

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE  
*Mycobacterium tuberculosis* DURANTE  
LA INFECCIÓN A MACRÓFAGOS**

Por

**HUGO BRÍGIDO BARRIOS GARCÍA**

Como requisito Para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
con Especialidad en Microbiología

Julio del 2006

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE *Mycobacterium tuberculosis*  
DURANTE LA INFECCIÓN A MACRÓFAGOS**

Este trabajo fue realizado en la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, en Monterrey, Nuevo León y en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

Directores de tesis:

**Dr. Juan Manuel Alcocer González**

**Dr. Jorge Enrique Castro Garza**

Para la realización de este trabajo de investigación y obtener el grado de Doctor en Ciencias, se obtuvo apoyo de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
Beca Crédito No. 72010

Instituto Mexicano del Seguro Social  
Becario No. 99090222

Fondo de Fomento a la Investigación-IMSS  
IMSS-FOFOI FP-2001-030  
IMSS-FOFOI FP-2005/9/I/494

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE *Mycobacterium tuberculosis*  
DURANTE LA INFECCIÓN A MACRÓFAGOS**

Comité de la Tesis:

---

**Dr. Juan Manuel Alcocer González**  
Presidente

---

**Dr. Jorge Enrique Castro Garza**  
Secretario

---

**Dra. Norma Laura Heredia Rojas**  
Vocal

---

**Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores**  
Vocal

---

**Dr. Lucio Vera Cabrera**  
Vocal

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE *Mycobacterium tuberculosis*  
DURANTE LA INFECCIÓN A MACRÓFAGOS**

Comité Académico de Doctorado

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Subdirector de Estudios de Postgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Jorge Castro, Asesor de mi tesis y al Dr. Lucio Vera por haber enriquecido este proyecto, así como a los Doctores Juan Manuel Alcocer, Norma Heredia y Ricardo Flores por las revisiones dadas al mismo.

Al Dr. Salvador Said y a todo el personal del Centro de Investigación Biomédicas del Noreste por el apoyo brindado durante mi estancia.

A mis amigos del CIBIN, Silvia, Gloria y Julio quienes estuvieron cerca durante todo el trayecto.

A mi equipo de trabajo del Laboratorio de Biología Celular y Molecular, en especial a Delia y Pilar así como a Toño y Norma con quienes conviví cercanamente.

A mis amigos Gabriel y Javier por su apoyo incondicional.

Amanda e Hilda por que siempre creyeron en mí.

A todos a quienes de alguna forma contribuyeron a que pudiera ver finalizado este proyecto.

No es posible salir adelante  
celebrando éxitos sino  
superando fracasos

Dedicado:

A mi madre, Rosa, por todo su amor y sacrificios hechos por apoyarme.

A la memoria de mi padre, quien supo guiarme en los pocos años que lo tuve.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me han brindado, especialmente a mis hermanos Roxana y Javier.

A todos mis pequeños y grandes amores. . . .

Más que el brillo de la  
victoria, nos conmueve la  
entereza ante la  
adversidad.

- *Octavio Paz*

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT. ....	1
2. INTRODUCCIÓN. ....	3
3. HIPÓTESIS. ....	4
4. OBJETIVOS ....	5
4.1 Objetivo general ....	5
4.2 Objetivos específicos. ....	5
5. ANTECEDENTES. ....	6
5.1 Epidemiología ....	6
5.2 Característica de género <i>Mycobacterium spp.</i> ....	6
5.3 Patogénesis de la tuberculosis. ....	7
5.4 Factores de virulencia. ....	9
5.5 Modelos para estudiar virulencia. ....	10
5.6 Planteamiento del problema. ....	13
5.7 Justificación. ....	13
5.8 Importancia del trabajo. ....	14
6. MÉTODOS ....	15
6.1 Diseño experimental. ....	15
6.2 Línea celular. ....	15

6.3	Transformación de células THP-1 a macrófagos .....	16
6.4	Evaluación de la viabilidad celular por ensayo de WST-1 .....	16
6.5	Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	16
6.6	Determinación de la densidad bacteriana .....	17
6.7	Extracción de DNA genómico de micobacterias .....	17
6.8	Ensayo de citotoxicidad bacteriana .....	18
6.9	Cuantificación de citotoxicidad por ensayo de TCV.....	18
6.10	Infección de macrófagos con cepas de <i>M. tuberculosis</i> y recuperación de bacterias para la extracción de RNA .....	20
6.11	Extracción de RNA de micobacterias .....	20
6.12	Extracción de RNA de macrófagos .....	22
6.13	Electroforesis en gel de agarosa para RNA .....	22
6.14	Determinación de la concentración del RNA .....	22
6.15	Selección de los genes para amplificar.....	23
6.16	Producción de DNA complementario (cDNA).....	25
6.17	Reacción en cadena de la polimerasa para obtener los amplicones correspondientes a cada gene analizado .....	25
6.18	Electroforesis en gel de agarosa para DNA.....	25
7.	RESULTADOS.....	27
7.1	Densidad bacteriana de los cultivos congelados de <i>M. tuberculosis</i> .....	27
7.2	Actividad citotóxica sobre cultivos celulares de células THP-1 por cepas de <i>M. tuberculosis</i> .....	27
7.3	Cuantificación de citotoxicidad por tinción con cristal violeta (TCV), desarrollo y estandarización del método.....	30

7.4	Cuantificación de la citotoxicidad producida por <i>M. tuberculosis</i> mediante el ensayo del cristal violeta (TCV) . . . . .	33
7.5	Extracción del RNA . . . . .	34
7.6	Selección de los genes para amplificar. . . . .	35
7.7	Especificidad de los iniciadores diseñados. . . . .	36
7.8	Expresión de los genes analizados. . . . .	36
8.	DISCUSIÓN. . . . .	40
9.	CONCLUSIONES . . . . .	47
10.	LITERATURA CITADA. . . . .	48
11.	APÉNDICE . . . . .	62

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Lista de iniciadores utilizados. ....	24
2. Porcentaje de celular muertas = citotoxicidad . . . . .	33
3. Selección de genes. ....	35
4. Productos amplificados por PCR de los genes de <i>M. tuberculosis</i> . . . .	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Efecto citotóxico de <i>M. tuberculosis</i> dependiente de la virulencia de las cepas. ....	28
2. Efecto citotóxico de <i>M. tuberculosis</i> dependiente del inóculo bacteriano. ....	29
3. El número de células en cultivo determinó los valores de absorbancia obtenidos utilizando el ensayo de TCV. ....	31
4. Evaluación de citotoxicidad de Tritón X-100 sobre cultivos de la línea celular THP-1 mediante el ensayo TCV. ....	32
5. RNA obtenido de los cultivos de micobacterias. ....	34
6. Expresión de genes de <i>M. tuberculosis</i> CDC1551. ....	39

## 1. RESUMEN

Los factores bacterianos responsables de la patogenicidad de *M. tuberculosis* no han sido plenamente identificados. En este trabajo, se analizó el efecto citotóxico producido por esta bacteria sobre macrófagos humanos en cultivo, así como la expresión de algunos genes bacterianos que pudieran estar involucrados en el proceso de infección. Monocapas en cultivo de la línea celular de monocitos humanos (THP-1) diferenciada a macrófagos por inducción con forbol-miristrato-acetato (PMA) se infectaron con *M. tuberculosis* cepas CDC1551, H37Rv y DR689, con una multiplicidad de infección (MDI) de 10:1, 1:1 y 0.1:1 (bacterias:macrófagos). El efecto citotóxico se observó como aglomeración celular y áreas de lisis. El daño dependió de la concentración del inóculo y del tiempo de incubación. En infecciones realizadas con una MDI de 10:1, se observó destrucción total de los cultivos a 24 h de incubación. Utilizando MDI menores se observó un daño menor en el cultivo celular y aglomeración de células en varias zonas, los cuales no se presentaron en los cultivos testigo. Las monocapas celulares infectadas con una MDI de 1:1 y 0.1:1 conservaron parcialmente su integridad a las 72 h de incubación. Para cuantificar el efecto citotóxico producido por *M. tuberculosis*, se desarrolló un método colorimétrico basado en la característica particular de *M. tuberculosis* de no absorber el cristal violeta. De esta manera la pérdida de células en el cultivo debido al efecto citotóxico se refleja cuantitativamente en las lecturas de absorbancia. En base a los resultados de citotoxicidad se seleccionó la MDI de 1:1 para realizar los estudios de expresión durante la infección. La extracción del RNA bacteriano se realizó de bacterias obtenidas a los 7 días de crecimiento en medio de cultivo Middlebrook 7H9, de bacterias cultivadas en medio RPMI completo o de bacterias infectando macrófagos a las 2, 6 y 24 h de incubación. La selección de genes para analizar su expresión se hizo tomando como base genes de *M. tuberculosis* reportados como probables factores de virulencia o genes sin función definida en *M. tuberculosis* pero con homología con factores de virulencia en otros patógenos. Los genes seleccionados para buscar su expresión se nombraron de acuerdo a la nomenclatura dada en [http://www.sanger.ac.uk/Projects/M\\_tuberculosis/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/): MT0003, MT0024, MT0040, MT0259, MT0655, MT0876, MT1524, MT3917 (*erp*), MT2783 (*sigB*), MT2415 (*plcB*) y MT2414 (*plcC*). El testigo de expresión constitutiva fue el gene MT3989 (*esat6*), el cual se expresó en todas las condiciones analizadas. Como testigo de expresión inducida durante la infección se seleccionó el gene MT2416 (*plcA*), el cual se expresó de manera semejante a lo reportado previamente por otros autores. Todos los genes a excepción del MT0259 se expresaron en todas las condiciones, pero se observó variabilidad en la intensidad de las bandas lo que representa una posible expresión diferencial que debe establecerse mediante métodos cuantitativos. El gene MT0259 con función aparente de oxidoreductasa se expresó hasta las 24 h de incubación tanto en medio de cultivo como en células infectadas pero no mostró expresión determinada por RT-PCR a los 7 días de crecimiento en medio Middlebrook. Con estos hallazgos, se concluyó que *M. tuberculosis* tiene un efecto citotóxico sobre la monocapa de macrófagos cuantificable por la tinción con cristal violeta y que la bacteria expresa selectivamente ciertos genes dependiendo de las condiciones del medio de cultivo.

## ABSTRACT

*M. tuberculosis* virulence factors have not been completely identified. In this work, the cytotoxic effect produced by *M. tuberculosis* on human macrophages and the expression of specific bacterial genes during macrophage infection that may be involved in mycobacterial virulence was analysed. THP-1 cells monolayers differentiated to macrophages by phorbol myristate acetate (PMA) were infected with *M. tuberculosis* strains CDC1551, H37Rv and DR689 with a variable multiplicity of infection (MOI): 10:1, 1:1 and 0.1:1 (bacteria:macrophage) and incubated at various time points. Cytotoxicity was observed as areas of clearing and cell agglomeration and the effect was dependent on bacilli inoculum and incubation time. MOI of 10:1 produced a complete destruction of the cell monolayer after 24 h post-infection. Uninfected cultures kept their integrity throughout the experiment. Cell monolayers infected with MOI's of 1:1 and 0.1:1 were partially disrupted after 72 h post-infection. In order to measure the cytotoxic effect, we developed an *in vitro* colorimetric assay based on *M. tuberculosis* inability to absorb crystal violet dye, such that any loss of cells caused by *M. tuberculosis* in infected cultures would produce a change in absorbance values. Based on the cytotoxicity results, the MOI of 1:1 was selected to recover bacteria, isolate their RNA and perform the expression analysis. RNA was isolated from bacteria grown in Middlebrook 7H9 medium after 7 days or in RPMI medium at 2, 6 and 24 h, as well as RNA from bacteria infecting macrophages at the same time points. Selection of analysed genes was based on genes reported as probable virulence factors of *M. tuberculosis* or genes with undefined function in *M. tuberculosis* but having a nucleotide sequence homologous to virulence genes from other pathogens. Selected genes for this study were named according to the nomenclature given in [http://www.sanger.ac.uk/Projects/M\\_tuberculosis/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/): MT0003, MT0024, MT0040, MT0259, MT0655, MT0876, MT1524, MT3917 (*erp*), MT2783 (*sigB*), MT2415 (*plcB*) and MT2414 (*plcC*). Gene MT3989 (*esat6*) was used as control of constitutive expression and gene MT2416 (*plcA*) as control of induced expression during infection. Gene MT0259 with a putative oxidoreductase activity did not show expression after 7 days of growth in 7H9 medium as determined by RT-PCR. But, it did express when cultivated in RPMI or during the macrophage infection at least till 24 h. All the rest of the genes analysed were expressed in all the studied conditions. Although, variability was observed on the intensity of bands, indicating a probable upregulation or downregulation of expression, it is necessary to make quantitative analysis to get conclusive results. These findings indicate that *M. tuberculosis* has a cytotoxic effect on macrophage monolayers, which can be measured by crystal violet dye and that *M. tuberculosis* selectively express genes depending on culture conditions.

## 2. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada principalmente por el género *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enfermedad es bien conocida desde la antigüedad, pero en los últimos años y especialmente, debido a la aparición del SIDA, se ha producido un cambio radical en su epidemiología y existe una enorme preocupación en todo el mundo por su nueva aparición y por el incremento de resistencia a los fármacos más importantes. La Organización Mundial de la Salud (OMS), manifestó que la tuberculosis había adquirido carácter de urgencia mundial, por lo cual es importante mantener y fortalecer los sistemas de control sobre la enfermedad.

Parte fundamental en la lucha contra la tuberculosis es el conocimiento de los mecanismos de patogenicidad y de evasión de la respuesta inmune que ocurren durante la infección. Los estudios realizados que proveen esta información permitirán disponer de un mejor tratamiento contra la enfermedad así como mejores medidas de control y/o prevención. En este trabajo se analizó el efecto citotóxico producido por *M. tuberculosis* sobre macrófagos humanos en cultivo y la expresión de algunos genes bacterianos que pudieran estar involucrados en el proceso de infección.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que *M. tuberculosis* tienen un efecto citotóxico sobre la monocapa de macrófagos, el cual depende de la virulencia de la cepa y está en función del inóculo usado y del tiempo de incubación. Esta actividad biológica de *M. tuberculosis* sobre macrófagos humanos se cuantificó mediante un método colorimétrico desarrollado en el laboratorio basado en la característica particular de esta bacteria de no absorber el colorante cristal violeta.

El análisis de la expresión de genes específicos de *M. tuberculosis* mediante la amplificación de cDNA obtenido del RNA de bacterias en medio de cultivo bacteriano mostró que los genes seleccionados se expresaron semejantemente a cuando las bacterias se obtuvieron después de infectar macrófagos humanos. La metodología usada en este trabajo permitió observar ligeras diferencias en la intensidad de las bandas de los amplicones en cada condición, lo que puede reflejar una expresión diferencial. Sin embargo es necesario utilizar métodos cuantitativos para tener resultados concluyentes al respecto. El gene MT0259 con posible función de oxidoreductasa se expresó en las diferentes condiciones estudiadas excepto cuando se cultivó por 7 días en medio Middlebrook. Este gene, muy posiblemente está relacionado con el metabolismo de la bacteria y se requiere durante el crecimiento activo de la bacteria pero deja de expresarse cuando esta llega a su fase estacionaria de crecimiento.

Estudios posteriores podrán cuantificar cada uno de los genes estudiados y establecer su importancia en la infección de *M. tuberculosis* a células humanas. Así mismo se podrá establecer la función real y la importancia del gene MT0259.

### **3. HIPÓTESIS**

*M. tuberculosis* expresa diferencialmente factores relacionados con la virulencia durante la invasión celular, los cuales pueden ser detectados en un modelo de infección celular.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Analizar la expresión de genes específicos de *M. tuberculosis* durante la infección *in vitro* en macrófagos derivados de la línea celular THP-1.

### 4.2 Objetivos específicos

- 5.1 Analizar el efecto citotóxico de *M. tuberculosis* sobre macrófagos humanos derivados de la línea celular THP-1.
- 5.2 Establecer un método colorimétrico para cuantificar el daño producido por *M. tuberculosis* sobre monocapas celulares.
- 5.3 Seleccionar genes específicos con probable función de virulencia de *M. tuberculosis* para analizar su expresión en las diferentes condiciones a estudiar.
- 5.4 Determinar los ARN expresados durante la infección de las bacterias en los macrófagos humanos derivados de la línea celular THP-1.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS), declaró en abril de 1993 que la tuberculosis había adquirido carácter de emergencia mundial. El incremento en la incidencia de la tuberculosis se ha debido principalmente a una falla en los servicios de salud y falta de atención a la enfermedad, al vínculo entre la tuberculosis y la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y a la aparición de cepas de *M. tuberculosis* multidrogoresistentes. Cerca de la tercera parte de la población mundial está infectada con el bacilo de la tuberculosis. Se calcula que la tuberculosis es responsable de más del 6% de todas las muertes en el mundo (PAHO, 2004; Snider *et al.*, 1994; Sayler *et al.*, 1994, Corbett y Raviglione, 2005).

Los datos más recientes muestran que aproximadamente de 7 a 8 millones de personas en el mundo se enferman cada año de tuberculosis y alrededor de 2 millones de personas mueren al año por causa de este padecimiento. Las muertes por tuberculosis corresponden al 25% de la mortalidad evitable en países en desarrollo. El 95% de los casos de tuberculosis y el 98% de las muertes causadas por esta enfermedad ocurren en países en desarrollo y el 75% de estos casos ocurren en la población económicamente productiva que oscila entre los 15-50 años de edad (PAHO, 2004).

Una persona con tuberculosis activa y sin tratamiento puede infectar un promedio de 10 a 15 personas cada año. Se ha estimado que, de no tomar las medidas adecuadas, entre los años 2002 y 2020 en el planeta se infectarán cerca de 1000 millones de personas, 150 millones padecerán la enfermedad y 36 millones morirán de tuberculosis, (PAHO, 2004).

### 5.2 Característica de género *Mycobacterium spp.*

El género *Mycobacterium* incluye varias especies, unas son patógenas tanto para el hombre como para los animales; otras son patógenas oportunistas y otras son esencialmente saprófitas (Freeman, 1991; Jawetz, 1987). Dentro de las micobacterias patógenas, *Mycobacterium tuberculosis* es la más representativa dentro del complejo tuberculosis que incluye además, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum* y *M. microti*

(Brock, 1987). Las micobacterias son bacilos delgados o ligeramente curvos, de 0.2 a 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 1 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud; aparecen como células aisladas o asociados en grupos pequeños y a veces en masas compactas en las que no se puede distinguir cada bacilo individual (Koneman *et al.*, 1992; Lenette *et al.*, 1974; Baron, 1990). El bacilo de la tuberculosis es inmóvil y no forma esporas (Freeman, 1991; Jawetz *et al.*, 1987; Barón, 1990) y requiere de 15 a 22 horas para su replicación (Koneman *et al.*, 1992; Buchanan, 1984). Las micobacterias no se tiñen con métodos convencionales porque hay una resistencia notable a la penetración de los colorantes en las células debido a la presencia de cantidades relativamente grandes de lípidos en la pared celular, por lo que son llamados bacilos ácido-alcohol resistentes. Por su naturaleza hidrofóbica, la pared celular no es accesible a sustancias hidrofílicas tales como el cristal violeta por lo tanto *M. tuberculosis* no puede ser teñida con la tinción regular de Gram resultando en gram neutral (no negativo – no positivo) o con una apariencia de fantasmas (Lenette *et al.*, 1974, Buchanan, 1984; Washington, 1981; Wistreich y Lechnam, 1989; Trifiro *et al.*, 1990).

