

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS DEL DAÑO AL DNA DE MONOCITOS HUMANOS
INFECTADOS CON *Mycobacterium tuberculosis*
MEDIANTE LA TÉCNICA DE DBD-FISH**

POR
M.C. MIRIAM LORENA LUÉVANO MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA**

DICIEMBRE, 2017

**ANÁLISIS DEL DAÑO AL DNA DE MONOCITOS HUMANOS
INFECTADOS CON *Mycobacterium tuberculosis*
MEDIANTE LA TÉCNICA DE DBD-FISH**

Comité de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño
Presidente

Dr. Jorge Enrique Castro Garza
Secretario

Dra. Elva Irene Cortés Gutiérrez
Vocal

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Vocal

Dr. Carlos E. Hernández Luna
Vocal

**ANÁLISIS DEL DAÑO AL DNA DE MONOCITOS HUMANOS
INFECTADOS CON *Mycobacterium tuberculosis*
MEDIANTE LA TÉCNICA DE DBD-FISH**

Dirección de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño
Director

Dr. Jorge Enrique Castro Garza
Director externo

**"ANÁLISIS DEL DAÑO AL DNA DE MONOCITOS HUMANOS
INFECTADOS CON *Mycobacterium tuberculosis*
MEDIANTE LA TÉCNICA DE DBD-FISH"**

Presentado por:

M. C. Miriam Lorena Luévano Martínez

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FCB-UANL) bajo la asesoría de la Dra. Licet Villarreal Treviño, en el Laboratorio de Patogénesis Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS) bajo la asesoría del Dr. Jorge Enrique Castro Garza y en el Laboratorio de Citogenética del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS) bajo la asesoría de la Dra. Elva Irene Cortés Gutiérrez.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para lograr concluir mis estudios.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en especial al Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) y a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo otorgado para lograr realizar este proyecto.

Al Dr. Jorge Castro por su gran apoyo para por fin culminar este proyecto y por la elaboración de esta tesis; a la Dra. Elva Cortés por su tiempo y por impulsar el desarrollo de este proyecto; a la Dra. Licet Villarreal por su apoyo en todo momento; al Dr. Francisco Contreras y Dr. Carlos Hernández por apoyarnos en su momento.

A Silvia, Catalina y Sanjuana por apoyarme en mi formación profesional y por todo el tiempo y esfuerzo que invirtieron en ayudarme a realizar este trabajo.

A todos aquellos que de alguna u otra forma contribuyeron en la culminación de este proyecto, ofrezco mi más sincero agradecimiento.

DEDICATORIA

A Dios por su infinita bondad y amor.

A mis padres Leticia y Rubén, por todo su apoyo, sus consejos, sus valores y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, por haberme dado la libertad de elegir este camino, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanos Luis Ángel, Cynthia, Rubén y Laura por apoyarme incondicionalmente en aciertos y momentos difíciles. Por siempre estar al pendiente de todo mi proceso de aprendizaje.

! Gracias!!

ÍNDICE

Sección	Página
Comité de Tesis.....	I
Dirección de Tesis.....	II
LUGAR DE TRABAJO.....	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES.....	2
2.1. Evolución histórica de la tuberculosis	2
2.2. Curso natural de la enfermedad.....	3
2.3. Prevalencia e incidencia	4
2.4. Mycobacterium tuberculosis	6
2.5. Proceso infeccioso	8
2.6. Daño al DNA, apoptosis y necrosis.....	11
2.7. Aplicación de técnicas para detectar daño del DNA	12
2.7.1. Terminal Uridine Nucleotide End Labeling (TUNEL).....	12
2.7.2. DNA Breakage Detection-Fluorescent <i>in situ</i> hybridization	13
(DBD-FISH)	13
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO DEL TRABAJO.....	18
Objetivo general	18
Objetivos Particulares.....	18
MATERIALES Y METODOS	19
6.1. Línea celular	19
6.2. Transformación de células THP-1 a macrófagos	19
6.3. Separación de los macrófagos del sustrato.	20

6.3.1.	Tripsina.....	20
6.3.2.	Placas pre-tratadas con SAB (Seroalbúmina bovina)	20
6.3.3.	Placas pre-tratadas con Caseína	21
6.3.4.	Solución de Verseno.....	21
6.4.	Cepas de Mycobacterias	21
6.5.	Infección de macrófagos con micobacterias.....	22
6.6.	Preparación de laminillas.....	22
6.7.	Incorporación de las células en suspensión al Microgel.....	23
6.8.	DNA Breakage Detection (DBD).....	23
6.9.	Marcaje de Sondas (Nick Translation)	24
6.9.1.	Reacción de marcaje con Biotin-dUTP	24
6.10.	Hibridación in vitro fluorescente (FISH).....	25
6.11.	Ensayo Cometa	25
6.12.	Técnica de fragmentación de DNA (Dispersión de Cromatina).....	26
6.13.	Análisis de imagen y estadístico	27
RESULTADOS.....		28
7.1.	Obtención de Macrófagos en suspensión	28
7.2.	Infección de macrófagos en suspensión	29
7.3.	Detección del daño al DNA (DNA Damage Detection-DBD).....	31
7.3.1.	Estandarización de control positivo de daño al DNA.	31
7.4.	Hibridación Fluorescente in situ (Fluorescent in situ hybridization-FISH)	32
7.4.1.	Estandarización inicial de la técnica	32
7.5.	DBD-FISH en macrófagos infectados.....	33
7.6.	Análisis de las imágenes por software ImageJ	34
7.7.	Ensayo de Cometa	36
DISCUSIÓN		40
PERSPECTIVAS		50
REFERENCIAS		51
RESUMEN BIOGRÁFICO		63
ANEXO 1		64
ANEXO 2.....		65

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Estados con mayor incidencia de casos de tuberculosis pulmonar para el 2001 y 2012. Datos reportados por la Secretaria de Salud	6
2	Promedios de los valores obtenidos por el programa de análisis de imagen ImageJ para la Densidad Integrada de los diferentes tratamientos	35
3	Datos arrojados de grado de significancia por paquete estadístico SPSS	36

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Rangos de incidencia estimada de tuberculosis (TB), 2015.	5
2	Bacilos de <i>M. tuberculosis</i> teñidos con Zhiel-Nielssen.	7
3	Línea celular THP-1 en proceso de diferenciación.	29
4	Conteo de Macrófagos diferenciados de la línea celular THP-1 con cámara de Neubauer.	29
5	Macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv a diferentes tiempos de infección.	30
6	Macrófagos infectados con <i>M. bovis</i> BCG a diferentes tiempos de infección.	30
7	Tinción con Ioduro de Propidio de macrófagos expuestos a H ₂ O ₂ , para estandarización de DBD.	31
8	DBD-FISH realizado a macrófagos no-infectados hibridados con sonda de genoma completo.	32
9	Macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, antes y después de ser hibridados con sonda de genoma completo.	33
10	DBD-FISH realizado a Macrófagos infectados con <i>M. bovis</i> BCG e hibridados con sonda de genoma completo.	34
11	DBD-FISH realizado a Macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e hibridados con sonda de genoma completo.	34
12	Escala del daño al DNA de macrófagos transformados, detectado por fluorescencia y medido por ImageJ	35
13	Tinción con Ioduro de Propidio de macrófagos expuestos a H ₂ O ₂ , sometidos a Ensayo de Cometa.	37
14	Ensayo de Cometa realizado en macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i> , teñidos con ioduro de propidio.	38
15	Comparación del daño de núcleos sometidos a cometa y dispersión de cromatina.	38
16	Núcleos de macrófagos sometidos a DBD-FISH infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	39

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DBD-FISH	DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization
WHO	World Health Organization
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
WHO	World Health Organization
TB	Tuberculosis
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida
MDR	Multidrogo Resistentes
XDR	Extremadamente Drogo Resistentes
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
MTBC	Comlejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
LAM	Lipoarabinomanano
PAMP's	Pathogen-associated molecular patterns
PRR's	Pattern recognition receptors
TUNEL	Terminal Uridine Nucleotide End Labeling
SFB	Suero Fetal Bovino
ATCC	American Type Culture Collection
SAB	Seroalbúmina Bovina
PMA	Forbol miristato acetato
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
NaCl	Cloruro de Sodio
TBE	Tris/Borate/EDTA
HCl	Ácido Clohídrico
LiCl	Cloruro de Litio
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
nm	Nanometro
NaOH	Hidróxido de Sodio

Na₂EDTA	Etilendiamina tetraacetato Disódico
BSL3	Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3
H₂O₂	Bióxido de Hidrógeno
M	Molar
mM	Milimolar
cm²	Centímetros cuadrados
CO₂	Bióxido de Carbono
xg	Tiempos de gravedad
ml	Mililitro
μl	Microlitro
μM	Micromolar
h	Hora
mg	Miligramos
min	Minuto
V	Voltios
Kb	Kilobase

RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno que reside preferentemente en forma intracelular. Durante la infección, los macrófagos alveolares son las células que enfrentan a la bacteria inicialmente, pero *M. tuberculosis* tiene la capacidad para invadir y replicarse dentro de otras células no fagocíticas profesionales. Una vez que el bacilo entra al macrófago, se desencadenan varios procesos que conducen a la muerte celular ya sea por necrosis o apoptosis. Una de las características de la apoptosis es la fragmentación del DNA, la cual se considera generalizada e inespecífica, sin embargo hay evidencia que en una célula dañada, la mitocondria libera “patrones moleculares asociados a daño (DAMP, por sus siglas en inglés) que incluyen péptidos y DNA mitocondrial con efecto en la respuesta inmune. Sin embargo no se ha determinado si a partir del DNA cromosómico, se pueden producir DAMPs semejantes que tengan implicaciones en la señalización celular. El comprender los mecanismos implicados en el daño al DNA y sus efectos en la célula pueden llevar a un mejor entendimiento de las enfermedades y posibles tratamientos. A la fecha, los métodos utilizados para la determinación de apoptosis no pueden determinar daño específico en el DNA.

Recientemente se describió la técnica de Detección de Rompimiento de DNA asociada a la Hibridación In Situ Fluorescente (DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization DBD-FISH), la cual hace posible el examen del rompimiento general del DNA o de regiones y hasta secuencias específicas a nivel de células individuales. Esta técnica ha tenido diversas aplicaciones para estudiar estructura y daño del DNA en diversas células de mamífero.

En el presente trabajo implementamos la técnica DBD-FISH para estudiar el daño al DNA de macrófagos causado durante la infección con *M. tuberculosis* como un primer paso en la búsqueda de DAMPs.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is a pathogen that preferably resides intracellularly. During infection, alveolar macrophages are the first cells to deal with the bacteria, but *M. tuberculosis* has the ability to invade and replicate itself inside other non-professional phagocytic cells. Once the bacilli enters the macrophage, it triggers processes that may lead to cellular death, either by necrosis or apoptosis. One feature of apoptosis is DNA fragmentation, which is considered widespread and unspecific. However, there is evidence that when a cell is damaged, the mitochondria releases "Damage-Associated Molecular Patterns" (DAMP), which include formyl peptides and mitochondrial DNA with effect on the immune response. At present, it has not been established yet if similar DAMP's with implications in cell signaling can be produced from chromosomal DNA. Understanding the mechanisms implicated in damage to DNA and its effects on the cell might lead to a better understanding of the disease and its possible treatments. The most actual used methods to determine apoptosis cannot show specific damage to DNA.

Recently, a reported technique called DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH) makes possible to examine from generalized DNA ruptures to regions or even specific sequences at a single cell level. This technique has been used on several applications to study DNA structure, as well as DNA damage in different mammalian cells.

The main goal of this project is to implement DBD-FISH technique to study the macrophages DNA damage during *M. tuberculosis* infection as a first step in the pursuit of DAMPs.

INTRODUCCION

Actualmente, más de un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*, y es causante de más de la cuarta parte de las muertes evitables en la edad adulta, tomando en cuenta que se trata de una enfermedad prevenible. *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular facultativo que induce muerte celular en las células infectadas, ya sea por factores bacterianos o como una respuesta por parte de la célula para contener la infección (WHO, 2015).

Investigaciones recientes han encontrado que una célula con daño puede liberar moléculas mitocondriales como mtDNA y formil péptidos, los cuales actúan como alarmas sistémicas o como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que llevan a la activación de una respuesta inflamatoria (Zhang *et al.* 2010). El efecto de microorganismos patógenos en el daño específico al DNA apenas empieza a ser estudiado y es un área de oportunidad muy interesante para encontrar nuevos mecanismos de respuesta celular ante los patógenos.

La técnica de DBD-FISH es un procedimiento que permite detectar y cuantificar rompimientos en el DNA de células individuales, no solo en el genoma entero sino que también en diferentes áreas de secuencias de DNA específicas (Fernández *et al.* 2005).

La identificación de DAMPs posiblemente producidos durante la infección de patógenos representa un objetivo interesante para entender mejor los procesos de patogénesis y buscar blancos novedosos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En el presente trabajo, como primer paso para la búsqueda de DAMPs en procesos infecciosos, implementamos la técnica de DBD-FISH para el estudio de daño al DNA durante el proceso infeccioso con *M. tuberculosis* en macrófagos humanos provenientes de la línea de monocitos THP-1.

ANTECEDENTES

2.1. Evolución histórica de la tuberculosis

La historia de la Tuberculosis (TB) se mezcla con la historia de la humanidad debido a que se trata de una de las enfermedades infecciosas más antiguas que afectan al hombre. La TB ha sido identificada en esqueletos de 5000 años, encontrados en Europa y el Medio Oriente, como la causa de muerte, mostrando que esta enfermedad ya se trataba de un problema de salud ampliamente esparcido (Posa *et al.* 2012).

Desde los tiempos de Hipócrates (c. 460-377 AC) hasta el siglo XIX, la naturaleza infecciosa de la enfermedad no era siquiera reconocida, sino que la tuberculosis era considerada un trastorno hereditario. Sin embargo, el aire (vehículo común para la transmisión de gérmenes vivos) fue incluido entre las explicaciones del posible origen de la enfermedad. El mismo Hipócrates, en registros históricos, escribe sobre pacientes consumiéndose asociados con dolor de pecho y tos, frecuentemente con sangre en esputo (Ducati, 2006).

Durante los siglos XVI y XVII, la explosión de la población Europea y el crecimiento de grandes centros urbanos hicieron del continente el epicentro de muchas epidemias de TB. Aun durante la primera mitad del siglo 19, la incidencia de TB llegó al máximo, causando la muerte de aproximadamente un cuarto de la población Europea (Dye y Williams, 2010). En la segunda mitad del mismo siglo, la mortalidad de la TB disminuyó debido a las mejoras sanitarias y de vivienda.

Sólo hacia la segunda mitad del siglo XIX la naturaleza infecciosa de la tuberculosis se hizo evidente, como resultado de los estudios realizados por Villemin (1865) y, en particular por Robert Koch (1843-1910). Koch fue el primero en sugerir la posibilidad de controlar esta enfermedad endémica, con la presentación de los resultados de sus investigaciones en 1882 que mostraron que la tuberculosis era una enfermedad contagiosa (Sakula, 1982). Él no sólo aisló la bacteria (bautizada con su nombre como bacilo de Koch) desde el esputo de los pacientes infectados, sino también propuso que la principal medida para controlar la enfermedad en la comunidad sería aislar a los pacientes afectados. Esta sugerencia pavimentó el camino para la era del "sanatorio" de

la TB, donde se creía que la reclusión prolongada de los pacientes en sanatorios era el único medio eficaz para curar la tuberculosis y controlar su transmisión (Sakula, 1982). Esta tendencia a la baja termino a mediados de 1980, desencadenado por la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y el incremento de la carencia de vivienda y la pobreza en el mundo en desarrollo (Ridzon, 1998). Este hecho señala la importancia del papel desempeñado del sistema inmune en esta enfermedad además de la importancia de los factores socio económico. Más recientemente, se identificaron cepas multiresistentes a fármacos (MDR), definidas como micobacterias resistentes a por lo menos rifampicina e isoniacida (drogas de primera línea anti-TB) y cepas extremadamente fármaco resistentes (XDR), definidas como MDR, las cuales tienen resistencia adicional a fluoroquinolones y a por lo menos a una de las drogas de segunda línea anti-TB (Shah *et al.* 2012). Notablemente, M/XDR-TB han sido reconocidas por la Organización Mundial de la Salud (WHO) como el mayor desafío en ser abordado para lograr erradicar a la tuberculosis.

A partir del año 2000, la incidencia global de la tuberculosis ha bajado un 1.5 % anualmente, sin embargo el 87 % de los casos ocurren en 30 países. Mientras que en solo seis países acontecen el 60% de los nuevos casos: India, Indonesia, China, Nigeria, Pakistan y Sudáfrica. Por lo que los avances en el control de la TB dependerá de las medidas de prevención y tratamiento se lleven en estos países (WHO, 2016).

2.2. Curso natural de la enfermedad.

La tuberculosis es una de las enfermedades de mayor impacto de salud pública en el mundo (Zenteno Cuevas, 2003); la tuberculosis pulmonar es la forma más común de tuberculosis. Se trata de una enfermedad infectocontagiosa de naturaleza crónica, que afecta a seres humanos de todas la edades (Palma-Nicolás *et al.* 2007), causada por el complejo *M. tuberculosis*, pero principalmente por la especie *Mycobacterium tuberculosis* (Zenteno Cuevas, 2003).

