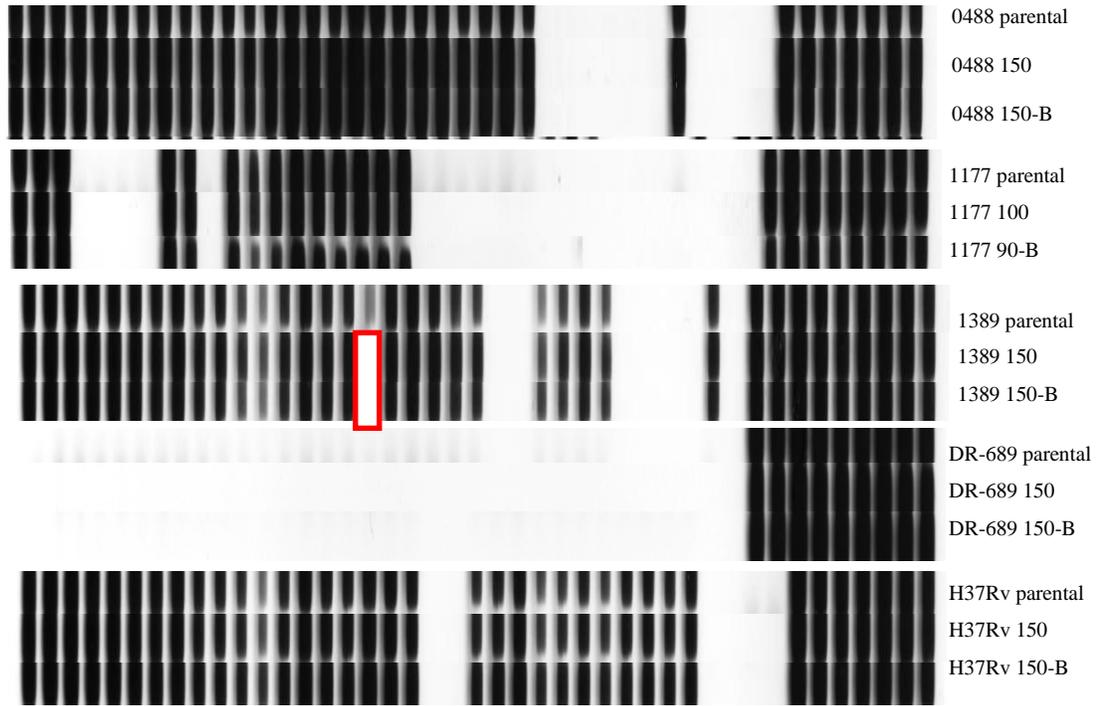


Figura 9. Patrones de espoligotipo para la región DR de las cepas de *M. tuberculosis*. El recuadro rojo muestra el cambio presentado por las cepas 1389 subcultivadas.

7.4 Ensayos de Citotoxicidad.

Como parte del análisis de posibles cambios en la virulencia de nuestros aislamientos, realizamos ensayos en monocapas de macrófagos de la línea celular THP-1 para determinar la capacidad citotóxica de los mismos después de ser subcultivados 150 veces.

Nuestros resultados mostraron una importante disminución en el porcentaje de citotoxicidad en una de las cepas estudiadas (DR-689), comparable con BCG que es utilizado como control negativo para esta infección (figura 10). En la figura 11 podemos observar la apariencia microscópica de la monocapa de macrófagos infectada con la cepa DR-689. En el recuadro 1 podemos observar que la monocapa de macrófagos permanece intacta ante la infección con BCG, se observa un crecimiento de los bacilos casi nulo. En la fotografía 2 se observa que la infección con la cepa DR-689 parental produjo un deterioro notable en la monocapa así como un gran crecimiento del microorganismo en la misma, contrario a lo observado en la infección con las cepas subcultivadas en el pase 150 (recuadros 3 y 4) donde notamos una evidente disminución en el crecimiento bacteriano así como las monocapas de macrófagos más íntegras en ambos casos.

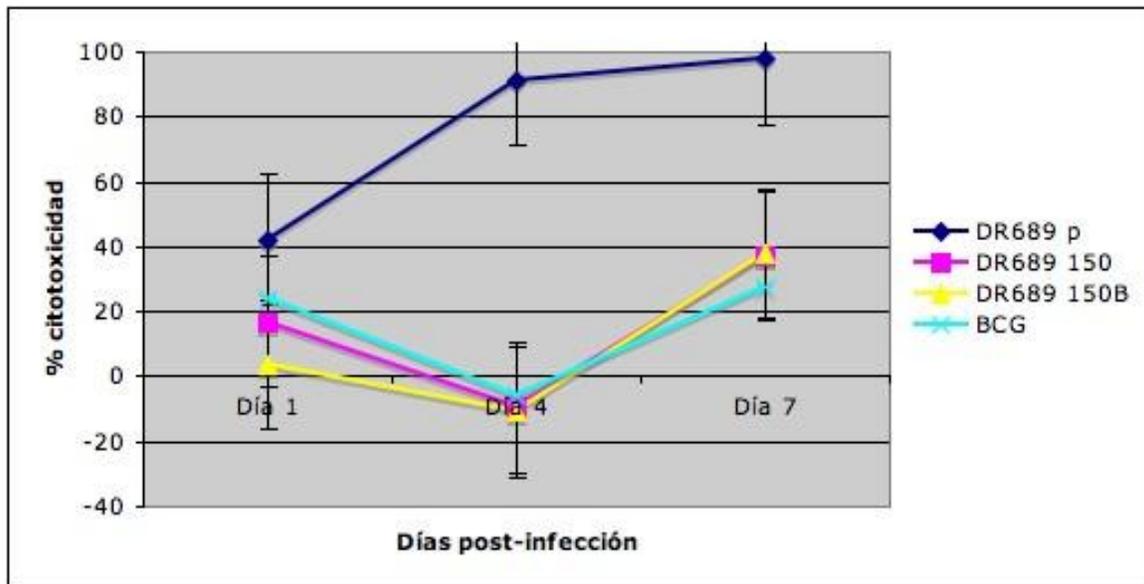


Figura 10. Porcentajes de citotoxicidad para la cepa DR-689 a diferentes días post-infección.

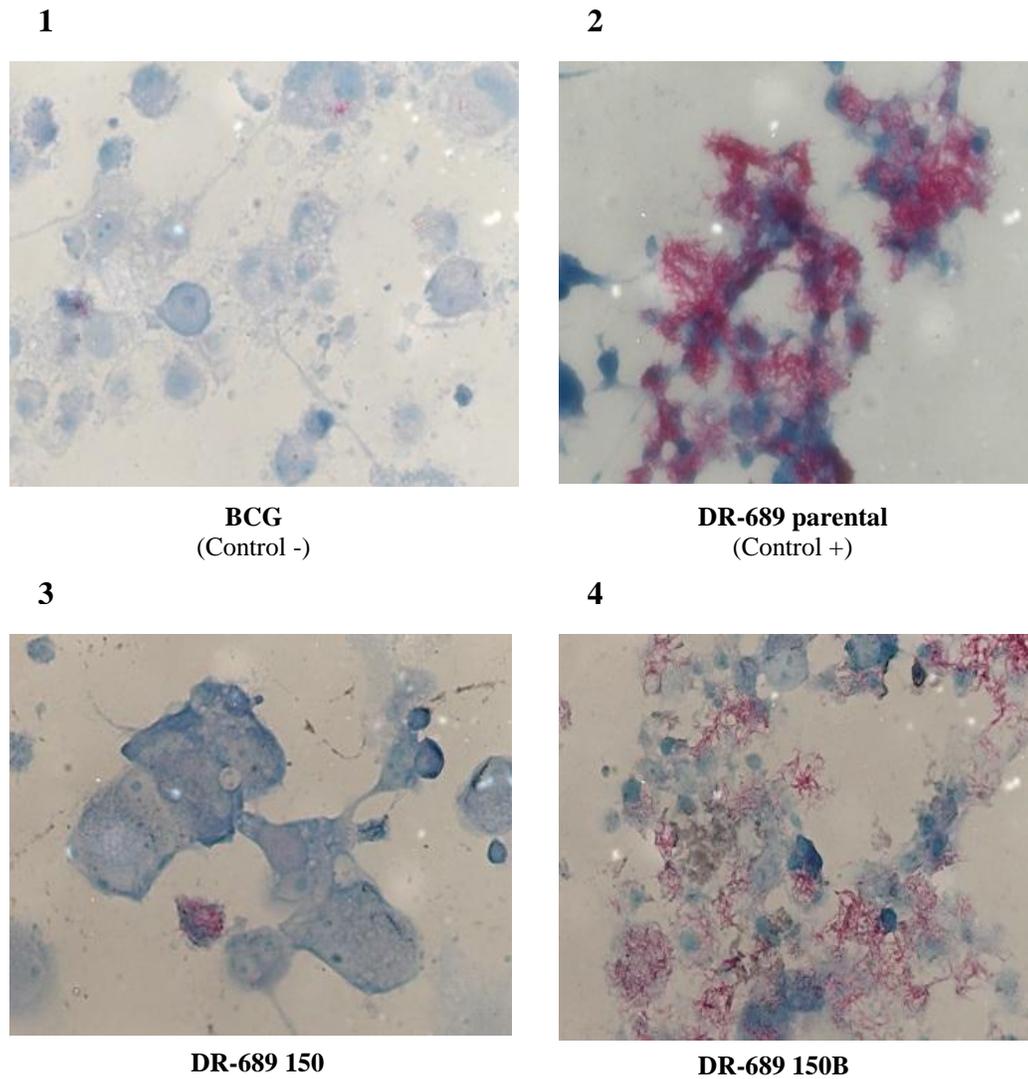


Figura 11. Apariencia microscópica de la monocapa de macrófagos THP-1 infectada con la cepa DR-689 y BCG como control negativo de la infección.

7.5 Ensayo de Rojo Neutro.

Para determinar algún otro posible cambio en la virulencia de las cepas subcultivadas, utilizamos la técnica del rojo neutro. Este colorante se utiliza como indicador de presencia o ausencia de lípidos de superficie (Figura 12), específicamente los lípidos metilados-ramificados los cuales se han observado que son importantes factores de virulencia para *M. tuberculosis*.

Todas nuestras cepas a excepción de una (DR-689 pase 150 subcultivada con bilis) mostraron resultados negativos para esta reacción, indicando una pérdida en los lípidos de superficie los cuales son importantes factores de virulencia (Tabla 4).