### 5.3 Patogénesis de la tuberculosis

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis humana. La enfermedad se presenta en un curso crónico que ataca de manera primaria a los pulmones, pero puede afectar cualquier órgano o tejido. Las micobacterias producen reacciones inflamatorias focales granulomatosas. En el centro de éstas, frecuentemente se observa una forma peculiar de necrosis caseosa (Robbins y Cotran, 1985; Levison, 1992; Hopewell y Jasmer, 2005); esta calcificación depende de la eficacia de la respuesta inmune mediada por células, constituida por la llegada de células como linfocitos T y macrófagos y en menor grado los neutrófilos y células asesinas naturales (NK), las cuales pueden tener un efecto micobacteriostático (Dannenberg y Rook, 1994), confiriendo un aislamiento de la zona de infección.

La habilidad de *M. tuberculosis* para mantener una infección crónica y causar enfermedad en un subgrupo de sujetos infectados, depende de sus productos conocidos como factores de virulencia, que capacitan al microorganismo para entrar y sobrevivir indefinidamente dentro de las células fagocíticas mononucleares y por evadir los mecanismos celulares antimicrobianos (Riley, 1995).

La respuesta a la infección por micobacterias es el ejemplo clásico de una respuesta inmune mediada por células a un parásito intracelular facultativo. Las micobacterias, dentro de las células fagocíticas, son capaces de evadir la respuesta humoral y mantenerse viables por largos periodos de tiempo. Las células T toman parte en la activación y regulación de los macrófagos y subsecuentemente en el control del crecimiento micobacteriano (Vanham *et al.*, 1997).

*M. tuberculosis* persiste en los macrófagos dentro de un granuloma en los hospederos infectados. En el granuloma se encuentran macrófagos, células gigantes, células T, células B y fibroblastos. El microorganismo puede estar en un estado inactivo, replicándose activamente pero limitado por la respuesta inmune, o metabólicamente

alterado con ciclos replicativos infrecuentes o limitados. La alteración de la respuesta inmune puede resultar en la reactivación y replicación del bacilo, con necrosis o daño al tejido pulmonar. La respuesta inmune es capaz de prevenir la enfermedad activa en la mayoría de las personas, pero no elimina la infección (Kaufmann, 2001; Wigginton y Kirschener, 2001).

Los factores de virulencia micobacterianos pueden causar un daño directo sobre las células del hospedero o inducir en las células infectadas la expresión de productos celulares como citocinas o enzimas líticas que pueden amplificar el daño de tejido en el individuo (Rook y Bloom, 1994; Kuby, 1994).

Las especies patógenas de *Mycobacterium spp.* al ser internalizadas en los macrófagos, residen inicialmente en una vacuola endocítica llamado fagosoma. Cuando ocurren los ciclos fagosomales normales de la maduración, es decir, fusión fagosoma-lisosoma, estas bacterias pueden encontrar un ambiente hostil que incluye pH ácido, los intermedios reactivos del oxígeno (ROI), las enzimas lisosomales, y péptidos tóxicos, que puede aumentar el daño en el tejido (Smith, 2003; Nathan y Hibbs, 1991); Sin embargo, las micobacterias patógenas, tienen la capacidad de bloquear el proceso de maduración que normalmente siguen los fagosomas; la presencia de la bacteria impide que el pH del organelo descienda hasta alcanzar el grado de acidificación necesario para la activación de los enzimas hidrolíticos. En tales circunstancias, a un pH de  $\cong 6.2-6.3$ , *M. tuberculosis* no sólo queda inaccesible a la acción lisosómica, sino que también pasa a captar hierro vía transferrinas (Crowle *et al.*, 1991; Deretic *et al.*, 2004; Vergne *et al.*, 2005).

Algunos autores proponen que el daño tisular en la infección por *M. tuberculosis* se debe principalmente a la respuesta inflamatoria generada por la infección y es mediada por la activación de TNF- $\alpha$  citotóxico (Flesch, 1990; Filley, 1991; Keane, 1997; Rojas, 1999; Kruys, 1992; Spira, 2003; Gil *et al.*, 2004; Lasco *et al.*, 2005). Estudios *in vitro* también sugieren que la penetración a través del epitelio alveolar puede ocurrir tras la inducción de TNF- $\alpha$  en células infectadas llevando a una reducción en la barrera bioeléctrica normal del epitelio alveolar (Zhang *et al.*, 1997). Sin embargo, en pacientes con tuberculosis y en un modelo murino, se ha observado necrosis pulmonar durante estados avanzados de la enfermedad (Dannenber y Rook, 1994) cuando el nivel de TNF- $\alpha$  en estos tejidos es bajo (Barnes *et al.*, 1990; Hernández-Pando *et al.*, 1997). Esto sugiere que factores adicionales de la bacteria o del hospedero deben estar involucrados en la destrucción del tejido en la tuberculosis.

Durante la respuesta inmune los macrófagos quedan expuestos a citocinas que los llevan a un proceso de activación que permite que los fagosomas superen el bloqueo y dejan a la bacteria bajo la acción hidrolítica del lisosoma. Así mismo, puede iniciarse un proceso de muerte de las células infectadas y dar lugar a la formación del granuloma característico de esta enfermedad (Kaufmann, 2001; Wigginton y Kirschener, 2001; Smith, 2003).

La apoptosis inducida durante la infección por *M. tuberculosis* ha mostrado ser un mecanismo de muerte celular para los mismos macrófagos y para otros tipos de células inmunes cuando son puestas a interaccionar en el mismo modelo (Keane, 1997; Rojas, 1999; Durrbaum-Landmann, 1996; Klingler, 1997; Oddo, 1998). También la apoptosis se ha observado en células epiteloides de granulomas en pacientes con tuberculosis (Keane, 1997; Cree, 1987). De hecho, la apoptosis inducida por bacterias ha sido

propuesta como un importante mecanismo pro-inflamatorio, controlando el crecimiento intracelular y previniendo la diseminación de la infección por otros patógenos intracelulares (Zychlinsky y Sansonetti, 1997) y por lo tanto pudiera desempeñar un papel importante en la patogénesis o control de la tuberculosis.

## 5.4 Factores de virulencia

La virulencia se define como la capacidad relativa de un patógeno de superar las defensas del huésped. Designa el grado de poder letal de un microorganismo y se mide por el número de gérmenes que se necesitan para matar animales de una especie determinada en condiciones establecidas y en un período definido. La virulencia es un fenómeno complejo que no sólo depende de la naturaleza genética del patógeno sino también de la genética y la inmunología del hospedero (Folch, 1966; Jacobs y Bloom, 1994; Smith, 2003).

Un factor de virulencia es fácil de reconocer cuando es un componente que daña directamente al hospedero o evade el sistema inmune, permitiendo sobrevivir al patógeno. *M. tuberculosis* es un parásito intracelular que infecta y se multiplica principalmente en fagocitos, aunque puede infectar células que no son fagocíticas profesionales (Sephard *et al.*, 1956; Bermudez *et al.*, 1996; Mehta *et al.*, 1996; Castro-Garza *et al.*, 2002). Se han hecho considerables esfuerzos en décadas pasadas para identificar factores de virulencia. Se ha demostrado en modelos experimentales con animales susceptibles que la infección con las cepas virulentas de laboratorio H37Rv y Erdman, resulta en destrucción de tejido, diseminación dentro de órganos y muerte (Dunn y North, 1995; Rhoades y Orme, 1997; Dorman *et al.*, 2004).

*M. tuberculosis* es capaz de infectar, multiplicarse intracelularmente y producir citotoxicidad a células en cultivo en la ausencia de muchos de los factores del hospedero (Bermudez y Goodman, 1996; Mehta *et al.*, 1996; Flynn *et al.*, 1995; McDonough y Kress, 1995). Estudios *in vitro* han demostrado que *M. tuberculosis* produce un efecto citotóxico sobre neumocitos humanos o macrófagos que está relacionado con la virulencia de las cepas; este efecto es independiente de TNF- $\alpha$  y del crecimiento micobacteriano en asociación con las células (Castro-Garza *et al.*, 2002; Dannenberg y Rook, 1994; McDonough y Kress, 1995; Mehta *et al.*, 1996; Bermudez y Goodman, 1996; Silver *et al.*, 1998; Birkness *et al.*, 1999; Dobos *et al.*, 2000).

Previo al conocimiento de la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis*, ya se conocían tres factores de virulencia, el gene *Kat G* que codifica para la enzima catalasa-peroxidasa, la cual proporciona protección frente a las especies reactivas de oxígeno producidas por las células fagocíticas en las que crece (Stoeckle *et al.*, 1993); el gen *mce*, que codifica para un factor colonizador de macrófagos (Collins, 1996; Arruda *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 2003); y el gen de un factor sigma, *sig A*, a nivel del cual se dan mutaciones que conducen a la atenuación de la cepa (Berthet *et al.*, 1998). En 1998 se publicó la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* cepa H37Rv (Cole *et al.*, 1998) y a partir de entonces se han publicado varios reportes referentes a otros factores de virulencia.

Entre los factores de virulencia de *M. tuberculosis* que se han descrito, está el codificado por el gen *eis* que se ha relacionado con un aumento en la sobrevivencia intracelular (Dahl *et al.*, 2000), las proteínas de unión a fibronectina asociadas con adhesión e invasión (Schorey *et al.*, 1995), así como la esfingomielinasa y otras hemolisinas que podrían desempeñar un papel importante en la degradación de la membrana fagolisosomal (Johansen *et al.*, 1996; King *et al.*, 1993; Leao *et al.*, 1995; Vargas-Villarreal *et al.*, 2003; Vera-Cabrera *et al.*, 2003).

También se han reportado estructuras como la lipoarabinomanana manosilada (ManLAM), un componente de la pared micobacteriana considerado un potente inductor de la producción de TNF- $\alpha$  por macrófagos (Chatterjee *et al.*, 1992a; Chatterjee *et al.*, 1992b; Rojas *et al.*, 2000).

Las proteínas de choque térmico y sulfolípidos inducen la liberación de citocinas amplificando así el proceso de inflamación, sin embargo las proteínas de choque térmico no tienen un papel definido en la virulencia de *M. tuberculosis* (Rook y Bloom, 1994). Otro factor reportado es el de acordonamiento, el cual induce necrosis y destrucción de tejido (Krahenbuhl, 1995).

Las fosfolipasas y esfingomielinasas son enzimas que hidrolizan fosfolípidos, lo que podría facilitar la entrada bacteriana al macrófago degradando la membrana celular; también se le ha atribuido actividad citotóxica y puede alterar los mecanismos de señalización celular llevando a la muerte celular (Wheeler y Ratledge, 1991; King *et al.*, 1993; Thorson *et al.*, 2001; Raynaud *et al.*, 2002; Vera-Cabrera *et al.*, 2003; Hernández-Vera, 2003; Vargas-Villarreal *et al.*, 2003; Vera-Cabrera *et al.*, 2006).

Entre otros posibles factores de virulencia se encuentran ciertas proteínas de almacenamiento, especializadas en la captación de factores de crecimiento, permitiendo la persistencia del bacilo en un fagosoma carente de nutrientes; así por ejemplo, se han identificado los genes *bfrA* y *bfrB*, que codifican para unas proteínas semejantes a la ferritina que integran un sistema de captación de hierro (Gold *et al.*, 2001).

## 5.5 Modelos para estudiar virulencia

Para poder conocer los factores o genes involucrados durante la patogenia de la tuberculosis, se han reportado diferentes formas para estudiar el proceso de infección, tales como modelos animales y cultivo de tejidos, usando principalmente macrófagos. El estudio en animales podría ser más representativo porque pueden ser estudiadas todas las etapas de la enfermedad, sin embargo el mantener los animales suele más caro y laborioso debido al manejo y alimentación, además de mayores restricciones de tipo ético que existen actualmente. Los modelos de cultivos de tejidos de mamífero son más fáciles de manejar y dan resultados más rápidos (Smith, 2003). El uso de los modelos *in vitro* nos proporciona ciertas ventajas como mantener un medio ambiente controlado, caracterización y homogeneidad de la muestra. Por economía, permiten trabajar a gran escala y en forma mecanizada. Además están bien justificados y son bien aceptados desde el punto de vista de la ética (Freshney, 2000).

Debido a que los macrófagos alveolares humanos son difíciles de obtener, generalmente se usan modelos de macrófagos que pueden ser de ratón o humano y pueden ser tanto de cultivos primarios como de líneas establecidas. Los monocitos de sangre periférica que son diferenciados en macrófagos son de los más usados en este tipo de experimentos. Es también común el uso de la línea celular de monocitos humanos THP-1, que pueden ser diferenciados a células fagocíticas, similares a macrófagos por la adición de ésteres de forbol (Smith, 2003; Tsuchiya *et al.*, 1980). Algunos estudios han mostrado que los macrófagos THP-1 diferenciados son similares a los macrófagos periféricos en la respuesta a la infección de *M. tuberculosis* (Stokes y Doxsee, 1999).

El daño celular puede ser estimado o parcialmente cuantificado mediante el análisis de los cambios morfológicos (redondeamiento celular y pérdida de la integridad de la monocapa) (Fisher *et al.*, 1996; Daniel *et al.*, 2004), estableciendo una escala del porcentaje de células redondeadas y/o desprendidas (Read *et al.*, 1974) o mediante un conteo de las células degradadas por microscopía electrónica (McDonough y Kress, 1995). Sin embargo, estos procedimientos son semi-cuantitativos. Existen también métodos cuantitativos más precisos, pero que requieren tiempos largos para ser llevados a cabo, como la medición de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) o la medición de los complejos DNA-histonas por ELISA (Dobos *et al.*, 2000; Danelishvili *et al.*, 2003).

La exclusión o inclusión de colorantes vitales no son métodos prácticos para modelos de infección con *M. tuberculosis* por el manejo directo de las muestras. El uso de marcadores radiactivos, aunque más sensible, incrementaría el nivel de bioseguridad, en tanto que el uso de compuestos como MTT, WST-1 y otras sales de tetrasolio que son reducidos por micobacterias (Gomez-Flores *et al.*, 1995; Franzblau *et al.*, 1998), así como por macrófagos en cultivo (Ferrari *et al.*, 1990) no serían adecuados para ser usados en un modelo de infección *in vitro* como el nuestro, pues los datos obtenidos serían dados tanto por la reducción del compuesto por las células como por las bacterias, resultando en una imprecisión en los valores de absorbancia.

El cristal violeta (CV) es una tinción de trifenilmetano también conocida como violeta de genciana. La aplicación más utilizada para esta tintura es la tinción de Gram, la cual divide las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas. Gillies en 1986 usó CV para determinar el número de células en cultivos de monocapa en función de la absorbancia dada por el colorante tomado por las células. Desde entonces, este método ha sido usado por modificaciones para varias aplicaciones. En este trabajo se implementó un método para cuantificar el efecto citotóxico de *M. tuberculosis* sobre monocapas de la línea celular THP-1.

Durante los últimos 10 años, los principales avances en el estudio de *M. tuberculosis*, se han realizado en la innovación de técnicas en bacteriología molecular. Donde se incluye la generación de vectores de transformación para su uso tanto en *Escherichia coli* como en micobacterias no tuberculosis; protocolos de electroporación para incluir esos plásmidos dentro de las micobacterias y cassettes de promotores, lo cual puede ser usado para dirigir la expresión de genes clonados en las micobacterias (Mahan *et al.*, 1993; Mahan *et al.*, 1995).

La identificación de genes que se expresan diferencialmente entre cepas atenuadas contra cepas virulentas de *M. tuberculosis* es otra forma de entender los mecanismos de virulencia y patogenicidad de tuberculosis. La hibridación sustractiva ha sido usada para

identificar y clonar genes que son expresados diferencialmente por las micobacterias al crecer en medios de cultivo bajo diferentes condiciones o durante la infección de células, aportando avances significativos que han permitido abordar el estudio de características genéticas relacionadas con patogenicidad, factores de virulencia y las interacciones hospedero-micobacteria (Rivera-Marrero *et al.*, 1998; Manganelli *et al.*, 1999; Rindi *et al.*, 1999; Fenhalls *et al.*, 2002; Gaede *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005). El estudio de la inducción de la expresión de genes de *M. tuberculosis* durante la infección a macrófagos humanos ha permitido identificar genes que se expresan exclusivamente bajo estas condiciones y ha aportado un mejor conocimiento de los factores expresados durante la infección en cultivos celulares (Silver *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998; Torzón *et al.*, 2001; Wigginton y Kirschener, 2001; Mariani *et al.*, 2000; Dubnau *et al.*, 2002; Dubnau *et al.*, 2003; Raynaud *et al.*, 2002; Danelishvili *et al.*, 2003; Tullius *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Rachman *et al.*, 2006).

Actualmente una de las técnicas más prometedoras para la investigación biomédica es la proteómica, la cual consiste en designar la totalidad de proteínas codificadas por un genoma. El término proteoma ha pasado de ser un concepto difuso y abstracto a ser un término funcional asociado a una realidad material. Así pues, la proteómica es el estudio en gran escala de las proteínas; lo más común es la separación de proteínas por electroforesis de doble dimensión, y su identificación por espectrometría de masas (Brodin *et al.*, 2005); y métodos bioquímicos (Valdiosera, 2006). Actualmente el término proteómica cubre gran parte, si no la totalidad, del análisis funcional de los productos génicos (genómica funcional), desde la localización en gran escala o el estudio de la expresión de miles de proteínas simultáneamente (Valdiosera, 2006). En el caso de *M. tuberculosis*, para el cual se conoce la secuencia completa del genoma, ésta metodología ayudará para establecer las funciones de las proteínas expresadas en diferentes condiciones.

En general, para explicar la virulencia de las micobacterias, los genes que se han tratado de identificar, son los implicados en la entrada, supervivencia y multiplicación intracelular. Sin embargo, para *M. tuberculosis* no se conocen con exactitud todos los factores específicos ni los mecanismos de acción que tienen la capacidad de producir directamente o inducir el daño observado para causar enfermedad. Bajo estas premisas, en este proyecto se analizó la interacción entre cultivos celulares y *M. tuberculosis*, y la expresión de genes específicos durante la interacción bacteria-célula que pudieran estar involucrados en la virulencia del microorganismo para aportar un mejor entendimiento del mecanismo patogénico de *M. tuberculosis* y contribuir en el desarrollo futuro de mejores estrategias preventivas (vacunas) y terapéuticas (medicamentos) para el control de la enfermedad.

## **5.6 Planteamiento del problema**

A pesar de encontrarnos en el siglo XXI, la tuberculosis mata a más personas adultas que cualquier otra enfermedad infecciosa y constituye uno de los mayores retos de la Salud Pública en el mundo. Es de gran importancia en la actualidad proveer de nuevos

conocimientos que nos permitan proponer nuevas y más efectivas medidas diagnósticas, terapéuticas y preventivas para esta afección. Para el desarrollo de tales medidas es necesario identificar los mecanismos y las moléculas implicados en ellos.

*M. tuberculosis* es un microorganismo que produce y/o induce daño celular, pero no se había descrito un modelo cuantitativo que determinará diferencias en el daño citotóxico producido por cepas de diferente virulencia, por lo que se desarrolló un ensayo para cuantificar la variabilidad de la citotoxicidad producida por cepas de *M. tuberculosis* en cultivos de macrófagos.

La identificación de genes que se expresan selectivamente durante la infección celular permite determinar que productos génicos están involucrados en el proceso de infección y ayudaría a determinar su función específica en la patogénesis de la tuberculosis.

## 5.7 Justificación

De acuerdo a la OMS, la tuberculosis se ha incrementado considerablemente en los últimos años y se estima que si no se hace algo para poder solucionar este problema, habrá alrededor de 8 millones de personas cada año infectadas por causa de esta enfermedad.

