

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
PROGRAMA DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**Expresión genética de *Mycobacterium tuberculosis*  
durante condiciones hipóxicas**

**TESIS**

**QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**PRESENTA**

**M. en C. Claudia Badillo López**

**Directores de tesis:**

**Dr. Jorge Alberto González y Merchand**

**Dr. Jorge Francisco Cerna Cortés**



**México D.F., 2010**

## AGRADECIMIENTOS

---

Este trabajo se realizó en el **Laboratorio de Microbiología Molecular** del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Jorge A. González y Merchand y del Dr. Jorge F. Cerna Cortés,

Se llevó a cabo con el apoyo financiero de las siguientes instituciones:

- **La Comunidad Europea**

Proyecto: "LATENT TUBERCULOSIS: New tools for the detection and clearance of dormant *Mycobacterium tuberculosis*" con clave HEALTH-F3-2008-2009 99.

La alumna fue becaria de los siguientes programas e instituciones:

- **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** durante el periodo agosto 2006-junio 2010.

- **El programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional** durante el periodo agosto-diciembre 2009.

Proyecto SIP: "*Mycobacterium tuberculosis*: un modelo para el estudio morfológico, genético y proteico de un microorganismo patógeno" con clave SIP 2009125.

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Índice de figuras</b>	I
<b>Índice de tablas</b>	III
<b>Resumen</b>	IV
<b>Abstract</b>	V
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Patogenia de la tuberculosis	1
1.2 La latencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y su expresión genética	6
1.3 El papel de los lípidos durante la latencia	8
<b>2. Justificación</b>	<b>17</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>18</b>
<b>4. Objetivo general</b>	<b>19</b>
4.1 Objetivos específicos	19
<b>5. Material y métodos</b>	<b>20</b>
5.1 Diseño experimental	20
5.2 Material biológico	21
5.3 Preparación de los cultivos experimentales	21
5.4 Curva de crecimiento	21
5.5 Obtención del DNA genómico	23
5.6 Genes candidatos y diseño de sus iniciadores	24
5.7 Confirmación de la especificidad de los iniciadores mediante secuenciación	25
5.8 Elaboración de las curvas tipo para los 19 genes micobacterianos	25
a) Amplificación del DNA	25
b) Determinación de las curvas tipo de cada gen	26
5.9 Modelo de hipoxia de Wayne	26
5.10 Obtención de las micobacterias en fase logarítmica, fase estacionaria y en la fase de Persistencia No Replicativa 1 y 2	28
5.11 Extracción de RNA total	28
5.12 Purificación del RNA	29
5.13 Transcripción reversa del RNA total (obtención de cDNA)	30
5.14 Análisis estadístico de los resultados	31

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>32</b>
6.1 Establecimiento del crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta	32
6.2 Aislamiento de DNA genómico de <i>M. tuberculosis</i>	34
6.3 Genes candidatos y diseño de sus iniciadores	34
6.4 Construcción de las curvas tipo para la técnica de RT-PCR en tiempo real	36
6.5 Estandarización del modelo de latencia <i>in vitro</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	42
6.6 Viabilidad de <i>M. tuberculosis</i> durante su adaptación a la latencia por hipoxia	42
6.7 Extracción del RNA total	43
6.8 Cuantificación de la expresión genética de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en el modelo de latencia <i>in vitro</i> de Wayne en presencia de ácidos grasos	46
<b>7. Discusión</b>	<b>59</b>
7.1 Genes normalizadores para la RT-PCR en tiempo real	62
7.2 Genes asociados al ciclo celular, a la reactivación y a la secreción de antígenos inmunodominantes	63
7.3 Genes asociados a la hipoxia y a la respuesta oxidativa	67
7.4 Genes asociados al metabolismo de lípidos	71
<b>8. Conclusiones</b>	<b>79</b>
<b>9. Perspectivas</b>	<b>80</b>
<b>10. Bibliografía</b>	<b>81</b>
<b>Apéndice I Reactivos y soluciones</b>	
<b>Apéndice II Resultados</b>	