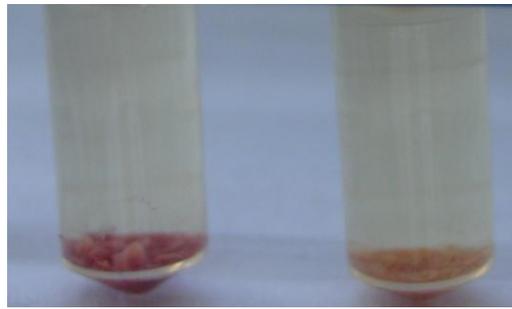


Figura 12. Ensayo del rojo neutro. Obsérvese que el cultivo parental que es positivo a la reacción (RN+) mantiene su coloración roja mientras que la cepa subcultivada negativa para la reacción (RN-) presenta una coloración mucho más clara.

TABLA 4

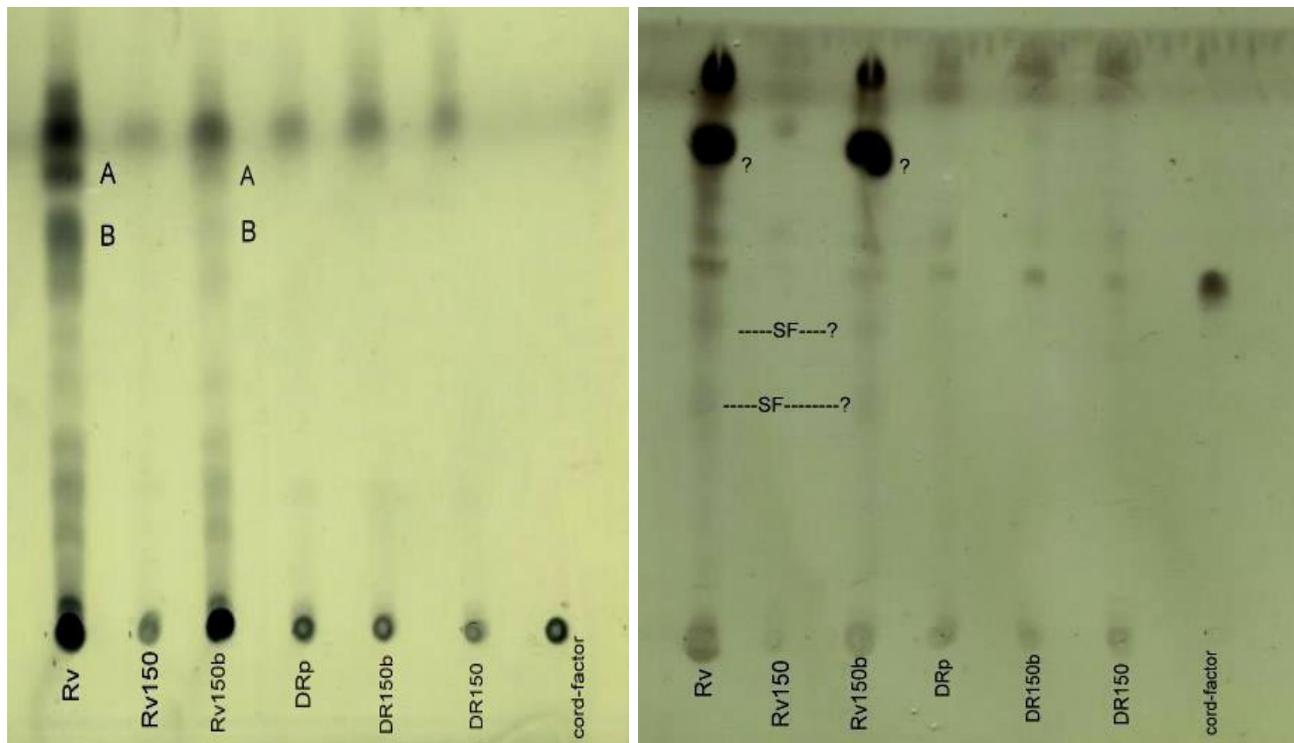
Resultados del análisis de lípidos por medio de la reacción del rojo neutro

CEPA	RESULTADO (RN +, RN -)
1177 p	RN+
1177 150	RN -
1177 150 B	RN -
1289 p	RN +
1289 150	RN -
1289 150B	RN -
1389 p	RN +
1389 150	RN -
1389 150 B	RN -
DR-689 p	RN +
DR-689 150	RN -
DR-689 150B	RN +
H37Rv p	RN +
H37Rv 150	RN -
H37Rv 150B	RN -

7.6 Análisis de Lípidos Mediante Cromatografía de Capa Fina (TLC).

Los resultados obtenidos a partir del análisis de lípidos por TLC nos indican que sólo las cepas H37Rv y H37Rv 150 subcultivada con bilis contienen dimicocerosatos de ftiocerol (DIMs) (señalados como A y B en la figura 13). Por su parte la cepa DR-689 tanto parental como las subcultivadas parecen carecer de estos compuestos.

Además de analizar los DIMs se realizó otra cromatografía de capa fina para la búsqueda de sulfolípidos (SF) para las cepas H37Rv parental y H37Rv pase 150 subcultivada en bilis. Sólo pudimos constatar la posible presencia de SF en las cepas H37Rv parental y H37Rv 150b de la figura 14. Debido a la baja concentración observada en el TLC el resultado fue confirmado mediante espectrometría de masas para las cepas anteriormente mencionadas (figura 15).



Figuras 13 y 14. Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina para la detección de DIMs y sulfolípidos respectivamente, en dos de las cepas subcultivadas en nuestro estudio: H37Rv y DR-689.

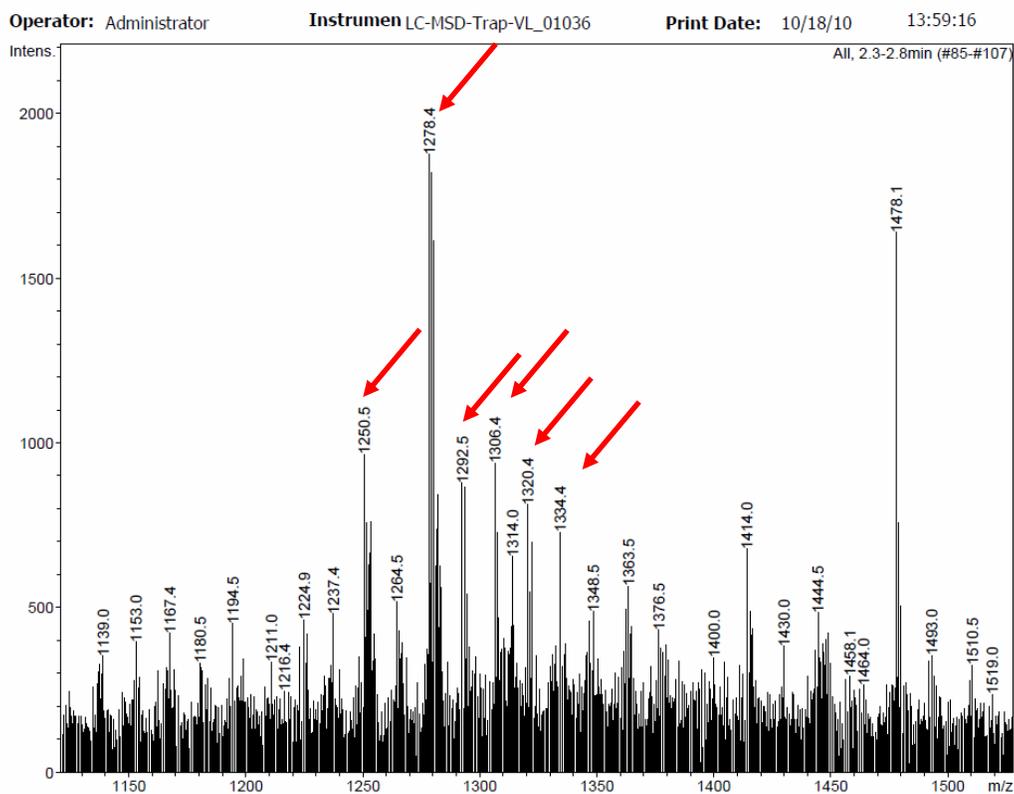


Figura 15. Confirmación de la presencia de sulfolípidos mediante análisis por espectrometría de masas. Las flechas rojas señalan los sulfolípidos para la cepa H37Rv parental y H37Rv pase 150 subcultivada en bilis.

7.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para los Genes *pps*.

Éste análisis se llevó a cabo con la intención de correlacionar los resultados con los obtenidos por medio de la cromatografía de capa fina para las cepas H37Rv y DR-689. Los genes fueron detectados en la cepa H37Rv sin subcultivar (parental) sin embargo, en el caso de las cepas subcultivadas solamente se detectó el gen *ppsB* para la cepa H37Rv pase 150, ninguna señal se detectó para la cepa subcultivada en medio con bilis (H37Rv 150B) (figura 16). Para la cepa DR-689 solamente se encontró el gen *ppsB* tanto en la cepa parental como en las subcultivadas (figura 17).

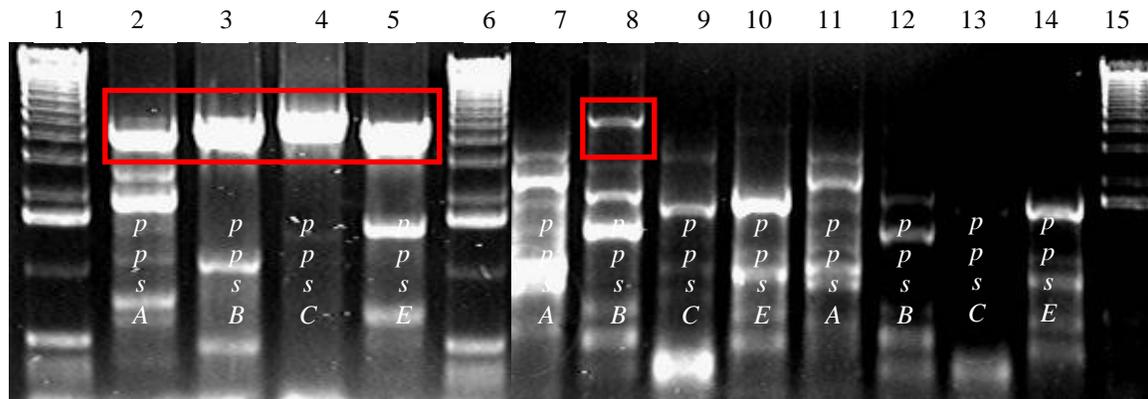


Figura 16. PCR para los genes *pps* de la cepa H37Rv. Carriles 1, 6 y 15 marcador de 1 kb. Carriles 2, 3, 4 y 5 cepa H37Rv parental para los genes indicados. Carriles 7, 8, 9 y 10 cepa H37Rv pase 150. Carriles 11, 12, 13 y 14 cepa H37Rv pase 150 medio con bilis. Los recuadros rojos señalan las bandas detectadas.