La exposición a *M. tuberculosis* a menudo resulta en infección de por vida debido a la gran variedad de mecanismos de evasión desplegados por la bacteria. La fase aguda de la

infección se caracteriza por un rápido crecimiento bacteriano y el desarrollo de una respuesta inmune inicial dominada por el reconocimiento de antígenos bacterianos secretados (Andersen, 1994). Los macrófagos y los linfocitos migran al sitio de la infección, resultando en la formación de granulomas en los pulmones. En la mayoría de los casos, la infección se pone bajo control por el sistema inmune (incluso si el patógeno no se elimina). Sin embargo, la bacteria responde al ambiente hostil del hospedero y entra en una etapa (a menudo referida como de hibernación o de latencia) caracterizada por un metabolismo alterado de manera drástica y un cambio significativo en la expresión de genes (Sherman *et al.* 2001). No está claro en la actualidad si las bacterias en esta etapa están en verdad hibernando, es más probable que persisten a través de la replicación limitada pero continua, o tal vez como una serie continua de formas activas y menos activas (Garton *et al.* 2008). El resultado es un estado latente de infección sin síntomas clínicos que pueden durar muchos años o incluso décadas. La latencia es un proceso dinámico en donde el sobre crecimiento bacteriano se controla por la respuesta inmune y, por el intento de las bacterias de alterar la respuesta inmune. Este es un equilibrio delicado que puede cambiar en cualquier momento (por ejemplo, la inmunosupresión por el VIH), que conduce a la replicación bacteriana rápida y la reactivación clínica de la tuberculosis (Scanga *et al.* 1999).

2.3. Prevalencia e incidencia

Actualmente, más de un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*. De acuerdo a los últimos reportes realizados por la WHO, en 2015 ocurrieron 10.4 millones de casos nuevos con 1.8 millones de muertes. Además de estas cifras alarmantes, las personas infectadas de modo latente constituyen una reserva oculta, propiciando nuevos casos de la enfermedad (WHO, 2016).

Con un aproximado de 19,697 casos de tuberculosis en todas sus formas y cerca de 2,000 muertes por esta causa, México ocupa el cuarto lugar en América Latina después de Brasil, Perú y Haití de casos reportados de tuberculosis.

El último reporte publicado de casos de tuberculosis pulmonar, indica una tasa de incidencia nacional de 16.8 casos por cada 100,000 habitantes, lo que evidencia su contención pero relativamente poco impacto en su reducción.

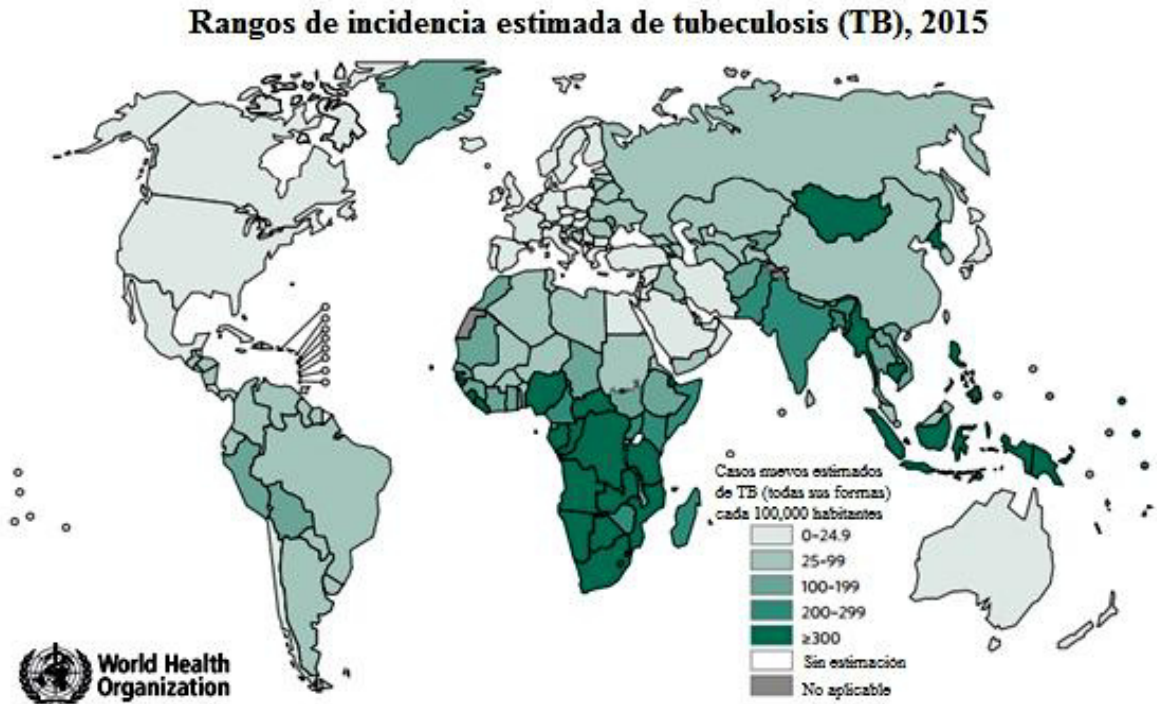


Figura 1. Fuente obtenida de Global Tuberculosis Report 2015. WHO, 2015.

La Tabla 1 muestra la persistencia de la transmisión en estados repetidores a casi una década de distancia. La localización anatómica más frecuente de la tuberculosis es la pulmonar con 80.5%, otras formas 17.8 % y meníngea con 1.5 %, el grupo de edad donde más frecuentemente se presenta la tuberculosis (todas sus formas) es de 25-44 años de edad, según el último reporte publicado por la World Health Organization con datos proporcionados por las instituciones de salud de México en el 2014.

Tabla 1. Estados con mayor incidencia de casos de tuberculosis pulmonar para el 2001 y 2012.
 Datos reportados por la Secretaria de Salud

Incidencia 2001		Incidencia 2012	
Estado	Casos por cada 100,000 habitantes	Estado	Casos por cada 100,000 habitantes
Baja California	53.98	Baja california	58.5
Tamaulipas	37.45	Guerrero	34.9
Guerrero	34.52	Tamaulipas	32.6
Chiapas	34.03	Sonora	30.1
Nuevo León	31.09	Sinaloa	30.0
		Nuevo León	25.9

2.4. *Mycobacterium tuberculosis*

Taxonómicamente, los agentes causales de la tuberculosis pertenecen al orden *Actinomycetales* y a la familia *Mycobacteriaceae*. La tuberculosis es ocasionada por un grupo de bacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis (MTBC)*, dentro de este, el agente causal más importante de la mayoría de los casos en seres humanos es *M. tuberculosis*. El complejo incluye *M. bovis* (bacilo tuberculoso bovino que en forma característica es resistente a pirazinamida, en alguna ocasión una causa importante de tuberculosis transmitida por leche no pasteurizada y que a la fecha causa un pequeño porcentaje de casos en humanos), *M. caprae* (relacionado con *M. bovis*), *M. africanum* (encontrado frecuentemente en África oriental, central y occidental), *M. microti* (el “bacilo campanol”, un microorganismo poco virulento encontrado en roedores y rara vez en humanos), *M. pinnipedii* (un bacilo que afecta focas y leones marinos en el hemisferio sur y que en fechas recientes se ha aislado de seres humanos), *M. canettii* (aislado ocasionalmente en el este africano, produce colonias lisas en medios sólidos) (Godreuil *et al.* 2007).

Mycobacterium tuberculosis, es un bacilo ligeramente curvo o recto, intracelular obligado, aerobio, inmóvil con dimensiones de 1-4 x 0.3 x 0.6 μm (Fig. 1). Su pared celular es muy rica en lípidos lo cual determina sus características propias como: hidrofobia, que es la tendencia que muestran las células a adherirse unas con otras durante su crecimiento en medios acuosos, y por ello a flotar en la superficie; resistencia a la acción de ácidos y álcalis; tiempo de generación, y resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos fijadores de complemento (Ingraham, 1998). *M. tuberculosis* obtiene su energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono (como glucosa y glicerol). El aumento de la presión de CO_2 estimula su crecimiento, y crece en medios simples con glucosa, sales de amonio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio (Lugo de la Fuente, 2005). Forma colonias no pigmentadas, rugosas de color gamuza, después de 14 a 28 días de incubación en medios de Löwenstein-Jensen o Middlebrook. Su crecimiento se propicia en una atmósfera de 5 a 10% de dióxido de carbono, pero sigue siendo lento, con un tiempo medio de generación de 12 a 24 horas. También es resistente a la desecación, insensible a los detergentes catiónicos, pero no resiste el calor ni la radiación ultravioleta (Lugo de la Fuente, 2005).



Figura 2. Bacilos de *M. tuberculosis* teñidos con Zhiel-Neelsen.

La envoltura de *M. tuberculosis* es compleja (Brennan-Nikaido, 1995). Su pared celular contiene lípidos, que constituyen el 20 % del peso seco de la bacteria, y está compuesta de cuatro capas, la más interna de mureína o peptidoglicano; que da a la bacteria forma y

rigidez. Por encima de esta capa están tres capas diferentes, compuestas de complejos péptidos, polisacáridos y lípidos que semejan filamentos arreglados en una matriz homogénea. La pared bacteriana rígida está constituida por una estructura covalente de dos polímeros unidos entre sí: peptidoglicano y arabinogalactano, contenidos aproximadamente en igual proporción. El 50% de los lípidos son ésteres de ácidos micólicos (ácidos grasos ramificados de 50-90 átomos de carbono) y un 25 % son ácidos grasos de cadena corta o media (Lugo de la Fuente, 2005).

La capa externa de la envoltura de las micobacterias sirve de protección contra múltiples factores externos, entre sus principales componentes se encuentran el ácido micólico y los glicolípidos que junto con algunas proteínas son responsables de las características antigénicas de la bacteria, por lo general estas moléculas son ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa (Briken *et al.* 2004).

Su membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias, los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como el lipoarabinomano (LAM), que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis (Briken *et al.* 2004).

2.5. Proceso infeccioso

La tuberculosis es una enfermedad aérea, debido a que los bacilos infecciosos son inhalados de la atmósfera. En el pulmón, las bacterias son fagocitadas principalmente por los macrófagos alveolares. La interacción de los componentes de la micobacteria con los receptores del macrófago, tales como los receptores tipo Toll (TLRs) resulta en la producción de quimiocinas y citocinas (Means *et al.*, 1999) las cuales sirven como señales de infección. Estas señales resultan en la migración de macrófagos y células dendríticas del torrente sanguíneo al sitio de la infección en el pulmón. Las células dendríticas engloban a la bacteria para luego madurar y migrar a los nódulos linfáticos (Bodnar *et al.* 2001). Una vez ahí, las células CD4 y CD8 son cebadas contra los antígenos del bacilo. Las células T cebadas se expanden y migran de regreso al punto de

la infección en los pulmones, probablemente en respuesta a mediadores producidos por células infectadas. Este fenómeno de migración de células hacia el foco de infección culmina en la formación del granuloma, el sello característico de la TB. El granuloma es formado por células T, macrófagos, células B, células dendríticas, células endoteliales y epiteliales, entre muchas otras en una proporción que varía con la edad del granuloma. Este granuloma previene la dispersión de los bacilos y genera un microambiente inmune el cual facilita la interacción entre las citocinas secretadas por los macrófagos y las células T. Sin embargo, el granuloma también proporciona hospedaje a *M. tuberculosis* durante un largo periodo de tiempo. Los bacilos latentes pueden ser liberados luego de un tiempo si el balance inmune se rompe, desencadenando la reactivación de la enfermedad (Ehlers y Schaible, 2013).

M. tuberculosis es una bacteria preferentemente intracelular, siendo las células fagocíticas los hospederos principales. Sin embargo, *M. tuberculosis* puede invadir células no fagocíticas profesionales. Una vez dentro de la célula se presentan dos alternativas: el bacilo es contenido por la respuesta innata, generando señales que activan la respuesta inmune y se elimina la infección o la bacteria es capaz de evadir los procesos de defensa y convierte a la célula en su hábitat, donde sobrevive y se multiplica.

Una de las características de la tuberculosis es el daño tisular. La destrucción de tejidos no está mediada por las actividades de las bacterias por sí solos, sino que es principalmente inmunopatológico en la naturaleza y el punto crucial por entender es que el balance de la respuesta inmune inflamatoria es esencial para la supervivencia tanto del hospedero como las bacterias. Así pues, parece que *M. tuberculosis* estimula y altera activamente esta respuesta. Al mismo tiempo, *M. tuberculosis* induce muerte en las células infectadas, ya sea por factores bacterianos o como una respuesta celular para contener la infección. La muerte celular inducida puede ser por necrosis o por apoptosis (Majno y Joris, 1995). La necrosis se presenta preferentemente en células infectadas con un alto número de bacilos (Majno y Joris, 1995), mientras que la apoptosis se observa en fagocitos del sistema inmune, pero en ninguno de los dos casos el tipo de muerte es exclusivo.

Se ha propuesto que la inducción de necrosis es un tipo de muerte celular que favorece la supervivencia de *M. tuberculosis* dentro del hospedero y que lo producen solo cepas virulentas de micobacterias, por lo que se sugiere como un mecanismo de virulencia (Chen *et al.*, 2006). La necrosis celular se caracteriza por la ruptura de la superficie de la membrana del hospedero, facilitando el escape de *M. tuberculosis* en el tejido circundante para un nuevo ciclo de infección y su diseminación desde los pulmones a otros tejidos. El centro de grandes granulomas inmaduros a menudo se vuelve necrótico, y esta destrucción de los tejidos es una característica esencial en la propagación de *M. tuberculosis* (Loeuillet *et al.* 2006).

En contraste, la apoptosis, que es la modalidad alternativa de la muerte celular, resulta en una mejorada defensa del hospedero al matar al *M. tuberculosis* intracelular y al aumentar la respuesta inmune adaptativa (Chen *et al.* 2008). La apoptosis captura a los patógenos dentro de la célula, lo que facilita la destrucción eficiente del patógeno (O'Sullivan *et al.* 2007), y mejora la actividad microbicida de macrófagos y células dendríticas, que engullen cuerpos apoptóticos (Gan *et al.* 2005). El papel crucial de la apoptosis en el despeje de micobacterias fue demostrado por el descubrimiento del gen IRP1 (Pan *et al.* 2005). Los ratones que carecen de este gen son extremadamente susceptibles a *M. tuberculosis* y sus macrófagos infectados experimentan la necrosis. Por el contrario, la expresión de IRP1 limita la replicación de *M. tuberculosis* y conduce a los macrófagos infectados hacia la apoptosis.

Los mecanismos antimicobacterianos desencadenados por la apoptosis son complejos y heterogéneos. En estudios iniciales, se sugirió que la integridad del material genético de los bacilos podría verse comprometida (Molloy *et al.* 1994) y el control de la acidificación y la fusión de fagosomas que contienen *Mycobacterium* se alteraron durante la apoptosis, privando al patógeno de su nicho intracelular. Diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* indican que *M. tuberculosis* virulenta (pero no micobacterias avirulentas) puede inhibir la apoptosis y que esto puede representar un mecanismo de escape mediante el cual el patógeno puede evitar la muerte de la célula hospedera por apoptosis (Loeuillet *et al.* 2006).

2.6. Daño al DNA, apoptosis y necrosis

La apoptosis es reconocida como un importante mecanismo de la muerte celular programada (Kerr *et al.* 1972). Criterios morfológicos de la apoptosis incluyen encogimiento celular, la aparición de protuberancias en la superficie de la célula, condensación de la cromatina y marginación, picnosis nuclear y la fragmentación tardía en cuerpos apoptóticos, con una notable conservación de la integridad de las membranas celulares y orgánulos. Todos estos cambios son debido a la escisión de diversos sustratos citoplásmicos y nucleares por caspasas, una familia de proteasas de cisteína que existen como zimógenos latentes y se activan a sí mismos en una forma de cascada, después de estímulos apoptóticos (Budihardjo *et al.* 1999). Un importante cambio bioquímico de la apoptosis es la fragmentación del DNA en fragmentos oligonucleosómicos múltiples de 180-200 pares de bases, que son visualizados por electroforesis en gel de agarosa como una "escalera". Varias DNAsas parecen inducir la fragmentación por apoptosis del DNA, incluyendo una DNAsa activada por caspasa (CAD) (Samejima *et al.* 1998).

El daño al DNA también se produce en la necrosis. A diferencia de la apoptosis, la necrosis no es un evento programado, se caracteriza morfológicamente por inflamación temprana, la desintegración de las membranas y orgánulos y ausencia de condensación de la cromatina (Majno y Joris, 1995), y se debe a la activación de las calpaínas en lugar de caspasas (Wang, 2000). Aunque los primeros informes indicaron que la fragmentación del DNA necrótico se produce de una manera "aleatoria", otros estudios mostraron que la fragmentación oligonucleosomal puede ser también una característica de la necrosis. En efecto, el daño en el DNA que se produce en la necrosis no es fácilmente distinguible del provocado por la apoptosis, debido a que se generan extremos de roturas de la cadena de DNA 3'-OH y 5'-OH en ambos casos, aunque con una proporción diferente (Hayashi *et al.* 1998). Por otra parte, los rompimientos de doble hebra con bases individuales 3' que sobresalen parecen ser específicos de la apoptosis, pero no para la necrosis (Didenko y Hornsby, 1996).