		<b>PÁGINA</b>
Figura 1	Estructura de un granuloma	2
Figura 2	Patogénesis de la tuberculosis	3
Figura 3	Algunas moléculas lipofílicas complejas de la envoltura celular de <i>M. tuberculosis</i>	10
Figura 4	Esquema de la $\beta$ oxidación de un palmitoil-CoA	12
Figura 5	Metabolismo del carbono en las micobacterias	14
Figura 6	Sitio de hidrólisis de las fosfolipasas C y D	15
Figura 7	Transporte de ácidos grasos de cadena larga en <i>E. coli</i>	16
Figura 8	Esquema general de trabajo	22
Figura 9	Curva de crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta (densidad óptica)	33
Figura 10	Curva de crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta (cuenta viable)	33
Figura 11	Electroferograma del DNA genómico de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	34
Figura 12	Electroferograma de los fragmentos amplificados por PCR de los 9 genes de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	35
Figura 13	Curvas tipo de los 19 genes a estudiar	39
Figura 14	Linearización de las curvas tipo para los 19 genes a estudiar	40
Figura 15	Curvas de desnaturalización para los productos de amplificación de los 19 genes a estudiar	41
Figura 16	Viabilidad de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv durante su adaptación a la latencia en presencia de ácidos grasos de cadena corta	43
Figura 17	Electroferograma del RNA total de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	44
Figura 18	Electroferograma de la PCR utilizando como molde el RNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv obtenido en diferentes condiciones	45
Figura 19	Expresión genética de los dos posibles normalizadores en <i>M. tuberculosis</i> en presencia de ácidos grasos de cadena corta	47
Figura 20	Expresión de los genes involucrados en el ciclo celular, en la producción de antígenos y en la reactivación en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta	49
Figura 21	Expresión de los genes involucrados en hipoxia y en la respuesta oxidativa en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta	50

## INDICE DE FIGURAS

---

		<b>PÁGINA</b>
Figura 22	Expresión de los genes involucrados en metabolismo de lípidos en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta	53
Figura 23	Expresión relativa de los genes involucrados en el ciclo celular, en la producción de antígenos y en la reactivación en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	55
Figura 24	Expresión relativa de los genes involucrados en hipoxia y en la respuesta oxidativa en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	56
Figura 25	Expresión relativa de los genes involucrados en el metabolismo de lípidos en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	58
Figura 26	El regulon PhoP en <i>M. tuberculosis</i>	68
Figura 27	Modelo de disipación del estrés reductivo durante la persistencia de <i>M. tuberculosis</i>	71
Figura 28	Esquema de la $\beta$ oxidación de los ácidos grasos en micobacterias	72
Figura 29	Rutas metabólicas relacionadas con la utilización de acetil-CoA y de propionil-CoA en <i>M. tuberculosis</i>	73
Figura 30	Estructura del polisorbato 80	74

## INDICE DE TABLAS

---

		PÁGINA
Tabla 1	Patogénesis de la tuberculosis y características de cada fase de la infección	4
Tabla 2	Características diferenciales de las fases del modelo de Wayne	7
Tabla 3	Genes propuestos para este estudio	24
Tabla 4	Iniciadores utilizados para la PCR en tiempo real de 9 genes de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	35
Tabla 5	Resumen de los resultados de las búsquedas de las secuencias analizadas mediante BLAST	36
Tabla 6	Condiciones de reacción estandarizadas para las PCR cuantitativas	38
Tabla 7	Establecimiento de la reducción parcial y total del azul de metileno en el modelo de Wayne	42

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por micobacterias del “Complejo *Mycobacterium tuberculosis*” (MTC). Actualmente, se estima que la tercera parte de la población se encuentra infectada en forma latente con alguna cepa del MTC. Algunos estudios sugieren que los lípidos podrían jugar un papel fundamental durante la adaptación de *M. tuberculosis* (*M.tb*) a la latencia. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la latencia inducida por hipoxia en presencia de propionato o valerato de sodio, sobre la expresión de algunos genes de *Mtb* H37Rv. Para cumplir con dicho objetivo, primeramente, se comprobó la capacidad de la cepa de crecer en presencia de dichos ácidos grasos; posteriormente, la micobacteria se cultivó hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento y se expuso a condiciones de hipoxia fase NRP1) y anaerobiosis (fase NRP2) empleando el modelo de latencia *in vitro* de Wayne. Se procedió a extraer el RNA total en la fase logarítmica y estacionaria, así como durante la latencia *in vitro*, y se cuantificó la expresión de 19 genes de *M.tb* H37Rv mediante RT-PCR en tiempo real. Los perfiles de expresión (normalizados con el rRNA 16S) mostraron que en presencia de propionato, los genes *dnaA* y *fstZ* presentaron una mayor expresión en la fase logarítmica y la fase NRP2; sin embargo, este aumento en la expresión en la fase NRP2, no se vio reflejado en un incremento en el número de UFC, es decir que la hipoxia induce un efecto bacteriostático. Respecto al gen *rpfB*, que codifica para un posible factor promotor de la reactivación, se detectó un menor número de transcritos durante las fases relacionadas con estrés, tanto en medio sin ácidos grasos como en medio adicionado de ellos, lo cual podría estar relacionado con algunos cambios morfológicos como el engrosamiento de la envoltura celular, fenómeno descrito durante la fase de persistencia no replicativa en otros microorganismos. En cuanto a los genes relacionados con hipoxia (*dosR*, *hspX*, Rv2626, Rv3134), durante la fase estacionaria y NRP2 (en presencia de propionato) se presentó una mayor actividad transcripcional que en ausencia de ácido graso; en tanto que la adición de valerato ocasionó una represión de estos mismos genes. En estas mismas fases (fase estacionaria y NRP2) se observó también una mayor sobreexpresión (8 y 21 veces respectivamente) del gen Rv3130 (relacionado con la biosíntesis y acumulación de triglicéridos) y de los genes *mmpL7* (11 veces más transcritos), *groEL1* (11 veces más transcritos) y para *fbpB* (52 veces más); estos últimos genes están relacionados con la biosíntesis de lípidos de membrana. En conclusión, los resultados encontrados sugieren que la falta de oxígeno y la presencia de propionato parecieran inducir en *M.tb* un aumento en la biosíntesis de lípidos de reserva que le ayudaran a persistir durante la latencia. En forma paralela, dicho estrés produciría un incremento en la biosíntesis de lípidos de membrana. Nuestros resultados sugieren que la micobacteria activa el metabolismo de lípidos para sobrevivir durante la latencia.