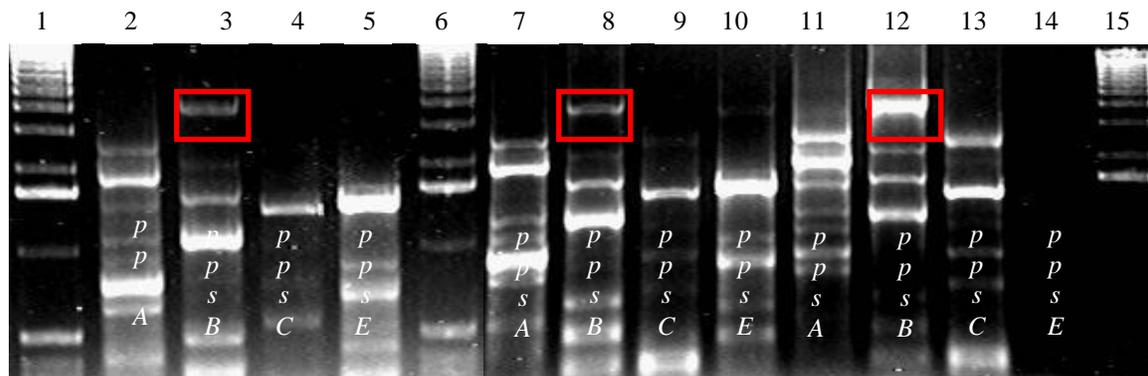


Figura 17. PCR para los genes *pps* de la cepa DR-689. Carriles 1, 6 y 15: marcador de 1 kb. Carriles 2, 3, 4 y 5: cepa DR-689 parental para los genes indicados. Carriles 7, 8, 9 y 10: cepa DR-689 pase 150. Carriles 11, 12, 13 y 14 cepa DR-689 pase 150 medio con bilis. Los recuadros rojos señalan las bandas detectadas.

TABLA 5

Resultado del análisis de PCR para los genes *pps*

Cepa	<i>ppsA</i>	<i>ppsB</i>	<i>ppsC</i>	<i>ppsE</i>
H37Rv parental	+	+	+	+
H37Rv pase 150	ND	+	ND	ND
H37Rv pase 150B	ND	ND	ND	ND
DR-689 parental	ND	+	ND	ND
DR-689 pase 150	ND	+	ND	ND
DR-689 pase 150B	ND	+	ND	ND

(ND: no detectado)

8. DISCUSIÓN

El pasaje serial es considerado como una forma de evolución experimental y se ha aplicado desde hace tiempo en el desarrollo de vacunas. Esta técnica de atenuación permite monitorear la evolución molecular y fenotípica en tiempo real, obteniendo como resultado diversas evidencias que revelan las causas y consecuencias de la evolución de los microorganismos (Ebert, 1998). El pasaje serial fue desarrollado originalmente por Pasteur quien en los 1880's subcultivo el virus de la rabia en conejos por más de una década, logrando aislar exitosamente una preparación atenuada del virus la cual comenzó a utilizarse como vacuna (Ellis y Brodeur, 2003). A partir de entonces ésta técnica ha sido ampliamente estudiada y utilizada en el desarrollo de otras vacunas virales y bacterianas.

La variación genética como resultado del subcultivo ha sido observada en muchas especies bacterianas incluyendo *E. coli*, *Streptococcus*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*, resultando generalmente en cambios fenotípicos relacionados con la virulencia (Iguchi *et al.*, 2002). Desde épocas como los años 30's se hizo evidente que los bacilos tuberculosos que afectaban a humanos, bovinos y aves perdieron su virulencia mientras eran subcultivados y conservados en medios de cultivo complejos, en este caso tales cambios fueron asociados con alteraciones en su morfología colonial (Petroff y Steenken, 1930). Afortunadamente, también se encontró que las características de dichas cepas podían estabilizarse mediante su cultivo en medios sintéticos definidos como Proskauer-Beck y Middlebrook 7H9 (Andreu y Gibert, 2008).

En el presente estudio se llevó a cabo el subcultivo continuo de cepas de *M. tuberculosis* con deleciones previas en el genoma durante 150 pases y se investigaron los efectos sobre su composición genética mediante el análisis de RFLP para IS6110 y la espigotipificación de la región del “repetido directo”. Los cambios en la virulencia se evaluaron mediante el estudio de la capacidad citotóxica en una monocapa de macrófagos THP-1, así como por el análisis de lípidos mediante las técnicas del rojo neutro, cromatografía de capa fina y PCR para los genes *pps*.

8.1 Subcultivo de las cepas.

El pasaje serial se llevó a cabo en el medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 en dos tratamientos, añadiendo a uno de ellos bilis de buey; con el propósito de emular un componente del medio que utilizaron Calmette y Guèrin para emulsificar o dispersar los cultivos bacterianos. La bilis está compuesta por sustancias orgánicas e inorgánicas entre cuyos constituyentes principales se encuentran ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y el pigmento biliverdina. La principal función *in vivo* de la bilis es actuar como un detergente biológico que emulsifica y solubiliza las grasas, confiriendo también potentes propiedades antimicrobianas jugando un papel muy importante en el sistema de defensas físico-químicas del organismo (Begley *et al.*, 2005).

El principal mecanismo antimicrobiano de la bilis descrito hasta el momento es el daño a la membrana celular (Meritt y Donaldson, 2009). Diversos factores determinan el resultado de la acción de la bilis en las membranas. En primer lugar, la concentración de bilis es de alta importancia. Las sales biliares en concentraciones altas pueden disolver rápidamente las membranas lipídicas y causar disociación de las proteínas integrales de la membrana. Esta solubilización resulta en la fuga de contenido celular teniendo como consecuencia la muerte. Las concentraciones bajas de bilis pueden también dañar la integridad de la membrana a través de efectos más sutiles en la permeabilidad y la fluidez (Coleman *et al.*, 1980). Se ha demostrado que la bilis bovina (oxgall), es menos inhibitoria que la porcina y se utiliza comúnmente en experimentación *in vitro* para la determinación de la tolerancia a la bilis en cepas bacterianas (Legrand-Defretin *et al.*, 1991). El daño conformacional y estructural a los lipopolisacáridos de la membrana celular causados por el congelamiento han demostrado incrementar la susceptibilidad de *Escherichia coli* 0157:H7 a las sales biliares (Chou y Cheng, 2000). Además de afectar las características de la membrana la bilis puede tener otros numerosos efectos en las células bacterianas entre los que se encuentran la

disrupción de la estabilidad de las macromoléculas (Leverrier *et al.*, 2003). Se ha demostrado también que los ácidos biliares inducen la formación de la estructura secundaria en el ARN y además inducen daño en el ADN, así como la activación de las enzimas involucradas en la reparación de las células bacterianas y de mamíferos (Kandell y Bernstein, 1991).

Por estas evidencias y los resultados obtenidos en nuestro trabajo, consideramos que la adición de bilis al medio pudo ser un factor importante que influyó en los cambios de algunas de nuestras cepas.

En nuestro estudio todas las cepas fueron llevadas hasta el pase número 150 con excepción de la 1177 subcultivada en medio con bilis, la cual hasta el cierre de nuestro estudio llegó al subcultivo 125 debido a las dificultades que tuvimos para cultivarla siendo desde el inicio muy lento su crecimiento en comparación de las demás cepas (aproximadamente 3 semanas entre cada subcultivo) así como una baja densidad celular observada a simple vista por medio de la turbidez en medio líquido y un escaso número de colonias en medio sólido M7H10 o Lowenstein-Jensen.

8.2 Análisis genético por medio de IS6110 y espoligotipificación del DR.

Desde hace varios años, diferentes locus polimórficos y elementos de inserción de múltiples copias han sido identificados y utilizados como marcadores genéticos con la finalidad de identificar las diferentes cepas de *M. tuberculosis* en estudios epidemiológicos. Entre estos elementos se encuentran el locus del repetido directo (DR) y la secuencia de inserción IS6110. Sin embargo, poco se sabe acerca de los procesos involucrados en estos cambios genotípicos o acerca de las tasas relativas de estos cambios o de los eventos de transposición.

Debido a que las bacterias se reproducen por fisión binaria, todos los descendientes deben compartir mutaciones adquiridas de sus ancestros comunes más recientes. Se ha demostrado que las tasas de transposición de elementos de inserción son muchos más altas que las tasas de otros cambios en el genoma hereditarios, tales como las mutaciones de nucleótidos. Las secuencias de inserción (IS) son de interés considerable desde dos perspectivas. Pueden ser vistos simplemente como ADN “parasítico”, con la única función de mantenerse en el genoma del hospedero. Alternativamente, pueden ser concebidos como “genes evolucionarios”, cuyos movimientos dentro del genoma alteran la función o median re-arreglos genómicos (Kivi *et al.*, 2002). IS6110 es un elemento genómico de inserción que contiene 1,361 pb, y se encuentra solamente en organismos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. Este elemento es miembro de la familia IS3 de elementos de inserción (Kim *et al.*, 2010) y es el marcador genético más utilizado en la actualidad en la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis*, más de 25 copias del IS6110 se han encontrado en los genomas de aislamientos clínicos aunque también han sido identificadas cepas sin copias de este elemento. Los esquemas de tipificación que utilizan RFLP para IS6110 asumen que la distribución de este elemento es aleatoria, aunque en el genoma de H37Rv se encuentra restringido a cerca de dos tercios del genoma alrededor del locus DR (Hermans *et al.*, 1992).

Además de su papel en la epidemiología molecular, como ya se mencionó el IS6110 es capaz de insertarse en la secuencia de uno o varios genes y alterar su expresión, contribuyendo de ese modo a la diversidad fenotípica entre distintas cepas de *M. tuberculosis* (McEvoy *et al.*, 2007).

