

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS

**SELECCIÓN DE GENES ESPECIE ESPECÍFICOS DE
Mycobacterium tuberculosis EXPRESADOS EN CONDICIONES DE
ESTRÉS TÉRMICO COMO CANDIDATOS PARA EL DIAGNÓSTICO
DE LA TUBERCULOSIS**

POR

WENDY LILIAN ZENTENO CHÁVEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

MAYO, 2018

**SELECCIÓN DE GENES ESPECIE ESPECÍFICOS DE *Mycobacterium tuberculosis*
EXPRESADOS EN CONDICIONES DE ESTRÉS TÉRMICO COMO
CANDIDATOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA
TUBERCULOSIS**

Comité de tesis

Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales
Presidente de Tesis

Dr. Pablo Zapata Benavides
Secretario

Dr. Jorge Enrique Castro Garza
Primer vocal

Dra. Licet Villarreal Treviño
Segundo vocal

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Tercer vocal

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Suplente

Mayo, 2018

FINANCIAMIENTO

El apoyo a la investigación científica de este trabajo ha sido brindado por parte del Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología de la UANL y a la Red Temática Inmunopatogénesis e Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas “INMUNOCANEI” No. 28013, CONACYT.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Patogénesis Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS) y en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León y bajo la dirección del Dr. Jorge Enrique Castro Garza y la Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales.

Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales
Directora Interna

Dr. Jorge Enrique Castro Garza
Director Externo

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la maravillosa vida que me ha dado, por brindarme la fortaleza necesaria para continuar en todo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado (N° de beca 386710) para la realización de mis estudios.

Agradezco al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas y a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por el apoyo financiero brindado para la realización del trabajo experimental.

Al Dr. Jorge Castro Garza por su infinita paciencia, grandes enseñanzas y el apoyo brindado durante todo este tiempo. Gracias por la confianza de permitirme trabajar sin restricciones en su laboratorio.

A la Dra. Lydia Rivera Morales por siempre tener palabras amables para mí, por su confianza, tolerancia y por estar siempre atenta a la culminación de este proyecto.

A mi comité de tesis por las facilidades brindadas para la revisión de este trabajo.

A la Dra. Pola Becerril Montes por todos los consejos profesionales y personales que ha compartido conmigo, por creer en mis capacidades siempre.

A Silvia González y Miriam Luevano por su apoyo y especialmente por hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia muy grata en todo momento.

A mi familia por esta larga espera y por siempre apoyar incondicionalmente mis decisiones.

A mis amigos por su amistad incondicional, por apoyar y entender cada una de mis decisiones; por no dejar que me rindiera.

DEDICATORIAS

A mis padres Eucario Zenteno Velasco y Glorinely Chávez Muñoz por ser un gran ejemplo de superación, por nunca dejar de creer en mí en ningún momento y por haber luchado a mi lado todas mis batallas como si fueran tuyas.

A mis hermanos Erick y Edgar por su apoyo incondicional y ejemplo de perseverancia.

A mi esposo Mario Enrique por ser un gran resplandor de optimismo en mi vida, creer en mí más de lo que yo en mí misma y “Porque sos mi amor, mi cómplice y todo, y en la calle codo a codo somos mucho más que dos.”

ÍNDICE

Sección	Página
COMITÉ DE TESIS.....	II
FINANCIAMIENTO.....	III
LUGAR DE TRABAJO.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Tuberculosis.....	4
2.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
2.3. Epidemiología.....	5
2.4. Genoma de <i>M. tuberculosis</i>	5
2.5. Expresión de genes bajo condiciones de estrés térmico.....	6
2.6. Detección de <i>M. tuberculosis</i> mediante ácidos nucléicos.....	7
3. HIPÓTESIS	10
4. OBJETIVOS	11
4.1. Objetivo general.....	11
4.2. Objetivos particulares.....	11

5.	MÉTODOS	12
5.1.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
5.2.	Determinación de la densidad celular en el lote de micobacterias.....	12
5.3.	Selección de genes.....	12
5.4.	Diseño de iniciadores.....	13
5.5.	Estrés inducido por calor.....	15
5.6.	Extracción de RNA.....	16
5.7.	Digestión de DNA.....	17
5.8.	Electroforésis en agarosa para RNA.....	17
5.9.	Determinación de la concentración y pureza de RNA.....	18
5.10.	Síntesis de DNA complementario.....	18
5.11.	Reacción en cadena de la polimerasa para obtener los amplicones correspondientes a cada gen.....	19
5.12.	Electroforesis en agarosa para DNA.....	19
6.	RESULTADOS	20
6.1.	Densidad celular en el lote de micobacterias.....	20
6.2.	Especificidad de los iniciadores diseñados.....	20
6.3.	Extracción de RNA.....	21
6.4.	Digestión de DNA.....	21
6.5.	Expresión de genes bajo condiciones de estrés térmico.....	22
7.	DISCUSIÓN	32
8.	CONCLUSIÓN	36
9.	BIBLIOGRAFÍA	37
10.	RESUMEN BIOGRÁFICO	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Genes de <i>M. tuberculosis</i> inducibles bajo condiciones de estrés térmico.....	13
2. Condiciones para el diseño de iniciadores en el programa Primer3plus....	14
3. Lista de las secuencias de los iniciadores diseñados.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Productos de amplificación usando iniciadores diseñados para genes de estrés térmico.....	20
2.	RNA aislado de <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv	21
3.	Producto de PCR utilizando iniciadores de una región no codificante en RNA aislado.....	22
4.	Amplificación del gen <i>dnaK</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por RT-PCR	24
5.	Amplificación del gen <i>groES</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por RT-PCR	25
6.	Amplificación del gen <i>hspX</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por RT-PCR	26
7.	Amplificación del gen <i>whiB3</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por RT-PCR	27
8.	Amplificación del gen <i>whiB4</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por RT-PCR	28
9.	Amplificación del gen <i>whiB5</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por RT-PCR	29
10.	Amplificación del gen <i>whiB6</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por RT-PCR	30
11.	Amplificación del gen <i>whiB7</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por RT-PCR	31

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
μm	micrómetros
μl	microlitros
et al.	y colaboradores
h	horas
mg	miligramos
mL	mililitros
min	minutos
nm	nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	pares de bases
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
Tb	Tuberculosis
TBP	Tuberculosis pulmonar
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Voltios

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad bacteriana ocasionada por especies agrupadas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, es una de las principales causas de muerte en el mundo. La rapidez, precisión y sensibilidad de los métodos de detección de la presencia del bacilo son uno de los puntos esenciales para el control de la enfermedad.

M. tuberculosis aumenta la expresión de ciertos genes en respuesta a diferentes condiciones ambientales a las que es expuesto. Para el desarrollo del presente trabajo se seleccionaron 8 genes (*dnaK*, *groES*, *hspX*, *whiB3*, *whiB4*, *whiB5*, *whiB6* y *whiB7*), que de acuerdo a estudios previos y a una búsqueda bioinformática sobre el genoma de *M. tuberculosis*, muestran un incremento en sus niveles de expresión bajo condiciones de estrés térmico y pueden ser utilizados como candidatos para el posterior desarrollo de una herramienta diagnóstica, debido a su alta especificidad en el genoma de *M. tuberculosis*.

Se diseñaron los iniciadores correspondientes para la amplificación por PCR de cada gen; la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* fue incubada a temperaturas de 42, 45, 48 y 50 °C durante 0.5, 1, 1.5 y 2 horas, posteriormente se llevó a cabo la extracción de RNA y síntesis de DNAc; la amplificación de los fragmentos de cada gen fue visualizada por electroforesis en gel de agarosa. Todas las muestras contenían la misma concentración inicial de RNA, por lo que una mayor intensidad de la banda indicó un incremento de la expresión del gen. El gen *dnaK* mostró una mayor intensidad de bandas a 42 y 48 °C a 30 min, *whiB3* a 42°C a 30 min, mientras que *whiB4* y *whiB5* a 48°C entre 0.5 y 2 h de incubación en condiciones de estrés. Los genes *groES*, *hspX*, *whiB6* y *whiB7* no mostraron cambios evidentes en la intensidad de las bandas. En general todos los genes analizados disminuyen su expresión con el tiempo de exposición al estrés y en temperaturas más altas. Un estudio cuantitativo confirmaría los resultados obtenidos en este trabajo. Los genes *dnaK*, *whiB3*, *whiB4* y *whiB5* son candidatos para continuar explorando su potencial como blancos de diagnóstico en una técnica de fácil implementación en laboratorios con infraestructura básica.

ABSTRACT

Tuberculosis is a bacterial disease caused by species belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex, is one of the top 10 causes of death worldwide. Fast, precise and sensitive methods to detect the bacilli are essential for disease control.

Mycobacterium tuberculosis increases expression of certain genes as a response to different environmental conditions. In the present work and based on previous studies about heat shock protein and a bioinformatic search, we selected 8 genes (*dnaK*, *groES*, *hspX*, *whiB3*, *whiB4*, *whiB5*, *whiB6* y *whiB7*) which increase their expression under heat shock stress. Moreover, as they are specific to *M. tuberculosis* complex, they could be candidates to the development of a diagnostic tool.

M. tuberculosis H37Rv strain was exposed to temperatures of 42, 45, 48 and 50 °C for 0.5, 1, 1.5 and 2 hours. Then, bacteria were harvested and RNA isolation and cDNA synthesis were performed subsequently. End point PCR amplification was carried on with specific primers designed for each selected gene. Amplicons were visualized by agarose gel electrophoresis. All samples contained the same initial RNA concentration, therefore a higher band intensity indicated an increase in gene expression. *dnaK* gene showed a increased intensity band at 42 and 48 °C at 30 min, *whiB3* at 42 °C and 30 min, while *whiB4* and *whiB5* at 48°C between 0.5-2 h incubation in stress conditions. *groES*, *hspX*, *whiB6* y *whiB7* did not show evident changes in the intensity of bands. Regularly, expression levels of all genes decreased at longer exposure time to heat shock stress and at higher temperatures. A quantitative study will confirm the results obtained in this work. The genes *dnaK*, *whiB3*, *whiB4* and *whiB5* are candidates to continue exploring its potential as diagnostic targets as a easy implementing technique in laboratories with basic infrastructure.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad bacteriana causada en humanos principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* y por especies agrupadas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* que incluye *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canetti* y *M. pinnipedii*, las cuales tienen una homología DNA-DNA superior al 95% (Fauci et al. 2009; Godreuil et al. 2007; Pfyffer 2007)

La enfermedad afecta principalmente a los pulmones y es transmitida vía aerógena de forma directa de persona a persona por medio de los bacilos expulsados por un enfermo con TB pulmonar (TBP) activa al toser o estornudar. La enfermedad es el resultado del establecimiento y la proliferación del microorganismo, así como su interacción con el hospedero. El bacilo sin embargo puede sobrevivir inactivo por meses o años sin manifestación del padecimiento. Cuando el hospedero tiene el primer contacto con el bacilo, se observa al inicio, la aparición de una lesión aguda exudativa que se desarrolla rápidamente y se disemina a los nódulos linfáticos, dicha lesión generalmente sana rápidamente y eventualmente los nódulos linfáticos sufren caseificación masiva que tiende a calcificarse. Ciertos factores del hospedero como su resistencia natural y los procesos inflamatorios son importantes para el desarrollo o control de la enfermedad, así como el número de micobacterias que infectan a un individuo (Smith 2003).

M. tuberculosis es una bacteria de forma bacilar, de crecimiento lento, Gram positiva, no esporulada e inmóvil, recta o ligeramente curva con extremos redondeados, que mide aproximadamente 1 – 4 μm de longitud por 0.3 – 0.5 μm de ancho. Es un organismo aerobio estricto, lo que explica la incidencia de infecciones severas en tejidos muy oxigenados como el lóbulo superior del pulmón. Su identificación microscópica se lleva a cabo mediante la tinción de Ziehl-Neelsen que permite reconocer microorganismos ácido-alcohol resistentes. Su tiempo de generación es de aproximadamente 18 h aunque el incremento en la tensión de CO_2 favorece su crecimiento. Es un organismo quimiorganótrofo y obtiene su energía a partir de la oxidación de compuestos de carbono simples (Brooks 2007; Pfyffer 2007).

El diagnóstico de la tuberculosis en nuestro país se lleva a cabo de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana para la prevención y control de la tuberculosis en la atención

primaria a la salud, la cual indica la búsqueda de casos de TB entre consultantes que presenten tos y expectoración, así como entre los contactos de un caso de tuberculosis y en grupos de alto riesgo. La comprobación del caso de tuberculosis se realiza mediante baciloscopía o el cultivo de tejidos, fluidos o secreciones de órganos de pacientes con manifestaciones clínicas, radiológicas y datos epidemiológicos compatibles con la enfermedad. (NOM-006-SSA2-1993).