## ABSTRACT

---

Tuberculosis (Tb), is a disease caused by microorganisms belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). Nowadays, it is estimated that a staggering one-third of the world's population is infected with some strain of the MTC. There is emerging evidence that fatty acids might be the dominant carbon source of *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) during dormancy. Therefore, the aim of the present study was to determine the gene expression of *M. tb* H37Rv in response to dormancy during hypoxic conditions in presence of sodium propionate or valerate. In order to achieve this objective, first of all, we verify that *M. tb* H37Rv was able to growth on propionate or valerate supplemented cultures. Then, the cultures were subjected to hypoxia, essentially as described by Wayne and Hayes. Total bacterial RNA was isolated from cultures during exponential and stationary phases of growth and during *in vitro* latency (hypoxia and anaerobiosis; NRP1 or NRP2, respectively). The expression of 19 genes of *M.tb* was quantified by real-time PCR. The expression profiles (normalized to the 16S rRNA) showed that on propionate, *dnaA* and *fstZ* genes were expressed higher in exponential phase and NRP2 stage than in the other conditions analyzed; the level of gene induction during NRP2 was not related to on increased of CFUs, suggesting that hypoxia might induce a bacteriostatic effect. Regarding *rpfB* gene, which encodes the resuscitation-promoting factor-like protein, we found a lower level of mRNA during phases related to stress than in exponential phase in both, with and without fatty acids; therefore, expression of this gene seems to be related to cell wall changes characteristic of non-replicative state of other microorganisms. Besides, an up-regulation of dormancy-related genes (*dosR*, *hspX*, Rv2626, Rv3134) was found in stationary phase and NRP2 (on propionate); in contrast, these genes were down-regulated when *M.tb* was cultivated on valerate. During these same stress conditions (Dubos media with propionate) the most relevant up-regulation (8 and 21-fold higher respectively) was found in Rv3130 gene (related to biosynthesis and storage of triacylglycerols) and also, in other genes, involved in biosynthesis and exportation of cell wall lipids as, *mmpL7* (11-fold higher), *groEL1* (11-fold) and *fbpB* (52-fold). In conclusion, these results indicate that during low oxygen tension (on propionate) *M.tb* H37Rv induces the synthesis of the storage lipid, triacylglycerol that could be used during dormancy. In parallel, hypoxia also induces an increase of cell wall lipids. Overall, our results suggest that lipid metabolism may be a mechanism that *M.tb* may activate in order to survive throughout dormancy.