En sí, en cualquier tipo de muerte celular, el rompimiento del DNA parecería ser aleatorio y generalizado. Sin embargo, bajo ciertas variables y condiciones, podría no ser así. Se ha postulado que a semejanza de los llamados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), la célula puede producir Patrones Moleculares Asociados a Daño

(DAMPs) cuando se encuentra ante moléculas celulares (lípidos, carbohidratos, proteínas o DNA) que han sido alteradas por procesos internos o externos tal como el daño oxidativo. Estas moléculas “señalizadoras” de daño serían reconocidas por los Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales inducirían la respuesta necesaria, ya sea la reparación, el inicio de una respuesta inmune innata o la auto-destrucción celular (Miller *et al.* 2011). Zhang *et al.* 2010, reportaron un aumento en la liberación de DNA mitocondrial (DAMPs) al suero de pacientes con trauma severo y este DAMP activa múltiples vías inflamatorias.

El efecto de microorganismos patógenos en el daño específico al DNA apenas empieza a ser estudiado. La infección con *Helicobacter pylori* de células mesenquimales y células epiteliales de ratón y humano produce rompimiento de DNA de doble cadena y este efecto es dependiente de la adhesión de la bacteria a las células. El daño al DNA dispara una señal de daño y una consecuente respuesta de reparación (Toller *et al.* 2011). Por otro lado, la infección celular con el Avian reovirus S1133 produce daño al DNA, lo cual induce la sobreexpresión de las proteínas de respuesta a daño al DNA, las proteínas DDIT-3 y GADD45 α , las cuales a su vez muestran un aumento en su fosforilación. Así mismo hay un aumento de las especies de oxígeno reactivo y de peroxidación de lípidos, todo esto conduciendo a la apoptosis (Lin *et al.* 2011).

2.7. Aplicación de técnicas para detectar daño del DNA

2.7.1. Terminal Uridine Nucleotide End Labeling (TUNEL)

El primer protocolo de marcado terminal desarrollado para la detección de fragmentación de DNA en la apoptosis fue la técnica de TUNEL (Gavrielli *et al.* 1992). La tinción de TUNEL se basa en la capacidad de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal de incorporar dUTP marcado en extremos 3'-hidroxilo libres generados por la fragmentación de DNA genómico en DNA de doble cadena de bajo peso molecular y en DNA de una hebra de alto peso molecular (Lockshin *et al.* 1998). Mediante el uso de un nucleótido análogo etiquetado fluorescentemente, los fragmentos de DNA se vuelven detectables. La formulación de la solución de reacción con el cobalto asegura que la enzima puede añadir múltiples bases al extremo 3' de cada hebra. Todos los tipos de

extremos 3' pueden ser marcados, incluyendo los del DNA de una y de doble cadena, así como las retardadas, que sobresalen y extremos romos. La enzima parece tener una preferencia por los extremos de hebras simples y extremos 3' que sobresalen. El método se puede utilizar en suspensiones de células y monocapas, así como secciones de tejido congeladas o de parafina.

Mientras que la tinción de TUNEL ha sido casi universalmente adoptada como el método de elección para la detección de la apoptosis *in situ*, se debe reconocer que la tinción de TUNEL no detecta solo células apoptóticas. Entre dichas limitaciones, los fragmentos de DNA con extremos 3'-OH se pueden producir en un número de situaciones en las que la apoptosis no es la causa de la fragmentación de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, algunas formas de daño en el DNA producen roturas en el DNA con 3'-OHs. Por otra parte, la degradación del DNA que ocurre durante la necrosis también produce fragmentos con 3'-OH que se etiquetan mediante TUNEL. La excesiva dependencia de estas técnicas ha dado lugar a una gran controversia en los estudios en el cerebro, donde, después de algunas lesiones, tanto la apoptosis y necrosis se producen al mismo tiempo por lo que es muy difícil de establecer y cuantificar la verdadera muerte celular por apoptosis (Gilmore *et al.* 2000). Es evidente, por lo tanto, que las técnicas de marcaje basados en TdT no deben usarse como el único criterio para establecer la naturaleza del mecanismo de la muerte celular. Por ejemplo, la detección de anexina en la superficie celular mediante fluorocromos se puede utilizar simultáneamente y una vez que se ha establecido que la muerte celular es apoptótica, entonces los ensayos basados en TdT se pueden utilizar para la cuantificación rutinaria por microscopía o citometría de flujo (Darzynkiewicz, 1992).

2.7.2. DNA Breakage Detection-Fluorescent *in situ* hybridization (DBD-FISH)

DBD-FISH es un procedimiento que permite la heterogeneidad tanto intragenómica como intercelular en la inducción del rompimiento y reparación del DNA a ser estudiados (Fernández *et al.* 2005). Por lo tanto, además del DNA celular total, el

comportamiento de diferentes áreas específicas de secuencia del DNA se puede analizar de forma simultánea dentro de una célula específica.

Mientras los rompimientos en el DNA aumentan dentro de un área nuclear específica, el álcali produce más ssDNA en la región y más sondas de DNA hibridan, dando lugar a una señal de FISH más intensa y/o de gran difusión, que puede ser capturada y cuantificada con un sistema de análisis de imagen digital. La sonda de DNA específica determina el área de la cromatina a analizar. En resumen, DBD-FISH integra las técnicas de microgel habitualmente empleadas en el "halo nuclear", o pruebas de "cola de cometa", los ensayos de desenrollado alcalinas para la detección de roturas de DNA utilizados en la actualidad en los estudios radiobiológicas (Wong, 2005) y FISH (Santos *et al.* 1997).

La introducción de la hibridación fluorescente in situ (FISH) hace casi 30 años marcó el comienzo de una nueva era para el estudio de la estructura y función del cromosoma, estableciendo un enfoque molecular y citológico combinado. La principal ventaja reside en su capacidad única para proporcionar un grado intermedio de resolución entre el análisis de DNA y cromosómico, al tiempo que mantienen la información a nivel de una sola célula. FISH ganó un amplio reconocimiento como una técnica de mapeo físico para soportar el mapeo y secuenciación a gran escala relacionados a los esfuerzos relacionados con el proyecto del genoma humano. Su precisión y capacidad de adaptación son explotados en otras áreas de la investigación médica y biológica. Como resultado, una gran cantidad de diversas aplicaciones y ensayos de diagnóstico basados en FISH se han desarrollado dentro de los diferentes campos de la investigación, incluyendo la genética clínica, la neurociencia, la medicina reproductiva, la toxicología, la ecología microbiana, biología evolutiva, la genómica comparativa, la genómica celular y biología del cromosoma (Espinete *et al.* 2000; Perenthaler *et al.* 2002; Bailey *et al.* 2004; Chawlab *et al.* 2004; Schmid *et al.* 2004; Volpi and Bridger, 2008; Kwon, 2013).

En el presente trabajo implementamos la técnica de DBD-FISH en un modelo de macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. Constituye el primer reporte utilizando esta técnica para la detección de daño al DNA en células infectadas por un patógeno. Los

resultados obtenidos abren la posibilidad de explorar en detalle el proceso de daño, incluyendo sitios específicos de fragmentación y producción de secuencias señalizadoras a nivel de células individuales.

JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis constituye aún un gran problema de salud. A pesar del numeroso grupo de estudio en todos los ámbitos, desde investigación básica hasta la clínica todavía queda mucho por descubrir en el proceso infeccioso de esta enfermedad. Nuevos datos pueden ayudar a proponer estrategias para el control de la TB.

M. tuberculosis induce la muerte de las células infectadas por dos mecanismos principales: necrosis y apoptosis. En los dos casos, la presencia de una multitud de roturas de la cadena de DNA resultantes de la fragmentación del DNA nuclear es uno de los rasgos más característicos. Durante los últimos años los ensayos para la detección de roturas en el ADN en núcleos celulares han encontrado aplicación en muchos campos de la biología celular y la medicina.

La fragmentación del DNA en una célula en proceso de muerte se considera generalizada e inespecífica, sin embargo hay evidencia que en una célula dañada por trauma, la mitocondria libera “patrones moleculares asociados a daño” (DAMP, por sus siglas en inglés) que incluyen formil péptidos y DNA mitocondrial con efecto en la respuesta inmune. Sin embargo no se ha determinado si a partir del DNA cromosómico, se pueden producir DAMPs semejantes que tengan implicaciones en la señalización celular. El comprender los mecanismos implicados en el daño al DNA y sus efectos en la célula pueden llevar a un mejor entendimiento de las enfermedades y posibles tratamientos. Al presente los métodos utilizados para la determinación de muerte celular no pueden determinar daño específico en el DNA.

La técnica de Detección de Rompimiento de DNA asociada a la Hibridación In Situ Fluorescente (DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization DBD-FISH) hace posible el examen del rompimiento general del DNA o de regiones y hasta secuencias específicas a nivel de células individuales.

El propósito de este trabajo es implementar la técnica DBD-FISH para estudiar el daño al DNA de macrófagos causado durante la infección con *M. tuberculosis* desde un enfoque no estudiado hasta ahora para posteriormente establecer si existen DAMPs producidos durante la infección bacteriana posiblemente relacionados con la virulencia de diferentes cepas, y buscar mecanismos presentes en la interacción bacteria-célula no detectados a la fecha.

HIPÓTESIS

DBD-FISH permite detectar y cuantificar la fragmentación del DNA de monocitos humanos producto de la infección con *Mycobacterium tuberculosis*.

OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo general

Estudiar el daño al DNA de células monocíticas humanas provocado por *Mycobacterium tuberculosis* empleando la técnica de DBD-FISH.

Objetivos Particulares

- ✓ Implementar la técnica de DBD-FISH en un modelo de infección celular en monocitos humanos.
- ✓ Usar la técnica de DBD-FISH para analizar el daño al DNA en genoma completo de monocitos humanos provocado por *M. tuberculosis*.
- ✓ Comparar el daño al DNA provocado por micobacterias con diferente grado de virulencia.

MATERIALES Y METODOS

6.1. Línea celular

Línea celular de monocitos humanos THP-1 se obtuvo originalmente de un paciente con leucemia monocítica aguda (ATCC: TIB-202) (Tsuchiya *et al.* 1982). Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 (GIBCO, Sparks, MD) adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO) y 1 mM de piruvato de sodio (Sigma, St. Louis, MO), a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂ en frascos de cultivos de 25 cm² (Corning, Acton, MA).

La línea celular de monocitos humanos THP-1 se diferencia y adquiere características de macrófago cuando se cultiva en presencia de acetato de forbol mirístico (PMA) (Calbiochem, La Jolla, CA) (Schwende *et al.* 1996). Esta línea celular ha sido ampliamente usada para el estudio de la virulencia de diferentes microorganismos, incluyendo *M. tuberculosis*, (Dubnau *et al.* 2002; Riendeau y Kornfeld, 2003; Jordao *et al.* 2008; Lee *et al.* 2009).

6.2. Transformación de células THP-1 a macrófagos

Las células THP-1 se cultivaron en ausencia de piruvato de sodio por al menos 3 pases antes de iniciar el protocolo de transformación. Posteriormente, las células con 4 días de crecimiento se centrifugaron a 130 xg por 4 minutos a temperatura ambiente; el medio usado se eliminó y se realizó conteo celular en un hemocitómetro. La densidad celular se ajustó a 5×10^5 células/ml, en medio adicionado con 1 µl/ml de forbol miristato acetato (PMA) 10 µM diluido en dimetil sulfoxido (DMSO) (Calbiochem, Darmstadt, Alemania). Se distribuyeron 3 ml por pozo de la suspensión celular en placas de cultivo de 6 pozos (Corning, NY). Las placas se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂, evitando movimientos bruscos al manejarlas. A las 48 h de incubación, el medio se sustituye por medio fresco RPMI-1640 completo precalentado a 37 °C e incubando nuevamente por 24 h en las mismas condiciones.

Al terminar los periodos de incubación, las células transformadas en macrófagos están listas para trabajarse.

6.3. Separación de los macrófagos del sustrato.

Una condición especial para realizar la técnica DBD-FISH es que las células deben estar en suspensión. Por lo que procedimos a establecer las condiciones óptimas para suspender las células y que mantuvieran buenas condiciones fisiológicas.

Primeramente se determinó el recipiente más adecuado para lograr un crecimiento abundante de células y que permitiera su fácil cosecha para los experimentos. Para este propósito las células se cultivaron en microplacas de 6, 24 y 96 pozos y en frascos de cultivo de 25 cm², todas ellas de marca Corning (Corning, NY). Las microplacas de 6 y 24 pozos dieron los mejores rendimientos de crecimiento. Para los ensayos elegimos las microplacas de 6 pozos por la accesibilidad para manejar los cultivos y realizar los tratamientos para desprender las células.

6.3.1. Tripsina

A los macrófagos sembrados en placas de 6 pozos como se describe en el punto 6.3 se les retiró el medio de cultivo y se agregaron 5 ml de tripsina al 0.25% (marca y lugar) por 5 min a 37 °C. Se retiró la tripsina con cuidado para no retirar también las células. Se agregaron 10 ml de RPMI-1640 precalentado a 37 °C y por pipeteo suave se desprendieron del sustrato, se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml. En algunos casos se requirió raspar las microplacas con un “scraper” para desprender las células.

6.3.2. Placas pre-tratadas con SAB (Seroalbúmina bovina)

Previo a la siembra de transformación de las células en las microplacas, estas fueron tratadas con 2 ml de una solución de Seroalbúmina Bovina (SAB, 10 mg/ml), esterilizada por filtración, para bloquear los puntos de adhesión del sustrato. Se incubaron las placas a 4 °C toda la noche o a 36 °C por 2 h. Por vacío se retiró la solución de SAB y se lavaron 3 veces con PBS 1X. En esta microplaca preparada se sembraron los monocitos tratados con PMA a 37 °C con 5% de CO₂ por 4 días con un cambio de medio a las 48 h. Terminado el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo, y con ligeros golpes con la palma de la mano se desprendieron las células y se recuperaron por medio de pipeteo en un tubo cónico de 15 ml.

6.3.3. Placas pre-tratadas con Caseína

Previo a la siembra de transformación de las células en las microplacas, estas fueron tratadas con 2 ml de una solución esterilizada por filtración de caseína (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MI). Se incubaron las placas a 4°C toda la noche. Por vacío se retiró la solución de caseína y se lavaron las microplacas 3 veces con PBS 1X. En esta microplaca preparada se sembraron los monocitos tratados con PMA a 37°C con 5% de CO₂ por 4 días con un cambio de medio a las 48 h. Para determinar la eficacia del método se realizó a la par la cosecha de los macrófagos en microplaca sin tratar con caseína. Terminado el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo, y con ligeros golpes con la palma de la mano se desprendieron las células y se recuperaron por medio de pipeteo en un tubo cónico de 15 ml.

6.3.4. Solución de Verseno

Las microplacas conteniendo los macrófagos, se lavaron dos veces con 2 ml de PBS 1X precalentado, inmediatamente se adicionaron 2 mL de Verseno (Ver Anexos) y las placas se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ por 45 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se recolectaron con pipeteo suave y se transfirieron a tubos cónicos estériles de 50 mL (Corning, NY). La suspensión se centrifugó a 130 xg por 4 minutos a temperatura ambiente, se retiró el Verseno y se añadieron 5 ml de medio RPMI-1640 fresco precalentado.

Para cada uno de los procedimientos para obtener células en suspensión, la viabilidad celular se determinó por tinción con azul de tripano (Sigma, St. Louis, MO) y el conteo del número de células se realizó en cámara de Neubauer.

6.4. Cepas de Mycobacterias

Las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG se cultivaron en medio Lowenstein-Jensen durante 15 días. Las bacterias fueron disgregadas mediante agitación en vortex para luego ser cultivadas en 100 ml de caldo de cultivo Middlebrook 7H9 (BD Biosciences, Mountain View, CA) adicionado con 0.5% de Tween 80 (Difco, Detroit, MI) y 10% BBL Middlebrook OADC (Becton Dickinson, Sparks, MD), y se incubaron

con agitación por 10 días a 37 °C con 5% CO₂. Al final del tiempo, se centrifugaron a 3,000 Xg por 10 min, se resuspendieron en 100 ml de medio 7H9 fresco, se separaron en alícuotas de 1.2 ml y se conservaron a -70 °C hasta su uso. A los 15 días, se descongelaron tres tubos al azar y se determinaron las UFC en medio 7H10 (BD Biosciences, Mountain View, CA).

6.5. Infección de macrófagos con micobacterias

La concentración de los macrófagos en suspensión se ajustó a 1.1×10^6 células/ml, y se alicuotaron 900 µl en microtubos con tapa de rosca de 1.8 mL (Axygen, Union City, CA). Luego se adicionaron 100 µl de la suspensión bacteriana ajustada para un inóculo a una multiplicidad de infección (MOI) de 5:1 (bacterias:célula). La infección se llevó a cabo con *M. tuberculosis* cepa H37Rv y *M. bovis* BCG. Los cultivos infectados se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂, por diferentes tiempos (0, 2, 6, y 12 h). Como control se utilizaron células sin infectar para cada tiempo de incubación. Al finalizar cada tiempo de incubación se lavaron 2 veces con 2 ml de PBS 1X precalentado a 37 °C y se fijaron con 1 ml de formalina neutra al 10% (4% formaldehído en PBS) (Sigma, St. Louis, MO) por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las células 2 veces más con 2 ml de PBS a temperatura ambiente y se resuspendieron en un volumen final de 250 µl de PBS 1X. Las células fijadas se almacenaron a 4 °C por no más de 1 mes para ser procesadas por DBD-FISH.