La identificación de los casos se lleva a cabo mediante el diagnóstico microbiológico que consiste en la detección del microorganismo por microscopía y cultivo de muestras clínicas. Para realizar el análisis microscópico se llevan a cabo uno de los dos métodos de tinción, Ziehl-Neelsen o Auramina O, que ponen de manifiesto la resistencia de las micobacterias a la decoloración con ácidos fuertes. La detección de micobacterias en cultivo toma un tiempo relativamente prolongado debido al tiempo de generación del bacilo, para lo cual es necesario descontaminar previamente las muestras con el fin de eliminar la flora normal. Para el aislamiento se pueden utilizar diferentes medios de cultivo sólidos (a base de huevo o agar) o medios líquidos. En estos medios convencionales la observación macroscópica del crecimiento requiere una incubación prolongada de hasta 3 semanas (Heifets et al. 1994; Fadda et al. 1998).

El control de la enfermedad depende principalmente de la rapidez y la precisión de los métodos de diagnóstico. En los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de técnicas moleculares para la detección directa de *M. tuberculosis* en muestras, de la misma forma se han reportado técnicas basadas en la susceptibilidad a antimicrobianos e identificación de especies del género *Mycobacterium*. Estos métodos son muy prometedores ya que reducen los tiempos para el diagnóstico y la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos de semanas a días; entre ellos está el uso de sondas de DNA, métodos de amplificación y análisis de ácidos nucleicos. Hasta ahora los avances tecnológicos no han remplazado a las pruebas convencionales pero sirven como herramientas complementarias para el manejo y control de la enfermedad (Kremer et al. 1999; Cheng et al. 2005).

La destreza del microorganismo para soportar el estrés ambiental tanto fuera como dentro del hospedero, juega un papel crítico para determinar su éxito como patógeno. En el hospedero el bacilo se enfrenta a distintos tipos de estrés; exposición a agentes oxidantes debido que los macrófagos producen intermediarios de nitrógeno y oxígeno reactivo,

exposición a un pH ácido frente al fagosoma seguido de la privación de oxígeno dentro del granuloma y fagosoma, así como la falta de nutrientes que coincide con la formación de los granulomas. (Park et al. 2003; Primm et al. 2000; Manganeli et al. 2004).

Actualmente existe una gran variedad de técnicas de diagnóstico molecular que están basadas en la amplificación de secuencias específicas de DNA y RNA de muestras extraídas de pacientes con baciloscopías positivas y de detección de genes relacionados a la resistencia a antibióticos (Ortiz-Marin 2013), sin embargo no existen estudios que relacionen la expresión de genes especie específicos inducidos en condiciones de estrés con la identificación de *M. tuberculosis*, la selección correcta de este tipo de genes promete ser una nueva herramienta para la identificación rápida y específica de *M. tuberculosis*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Tuberculosis

Consumición, demonio del rey, lupus vulgaris o phthisis son algunos de los nombres que se le han dado a la TB. Ésta enfermedad fue descrita por Hipócrates (400 a.C) en su documento “De las epidemias” y fue claramente reportada por Claudius Galen durante el imperio romano, aunque no fue sino hasta 1882 cuando Robert Koch dio a conocer que la TB era causada por un agente infeccioso (Mathema, 2006).

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa que se caracteriza por una destrucción tisular progresiva, circunscrita a las zonas infectadas, su vía de transmisión es aérea cuando un enfermo con tuberculosis pulmonar tose, estornuda o escupe; la forma pulmonar es la más común (Smith, 2003; OMS, 2014).

La infección suele ser asintomática en personas sanas, dado que su sistema inmunitario actúa formando una barrera alrededor de la bacteria. Los síntomas de la tuberculosis pulmonar activa son: tos, a veces con esputo que puede ser sanguinolento, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna.

2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis pertenece al género *Mycobacterium*, el único miembro de la familia *Mycobacteriaceae* dentro del orden Actinomycetales. (Eutzeby, 1997).

M. tuberculosis es una bacteria de forma bacilar, de crecimiento lento, Gram positiva, no esporulada e inmóvil, recta o ligeramente curva con extremos redondeados, que mide aproximadamente 1 – 4 μm de longitud por 0.3 – 0.5 μm de ancho. Es un organismo aerobio estricto, lo que explica la incidencia de infecciones severas en tejidos muy oxigenados como el lóbulo superior del pulmón. Su tiempo de generación es de aproximadamente 18 h aunque el incremento en la tensión de CO_2 favorece su crecimiento. Es un organismo quimiorganótrofo y obtiene su energía a partir de la oxidación de compuestos de carbono simples (Brooks, 2007; Pfyffer, 2007).

M. tuberculosis reside en distintos nichos *in vivo* y se encuentra expuesta a distintos ambientes durante su desarrollo, como el crecimiento intracelular en macrófagos, en lesiones cavitarias y su sobrevivencia en ambientes anóxicos en granuloma. El éxito notable de *M. tuberculosis* como patógeno se debe a su habilidad para persistir grandes periodos de tiempo dentro del hospedero.

2.3 Epidemiología

La tuberculosis actualmente es una de las principales causas de muerte en el mundo. Cada segundo una persona es infectada y se estima que aproximadamente un tercio de las personas que han estado expuestas muestran en algún momento de sus vidas evidencia de la enfermedad aunque únicamente el 10% de estas personas presentan síntomas o son capaces de contagiar a otros individuos (Mathema y Kreiswirth 2003).

Aunque la tuberculosis es un problema de salud reciente en países desarrollados, nunca ha dejado de serlo en países en vías de desarrollo. Es por esto que en 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la TB como emergencia de salud mundial (Glynn 1998). En el 2015, se reportaron un total de 10.4 millones de casos nuevos en el mundo, los cuales se presentaron principalmente en las regiones de África, Asia sudoriental y el Pacífico occidental. Además, produjo 1.8 millones de muertes, incluyendo 0.4 millones de muertes asociadas con HIV (WHO, 2016)

En México, de acuerdo con la información disponible en el anuario de morbilidad del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, en el 2016 se reportaron 16,913 casos de tuberculosis respiratoria, se observa un aumento del 7.9% con respecto al número de casos reportados en el 2005 (15,249 casos nuevos). En los reportes publicados en el 2015, Nuevo León ocupó el séptimo lugar a nivel nacional con una incidencia de 22.57 por cada 100,000 habitantes. (SS, 2017)

2.4 Genoma de *M. tuberculosis*

La investigación sobre la caracterización genético-molecular del agente causal de la tuberculosis tomó un gran impulso en el año de 1998, con la publicación del genoma

completo de la cepa H37Rv, que contiene 4.4×10^6 pares de bases y aproximadamente 4000 genes, de los cuales 607 tienen una función desconocida. Presenta un contenido en guanina-citocina elevado (65.6%) y relativamente constante, con la excepción de ciertas regiones con un mayor porcentaje de guanina-citocina y que corresponden a una gran familia de genes que incluyen las reacciones gen-proteína (conocidos como PGRs, por sus siglas en inglés). Sólo el 59% de los genes se transcriben con la misma polaridad que la replicación, lo cual, junto con la presencia de un único operón de RNAr localizado a 1.5 Mb del origen de replicación, se ha relacionado con frecuentes ciclos de replicación y con la baja tasa de crecimiento del bacilo. Tras la reanotación del genoma, un 52% de las proteínas predichas tienen una función asociada y solo un 10% no presentan similitud con otras proteínas que podrían ser exclusivas de *M. tuberculosis*. Un 51% de las proteínas han surgido por duplicación génica. (Brodin 2005; Camus et al. 2002; Cole et al. 1998; Smith 2003).

2.5 Expresión de genes bajo condiciones de estrés térmico

Se han realizado diversos estudios *in vitro* que asemejan las condiciones a las que el bacilo está expuesto en el hospedero. Éstos han demostrado que ciertos genes se expresan bajo ambientes de estrés lo que provoca un cambio en el comportamiento de la bacteria dentro del hospedero activando un sistema de adaptación que le confiere distintas características de supervivencia. El conocimiento de la expresión de genes de *M. tuberculosis* bajo distintas condiciones es de suma importancia para la comprensión tanto de los factores de virulencia como la fisiología del bacilo. (Smith 2003).

Uno de los primeros modelos de estudio sobre inducción de estrés en bacterias fue el realizado por Wayne y colaboradores en 1994 donde demostraron la capacidad de *M. tuberculosis* para sobrevivir a condiciones de reducción de oxígeno y privación de nutrientes durante la fase estacionaria de crecimiento del bacilo, indicando así su capacidad de adaptación a estas condiciones por largos periodos de tiempo en estado de latencia; este modelo de estudio fue de utilidad para la identificación de genes inducidos bajo condiciones de privación de oxígeno en trabajos posteriores (Wayne 1994).

Hu y colaboradores, usando el modelo de Wayne, demostraron la expresión de genes bajo distintas condiciones de estrés, esto relacionado con las respuestas en la transcripción de

genes que codifican los factores de transcripción *sigA* y *sigB* teniendo una respuesta distinta bajo condiciones de estrés oxidativo y estrés por falta de nutrientes, la expresión de *sigA* se mantiene de manera constante en las fases exponencial y estacionaria de crecimiento bajo condiciones de estrés, en contraste con el factor de transcripción *sigB*, el cual es inducido durante la transición de las células en fase logarítmica a estacionaria, explicando el por qué las células que se encuentran en fase estacionaria de crecimiento son más resistente al estrés que cuando se encuentran en fase logarítmica (Hu y Coates 1999).

Existe una relación muy estrecha entre la síntesis de proteínas de estrés y la supervivencia de bacterias patógenas cuando se realiza el proceso de infección en el hospedero, en estudios realizados en *Salmonella typhimurium* que al igual que *Mycobacterium tuberculosis* tiene la capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos, Buchemeier en 1990 demostró que la proteína chaperona DnaK era una de las que tenían mayores niveles de síntesis cuando la bacteria era fagocitada.

Young y colaboradores lograron demostrar que la respuesta al estrés térmico genera un cambio en el patrón de síntesis de proteínas y este es directamente proporcional al cambio de temperatura (Buchmeier y Heffron 1990; Young et al. 1991).

Dasgupta y colaboradores observaron que *M. tuberculosis* posee 11 sistemas moleculares de dos componentes que se encuentran relacionados en la regulación de la expresión génica de la bacteria, como la toma de azúcares y la virulencia cuando existen cambios adversos en las condiciones ambientales (Dasgupta et al. 2000).

La respuesta al estrés por calor en *M. tuberculosis* es una vía adaptativa involucrada en la supervivencia de la bacteria cuando esta se encuentra expuesta a un aumento de temperatura en el ambiente. Esta respuesta se caracteriza por el resultado de la inducción de más de 100 genes, entre ellos varios factores sigma (*sigB*, *sigE* y *sigH*), existen una gran cantidad de genes altamente conservados que codifican proteínas de choque térmico, en particular aquellos que se encuentran en los operones *HSP70* y *HSP60* (Williams et al. 2007).

2.6 Detección de *M. tuberculosis* mediante ácidos nucleicos

En la actualidad se han logrado determinar mediante técnicas de biología molecular una variedad de genes de *M. tuberculosis* que son expresados cuando los cultivos son sometidos a condiciones de estrés. El empleo de la bioinformática y la proteómica, así como la

secuenciación completa del genoma de *M. tuberculosis*, facilitan el entendimiento de diversos mecanismos involucrados en la infección y permanencia del bacilo en el hospedero y con ello permite el desarrollo de diferentes técnicas para avanzar en su estudio y en su detección.

Existe una amplia variedad de estrategias basadas en la detección y amplificación de secuencias de DNA que nos permiten la detección rápida y oportuna del microorganismo; comercialmente existen ciertos kits disponibles, incluyendo el Amplicor (Roche Molecular Systems; Branchburg NJ), donde la secuencia blanco de amplificación es parte del gen 16S RNAr, seguido por detección colorimétrica del producto amplificado. Otro de estos sistemas es el MTD (Gen Probe, San Diego California), método que de igual manera utiliza secuencias blanco ubicadas dentro del RNAr o la prueba de Strand Displacement Amplification Test (Becton Dickinson). El sistema automatizado Xpert MTB/RIF detecta simultáneamente secuencias específicas de DNA y resistencia a rifampicina mediante PCR. La mayoría de estas pruebas están basadas en la inserción *IS6110*, que se encuentra en múltiples copias en casi todos los aislamientos. Este hecho, en teoría, ayudaría a incrementar la sensibilidad del método, ya que al existir múltiples copias de la secuencia blanco de la PCR, se partiría de un DNA molde que se encuentra en mayor cantidad en el organismo. Sin embargo, utilizar estas técnicas como diagnóstico, pueden producir resultados falsos positivos. Por otro lado se pueden obtener resultados falsos negativos, debido a que no todas las micobacterias poseen esta inserción. Es por ello que en adición a la secuencia *IS6110*, se utilizan otros genes blanco, tales como *mtp40*, *mbp64*, *rpoB* y *hsp65*, reportados como especie-específicos; la amplificación de un fragmento del gen de la proteína de estrés térmico de peso molecular 65 kDa (*hsp65*), el cual acoplado con pruebas específicas para determinación de especie permite la identificación de micobacterias provenientes de muestras clínicas. (American Thoracic Society 1997; Boehme 2010; Dine 2007; Kent et al. 1995).

Diferentes estudios en *M. tuberculosis* realizados por PCR en tiempo real (RT-PCR) y por microarreglos han demostrado la importancia de los cambios en los patrones de expresión de distintos genes asociados a distintas condiciones de estrés que asemejan las condiciones a las que está expuesto el bacilo durante su desarrollo en el hospedero (Hu et al. 1999; Betts et al. 2002; Geiman 2004).