La capacidad de las micobacterias para inducir una infección, depende de la virulencia que los microorganismos poseen genéticamente y de los genes que son expresados bajo ciertas condiciones para entrar y sobrevivir indefinidamente dentro de las células fagocíticas.

Se ha demostrado en modelos animales susceptibles que la infección con las cepas virulentas H37Rv y Erdman de *M. tuberculosis*, resulta en destrucción de tejido, diseminación dentro de órganos, por lo que consideramos importante tener una herramienta para determinar cuantitativamente la citotoxicidad de cepas de *M. tuberculosis* en un cultivo estandarizado *in vitro* y que corresponda al análisis visual por microscopía de la citotoxicidad producida por las diferentes cepas de *M. tuberculosis*.

Se han hecho considerables esfuerzos en décadas pasadas para identificar factores de virulencia de *M. tuberculosis*. Los descritos hasta ahora; dan un mejor entendimiento de sus mecanismos de acción; sin embargo, no se han identificado plenamente todos los factores genéticos que pudieran estar involucrados en la patogenia de la enfermedad y que podrían ser determinados con diversas técnicas de estudio, principalmente tratando de simular las condiciones a las que se enfrenta la bacteria durante la infección, tal como el modelo de infección de monocapas celulares que se realizó en este trabajo.

De acuerdo a lo antes mencionado, es clara la necesidad de generar conocimiento que nos permita identificar los mecanismos que utilizan las micobacterias para inducir enfermedad y de esta forma formular nuevas medidas para el control de la enfermedad.

## 5.8 Importancia del trabajo

Con esta investigación, se aporta un modelo cuantitativo para comparar el efecto citotóxico producido por cepas de *M. tuberculosis* con diferente virulencia en cultivos de macrófagos. También se desarrolló un modelo para estudiar la expresión de genes específicos durante la infección a cultivos de macrófagos, el cual puede ser usado con otras líneas celulares como la línea de células epiteliales de pulmón A549.

Con estos modelos, podemos medir la citotoxicidad de diversas cepas, ya sean aislados clínicos o cepas que han sido modificadas genéticamente llevando a la atenuación de ciertos genes que pudieran estar involucrados en estos eventos y así ampliar el conocimiento de estos microorganismos. En este trabajo determinamos que el gen MT0253, con probable función de oxidoreductasa, se expresa durante la fase activa de crecimiento tanto en cultivo como durante la infección a macrófagos, pero falta por determinar su función en la patogénesis de la tuberculosis.

## 6. MÉTODOS

### 6.1 Diseño experimental

Para la realización de este trabajo dividimos el protocolo de investigación en 4 etapas: a) análisis de la actividad citotóxica, donde se analizó la integridad de los cultivos por microscopía y se cuantificó la actividad por el ensayo de TCV; b) estandarización y optimización del aislamiento de RNA de bacterias en medio de cultivo y en interacción con macrófagos; c) producción de cDNA a partir del RNA obtenido en la etapa previa; d) amplificación de genes bacterianos en las diferentes condiciones estudiadas y seleccionados de acuerdo al criterio que se explica más adelante. El análisis estadístico para los diferentes ensayos se describe en cada apartado correspondiente en la sección de métodos o de resultados.

### 6.2 Línea celular

Se utilizó la línea celular de monocitos humanos THP-1; ésta se obtuvo originalmente de un paciente con leucemia monocítica aguda (ATCC: TIB-202) (Tsuchiya *et al.*, 1980). 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 CO<sub>2</sub> en frascos de cultivos de 25 cm<sup>2</sup> (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) (Asseffa *et al.*, 1993; Tsuchiya *et al.*, 1980). Esta línea celular ha sido ampliamente usada para el estudio de la virulencia de diferentes microorganismos, incluyendo *M. tuberculosis*, (Shattock *et al.*, 1993; Friedland *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1998; Lee y Horwitz, 1999; Tchou-Whong *et al.*, 1999; Agranoff *et al.*, 1999; Kusner y Adams, 2000; Miller y Shinnick., 2000; Armitige *et al.*, 2000; Riendeau y Kornfeld, 2003).

### **6.3 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, los cultivos de 4 días de crecimiento se centrifugaron a 200 Xg por 10 minutos a temperatura ambiente; el medio usado se eliminó y se hizo un conteo celular en un hemocitómetro. La densidad celular se ajustó a  $5 \times 10^5$  células por mililitro con RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB). Al medio se le adicionó 1  $\mu$ l/ml de forbol-miristrato-acetato (PMA) 10  $\mu$ M diluido en Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Calbiochem). Se distribuyó 1 ml de la suspensión celular en cada uno de los pozos de una microplaca de 24 pozos. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub> por 48 horas evitando movimientos por ese tiempo y se lavaron con 2 ml de RPMI precalentado a 37°C con movimientos rotatorios suaves. El medio de lavado se descartó, se agregó 1 ml de RPMI con 10% de SFB nuevo y se incubó otras 48 horas con las mismas condiciones. Al término de este período las células transformadas en macrófagos estaban listas para infectarse.

### **6.4 Evaluación de la viabilidad celular por ensayo de WST-1**

Antes de infectar los cultivos celulares, el número de células viables por pozo se determinó usando una prueba de WST-1. WST-1 es una sal de tetrazolio que puede ser reducida por deshidrogenadas de células vivas liberando un producto colorido que puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 545 nm. Los valores de absorbancia tienen una relación lineal con el número de células vivas; el promedio de tres pozos por microplaca, se interpoló en una curva estándar de densidad celular y se usó como el número de células por pozo para cada experimento independiente.

### **6.5 Cepas de *Mycobacterium tuberculosis***

Se utilizaron las cepas H37Rv, CDC-1551y DR-689 de *M. tuberculosis*. La cepa H37Rv, desde su aislamiento en 1905, ha sido ampliamente utilizada en estudios médicos y de investigación, ha conservado la virulencia, es sensible a los distintos fármacos y susceptible de ser modificado genéticamente con facilidad (Cole, 1998; Brosch, 1998; Philipp, 1996). La cepa CDC-1551 fue aislada en 1998 a partir de un brote en una pequeña comunidad rural en Estados Unidos de América, la cepa aislada con características de crecimiento que excedieron grandemente los de otros aislamientos clínicos ha sido considerada una cepa más virulenta que H37Rv (Valway, 1998). Tanto la cepa H37Rv como la CDC1551 fueron donadas por el Centro de Control de

Enfermedades en Atlanta, Georgia, Estados Unidos. La cepa DR-689 es un aislado clínico de baja virulencia donada por el Laboratorio Nacional de Referencia para la tuberculosis en Winnipeg, Canadá, esta cepa carece del locus completo de fosfolipasa C y es reportada de baja citotoxicidad para células en cultivo (Hernández-Vera, 2003) y por su perfil de RFLP pertenece al grupo Beijing (Vera-Cabrera *et al.*, 2006).

Para obtener lotes de cultivos bacterianos estables a través de todo el estudio, realizamos cultivos en volúmenes de 100 ml de medio Middlebrook 7H9 (Difco, Sparks, MD) suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y 0.2 % de glicerol (J.T.Baker, Xalostoc, Edo. Méx.) a 37°C con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Los cultivos se realizaron en frascos tipo “roller bottle” de 490 cm<sup>3</sup> (Corning, Acton, MA) debido a la amplia superficie del cultivo lo que permite un mejor intercambio de gases y un mejor crecimiento de la bacteria. Después de 7 días de incubación, las bacterias se lavaron con medio Middlebrook 7H9 fresco con 0.2 % de glicerol y se resuspendieron en el mismo medio. La suspensión bacteriana se distribuyó en viales de 1.5 ml en criotubos con tapón de rosca estériles y se congelaron a -70°C hasta su uso.

## **6.6 Determinación de la densidad bacteriana**

En el transcurso de la semana posterior a la congelación se tomaron tres tubos para determinar el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml). Los tubos se agitaron en vórtex (Corning, Acton, MA) hasta que la suspensión se observó homogénea con mínimos agregados bacterianos, se hicieron diluciones décuples por triplicado desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> con medio Middlebrook 7H9 con glicerol y se sembraron en cajas petri con 15 ml de agar Middlebrook 7H10 con OADC, dejándolas incubar por 21 días a 37°C. Se observó que el tamaño de las colonias era homogéneo y se tomaron en cuenta las cajas conteniendo entre 20 y 200 colonias para hacer el conteo. Los cálculos se realizaron de acuerdo al factor de dilución para determinar el número de UFC/ml.

## **6.7 Extracción de DNA genómico de micobacterias**

Las bacterias se cultivaron en 5 ml de medio Middlebrook 7H9 (Gibco, Sparks, MD) por 14 días a 37°C. Después de la incubación, el cultivo se centrifugó a 17,000 Xg durante un minuto y el sedimento se transfirió a un tubo de plástico de 2.0 ml que contenía una esfera de cerámica de ¼ y perlas de sílica que son parte del estuche de extracción Fast DNA.Kit (BIO101, Inc., Carlsbad, Ca.). Los tubos conteniendo las bacterias se centrifugaron a 17,000 Xg por 5 minutos y se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 200 µl de medio en el tubo. Posteriormente se agregó a cada tubo 1 ml de solución de extracción CLS-TC para después procesarlos en el aparato Fast-Prep

por 2 ciclos de 30 segundos a una velocidad de 5.0 m/seg, con intervalos entre ciclos de 2 minutos inmersos en hielo. Luego, los tubos se colocaron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron de nuevo a 17,000 Xg por 10 minutos. Se transfirieron 600 µl del sobrenadante a un tubo nuevo donde se le agregaron 600 µl de matriz de captura del estuche de extracción (Binding Matrix), los tubos fueron mezclados suavemente por inversión e incubados a temperatura de laboratorio por 5 minutos. Los tubos se centrifugaron a 17,000 Xg por un minuto y se eliminó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en 500 µl en la solución del estuche de extracción denominada SEWS-M y se centrifugó nuevamente a 17,000 Xg por un minuto para posteriormente eliminar el sobrenadante y centrifugar por otros 10 segundos para remover todo el líquido residual. Para eluir el DNA de la matriz de captura, esta se resuspendió en 100 µl de agua destilada y se dejó incubar por 3 minutos a temperatura de laboratorio; se centrifugó a 17,000 Xg y el sobrenadante obtenido conteniendo el DNA, fue almacenado a -20°C hasta su cuantificación y uso.

## **6.8 Ensayo de citotoxicidad bacteriana**

Monocitos humanos THP-1 fueron transformados a macrófagos con PMA y cultivados en microplacas como se describe anteriormente. Las microplacas de 24 pozos con  $1 \times 10^5$  células por pozo, se infectaron con *M. tuberculosis* a diferente multiplicidad de infección (MDI); las MDI utilizadas fue de 10:1, 1:1, 0.1:1 (bacterias/macrófagos) y se incubaron por tiempos variables como se describe para cada experimento a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. El total del inóculo bacteriano se conservó en los cultivos celulares a lo largo de todo el experimento.

El efecto citotóxico fue evaluado por integridad de los cultivos y búsqueda de daño celular cada 24 horas mediante microscopía de contraste de fases, así como cuantitativamente por el ensayo de tinción con cristal violeta (TCV) que describimos adelante. Como cultivos testigos usamos cultivos celulares no infectados y observados a los mismos intervalos de tiempo de incubación.

## **6.9 Cuantificación de citotoxicidad por el ensayo de tinción con cristal violeta (TCV)**

Como ya se ha mencionado, debido a la propia naturaleza lipídica de la pared de las micobacterias, ésta no permite la penetración del cristal violeta. Tomando esta característica como ventaja, desarrollamos este método para cuantificar específicamente el daño producido por *M. tuberculosis*.

Evaluamos los valores de absorbancia obtenidos en monocapas de células THP-1 con diferente densidad conocida para tener una curva estándar relacionando el número de células por pozo y el valor de absorbancia producido por el cristal violeta tomado por las células.

Para probar el método con un agente citotóxico, usamos Tritón X-100, el cual es un detergente aniónico que disuelve la membrana celular llevando la célula a la muerte. Se utilizó Tritón X-100 a una concentración de 0.02 a 0.1%.

Para determinar la influencia de las micobacterias en los valores de absorbancia producidos durante la infección se infectaron por triplicado cultivos de monocitos humanos THP-1 transformados a macrófagos en microplacas de 24 pozos; se infectaron con las cepas DR-689 y H37Rv de *M. tuberculosis* a una MDI hasta de 10:1 (bacterias:celulas) y se incubaron por 6 h en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %, tiempo suficiente para permitir la internalización de las bacterias, pero sin producir daño celular. Para todos los demás casos donde se determinó la citotoxicidad, los cultivos se incubaron hasta por 72 h. Como cultivo testigo de las buenas condiciones celulares se procesaron 3 pozos con cultivos no infectados para cada tiempo de incubación.

A los cultivos celulares infectados y testigo negativo, se les retiró el medio y se fijaron con 500 µl por pozo de formalina neutra al 10 % o glutaraldehído al 1% por 24 horas a 4°C. La solución fijadora se retiró y se adicionaron 500 µl de solución acuosa de cristal violeta al 0.1 % en cada pozo. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación suave. Los microplacas se lavaron por sumersión en un recipiente con agua corriente por 15 minutos, se dejaron secar a temperatura ambiente por no mas de 1 h y luego se adicionaron 500 µl de Tritón X-100 al 0.2 % a cada pozo, incubando las microplacas por 30 minutos a temperatura ambiente con suave agitación para disolver el colorante. Se tomaron 100 µl de cada pozo y se transfirieron a un pozo de una microplaca de 96 pozos y se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 600 nm en un lector de microplacas (Sigma Diagnostic, EIA Multi-well reader M-2101, St. Louis, MO).

El análisis cuantitativo de la citotoxicidad sobre los cultivos infectados con *M. tuberculosis*, se calculó luego de restar a cada valor de absorbancia el promedio de los pozos blanco correspondiente a pozos tratados con el procedimiento de tinción pero sin células. La citotoxicidad se definió como el porcentaje de muerte celular por la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Células muertas} = \frac{\text{Control D.O.} - \text{Muestra D.O.}}{\text{Control D.O.}} \times 100$$

Donde,

Control: cultivo no infectado;

Muestra: cultivo infectado con *M. tuberculosis*;

*D.O.*: Densidad óptica equivalente al valor de absorbancia.

## **6.10 Infección de macrófagos con cepas de *M. tuberculosis* y recuperación de bacterias para la extracción de RNA**

Cultivos de monocitos humanos THP-1 transformados a macrófagos en microplacas de 24 pozos se infectaron con *M. tuberculosis* cepa CDC-1551 con una MDI de 1:1 y se incubaron por 2, 6 y 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> como se describió anteriormente.

A cada tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 0.5 ml de agua destilada estéril a cada uno de los pozos para romper las células. Los cultivos se incubaron por 5 minutos y se colectó todo el contenido de los pozos de cada tiempo de infección en un tubo cónico de 50 ml de polipropileno (Labcon, San Rafael, CA.). Los tubos se centrifugaron a 1000 Xg por 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, mientras que el sedimento conteniendo las bacterias recuperadas tras la infección a los macrófagos fue utilizado para la extracción de RNA como se describe en detalle más adelante.

## **6.11 Extracción de RNA de micobacterias**

Para la extracción de RNA bacteriano, la cepa CDC-1551 de *M. tuberculosis* se incubó en medio 7H9 suplementado con OADC por 7 días a 37°C o en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino por 2, 6 y 24 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. También se realizó la extracción de RNA de las bacterias infectando macrófagos a los tiempos de 2, 6 y 24 h de incubación.

El RNA de las bacterias crecidas en los medios de cultivo, como de las recuperadas de los cultivos celulares fue aislado mediante el sistema FAST-PREP FP 120, BIO 101 Inc, utilizando el estuche FastRNA® Kit – Blue (BIO 101 Inc, Carlsbad, CA) siguiendo el protocolo dado por el fabricante con algunas modificaciones para optimizarlo como se describe a continuación. En un tubo con tapón de rosca de 2 ml conteniendo una matriz de sílica para la ruptura de la pared de la micobacterias, se colocó una perla cilíndrica de cerámica ¼'' y se adicionaron 500 µl de CRSR-Blue, 500 µl de PAR y 500 µl de CIA. A esta mezcla se adicionaron 200 µl de suspensión bacteriana como máximo. El tubo conteniendo la muestra se colocó en el equipo FAST-PREP y se procesó por 3 ciclos de 45 segundos a una velocidad de 6 m/seg con intervalos en hielo de 1 minuto. Al término de los ciclos de lisis, se incubó en hielo por 5 minutos, se centrifugó a 17,000 Xg por 15 minutos y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo eppendorf de 1.5 ml. Se adicionaron 500 µl de CIA a la fase acusa, se agitó por 10 segundos y se centrifugó a 17,000 Xg por 2 minutos para separar las fases. La fase superior se pasó a un tubo nuevo teniendo mucho cuidado de no contaminar la muestra con la interfase, se adicionaron 500 µl de DIPS mezclando por inversión e incubando la mezcla por 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 17,000 Xg por 5 minutos para

obtener el RNA precipitado. El precipitado se lavó con 500  $\mu$ l de la solución SEWS, centrifugando a 17,000 Xg y el sobrenadante se removió para dejar secar la muestra por 15 minutos. Finalmente la muestra de RNA aislado se disolvió en 50  $\mu$ l de SAFE. Para eliminar restos de DNA en nuestra muestra, la sometimos a digestión con DNAsa (RQ1 RNase-Free Dnase – Promega, Madison, USA) a una concentración de 1U/ $\mu$ g de RNA a 37°C por 30 minutos. La concentración de RNA fue estimada como se describe más adelante.

Un método alternativo descrito por Mahenthiralingam (1998) y con modificaciones realizadas en el laboratorio para aislar el RNA con mejores rendimientos fue utilizado: las micobacterias se cosecharon por centrifugación a 3,000 Xg por 10 min. Posteriormente se resuspendieron en 1-2 ml de Tween salino y se transfirieron a un tubo de 2 ml para ser centrifugadas a 17,000 Xg por 1 min. Se removió el sobrenadante, se añadió 1 ml de solución GEB y se resuspendió usando una micropipeta. Se transfirió 1 ml de la suspensión a los tubos del Fast-RNA kit, los cuales se sometieron en el equipo Fast Prep (FP120, BIO 101 Inc., Carlsbad, CA) a 3 ciclos de lisis a velocidad de 6 m/seg por 20 segundos con intervalos en hielo de 1 min. La muestra procesada se centrifugó a 17,000 Xg por 1 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Para recobrar lo que se quedó atrapado entre las perlas, se adicionaron 0.8 ml de cloroformo al tubo con las perlas, se resuspendió y fue centrifugado a 17,000 Xg por 1 min. La fase acuosa se recuperó y se juntó con el sobrenadante recobrado previamente. Se añadió 1 volumen de fenol neutro:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó hasta que se formó una emulsión uniforme. Luego se centrifugó a 17,000 Xg por 3 min y se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, cuidando de no tomar nada de la interfase. Se adicionó 1 volumen de cloroformo a la fase acuosa y se agitó hasta formar una emulsión homogénea y se centrifugó a 17,000 Xg por 1 min. La fase acuosa resultante fue transferida a tres tubos nuevos (300  $\mu$ l por tubo) y se adicionaron 3 volúmenes de etanol al 95% (900  $\mu$ l) previamente enfriado a -20°C; se mezcló por inversión y se colocaron los tubos a -70°C por 30 min. Al término de este tiempo, la muestra se centrifugó a 17,000 Xg por 20 min. El sobrenadante se removió cuidadosamente y se añadieron 0.5 ml de etanol al 70%. La muestra se centrifugó brevemente, se retiró el etanol y se dejó secar por 10 min (sin dejarla secar por completo para facilitar la resuspensión). El precipitado se disolvió en 400  $\mu$ l de GEB fresco. A partir de aquí se realizó un segundo proceso de purificación, repitiendo los pasos descritos anteriormente, hasta dejar la muestra luego del lavado con los alcoholes. El precipitado se solubilizó en 100  $\mu$ l de la solución de digestión para DNAsas (Promega, Madison, USA) por 10 min. Luego, se añadieron 10 unidades de DNase libre de RNAsas y se incubaron por 1 h a 37° C. Para remover las DNAsas, se colocaron 100  $\mu$ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se repitió nuevamente el proceso de purificación de RNA. El precipitado formado después del paso del etanol se disolvió con agua-DEPC (diethyl pirocarbonato) (de 10 a 50  $\mu$ l) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

## **6.12 Extracción de RNA de macrófagos**

El RNA de macrófagos se extrajo para utilizarlo como testigo negativo para las reacciones de PCR. Se probaron cada uno de los pares de iniciadores diseñados para los genes de interés de *M. tuberculosis* en reacciones de PCR con el RNA de macrófagos para comprobar que no hubiera amplificación producida por alguna secuencia homóloga presente en el RNA de los macrófagos y que pudiera dar falsos positivos en los ensayos de infección en macrófagos. Se trabajó con la línea celular de monocitos humanos THP-1 transformadas a macrófagos bajo las condiciones descritas previamente. La monocapa se lisó con 100  $\mu$ l de agua destilada por 5 minutos; se recuperó la suspensión y se mezcló con 1 volumen de Tween salino y se prosiguió con el protocolo alternativo de extracción de RNA de Mahenthalingam (1998) modificado ya descrito.