# 1. INTRODUCCIÓN

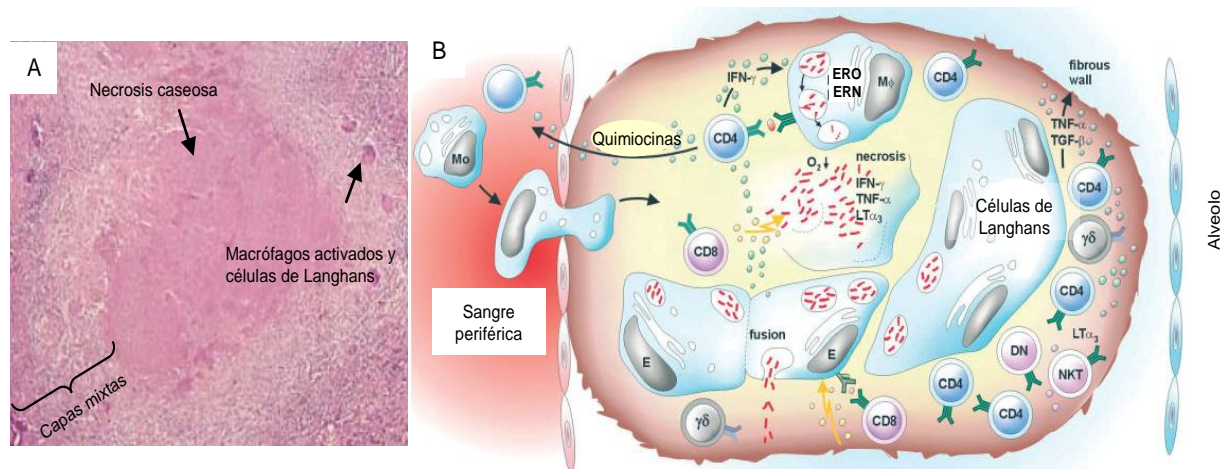
## 1.1. Patogenia de la tuberculosis

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad infecciosa causada por micobacterias del “Complejo *Mycobacterium tuberculosis*” (MTC), que incluye a las especies de *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti* y *M. tuberculosis* (Brosch y col., 2001). Afecta principalmente a los pulmones (tuberculosis pulmonar), pero también al sistema nervioso central, al sistema linfático, al sistema circulatorio, al aparato genitourinario, a los huesos, entre otros. Se denominó Tb al reconocerse que la lesión pulmonar característica consistía en la formación de un nódulo limitado ó “tubérculo”, en el que existía una proliferación celular reactiva, junto al depósito de una materia amorfa, amarilla y densa, parecida al queso: “materia caseosa” (Lucas y col., 1979).

Los principales síntomas de la tuberculosis pulmonar son: tos productiva con duración de más de tres semanas, dolor al respirar y al toser, pérdida de peso, fatiga, fiebre ligera, sudoración nocturna, estornudos y pérdida del apetito (URL1).

Para establecer la infección pulmonar, los microorganismos llegan por inhalación a los espacios alveolares, donde son fagocitados por los macrófagos pulmonares. La pared celular micobacteriana, la gran cantidad de enzimas capaces de destoxificar radicales libres y la capacidad de las micobacterias de interferir con los eventos de tráfico y señalización intracelular, les permite ocupar un fagosoma inmaduro, por lo que escapan de los mecanismos microbicidas del macrófago no activo y se replican en su interior (Stewart y col., 2003). Sin embargo, las micobacterias son internalizadas también por células dendríticas locales, que migran a los nódulos linfáticos cercanos, donde activan células T, las cuales retornan al pulmón e incrementan la respuesta antimicrobiana mediante el reclutamiento y activación de macrófagos adicionales. Esta capacidad de la micobacteria para interferir con la maduración celular está disminuida cuando este microorganismo se internaliza en los macrófagos que han sido activados por interferón- $\gamma$  (INF $\gamma$ ). En la mayoría de los individuos, esta comunicación entre las ramas innatas y adaptativas del sistema inmunológico, puede controlar la infección sin sintomatología clínica perceptible (Stewart y col., 2003).

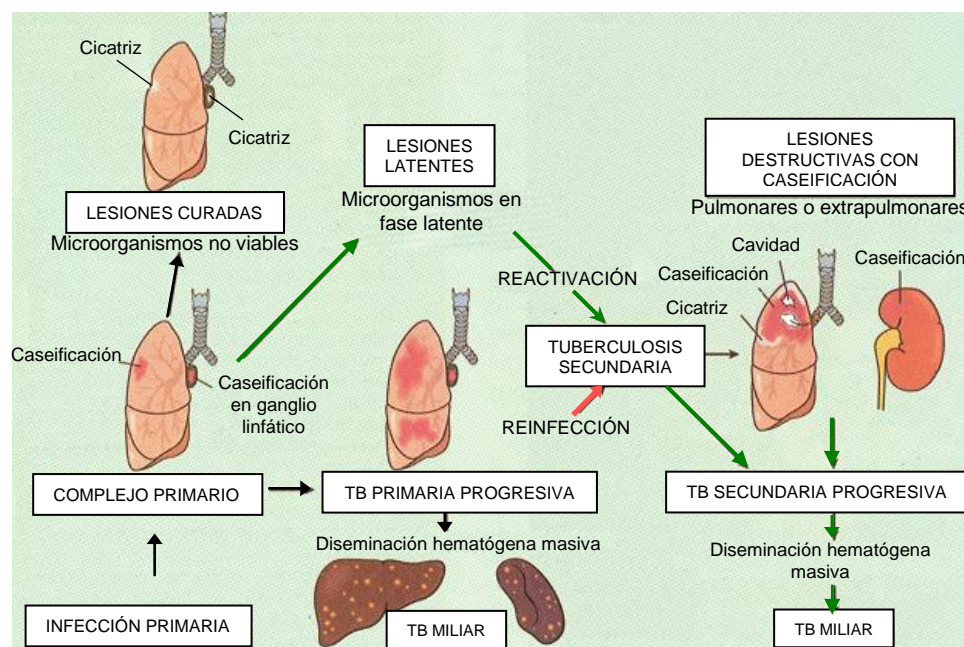
El control de la infección ocurre mediante la formación de granulomas en el sitio de primoinfección y en los ganglios linfáticos del hilio pulmonar; dichas estructuras son producto de una reacción de hipersensibilidad tipo IV inducida por las micobacterias, y consisten de un núcleo central de necrosis caseosa amorfa rodeada por una primera capa de macrófagos activados y células de Langhans, que contienen dentro de sus fagosomas a las micobacterias. Hacia el exterior del granuloma se encuentran capas mixtas de: linfocitos T y B, células dendríticas, neutrófilos, fibroblastos y componentes de la matriz extracelular que sellan el granuloma y que participan en su mantenimiento y en el aislamiento de la infección (figura 1) (Stewart y col., 2003).