Esta misma información ha permitido grandes avances en el descubrimiento y desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico molecular de la tuberculosis en los últimos años, muchas de éstas complementan de forma importante a las pruebas de diagnóstico convencionales permitiendo un nuevo enfoque en la lucha contra la tuberculosis a nivel mundial. Sin embargo, el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico está lleno de consideraciones de índole presupuestario, lo que es de gran relevancia en países económicamente inestables debido a que estos son los más afectados por la enfermedad, es por esto que existe la necesidad de crear nuevas herramientas de diagnóstico tomando en cuenta criterios de rentabilidad y aplicabilidad clínica.

El fortalecimiento de la capacidad y el desempeño de los laboratorios sigue siendo una prioridad para control de la TB, una novedosa opción de solución a la problemática del diagnóstico de la enfermedad es la identificación de genes especie-específicos expresados bajo distintas condiciones de estrés, para después realizar la selección de los que puedan ser utilizados para desarrollar herramientas eficaces que permitan una detección estandarizada y oportuna de la TB.

3. HIPÓTESIS

El análisis de los genes especie específicos de *Mycobacterium tuberculosis* expresados en condiciones de estrés térmico aportarán información para la selección de secuencias útiles para el desarrollo futuro de un nuevo método de diagnóstico de tuberculosis.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Seleccionar genes especie específicos de *M. tuberculosis* expresados bajo condiciones de estrés térmico como posibles candidatos para el posterior desarrollo de una herramienta diagnóstica.

4.2 Objetivos particulares

- Identificar en la literatura y bases de datos la expresión de genes reportados bajo diversas condiciones de estrés.
- Establecer un protocolo para inducir estrés de choque térmico a cultivos de *M. tuberculosis*
- Desarrollar el diseño de los iniciadores adecuados de acuerdo a los genes que hayan sido seleccionados como especie específicos.
- Analizar la expresión de genes específicos de un cultivo de *M. tuberculosis* bajo condiciones de estrés por choque térmico.
- Establecer un perfil de genes especie específicos como candidatos para el posterior desarrollo de nuevo método diagnóstico.

5. MÉTODOS

5.1 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis, cepa H37Rv. Aislada en 1905, desde entonces ha sido ampliamente utilizada en diversos trabajos de investigación debido a que ha conservado su virulencia, además de ser sensible a distintos fármacos y susceptible de ser modificada genéticamente con facilidad (Brosch et al. 1998; Cole et al. 1998; Philipp et al. 1996).

La cepa H37Rv de *M. tuberculosis* se cultivó en el medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Difco) adicionado con Tween 80 (Sigma-Aldrich) al 0.05% (v/v) y enriquecido con ácido oleico-albúmina dextrosa-catalasa (OADC) (Becton Dickinson, BBL) al 10%.

Con la finalidad de obtener y utilizar un solo lote de cultivo bacteriano homogéneo durante todo el trabajo, se inocularon 2 frascos de cultivo conteniendo 50 mL de medio 7H9 con la cepa H37Rv y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en agitación constante (20 rpm) durante 2 semanas. Los cultivos se distribuyeron en alícuotas de 1.2 mL en criotubos y fueron preservadas a -70°C hasta su uso.

5.2 Determinación de la densidad celular en el lote de micobacterias

Durante la semana posterior a la congelación de la cepa, se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL); a 3 alícuotas al azar se les realizó diluciones seriales 1:10 y de cada dilución se sembraron 100 µl en cajas Petri con 20 ml de medio de cultivo Middlebrook 7H10. Las cajas Petri fueron incubadas en posición invertida durante 2 semanas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Transcurrido ese tiempo se realizó la cuenta de colonias, se tomaron en cuenta aquellas cajas que contenían entre 20 y 200 colonias. Los cálculos se realizaron de acuerdo al factor de dilución para determinar el número de UFC/mL.

5.3 Selección de genes

Para seleccionar los genes sujetos a estudio se tomaron en cuenta reportes anteriores sobre la expresión de genes de estrés térmico (Betts et al. 2002; Geiman et al. 2006; Kendal et al.

2004; Young et al. 1991) y además se realizó una búsqueda bioinformática en: <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/> para el genoma de *M. tuberculosis*. En la tabla 1 se muestran los 8 genes seleccionados; Las secuencias de los genes seleccionados se obtuvieron de la base de datos “GenBank” del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Una vez obtenida la secuencia del gen en formato FASTA, se realizó una búsqueda contra la base de datos general disponible en la página web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, para determinar que las secuencias de los genes a usar fueran específicas de *M. tuberculosis*.

Tabla 1. Genes de <i>M. tuberculosis</i> inducibles bajo condiciones de estrés térmico				
Gen	Número de acceso	Longitud (pb)	Función	Referencia
<i>dnaK</i>	Rv0350	1,878	Chaperona	Young, 1991
<i>groES</i>	Rv3418c	303	Se une a CPN60 en presencia de Mg-ATP suprimiendo la actividad ATPasa	Young, 1991
<i>hspX</i>	Rv2031c	435	Chaperona Mantiene la viabilidad de la célula en el periodo de latencia	Kendal, 2004
<i>whiB3</i>	Rv3416	309	Regulador transcripcional	Geiman, 2006
<i>whiB4</i>	Rv3681	357	Regulador transcripcional	Geiman, 2006
<i>whiB5</i>	Rv0022c	420	Regulador transcripcional	Geiman, 2006
<i>whiB6</i>	Rv3862c	351	Regulador transcripcional	Geiman, 2006
<i>whiB7</i>	Rv3197A	279	Regulador transcripcional	Geiman, 2006

5.4 Diseño de iniciadores

Basados en las secuencias obtenidas como se describe en el punto anterior, se realizó el diseño de los iniciadores correspondientes a los genes seleccionados utilizando la

herramienta Primer3plus disponible en: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>, tomando en cuenta las condiciones mostradas en la Tabla 2 (Untergasser et al. 2007).

Tabla 2. Condiciones para el diseño de iniciadores en el programa Primer3plus.	
Rango de tamaño de la secuencia a amplificar	200-800
Tamaño del primer	18-25 nucleótidos
Primer Tm:	57 – 60 – 63
Máxima diferencia de temperatura de fusión:	2.0
% GC	40-50-60

Para corroborar el correcto diseño de los iniciadores, se utilizaron diversas herramientas bioinformáticas. OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies) : (<https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) para analizar la calidad de los iniciadores diseñados y OligoCalc (Northwestern University) (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) para corroborar la temperatura de fusión de nuestros iniciadores

Para corroborar la especificidad de los iniciadores diseñados y descartar la presencia de genes homólogos en el genoma de *M. tuberculosis*, se realizó una búsqueda utilizando la herramienta “PrimerBlast” disponible en la página del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y finalmente una PCR virtual en el simulador *in silico* de experimentos de biología molecular disponible en el portal web de la Universidad del País Vasco (San Millan, 2013) (<http://insilico.ehu.es/PCR>).

Tabla 3. Lista de las secuencias de los iniciadores diseñados.

Gen	Nombre	Secuencia	Tamaño amplicón (pb)
<i>dnaK</i>	dnaK_F	5'- GACCAAGGACAAGATGGCGA - 3'	573
	dnaK_R	5'- TAGACCTGGATCTGCACCGA - 3'	
<i>groES</i>	groES_F	5'- AGGTGAACATCAAGCCACTC - 3'	250
	groES_R	5'- TATTCCTCGCCGTTGTACTT - 3'	
<i>hspX</i>	hspX_F	5'- GGCTGGAAGACGAGATGAAA - 3'	302
	hspX_R	5'- CCGGATCTGAATGTGCTTTT - 3'	
<i>whiB3</i>	whiB3_F	5'- ACGCAGACATCTGGAAGTGG - 3'	241
	whiB3_R	5'- GTGCCCTTGAGGAGTAGGTC - 3'	
<i>whiB4</i>	whiB4_F	5'- TACCGACCCTGACGAACTCT - 3'	215
	whiB4_R	5'- TCGCCTTCTCAAGGTAGTCC - 3'	
<i>whiB5</i>	whiB5_F	5'- GGGAGCTGCCTGGAATTGAT - 3'	295
	whiB5_R	5'- CAACCGACCCGGAAGTATGG - 3'	
<i>whiB6</i>	whiB6_F	5'- GAATTACGACCCCTGCCAC - 3'	224
	whiB6_R	5'- AGAGGCTACAACCTGCAACG - 3'	
<i>whiB7</i>	whiB7_F	5'- TATCTCACCACCCCAAACGC - 3'	202
	whiB7_R	5'- ACTGACAGTCCCCAGACAGA - 3'	

5.5 Estrés inducido por calor

La inducción de estrés térmico se llevó a cabo en 2 etapas: a) estabilización de la cepa y b) estrés térmico.

a) Estabilización de la cepa:

Se tomaron 10 alícuotas de la cepa *M. tuberculosis* con una densidad de 4×10^6 , se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y los sedimentos obtenidos se concentraron en un tubo cónico de 50 mL al cual se le agregaron 10 mL de medio de cultivo 7H9 adicionado con Tween 80 y OADC. El cultivo se incubó a 37°C toda la noche en agitación constante (20 rpm).

b) Inducción de estrés

El cultivo estabilizado se dividió en 10 alícuotas de 1 mL en microtubos de 1.5 mL con tapón de rosca y empaque. Las alícuotas se incubaron en un baño de agua (Terlab, México) a temperaturas de 42, 45, 48 y 50 °C, durante: 0.5, 1, 2 y 6 horas. El control de expresión basal

se incubó a 37°C a los mismos tiempos. (Patel et al. 1991; Young et al. 1991; Stewart et al. 2002). Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Transcurrido cada tiempo de incubación, las muestras se retiraron del baño de agua para ser centrifugadas a 14,000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregaron 300 µl de la solución RNAlater (Ambion, Texas, USA) a cada uno de los tubos para evitar el deterioro del RNA, estos se almacenaron durante toda la noche a una temperatura de 4°C.

5.6 Extracción de RNA

La extracción del RNA total se realizó con material libre de RNAsas: tubos para microcentrífuga certificados, agua tratada con DEPC (Diethyl pirocarbonato), soluciones disueltas en agua DEPC, recipientes de vidrio horneado a 300°C por 3h, micropipetas reservadas para ese uso y cámaras de electroforesis tratadas con RNase AWAY (Molecular Bio-Products, CA, USA). Durante todo el proceso se usaron guantes para evitar la contaminación con RNAsas.

La extracción de RNA se realizó con el kit RNeasy[®] Protect Mini (Qiagen, CA, USA). Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se agregaron 600 µl de solución RLT (adicionado con 20 µl DTT 2M por cada mililitro de solución RLT), cada muestra se colocó en un tubo de lisis de 2 ml conteniendo esferas de sílica con un diámetro de 0.1 mm (MP biomedical, CA, USA); para el lisado y homogenización de las muestras, los tubos se colocaron en el sistema FastPrep FP120 (Bio 101 Thermo Savant, Carlsbad, CA, USA) aplicando 3 ciclos de 20 s a una velocidad de 6.0 min/seg, entre cada ciclo los tubos se retiraron del equipo para ser colocados 1 minuto en hielo. Los lisados se centrifugaron por 3 min a 14,000 rpm, luego se tomaron 350 µl del sobrenadante, y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1.5 µl para añadir un volumen (350 µl) de etanol al 70% y mezclar con la pipeta para transferir inmediatamente un volumen máximo de 700 µl de la muestra (incluyendo cualquier precipitado que se haya formado) a la columna RNeasy spin colocada en el tubo de recolección de 2 mL. Las columnas se centrifugaron por 15 seg a 14,000 rpm, se descartó la solución de lavado en el tubo de recolección, en caso de que el volumen de la muestra fuera superior a 700 µl, se centrifugaron alícuotas sucesivas en la misma columna de RNeasy spin. Enseguida se

agregaon 700 μ l de solución RW1 a la columna spin RNeasy, se centrifugó 15 seg a 14,000 rpm, se descartó la solución en el tubo de recolección y se agregaron 500 μ l de solución RPE-etanol a la columna, se centrifugó por 15 seg a 14,000 rpm para lavar la columna descartando nuevamente la solución de lavado, Se agregaron 500 μ l de solución RPE-etanol a la columna y se centrifugó 2 min a 14,000 rpm para lavar la columna. La columna se transfirió a un tubo de 1.5 ml nuevo, cuidando que la columna no tocara la solución filtrada para evitar residuos de etanol, se añadieron 30 μ l de agua libre de RNasa directamente a la membrana de la columna y centrifugamos 1 minuto a 14,000 rpm para eluir el RNA.

5.7 Digestión de DNA

La digestión del DNA residual contenido en las muestra de RNA extraído se realizó, mediante el kit RQ1 DNAsa libre de RNAsas (Promega, CA, USA), este kit contiene la endonucleasa DNasa I que genera rupturas en cadenas dobles y simples de DNA produciendo oligonucleótidos fosforilados con extremos terminales 3'-hidroxilados. Se preparó una mezcla de digestión en microtubos de 200 μ l que contenía: 4 μ l de H₂O, 1 μ l de mezcla de reacción 10x, 1 μ l de DNAsa RQ1, y finalmente se agregaron 4 μ l de muestra; la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min en un termociclador (marca y lugar de origen), transcurrido el tiempo de incubación se agregó 1 μ l de solución STOP e incubamos a 65°C durante 10 minutos para inactivar la DNAsa.