## **6.13 Electroforesis en agarosa para RNA**

El RNA aislado fue visualizado en geles de agarosa al 1.5% en condiciones desnaturalizantes. La agarosa se disolvió en solución MOPS 1X preparada con agua DEPC adicionado con 0.66 M de formaldehído en un volumen final de 30 ml.

Diez microlitros de cada muestra fueron mezclados con 0.2  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Research Organic Inc., Cleveland, OH.) y 2  $\mu$ l de solución de carga 5X. Las muestras se cargaron en el gel y se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal (E-C minicel, Holbrook, NY, USA) por 45 minutos con una fuente de poder (Fotodyne., Ney Berlin, WI.) a 80 V; la visualización se hizo en un emisor de luz UV (Fotodyne., Ney Berlin, WI.).

## **6.14 Determinación de la concentración de RNA**

La concentración de RNA fue determinada en un espectrofotómetro UV/VIS marca (Perkin Elmer, MBA 2000, Norwalk, CT). Se tomó 1  $\mu$ l de la muestra y se mezcló con 49  $\mu$ l de agua milli Q para quedar a una dilución de 1:50, se colocó en la celda y se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

## 6.15 Selección de genes

Se seleccionaron genes específicos de *M. tuberculosis* para analizar su expresión en las diferentes condiciones que estudiamos. La selección se basó en dos criterios: a) genes del género *Mycobacterium* que han sido sugeridos como probables factores de virulencia, pero aún sin función determinada y b) genes de virulencia presentes en otros microorganismos patógenos y que pudieran tener secuencias homólogas y por lo tanto funciones similares en *M. tuberculosis*.

La búsqueda de información sobre los genes sugeridos como probables factores de virulencia y la secuencia correspondiente a estos genes, se realizó en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>.

De los genes con función desconocida, pero con probable función en virulencia de acuerdo a la base de datos del genoma micobacteriano se buscaron en el sitio de The Wellcome Trust Sanger Institute <http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=gmt>.

Los pares de iniciadores para amplificar secuencias específicas correspondientes a los genes seleccionados por PCR, se diseñaron mediante el programa “Primer 3” localizado en la página web [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

Para comprobar la especificidad de los iniciadores diseñados para cada uno de los genes realizamos una búsqueda “Blast” en el genoma de *M. tuberculosis* en [http://www.sanger.ac.uk/Projects/M\\_tuberculosis](http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis) y en <http://tigrblast.tigr.org/cmrbblast/>. Los iniciadores de 14 genes seleccionados en base a una probable función de virulencia (tabla 1) se sintetizaron por MWG, Biosource (Nivelles, Bélgica).

Los genes se identificaron de acuerdo a la nomenclatura dada en el sitio de TIGR. Los genes a los cuales no se les ha definido función se identificaron como MT0003, MT0024, MT0040, MT0259, MT0655, MT0876, MT1524. El resto de los genes analizados son: MT3917 (*erp*), MT2783 (*sigB*), MT3989 (*Esat6*), MT1525 (*InvB*), MT2416 (*plcA*), MT2415 (*plcB*), MT2414 (*plcC*).

MT3989 (*Esat6*) fue utilizado como control positivo de expresión constitutiva (Dubnau y Smith, 2003; Pollock y Andersen, 1997; Mariani *et al.*, 2000) y MT2416 (*plcA*), utilizado como control positivo de expresión inducible dentro de macrófagos (Raynaud *et al.*, 2002).

Nº	Gene	Nombre	Iniciadores	Tamaño
1	MT0003	S/I	5´-CCGAAGTACACGTGATGTGG- 3´ 5´-GCGCAACACCCTCTCATATT- 3´	171
2	MT0024	S/I	5´-CCGAACCTCGACATTCTCCAT- 3´ 5´-GCCATACCGGTTATCACGTC- 3´	154
3	MT0040	S/I	5´-GTCATCACCTACCGCAACCT- 3´ 5´-ATCCCAACGGGTCATACAGA- 3´	199
4	MT0259	S/I	5´-CAAAAACGGGGACAGGTTTC- 3´ 5´-GACCTGGTTGACCCGTAAGA- 3´	155
5	MT0655	S/I	5´-ATCCGTTGCCGATATGGA - 3´ 5´-GACCCGAATGATCTCCACAC- 3´	214
6	MT0876	S/I	5´-CGACTTCGAGCACTTTCTCC- 3´ 5´-TACGTCGCTGGACAGCAATA- 3´	151
7	MT1524	S/I	5´-GCCAGGCTTCTGAATACGTG- 3´ 5´-CCCAGCAAACGAGTACAACA- 3´	161
8	MT3917	<i>erp</i>	5´-ATCCTCGGTGATCCAACACT- 3´ 5´-GACGGCATTAGCACACCTTT- 3´	152
9	MT2783	<i>sigB</i>	5´-GGCATTCCAATCGACAAGAT- 3´ 5´-CGGATGTCGGTGTGTAACAG- 3´	173
10	MT3989	<i>esat6</i>	5´-ATGACAGAGCAGCAGTGGAA- 3´ 5´-GTCCCATTTTTGCTGGACAC- 3´	177
11	MT1525	<i>invB</i>	5´-AGGCCGTCGAATATGTGATT- 3´ 5´-CGGCGTTGTACTGATCACC - 3´	204
12	MT2416	<i>plcA</i>	5´-ACTCCTCGGAATGTCACGTC- 3´ 5´-TTCTCCTGCATCAGCAACAC- 3´	168
13	MT2415	<i>plcB</i>	5´-ACCTGCCCATTCACTACCTG- 3´ 5´-TGTAGTGCTGCAGAGGTTGG- 3´	180
14	MT2414	<i>plcC</i>	5´-TAACGGGTATGTGGGCAGTT- 3´ 5´-GAATGACGGATGTTCCGACT- 3´	172

**Tabla 1.** Lista de iniciadores utilizados. El nombre de identificación de cada gene corresponde al dado por “The Wellcome Trust Sanger Institute” para el genoma de *M. tuberculosis* cepa CDC-1551. (S/I = sin función definida).

## **6.16 Producción de DNA complementario (cDNA)**

A partir del RNA obtenido de las micobacterias cultivadas en el medio 7H9 o RPMI-1640, de las micobacterias recuperadas de los cultivos infectados y de RNA de los macrófagos sin infectar, se sintetizaron los cDNA por la reacción de transcriptasa reversa (RT).

La reacción de Transcriptasa Reversa se realizó con el sistema ImProm-II (Promega A3800; Madison, USA). La mezcla de reacción incluyó 1  $\mu$ l de hexámeros al azar (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de RNA micobacteriano (100 ng/ $\mu$ l) y 3  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Se colocó en el termociclador (PCR Sprint, Termo-Hybaid; Waltham, MA) a 70°C por 5 minutos e inmediatamente después se colocaron en hielo por 5 minutos mínimo. Durante este tiempo se preparó la mezcla de transcriptasa reversa: 5.5  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, 4  $\mu$ l de solución de trabajo 5x (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM y MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 3  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 1  $\mu$ l de la mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 0.5  $\mu$ l de inhibidor de ribonucleasas (20 U/ $\mu$ l) y 1  $\mu$ l de transcriptasa reversa (20 U/ $\mu$ l). Esta mezcla se adicionó a la preparación de RNA y se colocó en el termociclador a 25°C por 5 min, 42°C por 1 hora y 70°C por 15 min.

## **6.17 Reacción en cadena de la polimerasa para obtener los amplicones correspondientes a cada gene analizado**

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en 25  $\mu$ l de mezcla conteniendo 14.4  $\mu$ l de agua Milli Q, 2  $\mu$ l de amortiguador de reacción 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gelatina 10  $\mu$ g/ml); 1  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 20X (30mM); 3.20  $\mu$ l de la mezcla de dNTPs de 5  $\mu$ l, 3  $\mu$ l del DNAc obtenido en la transcripción reversa; 0.2  $\mu$ l de DNA Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l) (Amplificasa® ,Biotecsa, México D.F.) y utilizando 1.2  $\mu$ l (5  $\mu$ M) de cada par de los iniciadores mostrados en la tabla 1 en reacciones independientes.

Las condiciones de amplificación fueron: un tiempo inicial de desnaturalización de 6 minutos a 96°C seguido de 35 ciclos de 96, 55 y 72° C por 30 segundos para cada temperatura y un tiempo final de extensión de 10 minutos a 72° C.

## **6.18 Electroforesis en agarosa para DNA**

Los amplicones se observaron en geles de agarosa al 1.5 % preparado en Tris-Borato-EDTA (TBE).

Se mezclaron 10  $\mu$ l de cada muestra con 0.2  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) y 2  $\mu$ l de solución de carga 5x (Ficoll 15% p/v, EDTA 6 mM pH 8.0, azul de bromofenol 0.25% y cianol xileno 0.25 % en agua-DEPC). Las muestras se cargaron en el gel y se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal (Termo EC minicel, Waltham, MA) por 45 minutos con una fuente de poder Fotodyne (New Berlin, WI.) a 80 V; la visualización se hizo en un emisor de luz UV (Fotodyne). En cada gel se incluyó un carril con 5  $\mu$ l del marcador de peso molecular para DNA de rango bajo pBR322 digerido con *Msp*I (0.05  $\mu$ g/ $\mu$ l) (Biotecsa, México).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Densidad bacteriana de los cultivos congelados de *M. tuberculosis*

Se congelaron los viales de los cultivos de las diferentes cepas de *M. tuberculosis* para asegurarnos de mantener las cepas con las mismas características biológicas durante todo el transcurso del proyecto. Estos cultivos conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  se utilizaron para realizar las infecciones de cultivos celulares, por lo que se determinó la densidad bacteriana post-congelación como se describe en material y métodos. La densidad de los cultivos de *M. tuberculosis* fueron: para la cepa H37Rv de  $8.1 \times 10^5$  ufc/ml, para la cepa CDC-1551 de  $4.2 \times 10^8$  ufc/ml y para la cepa DR-689  $1.8 \times 10^8$  ufc/ml. Estos datos permitieron realizar las infecciones a los cultivos celulares con una densidad definida de inóculo.

### 7.2 Actividad citotóxica sobre cultivos celulares de células THP-1 por cepas de *M. tuberculosis*

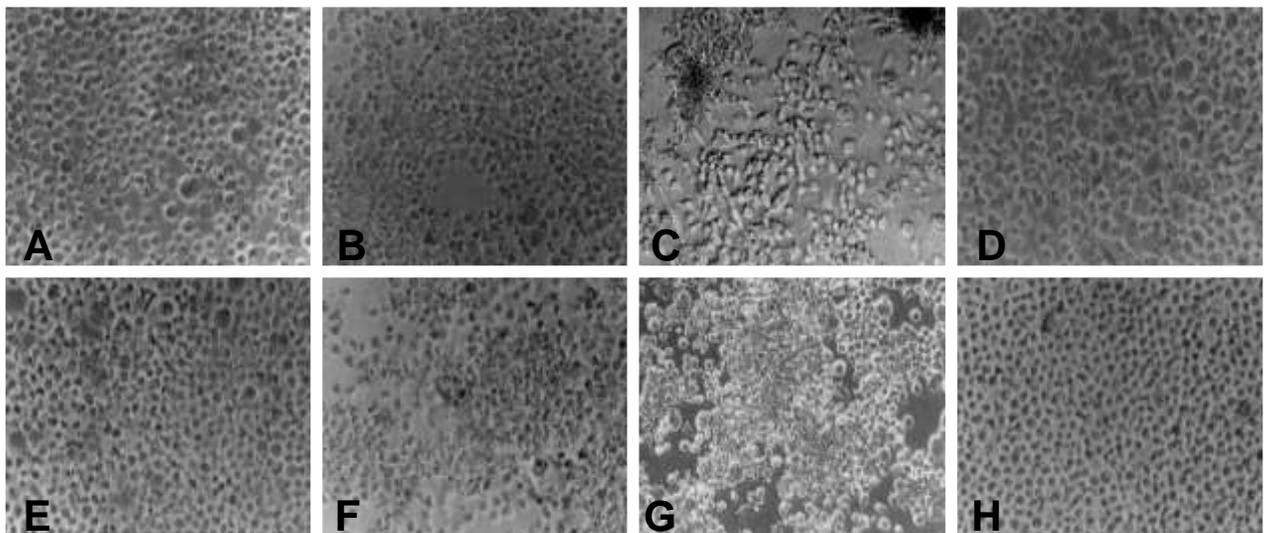
La capacidad de diferentes cepas de *M. tuberculosis* para producir daño sobre los cultivos de células THP-1 fue analizada. Se utilizaron diferentes inóculos y diferentes tiempos de incubación. Se encontró que tanto la cepa CDC-1551, como la cepa H37Rv produjeron un efecto citotóxico sobre las monocapas celulares. La cepa DR-689, con un reducido efecto citotóxico (Hernández-Vera, 2003), causó un daño menor, observándose estos cultivos con apariencia semejante a los cultivos no infectados. Este efecto dependió del tiempo de incubación y del inóculo bacteriano utilizado. El efecto tóxico se manifestó en los cultivos celulares infectados como agregación celular en varias zonas y áreas sin células, lo cual no se observó en los cultivos testigo no infectados.

Se comparó el efecto citotóxico de las cepas de *M. tuberculosis* CDC-1551, H37Rv y DR-689, inoculando células THP-1 transformadas a macrófagos a una MDI de 0.1:1 (bacteria:célula). La observación se realizó cada 24 horas por microscopía de contraste de fases.

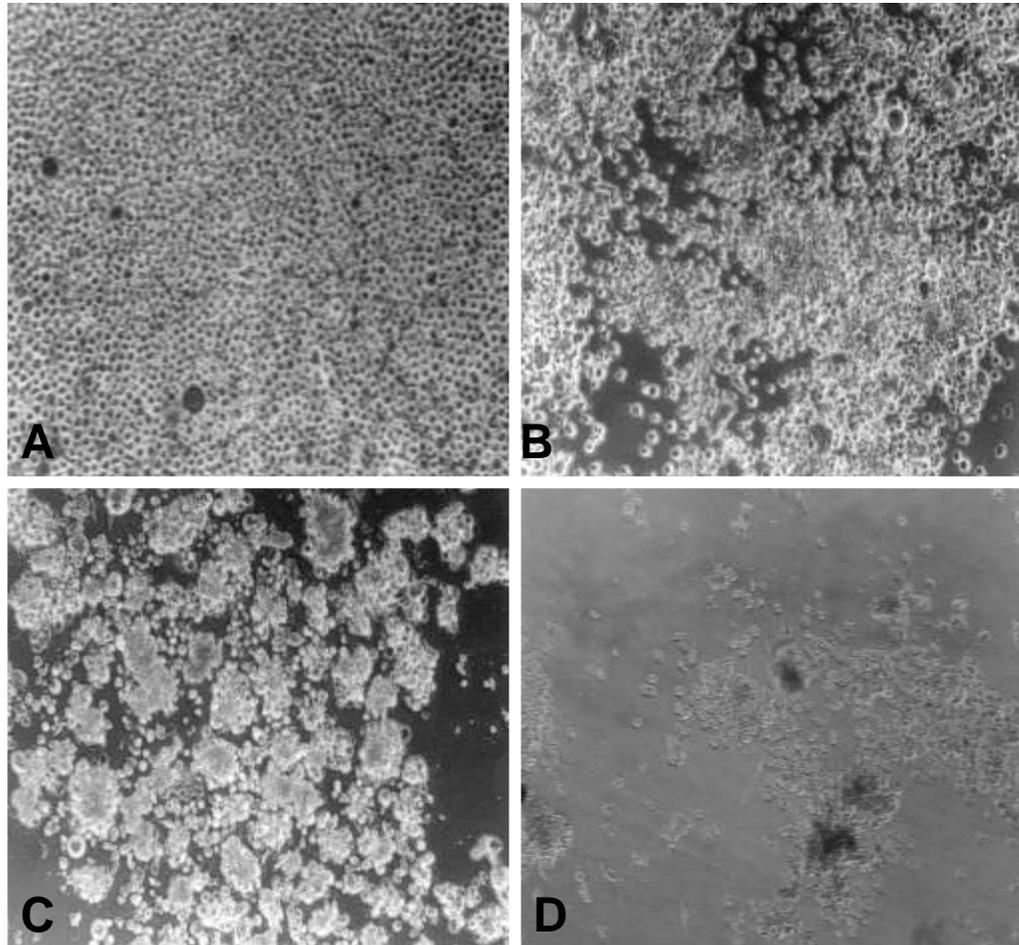
Como puede observarse en la figura 1, las monocapas de los cultivos testigos no infectados se conservaron íntegros durante todo el experimento. Las células THP-1 infectadas con la cepa CDC-1551 mostraron una destrucción parcial a las 24 h de incubación post infección y el efecto se incrementó con el paso del tiempo. A las 72 h de incubación las zonas sin células aumentaron.

La cepa H37Rv produjo también un evidente daño sobre las células en cultivo, el cual también estuvo relacionado con el tiempo de incubación. En la figura 1 puede observarse las zonas de aglomeración celular, así como áreas sin células debidas a lisis.

En tanto, los cultivos infectados con la cepa DR-689 mostraron un daño menor aún después de 72 h de incubación. Las imágenes obtenidas de estos cultivos fueron muy similares a las de los cultivos no infectados.



**Figura 1.** Efecto citotóxico de *M. tuberculosis* dependiente de la virulencia de las cepas. Monocapas de células THP-1 infectadas con las cepas de *M. tuberculosis* a una multiplicidad de infección de 0.1:1 (bacteria:células). Recuadros A, B, C y D representan cultivos a 24 h post infección; recuadros E, F, G y H cultivos a 72 h post infección. (A y E) cultivos testigo sin infectar; (B y F) cultivos infectados con la cepa CDC-1551; (C y G) cultivos infectados con la cepa H37Rv; (D y H) cultivos infectados con la cepa DR-689.