**Figura 1. Estructura de un granuloma.** A) Corte histológico B) Esquema de la respuesta inmune en el granuloma. El granuloma es una estructura histológica resultado de un balance entre la micobacteria y la respuesta inmune en el sitio de primoinfección; aquí las células T activadas retornan a pulmón, para reclutar y activar macrófagos adicionales (M<sub>0</sub>), los cuales incrementan la respuesta antimicrobiana mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN). Además de liberar una gran variedad de citocinas y quimiocinas que a su vez reclutan a otras células de inmunidad innata de sangre periférica y en conjunto establecen una dinámica para el mantenimiento del granuloma y el aislamiento de la infección (Linfocitos CD4+ y M<sub>0</sub> producen TNF- $\alpha$  y linfotina  $\alpha$ -3 mientras que linfocitos CD8+ producen granulinas y perforinas); (Tomado de Ulrichs y Kaufmann, 2006).

La arquitectura típica del tejido granulomatoso está acompañada por tejido altamente vascularizado. Sin embargo se ha demostrado que en el interior del granuloma *M. tuberculosis* sufre de microaerofilia y falta de nutrientes (Ulrichs y Kaufmann, 2006); ya que Nyka en 1974 observó, en cortes de lesiones tuberculosas, la presencia de micobacterias con morfología y características tioriales alteradas, semejantes a las observadas cuando *M. tuberculosis* es cultivado en agua destilada (Nyka, 1974).

El 95% de los individuos con Tb controlan al microorganismo mediante la formación de granulomas; sin embargo, las micobacterias no son eliminadas de su interior y pueden persistir por periodos largos conservando el potencial de reiniciar el crecimiento y causar una Tb activa. Se estima que del 5 al 10% de las Tb primarias pueden reactivarse causando progresión de las lesiones primarias a una enfermedad diseminada e incluso la muerte. Se sabe también que individuos con Tb pueden sufrir una reinfección por una cepa diferente (figura 2) (Cotran y col., 2004). Como lo muestra la figura 2, existe un amplio espectro de la tuberculosis, el cual es determinado por el estado inmunológico del paciente, la virulencia de la cepa responsable de la infección y por la respuesta de ésta frente a los tratamientos médicos. El espectro de la Tb inicia con una infección pulmonar primaria autolimitada, pasa por fases intermedias de la enfermedad hasta producir Tb diseminada y muerte. Cada una de las fases presenta características diferenciales de la enfermedad, algunas de las cuales se citan en la tabla 1.



**Figura 2. Patogénesis de la tuberculosis.** Las micobacterias llegan por inhalación a los espacios alveolares, establecen una infección pulmonar primaria que se autolimitada mediante la formación de granulomas, donde las micobacterias permanecen en latencia, conservando el potencial de causar Tb activa que puede progresar a una enfermedad diseminada (Tomado de Cotran y col., 2004).

**Tabla 1. Patogénesis de la tuberculosis y características de cada fase de la infección**

Fase	Características
<b>Tb primaria</b>	Establecimiento de la infección pulmonar, control de la infección mediante la formación de granulomas. Reactividad a la tuberculina y baciloscopía negativa.
<b>Latencia</b>	Infección pulmonar autolimitada, las micobacterias persisten viables en los granulomas conservando la capacidad de reactivar la Tb. Inefectividad de las drogas para matar al bacilo. Ausencia de signos clínicos y radiológicos. Reactividad positiva a la tuberculina.
<b>Tb secundaria y Tb diseminada</b>	Se presenta por reactivación de la infección o por reinfección con una cepa diferente. Característicamente se presenta necrosis caseosa y de cavidades. Cuando los granulomas se rompen cerca de los vasos sanguíneos se presenta diseminación sistémica y cuando se abren a las vías respiratorias superiores hay liberación de micobacterias en aerosoles. Reactividad positiva a la tuberculina.
<b>Fibrosis fibrocavitaria</b>	Se presenta cuando un granuloma provoca la erosión de un bronquiolo y vacía en su interior su contenido, el granuloma se transforma en una cavidad. En la evolución de la Tb fibrocavitaria extensa, es muy probable que los bacilos se implanten en el revestimiento mucoso de las vías respiratorias, produciendo Tb endobronquial acompañada de Tb laríngea e intestinal. Baciloscopía y reactividad a la tuberculina positivas.
<b>Bronconeumonía tuberculosa</b>	Se presenta cuando un ganglio linfático bronquial infectado vierte su contenido en los lóbulos pulmonares inferiores, se desarrollan lesiones granulomatosas confluentes conocidas como "tisis galopante", suele ser fatal. Baciloscopía y reactividad a la tuberculina positivas.
<b>Tb miliar</b>	Consiste en la diseminación hematológica de lesiones tuberculosas por todo el organismo. El término miliar se refiere a lesiones pequeñas de color blanquecino amarillento que están presentes en pulmones y otros órganos. Baciloscopía positiva.