5.8 Electroforesis en agarosa para RNA

El RNA aislado se visualizó en geles de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio en condiciones desnaturalizantes. La agarosa se disolvió en solución MOPS 1x (ácido 3-(n-morfolino) propanosulfónico) preparado con agua DEPC adicionado con 0.66 M de formaldehído y 0.5 μ l de Bromuro de Etidio (10 mg/mL) en un volumen final de 30 ml.

Se mezclaron en tubos de 200 μ l: 5 μ l de cada muestra con 1 μ l de solución de carga 6x, esta mezcla se incubó a 65°C durante 10 min, e inmediatamente después las muestras se

colocaron en hielo; las muestras preparadas se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal (Owl Easycast B1, Thermo scientific, Massachusetts, USA) por 1 h a 80 V (PowerPac Basic, BioRad, CA, USA); la visualización de las bandas se realizó en un transiluminador (Hofer MacroVue UVis-20, Amersham Biosciences). En cada gel se incluyó un carril con 2 μ l del marcador de peso molecular 1x de 10 -2000 pb (Invitrogen, CA, USA).

5.9 Determinación de la concentración y pureza de RNA

Una vez extraído el RNA y realizado la digestión del DNA residual se determinó su concentración y pureza mediante los valores de absorbancia a las longitudes de onda de 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

El cociente de las absorbancias a las longitudes de 260/280 nm nos indica la calidad y pureza del RNA, considerándose de óptima calidad si la relación se encuentra entre 1.8 - 2. Cuando esta relación se encuentra por debajo de estos valores nos indica la presencia de proteínas, fenoles, otros contaminantes o degradación del ácido nucleico. En ese caso se requirió una segunda purificación. Todas las muestras obtenidas se encontraron en la relación adecuada para ser consideradas puras.

5.10 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Posterior a la determinación de la concentración del RNA de cada muestra, se ajustó la concentración a 5 ng/ μ l y se realizaron las reacciones de retrotranscripción para obtener el cDNA) utilizando el kit ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Wisconsin, USA). Se preparó una mezcla incluyendo 1 μ l de hexámeros al azar (0.5 μ g/ μ l), 1 μ l de RNA y suficiente agua libre de nucleasas para llevar a un volumen total de 5 μ l. Se incubó a 70° C por 5 min e inmediatamente después a 4°C por 5 min. Mientras tanto, se prepararon las mezclas de reacción de transcripción reversa: 4 μ l de solución de reacción ImProm-IITM 5x (250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl y 50mM DTT.); 3 μ l de MgCl₂ 25 mM; 1 μ l de

mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno dGTP, dCTP, dATP y dTTP); 0.5 µl de inhibidor de ribonucleasas recombinante RNasin[®] (20 U/µl); 1 µl de Transcriptasa Reversa ImProm-II[™] (20 U/µl) y agua libre de nucleasas para llevar a un volumen de 15 µl. Esta preparación se adicionó a la mezcla de RNA y se incubaron en el termociclador secuencialmente a 25°C por 5 min, 42°C por 1 h y 70°C por 15 min.

5.11 Reacción en cadena de la polimerasa para obtener los amplicones correspondientes a cada gen

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en 25 µl de mezcla conteniendo 10.3 µl de agua libre de nucleasas, 12.5 µl de Mastermix para PCR (Promega, Wisconsin, USA) y 1.2 µl de la mezcla de iniciadores (5 µM) y 1 µl de DNA. Las condiciones de amplificación fueron: un tiempo inicial de desnaturalización de 6 min a 96°C seguido de 35 ciclos de 96, 55 y 72° C por 30 s para cada temperatura y un tiempo final de extensión de 10 min a 72° C.

5.12 Electroforesis en agarosa para DNA

Los amplicones se observaron en geles de agarosa al 1 % con Bromuro de Etidio. La agarosa se disolvió en Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5x y se agregaron 0.5 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml) en un volumen final de 30 ml.

Las muestras se cargaron en el gel y se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal por 1 h a 80 V; las bandas se visualizaron en un transiluminador. En cada gel se incluyó un carril con 2 µl del marcador de peso molecular de 10 -2000 pb (Invitrogen, CA, USA).

6. RESULTADOS

6.1 Densidad celular en el lote de micobacterias

La densidad bacteriana de los cultivos almacenados de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* fue de 4×10^6 ufc/ml.

6.2 Especificidad de los iniciadores diseñados

Se seleccionaron ocho genes previamente reportados como inducibles bajo estrés térmico (tabla 1) y para cada uno de ellos se diseñaron el par de oligonucleótidos para llevar a cabo la amplificación del gen por PCR. Después del proceso de selección, diseño y comprobación de la especificidad de los oligonucleótidos *in silico*, analizamos la amplificación de cada gen con su correspondiente par de oligonucleótidos en una PCR real. Como templado se utilizó el DNA genómico extraído de *M. tuberculosis* H37Rv incubada a una temperatura de 37°C en una atmosfera del 5% de CO₂. En la figura 1 se muestra que en todos los casos se obtuvo un solo amplicón del tamaño esperado indicado en la tabla 3.

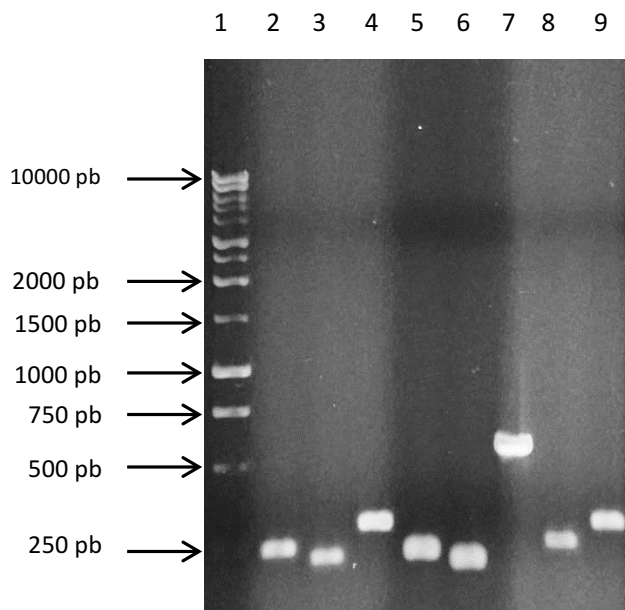


Figura 1. Productos de amplificación usando iniciadores diseñados para genes de estrés térmico. Carriles: (1) Marcador de peso molecular, (2) *whiB3*, (3) *whiB4*, (4) *whiB5*, (5) *whiB6*, (6) *whiB7*, (7) *dnaK*, (8) *groES*, (9) *hspX*.

6.3 Extracción de RNA

El RNA extraído mediante el kit RNeasy[®] Protect Mini (Qiagen, CA, USA) fue cuantificado por espectrometría. Todas las muestras se ajustaron a una concentración de 5 ng/μl.

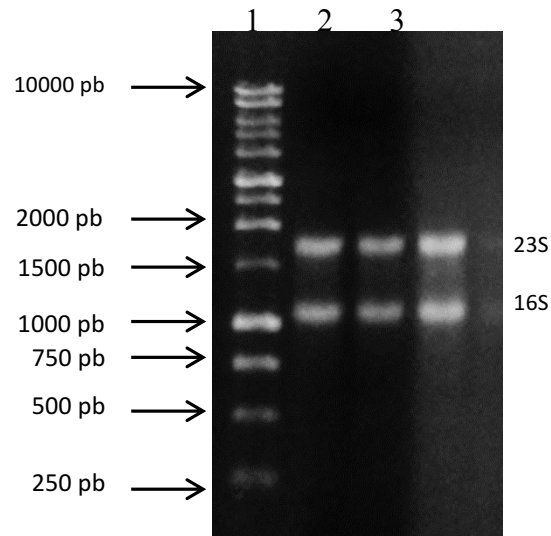


Figura 2. RNA aislado de *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Gel de agarosa al 1% en el que se muestran: Carril 1, marcador de peso molecular 10,000-250 pb; Carriles 2-4 RNA aislado.

6.4 Digestión de DNA

Con la finalidad de eliminar por completo el DNA de las muestras y evitar cualquier probable amplificación proveniente del DNA, las muestras de aislamiento de RNA se trataron con una enzima DNAsa (Promega, Madison, WI). Para corroborar que la digestión se llevó a cabo completamente, se realizó una PCR de las muestras de RNA digeridas con DNAsa utilizando un par de iniciadores que amplifican una región no codificante de 369 pb de longitud en el genoma de *M. tuberculosis*. Como control positivo en la PCR se utilizó DNA de *M. tuberculosis* H37Rv sin digerir. Observamos que la digestión del DNA fue completa y no hay interferencias en los ensayos debido a restos de DNA en las muestras. (Fig 3).

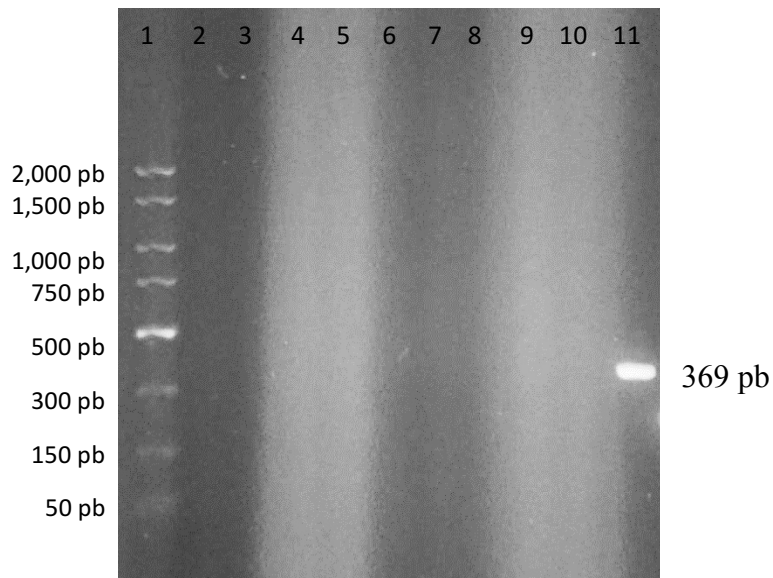


Figura 3. Producto de **PCR utilizando iniciadores de una región no codificante en RNA aislado**. Gel de agarosa al 1% en el que se muestran: Marcador de peso molecular (Carril 1), RNA aislado tratado con DNAsa (Carriles 2-9), control negativo (Carril 10), Control positivo de DNA no digerido (Carril 11).

6.5 Expresión de genes bajo condiciones de estrés térmico

Los cultivos de *M. tuberculosis* se sometieron a estrés térmico a diferentes tiempos de incubación como se describe en la sección de metodología (ver sección 5.5). Las muestras colectadas se procesaron para aislar el RNA y producir su correspondiente cDNA. Para cada gen, todas las reacciones para producir cDNA se prepararon con la misma concentración de RNA. Posteriormente, a partir de cada cDNA se llevaron a cabo las reacciones de PCR para cada juego de iniciadores. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa. Ya que todas las muestras se trabajaron con la misma concentración inicial de RNA, una mayor intensidad de la banda indicó un incremento de la expresión del gen.

Tomando como expresión basal el amplicon obtenido a 37°C al tiempo 0 h, comparamos los amplicones en las diferentes condiciones de temperatura y tiempo para cada gen.

En la figura 4 se observa un incremento de la expresión del gen *dnaK* a temperaturas superiores a 37°C, siendo más evidente a los 30 min de incubación en las temperaturas de 42 a 48°C. A las 6 h de incubación la intensidad de la banda disminuye al igual que al incubar las muestras a 50°C.

Las bandas obtenidas para el gen *groES* no mostraron diferencias de intensidad para los diferentes tiempos y temperaturas con excepción de los 50°C, donde se observó una disminución en la intensidad, lo que representa una menor expresión del gen a dicha temperatura (figura 5).

La expresión del gen *hspX* a 42°C no muestra diferencias evidentes al comparar la intensidad de las bandas correspondientes al amplicon. Al incubar las micobacterias a 45 y 48°C observamos que la intensidad de las bandas disminuye con el tiempo de incubación y para las 6 h de incubación a 48°C no se observó banda correspondiente al amplicon. Al incubar las micobacterias a 50°C no detectamos bandas, indicando la no expresión del gen *hspX* a esta temperatura a ningún tiempo de incubación (figura 6).

El análisis de los productos de PCR del gen *whiB3* mostró un incremento en la intensidad de las bandas a 42°C, temperaturas más altas no produjeron cambios en la intensidad de las bandas. (figura 7). Los genes *whiB4* (figura 8) y *whiB5* (figura 9) presentaron su nivel más alto de expresión a la temperatura de 48°C entre 0.5 y 2 h de incubación. En estos 3 genes de la familia *whiB* la incubación a 50°C produjo resultados inconsistentes en la amplificación del gen. Los genes *whiB6* (figura 10) y *whiB7* (figura 11) no presentaron cambios en su expresión al someter las bacterias a diferentes temperaturas ni por el tiempo de exposición.