Debido a los datos anteriormente mencionados, en el presente estudio utilizamos el RFLP para el IS6110 como parte del análisis genético de las cepas utilizadas en este estudio, con la finalidad de detectar la presencia de posibles cambios generados por el subcultivo continuo de las mismas. Los resultados de este análisis en el cual se incluyeron tanto las cepas parentales como las sometidas a pasaje en medio líquido M7H9 con y sin bilis, reveló que 3 de las cepas estudiadas permanecieron sin cambio en sus patrones de bandas para IS6110. Sin embargo, pudimos observar un cambio en las cepas RIVM-9701 0488 subcultivadas al pase 150 tanto en medio con y sin bilis. También en la cepa DR-689 (Beijing) subcultivada en el medio sin bilis pudimos observar un cambio que involucró el elemento transponible IS6110 (figura 7). Las principales evidencias de variación en las tasas de transposición solo habían sido descritas en aislamientos de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes (de Boer *et al.*, 1991; Niemann *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 2002). En diversos estudios recientes se ha analizado la tasa de cambios del patrón de RFLP para el IS6110 en aislamientos seriados de pacientes. Dos de estas publicaciones confirmaron un alto grado de estabilidad (de Boer *et al.*, 1999; Niemann *et al.*, 1999) mientras que el estudio de Yeh y colaboradores en 1998, indicó una alta variabilidad en los patrones de IS6110 y Niemann y su equipo reportaron en el 2000 una tasa de variación de un 11% en aislamientos seriados de pacientes. Estos resultados indican que el grado de estabilidad del patrón de RFLP para este elemento de inserción puede variar para diferentes familias de cepas de *M. tuberculosis* o en el caso de cepas aisladas de diferentes regiones geográficas.

En 1991 van Soolingen y colaboradores realizaron un análisis para determinar si el pasaje serial *in vitro* de cepas de *M. tuberculosis* producía cambios en el patrón de RFLP, los resultados arrojados mostraron que no se produjeron cambios después de aproximadamente 25 pases. Fue hasta el 2007 que se dio el primer reporte de un evento de transposición generado *in vitro*, en este estudio Molina-Torres y colaboradores observaron un cambio que involucró el elemento transponible IS6110 en la cepa tipo Beijing DR-689 después de 100 subcultivos continuos en medio líquido con bilis. En nuestro estudio, este cambio se mantuvo presente para la misma cepa después de 150 pasajes seriales en las mismas condiciones de cultivo.

Históricamente, la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* es la contraparte avirulenta de la cepa H37Rv y ambas son derivadas de la cepa parental virulenta H37. Esta cepa fue aislada originalmente de un paciente con tuberculosis por Edward R. Baldwin en 1905. Para obtener los derivados virulentos de H37, en 1935, William Stenke realizó un estudio de disociación basado en el añejamiento durante 3 a 4 meses de los bacilos de H37 en medio sólido de huevo a 37°C (Steenken y Gardner, 1946). La cepa H37Ra tiene diferentes características que la diferencian de su cepa hermana virulenta H37Rv entre las que se encuentran: morfología colonial elevada, pérdida de factor de cuerda, pérdida de fijación del colorante rojo neutro, disminución de sobrevivencia en condiciones anaeróbicas o dentro de los macrófagos, pérdida de virulencia en cobayos y ratones, etc. Las características distintivas de H37Ra y H37Rv se conservan indefinidamente en subcultivo, sugiriendo que ambas cepas difieren genéticamente (Zheng *et al.*, 2008).

Distintas cepas de *M. tuberculosis* presentan variaciones fenotípicas en muchos aspectos de su virulencia a pesar de que muestran una extrema similitud dentro de las regiones del genoma que codifican proteínas. En el 2007, se presentó una compilación de las evidencias que sugieren que por medio de su alta actividad de transposición, el elemento IS6110 es uno de los principales

contribuyentes a esta variación fenotípica y que esta acción ha influido en la evolución del patógeno. El IS6110, ha mostrado tener influencia en la expresión genética a través de su integración en regiones genómicas codificantes de proteínas, así como su habilidad para llevar a cabo eventos de recombinación resultantes en deleciones genéticas y la regulación de genes debido a su actividad intrínseca de promotor (McEvoy *et al.*, 2007).

Diversas líneas de evidencia sugieren que la mayoría de los eventos de transposición del IS6110 en *M. tuberculosis* tienen como resultado la letalidad o disminución de la virulencia. En el 2004, Soto y colaboradores describieron un evento de integración del IS6110 que resultó en la sobre-regulación de un gen implicado en la virulencia de un aislamiento clínico que había causado un brote de tuberculosis multi-fármaco resistente.

En el 2008 Zhang y colaboradores realizaron un análisis comparativo de los genomas de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. En este estudio se encontró que el genoma de H37Ra contiene 32 elementos IS completos y 10 interrumpidos, casi idénticos a los de H37Rv excepto por algunas diferencias en el IS6110. Existen 17 copias completas del IS6110 en H37Ra y 16 en H37Rv. La diferencia en el número de copias entre estas dos cepas se debe a dos inserciones completas del IS6110 específicas de H37Ra (localizadas a 14kb y 1990kb del *oriC*), además de una deleción completa del mismo elemento (1358 pb).

Todas estas diferencias nos confirman que como anteriormente se mencionó, el IS6110 no es simplemente una secuencia pasiva de ADN, sino que funciona como un generador de importantes variaciones fenotípicas que resultan de su actividad de transposición. Estas evidencias sugieren que los cambios encontrados en el patrón de RFLP para el IS6110 de nuestras cepas subcultivadas podrían estar afectando el estado de virulencia de las mismas, tal como se observó en los ensayos de virulencia realizados.

Por su parte, el locus DR se ha convertido en el segundo marcador más importante para la genotipificación de aislamientos de *M. tuberculosis*. Esta técnica ha ganado una amplia aceptación debido a que es un método simple, rápido y robusto. Los resultados pueden expresarse en un formato digital simple y son más fáciles de comparar y almacenar en comparación con otras técnicas disponibles. El repetido directo o “DR” es un locus polimórfico en el genoma de *M. tuberculosis* que comprende un grupo de secuencias directas repetidas de 36 pb, separadas por secuencias espaciadoras únicas de 36 a 41 pb (Hermans *et al.*, 1990). Los aislamientos clínicos difieren en la presencia de espaciadores, y este polimorfismo puede visualizarse por medio de la espoligotipificación. Una secuencia repetida y la secuencia espaciadora adyacente juntas han sido llamadas DVR (repetido variable directo). El número de DVRs varía entre cepas, permitiendo que este locus sea utilizado como marcador genético para diferenciar cepas (Fang *et al.*, 1998). Se han propuesto varios mecanismos para la presencia de polimorfismos en este locus entre los que se pueden mencionar: la recombinación homóloga entre DRs distantes o adyacentes, reacomodos causados por la transposición del IS6110 que se encuentra presente en la región DR de la mayoría de las cepas del complejo *M. tuberculosis* y la delección sucesiva de DVRs sencillos o múltiples de cierta región DR (Groenen, 1993).

Mientras que la función de la región DR en el genoma de *M. tuberculosis* permanece aún indeterminada, su preservación a lo largo de la historia evolutiva del complejo *M. tuberculosis* sugiere ser de suma importancia. Existe poca información referente a los eventos microevolutivos asociados con este locus y su influencia en la interpretación de la espoligotipificación. El ritmo del “reloj molecular” asociado con este marcador genético parece ser extremadamente lento, ya que se ha demostrado que múltiples aislamientos de *M. tuberculosis* de los mismos pacientes en recaídas o infecciones a diferentes tiempos mostraron espoligotipos idénticos (Goguet de la Salmonière *et al.*, 1997).

El cambio en el patrón de espoligotipificación de un aislamiento clínico y una cepa de *M. tuberculosis* subcultivada durante 5 años fue reportado por Aranaz y colaboradores en el 2004. Este cambio fue causado por la delección de un espaciador y el DR adyacente. En el presente estudio pudimos observar que después de 150 subcultivos continuos el patrón de espoligotipo para el DR de las cepas 1389 subcultivadas con y sin bilis sufrió un cambio debido a la delección del espaciador 17 (figura 9), el resto de nuestras cepas permanecieron sin cambios. Para entender la razón de este cambio, será necesario llevar a cabo un estudio adicional, una de las opciones podría ser la amplificación de espaciadores adyacentes al deletado, de acuerdo con la hipótesis propuesta por van Embden y colaboradores en la cual se sugiere que la delección de uno o varios DVRs es una de las causas subyacentes a la variación entre cepas de *M. tuberculosis* (van Embden *et al.*, 2000).

A nuestro conocimiento, el presente estudio junto con el de Aranaz, han sido los únicos en reportar hasta el momento cambios en el patrón de espoligotipo del repetido directo en cepas de *M. tuberculosis* sometidas a pasaje serial *in vitro*.

8.3 Ensayos de citotoxicidad.

La fagocitosis de *M. tuberculosis* por los macrófagos alveolares es el evento principal en la relación hospedero-patógeno que decide el resultado de la infección. Dentro de las semanas 2 y la 6 del inicio de la infección, se desarrolla la inmunidad mediada por células, y hay un influjo de linfocitos y macrófagos activados en la lesión resultando en la formación de un granuloma. Las interacciones macrófago-*Mycobacterium* y el papel del macrófago en la respuesta del hospedero puede resumirse en las siguientes etapas principales: unión de *M. tuberculosis* a la superficie de los macrófagos; fusión del fagosoma-lisosoma; inhibición/muerte del crecimiento micobacteriano; reclutamiento de células accesorias del sistema inmune para la respuesta inflamatoria local y la presentación de antígenos a las células T para el desarrollo de la inmunidad adquirida (Raja, 2004).

Un punto central en la patogénesis de tuberculosis es la caracterización de los determinantes de virulencia de *M. tuberculosis* que son relevantes para la enfermedad en humanos. La cepa virulenta H37Rv y su contraparte avirulenta H37Ra han sido ampliamente estudiadas en modelos animales, y las diferencias genéticas y fenotípicas entre estas cepas continúan bajo investigación intensiva. En ratones y cobayos, ambos H37Ra y H37Rv establecen infección en el pulmón. En contraste, H37Rv se replica muy rápidamente y la infección no es contenida (North e Izzo, 1993). La cepa H37Rv también crece más rápidamente que H37Ra en macrófagos peritoneales de murinos, una línea celular de macrófagos murinos, células HeLa humanas y una línea celular alveolar humana (Paul *et al.*, 1996; McDonough *et al.*, 1993). Sin embargo, en ninguno de estos estudios quedaba claro si la virulencia incrementada en H37Rv en modelos animales y líneas celulares humanas era relevante para la tuberculosis humana, porque el crecimiento de H37Rv y H37Ra no habían sido evaluadas en macrófagos humanos.