Información tomada de Cotran y col., 2004.

En 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la Tb emergencia de salud mundial. Actualmente la Tb es la cuarta causa de muerte por agentes infecciosos, sólo después de otras infecciones respiratorias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA) y de infecciones gastrointestinales. Basados en los resultados de la prueba de la tuberculina, se estima que aproximadamente la tercera parte de la población mundial (2 mil millones de individuos) se encuentran infectados con alguna cepa de MTC en estado latente. En 2008, la OMS reportó una incidencia de 8.8-9.9 millones de Tb en todo el mundo, mientras que la prevalencia durante el mismo periodo fue de 11.1-17 millones de casos (URL1).

Pese a los esfuerzos realizados a nivel mundial y a los programas TAES y TAES-Plus (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) implementados por la OMS, aún no se ha tenido éxito en el control de esta enfermedad. Entre los obstáculos que se han presentado para el control de la Tb se pueden mencionar:

- El binomio Tb/VIH. Se estima que a nivel mundial 3 de cada 100 casos de Tb están relacionados a VIH/SIDA, cifra que en África llega a ser hasta del 38% (URL1).
- La baja efectividad de la vacuna BCG. Si bien se ha comprobado que la vacuna BCG ha reducido la incidencia de Tb meníngea y miliar en niños, este biológico ha mostrado baja o nula eficiencia de protección contra la Tb pulmonar (Stewart y Young, 2002).
- El hombre es el principal reservorio de *M. tuberculosis* en la naturaleza (URL1).
- La ineffectividad de la isoniacida, la estreptomycin y la rifampicina para matar al bacilo durante los periodos de latencia (Wayne y Hayes, 1996; Betts y col., 2002).
- El aumento de la selección de cepas de *M. tuberculosis* multifármacorresistentes ([Zhang y Yew, 2009](#)); y la evolución de Tb en estado latente a Tb activa cuando un individuo entra en un estado inmunocomprometido (desnutrición ó inmunodeficiencias ó transplantes ó *diabetes mellitus*; esta última es otro problema serio de salud pública en nuestro país) (URL1).

## 1.2 La latencia de *Mycobacterium tuberculosis* y su expresión genética

La capacidad de *M. tuberculosis* para entrar en latencia representa uno de los principales obstáculos para el control de la enfermedad. Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos que capacitan a *M. tuberculosis* para llevar a cabo la transición de un crecimiento activo a un estado latente, así como los involucrados en la persistencia y en la reactivación, son fundamentales para plantear una nueva estrategia para controlar dicha enfermedad.

En fisiología bacteriana, el término "latencia" se emplea para definir un "estado reversible de baja actividad metabólica, en el cual las células pueden persistir por periodos largos sin dividirse" (Kell y col., 1985). Algunos de los factores que han sido considerados para el inicio de la latencia incluyen la falta de nutrientes, los valores extremos de pH y la falta de oxígeno (Wayne y Sohaskey, 2001).

Hasta ahora se han desarrollado diversos modelos experimentales para estudiar elementos genéticos que guían la adaptación de la bacteria al estado de persistencia dentro del huésped. Algunos se han realizado *in vitro* basados en hipoxia o en la falta de nutrientes (Loebel y col., 1933; Wayne, 1976; Wayne y Hayes, 1996; Betts y col., 2002; Voskuil y col., 2004), otros se han desarrollado *in vivo*, mediante la administración de micobacterias por vía aérea ó intravenosa a ratones ó a cerdos, que desarrollan una infección autolimitada que se reactiva cuando hay disminución de la respuesta inmune del hospedero (Smith y col., 1991; Rhoades y col., 1997). En algunos otros, la latencia y la reactivación son establecidas por la administración de antibióticos e inmunosupresores (McCune y Tompsett, 1956; Cooper y col., 1995); finalmente, los desarrollados *ex vivo*, que consisten en cultivos celulares de macrófagos infectados con micobacterias (Meylan y col., 1992).

Dentro de los modelos de latencia "*in vitro*", uno de los más utilizados es el de Wayne y Hayes (1996), también conocido como suavemente agitado o modelo de persistencia no replicativa; en principio se diseñó para investigar la respuesta fisiológica de un cultivo sincrónico de *M. tuberculosis* a condiciones de baja disponibilidad de oxígeno. El modelo involucra una disminución lenta del oxígeno

dentro de un cultivo agitado y sellado herméticamente. Wayne y Hayes demostraron que bajo estas condiciones, el bacilo era capaz de adaptarse eficientemente a la baja tensión de oxígeno que había autogenerado. Así mismo, ellos observaron que dicha adaptación se podía dividir claramente en dos fases, delimitadas por cambios en la tendencia a la incorporación de biomasa. Estas dos fases se denominaron Persistencia No Replicativa 1 y 2 (NRP1 y NRP2).