Para verificar la eliminación de bacterias vivas en las muestras, se tomaron muestras a diferentes tiempos y se sembraron en medio 7H9 y se incubaron a 37 °C por 2 semanas. Las muestras recuperadas a partir de los 30 minutos no presentaron crecimiento bacteriano. Por seguridad, las muestras se trabajaron solo después de 1 h de fijación en formalina. Tiempos mayores no se recomiendan por el posible daño al DNA por la formalina (Schwebach, et al. 2001).

6.6. Preparación de laminillas

Se preparó agarosa estándar de punto de fusión normal (Promega, Madison, WI) al 0.65% en agua mQ disolviéndola por calor por 1 min en horno de microondas y conservándola a 70 °C en baño maría.

Los portaobjetos estándar para microscopio (Corning, NY) se limpiaron previamente con solución desengrasante (etanol, metanol, ácido acético 2:1:1.5) y se dejaron secar a temperatura ambiente por 5 min. Los portaobjetos limpios se sumergieron verticalmente por 2 segundos en la agarosa caliente y se retiraron, limpiando el exceso de agarosa de la parte inferior y se colocaron en una placa metálica. Se refrigeraron por 4 min a 4 °C para solidificar la agarosa. Las laminillas se incubaron toda la noche a 80 °C para lograr una capa seca de agarosa, dando como resultado un film adherido firmemente a los portaobjetos. Estas laminillas pueden ser usadas inmediatamente o ser almacenadas en una caja cerrada a temperatura ambiente por varios meses.

6.7. Incorporación de las células en suspensión al Microgel

Se prepararon alícuotas estériles de 50 µl de agarosa de bajo punto de fusión (Fisher, NH) al 1% en tubos eppendorf de 500 µl. Se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso. Previo al procedimiento, las alícuotas de agarosa se disolvieron a 80°C y luego los tubos se colocaron en baño maría a 40 °C por 30 minutos para procesar las células.

A partir de las células fijadas se transfieren 30 µl de la suspensión celular (2.5×10^{-4} células) a los tubos con la agarosa de fusión a 37 °C, y se homogeniza la suspensión suavemente con pipeteo. Se depositaron 40 µL de la mezcla células-agarosa en la superficie de una laminilla previamente recubierta con agarosa y se cubrió inmediatamente con un cubreobjetos limpio de vidrio, sin dejar burbujas de aire atrapadas. Las laminillas se enfriaron a 4 °C por 10 minutos para solidificar la agarosa.

6.8. DNA Breakage Detection (DBD)

Las laminillas preparadas en el punto anterior ya solidificadas se colocaron en posición horizontal y se retiró el cubreobjetos con cuidado para evitar la pérdida de gel y células. Todo el proceso se realizó con las laminillas en forma horizontal. Se sumergieron inmediatamente en 100 ml de solución de lisis suave (Cortés-Gutiérrez, *et al.* 2012) a temperatura ambiente por 60 min. Posteriormente se transfirieron a 100 ml de TBE 1X a temperatura ambiente por 10 min y luego se lavaron sumergiéndolas en 100 ml de solución salina isotónica (0.9% NaCl) por 2 min y se transfirieron a un baño de 100 ml de solución alcalina fuerte (Cortés-Gutiérrez, *et al.* 2012) a 4 °C por 2.5 minutos y

preparada al momento del experimento, seguido por una incubación en 100 ml de solución neutralizante (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) por 5 min. En seguida se lavó en 100 ml de TBE 1X por 2 min y se deshidrató transfiriendo el portaobjetos secuencialmente en baños de 100 ml de etanol al 70, 90 y 100 % por 2 min en cada concentración de alcohol a temperatura ambiente.

Luego del baño de etanol al 100%, la laminilla se dejó secar horizontalmente sobre papel secante a temperatura ambiente, permitiendo que la capa de agarosa se convierta en un filme muy delgado. Después de este tratamiento las laminillas se pueden procesar inmediatamente o almacenar a 4°C en obscuridad hasta por un mes.

6.9. Marcaje de Sondas (Nick Translation)

Para procesar las laminillas por FISH se requiere la preparación de las sondas de DNA marcado con biotina. El procedimiento de Nick translation incorpora un nucleótido modificado (biotina-) a intervalos de aproximadamente 20-25 posiciones en la nueva cadena de DNA sintetizado. Esta densidad de marcaje permite la óptima incorporación enzimática del nucleótido modificado. Para la hibridación *in situ*, la longitud de los fragmentos marcados, obtenidos de este procedimiento deben ser de 200-500 bases.

6.9.1. Reacción de marcaje con Biotin-dUTP

En un microtubo estéril de 1.5 ml previamente colocado en hielo, se preparó el coctel de reacción, agregando 1µg de DNA molde en 16 µL de agua biodestilada estéril y 4µl del Biotin-Nick Translation Mix 5X (glicerol al 50%; DNA Polimerasa I; DNasa I; dATP, dCTP y dGTP 0.25 mM cada uno; dTTP 0.17mM; y biotin-dUTP 0.08mM). Se mezcló por pipeteo y se incubó a 15 °C por 45 minutos. A continuación, se detuvo la reacción agregando 2 µl de EDTA (0.2M) pH 8, 2.5 µl de LiCl (4M) y 75 µl de etanol frio (-20 °C) por cada 20 µl de muestra marcada. Se mezcló y se le dio un toque de centrifugación. Se incubó a 70 °C por 30 minutos ó 2 h a -20°C para permitir que se formara el precipitado. Se centrifugó a 10,000 xg por 20 minutos a 2-8 °C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 50 µl de etanol frio (-20 °C) al 70% y se centrifugó nuevamente a 10,000 xg por 5 minutos a 2-8 °C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente de 4-5 horas con los tubos invertidos sobre papel

secante. Pasado el tiempo de secado, se agregaron 50 µl de Biotina por cada 20 µl de sonda marcada y se almacenó a -20 °C. El tamaño adecuado de las sondas (500-1000 Kb) se verificó por electroforesis en gel, usando 3µl de muestra.

6.10. Hibridación in vitro fluorescente (FISH)

La sonda de DNA de doble cadena marcada con biotina se desnaturalizó a 73 °C por 10 min en baño maría y se colocó inmediatamente en hielo para evitar el cierre de las cadenas. Se colocaron de 8-10 µl de la sonda desnaturalizada sobre las laminillas con las células incluídas y se cubrió con cubreobjetos de plástico incubando en cámara húmeda y en oscuridad a 37 °C por toda la noche. Terminado el tiempo de hibridación, las laminillas se lavaron secuencialmente en jarras coplin con soluciones de formamida al 50% en SSC por 15 min, 2XSSC por 8 min y Tween 4 por 2 min, todos a temperatura ambiente.

A partir de este paso, el proceso se llevó a cabo en la oscuridad. Se aplicaron 80 µl de un agente bloqueante al área hibridada y se cubrió con cubreobjetos de plástico incubando a 37 °C por 5 min. Se retiró el cubreobjetos para colocar 20 µl de avidina rodamina (Roche), y se cubrió nuevamente con el cubreobjetos y se incubó en cámara húmeda a 37 °C por 25 min. Se retiró el cubreobjetos de plástico y las laminillas se lavaron 3 veces por sumersión en Tween 4 por 2 minutos, sucesivamente. Para finalizar, se tiñeron con 1 gota de DAPI, y se cubrieron con cubreobjetos de vidrio evitando atrapar burbujas de aire.

Las laminillas son visualizadas bajo un microscopio epifluorescente usando objetivos de 10x, 40x y 63x con un filtro de fluorescencia rojo (Texas Red) de longitud de onda de 591 nm. La señal de *DBD-FISH* se observa con objetivos de 40x ó 63x, usando el filtro de fluorescencia azul (DAPI) con longitud de onda de 405 nm.

6.11. Ensayo Cometa

Basándonos en el principio del ensayo, donde el DNA dañado viaja más rápidamente que el DNA intacto al momento de correr la electroforesis sobre las células en la laminilla de agarosa, se puede observar la formación de la ya mencionada cola de cometa en los ensayos preliminares diseñados para los macrófagos.

A partir de las células fijadas que se obtuvieron de los experimentos de infección se preparó una suspensión de 2.5×10^5 células por ml en agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Cuarenta microlitros de esta suspensión se depositaron sobre la laminilla. La concentración celular aseguró la buena distribución de las células en la laminilla y evitó la superposición entre ellas. Esto permitió una adecuada lectura de la imagen cometa. Se colocó un cubreobjetos de vidrio por área tratada y se enfriaron a 4 °C por 10 minutos. El cubreobjetos se retiró y las laminillas se sumergieron horizontalmente en una solución de lisis suave (Cortés-Gutiérrez, *et al.* 2012) por 60 minutos a temperatura ambiente.

Después se trataron consecutivamente por sumersión en recipientes conteniendo 100 ml de: 1) TBE 1X por 10 min a temperatura ambiente, 2) NaCl 0.9 % por 2 min a temperatura ambiente y 3) solución de álcali fuerte preparada al momento (NaOH 0.03M; NaCl 1M) por 2.5 min a 4 °C.

Las laminillas se sometieron a electroforesis por 8 min a 23 V, cuidando que el nivel de solución de corrida (0.003M NaOH y 2mM Na₂EDTA, pH 12.5) estuviera de 2-3 mm por arriba de la laminilla. Terminado el tiempo de electroforesis, las laminillas se retiraron y sumergieron por 5 min en solución neutralizante (Cortés-Gutiérrez, *et al.* 2012), enseguida se lavaron en 100 ml de TBE 1X durante 2 minutos, y se finalizó con lavados sucesivos de alcohol al 70%, 90% y 100% de 2 minutos cada uno, todo a temperatura ambiente. Luego del último baño con alcohol, las laminillas se colocaron horizontalmente en una cama de papel absorbente y se dejaron secar a temperatura ambiente por 30 minutos. Las laminillas secas se tiñeron con 10 µl de yoduro de propidio por 15 minutos y se examinaron en microscopio de fluorescencia con los filtros Texas Red (591 nm), con DAPI (405 nm) como contraste, utilizando el objetivo de 63X.

6.12. Técnica de fragmentación de DNA (Dispersión de Cromatina)

Después de incluir a los macrófagos en una laminilla con agarosa, como ya se especificó con anterioridad, las laminillas se trataron con una solución de lisis en posición horizontal por 60 minutos, para desnaturalizar al DNA y remover proteínas nucleares. Pasado ese tiempo se procedió a realizar 2 lavados con agua destilada, seguidos de tratamientos con alcohol de 70%, 90% y 100% por 2 minutos cada uno. Esta técnica requiere el empleo de un kit de trabajo en trámite de patente. Las laminillas secas se

tiñeron con 10 µl de yoduro de propidio por 15 minutos y se examinaron en microscopio de fluorescencia con los filtros Texas Red (591 nm), con DAPI (405 nm) como contraste, utilizando el objetivo de 63X.

6.13. Análisis de imagen y estadístico

Las imágenes de microscopía se obtuvieron en un microscopio de fluorescencia equipado con filtros de banda baja para la visualización de la fluorescencia roja (591 nm) y una cámara AxiCam MRm. El análisis de las imágenes se llevó a cabo mediante el programa ImageJ, comparando la intensidad de la señal de fluorescencia obtenida en 25-30 imágenes de células individuales por tratamiento. Se realizó el análisis estadístico factorial con datos aleatorios Anova para datos repetitivos con una $p \leq 0.05$

RESULTADOS

7.1. Obtención de Macrófagos en suspensión

Los macrófagos derivados de la línea celular de monocitos humanos THP-1 han sido utilizados ampliamente en estudios de infección con micobacterias. Estas células presentan características típicas de macrófagos al ser activadas con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA). La línea de monocitos crecen en suspensión y cuando se transforman a macrófagos se adhieren al sustrato y su morfología cambia de redondeada a alargada y aplanada. Sin embargo para los procedimientos experimentales se requieren células transformadas a macrófagos y presentes en suspensión.

Probamos cuatro métodos para obtener los macrófagos en suspensión; cuando se recubrieron las microplacas con SAB o caseína para bloquear los puntos de adhesión del sustrato, no se obtuvo buen resultado, ya que los macrófagos se adhirieron fuertemente a pesar del recubrimiento proteico. El uso de tripsina no proporcionó buen rendimiento de recuperación, el tiempo de incubación no fue suficiente para desprender los macrófagos. Probamos aún tiempos hasta de media hora sin éxito. Además de que el tratamiento con tripsina puede “rasurar” la membrana celular, eliminando proteínas que pueden ser relevantes para la interacción con las micobacterias. La solución de Verseno al 0.1% fue la mejor opción al producir un buen desprendimiento celular del sustrato con mínimo daño a las células. Se determinó el número de células desprendidas y su viabilidad por conteo en cámara Neubauer y tinción con azul de tripano. Se logró un porcentaje de recuperación del 90 – 95 % y con una viabilidad promedio del 95 %. En la Figura 3 se observan monocitos sin transformar, monocitos transformados a macrófagos y monocitos transformados y desprendidos del sustrato. En la Figura 4 se muestran macrófagos en cámara de Neubauer para su conteo y determinación de viabilidad.

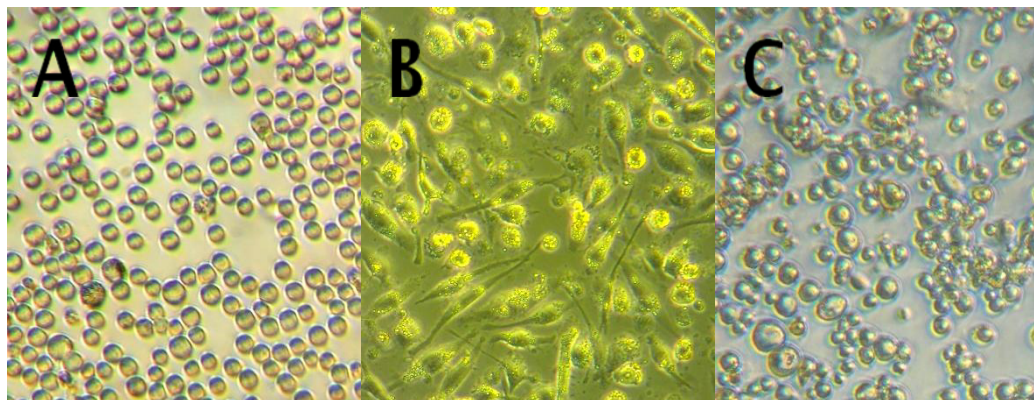


Figura 3. Línea celular THP-1 en proceso de diferenciación. A) Células THP-1 no diferenciadas. B) Células transformadas a macrófagos con PMA. C) Macrófagos desprendidos luego de ser tratados con Verseno.

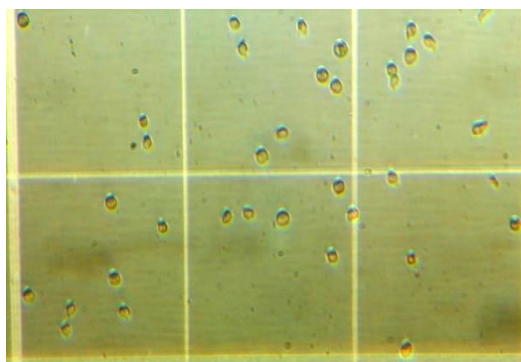


Figura 4. Cuento de Macrófagos diferenciados de la línea celular THP-1 con cámara de Neubauer. Después de ser desprendidos y teñidos con azul tripano, no se observan células muertas (azules).

7.2. Infección de macrófagos en suspensión

Todo los procedimientos involucrando el manejo de micobacterias vivas se realizó en un laboratorio de Bioseguridad nivel 3 (BSL3), con todas las prácticas adecuadas para su manejo.

El análisis visual de los cultivos infectados antes de fijarlos mostró cambios estructurales desde las primeras 2 h de infección, mostrando vacuolización y disrupción de la membrana plasmática con formación de protuberancias. Para las 12 h de infección se puede observar un daño avanzado que se manifiesta como desintegración celular al perder la integridad de la membrana celular y formación inequívoca de cuerpos apoptóticos.

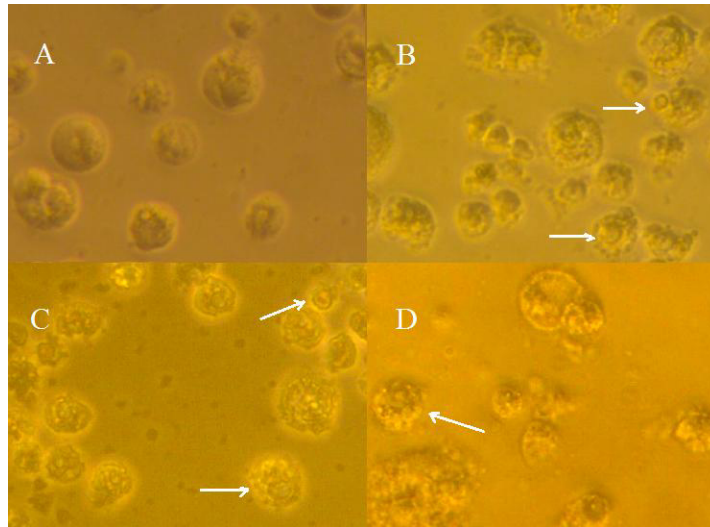


Figura 5. Macrófagos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv a diferentes tiempos de infección. 2 h (B), 6 h (C) y 12 h (D), en A se muestra macrófagos sin infectar. Las flechas indican la formación de cuerpos apoptóticos o vacuolas en células infectadas. Microscopía de contraste de fases con una amplificación total de 20X.