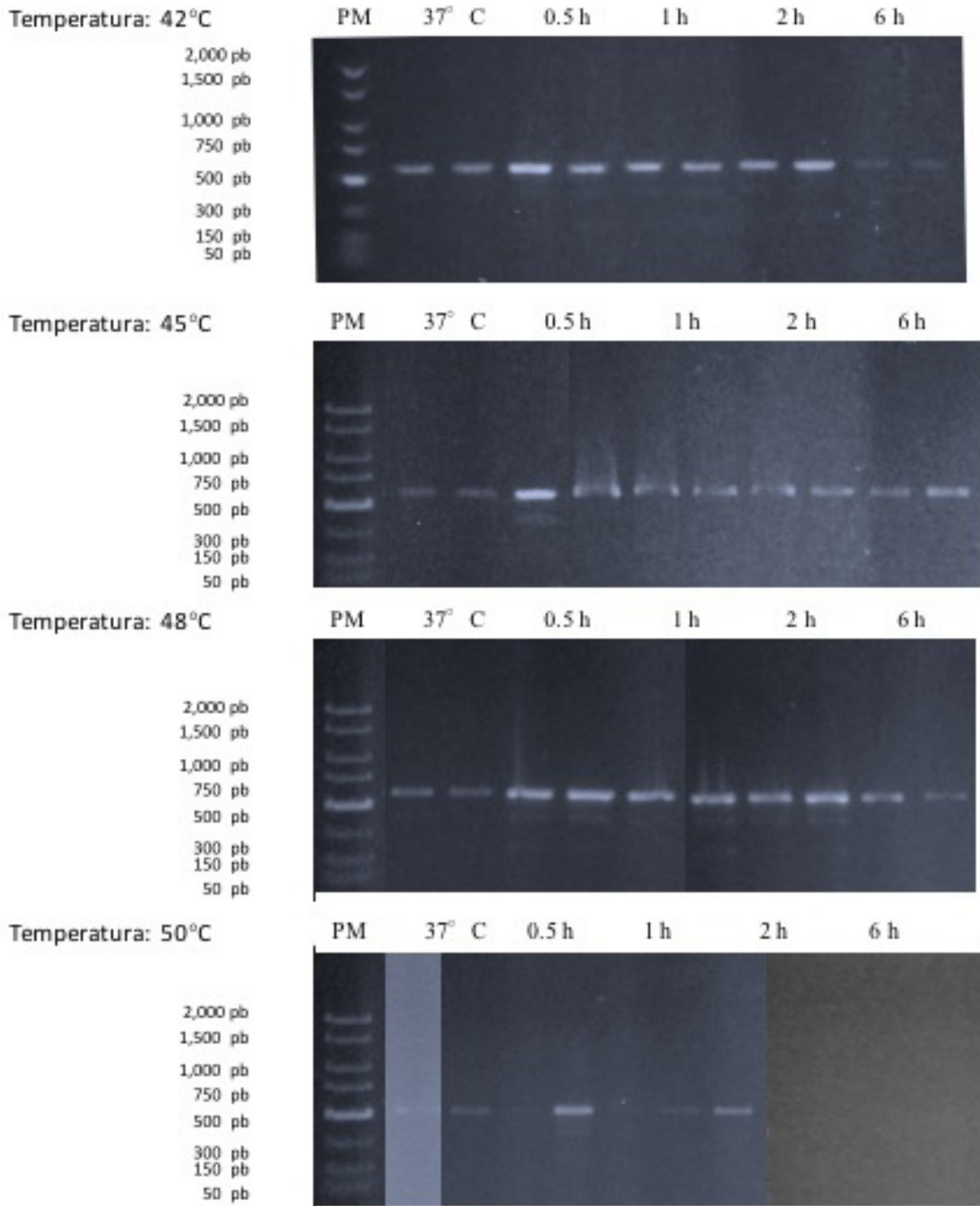


Figura 4. Amplificación del gen *dnaK* de *M. tuberculosis* H37Rv por RT-PCR. Amplicones obtenidos a partir del cDNA de cultivos de *M. tuberculosis* incubados a diferentes temperaturas por tiempos variables. Carril 1: Marcador de peso molecular, la temperatura de 37°C representa la expresión basal del gen.(carril 2 y 3), carril 4 al 11 muestran los tiempo de incubación por duplicado.

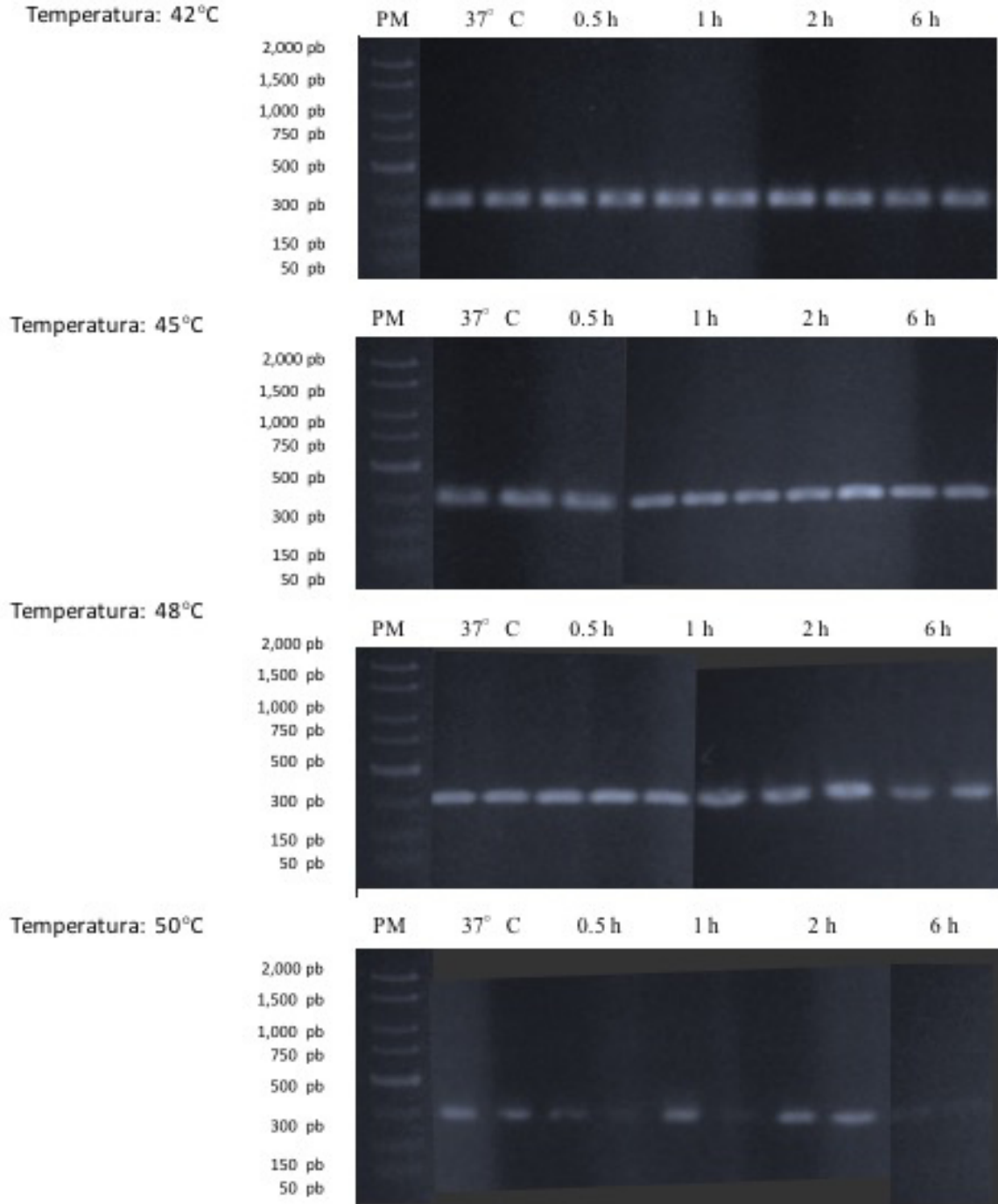


Figura 5. Amplificación del gen *groES* de *M. tuberculosis* H37Rv por RT-PCR. Amplicones obtenidos a partir del cDNA de cultivos de *M. tuberculosis* incubados a diferentes temperaturas por tiempos variables. Carril 1: Marcador de peso molecular, la temperatura de 37°C representa la expresión basal del gen.(carril 2 y 3), carril 4 al 11 muestran los tiempo de incubación por duplicado.

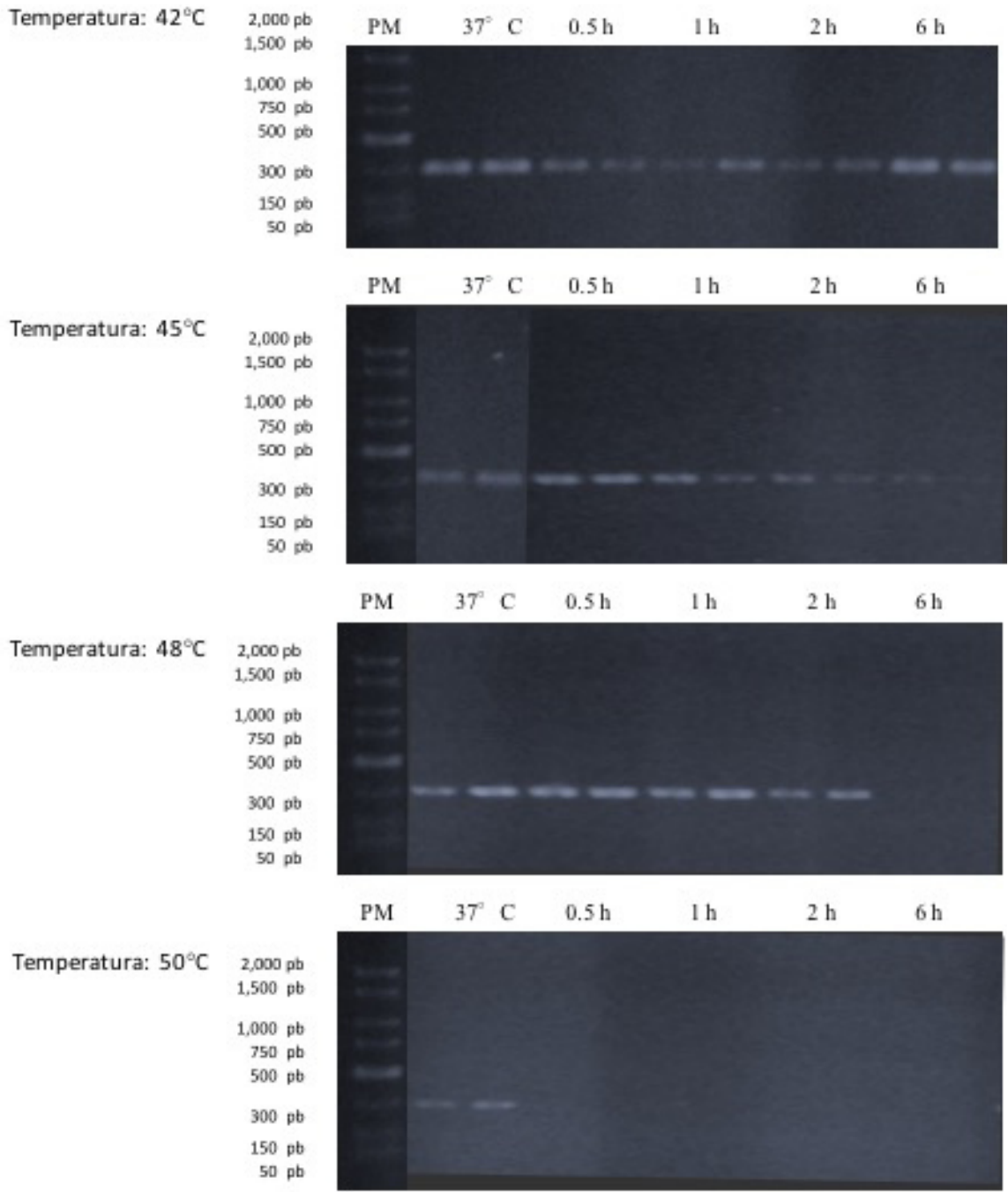


Figura 6. Amplificación del gen *hspX* de *M. tuberculosis* H37Rv por RT-PCR. Amplicones obtenidos a partir del cDNA de cultivos de *M. tuberculosis* incubados a diferentes temperaturas por tiempos variables. Carril 1: Marcador de peso molecular, la temperatura de 37°C representa la expresión basal del gen.(carril 2 y 3), carril 4 al 11 muestran los tiempo de incubación por duplicado.