Fase NRP1. Esta fase comienza cuando la concentración de oxígeno en el medio y en el aire es de 1% y 72%, respectivamente; se caracteriza por la detención súbita de la síntesis de DNA, pero no de RNA; en esta fase se detecta un aumento del volumen celular de aproximadamente 32%, así como de la síntesis de proteínas y de ATP. Los bacilos en la fase NRP1 se vuelven resistentes a la isoniacida, la ciprofloxacina y la rifampicina (Tabla 2).

NRP2. Esta fase comienza cuando la absorbencia a 580 nm está entre 0.18 y 0.20, la concentración de oxígeno en el medio y el aire es de 0.06% y 15%, respectivamente; se caracteriza por una disminución inicial en la concentración global de ATP la cual posteriormente se mantiene constante; se detiene el aumento de volumen celular y se observa sensibilización a metronidazol (Tabla 2).

**Tabla 2. Características diferenciales de las fases del modelo de Wayne**

	Logarítmica	NRP1	NRP2
Oxígeno disuelto en el medio (%)	5	1	0.06
Oxígeno en aire (%)	100	72	15
Estado redox del azul de metileno	Oxidado	Reducción parcial	Reducción completa
Síntesis de DNA	Continua	Detenida	Detenida
Síntesis de RNA	Continua	Disminuida	Disminuida
Síntesis de proteínas	Continua	Disminuida	Disminuida
Tamaño celular ( $\mu\text{m}$ )	2.23 $\mu\text{m}$	2.94 $\mu\text{m}$	2.94 $\mu\text{m}$
Sensibilidad a antibióticos			
Isoniacida 0.4 $\mu\text{g/mL}$ ,	+	+↓	-
Rifampicina 0.1 $\mu\text{g/mL}$	+	+↓	-
Ciprofloxacina 1.0 $\mu\text{g/mL}$	+	-	-
Metronidazol 12 $\mu\text{g/mL}$	-	+↑	+

+, sensible; - resistente; ↑ ó ↓, incremento o disminución de la sensibilidad mientras transcurre el tiempo (Información tomada de Wayne y Hayes, 1996).



Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la expresión genética de *M. tuberculosis* H37Rv usando la hipoxia como inductor de la latencia *in vitro*; los descubrimientos más importantes son los siguientes:

El sistema de transcripción de dos componentes *dosR/S*, es el principal mediador de la respuesta a la hipoxia en *M. tuberculosis* y controla la sobreexpresión de 52 genes y la represión de 19 (Kendall y col., 2004). Este locus (*dosR/S*) refleja el sistema clásico de dos componentes formado de una proteína sensora, histidín fosfoquinasa, y una reguladora de la respuesta. Es importante mencionar que *dosR* regula la expresión genética mediante su dominio de unión a la secuencia consenso 5'TTSGGGACTW WAGTCCCSAA3' (S=C/G; W=A/T) presente en una ó varias copias en la región promotora de los genes que componen dicho regulón (Park y col., 2003). Este sistema se expresa principalmente bajo hipoxia pero también en presencia de etanol, peróxido de hidrógeno y S-nitrosoglutatión (Kendall y col., 2004).

Adicionalmente a los 52 genes incluidos en la regulón *dosR/S*, otros 62 genes se sobreexpresan en el modelo de Wayne, entre ellos 6 posibles reguladores transcripcionales, 7 genes PE, PPE y PE-PGRS y 5 genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos (Voskuil y col., 2004).

### **1.3 El papel de los lípidos durante la latencia**

Pese a que continuamente se reportan nuevos hallazgos acerca de la expresión genética de *M. tuberculosis* durante la fase de latencia empleando diferentes modelos *in vitro* aún se está lejos de elucidar los eventos metabólicos que guían la sobrevivencia de este patógeno durante dicha fase. Algunos estudios previos sugieren que los ácidos grasos podrían jugar un papel fundamental durante la fase de latencia; ya que la capacidad de *M. tuberculosis* de persistir por largos periodos en el hospedero depende en gran parte de su capacidad para adquirir y utilizar nutrientes del granuloma. Sin embargo, la fuente y el tipo de ácidos grasos que pueden ser utilizados por *M. tuberculosis* durante esta fase son desconocidos (Muñoz-Elias y McKinney, 2006). Otros autores proponen que antes de entrar en el estado de latencia