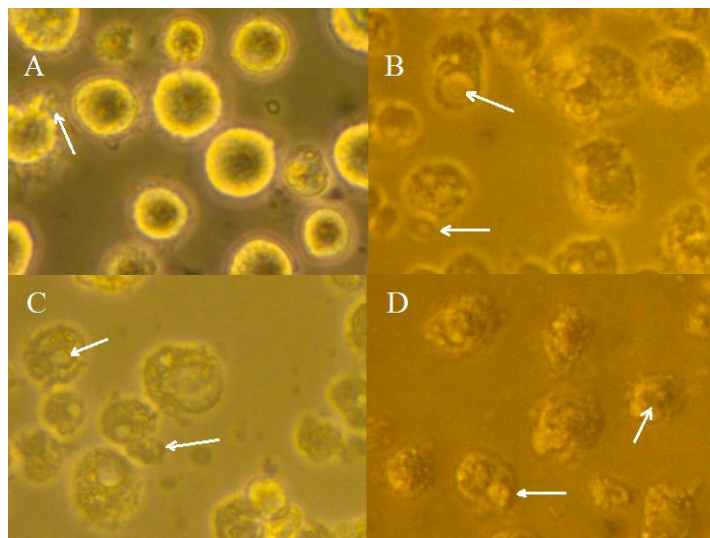


Figura 6. Macrófagos infectados con *M. bovis* BCG a diferentes tiempos de infección. 2 h (B), 6 h (C) y 12 h (D), en A se muestra macrófagos sin infectar. Las flechas indican la formación de cuerpos apoptóticos o vacuolas en células infectadas. Microscopía de contraste de fases con una amplificación total de 20X.

Las células infectadas con *M. bovis* BCG presentaron cambios morfológicos más marcados que aquellas infectadas con *M. tuberculosis*, los macrófagos mostraron además de la formación de protuberancias, hinchamiento y en algunos casos liberación del contenido citoplasmático.

7.3. Detección del daño al DNA (DNA Damage Detection-DBD)

7.3.1. Estandarización de control positivo de daño al DNA.

Una parte fundamental de esta metodología es contar con una buena señal base dada por daño al DNA en cultivos control. Para la optimización, los macrófagos fueron tratados con concentraciones variables (como se describe en métodos) de H_2O_2 por 15 minutos. En la Figura 7 se muestran macrófagos teñidos con ioduro de propidio después de la exposición a H_2O_2 para la detección de los rompimientos del DNA generados por el tratamiento.

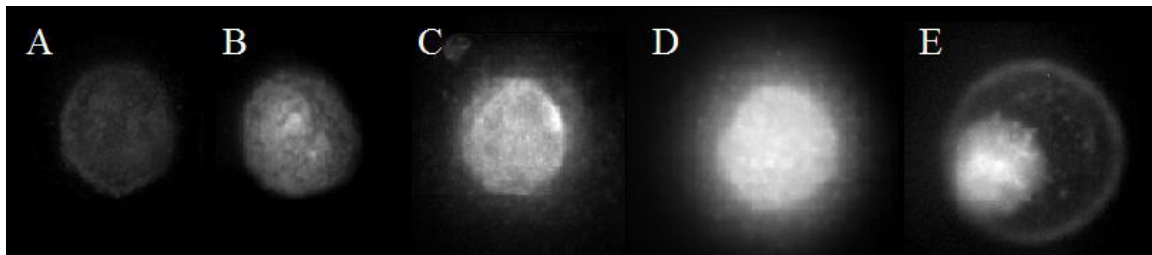


Figura 7. Tinción con Ioduro de Propidio de macrófagos expuestos a H_2O_2 para estandarización de DBD. A) Células control sin tratamiento; B) Células tratadas con H_2O_2 al 0.3%; C) Células tratadas con H_2O_2 al 1%; D) Células tratadas con H_2O_2 al 1.3%; E) Células tratadas con H_2O_2 al 1.5%. Imágenes de microscopía de fluorescencia con amplificación de 63 X.

La exposición a concentraciones menores al 1% no produjo lesiones aparentes como se observa en Figura 7B. A partir del tratamiento con 1 % de H_2O_2 (Figura 7C), se produjo liberación de cromatina lo que se muestra por la formación del halo característico en las Figuras 7C a 7D.

La concentración más alta de H_2O_2 produjo el mayor daño, como se observa en la Figura 7E por la condensación y encogimiento general de la cromatina.

Para los propósitos del estudio, la concentración del 1.5 % de H_2O_2 produjo un daño excesivo, mientras que la concentración del 1.3 % de H_2O_2 fue la más adecuada para producir el daño necesario para ser usado como control positivo de daño al DNA. Además la formación del halo de cromatina permitiría la incorporación de la sonda de DNA marcada en forma óptima.

7.4. Hibridación Fluorescente in situ (Fluorescent in situ hybridization-FISH)

7.4.1. Estandarización inicial de la técnica

En los ensayos de infección de macrófagos con micobacterias, se observaron lesiones celulares que morfológicamente corresponden tanto a apoptosis y necrosis (Figuras 5-6). A este nivel de análisis no se diferencia cuál de los dos mecanismos de daño es el principal.

La técnica de FISH, en la cual se utilizan marcadores fluorescentes, permitió marcar el DNA dañado y con ello la detección del efecto de la infección por micobacterias en el DNA de células infectadas.

En la Figura 8 se muestran macrófagos sometidos a estrés oxidativo con H_2O_2 e hibridados con una sonda de DNA de genoma completo marcada (Biotina) la cual fue generada por Nick Translation en presencia de dUTP biotinizados. Para una mejor observación al microscopio de fluorescencia, las preparaciones se contrastaron con DAPI. El control negativo de estrés (8-A), muestra poca señal de fluorescencia y esta señal se definió como el daño basal inespecífico. Mientras que la señal de hibridación del control positivo (8-B) (células expuestas a H_2O_2 al 1.3 %), mostraron señales intensas y abundantes marcando el daño provocado al DNA por su exposición al tratamiento. Los valores de Densidad Integrada (DI), mostraron una marcada diferencia con valores más altos de $DI=23.4 \times 10^4$ (Figura 8-A), que aquellos observados con los controles negativos de macrófagos no infectados con $DI=10.3 \times 10^4$ (Figura 8-B).

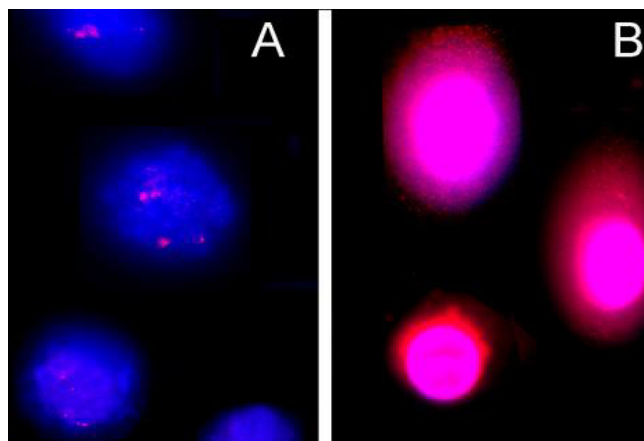


Figura 8. DBD-FISH realizado a macrófagos no-infectados hibridados con sonda de genoma completo. A) Célula sin exposición a H_2O_2 usada como control negativo. B) Célula tratada con H_2O_2 al 1.3 % como control positivo.

En la Figura 8 se puede apreciar a los macrófagos transformados hibridados con una sonda de DNA de genoma completo marcada, la cual fue generada por Nick Translation en presencia de dUTP biotinizados. Para la detección del DNA dañado, las laminillas de agarosa con los macrófagos embebidos fueron contrastados con DAPI, obteniendo imágenes como la mostrada arriba. El daño se refleja al observar al microscopio de fluorescencia con los filtros apropiados.

7.5. DBD-FISH en macrófagos infectados

Luego de haber definido las condiciones óptimas de hibridación, se estableció el protocolo para la hibridación de los macrófagos infectados (ver metodología).

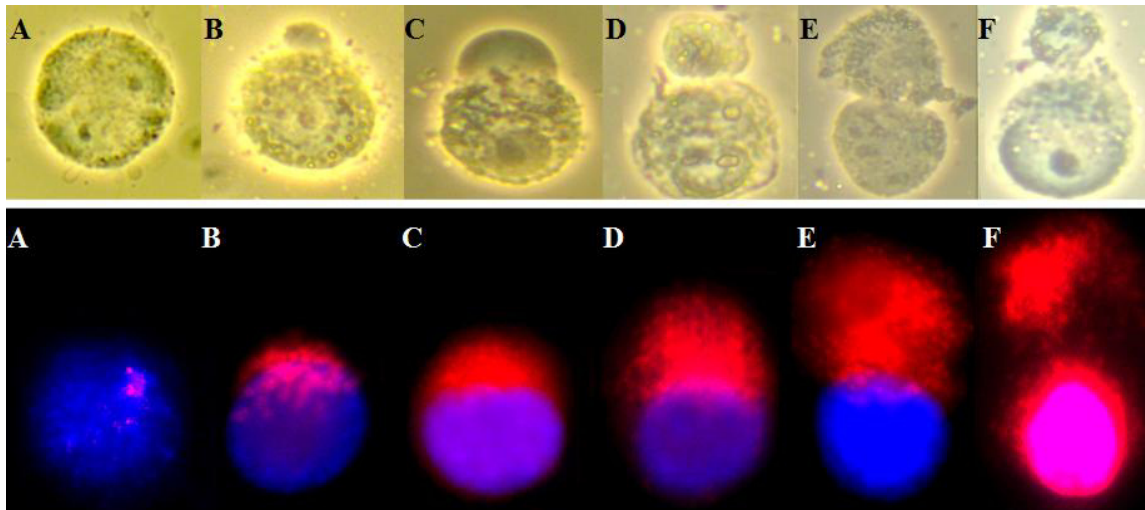


Figura 9. Macrófagos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, antes y después de ser hibridados con sonda de genoma completo. Arriba: Macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (B-F) y sin infección (A) antes de ser sometidos al DBD-FISH. Abajo: Macrófagos infectados con *M. tuberculosis* y sometidos a DBD-FISH.

En pruebas iniciales, se trabajaron tiempos prolongados de infección con *M. tuberculosis*, esto para determinar el marco de tiempo apropiado para trabajar la técnica de hibridación. A la par se realizó una comparación con macrófagos infectados, los cuales aún se encontraban en suspensión y sin ser sometidos a DBD-FISH. Como se puede observar en la Figura 9, se muestra un comportamiento repetitivo en ambos casos, donde no solo aumenta el daño causado con el tiempo, pero además ese mismo daño está enfocado a un solo extremo, mostrando un tipo de daño localizado. Por estos resultados los tiempos se definieron de 2 a 12 h.

Siguiendo el protocolo para la técnica, los macrófagos fueron infectados con *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Rv. Realizando el seguimiento de la infección a partir de las 2 h se obtuvo señal de hibridación, lo que nos indica el daño causado por *Mycobacterium* desde las etapas más tempranas del proceso de infección, información que se confirma si se analizan a la par las Figuras 5-6.

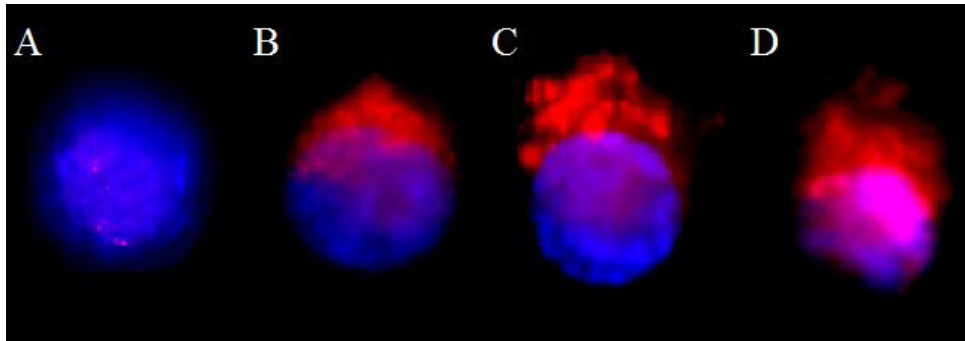


Figura 10. DBD-FISH realizado a Macrófagos infectados con *M. bovis* BCG e hibridados con sonda de genoma completo. A) Control negativo; B) A 2 h de infección; C) A 6 h de infección; D) A 12 h de infección.

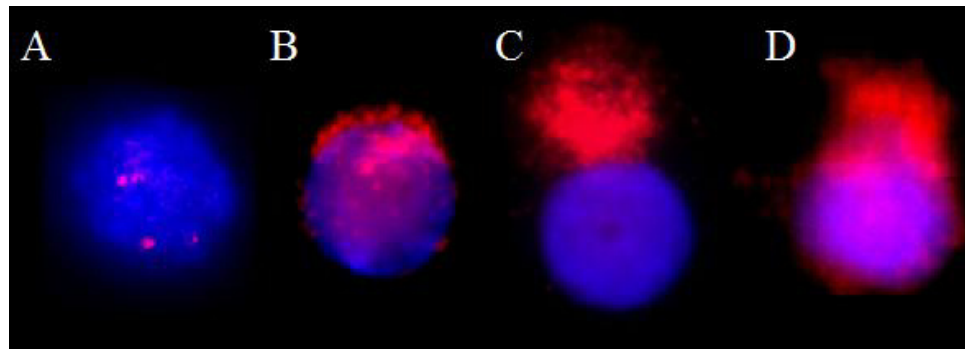


Figura 11. DBD-FISH realizado a Macrófagos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv e hibridados con sonda de genoma completo. A) A 2 h de infección; B) A 6 h de infección; C) A 12 h de infección.

Las Figuras 10 y 11, muestran el avance en el daño causado sobre el DNA del hospedero, dando una señal definida de hibridación.

7.6. Análisis de las imágenes por software ImageJ

Todas las imágenes obtenidas de los ensayos se analizaron con el programa ImageJ, el cual examina y convierte una señal luminosa en datos numéricos que se presentan como valores de densidad integrada. Al finalizar el procesamiento de las imágenes, lo que se

obtiene son mediciones cuantitativas, donde el software determina mediciones como: áreas, perímetros, longitudes, intensidad media de píxeles, etc. En el caso particular de la densidad integrada, es el resultado de la suma de los valores de los píxeles seleccionados en la imagen o equivale al producto del valor del área multiplicado por la media. Los datos obtenidos con este análisis se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Promedios de los valores obtenidos por el programa de análisis de imagen ImageJ para la Densidad Integrada de los diferentes tratamientos.

Densidad Integrada (píxeles)			
Cepa	Tiempo de Infección (horas)		
	2	6	12
BCG	10.06×10^5	11.05×10^5	12.8×10^5
H37Rv	13.76×10^5	17.07×10^5	19.58×10^5

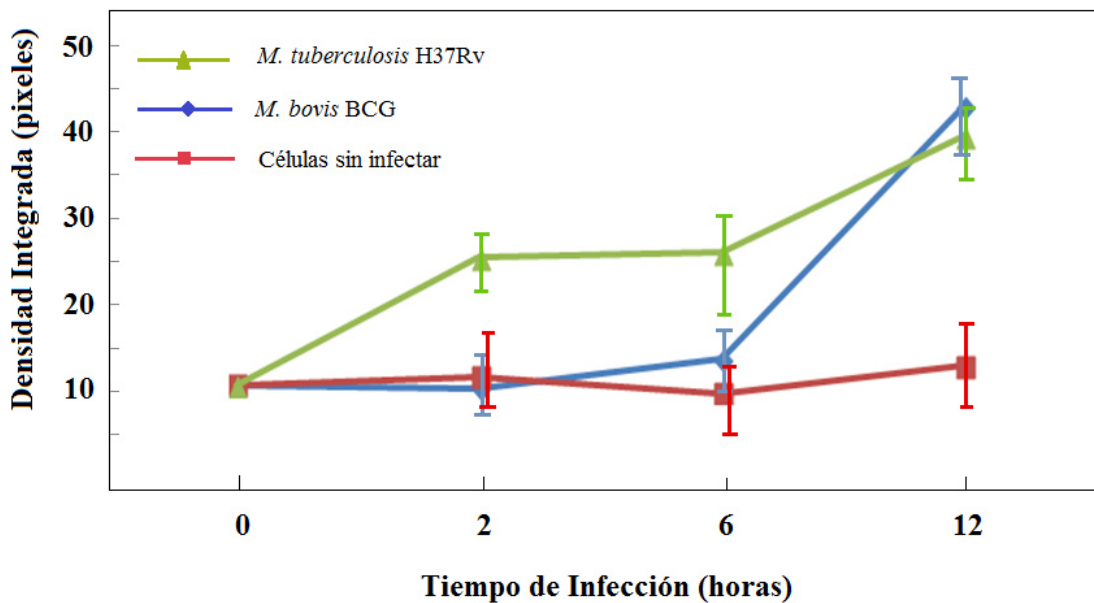


Figura 12. Escala del daño al DNA de macrófagos transformados, detectado por fluorescencia y medido por ImageJ.

La Figura 12 representa el comportamiento ya mencionado en la Tabla 2, de una manera más visual, dando una mejor idea de la afectación realizada sobre las diferentes muestras de macrófagos.