Con la finalidad de correlacionar los resultados de virulencia de obtenidos de modelos animales, se han utilizado los modelos de monocitos humanos para examinar las tasas de crecimiento intracelular en cepas de referencia y aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. En 1998, Zhang y colaboradores presentaron uno de los primeros reportes en el cual se demostró que tanto H37Rv como aislamientos de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes crecen más rápido en macrófagos humanos que la cepa H37Ra.

Los estudios de interacciones entre macrófagos y micobacterias han utilizado muchos sistemas para mimetizar lo que se cree sucede realmente *in situ*, por ejemplo, la asociación de *M. tuberculosis* con los macrófagos alveolares. Las líneas celulares parecidas a macrófagos de origen humano, han mostrado ser un buen modelo para macrófagos derivados de monocitos diferenciados *in vitro*, estas líneas poseen ventajas como no tener variabilidad por distintos donantes, las células pueden crecerse en grandes cantidades de una manera reproducible, pueden estudiarse en diferentes etapas y además sirven como modelo de la apoptosis inducida por *M. tuberculosis* en macrófagos alveolares (Riendeau y Kornfeld, 2003).

La línea celular THP-1 proveniente de una leucemia monocítica aguda humana, desarrolla las funciones mediante la adición de estimuladores. Esta línea celular ha sido utilizada en diversos estudios para elucidar las diferencias en virulencia entre diversos aislamientos de *M. tuberculosis*. En el 2004, se observaron diferencias significativas en el crecimiento intracelular de aislados de dos sitios de transmisión de tuberculosis, en este caso se concluyó que las células THP-1 eran una alternativa viable para utilizarse como modelo de monocitos de sangre periférica (Theus *et al.*, 2004).

La cuantificación del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos es muy demandante en cuanto a la técnica por diversas razones. Entre ellas podemos mencionar que *M. tuberculosis* puede destruir a

los macrófagos durante el período de cultivo, reduciendo el número de UFC en los lisados de macrófagos, además, el crecimiento extracelular de *M. tuberculosis* puede complicar la interpretación de los resultados, entre otras (Zhang *et al.*, 1998). Para resolver estos problemas se ha optado por utilizar otro tipo de técnicas como los ensayos colorimétricos para medir las diferencias en la citotoxicidad de cepas de *M. tuberculosis*. Ya que este patógeno bacteriano produce un efecto detrimental en cultivos celulares de mamíferos debido a la inducción de apoptosis celular o necrosis que conlleva a la muerte, el fenotipo de efecto citotóxico o citopático es utilizado como indicador de virulencia para los aislamientos de *M. tuberculosis* (Castro-Garza *et al.*, 2002).

El efecto citotóxico puede cuantificarse analizando la alteración de la morfología celular mediante dos características principales: redondeo celular y pérdida de la integridad de la monocapa celular. Se han desarrollado diversos métodos para cuantificar la citotoxicidad, sin embargo la mayoría de ellos tienen las desventajas de ser solamente semi-cuantitativos o consumir mucho tiempo (Daniel *et al.*, 2004). Por esto en el 2007, Castro-Garza y colaboradores describieron un método basado en la toma del colorante cristal violeta (CV) por las células THP-1. Éste método colorimétrico cuantifica el efecto citotóxico en función del número de células restantes después de la infección con *M. tuberculosis*. Debido a que este microorganismo no se tiñe por el CV, no se produce un trasfondo que altere las lecturas de absorbancia. Éste método ha mostrado ser rápido, sensible y confiable en la medición de la citotoxicidad de diferentes cepas de *M. tuberculosis*. En el 2010, se presentaron resultados de un análisis de la virulencia de diversos aislamientos de *M. tuberculosis* utilizando el ensayo del CV, en ellos se mostró una disminución dramática en la habilidad de destruir una monocapa de macrófagos THP-1 relacionada con la atenuación de las cepas después de 100 subcultivos continuos (Molina-Torres *et al.*, 2010).

En el presente estudio evaluamos también los cambios en la capacidad citotóxica de diversas cepas de *M. tuberculosis* sometidas a 150 subcultivos continuos sobre una monocapa de células THP-1. En este caso encontramos una importante disminución en el porcentaje de citotoxicidad en una de las cepas estudiadas (DR-689), comparable con BCG que es utilizado como control negativo para esta infección (figura 10), concordando con los resultados obtenidos anteriormente por Molina-Torres y colaboradores. Además pudimos observar un cambio en la apariencia microscópica de la monocapa de macrófagos infectada con la cepa DR-689 en la cual se encontró que en la infección con las cepas subcultivadas en el pase 150 existe una evidente disminución en el crecimiento bacteriano así como en la desintegración de las monocapas de macrófagos comparada con la cepas no subcultivada (figura 11), que como se mencionó anteriormente es considerado uno de los efectos principales de la citotoxicidad (Daniel *et al.*, 2004).

8.4 Análisis de lípidos por medio del ensayo de rojo neutro, TLC y PCR.

En la actualidad, la identificación de *M. tuberculosis* se lleva a cabo normalmente en laboratorios clínicos mediante técnicas convencionales como la niacina, reducción de nitratos, catalasa, entre otras. Además, el complejo *M. tuberculosis* puede distinguirse de otras micobacterias por medio de pruebas comerciales basadas en ácidos nucleicos así como por el análisis de cromatografía líquida de alta resolución de los ácidos micólicos. Sin embargo, no es posible distinguir la cepa atenuada H37Ra de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* por medio de estas técnicas. Aún así, H37Ra se utiliza como control en pruebas de identificación, en las cuales pueden presentarse diagnósticos falsos debido a contaminación cruzada de muestras de laboratorio. Hasta la fecha, la diferenciación más confiable entre H37Ra y cepas virulentas ha sido posible solo mediante la espoligotipificación y la genotipificación del IS6110, los cuales son procedimientos laboriosos y muy tardados, por lo cual las reacciones citoquímicas permiten distinguir entre cepas virulentas de las avirulentas de una forma fácil y rápida como opción a las pruebas de diagnóstico existentes.

Las reacciones citoquímicas en los bacilos tuberculosos fueron estudiadas con mucha profundidad entre 1940 y 1950 con la finalidad de encontrar marcadores fenotípicos correlacionables con la virulencia. La acción de muchos colorantes básicos tales como el azul de Nilo, azul de metileno, rojo neutro y violeta metil han sido estudiados en diversas cepas de *Mycobacterium*. Los resultados más exitosos fueron obtenidos con los colorantes rojo neutro y azul de Nilo (Dubos y Middlebrook, 1948; Desbordes *et al.*, 1954). Dubos y Middlebrook reportaron que H37Rv junto con otros 22 aislados de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, fijaban el rojo neutro en soluciones acuosas alcalinas y tomaban un color rojo, mientras que las células de H37Ra no tomaban la coloración. Dos estudios subsecuentes en los cuales se utilizaron cantidades mayores de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (aproximadamente 200 cepas en cada estudio) corroboraron los resultados de

Dubos y Middlebrook (Morse et al., 1953; Hughes et al., 1954). Al mismo tiempo Desbordes y colaboradores concluyeron que, a diferencia de las cepas atenuadas y avirulentas, la cepa virulenta H37Rv fijaba fuertemente los colorantes básicos tales como azul de Nilo y rojo neutro, en sus formas aniónicas (azul y rojo respectivamente) en ambientes muy alcalinos. Más recientemente en el 2002, Soto y colaboradores realizaron diversas modificaciones a las pruebas de rojo neutro y azul de metileno con la finalidad de incrementar el poder discriminante y la reproducibilidad de estas pruebas, permitiendo diferenciar entre H37Ra y cepas virulentas. Las modificaciones a estas técnicas se aplicaron en el análisis de diversas cepas sometidas a subcultivos continuos por un período de 2 años, tiempo en el cual las cepas fueron probadas para las dos técnicas citoquímicas cada 4 semanas, demostrando que no se presentó pérdida de intensidad en la tinción durante los 2 años de duración de este estudio. En el 2005, Cardona y su equipo estudiaron un aislamiento clínico de *M. tuberculosis* que era originalmente rojo neutro positivo, pero después de más de un año de pasaje continuo en medio de cultivo, se tornó en rojo neutro negativo. Éstos resultados fueron corroborados por medio de dos ensayos en modelo murino de tuberculosis, en los cuales se encontró que la cepa rojo neutro negativa estaba atenuada. Además, encontraron una reacción negativa de rojo neutro en mutantes deficientes en más de un tipo de lípidos metilados ramificados, concluyendo que el rojo neutro es un marcador de virulencia e indica importantes modificaciones en la superficie externa de las células de *M. tuberculosis*. En otro trabajo, se llevó a cabo un análisis sistemático de clonas individuales aisladas del subcultivo de *M. tuberculosis* H37Rv y de un stock congelado de cepas no subcultivadas, en donde se estudiaron dos indicadores de virulencia: la tinción con rojo neutro y el contenido de ftiocerol dimicocerosatos (PDIMs) encontrando que H37Rv formó una población mixta conteniendo tanto células parentales como mutantes para rojo neutro y PDIMs. (Andreu y Gibert, 2008). Domenech y Reed realizaron en el año 2009 una investigación en la cual demostraron que después de subcultivar semanalmente aislados de *M. tuberculosis* PDIM-positivos durante un período de

20 semanas, la proporción de células PDIM-negativos se incrementó en más del 30%. Los resultados indicaron que la biosíntesis de PDIMs es seleccionada negativamente *in vitro* debido al amplio rango de tipos de mutaciones observadas en cultivos originados de una sola cepa parental PDIM-positiva. Los resultados obtenidos de este estudio revelaron que la pérdida de PDIMs ocurre espontáneamente, incluyendo la delección de genes y mutaciones regulatorias.