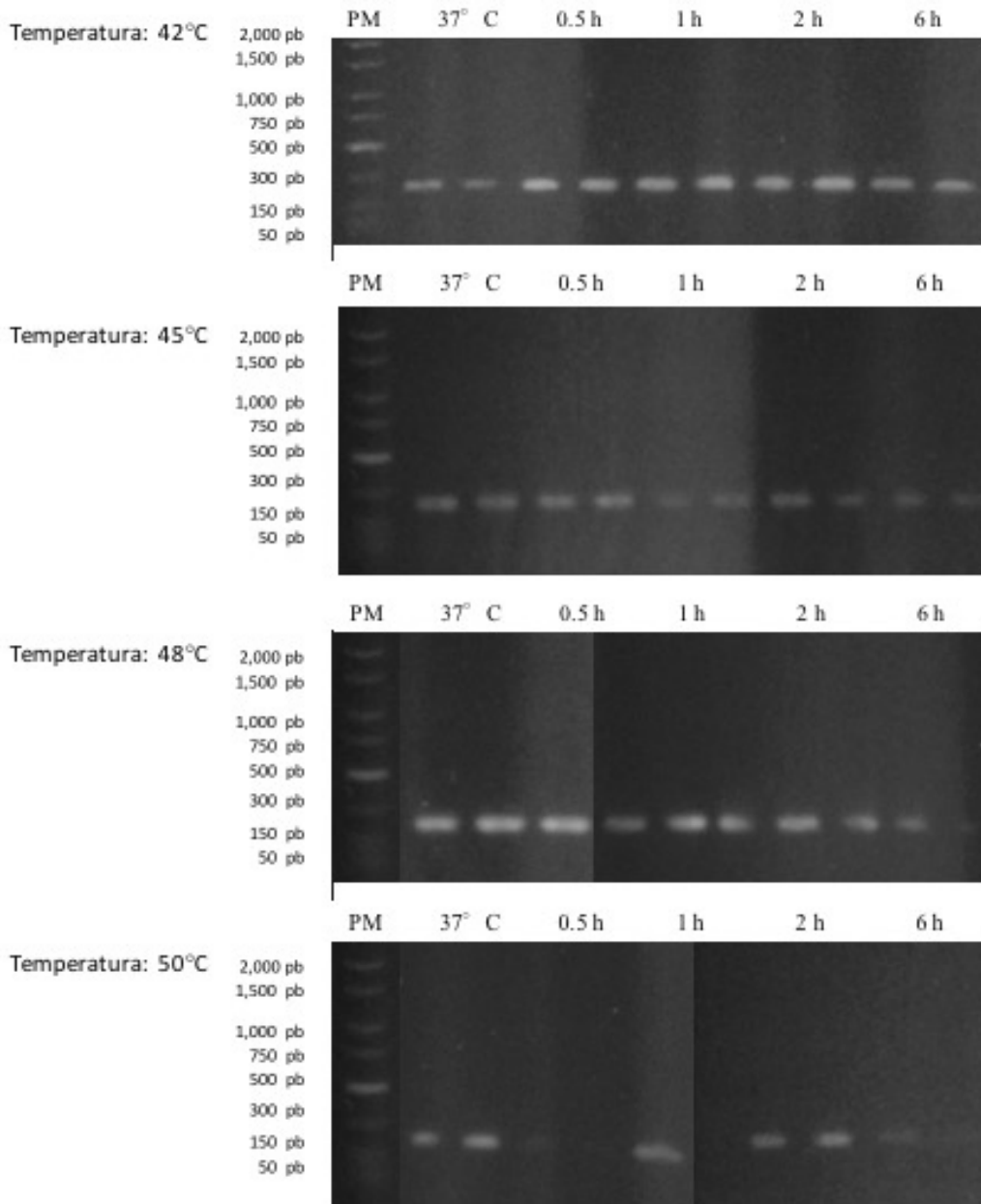


Figura 7. Amplificación del gen *whiB3* de *M. tuberculosis* H37Rv por RT-PCR. Amplicones obtenidos a partir del cDNA de cultivos de *M. tuberculosis* incubados a diferentes temperaturas por tiempos variables. Carril 1: Marcador de peso molecular, la temperatura de 37°C representa la expresión basal del gen.(carril 2 y 3), carril 4 al 11 muestran los tiempo de incubación por

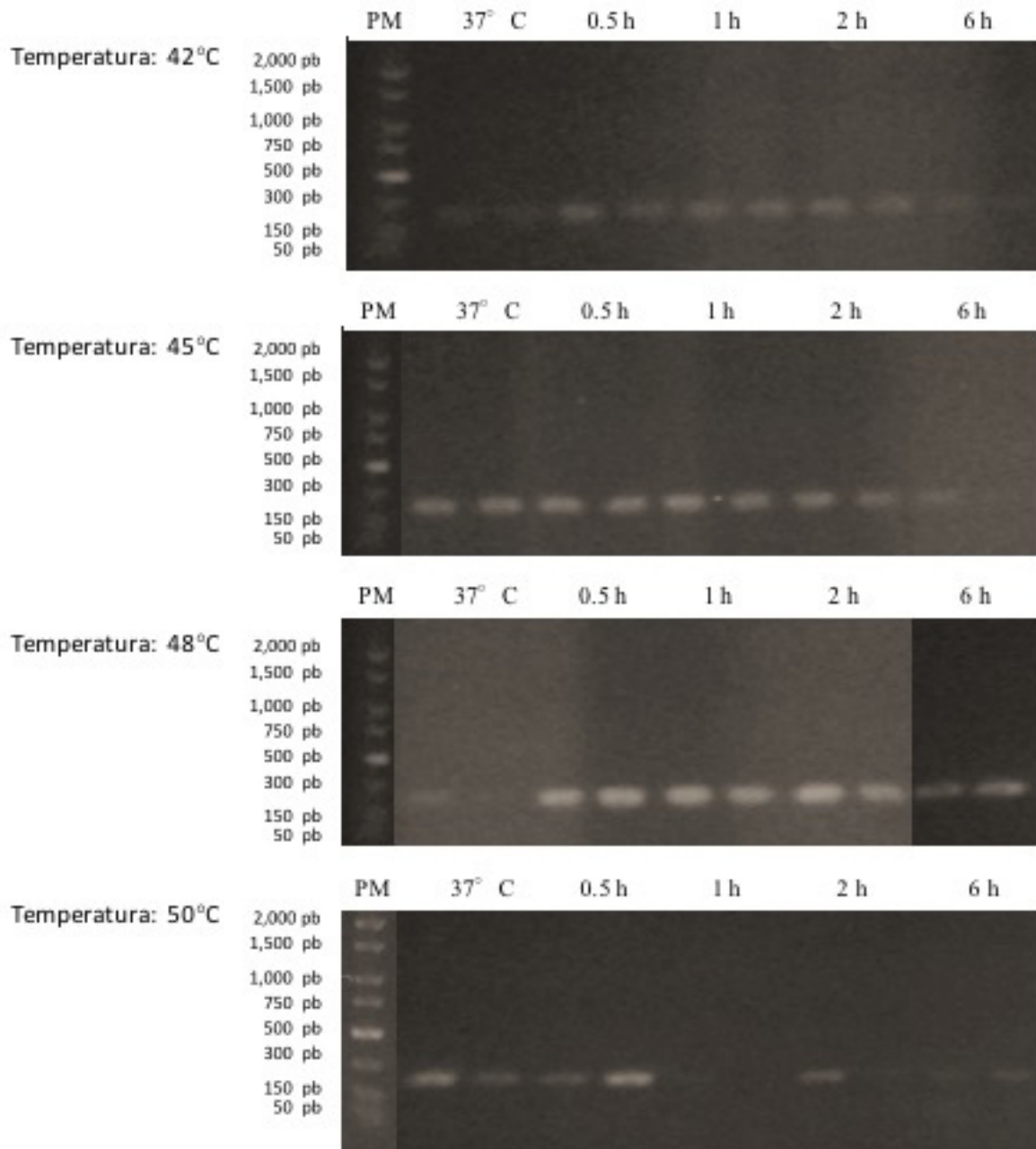


Figura 8. Amplificación del gen *whiB4* de *M. tuberculosis* H37Rv por RT-PCR. Amplicones obtenidos a partir del cDNA de cultivos de *M. tuberculosis* incubados a diferentes temperaturas por tiempos variables. Carril 1: Marcador de peso molecular, la temperatura de 37°C representa la expresión basal del gen.(carril 2 y 3), carril 4 al 11 muestran los tiempo de incubación por duplicado.

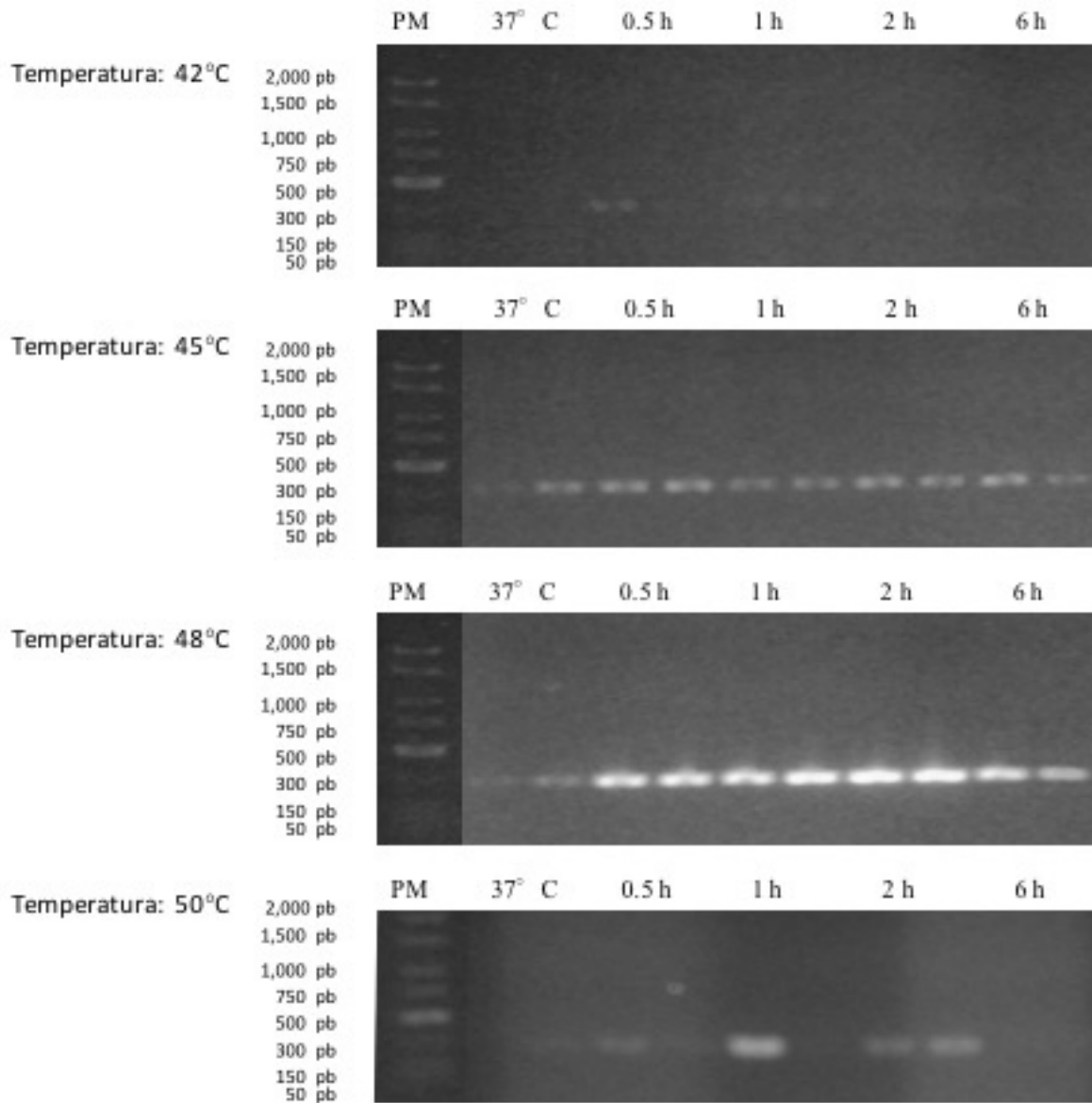


Figura 9. Amplificación del gen *whiB5* de *M. tuberculosis* H37Rv por RT-PCR. Amplicones obtenidos a partir del cDNA de cultivos de *M. tuberculosis* incubados a diferentes temperaturas por tiempos variables. Carril 1: Marcador de peso molecular, la temperatura de 37°C representa la expresión basal del gen.(carril 2 y 3), carril 4 al 11 muestran los tiempo de incubación