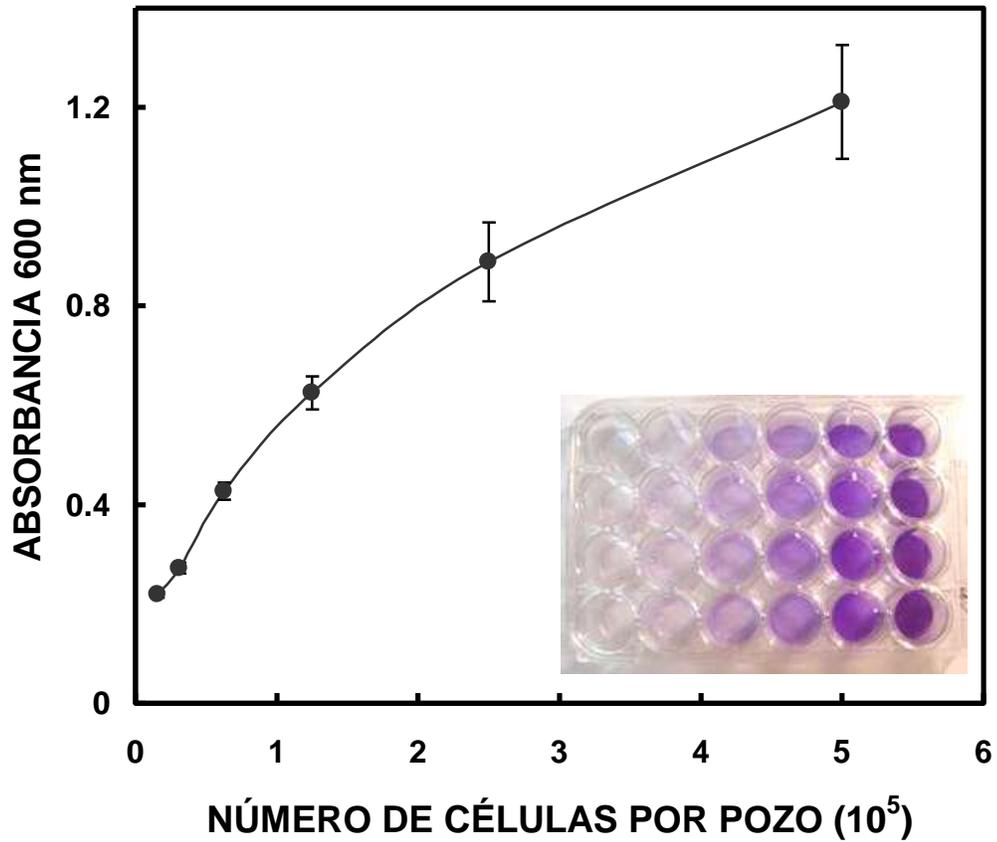
**Figura 2.** Efecto citotóxico de *M. tuberculosis* dependiente del inóculo bacteriano. Células THP-1 infectados con *M. tuberculosis* CDC-1551 por 72 h con diferente multiplicidad de infección (MDI). A) Cultivo testigo no infectado; B) Células infectadas con una MDI de 0.1:1 (bacteria:célula); C) Células infectadas con una MDI de 1:1 y D) Células infectadas con una MDI de 10:1.

Cuando las células THP-1 se infectaron con la cepa CDC-1551 de *M. tuberculosis* a una MDI de 10:1 (bacteria:célula) se observó una destrucción de los cultivos a las 24 h de incubación. Inóculos menores de la misma cepa con una MDI de 1:1 y 0.1:1 produjeron un menor daño sobre los cultivos celulares, con diferencias notablemente apreciables al microscopio de luz. A las 72 h de incubación los cultivos infectados con una MDI de 1:1 y 0.1:1 presentaron una destrucción parcial con relación al inóculo (figura 2).

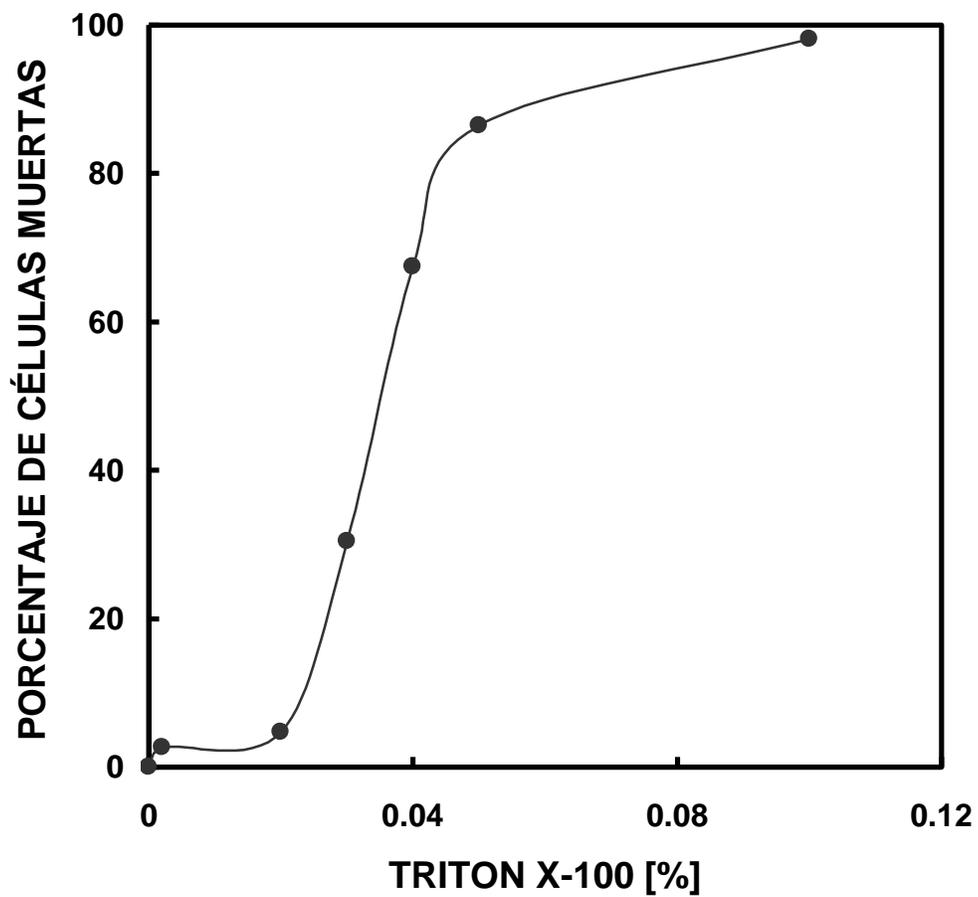
### **7.3 Cuantificación de citotoxicidad por el ensayo de TCV, desarrollo y estandarización del método**

De los valores de absorbancia obtenidos en monocapas de células THP-1 relacionando el número de células por pozo y el valor de absorbancia producido, se obtuvo una relación lineal entre las dos variables (Fig. 3). El análisis de correlación y regresión mostró una pendiente de 0.2019 con un valor de “ $r^2$ ” de 0.9465. El proceso de fijación de los cultivos celulares con formalina o glutaraldehído no produjo cambios en los valores de absorbancia obtenidos en los ensayos. Estos resultados confirman la utilidad del ensayo de TCV para determinar la viabilidad o densidad de cultivos celulares.

El detergente aniónico Tritón X-100 indujo un claro efecto como agente citotóxico; el análisis de regresión y correlación de los datos da un valor a la pendiente de 2821.5 y una “ $r^2$ ” de 0.9865 (Fig. 4).



**Figura 3.** El número de células en cultivo determinó los valores de absorbancia obtenidos utilizando el ensayo de TCV. En el recuadro se puede ver una microplaca donde se realizó el ensayo, cada columna de la microplaca corresponde a cada valor promedio mostrado en la gráfica. Cada símbolo representa el valor promedio de 3 experimentos independientes hechos por triplicado.



**Figura 4.** Evaluación de citotoxicidad de Tritón X-100 sobre cultivos de la línea celular THP-1 mediante el ensayo TCV. Cada símbolo representa el promedio de dos experimentos hechos por triplicado.

Para evaluar este método en la cuantificación del efecto citotóxico producido por *M. tuberculosis*, se analizaron los valores de absorbancia producidos por *M. tuberculosis per se* en el modelo de infección. Monocapas de células THP-1 se infectaron con un número variable de micobacterias con una multiplicidad de infección (MDI) hasta de 10:1 (bacterias:celulas). Los cultivos infectados se incubaron por 6 horas para permitir la internación de bacterias dentro de las células y entonces se realizó el ensayo de TCV. En este punto inicial de la infección las micobacterias no han producido ningún efecto sobre las monocapas. La lectura de la absorbancia para todas las diferentes densidades bacterianas fueron muy similares y no hubo diferencias significativas por ANOVA una vía ( $p \leq 0.05$ ). Este resultado sustenta el uso del ensayo de TCV para cuantificar la citotoxicidad producida por *M. tuberculosis* debido a que los bacilos no son teñidos y no producen valores de fondo de tal manera que los valores de absorbancia corresponden únicamente a las células teñidas.

#### 7.4 Cuantificación de la citotoxicidad producida por *M. tuberculosis* mediante el ensayo de TCV

Comparamos cuantitativamente mediante el ensayo de TCV, la citotoxicidad producida por *M. tuberculosis* cepas H37Rv y DR-689 sobre monocapas de células THP-1. Los valores obtenidos son mostrados en la tabla 2.

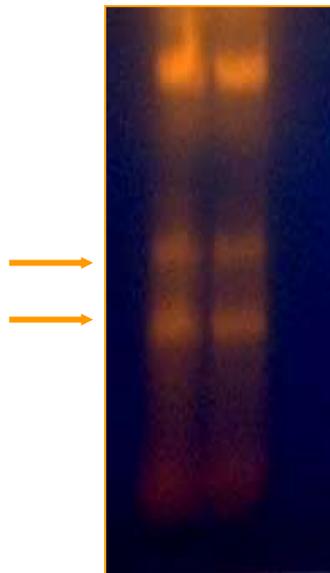
Tiempo de incubación	<i>M. tuberculosis</i>	
	DR-689	H37Rv
24 h	0	10.50
72 h	0	50.52

**Tabla 2.** Porcentaje de células muertas = citotoxicidad

Con los resultados de citotoxicidad se obtuvo la optimización del modelo celular de infección con micobacterias. Se definió el inóculo y tiempo de incubación adecuados para realizar los ensayos de recuperación del RNA de las bacterias infectantes y analizar la expresión de algunos de los genes bacterianos en estas condiciones. Se determinó que la MDI de 1:1 permitió una buena interacción de las micobacterias con las células, produjo un efecto citotóxico parcial y permitió tener un número suficiente de bacterias para realizar el análisis de expresión.

## 7.5 Extracción de RNA

La calidad y cantidad de RNA obtenida de los cultivos micobacterianos crecidos en medio 7H9 o de las bacterias recuperadas de los cultivos infectados fue buena (Figura 5) y suficiente para realizar los ensayos. Para realizar la producción de cDNA, la concentración de RNA se ajustó a 100 ng/μl para todos los ensayos. Encontramos que el método de Mahenthiralingam (1998) con las modificaciones realizadas en el laboratorio produjo un RNA de mejor calidad y mayor pureza que el obtenido por el método comercial del kit FastRNA® Kit–Blue.



**Figura 5.** RNA obtenido de los cultivos de micobacterias. El RNA extraído y sometido a electroforesis en un gel de agarosa desnaturizante al 1.5 % a 80 volts y teñido con bromuro de etidio. Las flechas muestran las bandas de RNA obtenida durante nuestros ensayos.

## 7.6 Selección de genes para amplificar

A través de la búsqueda detallada en la sección de metodología, se seleccionó un número limitado de genes que podrían ser analizados en el presente trabajo. De estos genes, había algunos con información sobre su probable función en el metabolismo y/o virulencia. En tanto para otros no se ha definido su función. Los genes están enlistados en la tabla 3.

NOMBRE GENE	REGISTRO TIGR	FUNCION	RT-PCR
<i>ahpC</i>	MT2503	Sobrevivencia macrófagos	+
35 kDa	MT2815	No identificada	+
<i>eis</i>	MT1184	Sobrevivencia intracelular	+
<i>erp</i>	MT3917	Atenuación de virulencia por disrupción de gene	ND
<i>rpoB</i>	MT0695	Resistencia a rifampicina	+
<i>rpoV</i>	MT3179	Desconocido	-
<i>esat6</i>	MT3989	Desconocido, induce buenos niveles de inmunidad	+
<i>sigB</i>	MT2783	Control regulón de fase estacionaria. Resistencia a estrés	+
<i>sigA</i>	MT2777	Contribuyen a inicio de transcripción. Sobrevivencia celular	+
<i>invA</i>	MT1524	Hemolítica. Similar a p60 de Listeria	+
<i>invB</i>	MT1525	Hemolítica. Similar a p60 de Listeria	+
<i>mce -1</i>	MT0178	Factor de colonización (Invasión celular)	ND
<i>mycPI</i>		Proteína. Extracelular presente en membrana	-
<i>umaA2</i>	MT0486	Ácido micólico sintasa. Infección persistente	+
SN	MT0003	Desconocida	-
SN	MT0024	Desconocida	-
SN	MT0040	Desconocida	-
SN	MT0259	Desconocida	-
SN	MT0655	Desconocida	-
SN	MT0876	Desconocida	-
SN	MT0876	Desconocida	-
SN	MT1524	Desconocida	-

**Tabla 3.** Selección de genes. La búsqueda se realizó en las bases de datos de genes de *M. tuberculosis* con probable función de virulencia reportada y con función no conocida.

De los genes enlistados en la tabla 3 se realizó una segunda selección para tener en el ensayo, testigos positivos constitutivos y testigos de expresión inducible. En esta segunda selección, se definieron los genes a ser analizados y se muestran en la tabla 1 junto con los iniciadores correspondientes para cada gene en la sección de material y métodos.

## 7.7 Especificidad de los iniciadores diseñados

Para comprobar que había un sólo amplicón para cada gen específico, el análisis de homología de estos genes con el genoma micobacteriano se realizó mediante una búsqueda Blast en los sitios, <http://www.sanger.ac.uk> y <http://tigrblast.tigr.org>. Solo se encontró un sitio homólogo en todo el genoma de *M. tuberculosis* para cada uno de los iniciadores, el cual correspondió específicamente al gene blanco para el cual fue diseñado cada par de iniciadores, por lo que cada par de iniciadores produciría un solo amplicon a partir de *M. tuberculosis*.

Para corroborar que los iniciadores habían sido diseñados correctamente y probar que no hubiera amplificaciones inespecíficas se probaron todos los iniciadores, indicados en la tabla 1, con DNA producto de las extracciones de bacterias crecidas en medios de cultivo, obteniendo amplificación de todas ellas. En todos los casos se obtuvo un solo amplicon del tamaño esperado para cada par de iniciadores (Tabla 4).

Para corroborar que la posible presencia de cDNA proveniente de las células THP-1 no produjera falsos positivos en la reacción de PCR a partir de las bacterias recuperadas tras la infección, se realizó un proceso de amplificación con cada par de iniciadores descritos en la tabla 1 usando como templado el cDNA producto de la extracción de RNA del cultivo de las células THP-1. No obtuvimos amplificación de ninguno de ellos; con esto se descartó posibles productos debidos a contaminación de RNA de macrófagos en nuestros ensayos.

## 7.8 Expresión de genes analizados

Se obtuvo cDNA a partir del RNA total obtenido de las micobacterias cultivadas por 7 días en medio Middlebrook 7H9, así como de las bacterias cultivadas en medio RPMI completo, y de las bacterias recuperadas tras la infección a macrófagos a los tiempos de incubación de 2, 6 y 24 h. La amplificación de las secuencias de los genes seleccionados se realizó con los pares de iniciadores enlistados en la tabla 1.

A partir del RNA obtenido de las micobacterias crecidas en el medio de cultivo RPMI a los tiempos de incubación de 2, 6 y 24 h se obtuvieron amplicones de la longitud esperada para los siguientes genes: MT0003, MT0024, MT0040, MT0655, MT0876, MT1524, MT3917 (*erp*), MT2783 (*sigB*), MT3989 (*Esat6*), MT2416 (*plcA*),

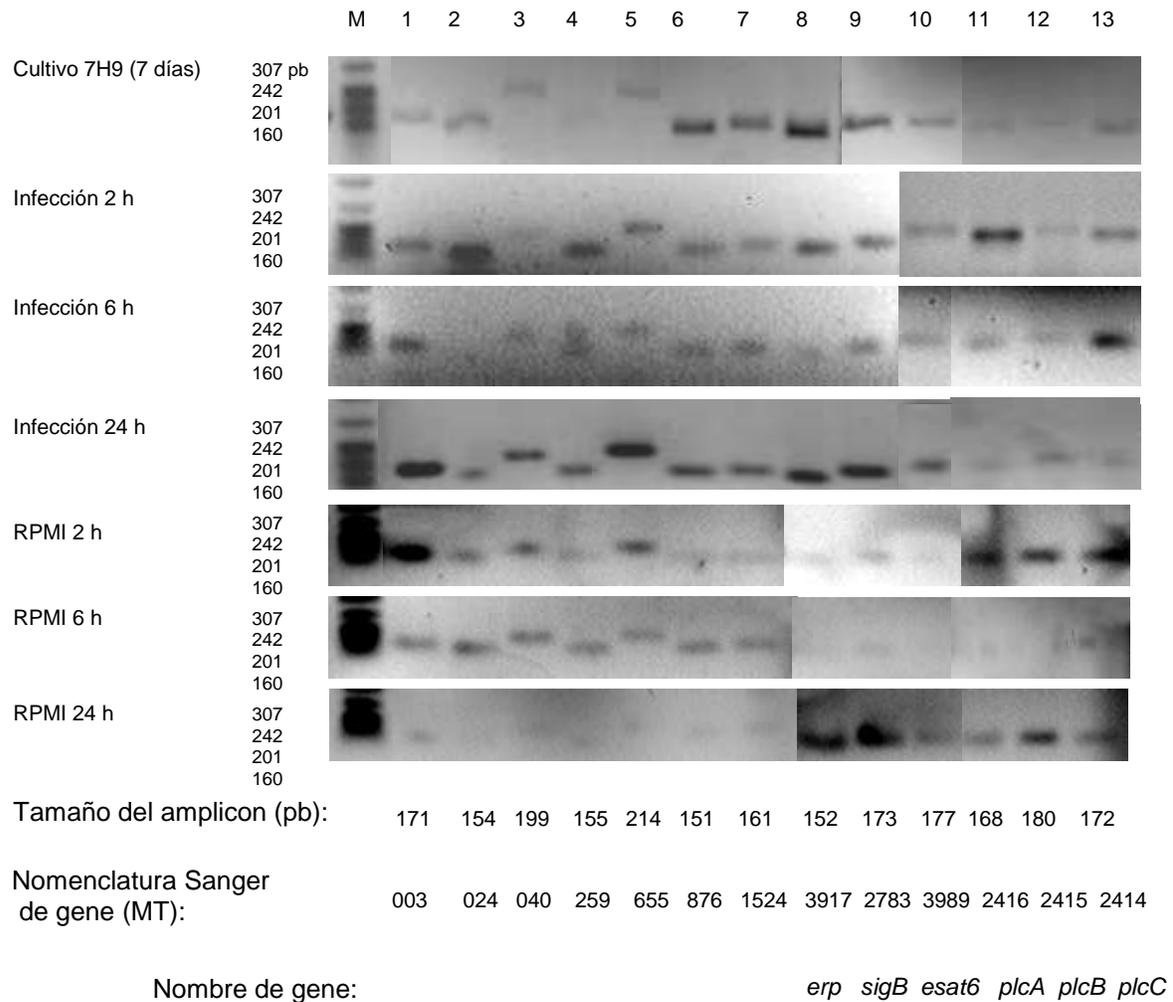
MT2415 (*plcB*), MT2414 (*plcC*) y MT0259, como se muestra en la tabla 4. Cuando se analizó la expresión de estos mismos genes en micobacterias incubadas por 7 días se encontró que estos mismos genes también se expresaron con excepción del gene MT0259, del cual no se obtuvo amplicon correspondiente al gene. El gene MT0259 corresponde a una proteína con probable función de oxidoreductasa.