El daño producido al DNA por la infección micobacteriana muestra una relación directa con el tiempo de incubación. Así mismo, la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, considerada una cepa virulenta produce un daño mayor que *M. bovis* BCG, considerada una cepa no virulenta. El análisis estadístico de ANOVA para casos repetitivos no mostró diferencias significativas entre los diferentes tiempos de infección, para ambas cepas examinadas. El mismo comportamiento se observa al comparar los resultados del daño causado por ambas cepas al no mostrar diferencia significativa en ninguno de los tiempos de infección analizados.

Tabla 3. Datos arrojados de grado de significancia por paquete estadístico SPSS.

Cepa	R ² (%)	Significancia
BCG	0.08	0.22
H37Rv	0.04	0.25

Estos resultados prueban que, aún cuando el daño generado sobre los macrófagos se da de manera ascendente conforme aumenta el tiempo, esto no representa un daño lo suficientemente grave para ser significativo.

7.7. Ensayo de Cometa

En los macrófagos sin infectar, pero sometido a estrés oxidativo (H₂O₂) se estandarizó el protocolo para la detección de cometas. Se obtuvo un cometa bien definido, la cabeza del cometa está compuesta por DNA genómico intacto, mientras que la cola está compuesta por DNA dañado o fragmentado, donde la intensidad de la fluorescencia y la longitud de la cola son directamente proporcionales al grado de daño causado al DNA (Figura 13).

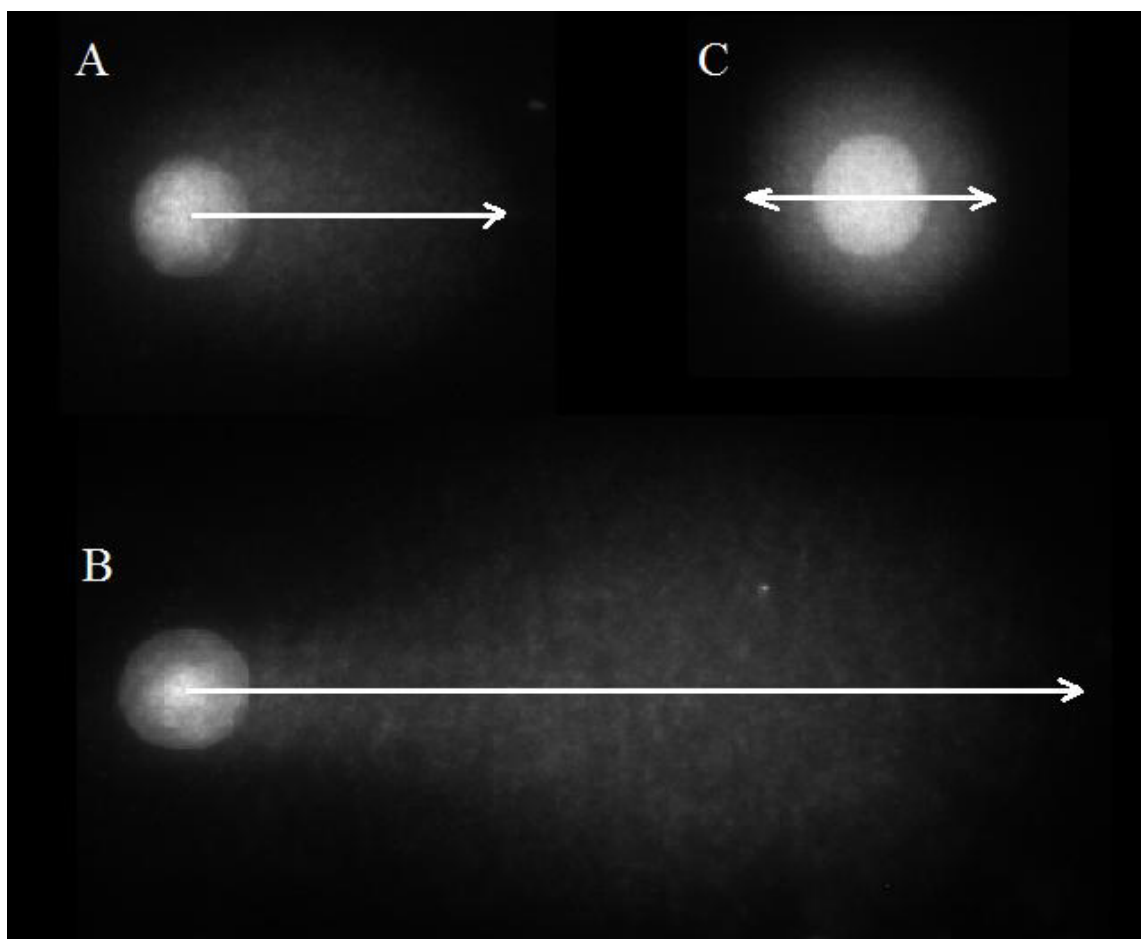


Figura 13. Digitalización de tres células ilustrando variabilidad en el contenido y migración del DNA. Tinción con Ioduro de Propidio de macrófagos expuestos a H_2O_2 , sometidos a Ensayo de Cometa. A) Inducción de daño al DNA de macrófagos sin infectar, B) Formación de Cometas provocado daño con 1.3% de H_2O_2 . C) Control Negativo.

El ensayo cometa es uno de los métodos establecidos para detectar diferentes tipos de daño sufrido por el DNA, por lo que realizamos este protocolo para comprobar los resultados obtenidos por DBD-FISH. Las imágenes obtenidas del ensayo cometa de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* no correspondieron a las esperadas, lo que no permitió su análisis. Se puede observar un daño al DNA por la formación de un halo, sin embargo la cromatina de las células infectadas no migró al someterlas al campo eléctrico, sino que se concentró hacia un costado del núcleo como se muestra en la Figura 14.

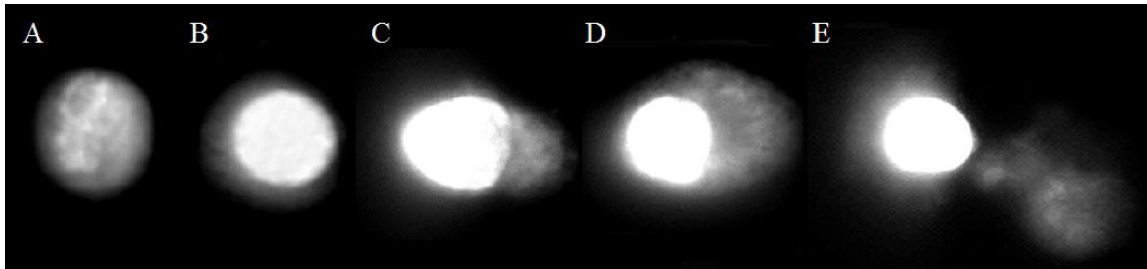


Figura 14. Ensayo de Cometa realizado en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*, teñidos con yoduro de propidio. A) Control negativo; B) 0 h de infección; C) 2 h de infección; D) 6 h de infección; E) 12 h de infección.

La técnica de dispersión de cromatina es otra técnica que permite visualizar daño al DNA. Al comparar las imágenes de dispersión de cromatina con las de ensayo cometa, se observan patrones semejantes; la cromatina se concentra a un extremo del núcleo, (Figura 15). Este resultado nos indica que no es un artefacto de la técnica sino un proceso que ocurre en las células infectadas con *M. tuberculosis*.

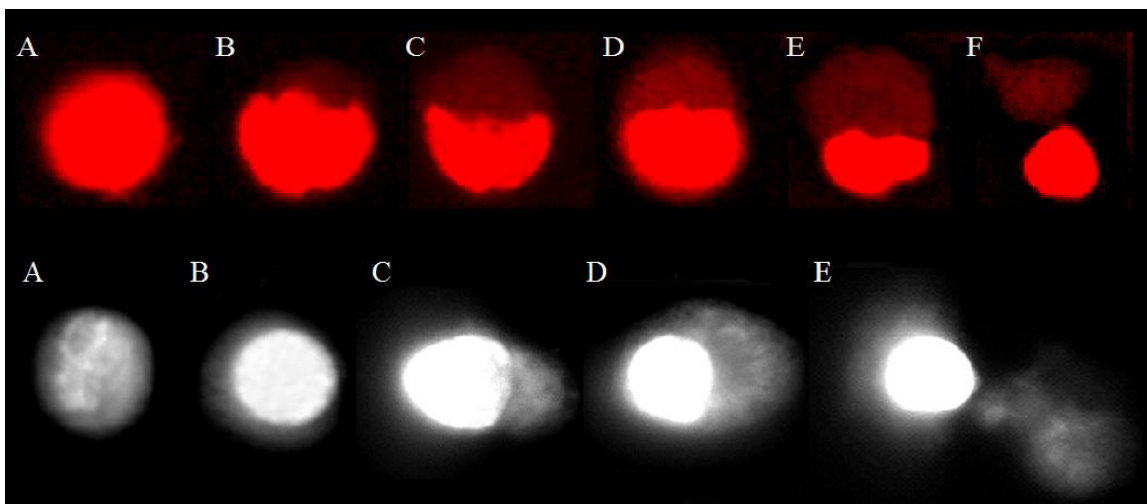


Figura 15. Comparación del daño de núcleos sometidos a cometa y dispersión de cromatina. Arriba: núcleos de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* con tiempos de infección de 0, 2, 6, 12 y 24 h (B-F) y control negativo (A) sometidos a Dispersión de Cromatina. Abajo: núcleos de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* y sometidos a ensayo Cometa con tiempos de infección de 0, 2, 6 y 12 h (B-E) y control negativo (A).

Considerando esto, superpusimos las imágenes de los núcleos de células infectadas en microscopía de luz y las obtenidas por DBD-FISH. Observamos que la concentración de la cromatina hacia un extremo coincide en ubicación con las burbujas formadas en la membrana nuclear corroborando que es un fenómeno particular del proceso infeccioso con micobacterias.

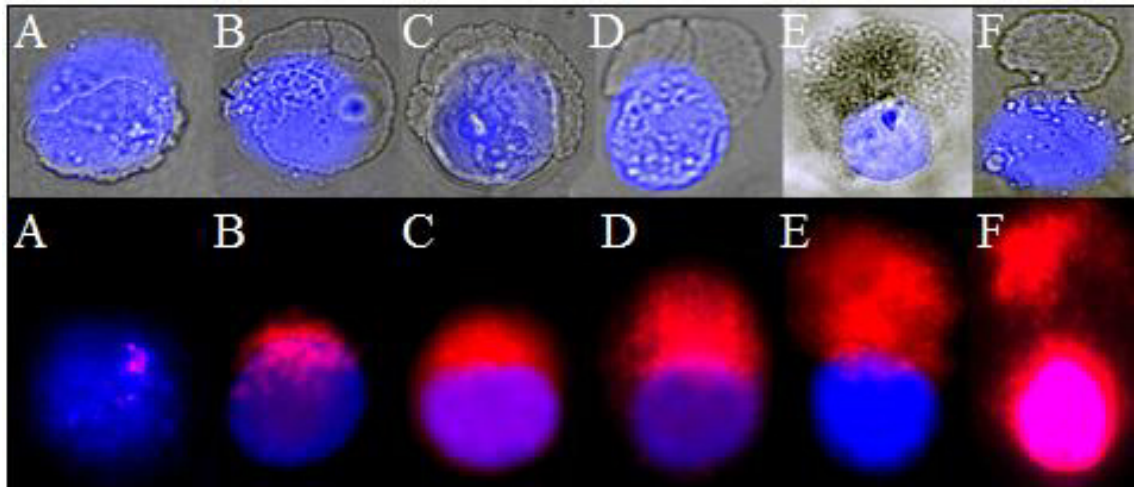


Figura 16. Núcleos de macrófagos sometidos a DBD-FISH infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. Con tiempos de 0, 2, 6, 12 y 24 h respectivamente (B-F); Control negativo (A). Arriba: núcleos observados bajo luz blanca. Abajo: núcleos observados con fluorescencia.

DISCUSIÓN

M. tuberculosis es un patógeno intracelular facultativo que modula la señalización celular para evadir la respuesta inmune, permitiéndole sobrevivir y multiplicarse dentro de la célula, alejado de los efectores de la inmunidad. Dependiendo del tipo celular que esté infectando y bajo ciertas condiciones las células infectadas entran en un proceso de muerte. Esto puede deberse a mecanismos de defensa innata de la célula para detener la multiplicación, exponiendo a las bacterias a las células inmunes efectoras activadas o como parte del proceso infeccioso en el cuál es necesario dejar el nicho intracelular para diseminarse en el tejido.

La muerte celular posee un papel importante en la respuesta inmune innata contra los patógenos y consiste en una estrategia de defensa conservada, por lo que los patógenos intracelulares suelen tener mecanismos anti-apoptosis. El desenlace de una célula infectada está dado por un balance multifactorial en la interacción célula-patógeno. Así, estudios han mostrado que *M. tuberculosis* induce apoptosis de la célula hospedera (Lee *et al.* 2006), pero también hay evidencia de mecanismos anti-apoptóticos de *M. tuberculosis* (Behar *et al.* 2010).

Los cambios morfológicos que ocurren luego de iniciarse el proceso de muerte celular son diferentes en la necrosis y en la apoptosis. En la necrosis, ocurre una pérdida en la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando un hinchamiento del citoplasma y organelos, formando protusiones o vesículas con una consecuente liberación del contenido celular al espacio extracelular. En este proceso hay daño al DNA en forma aleatoria (Elmore, 2007). La necrosis usualmente afecta grupos de células contiguas e induce una reacción inflamatoria en el tejido expuesto (Majno y Joris, 1995).

En tanto, en la apoptosis ocurre un proceso inicial de pérdida de estructuras especializadas de la membrana, el citoplasma se encoge y el núcleo se condensa llevando al rompimiento del DNA en fragmentos de aproximadamente 200 pb o múltiplos de este tamaño. Las membranas de los orgánulos y la citoplasmática se fusionan formando cuerpos apoptóticos que emergen de la célula. Normalmente no se

produce una reacción inflamatoria pues los cuerpos apoptóticos son fagocitados y digeridos por las células vecinas, usualmente por fagocitos del sistema mononuclear (Haanen y Vermes, 1995; Apoptosis and inflammation) (Montague y Cidlowski, 1996).

M. tuberculosis es capaz de inducir muerte celular por necrosis y apoptosis. La apoptosis es el tipo de muerte preferentemente inducida en los macrófagos infectados (Lee *et al.* 2006), mientras que en células no fagocíticas profesionales es por necrosis. Esto puede explicarse dado que las células del sistema monocítico son células de defensa y una activación de apoptosis tiende a ser bactericida, mientras que las células no inmunes que son inducidas a muerte celular por necrosis favorece la diseminación de las bacterias y la transmisión de la enfermedad (Butler, 2012).

En el presente trabajo utilizamos monocitos humanos de la línea THP-1 transformados en el laboratorio a macrófagos para analizar el proceso de daño al DNA provocado por la infección de *M. tuberculosis*. Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada como modelo de infección de tuberculosis (Miller y Shinnick., 2000; Armitige *et al.* 2000; Riendeau y Kornfeld, 2003, Sarkar y Sarkar, 2012; Lin *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2017).

Los macrófagos derivados de la línea de monocitos THP-1 son células adherentes, sin embargo para llevar a cabo los análisis por la técnica DBD-FISH era necesario tener células en suspensión. Por ello innovamos este modelo realizando la infección con micobacterias en macrófagos desprendidos del sustrato. Para lograr este objetivo, probamos varios métodos para desprender las células antes de la infección: tripsina, pre tratamientos de las placas de cultivo con seroalbúmina bovina, pre tratamientos de las placas de cultivo con caseína y verseno. La mejor opción fue una solución de verseno al 0.1% que permitió desprender los macrófagos sin alterar la composición proteica de la membrana celular. La solución de verseno contiene EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) el cual es un quelante de cationes divalentes tales como el calcio y el magnesio. La quelación de estos cationes conduce a la disociación de las monocapas de células y la liberación de las células en suspensión. El uso del verseno no requiere de un manejo especial, es conveniente y versátil.

Los macrófagos derivados de la línea celular THP-1 no habían sido previamente utilizados con la técnica DBD-FISH, por lo que se estandarizaron las condiciones de ensayo para optimizar la prueba. En células sin infectar se determinó la concentración y

los tiempos adecuados para causar daño al DNA por estrés oxidativo con H_2O_2 . Quince minutos de incubación con una concentración de 1.3 % de H_2O_2 produjeron el daño óptimo para ser usado como control positivo en nuestros ensayos. Es interesante que la concentración de peróxido de hidrógeno necesaria para causar daño fue mayor que la reportada para otros tipos de células (Cortés-Gutierrez *et al.* 2012).

Teniendo optimizado el modelo celular para analizar daño al DNA por la técnica de DBD-FISH, procedimos a establecer las condiciones para la infección de las células con micobacterias. El análisis por esta técnica requiere células en suspensión y ya que los macrófagos son células adherentes, probamos desprenderlas antes y después de la infección. El desprendimiento del sustrato después de la infección no dio buenos resultados, ya que la manipulación (lavado, centrifugación y pipeteo) de células infectadas con daño llevan a su destrucción. El desprendimiento previo a la infección permitió completar el ensayo. Al comparar los cultivos infectados con los controles se observó que el daño celular se debió a la infección con micobacterias y no a la manipulación. Otro de los aspectos a considerar en este modelo es la bioseguridad; todo el proceso de infección se llevó a cabo en un laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL3), mientras que la técnica de DBD-FISH se realizó en un laboratorio de bioseguridad nivel 1, por lo que se requiere que no haya bacterias vivas en las muestras antes de salir del BSL3. El procedimiento convencional luego de terminado el proceso de infección, es continuar con la fijación química de las células con formaldehído al 4% (formalina), el cual es requerido para ayudar a preservar la morfología de las células y eliminar las bacterias vivas (muestras no infecciosas). El proceso es dependiente del tiempo de exposición por lo que se debió probar el mejor tiempo para evitar la sobreexposición y daño asociado al tratamiento químico que pudiera ejercer sobre el DNA de la célula ya dañada a causa de la infección con micobacterias. Después de cada tiempo de exposición se sembraron las muestras en medio 7H9 y se incubaron por 2 semanas para corroborar la ausencia de crecimiento bacteriano. El tiempo óptimo de exposición con formalina fue 1 h, tiempo suficiente para matar el 100% de las bacterias y conservar la muestra.