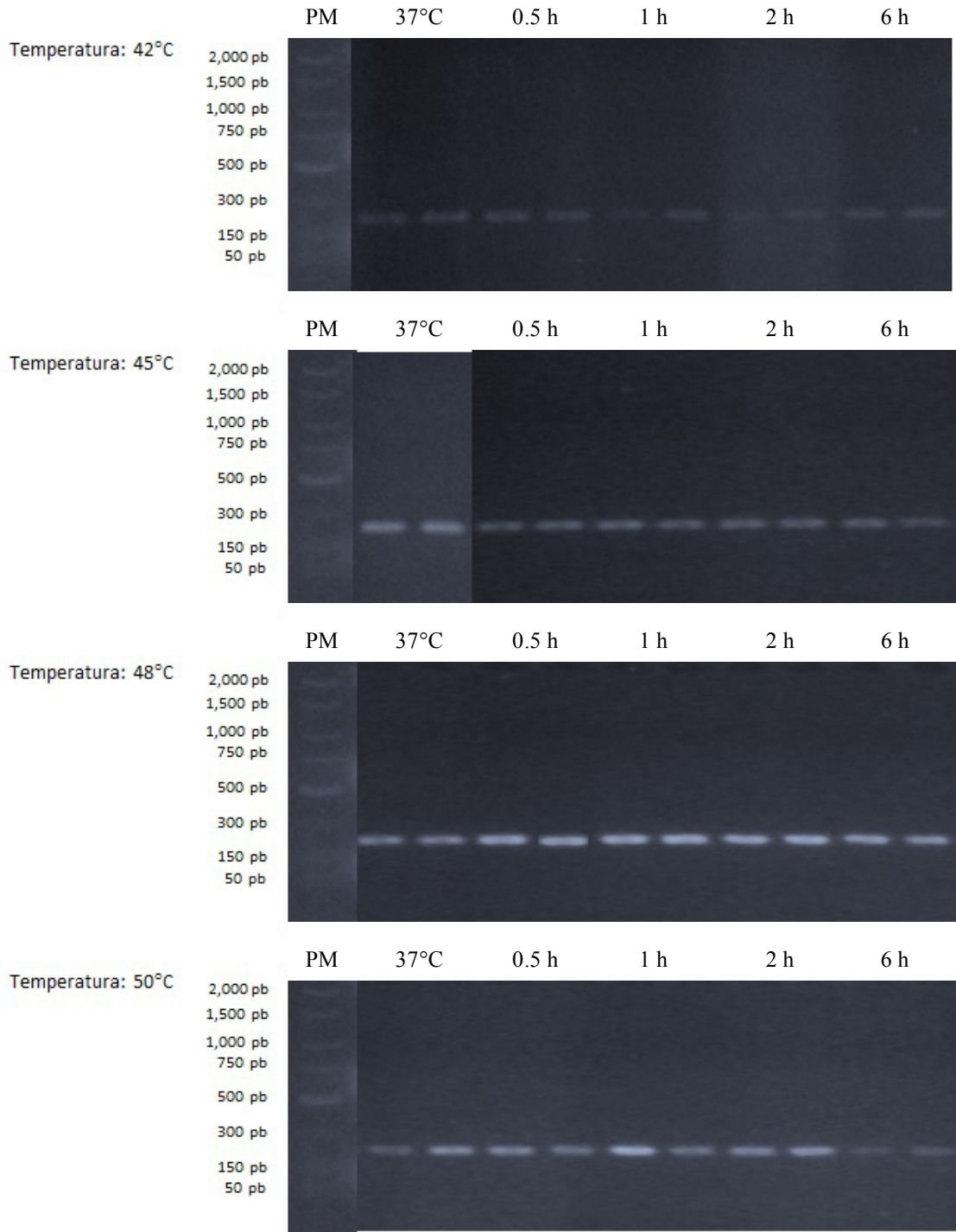


Figura 10. Amplificación del gen *whiB6* de *M. tuberculosis* H37Rv por RT-PCR. Amplicones obtenidos a partir del cDNA de cultivos de *M. tuberculosis* incubados a diferentes temperaturas por tiempos variables. Carril 1: Marcador de peso molecular, la temperatura de 37°C representa la expresión basal del gen.(carril 2 y 3), carril 4 al 11 muestran los tiempo de incubación por

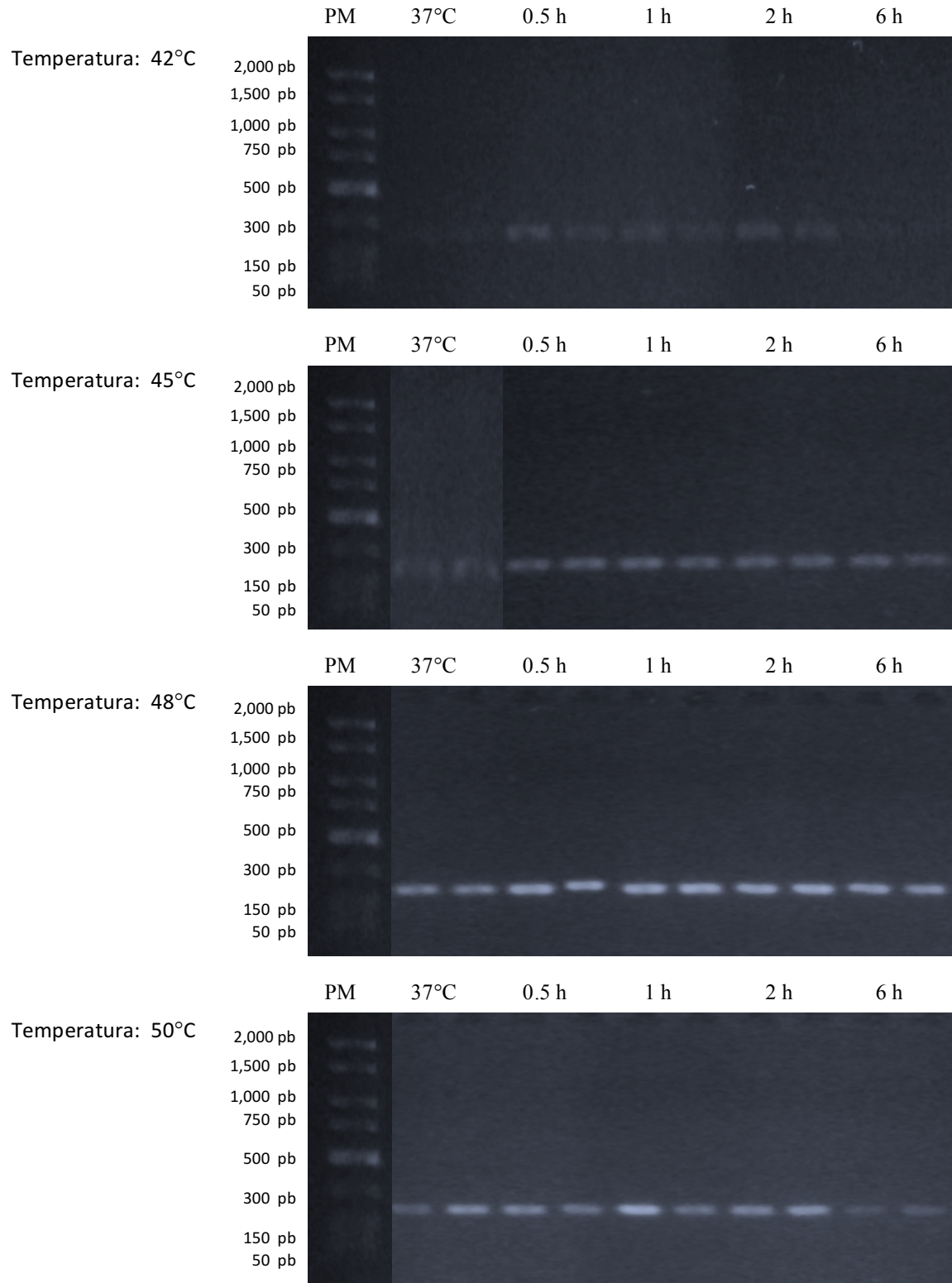


Figura 11. Amplificación del gen *whiB7* de *M. tuberculosis* H37Rv por RT-PCR. Amplicones obtenidos a partir del cDNA de cultivos de *M. tuberculosis* incubados a diferentes temperaturas por tiempos variables. Carril 1: Marcador de peso molecular, la temperatura de 37°C representa la expresión basal del gen.(carril 2 y 3), carril 4 al 11 muestran los tiempo de incubación por duplicado.

7. DISCUSIÓN

A pesar de que la Tuberculosis (TB) se encuentra presente en todas las regiones del mundo existe una mayor incidencia en países con ingresos bajos y medios (OMS, 2014). La detección y el tratamiento oportuno de la TB son factores muy importantes para el control de la enfermedad. Al presente, la baciloscopía y el cultivo son los métodos más extensamente utilizados y el último de ellos es aún considerado el estándar de oro para el diagnóstico de la tuberculosis. Para su éxito se requiere personal capacitado e instalaciones adecuadas por el riesgo biológico que representa *M. tuberculosis*. En el caso del cultivo de los bacilos, el diagnóstico puede llevar de 2 a 3 semanas y alargarse de 4 a 6 semanas si se determina fármaco resistencia.

Los métodos de diagnóstico inmunológicos y moleculares son una alternativa que permiten reducir el tiempo para la identificación de una infección tuberculosa, sin embargo la mayoría de ellos aún no están validados como métodos únicos y sirven como técnicas de apoyo en el diagnóstico.

En la actualidad existen varias pruebas comerciales para el diagnóstico de tuberculosis que se basan en la amplificación de ácidos nucleicos. Estas pruebas permiten la identificación de bacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* directamente de muestras de esputo y simultáneamente dan información sobre resistencia a antibióticos.

Entre los métodos para el diagnóstico de la TB que utilizan esta tecnología está el sistema Gene Xpert MTB/RIF, la cual es una prueba automatizada que detecta *M. tuberculosis* y resistencia a rifampicina que provee resultados en aproximadamente 2 horas y es una de las dos pruebas rápidas de amplificación de ácidos nucleicos para diagnóstico de Tb aprobada por la Organización Mundial de la Salud.

Otras pruebas comerciales que utilizan la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos son: Amplicor PCR assay (Roche Molecular Systems), Amplified MTD assay (Gen-Probe Inc.), GenoType Mycobacteria Direct assay (Hain Lifescience), strand displacement amplification (BD ProbeTec assay; Becton Dickinson) y loop-mediated isothermal amplification (LAMP; Eiken Chemical Co.) siendo esta última una de las más sencillas y rápidas debido a que se obtienen resultados en un rango de 35-65 minutos. (Parsons, 2011). Sin embargo, estas requieren de personal altamente capacitado, un elevado costo de las

pruebas e infraestructura especial para montar el equipo, siendo esto una gran desventaja para países e instituciones de bajos recursos.

M. tuberculosis, responsable de la TB, tiene la capacidad para sobrevivir dentro del hospedero por tiempo indefinido. Los reguladores transcripcionales, la expresión de ciertos genes y proteínas regulatorias permiten que la bacteria sobreviva a diversas condiciones de estrés como lo son los cambios bruscos de temperatura. Esto puede orientar el diseño de herramientas de diagnóstico molecular para la identificación de ciertos genes que puedan estar involucrados en las diversas fases de crecimiento del bacilo o en respuesta a algún tipo de estrés. Una respuesta al cambio de temperatura supone la inducción de un vía de supervivencia del bacilo que se refleja en la expresión de genes asociados a estrés, controlado a nivel transcripcional, que desencadena la traducción de proteínas chaperonas (Buchmeier et al. 1990). Los métodos moleculares aprobados en la actualidad se basan en la transcripción reversa de genes de *M. tuberculosis* sin estímulo para la detección del bacilo, indicando la presencia de la bacteria viva en las muestras. Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que al causar un estrés de las micobacterias en las muestras, estas expresarán los genes y las copias de RNA correspondientes aumentarán haciendo más fácil su detección aún por PCR en tiempo final. Poniendo al alcance pruebas moleculares para la identificación de *M. tuberculosis* en lugares con limitaciones en instalaciones y recursos. En el presente trabajo analizamos la expresión de 8 genes inducidos por choque térmico (Alvarez et al. 2009; Geiman et al. 2006; Stewart et al. 2002).

Las proteínas de choque térmico (HSP), son proteínas chaperonas inducibles bajo diversas condiciones de estrés. HSP desempeñan un papel muy relevante al asegurar el correcto plegamiento, ensamble, transporte y degradación de diversas proteínas, siendo de esta manera posible que las células toleren los daños asociados con la acumulación intracelular de polipéptidos desnaturalizados a consecuencia del choque térmico en el cual se encuentra la célula. Estas proteínas son altamente conservadas y cumplen un papel similar en casi todos los organismos (Qamra 2005; Stewart et al. 2001)

El gen *hspX* codifica para la proteína HspX, la cual tiene un papel importante en la viabilidad del bacilo durante las fases de infección inicial y latente; el gen es expresado después de que

los macrofagos fagocitan a la bacteria, siendo éste indispensable para su supervivencia (Monahan et al. 2001; Yuan et al. 1998). La habilidad que tiene un patógeno para adaptarse a las condiciones de su hospedero determina su virulencia, Dubnau y colaboradores en el 2001, demostraron el número de transcritos de RNAm de *hspX* aumenta cuando el bacilo es fagocitado por macrofagos, sin embargo su concentración disminuye con respecto al tiempo, estos resultados se asocian a los obtenidos cuando los bacilos fueron expuestos a diferentes temperaturas ya que como respuesta inicial a la exposición a estrés por choque térmico se observa una disminución en sus niveles de expresión con respecto al tiempo.