La expresión de los genes de las micobacterias durante las infecciones a los macrófagos a tiempo de 2 h de incubación, fue evidenciado por los amplicones correspondientes a los genes MT0003, MT0024, MT0040, MT0259, MT0655, MT0876, MT1524, MT3917 (*erp*), MT2783 (*sigB*) y el gene MT3989 (*esat6*). En este tiempo de incubación la banda observada correspondiente al gene MT0024 presentó una mayor intensidad que a las 6 y 24 h. También a este tiempo de incubación de 2 h, la intensidad de la banda del gene MT2416 (*plcA*), fue mayor que las bandas correspondientes a los genes MT2415 (*plcB*) y MT2414 (*plcC*). La intensidad de las bandas de los amplicones a las 24 h de incubación fue mayor para la mayoría de los genes a excepción de los mencionados previamente (Fig. 6; tabla 4).

El gene testigo de expresión constitutiva MT3989 (*esat6*) se expresó en todas las condiciones estudiadas. El gene testigo inducible MT2416 (*plcA*) se expresó como se esperaba a mayor intensidad en las primeras horas de infección y disminuyó al paso del tiempo, estos resultados concuerdan con los antecedentes de Reynaud *et al.*, 2002.

Nº	Registro TIGR	Nombre Gene	I-2	I-6	I-24	R-2	R-6	R-24	Mdd	Tamaño Amplicon
1	MT0003	S/I	+	+	+	+	+	+	+	171
2	MT0024	S/I	+	+	+	+	+	+	+	154
3	MT0040	S/I	+	+	+	+	+	+	+	199
4	MT0259	S/I	+	+	+	+	+	+	-	155
5	MT0655	S/I	+	+	+	+	+	+	+	214
6	MT0876	S/I	+	+	+	+	+	+	+	151
7	MT1524	S/I	+	+	+	+	+	+	+	161
8	MT3917	<i>erp</i>	+	+	+	+	+	+	+	152
9	MT2783	<i>sigB</i>	+	+	+	+	+	+	+	173
10	MT3989	<i>esat6</i>	+	+	+	+	+	+	+	177
11	MT2416	<i>plcA</i>	+	+	+	+	+	+	+	168
12	MT2415	<i>plcB</i>	+	+	+	+	+	+	+	180
13	MT2414	<i>plcC</i>	+	+	+	+	+	+	+	172

**Tabla 4.** Productos amplificados por PCR de los genes de *M. tuberculosis* cepa CDC1551 con probable función de virulencia reportada y aquellos con función no conocida. La reacción de PCR se realizó a partir del cDNA obtenido de *M. tuberculosis* infectando macrófagos por 2 h (I-2), 6 h (I-6) o 24 h (I-24), así como de micobacterias cultivadas en medio RPMI completo por 2h (R-2), 6 h (R-6) o 24 h (R-24) o en medio Middlebrook 7H9 completo por 7 días (Mdd). El tamaño del amplicon está dado en pb.



**Fig. 6.** Expresión de genes de *M. tuberculosis* CDC1551. Amplicones de genes de cDNA proveniente del RNA micobacteriano obtenido de bacterias crecidas en medio de cultivo 7H9 por 7 días o bacterias incubadas en RPMI-1640 o recuperadas después de infectar macrófagos humanos a las 2, 6 y 24 h. Como marcador de peso molecular se utilizó pBR322 digerido con *MspI* (Biotecsa). Valores en pb.

## 8. DISCUSIÓN

A pesar de los grandes avances en el conocimiento de la biología de *M. tuberculosis* obtenido en los últimos 100 años, no se han esclarecido todos los factores que están involucrados en la virulencia de la bacteria. *M. tuberculosis* no posee factores de virulencia únicos o particularmente relevantes como los conocidos en otras bacterias patógenas como por ejemplo *Clostridium botulinum* que produce una de las toxinas más potentes y letales responsable del botulismo, o la de *C. tetani* que produce la tetanospasmina (Henry, 1917). También podemos citar la hialuronidasa de *Staphylococcus aureus* (Rautela y Abramson, 1973), la toxina eritrogénica producida por las bacterias del género *Streptococcus* spp (Stock, 1939) y las enterotoxinas termolábil (LT) y termoestable (ST) de *Escherichia coli* (Karch *et al.*, 2005; Kunkel y Robertson, 1979).

En el mecanismo patogénico de *M. tuberculosis* están involucrados múltiples factores bacterianos que interactúan en forma muy compleja con las células del hospedero. Generalmente el hospedero es capaz de inclinar la balanza a su favor y controlar la infección, sin embargo si el balance se rompe el bacilo puede replicarse y causar daño tisular ya sea por productos propios de la bacteria o por una inducción de la respuesta inmune que en su intento de controlar la infección lesiona los tejidos.

Para el estudio del mecanismo patogénico de *M. tuberculosis* se han utilizado tanto modelos *in vivo* como modelos *in vitro*. Los modelos de animales de experimentación son muy útiles porque permite estudiar todas las etapas de la infección, además de que dan una información más cercana a lo que ocurre en el humano, sin embargo el mantener los animales es costoso y laborioso debido al manejo y a la alimentación, aunado al problema de las restricciones éticas que hay en la actualidad. Por otro lado los modelos *in vitro* utilizan cultivos de diversas líneas celulares que resultan ser más fáciles de trabajar manteniéndolas en un medio ambiente controlado, suelen ser más económicos y proporcionan suficiente información válida que puede ser utilizadas para descifrar el mecanismo de patogénesis micobacteriano. Dentro de los modelos *in vitro* están los que utilizan cultivos de macrófagos, los cuales constituyen la primera línea de defensa natural contra *M. tuberculosis* o neumocitos que son células del epitelio pulmonar donde generalmente inicia la infección.

Con estos modelos se ha logrado obtener información muy valiosa sobre productos bacterianos o actividades biológicas de *M. tuberculosis* que pueden estar involucrados con la virulencia de la bacteria. Birkness *et al.* (1999) y luego independientemente Bermudez *et al.* (2002) examinaron eventos tempranos de la infección por *M. tuberculosis* y de la translocación de las bacterias en una bicapa celular artificial que

recuerda el epitelio pulmonar. Trabajos de infección a monocapas macrófagos, se han enfocado a analizar el papel de genes específicos como la fosfolipasa C en la virulencia de *M. tuberculosis* (Raynaud *et al.*, 2002, Hernández-Vera, 2003). Otros trabajos como los de Riendeau y Kornfeld (2003) y Danelishvili *et al.* (2003) reportaron daño a cultivos celulares por inducción de apoptosis a células THP-1 en respuesta a la infección por micobacterias. Dobos *et al.*, en el 2000, reportaron que durante la infección de células epiteliales de pulmón de la línea A549 con *M. tuberculosis* la necrosis celular precede a la apoptosis y es la principal causante del daño sobre las monocapas celulares. En ensayos similares se ha determinado que la citotoxicidad para células epiteliales de pulmón es una virulencia asociada al fenotipo de *M. tuberculosis* como lo reportó McDonough *et al.* (1995).

En este estudio se determinó el grado de citotoxicidad producido por tres diferentes cepas de *M. tuberculosis* sobre una monocapa de células y se analizó la expresión de algunos genes bacterianos durante la infección celular que pudieran estar involucrados en la virulencia de *M. tuberculosis*.

Se utilizó la línea celular de monocitos humanos THP-1, los cuales pueden ser diferenciados a macrófagos cuando se adiciona PMA al cultivo. Los monocitos de la línea THP-1 crecen en suspensión pero, al diferenciarse se adhieren a las cajas de cultivo y adquieren características semejantes a macrófagos primarios tanto en morfología como en fisiología (Asseffa A, 1993) y se han utilizado en diversos estudios como modelo de infección *in vitro* con *M. tuberculosis* (Shattock *et al.*, 1993; Friedland *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1998; Lee y Horwitz, 1999; Tchou-Whong *et al.*, 1999; Agranoff *et al.*, 1999; Kusner y Adams, 2000; Miller y Shinnick, 2000; Armitige *et al.*, 2000; Riendeau y Kornfeld, 2003).

Para los ensayos de citotoxicidad se usaron diferentes cepas de *M. tuberculosis*: a) H37Rv, cepa virulenta de referencia (Cole *et al.*, 1998; Brosch *et al.*, 1998; Philipp *et al.*, 1996); b) CDC-1551, cepa considerada más virulenta que H37Rv (Valway *et al.*, 1998, Bishai *et al.*, 1999), c) DR-689, es un aislado clínico proveniente del Laboratorio Nacional de Referencia para la tuberculosis en Winnipeg, Canadá. Esta cepa carece del locus completo de fosfolipasa C en forma natural y es reportada de baja citotoxicidad para células en cultivo (Hernández-Vera, 2003), por lo que resultaba un buen testigo de infección de baja virulencia para comparar contra el efecto citotóxico producido por las cepas virulentas H37Rv y CDC-1551.

En los ensayos de infección de la monocapa de los macrófagos THP-1, las cepas H37Rv y CDC-1551 tuvieron actividad citotóxica a las 24 horas post infección cuando se infectó a una MDI de 10 bacterias por cada célula. La destrucción del cultivo fue casi completa. En cambio la cepa DR-689 no produjo efecto visible a la monocapa del cultivo. Estas observaciones confirman trabajos previos, donde también se evaluó la infección de macrófagos con cepas de *M. tuberculosis* con diferencia en su virulencia (Silver *et al.*, 1998; Raynaud *et al.*, 2002; Dobos *et al.*, 2000; Danelishvili *et al.*, 2003; Keane *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Hernández-Vera, 2003).

Al disminuir la MDI (1:1 y 0.1:1), el efecto producido por las cepas H37Rv y CDC-1551 en los cultivos fue menor. El efecto se manifestó como aglomeración celular y pérdida parcial de la integridad de la monocapa, sin embargo se podían observar áreas sin aparente daño. Los cultivos infectados con la cepa DR689 con el mismo inóculo no mostraron daño en la monocapa de macrófagos.

Con la finalidad de determinar cuantitativamente el efecto citotóxico observado, se desarrolló un método colorimétrico basado en la tinción con el colorante cristal violeta. Gillies (1986) usó este colorante para cuantificar el número de células en una monocapa celular como una función de los valores de absorbancia del colorante tomado por las células. El método ha sido utilizado con modificaciones para un variado número de aplicaciones relacionadas con la determinación de citotoxicidad o muerte celular de compuestos químicos, de medicamentos o de toxinas de microorganismos patógenos (Lee *et al.*, 2004; Shaik *et al.*, 2004; Rothman, 1986; Li *et al.*, 2004), así como para cuantificar viabilidad (Harhaji *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2004) o proliferación celular en diferentes condiciones (Qu *et al.*, 2004; Zivadinovic *et al.*, 2005). Utilizando concentraciones variables del agente citolítico Tritón X-100, se demostró que el efecto puede ser cuantificado mediante el ensayo de TCV (Fig 4).

Debido a la particular naturaleza lipídica de la pared de las micobacterias, el cristal violeta no es absorbido por las micobacterias, lo cual resultó ser una gran ventaja para la cuantificación de la citotoxicidad producida por *M. tuberculosis*, ya que los cambios producidos en los valores de absorbancia en cultivos infectados con *M. tuberculosis* son dados solo por la diferencia en el número de células como lo se demostró al infectar un número constante de células con diferente número de bacterias y no obtener diferencia significativa en los valores de absorbancia obtenidos de acuerdo al análisis de correlación y regresión que mostró una pendiente de 0.2019 con un valor de “ $r^2$ ” de 0.9465. (Fig. 3). En un previo estudio, Takii *et al.* (2002), utilizó TCV para una búsqueda de agentes antituberculosos y su toxicidad en la línea celular MRC-5 de fibroblastos de pulmón de humano infectados con *M. tuberculosis* H37-RV. Sin embargo la citotoxicidad bacteriana fue medida sólo por liberación de LDH.

De acuerdo a los datos obtenidos, se puede concluir que las cepas virulentas H37Rv y CDC-1551 tuvieron un efecto citotóxico sobre la monocapa de los macrófagos, a diferencia de la cepa DR689 que produjo un daño mínimo a los cultivos celulares a las 72 h post-infección, no visible al microscopio, pero si evidenciado por el ensayo TCV. Estos resultados indican que *M. tuberculosis* produce un efecto citotóxico sobre células en cultivo y que la citotoxicidad está relacionada a la virulencia de la cepa. Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos con otras cepas de *M. tuberculosis* y reportados por otros autores (Silver *et al.*, 1998; Raynaud *et al.*, 2002; Dobos *et al.*, 2000; Danelishvili *et al.*, 2003; Keane *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Hernández-Vera *et al.*, 2003).

En este trabajo se demostró que el ensayo de TCV determina cuantitativamente la citotoxicidad producida por *M. tuberculosis* en una monocapa de células THP-1. Los resultados de este trabajo, sostienen el uso de TCV como un método rápido, sensible y confiable para cuantificar la citotoxicidad de *M. tuberculosis* y para comparar diferencias en actividad entre cepas que podría estar relacionada a la virulencia. El uso de este método para modelos de infección con otras especies de micobacterias deberá ser establecido, ya que biofilms producidos por *M. avium* pueden ser teñidos con cristal violeta (Carter *et al.*, 2003) y cambios en la morfología de las colonias alteran las propiedades bioquímicas de la pared de *M. avium*, conduciendo a cambios en la permeabilidad celular que reducen el paso de sales de tetrazolio y colorantes (Kansal *et al.*, 1998).

En 1998 se publicó la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* cepa H37Rv (Cole *et al.*, 1998), y al poco tiempo en el 2002 se dio a conocer la secuencia genómica de la cepa CDC-1551 (Fleischmann *et al.*, 2002). El genoma micobacteriano tiene una longitud de 4,411,529 pares de bases (pb) para H37Rv y de 4,403,836 pb para CDC-1551, lo que representa todo un potencial de información a descifrar entre todo el repertorio de genes; aquellos que son claves para la virulencia, patogénesis, supervivencia, latencia y posibles blancos contra los que se pueden diseñar nuevos fármacos. Se estima que el genoma de *M. tuberculosis*, con un contenido importante en citosina/guanina (65.5%) relativamente constante a lo largo de toda la secuencia, alberga alrededor de 4000 genes (3924 ORFs identificados), y llama la atención por la elevada proporción de su capacidad codificante destinada a la expresión de enzimas implicadas en lipogénesis y lipólisis. De hecho, pocas bacterias son capaces de sintetizar una gama de moléculas lipofílicas tan variada como *M. tuberculosis*. Por otro lado, el genoma de *M. tuberculosis* difiere respecto al resto de bacterias por poseer dos familias de proteínas ricas en glicina (PE y PPE), cuya estructura repetitiva proporciona una fuente importante de variabilidad antigénica; se calcula que un 10% de la capacidad codificante de *M. tuberculosis* va destinado a esta familia multigénica, cuyos genes se hallan organizados en forma de cluster (Cole *et al.*, 1998; Rilova-Barrusio, 2006).

Se han reportado diferentes formas para estudiar genes de las micobacterias, entre las que podemos mencionar técnicas de inactivación de genes con el interés de reemplazarlos dentro del genoma (Balasubramanian *et al.*, 1996; Aldovini *et al.*, 1993; Collin *et al.*, 1995; Lee, *et al.*, 1991; Kalpana *et al.*, 1991); la inactivación de genes dirigida, cuando se conoce la secuencia de algún gene de interés y se quiere bloquear la acción para conocer su efecto (Berthet, 1998; Hinds *et al.*, 1999; Azad *et al.*, 1996, Husson *et al.*, 1990; Arruda *et al.*, 1993); la inactivación de genes en forma global cuyo principio es la inserción de DNA extraño, usualmente elementos transponibles que se insertan aleatoriamente dentro de algunos sitios en el genoma de la bacteria (Camacho *et al.*, 1999; Karlin, 2001; McFadden, 1996; Armitige *et al.*, 2000). El uso de complementación génica también ha sido usado para identificar genes de virulencia, en estos estudios se usan genomas de microorganismos avirulentos como receptores para genes que pueden codificar para algún factor de virulencia (Hinshelwood y Stoker, 1992; Collins *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1991). El uso de las técnicas mencionadas anteriormente para el estudio de la genética de *M. tuberculosis* tiene ya identificados algunos genes que son importantes para la virulencia o algunas propiedades fisiológicas, sin embargo el uso de técnicas para identificar genes que son diferencialmente expresados bajo varias condiciones incluyendo infecciones a macrófagos y comparados con genes expresados bajo otras condiciones, nos permite tener una mayor oportunidad de identificar nuevos genes que pudieran tener un impacto en la patogenia de la enfermedad (Silver *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998; Torzón *et al.*, 2001; Wigginton *et al.*, 2001; Mariani *et al.*, 2000; Dubnau *et al.*, 2002; Dubnau *et al.*, 2003; Raynaud *et al.*, 2002; Danelishvili *et al.*, 2003; Tullius *et al.*, 2003).

El análisis genómico de *M. tuberculosis* nos ha provisto de una gran fuente de información, referente a bases moleculares de la patogenia; sin embargo, durante la evolución, las estructuras de la proteínas son generalmente mucho mas conservadas que sus secuencias, por lo que considerar en un futuro estudios con proteómica, podría favorecer el entendimiento de esta enfermedad (Brodin *et al.*, 2005).

En el presente estudio se evaluó la expresión de algunos genes que pudieran estar relacionados con la virulencia de *M. tuberculosis* en un modelo *in vitro* de infección a macrófagos. El estudio fue dirigido a un grupo de genes de *M. tuberculosis* que ha sido reportado con probable función de virulencia y a un segundo grupo de genes con función desconocida en *M. tuberculosis*, pero cuya secuencia nucleotídica tiene homología con genes que están relacionados con virulencia en otros microorganismos. Esta información se obtuvo a través de una búsqueda exhaustiva de información en el sitio de la Biblioteca “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>) y en los sitios de “The Wellcome Trust Sanger Institute” (<http://www.sanger.ac.uk/>) y “The Institute for Genomic Research” (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/Genome>), estos últimos son los dos organismos que llevaron a cabo la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*.

En nuestro modelo de infección, encontramos que la infección de células THP-1 con la cepa CDC-1551 a una MDI de 1:1 destruía parcialmente los cultivos a las 24 h pero se mantenía un gran porcentaje de la monocapa. Por ello consideramos que este inóculo era el adecuado para recuperar un número suficiente de bacterias y extraer su RNA en buena cantidad para analizar la expresión genética en las diferentes condiciones estudiadas.

Uno de los puntos críticos de este tipo de trabajo, es el disponer de buena cantidad y calidad de RNA para los ensayos. Dubnau *et al.*, en 2002, extrajeron RNA de micobacterias a 1, 6, 24, 48 y 72 h y para validar su método de inducción génica utilizaron el gene micobacteriano hspX que codifica para una proteína semejante a  $\alpha$ -cristalina y su expresión se induce cuando la bacteria se encuentra dentro de macrófagos. Ellos encontraron que a 1 h de incubación su expresión no había aumentado más de dos veces, lo cual contrasta grandemente con el pico máximo de expresión a las 6 h con un aumento de la expresión de 336 veces. A las 24, 48 y 72 h, la cantidad de mRNA aumentó, en relación con la basal, alrededor de 100 veces. Basados en estos resultados previos se decidió realizar la extracción de RNA a las 2, 6 y 24 h y el RNA obtenido de cada tiempo se usó para los ensayos de RT-PCR.