En nuestro estudio encontramos que después de 150 subcultivos continuos todas las cepas a excepción de la DR-689 pase 150 subcultivada en medio con bilis, presentaron una reacción rojo neutro negativa (tabla 4). Nuestros resultados coinciden con los reportados y mencionados anteriormente, en los cuales se encontró que las cepas de *M. tuberculosis* que originalmente fueron rojo neutro positivas tuvieron un cambio a rojo neutro negativas como consecuencia del pasaje serial *in vitro*. Sin embargo, Soto y colaboradores reportan en el 2005 que esta técnica debe ser utilizada con cautela para el análisis de aislamientos clínicos mantenidos en el laboratorio por largos períodos de tiempo a través del pasaje serial, ya que aunque la mayoría de las cepas demostró estabilidad en los resultados de la reacción del rojo neutro, se encontró que 6 cepas después de 7 u 8 pasajes tuvieron una disminución en la intensidad de la fijación del rojo neutro en comparación con H37Rv y otros aislamientos. En nuestro estudio todas las cepas utilizadas fueron consistentes en el resultado de la reacción del rojo neutro, mostrando estabilidad en la fijación del colorante (incluyendo la cepa con resultado rojo neutro negativo) durante los diversos ensayos realizados.

En el estudio realizado por Andreu y Gibert en el 2008, se menciona que el análisis de la estabilidad de los resultados tanto para la técnica del rojo neutro como para la presencia de PDIMs en clones individuales, ha demostrado que a pesar de la ocurrencia de mutantes rojo neutro negativas, la reversión al fenotipo parental (rojo neutro positivo) ocurre con gran frecuencia, manteniendo por lo tanto una población principalmente rojo neutro

positiva. En contraste, ellos no detectaron la reversión de mutantes en la síntesis de PDIMs; de aquí que estas mutantes se acumulen con el pasaje sucesivo de la cepa en medio de cultivo hasta que se convierten en el grueso de la población. Este resultado es apoyado por los datos reportados por Domenech y Reed en los cuales mencionan que una vez que se pierde la habilidad de producir PDIMs, las cepas parecen ser incapaces de recuperar esta característica.

Existen diversos factores que parecen contribuir a la rápida emergencia de clonas PDIM-negativas *in vitro*. Entre ellos podemos mencionar la ocurrencia simultánea de múltiples mutaciones independientes que resultan en la pérdida de PDIM. Otro factor importante podría ser que el hecho de que estas mutantes ya no sintetizan PDIM les confiere la ventaja de crecimiento entre una población heterogénea (mezcla de clonas PDIM-positivas y PDIM-negativas). Aunque se ha mencionado que la pérdida de PDIMs en cultivos *in vitro* es un proceso espontáneo, una descripción más precisa sería que la síntesis de PDIMs *in vitro* sufre una fuerte selección en contra. Esto resulta bastante lógico si consideramos el alto costo energético de replicar, transcribir y traducir un grupo de ADN de aproximadamente 50 kb que consiste en 15 marcos de lectura abiertos separados los cuales codifican proteínas involucradas en al menos 35 etapas catalíticas (Trievedi *et al.*, 2005).

Además de la caracterización de la reacción del rojo neutro y la presencia de PDIMS, Andreu y Gibert compararon también la expresión global del patrón de 3 clonas diferentes con cepas no subcultivadas mantenidas en congelación mediante análisis de microarreglos, encontrando diferencias entre las clonas a pesar de que sus fenotipos de rojo neutro y PDIM eran iguales. Por lo tanto, sería ideal realizar también el análisis de microarreglos en nuestras cepas subcultivadas para poder determinar otras diferencias entre ellas aún cuando los resultados en el análisis de lípidos realizados en este estudio sean los mismos para todas ellas.

Hasta el momento no se encontraron reportes de resultados para la reacción del rojo neutro en la cepa DR-689, sin embargo resulta interesante que esta misma cepa haya presentado una importante disminución de la citotoxicidad en la infección de macrófagos THP-1 (figura 10) y fue también la primer cepa subcultivada en manifestar un cambio en su patrón de IS6110 en el pase número 100 (figura 7). Por otro lado, Domenech y Reed reportaron en el 2009 la presencia de una proporción de subclonas PDIM-negativas después del pasaje serial en cultivo líquido de la cepa HN878 perteneciente a la familia Beijing como nuestro aislado DR-689. En conjunto todos estos resultados demuestran que como se mencionó previamente, la virulencia de *M. tuberculosis* es bastante compleja y sobre todo multifactorial, en la cual se encuentran involucrados una gran diversidad de genes que van desde los que codifican para la estructura de la célula bacteriana como los involucrados en cualquier fase de la infección, a diferencia de otros microorganismos patógenos para el hombre en los cuales sus factores de virulencia tienen una función muy específica y están plenamente identificados.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de lípidos por TLC nos indican que sólo las cepas H37Rv y H37Rv 150 subcultivada con bilis contienen dimicocerosatos de ftiocerol (DIMs) (señalados como A y B en la figura 12). Por su parte la cepa DR-689 tanto parental como las subcultivadas parecen carecer de estos compuestos, relacionados, como sabe, con la reacción al rojo neutro y con la virulencia. Algunos autores señalan que los sulfolípidos también están relacionados con la virulencia y con el rojo neutro, en el 2006 Cardona y colaboradores subcultivaron por un año un aislamiento clínico de *M. tuberculosis* deficiente en la producción de sulfolípidos de la pared celular el cual mostró una disminución en la letalidad de ratones SCID. Estos resultados han sido confirmados gracias a la reciente secuenciación del genoma de la cepa avirulenta H37Ra (Zheng *et al.*, 2008). Por lo cual en nuestro estudio se procedió a realizar también el análisis de TLC para estos compuestos en donde sólo hemos constatado la posible presencia de SF en H37Rv parental y

H37Rv pase 150 subcultivada en bilis. La confirmación de esta observación vino dada por la espectrometría de masas debido a que en el TLC la concentración era mínima difícilmente detectable a simple vista.

Aunque existe una gran cantidad de genes involucrados en la síntesis de lípidos en *M. tuberculosis*, se ha encontrado que los genes *pps* son los principales involucrados en la biosíntesis de PDIMs, estos comprenden 5 genes distintos (*ppsA-E*) de entre aproximadamente 4 y 5 kb cada uno. Además de estos genes se encuentran también los *drrA-C*, que funcionan como transportadores de PDIMs. Los genes *ppsA-E* codifican una PKS involucrada en la síntesis de ftiocerol y las mutantes de *ppsC* y *ppsD* en cepas de *Mycobacterium bovis* demostraron carecer de PDIMs (Trievedi *et al.*, 2005). Domenech y Reed demostraron también que las cepas que carecen de PDIMs presentan mutaciones en la zona de estos genes (Domenech y Reed, 2009). En el presente estudio utilizamos la reacción en cadena de la polimerasa para los genes *pps A-E* con la finalidad de correlacionar los resultados obtenidos en el análisis de rojo neutro y TLC.

Entre nuestros resultados para la PCR de los genes *pps* pudimos observar que todos los genes (*pps A,B,C* y *E*) fueron detectados en la cepa H37Rv parental (no subcultivada), cabe mencionar que el gen *pps D* no se detectó en nuestra cepa H37Rv parental y por consiguiente no se incluyó en el análisis con las demás cepas, estos resultados coinciden con los reportados previamente por Domenech y Reed en los que se observó la ausencia de este gen para las cepas H37Rv (Domenech y Reed, 2009). En el caso de las cepas subcultivadas solamente se detectó el gen *ppsB* para la cepa H37Rv pase 150, mientras que en la cepa subcultivada en medio con bilis (H37Rv 150B) todos los genes *pps* se encuentran deletados (figura 16). Para la cepa DR-689 se encontró el gen *ppsB* tanto en la cepa parental como en las subcultivadas (figura 17). Por lo tanto, al comparar estos resultados con los obtenidos por medio de la cromatografía de capa fina (TLC) podemos mencionar que en el caso de la cepa H37Rv los resultados no parecen coincidir debido a que pudimos observar que en la cepa

subcultivada H37Rv 150B que muestra presencia tanto de PDIMs como de sulfolípidos, todos los genes *pps* se encuentran deletados, en contraste con la cepa H37Rv 150 en la cual no se observa la presencia de ninguno de los lípidos mencionados anteriormente pero sí se observa la presencia del gen *ppsB*. En las cepas DR-689 encontramos deletados también todos los genes *pps* a excepción del *ppsB*, sin embargo en este caso no se observó la presencia de PDIMs ni de sulfolípidos en el patrón de cromatografía de capa fina. Hasta el momento se desconoce de otro reporte en el que se haya incluido el estudio del cambio generado en el patrón de lípidos a causa del pasaje continuo en cepas tipo Beijing.

Es probable que éstas discrepancias entre los resultados de la cromatografía de capa fina y la PCR puedan aclararse con un análisis más detallado del patrón de lípidos, así como mediante la búsqueda de los genes *drrA-C* que codifican para las proteínas encargadas del transporte de PDIMs a través de la pared celular micobacteriana. Esta función pudo deducirse gracias a Camacho y su equipo, quienes demostraron en 1999 que las mutantes de *M. tuberculosis* que tienen inactivados los genes *drrB* y *drrC* tenían defectos en la secreción de PDIMs.

Sería muy importante el poder confirmar nuestros resultados obtenidos *in vitro* en un modelo murino de tuberculosis, que además puedan brindarnos un panorama más claro de las redes de la respuesta inmune a *Mycobacterium tuberculosis* mediante la medición de otros factores mediadores en esta infección, ya que el entendimiento de las funciones efectoras de sus componentes, es esencial para el diseño y la implementación de vacunas y tratamientos efectivos contra la tuberculosis.

9. CONCLUSIONES

1. En la cepa *M. tuberculosis* RIVM-9701 0488 subcultivada en el medio con y sin bilis, y en la DR-689 se produjeron cambios genéticos que involucraron el elemento transponible IS6110.
2. El patrón de espigotipo reveló una deleción en el patrón de las cepas *M. tuberculosis* RIVM-9701 1389 subcultivadas con y sin bilis.
3. El subcultivo continuo produjo cambios en la citotoxicidad de *M. tuberculosis* sobre la monocapa de macrófagos THP-1, especialmente en las cepas *M. tuberculosis* RIVM-9701 1289, DR-689 y H37Rv.
4. Todas las cepas utilizadas en nuestro estudio a excepción de una (DR-689 pase 150 subcultivada con bilis) mostraron resultados negativos para la reacción del rojo neutro, indicando un cambio en la composición en los lípidos de superficie.
5. El análisis de TLC reveló la ausencia de lípidos metilados ramificados en las cepas H37Rv y DR-689, estos resultados fueron corroborados mediante PCR donde se mostró pérdida de algunos genes *pps*.