El proceso de muerte celular, se caracteriza generalmente por rasgos morfológicos distintivos. El análisis morfológico de los cultivos de macrófagos infectados con

micobacterias en microscopio invertido, mostró que tanto *M. tuberculosis* como *M. bovis* BCG producen daño en las células infectadas. En la Figura 5 se observa que desde las 2 h de infección hay un aumento de vesículas o gránulos comparado con los cultivos no infectados, el daño celular ocurre en una manera dependiente del tiempo de exposición al bacilo que terminan con la muerte de la célula.

El papel de la apoptosis durante la infección con *M. tuberculosis* aún está en debate. *M. tuberculosis* es capaz de modular la apoptosis de la célula infectada. Estudios previos han reportado una relación entre la virulencia de la cepa de *M. tuberculosis* y la inducción de daño celular y apoptosis. Las cepas más virulentas inhiben el proceso de apoptosis, favoreciendo la sobrevivencia del patógeno intracelularmente manteniendo alejada a la bacteria de los mecanismos bactericidas del hospedero (Velmurugan *et al.* 2007). Por otro lado, también se ha encontrado que la inducción de la apoptosis por *M. tuberculosis* favorece la diseminación de la infección (Aguilo *et al.* 2013). Paralelamente, la inducción de muerte por necrosis en las células infectadas con *M. tuberculosis* facilitó la diseminación de la infección a células nuevas (Butler *et al.* 2012).

La fragmentación del DNA es considerada como la característica más definitiva del proceso de muerte celular, sin embargo los estudios realizados se han enfocado al daño total al DNA, sin tomar en cuenta la posibilidad de observar daño a diferentes escalas en regiones específicas del genoma. Los procedimientos moleculares actuales permiten un análisis más profundo de los mecanismos involucrados en el daño celular, ya sea por agentes endógenos celulares, agentes tóxicos externos o patógenos.

El estudio de la muerte celular causada por efecto de una infección fue descubierta por observaciones de cambios morfológicos notables que ocurren en el núcleo, por lo que la microscopía de luz convencional fue la primer herramienta para la detección del daño celular. Esta característica del colapso de la cromatina y finalmente de la organización estructural del núcleo se activa por la degradación del DNA, el cual es un proceso activo que ocurre previo a la muerte celular. Posteriormente se encontró que la degradación del DNA es mediada por actividad endonucleolítica que generaba fragmentos con patrones específicos (Wyllie, 1980), los tamaños de los fragmentos eran múltiplos de aproximadamente 200 pb. Más adelante, se hizo evidente que la fragmentación del DNA

es bastante variable dentro de las células y algunos tipos de células producen sólo fragmentos de alto peso molecular (Walker *et al.*, 1995), estas últimas observaciones formaron la base de una técnica bioquímica *in vitro* conveniente para la detección rutinaria de apoptosis del DNA fragmentado mediante electroforesis en gel de agarosa de campo convencional o pulsada. Sin embargo, esta técnica requiere grandes cantidades de material y de la extracción del DNA.

Aunque la ruptura del DNA ciertamente representa un paso irreversible en la muerte celular apoptótica, no ha demostrado ser una característica obligatoria de la apoptosis en todos los sistemas celulares y puede ser que tenga una función de limpieza, relevante en algunos casos y en lugares específicos (Peitsch *et al.* 1994).

Más adelante, surgieron una diversidad de técnicas para detectar la fragmentación del DNA apoptótico *in situ*, explotando el hecho de que el grupo hidroxilo en los extremos 5' o 3' de los pequeños fragmentos de DNA son expuestos, donde al emplear nucleótidos análogos, estos se adhieren a los extremos con la ayuda de varias enzimas (Walker *et al.* 1995; Gavrieli *et al.* 1992).

Otras técnicas han surgido para la detección de la fragmentación *in situ* de DNA apoptótico, explotando el hecho de la exposición de los grupos hidroxilo 5' o 3' de los fragmentos de DNA. Estos ensayos se basan principalmente en fluorescencia, ya sea por la incorporación directa de un nucleótido el cual posee un fluorocromo conjugado, o de manera indirecta por el uso de anticuerpos conjugados que se tiñen con fluorescencia que reconocen nucleótidos biotinizados. Los métodos han sido desarrollados para usarse con microscopia de luz y confocal, al igual que con citometría de flujo, facilitando la detección y cuantificación del daño *in situ*. El primer protocolo desarrollado para la detección de la fragmentación del DNA en la apoptosis fue Terminal Uridine Nucleotide End Labeling (TUNEL), desarrollada por Gavrieli *et al.* (1992), y como el nombre indica, TUNEL detecta fragmentación del DNA por la incorporación de fluoresceína en las terminaciones libres del DNA, y con la ayuda de la microscopia de fluorescencia es posible detectar rompimientos de cadena simple y doble. A pesar de las ventajas de la técnica, no debería ser utilizada como único criterio para establecer la naturaleza de la muerte celular y en orden de establecer la naturaleza de la muerte celular se requiere de el uso de múltiples fluorocromos en el mismo experimento, asimismo, esta técnica es no

específica y sus hallazgos deben ser interpretados con precaución y correlacionando con criterios morfológicos y para lograr extraer información sobre el daño del DNA de muestras pequeñas, se requieren técnicas que dependen de la evaluación del daño del DNA al nivel de células individuales.

La citogenética molecular y los métodos de hibridación *in situ* han revolucionado el entendimiento de la estructura, función, organización y evolución de los genes y el genoma. Estas técnicas han posibilitado conocer la secuencia del DNA en los cromosomas y la expresión genética a un nivel unicelular (Cremer *et al.* 1993; Sun *et al.* 2000; Boyle *et al.* 2001; The BAC Resource Consortium, 2001).

Se han descrito una gran variedad de aplicaciones diagnósticas en investigación, haciendo esta técnica una parte integral de los estudios relacionados con el mapeo genético, transporte de RNA, genética tumoral, detección de mutaciones, entre otras.

Existen numerosos reportes con el uso de la hibridación *in situ* como herramienta diagnóstica en la detección de algunas patologías infecciosas y no-infecciosas, donde el uso de sondas ha sido particularmente apropiado (Speel *et al.* 1999).

El enfoque principal de este estudio, está en el empleo de la hibridación *in situ* la cual se permite el análisis de ácidos nucleicos en un contexto citológico en cromosomas, células y tejidos. Esta técnica ha evolucionado de detectar secuencias blanco altamente repetitivas con el uso de sondas marcadas radioactivamente, hasta ser una herramienta altamente usada que permite tinciones simultáneas de secuencias múltiples únicas con diferentes "colores" producidos por métodos de marcaje no radioactivos. Sondas específicas ofrecen la habilidad de obtener información genética refinada de células y cromosomas individuales.

En este estudio, hemos modificado y extendido los protocolos existentes de DBD-FISH, mediante el uso del embebido en gel de agarosa de una muestra infectada con diferentes cepas de micobacterias. Es importante el conocer los efectos que tienen las micobacterias sobre el DNA de la célula que las hospeda, por lo que se cuantificó el grado de fragmentación del DNA de macrófagos infectados con micobacterias y se compararon con células tratadas con H₂O₂ usando el protocolo de DBD-FISH y sus respectivos controles negativos.

DBD-FISH es un procedimiento relativamente sencillo. Se presume que cualquier tipo de célula en suspensión puede ser analizada, permitiendo el análisis de células individuales en una misma muestra. Con la muestra contenida dentro de una capa delgada de agarosa sobre una laminilla de vidrio, esta es incubada en una solución de lisis suave, donde el tiempo de incubación se incrementó debido que se dificultó el rompimiento de la membrana celular para lograr la dispersión de la cromatina. El tiempo de exposición a la solución de lisis suave de 60 minutos, nos muestra que los macrófagos son resistentes al proceso de lisis.

DBD-FISH dio resultados positivos al detectar los rompimientos de cadena de los núcleos de los macrófagos infectados con micobacterias, como se observa en las Figuras 10 y 11. El incremento en la señal de hibridación concordó con los cambios morfológicos detectados en los macrófagos analizados con luz blanca.

Una característica muy notable que se presentó en cada uno de los tratamientos, fue la formación de protuberancias como se puede observar de manera clara en la Figura 15. La aparición de estas protuberancias coinciden con la ubicación de la señal de hibridación correspondiente a la cromatina condensada (Leist y Jaattela, 2001). Este proceso ocurre a componentes celulares que podrían presentar un daño particular al sistema inmune y por lo tanto son concentrados en estructuras periféricas (de Cathelineau y Henson, 2003; Savill *et al.* 2002). Este daño periférico se destacó en los macrófagos infectados con las diferentes cepas de micobacterias, al emplear la sonda de genoma completo para marcar los rompimientos generados durante la infección, se presentan de una manera polarizada en un solo sitio de la membrana.

Una teoría interesante de la formación de estas protuberancias es que la creación de tales estructuras conlleva finalmente a la fragmentación, y que las protuberancias superficiales son por lo tanto los progenitores de cuerpos apoptóticos.

Estas observaciones plantean la posibilidad de que la formación de las protuberancias sean simplemente un subproducto de la reorganización celular, ya que una de las secuelas del proceso de apoptosis es la redistribución de la cromatina condensada en cuerpos apoptóticos (Casciola-Rosen *et al.* 1994; Leist y Jaattela, 2001). Una clara imagen de este comportamiento fue el presentado por los macrófagos en este estudio,

donde el daño detectado por DBD-FISH mostró la formación de cuerpos acumulando cromatina.

Para confirmar las observaciones en microscopia de luz y por DBD-FISH, se examinaron a los macrófagos con una segunda técnica para detectar daño al DNA, el ensayo Cometa. En esta técnica las células embebidas en agarosa son lisadas y sometidas a electroforesis. El DNA intacto, al poseer un enorme peso molecular, se mantiene en su lugar, pero el DNA con rompimiento en sus hebras, migra a través del gel como se puede observar de manera clara en la Figura 13. Esencialmente, la cola de cometa parece ser simplemente un halo de lazos relajados estirados a un lado por el campo electroforético.

En este caso, el protocolo de cometa igualmente requirió de ajustes de los tiempos de incubación en la solución de lisis, como en el tiempo empleado para la electroforesis.

La medición de las rupturas de la cadena de DNA proporciona información limitada, ya que la aparición del cometa refleja el daño en el DNA celular total.

Debido a que el DNA tiene carga negativa, la cromatina dañada migra hacia el ánodo, haciendo posible detectar rompimientos de cadena dobles o sencillos. La presencia de la cola es un indicador de la proporción del daño generado a una célula, y esto se detecta al comparar las células que exhiben daño contra células sin daño. El parámetro más usado es la longitud de la migración del DNA que depende del tamaño de los fragmentos presentes y que es proporcional a la magnitud del daño en el DNA. Olive *et al.* (1990) reportaron una limitante de este método como parámetro para el daño del DNA, ya que al probar dosis crecientes de mutágenos, la longitud de la migración del DNA alcanzó un estado de poco o ningún cambio después de un período de actividad. Por lo que propusieron el concepto de momento de cola donde se toma en cuenta la longitud y anchura de la cola como parámetro para el daño al DNA.

Al utilizar este ensayo en nuestros experimentos de infección, estas características típicas de daño al DNA no se observaron. No se formaron las colas de cometa esperadas, sino que la cromatina tendió a polarizarse en forma inespecífica sin migración del DNA. Muy probablemente esto se debió al paso añadido de fijación con formalina a esta técnica para asegurar la bioseguridad de las muestras. Ya que pruebas preliminares en

macrófagos no infectados y sin fijar sí formaron la cola de cometa. Estos resultados no nos permitieron analizar el daño al DNA por esta técnica y apoyan la ventaja que tiene DBD-FISH sobre el ensayo cometa.

Existe otra variante de protocolo que puede ser adaptado para estudios específicos logrando la visualización del daño al DNA con microscopia de fluorescencia, la técnica de dispersión de cromatina (CD), se creó originalmente para analizar muestras de esperma, y en general, la variante de prueba SCD desarrollada es un procedimiento simple y rápido para determinar la fragmentación del DNA con gran reproducibilidad (Fernández *et al.* 2003). Esta técnica es lo suficientemente versátil como para ser usada con otras líneas celulares.

Los resultados obtenidos con la variante desarrollada del protocolo de Dispersión de Cromatina, apoyan a los obtenidos por DBD-FISH. Los resultados de los protocolos en su conjunto, confirmaron de manera directa que la falta de difusión del halo característico y que el DNA fragmentado es producto de la infección.

CONCLUSIONES

M. tuberculosis H37Rv y *M. bovis* BCG infectaron macrófagos en suspensión derivados de la línea celular THP-1 causando daño celular dependiente del tiempo de incubación, que se manifiesta como vacuolización, formación de protuberancias, rompimiento del DNA y lisis celular.

Este estudio constituye el primer reporte del uso de la técnica de DBD-FISH para analizar el daño al DNA en células infectadas con micobacterias.

En la actualidad, la fragmentación del DNA se ha convertido en un punto de enfoque para continuar explorando mecanismos de daño. Contar con una técnica capaz de detectar los cambios de una manera específica daría un mejor entendimiento de los procesos que ocurren durante la infección con *M. tuberculosis*, permitiendo al mismo tiempo observar los aspectos estructurales. Esta técnica tiene además la ventaja de analizar células individuales y el uso de sondas adecuadas identificar secuencias específicas de DNA dañado que estén involucradas en la patogénesis de la tuberculosis.

PERSPECTIVAS

M. tuberculosis induce la muerte de las células que infecta. En este proceso uno de los efectos es el rompimiento de la cadena de DNA. Reportes previos han demostrado secuencias de DNA señalizadoras en célula dañada por trauma conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs).

El uso de DBD-FISH permitiría la identificación de secuencias específicas similares a DAMPs y estudiar, asociadas a otras técnicas, su papel durante la infección con *M. tuberculosis*. Ya sea como promotoras de muerte celular o señalizadoras para inducir respuesta inmune. Esto llevaría a entender mejor los procesos de patogénesis y buscar blancos novedosos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

REFERENCIAS

Aguiló, N., Marinova, D., Martín, C., Pardo, J. 2013. ESX-1-induced apoptosis during mycobacterial infection: to be or not to be, that is the question. *Cellular and Infection Microbiology*. 3: 88.

Andersen, P. 1994. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infection and Immunity*. 62: 2536–2544.

Armitige, L.Y., Jagannath, C., Wanger, A.R., Norris, S. J. 2000. Disruption of the genes encoding antigen G5A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infection and Immunity*. 68: 767-78.

Bailey, S.M., Goodwinb, E.H., Cornforthc, M.N. 2004. Strand-specific fluorescence in situ hybridization: the CO-FISH family. *Cytogenetic and Genome Research*. 107: 14–17.

Behar, S.M., Divangahi, M. and Remold, H.G. 2010. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy?. *Nature Reviews Microbiology*. 8: 9; 668–674.

Bodnar, K.A., Serbina, N.V., Flynn, J.L. 2001. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. *Infection and Immunity* 69; 2: 800–809.

Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J.M., Mahy, N.L., Ellis, J.A., Bickmore, W.A. 2001. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Human Molecular Genetics*. 10: 3;211–219.

Brennan, P.J. and Nikaido, H. 1995. The envelop of Mycobacteria. *Annual Review Biochemistry*. 64: 29-63.

Briken, V., Porcelli, S.A., Besra, G.S., Kremer, L. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular Microbiology*. 53: 2;391-403.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review Cell and Developmental Biology*. 15: 269–290.

Butler, R.E., Brodin, P., Jang, J., Jang, M.-S., Robertson, B.D., Gicquel, B., Stewart, G.R. 2012. The Balance of Apoptotic and Necrotic Cell Death in Mycobacterium tuberculosis Infected Macrophages Is Not Dependent on Bacterial Virulence. *PLoS ONE*. 7(10): e47573.

Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G., Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 179: 1317- 1330.

Chawlab, M.K., Lina, G., Olsonb, K., Vazdarjanovab, A., Burkeb, S.N., McNaughtonb, B.L., Worleyc, P.F., Guzowskid, J.F., Roysama, B., Barnesb, C.A. 2004. 3D-catFISH: a system for automated quantitative three-dimensional compartmental analysis of temporal gene transcription activity imaged by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Neuroscience Methods*. 139: 13–24.

Chen, M., Gan, H., Remold, H.G. 2006. A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *The Journal of Immunology*. 176:6; 3707–3716.

Chen, M., Divangahi, M., Gan, H., Shin, D.S.J., Hong, S., Lee, D.M., Serhan, C.N., Behar, S.M., Remold, H.G. 2008. Lipid mediators in innate immunity against

tuberculosis: opposing roles of PGE and LXA in the induction of macrophage death. *Journal of Experimental Medicine*. 205: 12;2791–2801.

Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., Fernández, J.L., López-Fernández, C., Gosálvez, J. 2012. DNA breakage detection fluorescence in situ hybridization in buccal cells. *European Journal of Histochemistry*. 56: e49;311-313.

Cremer, T., Kurz, A., Zirbel, R., Dietze, S., Rinke, B., Schröck, E., Speicher, M.R., Mathieu, U., Jauch, A., Emmerich, P., Scherthan, H., Ried, T., Cremer, C., Lichter, P. 1993. Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 58: 777–792.

Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., Traganos, F. 1992. Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. *Cytometry*. 13: 795-808.

deCathelineau, A. M. and Henson, P. M. 2003. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays in Biochemistry*. 39: 105-117.

DeLong, E.F., Wickham, G.S. and Pace, N.R.. 1989. Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*. 243: 1360–1363.

Didenko, V.V. and Hornsby, P.J. 1996. Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *Journal of Cell Biology*. 135: 1369–1376.

Dubnau, E., Fontán, P., Manganelli, R., Soares-Appel, S., Smith, I. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* genes induced during infection of human macrophages. *Infection and Immunity*. 70: 6;2787–2795.

Ducati, R.G., Ruffino-Netto, A., Basso, L.A., Santos, D.S. 2006. The resumption of consumption - A review on tuberculosis. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 101: 7:697-714.

Dye, C. and Williams, B.G. 2010. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science*. 328: 5980;856-61.

Ehlers, S. and Schaible, U.E. 2013. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Frontiers in Immunology*. 3:411;1-9.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35: 4; 495-516.

Espinet, B., Solé, F., Salido, M., Lloveras, E., Abella, E., Besses, C., Serrano, S., Woessner, S., Florensa, L. 2000. Application of cross-species color banding (RxFISH) in the study of T-prolymphocytic leukemia. *Haematologica*. 85: 6;607-612.

Fernández, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., Govanes, V., Vazquez, R. and Alvarez, J.G. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology*. 24: 1;59-66.

Fernández, J.L., Gosalvez, J., Goyanes, V. 2005. DNA Breakage Detection Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH). *Encyclopedia of Medical Genomics and Proteomics*. DOI: 10.1081/E-EDGP-120040279.

Gan, H., He, X., Duan, L., Mirabile-Levens, E., Kornfeld, H., Remold, H.G. 2005. Enhancement of antimycobacterial activity of macrophages by stabilization of inner mitochondrial membrane potential. *Journal of Infectious Diseases*. 191: 8;1292–1300.

Garton, N.J., Waddell, S.J., Sherratt, A.L., Lee, S.M., Smith, R.J., Senner, C., Hinds, J., Rajakumar, K., Adegbola, R.A., Besra, G.S., Butcher, P.D., Barer, M.R. 2008.

Cytological and transcript analyses reveal fat and lazy persister-like bacilli in tuberculous sputum. *PLoS Medicine*. 5:4; 634-645.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. 1992. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. 119: 3;493-501.

Gilmore, E.C., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., Herrup, K. 2000. Cell birth, cell death, cell diversity and DNA breaks: how do they all fit together?. *Trends in Neuroscience*. 23: 100–105.

Godreuil, S., Torrea, G., Terru, D., Chevene,t F., Diagbouga, S., Supply, P., Van de Perre, P., Carriere, C., Bañuls, A.L. 2007. First Molecular Epidemiology Study of *Mycobacterium tuberculosis* in Burkina Faso. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 3;921–927.

Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., Breitschopf, H., Hartung, H.P., Toyka, K.V., Lassmann, H. 1994. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Laboratory Investigation*. 71: 2;219-25.

Haanen, C. and Vermes, I. 1995. Apoptosis and inflammation. *Mediators of Inflammation*. 4;5-15.

Hayashi, R., Ito, Y., Matsumoto, K., Fujino, Y., Otsuki, Y. 1998. Quantitative differentiation of both free 3'-OH and 5'-OH DNA ends between heat-induced apoptosis and necrosis. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*. 46: 1051–1059.

Ingraham, J.L. 1998. *Introducción a La Microbiología*. 1ra Edición. Editorial Reverté S.A. Barcelona. Capítulo 23.

Jordao, L., Bleck, C.K.E., Mayorga, L., Griffiths, G., Anes, E. 2008. On the killing of mycobacteria by macrophages. *Cellular Microbiology*. 10: 2;529–548.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26: 239–257.

Kwon, S. 2013. Single-molecule fluorescence in situ hybridization: Quantitative imaging of single RNA molecules. *BMB Reports*.

Leist, M. and Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2: 589-598.

Lee, J., Yang, C., Shin, D., Yuk, J., Son, J., Jo, E. 2009. Nitric Oxide Synthesis is modulated by 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 and Interferon- γ in human macrophages after mycobacterial infection. *Immune Network*. DOI 10.4110/in.2009.9.5.192.

Lee, J., Remold, H.G., Jeong, M.H., Kornfeld, H. 2006. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. *Journal of Immunology*. 176:4267-4274.

Lin, P.Y., Liu, H.J., Chang, C.D., Chang, C.I., Hsu, J.L., Liao, M.H., Lee, J.W., Shih, W.L. 2011. Avian reovirus S1133-induced DNA damage signaling and subsequent apoptosis in cultured cells and in chickens. *Archives of Virology*. 156: 11;1917-29.

Lin, W., de Sessions, P.F., Teoh, G.H., Mohamed, A.N., Zhu, Y.O., Koh, V.H., Ang, M.L., Dedon, P.C., Hibberd, M.L., Alonso, S. 2016. Transcriptional Profiling of *Mycobacterium tuberculosis* Exposed to *in vitro* Lysosomal Stress. *Infection and Immunity*. 19:84(9); 2505-23.

Lockshin, R.A. and Zakeri, Z. 2004. Caspase-independent cell death?. *Nature*. 23: 2766-2773.

Loeuillet, C., Martinon, F., Perez, C., Munoz, M., Thome, M., Meylan, P.R. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* subverts innate immunity to evade specific effectors. *Journal of Immunology*. 177: 6245–6255.

Lugo de la Fuente, G. 2005. *Bacteriología Médica*. Tercera Edición. Cuellar México.

Majno, G. and Joris, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *American Journal of Pathology*. 146: 3–15.

Means, T.K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D.T., Fenton, M.J. 1999. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*. 163:7; 3920–3927.

Miller, B.H. and Shinnick, T.M. 2000. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* Genes Involved in Resistance to Killing by Human Macrophages. *Infection and immunity*. 68:1; 387-390.

Miller, Y.I., Choi, S., Wiesner, P., Fang, L., Harkewicz, R., Hartvigsen, K., Boullier, A., Gonen, A., Diehl, C.J., Que, X., Montano, E., Shaw, P.X., Tsimikas, S., Binder, C.J., Witztum, J.L. 2011. Oxidation-Specific Epitopes are Danger Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity. *Circulation Research*. 108: 2;235–248.

Molloy, A., Laochumroonvorapong, P., Kaplan, G. 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *Journal of Experimental Medicine*. 180: 4;1499–1509.

Montague, J.W. and Cidlowski, J.A. 1996. Cellular catabolism in apoptosis: DNA degradation and endonuclease activation. *Experientia*. 31: 52(10-11): 957-962.

Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E. 1990. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the comet assay. *Radiation Research*. 122: 86-94.

O'Sullivan, M.P., O'Leary, S., Kelly, D.M., Keane, J.. 2007. A caspase-independent pathway mediates macrophage cell death in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*. 75: 4;1984–1993.

Palma-Nicolas, J.P. and Bocanegra-García, V. 2007. Innovative Strategies to Diagnose and Monitor Tuberculosis Patients. *Archives of Bronconeumology*. 43: 4;225-32.

Peitsch, M.C., Mannherz, H.G. and Tschopp, J. 1994. The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death?. *Trends in Cell Biology*. 4:37–41.

Pernthaler, A., Pernthaler, J., and Amann, R. 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 6;3094–3101.

Pósa, A., Maixner, F., Zink, A., Lovász, G., Molnár, E., Bereczki, Z., Perrin, P., Dutour, O., Sola, C., Pálfi, G. 2012. Ancient human tooth samples used for TB paleomicrobial research. *Acta Biologica Szegediensis*. 56: 2;125-131.

Ridzon, R., Whitney, C.G., McKenna, M.T., Taylor, J.P., Ashkar, S.H., Nitta, H.T., Harvey, S.M., Valway, S., Woodley, C., Cooksey, R., Onorato, I.M. 1998. Risk factors for rifampin mono-resistant tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 157: 1881–1884.

Riendeau, C.J. and Kornfeld, H. 2003. THP-1 Cell Apoptosis in Response to Mycobacterial Infection. *Infection and Immunity*. 71: 1;254–259.

Sakula, A. 1982. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax*. 37:246-251.

Samejima, K., Toné, S., Kottke, T.J., Enari, M., Sakahira, H., Cooke, C.A., Durrieu, F., Martins, L.M., Nagata, S., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. 1998. Transition from Caspase-dependent to Caspase-independent Mechanisms at the Onset of Apoptotic Execution. *The Journal of Cell Biology*. 1431: 225–239.

Santos, S.J., Singh, N.P., Natarajan, A.T. 1997. Fluorescence in situ hybridization with comets. *Experimental Cell Research*. 232: 407–411.

Sarkar, S.S. and Sarkar, D. 2012. Potential use of nitrate reductase as a biomarker for the identification of active and dormant inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* in a THP1 infection model. *Journal of Biomolecular Screening*. 17: 7;966-973.

Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. and Haslett, C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 2: 965-975.

Scanga, C.A., Mohan, V.P., Joseph, H., Yu, K., Chan, J., Flynn, J.L. 1999. Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model. *Infection and Immunology*. 67: 9;4531–4538.

Schmid, T.E., Brinkworth, M.H., Hill, F., Slotter, E., Kamischke, A., Marchetti, F., Nieschlag, E., Wyrobek, A.J. 2004. Detection of structural and numerical chromosomal abnormalities by ACM-FISH analysis in sperm of oligozoospermic infertility patients. *Human Reproduction*. 19: 6;1395-1400.

Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P., Dieter, P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Journal of Leukocyte Biology*. 59: 555-561.

Shah, N.S., Wright, A., Bai, G.H., Barrera, L., Boulahbal, F., Casabona, N.M., Drobniewski, F., Gilpin, C., Havelková, M., Lepe, R., Lumb, R., Metchock, B., Portaels, M., Rodrigues, M.F., Rüsck-Gerdes, S., Van Deun, A., Vincent, V., Laserson, K., Wells, C., Cegielski, P. 2007. Worldwide Emergence of Extensively Drug-resistant Tuberculosis. *Emerging Infectious Diseases*. 13: 3;380-387.

Sherman, D.R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M.I., Schoolnik, G.K. 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 98: 7534–7539.

Speel, E.J.M., Hopman, A.H.N. and Komminoth, P. 1999. Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization: play CARD(s). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 47: 281–288.

Sun, H.B., Shen, J. and Yokota, H. 2000. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophysical Journal*. 79: 1;184–190.

The BAC Resource Consortium. Cheung, V.G., Nowak, N., Jang, W., Kirsch, I.R., Zhao, S., Chen, X-N., Furey, T.S., Kim, I.-J., Kuo, W.-L., Olivier, M., Conroy, J., Kasprzyk, A., Massa, H., Yonescu, R., Sait, S., Thoreen, C., Snijders, A., Lemyre, E., Bailey, J.A., Bruzel, A., Burrill, W.D., Clegg, S.M., Collins, S., Dhami, P., Friedman, C., Han, C.S., Herrick, S., Lee, J., Ligon, A.H., Lowry, S., Morley, M., Narasimhan, S., Osoegawa, K., Peng, Z., Plajzer-Frick, I., Quade, B.J., Scott, D., Sirotkin, K., Thorpe, A.A., Gray, J.W., Hudson, J., Pinkel, D., Ried, T., Rowen, L., Shen-Ong, G.L., Strausberg, R.L., Birney, E., Callen, D.F., Cheng, J.-F., Cox, D.R., Doggett, N.A., Carter, N.P., Eichler, E.E., Haussler, D., Korenberg, J.R., Morton, C.C., Albertson, D.,

Schuler, G., de Jong, P.G. and Trask, B.J. 2001. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature*. 409: 6822;953–958.

Toller, I.M., Neelsen, K.J., Steger, M., Hartung, M.L., Hottiger, M.O., Stucki, M., Kalali, B., Gerhard, M., Sartori, A.A., Lopes, M., Müller, A. 2011. Carcinogenic bacterial pathogen *H. pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 108: 36;14944-14949.

Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. and Tada, K. 1982. Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester. *Cancer Research*. 42: 1530-1536.

Velmurugan, K., Chen, B., Miller, J.L., Azogue, S., Gurses, S., Hsu, T., Glickman, M., Jacobs Jr, W.R., Porcelli, S.A. and Briken, V. 2007. Mycobacterium tuberculosis *nuoG* is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathogens*. 3: 7;e110.

Volpi, E.V. and Bridger, J.M. 2008. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques*. 45: 4;385-409.

Walker, P.R., Pandey, S. and Sikorska, M. 1995. Degradation of chromatin in apoptotic cells. *Cell Death and Differentiation*. 2: 93–100.

Wang, K.K. 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends in Neuroscience*. 23: 20–26.

WHO. 2015. Global Tuberculosis Report 2015.

Wong, V.W.C., Szeto, Y.T., Collins, A.R., Benzie, I.F.F. 2005. THE COMET ASSAY: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 3:1;1-14.

Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284: 555–556.

Zenteno-Cuevas, R. 2003. Pasado, presente y futuro de las técnicas diagnósticas de tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Mex*. 16: 3;181-186.

Zhang, Q., Raouf, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., Carl, J., Hauser, C.J. 2010. Circulating Mitochondrial DAMPs Cause Inflammatory Responses to Injury. *Nature*. 464: 7285;104–107.

Zhang, Z.M., Zhang, A.R., Xu, M., Lou, J., Qiu, W.Q. 2017. TLR-4/miRNA-32-5p/FSTL1 signaling regulates mycobacterial survival and inflammatory responses in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Experimental Cell Research*. 15: 352(2);313-321.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Miriam Lorena Luévano Martínez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: ANÁLISIS DEL DAÑO AL DNA DE MONOCITOS HUMANOS INFECTADOS CON *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE LA TÉCNICA DE DBD-FISH

Campo de estudio: Microbiología, citogenética y epidemiología molecular.

Datos Personales: Nacida en Nueva Rosita Coahuila, el 26 de junio de 1980, hija de Rubén Luévano Hernández y Alma Leticia Martínez Galindo.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Coahuila con el grado de Licenciado en Ciencias Químicas con Especialidad en Química Orgánica en el año de 2005 y en 2010 con el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología.

ANEXO 1

Presentaciones en Congresos

XX Foro Norte de Investigación en Salud. Hermosillo, Sonora, 2014.

XXI Foro Norte de Investigación en Salud. Aguascalientes, Aguascalinetes, 2015.

Foro de Investigación XXXV Aniversario UMAE Hospital de Especialidades No. 25. Monterrey, Nuevo León, 2015.

ANEXO 2

Preparación de reactivos y soluciones

Soluciones:

TBE 1X pH 7.5

Tris Base	11.16 g
Acido bórico	8.42 g
Na ₂ EDTA	0.98 g
H ₂ O destilada	Aforar a 1000 ml

PBS 1X pH 7.4

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
H ₂ O destilada	Aforar a 1000 ml

Rojo fenol

Rojo de fenol	0.1 g
NaOH (0.02N)	14.2 ml
H ₂ O destilada	Aforar a 250 ml

Verseno (0.33M)

Concentrado

EDTA	12.4 g
Rojo fenol 0.5%	3-4 gotas
NaOH 2N	30 ml
H ₂ O miliQ	Aforar a 100 ml

Disolver en caliente 12.4g de EDTA en 65ml de agua desnaturalizada, ya disuelto y a temperatura ambiente, agregar 3-4 gotas de rojo fenol al 0.5% y neutralizar con NaOH 2N (hasta que tome un color rosado, aproximadamente 30ml). Se afora a 100ml con agua miliQ y autoclavar por 15 minutos. Mantener a temperatura ambiente.

Verseno 0.1%

(Solución de trabajo)

PBS 1X estéril	100 ml
Verseno 0.33M estéril	0.8 ml
Mantener a temperatura ambiente	

Alcalina fuerte pH 12.5

NaOH 10 M	300 μ l
NaCl 5M	20 ml
H2O destilada	Aforar a 100 ml

Se prepara el día del experimento.
Esta solución se usa a 4°C

Soluciones de Hibridación:

Formamida al 50%

Formamida	50 ml
2XSSC	50 ml

Deberá ser preparada al momento de usarse.

20XSSC pH 5.3

NaCl 3M	175.3 g
Citrato de Sodio 0.3M	88.2 g
H2O destilada	Aforar a 1000 ml

2XSSC pH 7

A partir de 20XSSC diluir 10 veces.

Tween 4

20XSSC	20 ml
Tween 20 al 10% pH 7	1 ml
H2O destilada	Aforar a 100 ml

(Mantener en frasco ámbar)
Procurar que no tenga más de una semana de haber sido preparada.

Solución bloqueante

BSA al 10%	500 μ l
20XSSC	200 μ l
Tween 20 al 10%	10 μ l
H2O destilada	290 μ l