En este trabajo se estudiaron tres diferentes condiciones experimentales en las cuales *M. tuberculosis* podría expresar selectivamente algunos genes: a) bacterias cultivadas en el medio Middlebrook 7H9, el cual es el medio comúnmente usado para el cultivo de micobacterias; b) bacterias cultivadas en medio RPMI completo, el cual es el medio donde se cultivan las células THP-1, y c) bacterias infectando cultivos de macrófagos derivados de la línea THP-1 en medio RPMI. De esta manera se podría reconocer la expresión constitutiva, es decir los genes que se expresan constantemente sin ser alterados por cambios en el medioambiente y la expresión inducida de los genes que se expresan solo en ciertas condiciones y bajo ciertos estímulos.

El gene MT3989 (*esat 6*) de *M. tuberculosis* se conoce por codificar para una proteína que es un antígeno inmunodominante (Andersen *et al.*, 1995; Boesen *et al.*, 1995) e induce buenos niveles de protección en animales inmunizados (Kamath *et al.*, 1999; Lee and Horwitz, 1999). Este gene se seleccionó como testigo de expresión constitutiva por ser parte estructural de la micobacteria y por producirse tanto en medios de cultivo como en macrófagos humanos (Dubnau y Smith, 2003; Pollock JM y Andersen P, 1997; Mariani *et al.*, 2000). En todos los ensayos hechos se observó la expresión de este gene, por lo que comprobamos que es un buen testigo de expresión constitutiva.

El gene MT2416 (*plcA*) de *M. tuberculosis* se utilizó como control positivo de expresión inducida dentro de macrófagos. De acuerdo a lo publicado por Raynaud *et al.*, 2002, el análisis de RT-PCR mostró que la expresión de este gene está fuertemente sobre-regulado durante las primeras 24 h de infección a macrófagos y baja notoriamente su expresión después de las 48 h de incubación, pero manteniendo sus niveles de expresión a un nivel basal, por lo menos hasta las 72 h.

En nuestro caso, los resultados obtenidos muestran una banda más intensa, correspondiente a este amplicon, durante las primeras horas de infección a macrófagos y va disminuyendo al paso del tiempo, lo que indica una sobre-expresión de este gen en los tiempos iniciales de la infección. Resultados similares se obtuvieron con los genes MT2415 (*plcB*) y MT2414 (*plcC*), estos resultados concuerdan con los publicados por Raynaud *et al.*, 2002. Estos genes codifican para fosfolipasa C, enzimas que son relevantes para la virulencia de *M. tuberculosis*. Dentro de sus actividades biológicas pueden hidrolizar casi cualquiera de los fosfolípidos celulares y esto podría facilitar la entrada a la célula al desestabilizar la membrana celular. También se le ha atribuido actividad citotóxica y sus productos de hidrólisis pueden alterar los mecanismos de señalización celular llevando a la muerte celular (Songer, 1997; Wheeler, 1991; King *et al.*, 1993; Vera-Cabrera *et al.*, 2003; Hernández-Vera, 2003; Vera-Cabrera *et al.*, 2006). Mutaciones de estos genes en *M. tuberculosis* disminuyeron la capacidad citotóxica sobre macrófagos y produjeron menos granulomas (Smith *et al.*, 1995; Hernández-Vera, 2003, Raynaud *et al.*, 2002).

En este trabajo se analizó la expresión de los genes MT0003, MT0024, MT0040, MT0259, MT0655, MT0876, MT1524, MT3917 (*erp*), MT2783 (*sigB*), MT2415 (*plcB*) y MT2414 (*plcC*); esta nomenclatura corresponde a “The Wellcome Trust Sanger Institute” <http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=gmt>.

El análisis de expresión del RNA obtenido de *M. tuberculosis* a las 2, 6 y 24 horas de infección en macrófagos derivados de las células THP-1 y de *M. tuberculosis* incubadas en medio de cultivo RPMI completo, mostró la expresión del gene MT0259, pero no se observó expresión de este gene a los 7 días de cultivo en medio de cultivo Middlebrook 7H9. Para los otros genes analizados se observó que se expresaron en todas las condiciones estudiadas, y aunque hay variaciones en la expresión detectadas por la diferente intensidad de la banda del amplicon producido, sería necesario un método cuantitativo como “northern blot” o aún mas definitivo como RT-PCR en tiempo real que nos permita observar estas pequeñas diferencias y poder determinar con exactitud las variaciones cuantitativas de la expresión durante todos las variantes del experimento. Esto ocurre con algunos otros genes estudiados en modelos de infección donde se expresan diferencialmente en las fases tempranas de la interacción celular para luego volver a su nivel de expresión basal (Raynaud *et al.*, 2002). En este estudio, no se observó la expresión del gene MT0259 en la fase tardía de crecimiento en el medio de cultivo, al parecer es necesario en las fases tempranas del crecimiento pues se expresó al menos hasta las 24 h. Las condiciones de crecimiento o estrés también pueden causar expresión de algunos genes, tal es el caso de los genes *pcKA*, *aceA* y 7 genes *fad*, los cuales se sobreregularon por tratamiento con SDS (Manganelli *et al.*, 2001).

De acuerdo a la información en los sitios de Sanger y TIGR el gene MT0259, tiene una probable función de oxidoreductasa, involucrada en metabolismo intermediario central. Dado que no se detectó la expresión del gene MT0259 en la fase de crecimiento

tardía, sería importante analizar en que momento se dejó de expresar y tratar de determinar que función juega en determinadas fases de crecimiento.

Como se ha mencionado, se han desarrollado muchos trabajos en la búsqueda de factores de virulencia de *M. tuberculosis*, sin embargo, a pesar de los esfuerzos hechos, aun se debe incidir en definir la función de un gran número de genes de esta bacteria que pudieran estar relacionados con su virulencia y nos ayuden a establecer nuevas estrategias para el control de la enfermedad.

Este trabajo permitió desarrollar un modelo *in vitro* para monitorear y cuantificar el efecto citotóxico sobre una monocapa de macrófagos humanos derivados de la línea celular THP-1 por diferentes cepas de *M. tuberculosis* y también permitió obtener RNA micobacteriano producido en diferentes condiciones y tiempos para poder hacer un análisis de expresión diferencial que nos ayude a detectar genes de *M. tuberculosis* expresados selectivamente dependiendo de las condiciones a las que se sometan y que estén involucrados en virulencia o metabolismo. Así mismo se identificó al gene MT0259, con probable función de oxidoreductasa, como un gene del metabolismo bacteriano que se expresa durante el crecimiento activo de *M. tuberculosis*. La metodología usada en este proyecto o similar a ésta facilitará identificar genes relevantes en la virulencia de *M. tuberculosis* para luego comprobar su papel en modelos de infección a células en cultivo.

## 9. CONCLUSIONES

- *Mycobacterium tuberculosis* tiene un efecto citotóxico dependiente de la virulencia de las cepas sobre la monocapa de macrófagos humanos derivados de la línea celular THP-1.
- El método de tinción de cristal violeta cuantifica la citotoxicidad producida en cultivos celulares infectados con *Mycobacterium tuberculosis*.
- El uso de técnicas para analizar expresión diferencial nos permite analizar los genes involucrados en virulencia o metabolismo durante la infección de macrófagos humanos derivados de la línea celular THP-1 por *Mycobacterium tuberculosis*.
- *M. tuberculosis* expresa selectivamente genes dependiendo de las condiciones de cultivo en el que se encuentre.
- El gene MT0259, con probable función de oxidoreductasa, parece ser un gene del metabolismo bacteriano que se expresa en las primeras fases de crecimiento activo de *M. tuberculosis*.

## 10. LITERATURA CITADA

Agranoff D, Monahan IM, Mangan JA, Butcher PD, Krishna S. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the *Nramp* family. *Journal of Experimental Medicine*. 190:717-724.

Aldovini A, Husson N, Young A. 1993. The *ura* A locus and homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Bacteriology*. 175:7282-7289.

Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. 1995. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Journal of Immunology*. 154:3359-3372.

Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ. 2000. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infection and Immunity*. 68:767-778.

Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW. 1993. Cloning of a *Mycobacterium tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science*. 261:1454-1457.

Asseffa A, Dickson LA, Mohla S, Bremner TA. 1993. Phorbol myristate acetate-differentiated THP-1 cells display increased levels of MHC class I and class II mRNA and interferon- $\gamma$ -inducible tumoricidal activity. *Oncology Research*. 5:11-18.

Azad AK, Sirakova TD, Rogers LM, Kolattukudy PE. 1996. Targeted replacement of the mycocerosic acid synthase gene in *Mycobacterium bovis* BCG produces a mutant that lacks mycosides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93:4787-4792.

Balasubramanian V, Pavelka MS Jr, Bardarov SS, Martin J, Weisbrod T, McAdam RA, Bloom BR, Jacobs WR Jr. 1996. Allelic exchange in *Mycobacterium tuberculosis* with long linear substrates. *Journal of Bacteriology*. 178: 273-279.

Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RL. 1990. Local production of tumor necrosis factor and INF $\gamma$  in tuberculosis pleuritis. *Journal of Immunology*. 145:149-154.

Bermudez LE, Goodman J. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infection and Immunity*. 64:1400-1406.

Bermudez LE, Sangari FJ, Kolonoski P, Petrofsky M, Goodman J. 2002. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infection and Immunity*. 70:140-146.

Berthet FX, Gounon P, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Chavarot P, Thouron F, Maranghi E, Pelicic V, Portnoi D, Marchal G, Gicquel B, Berthet FX, Lagranderie M. 1998. Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. *Science*. 282:759-762.

Birkness KA, Deslauriers M, Bartlett JH, White EH, King CH, Quinn FD. 1999. An *in vitro* tissue culture bilayer model to examine early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*. 67:653-658.

Bishai WR, Dannenberg AM Jr, Parrish N, Ruiz R, Chen P, Zook BC, Johnson W, Boles JW, Pitt ML. 1999. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 and H37Rv in rabbits evaluated by Lurie's pulmonary tubercle count method. *Infection and Immunity*. 67:4931-4934.

Boesen H, Jensen BN, Wilcke T, Andersen P. 1995. Human T-cell responses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 63:1491-1497.

Brock TD, Smith DW, Nadrigan MT. 1987. *Microbiología*. Prentice Hall: México DF., pp 127.

Brodin P, Demangel C, Cole ST. 2005. Introduction to functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. In: *Tuberculosis and Tubercle Bacillus*. Cole ST. (ed). ASM Press: Washington D.C. pp 143-164.

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

Buchanan RE, Gibbons NE. 1984. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Board: Baltimore, pp. 687-729.

Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilthot C. 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular Microbiology*. 34:257-267.

Carter G, Wu M, Drummond DC, Bermudez LE. 2003. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *Journal of Medical Microbiology*. 52:747-752.

Castro-Garza J, Harold King C, Swords WE, Quinn FD. 2002. Demonstration of spread by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in A549 epithelial cell *monolayers*. *FEMS Microbiology Letters*. 212:145-149.

Chan J, Silver R, Kampmann B, Wallis R. 2005. Intracellular models of *Mycobacterium tuberculosis* infection. In: *Tuberculosis and Tubercle Bacillus*. Cole ST (ed). ASM Press: Washington D.C., pp 437-443.

Chatterjee D, Hunter SW, McNeil M, Brennan PJ. 1992. Lipoarabinomannan, multiglycosylated form of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols. *Journal of Biological Chemistry*. 267:6228-6233.

Chatterjee D, Lowell K, Rivoire B, McNeil MR, Brennan PJ. 1992. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. *Journal of Biological Chemistry*. 267:6234-6239.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S V, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, Mclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393:537-544.

Collins DM, Kawakami RP, Lisle GW, Pascopella L, Bloom BR, Jacobs WR. 1995. Mutation of the principal sigma factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92:8036-8040.

Collins DM. 1996. In search of tuberculosis virulence genes. *Trends in Microbiology*. 4:426-430.

Corbett L, Raviglione M. 2005. Global burden of tuberculosis: past, present, and future. In: *Tuberculosis and Tubercle Bacillus*. Cole ST. (ed). ASM Press: Washington D.C., pp 3-12.

Cree IA, Nurbai S, Milne G, Beck JS. 1987. Cell death in granulomata: the role of apoptosis. *Journal of Clinical Pathology*. 40:1314-1319.

Crowle AJ, Dahl R, Ross E, May MH. 1991. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infection and Immunity*. 59:1823-1831.

Dahl WJ, Moulder JW, Roberts EA, O'Gaora P, Young DB, Friedman RL. 2000. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene that enhances mycobacterial survival in macrophages. *Journal of Bacteriology*. 182:377-384.

Danelishvili J, McGarvey J, Li Y, Bermudez LE. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cellular Microbiology*. 5:649-660.

Daniel AK, Lee RE, Portaels F, Small PL. 2004. Analysis of *Mycobacterium species* for the presence of a macrolide toxin, mycolactone. *Infection and Immunity*. 72:123-132.

Dannenberga A, Rook G. 1994. Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis: an Interplay of Tissue-Damaging and Macrophage-Activating Immune Responses-Dual Mechanisms that Control Bacillary Multiplication. In: *Tuberculosis Pathogenesis, Protection and Control*. Bloom B.R. (ed). ASM Press: Washington D.C., pp. 459-483.

Deretic V, Vergne I, Chua J, Master S, Singh SB, Fazio JA, Kyei G. 2004. Endosomal membrane traffic: convergence point targeted by *Mycobacterium tuberculosis* and HIV. *Cellular Microbiology*. 6:999-1009.

Dobos KM, Spotts EA, Quinn FD, King CH. 2000. Necrosis of lung epithelial cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation. *Infection and Immunity*. 68:6300-6310.

Dorman SE, Hatem CL, Tyagi S, Aird K, Lopez-Molina J, Pitt ML, Zook BC, Dannenberg AM Jr, Bishai WR, Manabe YC. 2004. Susceptibility to tuberculosis: clues from studies with inbred and outbred New Zealand white rabbits. *Infection and Immunity*. 72:1700-1705.

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

Dubnau E, Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression in macrophages. *Microbes and Infection*. 5: 629-637.

Dunn PL, North RJ. 1995. Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. *Infection and Immunity*. 63:3428-3437.

Durrbaum-Landmann IJ, Gercken HD, Flad, Ernst M. 1996. Effect of *in vitro* infection of human monocytes with low numbers of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on monocyte apoptosis. *Infection and Immunity*. 64:5384-5389.

Fenhalls G., Liesel S, Lorraine M, Bezuidenhout J, Betts JC, Helden P, Lukey PT, Duncan K. 2002. *In situ* detection of *Mycobacterium tuberculosis* transcripts in human

lung granulomas reveals differential gene expression in necrotic lesion. *Infection and Immunity*. 70:6330-6338.

Ferrari M, Chiara FM, Isetta AM. 1990. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. *Journal of Immunological Methods*. 131:165-172.

Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D, Hickey E, Kolonay JF, Nelson WC, Umayam LA, Ermolaeva M, Salzberg SL, Delcher A, Utterback T, Weidman J, Khouri H, Gill J, Mikula A, Bishai W, Jacobs Jr WR Jr, Venter JC, Fraser CM. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *Journal of Bacteriology*. 184:5479-5490.

Flesch IEA, Kaufmann SHE. 1990. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma-interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infection and Immunity*. 58:2675-2677.

Filley EA, Rook GAW. 1991. Effect of mycobacteria on sensitivity to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor. *Infection and Immunity*. 59:2567-2572.

Fisher LJ, Quinn FD, White E, King CH. 1996. Intracellular growth and cytotoxicity of *Mycobacterium haemophilum* in a human epithelial cell line (Hec-1-B). *Infection and Immunity*. 64:269-276.

Flynn JL, Golstein MM, Chan KJ, Triebold DK, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Scriber R, Mak TW, Bloom BR. 1995. Tumor necrosis factor  $\alpha$  is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 2:561-572.

Folch A. 1966. *Diccionario Microbiológico* University. Interamericana: México, pp. 1237.

Freeman BA. 1991. *Microbiología de Burrows*. Interamericana: México, pp.691.

Freshney RI. 2000. *Culture of animal cells, a manual of basic technique*. Wiley-Liss: New York, pp. 4-16.

Friedland JS, Shattock RJ, Griffin GE. 1993. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or particulate stimuli by human monocytic cells induces equivalent monocyte chemotactic protein-1 gene expression. *Cytokine*. 5:150-156.

Gaede KI, Mamat U, Muller-Quernheim J. 2004. Differential gene expression pattern in alveolar macrophages of patients with sarcoidosis and tuberculosis. *Journal of Molecular Medicine*. 82:206-210.

Gil DP, Leon LG, Correa LI, Maya JR, Paris SC, Garcia LF, Rojas M. 2004. Differential induction of apoptosis and necrosis in monocytes from patients with tuberculosis and healthy control subjects. *Journal of Infectious Diseases*. 189:2120-2122.

Gold B, Rodriguez GM, Marras SA, Pentecost M, Smith I. 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Molecular Microbiology*. 42:851-865.

Gomez-Flores R, Grupta S, Tamez-Guerra, Mehta RT. 1995. Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:1842-1846.

Gillies RJ, Didier N, Denton M. 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*. 159:109-113.

Harhaji L, Vuckovic O, Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Trajkovic V. 2004. Iron down-regulates macrophage anti-tumor activity by blocking nitric oxide production. *Clinical and Experimental Immunology*. 137:109-116.

Henry H. 1917. An investigation of the cultural reactions of certain anaerobes found in wounds. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 21:344-385.

Hernández-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Samperiro A, Larriva-Sahd J, Madrid MV. 1997. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 90:607-612.

Hernández-Vera M, 2003. *Caracterización genética y evaluación de los genes de fosfolipasa C de Mycobacterium tuberculosis como factores de virulencia de una línea de macrófagos*. Tesis (Doctor). Universidad Autónoma de Nuevo León.

Hinds J, Mahenthiralingam E, Kempell E, Duncan K, Stokes W, Parish T, Stoker G. 1999. Enhanced gene replacement in mycobacteria. *Microbiology*. 145:519-527.

Hopewell PC, Jasmer MR. 2005. Overview of clinical tuberculosis. In: *Tuberculosis and Tubercle Bacillus*. Cole ST (ed) ASM Press: Washington D.C., pp. 15-31.

Husson RN, James BE, Young RA. 1990. Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria. *Journal of Bacteriology*. 172:519-524.

Hinshelwood S, Stoker NG. 1992. Cloning of mycobacterial histidine synthesis genes by complementation of a *Mycobacterium smegmatis* auxotroph. *Molecular Microbiology*. 6:2887-2895.

Jacobs WR, Bloom BR. 1994. Molecular genetic strategies for identifying virulence determinants of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. Bloom BR (ed). ASM Press: Washington D.C., pp. 253-268.

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1987. Microbiología Médica. Manual Moderno: México, pp. 199-239.

Johansen KA, Gill RE, Vasil ML. Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D in Mycobacteria. 1996. Infection and Immunity. 64:3259-3266.

Kamath AT, Hanke T, Briscoe H, Britton WJ. 1999. Co-immunization with DNA vaccines expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and mycobacterial secreted proteins enhances T-cell immunity, but not protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. Immunology. 96:511-516.