El gen *dnaK*, codifica para una proteína DnaK que es clasificada como una probable chaperona con actividad ATPasa. Existe una relación directa entre la síntesis de proteínas que se lleva a cabo bajo ciertas temperaturas y la expresión de genes relacionados al choque térmico. De acuerdo a estudios publicados por Young y colaboradores (1991) existe un patrón bien definido que indica que en el caso de las proteínas DnaK y GroES pueden ser identificadas cuando un cultivo es incubado a 37°C, sin embargo la síntesis de DnaK aumenta al doble a temperaturas de 42°, 45° y 48°, sucediendo lo contrario con la proteína GroES que disminuye cuando los cultivos alcanzan las mismas temperaturas, sin embargo, en nuestro trabajo la expresión de los genes que codifican para las proteínas antes mencionadas no mostraron ningún cambio en sus niveles de expresión, a excepción del gen *dnaK* que a 50°C muestra una disminución en la intensidad de las bandas con respecto al tiempo de exposición. La intensidad de los amplicones del gen *dnaK* como resultado de la inducción de estrés a 42, 45 y 48°C a tiempos de exposición superiores a 30 minutos, nos indican que este gen sería de utilidad como candidato para estudios posteriores en muestras aisladas de pacientes que han sido diagnosticados con tuberculosis pulmonar para el posterior desarrollo de una herramienta de diagnóstico

La familia de genes *whiB* codifican para proteínas pequeñas que se encuentran en el citoplasma y son consideradas como uno de los factores transcripcionales más importantes en *M. tuberculosis*; Geiman y colaboradores (2006) analizaron la expresión de los genes *whiB* al exponer diversos cultivos de *M. tuberculosis* a una temperatura de 42° durante 1.5 h observando un incremento en los niveles de expresión de *whiB3*, *whiB4*, *whiB5*, *whiB6* y *whiB7*, obteniendo resultados que concuerdan con los observados en el presente trabajo a

excepción de los patrones de expresión de los genes *whiB5* y *whiB6* en los cuales no se observó ninguna variación en la intensidad de las bandas a 42° pero si se observa un incremento en la expresión en temperaturas superiores. De las siete proteínas de la familia WhiB solo cuatro han sido estudiadas completamente, más allá de los perfiles de expresión y actividad de proteína disulfuro reductasa, la información sobre WhiB4, WhiB5 y WhiB6 es mínima en comparación con las otras proteínas (Casonato 2012). El incremento en la intensidad de los amplicones correspondientes al gen *whiB3* de muestras expuestas durante 30 minutos a 42°, además de los genes *whiB4* y *whiB5* de muestras incubadas a 48°C de 0.5 a 2 h, nos indica que dichos genes serían de utilidad como candidatos para el posterior desarrollo de una herramienta de diagnóstico.

El uso de métodos de diagnóstico que impliquen la amplificación de ácidos nucleicos tienen como ventaja la obtención de resultados en menor tiempo, sin embargo aún no es posible realizar un diagnóstico definitivo utilizando estos métodos debido a la evidencia de resultados falsos positivos causados por contaminación de otras muestras o falsos negativos debido a la falta de sensibilidad de las pruebas. Es por esto que es aún importante llevar a cabo a la par métodos de diagnóstico tradicionales como lo es el cultivo en medios específicos y baciloscopia seriada (Noordhoek 2004; Ozyurt 2012).

Los amplicones correspondientes a los genes *dnaK*, *whiB3*, *whiB4* y *whiB5* de muestras expuestas a las temperaturas y tiempos de incubación antes mencionados, nos permiten observar diversos patrones de amplificación de gran utilidad para estudios a futuro, sin embargo, un estudio cuantitativo sobre la expresión de los genes estudiados podría confirmar los resultados obtenidos en el presente trabajo ya que cualquier variación en la manipulación de los ácidos nucleicos puede influir directamente en la intensidad de las bandas, el uso de técnicas de amplificación como PCR-tiempo real podría ser un punto de comparación para analizar los resultados obtenidos de las muestras obtenidas por PCR punto final y posteriormente realizar un estudio con muestra de pacientes con TB.

8. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados indican que la intensidad de las bandas de los genes *dnaK* y *whiB3* incrementa a 42°C después de 30 minutos de incubación y los genes *whiB4* y *whiB5* a los 48°C. Mientras que los genes *hspX*, *groES*, *whiB6* y *whiB7* no muestran cambios evidentes en la intensidad de las bandas. Esto sugiere que los genes *dnaK*, *whiB3*, *whiB4* y *whiB5* son candidatos para ser utilizados en el diseño de una prueba de diagnóstico.

La incubación de las muestras por 30 min a 42°C es un tiempo corto que incrementaría el número de secuencias blanco para amplificación, mejorando la sensibilidad de la prueba a desarrollar. La confirmación de estos resultados por qRT-PCR apoyaría el uso de estos genes. Contar con una prueba de PCR punto final reduciría costos comparada con otros métodos moleculares que son usados actualmente para el diagnóstico de la TB y resultaría más accesible para zonas con recursos limitados.

9. BIBLIOGRAFÍA

Alvarez N, Borrero R, Reyes F, Camacho F, Mohd N, Sarmiento ME. 2009. Mecanismos de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latent. *Vaccimonitor* 18:18-25.

American Thoracic Society. 1997. Rapid diagnostic tests for tuberculosis: what is the appropriate use?. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155:1804–1814.

Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Journal of Molecular Microbiology* 43:717-731.

Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F et al. 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *The New England Journal of Medicine* 363:1005-1015.

Brodin P, Demangel C, Cole ST. 2005. Introduction to functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. In: *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR (eds). ASM Press. Washington DC. Pp 143-153.

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. 2007. *Mycobacteria*. In *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. McGraw Hill Lange. E.U.A.: pp. 320-329.

Brosch R, Gordon SV, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Soravito C, Barrell BG, Cole ST. 1998. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing and comparative genomics. *Infection and Immunity* 66:2221– 2229.

Buchmeier NA and Heffron F. 1990. Induction of Salmonella stress proteins upon infection of macrophages. *Science* 248:730-732.

Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148:2967-2973.

Casonato S, Cervantes Sánchez, A., Haruki, H., Rengifo González, M., Provvedi, R., Dainese, E., Manganelli, R. (2012). WhiB5, a Transcriptional Regulator That Contributes to *Mycobacterium tuberculosis* Virulence and Reactivation. *Infection and Immunity* 80:3132–3144.

Cheng VCC, Yew WW, Yuen KY. 2005. Molecular diagnosis in tuberculosis. *European Journal of Clinical Microbiology* 24:711-720.

Cole ST, Brosch J, Parkhill T, Garnier C, Churcher D, Harris et al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537-544.

Dasgupta N, Kapur V, Hayes IG. 2000. Characterization of two-component system, devR-devS, of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease* 80:141-159.

Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, Drobniewski F, Lalvani A. 2007. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technology Assessment* 11:1-196.

Eutzeby PJ. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47:590-592.

Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. 2009. Tuberculosis. In: *Principios de Harrison Medicina Interna*. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México: pp. 1006-1020.

Fadda G, Sanguinetti M. 1998. Polymerase Chain Reaction and other techniques used in the diagnosis of tuberculosis. *Respiratory* 23:48-54.

Geiman DE, Kaushal D, Ko C, Tyagi S, Manabe YC, Schroeder BG, Fleischmann RD, Morrison NE, Converse PJ et al. 2004. Attenuation of late-stage disease in mice infected by the *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the SigF alternate sigma factor and identification of SigF-dependent genes by microarray analysis. *Infection and Immunity* 72:1733-1745.

Geiman DE, Raghunand T, Agarwal N, Bishai W. 2006. Differential gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress conditions among seven *Mycobacterium tuberculosis* *whiB*-Like Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50:2836-2841

Gomez M, Doukhan L, Nair G, Smith I. 1998. *sigA* is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology* 29: 617–628.

Glynn JR. 1998. Resurgence of tuberculosis and the impact of HIV infection. *British Medical Bulletin* 54:579-593.

Godreuil S, Tazi L, Bañuls AL. 2007. Pulmonary tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis*: Modern molecular epidemiology and perspectives. In: *Encyclopedia of Infectious Disease: Modern Methodologies*. Tybayrenc (ed). John Wiley & Sons, Inc: New Jersey: pp. 1-22.

Heifets L, Good RC. 2004. Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In: *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Bloom BR (ed) American Society for Microbiology: Washington DC, pp. 85-112.

Hu Y, Coates ARM. 1999. Transcription of two sigma 70 homologue genes, *sigA* and *sigB*, in stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 181:469-476.

Hu Y, Mangan JA, Dhillon J, Sole KM, Mitchison DA, Butcher PD & Coates ARM. 2000. Detection of mRNA transcripts and active transcription in persistent *Mycobacterium tuberculosis* induced by exposure to rifampin or pyrazinamide. *Journal of Bacteriology* 182:6358–6365.

Kendall SL, Movahedzadeh F, Rison SCG, Wernisch L, Parish T, Duncan K, Betts JC, Stoker NG. 2004. The *Mycobacterium tuberculosis dosRS* two-component system is induced by multiple stresses. *Journal of Tuberculosis*. 84:247-255.

Kent L, McHugh TD, Billington O, Dale JW, Gillespie SH. 1995. Demonstration of homology between *IS6110* of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium spp.*? *Journal of Clinical Microbiology* 1995 33:2290-2293.

Kibbe WA. 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator'. 2007. *Nucleic Acids Res.* 35(webserver issue): May 25. [Online]. Disponible en: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PWM, Martin 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 of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *Journal of Clinical Microbiology* 37:2607-2618.

Manganelli R, Proveddi R, Dheda K. 2004. σ factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Bacteriology* 186:895-902.

Mathema B, Kreiswirth BN. 2003. Rethinking tuberculosis epidemiology: the utility of molecular methods. *American Society of Microbiology News* 60:80-85.

Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clinical Microbiology Reviews* 19:658-685.

Monahan IM, Betts J, Banerjee DK, and Butcher PD. 2001. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology* 147:459-471.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. [Online]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Noodhoek GT, Mulder S, Wallace P, van Loon AM. 2004. Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic amplification methods. *Clinical Microbiology and Infection* 10: 295-301.

Norma Oficial Mexicana. 1993. NOM-006-SSA2-1993 para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud

Organización Mundial de la Salud. 2014 Tuberculosis, nota descriptiva 104 [Online] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>

Ortiz-Marin DC, Aristizábal BH. 2013. Molecular methods in the diagnosis of tuberculosis. *Medicina Universidad Pontificia Bolivariana* 32:144-150.

Ozyurt M. 2012. Use of molecular techniques in the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *Mikrobiyoloji Bulteni* 46:319-331.

Park HD, Guinn KM, Parker S, Ewein P. 2003. Rv3133c/*dosR* is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Microbiology* 48:833-843.

Parsons, L. M., Somoskövi, Á., Gutierrez, C., Lee, E., Paramasivan, C. N., Abimiku, A., ... Nkengasong, J. 2011. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities. *Clinical Microbiology Reviews* 24:314–350.

Pfyffer GE. 2007. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection and Staining Procedures. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML and Pfaller MA (eds). American Society for Microbiology Press: Washington DC, pp. 646-572.

Philipp WJ, Poulet S, Eiglmeier K, Pascopella L, Balasubramanian V, Heym B, Bergh S, Bloom BR, Jacobs WR Jr, Cole ST. 1996. An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.93:3132–3137.

PrimerQuest® program, IDT, Coralville, USA. Retrieved 12 December, 2012. [Online]. Disponible en: <http://www.idtdna.com/Scitools>.

Primm TP, Andersen SJ, Loungly L. 2000. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *Journal of Bacteriology*.182:4889-4898.

Qamra R, Mande SC, Coates AR, Henderson B. 2005. The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 85:385-394.

San Millán RM, Martínez-Ballesteros I, Rementeria A, Garaizar J, Bikandi J. 2013. Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. *BMC Research Notes* 6:513.

Secretaria de Salud. 2017. Dirección General de Epidemiología. Anuarios de Morbilidad. México, D.F. [Online]. Disponible en:
http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html

Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews* 16:463-496.

Stewart G, Valerie Snewin, Walzl G, Hussell T, Tormay P, O'Gaora P, Goyal M, Betts J, Brown I, Young D. 2001. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase infection. *Nature Medicine* 7:732-737.

Stewart G, Wernisch L, Stabler R, Mangan J, Hinds J, Laing K, Young D, Butcher P. 2002. Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology* 148:3129-3138.

Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, and Leunissen JAM. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 *Nucleic Acids Research* 35:W71-W74, [Online]. Disponible en: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

Wayne LG. 1994. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. European Journal of Clinical Microbiology 13:908-914.

Williams DL, Pittman TL, Deshotel M, Oby-Robinson S, Smith I, Husson R. 2007. Molecular basis of the defective heat stress response in *Mycobacterium leprae*. Journal of Bacteriology 184:8818-8827.

World Health Organization. 2014. Global Tuberculosis Report 2014. Geneva: World Health Organization. [Online] Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

Young DB, Garbe TR. 1991. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity 59:3086-3093.

Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu YQ, Hickey MJ, Sherman DR y Barry CE. 1998. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 95:9578-9583.

10. RESUMEN BIOGRÁFICO

Wendy Lilian Zenteno Chávez

Candidata para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: **SELECCIÓN DE GENES ESPECIE ESPECÍFICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* EXPRESADOS EN CONDICIONES DE ESTRÉS TÉRMICO COMO CANDIDATOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS.**

Campo de Estudio: Microbiología

Datos Personales: Nacida en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas el 25 de Mayo de 1985, hija de Glorinely Chávez Muñoz y Eucario Zenteno Velasco.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2008 como Químico Bacteriólogo Parasitólogo.