10. PERSPECTIVAS

- El pasaje serial de las cepas de *M. tuberculosis* deberá continuarse por lo menos hasta el pase 250 para observar posteriores cambios.
- Es necesario llevar a cabo un análisis más detallado de los cambios en el patrón lipídico para así poder correlacionarlos de una manera más precisa con el estado de virulencia de nuestras cepas.
- La evaluación de nuestras cepas subcultivadas en un modelo animal, es esencial para poder evaluar su nivel de virulencia de una manera más completa.
- Un posterior análisis de nuestras cepas subcultivadas por medio de la secuenciación de sus genomas, será de suma importancia para la detección de nuevos cambios que podrían tener gran relevancia en el estudio de las mismas.

11. LITERATURA CITADA

- Alteri CJ, Xicohténcatl-Cortes J, Hess S, Caballero-Olín G, Girón JA, Friedman RL. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 5145-5150.
- Andreu N, Gibert I. 2008. Cell population heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Tuberculosis. 88: 553-559.
- Aranaz A, Romero B, Montero N, Alvarez J, Bezos J, de Juan L, Mateos A, Dominguez L. 2004. Spoligotyping profile change caused by deletion of a direct variable repeat in a *Mycobacterium tuberculosis* isogenic laboratory strain. J Clin Microbiol. 42: 5388-5391.
- Armstrong, JA, Hart PD. 1971. Response of cultured macrophages to *M. tuberculosis* with observations of fusion of lysosomes with phagosomes. J. Exp. Med. 134: 713-740.
- Barrick J, Su Yu D, Ho Yoon S, Jeong H, Kwang Oh T, Schneider D, Lenski R, Kim J. 2009. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. Nature. 461: 1243-1249.
- Begley M, Gahan CGM, Hill C. 2004. The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiology Reviews 29: 626-644.
- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small P. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science 284:1520-1523.
- Bloom BR. 1994. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ASM Press. Págs. 271-353. Capítulo 2.
- Brennan WR, Curlin G, Ginsberg A, Adams M, Fleischmann R, Fraser C, Venter JC, Shinnick T, Bishai W, Smith H, Stover K, and Hatfull G. 1996. Comparative sequencing. Science 274:17-18.
- Brock. 2004. Biología de los microorganismos. Décima edición. Editorial Prentice Hall. Capítulo 26, págs. 874-877.
- Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Proc Natl Acad Sci USA 104:5596-601.
- Brosch R, Gordon SV, Eiglmeier K, Garnier T, Tekaia F, Yeramian E, Cole ST. 2000. Genomics, biology, and evolution of *Mycobacterium tuberculosis* complex. In molecular genetics of mycobacteria. Edited by Hatfull G. F., W. R. Jacobs Jr. ASM Press. pp. 19-36.

- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:3684–3689.
- Brosch R, Philipp WJ, Stavropoulos E, Colston MJ, Cole ST, Gordon SV. 1999. Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the attenuated *M. tuberculosis* H37Ra strain. Infect. Immun. 67:5768-5774.
- Burke M, Dunham J, Shahrestani P, Thornton K, Rose M, Long A. 2010. Genome-wide analysis of a long-term evolution experiment with *Drosophila*. Nature. 467: 587-590.
- Calmette A, Guerin C. 1909. Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux d'origine, cultivé sur la bile de boeuf glycéinée. C. R. Acad. Sci. 149:716-718.
- Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. Mol. Microbiol. 34 : 257-267.
- Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Lanelle MA, Triccas JA, Gicquel B, Daffé M, Guilhot C. 2001. Analysis of the phtiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. J. Biol. Chem. 276 : 19845-19854.
- Cardona PJ, Soto CY, Martín C, Gicquel B, Agustí G, Guirado E, Sirakova T, Kolattukudy P, Julián E, Luquin M. 2006. Neutral-red reaction is related to virulence and cell wall methyl-branched lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. Microbes and Infection. 8: 183-190.
- Castro-Garza J, King CH, Swords WE, Quinn FD. 2002. Demonstration of spread by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in A549 epithelial cell monolayers. FEMS Microbiol Lett. 212 : 145-149.
- Castro-Garza J, Barrios-García HB, Cruz-Vega DE, Said-Fernández S, Carranza-Rosales P, Molina-Torres CA, Vera-Cabrera L. 2007. Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Med Microbiol 56: 733-737.
- CDC. 1996. The role of BCG vaccine in the prevention and control of tuberculosis in the United States. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00041047.htm> [Revisado el 10 de junio del 2010]
- Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. Infect. Immun. 59:1755-1761.
- Chou CC y Cheng SJ. 2000. Recovery of low-temperature stressed *E. coli* 0157:H7 and its susceptibility to crystal violet, bile salt, sodium chloride and ethanol. Int. J. Food. Microbiol. 61: 127-136.

- Clemens DL, Horwitz MA. 1995. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J. Exp. Med.* 181:257-270.
- Clemens JD, Jackie JH, Chuong JH, Feinstein AR. 1983. The BCG controversy: a methodological and statistical reappraisal. *JAMA.* 249:2362.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393:537-44.
- Coleman R, Lowe PJ, Billington D. 1980. Membrane lipid composition and susceptibility to bile salt damage. *Biochim. Biophys.* 588: 294-300.
- Collins DM, Kwakami RP, de Lisle GW, Pascopella L, Bloom BR, Jacobs Jr WR. 1995. Mutation of the principal σ factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:8036-8040.
- Cox JS, Chen B, McNeil M, Jacobs WR. 1999. Complex Lipid Determines Tissue-specific Replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature.* 402:70-83.
- Daffé M, Reytrat J.M. 2008. The mycobacterial cell envelope. ASM Press. Capítulo 15, páginas 235-246. Capítulo 17, páginas 273-287.
- Daniel AK, Lee RE, Portaels F, Small PL. 2004. Analysis of *Mycobacterium* species for the presence of a macrolide toxin, mycolactone. *Infect Immun.* 72: 123-132.
- De Boer A S, Borgdorff M W, de Haas P E, Nagelkerke N J, van Embden J D A, van Soolingen D. 1999. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J Infect Dis.* 180:1238–1244.
- Desbordes J, Fournier E, Alix D. 1954. Action des substances colorantes sur les mycobactéries. I. Colorants basiques. Étude de la cinétique de la réaction. *Ann. Inst. Pasteur.* 88: 657-660.
- Domenech P, Reed MB, Barry CE. 2005. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* Mmpl protein family to virulence and drug resistance. *Infect. Immun.* 73- 3492-3501.
- Domenech P, Reed M. 2009. Rapid and spontaneous loss of phthiocerol dimycocerosate (PDIM) from *Mycobacterium tuberculosis* grown *in vitro*: implications for virulence studies. *Microbiology.* 155: 3532-3543.
- Douglas JT, Qian L, Montoya CJ, Musser JM, Van Embden JDA, Van Soolingen D, Kremer K. 2003. Characterization of the manila family of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin. Microbiol.* 41:2723-2726.
- Dubos RJ, Middlebrook G. 1948 Cytochemical Reaction of Virulent Tubercle Bacilli. *Am. Rev. Tuberc.* 58: 698:699.

- Dussurget O, Stewart G, Neyrolles O, Pescher P, Young D, Marchal GR. 2001. Role of *Mycobacterium tuberculosis* copper-zinc superoxide dismutase. *Infect Immun.* 69:529-33.
- Ebert D. 1998. Experimental evolution of parasites. *Science.* 282: 1432-1436.
- Ehrt S, Schnnaping D. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* Virulence: Lipids Inside and Out. *Nature Medicine.* 13: 284-285.
- Ellis RW, Brodeur BR. 2003. *New Bacterial Vaccines.* Kluwer Academic/ Plenum Publishers. USA. Capítulo 6.
- Fang Z, Watt B, Doig C, Forbes K. 1998. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal of Bacteriology.* 180: 2102-2109.
- Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D, Hickey E, Kolonay JF, Nelson WC, Umayam LA, Ermolaeva M, Salzberg SL, Delcher A, Utterback T, Weidman J, Khouri H, Gill J, Mikula A, Bishai W, Jacobs Jr WR Jr, Venter JC, Fraser CM.. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory Strains. *J Bacteriol.* 184: 5479-90.
- Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, Julkunen I, Coccia EM. 2001. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *Journal of Immunology.* 166: 7033-7041.
- Gillies RG, Didier N, Denton M. 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 159:109-113.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne AB y Kuby J. 2004. *Inmunología.* Quinta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. Capítulo 17, págs. 422-424.
- Goguet de la Salmonière YO, Li HL, Torrea G, Bunschoten A, van Embden J, Gicquel B. 1997. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2210-2214.
- Gonzalez-Garza MT, Castro-Garza J, Cruz-Vega DE, Vargas-Villarreal J, Carranza-Rosales P, Mata-Cardenas BD, Siller-Campos L, Said-Fernandez S. 2000. *Entamoeba histolytica*: diminution of erythrophagocytosis, phospholipase a(2), and hemolytic activities is related to virulence impairment in long-term axenic cultures. *Exp Parasitol.* 96(2):116-9.
- Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD. 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.* 10: 1057-1065.
- Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, Schuitema ARJ, McAdam RA, Catty D, van Embden JDA. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*:

a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 28:2051-2058.

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

Hofmann AF. 1999. Bile acids: the good, the bad, and the ugly. News Physiol. Sci. 14: 24-29.

Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM, Marks CB, Padiyar J, Goulding C, Gingery M, Eisenberg D, Russell RG, Derrick SC, Collins FM, Morris SL, King CH, Jacobs WR. 2003. The primary mechanism of attenuation of bacillus calmette-guèrin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. PNAS. 100: 12420-12425.

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

Hughes DE, Moss ES, Maigon PD, Henson M. 1954. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Evaluation of a test, using neutral red indicator. Am. J. Clin. Pathol. 24: 621-625.

Iguchi A, Osawa R, Kawano J, Shimizu A, Terajima J, Watanabe H. 2002. Effects of repeated subculturing and prolonged storage at room temperature of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 on pulsed-field gel electrophoresis profiles. J Clin Microbiol. 40: 3079-3081.

Ioerger TR, Feng Y, Ganesula K. 2010. Variation among genome sequences of H37rv strains of *Mycobacterium tuberculosis* from multiple laboratories. Journal of Bacteriology. 192: 3645-3653.

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

Kandell RL and Bernstein C. 1991. Bile salt/acid induction of DNA damage in bacterial and mammalian cells: implications for colon cancer. Nutr. Cancer. 16: 227-238.