Kalpana GV, Bloom BR, Jacobs WR Jr. 1991. Insertional mutagenesis and illegitimate recombination in mycobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences. 88:5433-5437.

Kansal RG, Gomez-Flores R, Mehta RT. 1998. Change in colony morphology influences the virulence as well as the biochemical properties of the *Mycobacterium avium* complex. Microbial Pathogenesis. 25:203-214.

Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. International journal of medical microbiology. 295:405-418.

Karlin S. 2001. Detecting anomalous gene clusters and pathogenicity islands in diverse bacterial genomes. Trends in Microbiology. 9:335-3343.

Kaufmann Stefan HE. 2001. How can immunology contribute the control of tuberculosis?. Nature. 1:20-30.

Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meeks BB, Fenton MJ, Kornfeld H. 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. Infection and Immunity. 65:298-304.

King CH, Mundayoor S, Crawford JT, Shinnick TM. 1993. Expression of contact dependent cytolytic activity by *Mycobacterium tuberculosis* and isolation of the genomic locus that encodes the activity. Infection and Immunity. 61:2708-2712.

Klingler K, Tchou-Wong KM, Brandli O, Aston C, Kim R, Chi C, Rom WN. 1997. Effects of Mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. Infection and Immunity. 65:5272-5278.

Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda MW, Sommers HM, Winn JT. 1992. Diagnóstico Microbiológico. Panamericana: Argentina, pp. 418.

Krahenbuhl J. 1995. Role of Mycobacterial constituents in regulation of macrophage effector function. In: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Roth J, Bolin C, Brogden K, Minion C, Wannemuehler M (eds). ASM Pres: Washington D.C., pp. 97.

Kruys V, Kemmer K, Shakhov A, Jongeneel V, Beutler B. 1992. Constitutive activity of the tumor necrosis factor promoter is canceled by the 3' untranslated region in nonmacrophage cell lines; a trans-dominant factor overcomes this suppressive effect. Proceedings of the National Academy of Sciences 89:673-677.

Kuby J. 1994. Immunology. W.H. Freeman and Company: New York. pp. 52, 187.

Kunkel SL, Robertson DC. 1979. Purification and chemical characterization of the heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 25:586-596.

Kumar A, Bose M, Brahmachari V. 2003. Analysis of expression profile of mammalian cell entry (*mce*) operons of *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity. 71:6083-6087.

Kusner DJ, Adams J. 2000. ATP-induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D. Journal of Immunology. 164:379-388.

Lasco TM, Cassone L, Kamohara H, Yoshimura T, McMurray DN. 2005. Evaluating the role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in experimental pulmonary tuberculosis in the guinea pig. Tuberculosis. 85:245-258.

Leao SC, Rocha CL, Murillo LA, Parra CA, Patarroyo ME. 1995. A species specific nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a protein that exhibits hemolytic activity when expressed in *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 63:4301-4306.

Lee BY, Horwitz MA. 1999. T-cell epitope mapping of the three most abundant extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in outbred guinea pigs. Infection and Immunity. 67:2665-2670.

Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY, Joo HG and Woo HJ. 2004. Immunomodulatory and antitumor effects *in vitro* by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. Journal of Veterinary Science. 5:41-48.

Lee MH, Pascopella L, Jacobs W, Hatfull G. 1991. Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacilli Calmette-Guérin. Proceedings of the National Academy of Sciences. 88:3111-3115.

Lenette K, Spaulding J, Truant A. 1974. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press: Washington D.C., pp785.

Levison WE, Jawetz E. 1992. Microbiología e Inmunología. Manual Moderno: México, pp. 96, 115, 126.

Li ZH, Nie BM, Chen H, Chen SY, He P, Lu Y, Guo XK, Lui JX. 2004. *In vitro* anti-coxsackievirus B(3) effect of ethyl acetate extract of Tian-hua-fen. World Journal of Gastroenterology. 10:2263-2266.

Mahenthalingam E. 1998. Extraction of RNA from Mycobacteria. In: Methods in Molecular Biology, Mycobacteria Protocols. Parish T. and Stoker N.G. (eds). Humana Press: Totowa, New Jersey, pp 65-75.

Manganelli R, Dobnau E, Tyagi S, Russell KF, Smith I. 1999. Differential expression of sigma factor gene in *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology. 31:715-724.

Mariani F, Capelli G, Riccardi G, Collizi V. 2000. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv comparative gene-expression analysis in synthetic medium and human macrophage. Gene. 253:281-291.

McDonough KA, Kress Y. 1995. Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity. 63:4802-4811.

McFadden J. 1996. Recombination in mycobacteria. Molecular Microbiology. 21:205-211.

McNamara PJ, Bradley GA, Songer JG. 1994. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Molecular Microbiology. 12:921-930.

Mehta P, King C, Whitte E, Murtagh J, Quinn F. 1996. Comparison of *in vitro* models for the study of *Mycobacterium tuberculosis* invasion and intracellular replication. Infection and Immunity. 64:2673-2679.

Miller BH, Shinnick TM. 2000. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in resistance to killing by human macrophages. Infection and Immunity. 68:387-390.

Oddo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PRA. 1998. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Immunology. 10:5448-5454.

PAHO, 2004. Disponible en el sitio de Red:  
<http://www.paho.org/English/ad/dpc/cd/tb-fact-sheet-2004.pdf> [Revisado el 20 de marzo del 2006].

PAHO, 2004. Disponible en el sitio de Red:  
[http://www.paho.org/English/DD/PUB/Fact\\_Sheet\\_SP596.pdf](http://www.paho.org/English/DD/PUB/Fact_Sheet_SP596.pdf) [Revisado el 20 de marzo del 2006].

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

Pollock JM, Andersen P. 1997. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. Infection and Immunity. 65:2587-2592.

Qu XJ, Yang JL, Rusell PJ, Goldstein D. 2004. Changes in epidermal growth factor receptor expression in human bladder cancer cell lines following interferon-alpha treatment. Journal of Urology. 172:733-738.

Rachman H, Strong M, Schaible U, Schuchhardt J, Hagens K, Mollenkopf H, Eisenberg D, Kaufmann SH. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression profiling within the context of protein networks. Microbes and Infection. 8:747-57.

Rautela GS, Abramson C. 1973. Crystallization and partial characterization of *Staphylococcus aureus* hyaluronate lyase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 158:687-94.

Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, Bortan Y, Pelicic V, Manganelli R, Smith I, Gicquel B, Jackson M. 2002. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology. 45:203-217.

Read JK, Heggie CM, Meyers WM, Connor DH. 1974. Cytotoxic activity of *Mycobacterium ulcerans*. Infection and Immunity. 9:1114-1122.

Rhoades ER, Orme IM. 1997. Susceptibility of a panel of virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive nitrogen intermediates. Infection and Immunity. 65:1189-1195.

Riendeau CJ, Kornfeld H. 2003. THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection. Infection and Immunity. 71: 254-259.

Riley LW. 1995. Determinants of cell entry and intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis*. Trends in Microbiology. 3:27-31.

Rilova Barrusio B. 2006. Tuberculosis [internet] Universidad Autónoma de Barcelona. Disponible en el sitio de red: <http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/>

treballs02%2D03/B\_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm [Revisado el 15 de enero del 2006].

Rindi L, Lari N, Garzelli C. 1999. Search for genes potentially involved in *Mycobacterium tuberculosis* virulence by mRNA differential display. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 258:94-101.

Rivera-Marrero CA, Burroughs MA, Masse RA, Vannberg FO, Leimbach DL, Roman J, Murtagh JJ Jr. 1998. Identification of genes differentially expressed in *Mycobacterium tuberculosis* by differential display PCR. *Microbial Pathogenesis*. 25:307-316.

Robbins SL, Cotran RS. 1985. Patología funcional y estructural. Interamericana: México, pp.790-795.

Rojas M, Barrera LF, García LF. 1999. TNF- $\alpha$  and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *Journal of Immunology*. 162:6122-6131.

Rojas M, García LF, Nagau J, Puzo G, Oliver M. 2000. Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis by altering Ca<sup>2+</sup>-dependent cell signaling. *Journal of Infection Disease*. 182:240-251.

Rook G, Bloom B. 1994. Mechanisms of Pathogenesis in Tuberculosis. In: Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Bloom BR. (ed). ASM Press: Washington D.C., pp. 485-501.

Rothman SW. 1986. Techniques for measuring 50% end points in cytotoxicity assays for *Clostridium difficile* toxins. *Journal of Clinical Pathology*. 39:672-676.

Sayler A, Whitt D. 1994. Bacterial Pathogenesis. ASM Press: Washington DC., pp. 307.

Schorey JS, Li Q, McCourt DW, Bong-Mastek M, Clark-Curtiss JE, Ratliff TL, Blown EJ. 1995. A *Mycobacterium leprae* gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infection and Immunity*. 63:2652-2657.

Sephard CC. 1956. Growth characteristic of tubercle bacilli and certain other mycobacteria in HeLa cell. *Journal of Experimental Medicine*. 9:39-43.

Shaik MS, Chatterjee A, Singh M. 2004. Effects of monensin liposomes on the cytotoxicity, apoptosis and expression of multidrug resistance genes in doxorubicin-resistant human breast tumor (MCF-7/dox) cell-line. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 56:899-907.

Shattock RJ, Friedland JS, Griffin GE. 1993. Modulation of HIV transcription in and release from human monocytic cells following phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Research in Virology*. 144:7-12.

Shi S, Blumenthal A, Hickey CM, Gandotra S, Levy D, Ehrt S. 2005. Expression of many immunologically important genes in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages is independent of both TLR2 and TLR4 but dependent on IFN- $\alpha$  receptor and STAT1. *Journal of Immunology*. 175:3318-3328.

Silver RF, Li Q, Ellner JJ. 1998. Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. *Infection and Immunity*. 66:1190-1199.

Singh R, Singh A, Tyagi AK. 2005. Deciphering the genes involved in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 85:325-335.

Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*. 16:463-496.

Snider DE, Raviglione M, Kochi A. 1994. Global Burden of Tuberculosis. In: *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Bloom BR. (ed). ASM Press: Washington DC., pp. 3-24.

Songer JG. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends in Microbiology*. 5:156-161.

Spira A, Carroll JD, Liu G, Aziz Z, Shah V, Kornfeld H, Keane J. 2003. Apoptosis genes in human alveolar macrophages infected with virulent or attenuated *Mycobacterium tuberculosis*: a pivotal role for tumor necrosis factor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 29:545-551.

Stock AH. 1939. Studies on the Hemolytic Streptococcus: III. Polysaccharide and protein fractions encountered in the precipitation of erythrotoxic toxin from culture filtrates. *Journal of Bacteriology*. 38:511-524.

Stokes RW, Doxsee D. 1999. The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the macrophage-like cell line THP-1: a comparison with human monocyte-derived macrophages. *Cellular Immunology*. 197:1-9.

Takii T, Yamamoto Y, Chiba T, Abe C, Belisle JT, Brennan PJ, Onozaki K. 2002. Simple fibroblast-based assay for screening of new antimicrobial drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46:2533-2539.

Tchou-Whong KM, Tanabe O, Chi C, Yie TA, Rom WN. 1999. Activation of NF- $\kappa$ B in *Mycobacterium tuberculosis* induced interleukin-2 receptor expression in

mononuclear phagocytes. American Journal of Respiratory Critical Care Medicine. 159:1323-1329.

Thomas M, Finnegan CE, Rogers KM, Purcell JW, Trimble A, Johnston PG, Boland MP. 2004. STAT1: a modulator of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Research. 64:8357-8364.

Thorson LM, Doxsee D, Scott M, Wheeler P, Stokes R. 2001. Effect of Mycobacterial phospholipids on interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. Infection and Immunity. 69:2172-2179.

Trifiro S, Bourgaul AM, Lebel F, Rene P. 1990. Ghost mycobacteria on Gram stain. Journal of Clinical Microbiology. 28:146-147.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). International Journal of Cancer. 26:171-176.

Tullius MV, Harth G, Horwitz MA. 2003. Glutamine synthetase GlnA1 is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human THP-1 macrophages and guinea pigs. Infection and Immunity. 71: 3927-3936.

Vanham G, Toossi Z, Hirsch CS, Wallis RS, Schwander SK, Rich EA, Ellner JJ. 1997. Examining a paradox in the pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/anergy. Tubercle and lung disease.78:145-158.

Valdiosera, C, 2006. El proteoma humano y la era posgenómica. Disponible en el sitio de Red: <http://www.jornada.unam.mx/2006/03/09/033a1tec.php> [Revisado el 9 de marzo de 2006].

Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF, Orme I, Agerton T, Hoy D, Jones JS, Westmoreland H, Onorato IM. 1998. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. The New England Journal of Medicine. 338:633-639.

Vargas-Villarreal J, Mata-Cardenas BD, Deslauriers M, Quinn FD, Castro-Garza J, Martinez-Rodriguez HG, Said-Fernandez S. 2003. Identification of acidic, alkaline, and neutral sphingomyelinase activities in *Mycobacterium tuberculosis*. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. 9:225-230.

Vera-Cabrera L, Castro-Garza J, Welsh O. 2003. Mycobacterial phospholipases. In: Research Advances in Microbiology (3), Mojan RM (ed). Global Research Networks: Kerala, India, pp. 169-174.

Vera-Cabrera L, Molina-Torres C, Hernández-Vera MA, Barrios-García HB, Balckwood K, Villarreal-Treviño L, Ocampo-Candiani J, Welsh Oliverio, Castro-Garza J. 2006. Genetic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with

deletions in the plcA-plcB-plcC Locus. Tuberculosis. (Aceptado Referencia N°. TUBE-D-05-00027R1) En prensa.

Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, Deretic V. 2005. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 102:4033-4038.

Washington JA. 1981. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. Springer-Verlag: New York, pp.199.

Wheeler PR, Ratledge C. 1991. Phospholipase activity of *Mycobacterium leprae* harvested from experimentally infected armadillo tissue. Infection and Immunity. 59:2781-2789.

Wigginton JE, Kirschener D. 2001. A model to predict cell-mediated immune regulatory mechanisms during human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Immunology. 166: 1951-1967.

Wistreich GA, Lechtman MD. 1989. Prácticas de laboratorio en Microbiología. Limusa: México, pp. 93.

Zhang M, Gong J, Lin Y, Barnes PF. 1998. Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. Infection and Immunity. 66:794-799.

Zhang M, Kim K, Iyer D, Lin Y, Belisle J, McEnery K, Crandall E, Barnes P. 1997. Effects of *Mycobacterium tuberculosis* on the bioelectric properties of the alveolar epithelium. Infection and Immunity. 65:92-98.

Zivadinovic D, Gametchu B, Watson CS. 2005. Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses. Breast Cancer Research. 7:101-112.

Zychlinsky A, Sansonetti PJ. 1997. Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death?. Trends in Microbiology. 5:201-204.

## 11. APÉNDICE

### 11.1 Preparación de medios y soluciones

**Acetato de sodio 3 M, pH 6.0:** 2.46 g de acetato de sodio en 10 ml de agua-DEPC. Ajustar pH a 6.0.

**Agua-DEPC** (diethyl pirocarbonato): 0.1% (v/v) DEPC en agua deionizada. Esterilizar por autoclave para inactivar el DEPC.

**Bromuro de etidio:** bromuro de etidio 10 mg/ml en agua-DEPC.

**Buffer de extracción (GEB):** 59 g de tiocianato de guanidina y 1 g de N-lauryl-sarcosina en 50 ml de agua-DEPC. 0.83 ml de Acetato de sodio 3M, pH 6.0 y aforar a 100 ml con agua-DEPC. Inmediatamente antes de usar, colocar en un tubo estéril 5 mg de ditiotreitól (DTT) y agregar 5 ml de la solución de guanidina-sarcosina para dar una concentración de DTT de 1.5 mg/ml.

**Etanol grado analítico:** etanol al 70 y 95 % en agua-DEPC. La solución al 95 % deberá estar enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para una rápida precipitación de los ácidos nucleicos.

**Medio Middlebrook 7H10 AGAR** (Difco). Agregar 19 g de Medio Middlebrook 7H10 a 900 ml de agua destilada con 5 ml de glicerol (J.T.Baker), calentar y dejar hervir por 1 minuto; esterilizar por 10 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ , dejar enfriar a  $55^{\circ}\text{C}$  y adicionar 100 ml de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Becton Dickinson). Distribuir 15 ml a cajas de petri.

**Medio Middlebrook 7H9** (Difco). Agregar 4.7 g de Medio Middlebrook 7H9 a 900 ml de agua destilada con 2 ml de glicerol (J.T.Baker), esterilizar por 10 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ , dejar enfriar y adicionar 100 ml de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Becton Dickinson).

**MOPS 10x:** 200 mM de MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid) (Research Organic Inc, Inc., Cleveland, OH.) 50 mM de NaOAc (Acetato de Sodio, SIGMA, St. Louis, MO), 10 mM de EDTA pH 8 (Ethylenediaminetetraacetic acid) (Research Organic Inc), disuelto en 0.1% de agua DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) (Sigma Cat. D-5758).

**Solución de carga (stock 5X):** Ficol15% p/v, EDTA 6 mM, pH 8.0, azul de bromofenol 0.25% y cyanol xileno 0.25 % en agua-DEPC.

**Solución de digestión de Dnasa:** preparar 100 ml de una solución 10 mM de MgCl<sub>2</sub> (95.21 mg), 20 mM de Tris-HCl (242 mg) pH 8.0; tratarlo con DEPC igual que el agua.

**Solventes orgánicos:** Phenol neutro:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v).

**TBE** (Tris HCl/Borato 45 mM, EDTA 1 mM). 54 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0; disolver en 1 litro.

**Tween Salino:** NaCl 0.8% (p/v) en Tween-80 al 0.05% en agua (v/v)

## **RESUMEN CURRICULAR**

Hugo Brígido Barrios García

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias Acentuación en Microbiología

**Tesis: ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE *Mycobacterium tuberculosis* DURANTE LA INFECCIÓN A MACRÓFAGOS.**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Lugar y Fecha de Nacimiento: 26 de enero de 1970

Nombre de los padres: Brígido Barrios Ahumada y Rosa S. García Hernández.

Educación: **1)** Médico Veterinario y Zootecnista. 1992. Universidad Autónoma de Tamaulipas. **2)** Especialidad en Diagnóstico en Bacteriología y Micología Veterinaria. 1994. Universidad Nacional Autónoma de México. **3)** Maestría en Ciencias Veterinarias: Microbiología. 1998. Universidad Nacional Autónoma de México.

Experiencia profesional: **1)** Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS; Programa de Retención de Investigadores, proyecto: “Epidemiología molecular de la tuberculosis pulmonar en el área metropolitana de Monterrey”; Monterrey N.L., México. Agosto de 2004 - agosto de 2005. **2)** Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS; Becario de Investigación; Investigación básica relacionada con *M. tuberculosis*. Monterrey N.L., México. Septiembre 2000 - febrero de 2004. **3)** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Becado de Estudios de Doctorado en Ciencias; Facultad de Ciencias Biológicas, UANL; febrero de 2001 - enero de 2003. **4)** Biotecnologías Universitarias S.A., Producción de reactivos y servicios en Biología Molecular, 1998. **5)** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM; Profesor de laboratorio en la materia de Bacteriología y Micología; México DF. 1997 -1998. **6)** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Becado de Estudios de Maestría en Ciencias; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; septiembre de 1995, agosto de 1997. **7)** Escuela Secundaria Diurna Federal N° 321; Turno matutino, 30 horas. México DF., Ciclo Escolar 1994-1995.

Publicaciones: 1 artículos publicado, 1 artículo aceptado, 1 artículo enviado y 2 capítulos de libro.