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

Kim EY, Nahid P, Hopewell PC, Kato-Maeda M. 2010. Novel hot spot of IS6110 insertion in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology. 48: 1422-1424.

Kivi M, Liu X, Raychaudhuri S, Altman RB, Small PM. 2002. Determining the genomic locations of repetitive DNA sequences with a whole-genome microarray: IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology. 40: 2192-2198.

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

- Kozak RA, Alexander CD, Liao R, Sherman DR, Behr MA. 2010. Region of difference 2 contributes to virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 79: 59-66.
- Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PWM, Martín C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, van Embden JDA. 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *Journal of Clinical Microbiology.* 37: 2607-2618.
- Lari N, Rindi L, Lami C, Garzelli C. 1998. IS6110-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra. *Microbial Pathogenesis.* 26: 281-286.
- Legrand-Defretin V, Juste C, Henry R, Corring T. 1991. Ion-pair high-performance liquid chromatography of bile salt conjugates: application to pig bile. *Lipids.* 26: 578-583.
- Leverrier P, Dimova D, Pichereau V, Auffray Y, Boyaval P, Jan G. 2003. Susceptibility and adaptative response to bile salts in *Propionibacterium freudenreichii*: physiological and proteomic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3809-3818.
- Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. 2003. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guèrin attenuation. *J Infect Dis* 187:117-123.
- McDonough KA, Kress Y, Bloom BR. 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun.* 61: 2763-2773.
- McEvoy CR, Falmer AA, van Pittius NC, Victor TC, van Helden PD, Warren RM. 2007. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 87: 393-404.
- McKinney JD, Honer zu Bentrup J, Munoz-Elias EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson SD, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr., and Russell DG. 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406:735-738.
- Meritt ME, Donaldson JR. 2009. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *Journal of Medical Microbiology.* 58: 1533-1541.
- Molina-Torres C. 2007. Análisis genético y de virulencia por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sometidas a subcultivo. Tesis Doctoral.
- Molina-Torres C, Castro-Garza J, Ocampo-Candiani J, Monot M, Cole S, Vera-Cabrera L. 2010. Effect of serial subculturing on the genetic composition and cytotoxic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medical Microbiology.* 59: 384-391.

- Morse WC, Dail MC, Olitzky I. 1953. A study of the neutral red reaction for determining the virulence of mycobacteria. *Am. J. Public Health.* 43: 36-39.
- Niemann S, Richter E, Rüsç-Gerdes S. 2000. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 37:409–412.
- North RJ, Izzo AA. 1993. Mycobacterial virulence. Virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* have faster *in vivo* doubling times and are better equipped to resist growth-inhibiting functions of macrophages in the presence and absence of specific immunity. *J Exp Med.* 177: 1723-1733.
- Onwueme KC, Ferreras JA, Buglino J, Lima CD, Quadri LEN. 2003. Mycobacterial Polyketide-associated Proteins are Acyltransferases: Proof of principle with *Mycobacterium tuberculosis* PapA5. *PNAS.* 101: 4608-4613.
- Onwueme KC, Vos CJ, Zurita J, Ferreras JA, Quadri LEN. 2005. The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. *Prog Lipid Res.* 44: 259-302.
- Organización Mundial de la Salud. Atlas global de la tuberculosis en la región de las Américas. Disponible en sitio de red: (<http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/default.asp>) [Revisada el 15 de Agosto de 2007]
- Organización Mundial de la Salud. Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing. WHO Report 2010. Genova, Switzerland. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2010/en/index.html. [Revisado el 1 de febrero del 2011]
- Parsons LM, Brosch R, Cole AT, Somoskövi À, Loder A, Bretzel G., van Soolingen D, Hale YM, Salfinger A. 2002. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by PCR-Based Genomic Deletion Analysis.
- Paul S, Laochumroonvorapong P, Kaplan G. 1996. Comparable Growth of Virulent and Avirulent *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 174:105–112.
- Project Concern International y Secretaría de Salud México. 2010. Alianza comunitaria solución TB. Boletín informativo. Disponible en: www.soluciontb.org [Revisado el 2 de febrero del 2011]
- Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, and Cole ST. 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 46:709- 717.
- Raja A. 2004. Immunology of tuberculosis. Review article. *Indian J Med Res.* 120: 213-232.

- Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, Manganelli R, Smith I, Gicquel B, Jackson M. 2002. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 45:203-217.
- Reed MB, Domenech P, Manca C, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G. 2004. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431: 84-87.
- Riendeau CJ, Kornfeld H. 2003. THP-1 cell apoptosis in response to mycobacterial infection. *Infect. Immun*. 71:254-259.
- Robbins Stanley L, Cotran Ramzi S, Kumar Vinay, Collins Tucker. 2002. Manual de patología estructural y funcional. Sexta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. Págs. 194-195, 415-417.
- Russell DG. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 569–577.
- Schlossberg D. 2000. Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. Cuarta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Schluger NW, Rom WN. 1998. The host immune response to tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 157: 679-691.
- Secretaría de Salud México. 2009. Estándares para la atención de la tuberculosis en México. Disponible en <http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/> [Revisado el 1 de febrero del 2011]
- Segal W and Bloch H. 1956. Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown *in vivo* and *in vitro*. *J. Bacteriol*. 72:132-141.
- Singh R, Singh A, Tyagi AK. 2005. Deciphering the genes involved in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 85:325-35.
- Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin Microbiol Rev*. 16:463-96. Review.
- Soto C, Andreu N, Gibert I, Luquin M. 2002. Simple and rapid differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra from *M. tuberculosis* clinical isolates through two cytochemical tests using neutral red and Nile blue stains. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 3021-3024.
- Soto CY, Menéndez MC, Pérez E, Samper S, Gómez AB, García MJ. 2004. IS6110 mediates increased transcription of the *phoP* virulence gene in a multidrug-resistant clinical isolate responsible for tuberculosis outbreaks. *J. Clin. Microbiol*. 42: 212-219.
- Steenken W JR, Gardner LU. 1946. History of H37 strain of tubercle bacillus. *Am Rev Tuberc*. 54: 62-66.
- Strohmeier GR, Fenton M.J. 1999. Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes Infect*. 1: 709-717.

- Theus SA, Cave MD, Eisenach KD. 2004. Activated THP-1 Cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Infect Immun.* 72:1169–1173.
- Todar K. 2011. *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis. Todar's online textbook of bacteriology. Disponible en: <http://www.textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html> [Revisado el 21 de febrero del 2011]
- Tripathy SP. Fifteen-year follow-up of the Indian BCG prevention trial. In: International Union Against Tuberculosis, ed. Proceedings of the XXVIth IUAT World Conference on Tuberculosis and Respiratory Diseases. Singapore: Professional Postgraduate Services International, 1987:69–72.
- Trivedi OA, Arora P, Vats A, Ansari MZ, Tickoo R, Sridharan V, Mohanty D, Gokhale RS. 2005. Dissecting the mechanism and assembly of a complex virulence mycobacterial lipid. *Mol. Cell.* 17: 631-643.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line /THP-1. *Int J Cancer.* 26:171-176.
- van Embden JDA, van Gorkom T, Kremer K, Jansen R, van der Zeijst BAM, Schouls LM. 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.* 182: 2393-2401.
- van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent dna polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 29:2578-86.
- Vera-Cabrera L, Molina-Torres CA, Hernandez-Vera MA, Barrios-Garcia HB, Blackwood K, Villarreal-Treviño L, Ocampo-Candiani J, Welsh O, Castro-Garza J. 2007. Genetic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with deletions in the *plcA-plcB-plcC* locus. *Tuberculosis* 87:21-9.
- Vera-Cabrera L, Hernández-Vera MA, Welsh O, Jonson WM, Castro-Garza J. 2001. Phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis* is a preferential locus for *IS6110* transposition. *J. Clin. Microbiol.* 39:3499-3504.
- Vera-Cabrera L, Howard ST, Laszlo A, Johnson WM. 1997. Analysis of genetic polymorphism in the phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 35:1190-1195.
- Vergne I, Chua J, Deretic V. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking. *Traffic* 4:600–606.
- Walsh G. 2003. Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology. Segunda edición. John Wiley and Sons Publishers. England. Capítulo 10.

- Wards BJ, de Lisle GW, Collins DM. 2000. An *esat6* knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. *Tubercle Lung Dis.* 80:185-189.
- Wilson K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria, *In* Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman IG, Smith JA, Struhl K. Ed. *Current protocols in molecular biology*, Vol.1. New York, N.Y.: Wiley Interscience, 19: 2.4.1.
- Wilson TM, de Lisle GW, Collins DM. 1995. Effect of *inhA* and *katG* on isoniazide resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Mol. Microbiol.* 15: 1009-1015.
- World Health Organization. *Global Tuberculosis Control. WHO Report 2003.* Geneva, Switzerland, WHO/TB/99.259.
- Yeh RW, Ponce DL, Agasino CB, Hahn JA, Daley CL, Hopewell PC, Small PM. 1998. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J Infect Dis.* 177:1107–11.
- Zhang M, Gong J, Lin Y, Barnes P. 1998. Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. *Infect. Immun.* 66:794–799.
- Zhang M, Gong J, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. 1999. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J. Infect. Dis.* 179:1213–1217.
- Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhu G, Shi W, Zhang L, Wang S, Zhao G, Zhang Y. 2008. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *Plos One.* 3: e2375.

RESUMEN CURRICULAR

Ofelia Sánchez Salinas

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: Efecto de 150 subcultivos continuos sobre la composición genética y de virulencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 1º de mayo de 1983, hija de Luis Miguel Sánchez García y Manuela Salinas Carmona.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2006 con mención honorífica por la defensa de tesis.

Experiencia profesional: Servicio social en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” (2003-2004). Prácticas profesionales en el Instituto de Microbiología y Genética de la Universidad Georg-August en la ciudad de Göttingen Alemania (2004-2005). Tesis para obtener el grado de Licenciatura en laboratorio de Inmunología Celular del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (2006). Coordinadora de estudios de Investigación Clínica en el Hospital y Clínica OCA en Monterrey N.L. (2006-2007). Maestría en Ciencias con acentuación en Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L (2008-2010). Docente en la Universidad del Valle de México a nivel de Bachillerato Bicultural, impartiendo las materias de Química y Biología en idioma Inglés y a nivel de Licenciaturas de Nutrición y Fisioterapia colaborando con las materias de Microbiología, Inmunología y Toxicología de Alimentos (2010 a la fecha).