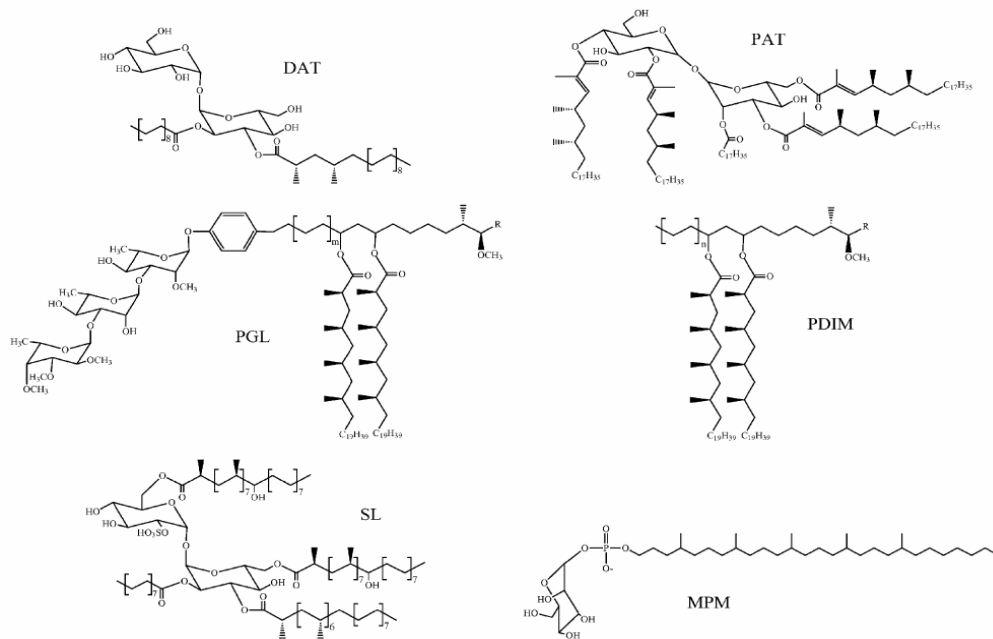
la micobacteria acumula lípidos derivados de la degradación la membrana celular de la célula hospedera ó sintetizados de novo (Álvarez y Steinbüchel, 2002; Raynaud y col., 2002; Daniel y col., 2004; Côtes y col., 2007). Con respecto a lo anterior, Gräbner y Meerbach encontraron que el surfactante pulmonar, característicamente rico en una compleja mezcla de ácidos grasos de cadena larga como el dipalmitoil fosfatidilcolina, era internalizado por macrófagos pulmonares y metabolizado a través del ciclo del glioxilato por las micobacterias (Gräbner y Meerbach, 1991).

Por otra parte, el grupo de trabajo de Daniel en el 2004, planteó como hipótesis, que los triglicéridos podrían ser una reserva energética eficiente para *M. tuberculosis* durante la fase de latencia tal y como ocurre en otros estados fisiológicos con baja actividad metabólica como la hibernación en animales superiores o el periodo de latencia en semillas secas o periodos de estrés metabólico en hongos y levaduras. De esta forma el tejido necrosado del huésped localizado alrededor del granuloma, podría proveer a la micobacteria de ácidos grasos que serían convertidos a triacilglicerol (Álvarez y Steinbüchel, 2002). Esta hipótesis además se apoya en la observación de inclusiones intracelulares lipofílicas en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 cuando esta bacteria se cultiva en concentraciones bajas de nitrógeno o en presencia de ácido palmítico o de ácido oleico. El análisis químico del material de las inclusiones intracelulares lipídicas, realizado mediante cromatografía en capa fina, cromatografía de masas y espectrometría de masas, detectó principalmente trioleína y ácidos grasos libres. Estas inclusiones intracelulares lipofílicas también se han demostrado en el esputo de un paciente con Tb activa (Garton y col., 2002).

En las micobacterias aún no se encuentra completamente definida la vía de biosíntesis de los triglicéridos; hasta hace pocos años, no se habían identificado triacilglicerol sintasas (*tgs*) en el genoma de *M. tuberculosis*; sin embargo, en 2003 un nuevo análisis del genoma reveló la presencia de 15 genes hipotéticos cuyos productos presentaban homología a la triacilglicerol sintasa de *Acinetobacter calcoaceticus*, 11 presentaron el motivo HHXXDG responsable de la actividad catalítica de la reacción de acil-CoA aciltransferasa involucrada en la biosíntesis de triacilglicerol a partir de dioleína y oleoil-CoA. Los 15 genes mostraron actividad de triacilglicerol sintasa cuando se probaron frente a sus sustratos (Daniel y col., 2004).

Además, estos investigadores demostraron que cuando *M. tuberculosis* H37Rv se encontraba en el estado de latencia caracterizado por Wayne, ocurría la inducción de dichos genes en forma inversa al consumo de oxígeno. Algunos de estos, se encontraron significativamente sobreexpresados, como el gen Rv3130, cuyo producto mostró la mayor actividad de triacilglicerol sintasa. Así mismo, estos investigadores demostraron que mientras el bacilo adquirió resistencia a isoniazida y sensibilidad a metronidazol, también ocurría incorporación de ácido oleico exógeno [ $1^{14}\text{C}$ ] en triacilglicéridos, con lo que se sugirió que la inducción de los genes *tgs* conduce a la síntesis de triacilglicéridos durante el estado de latencia (Daniel y col., 2004).

No es extraño que *M. tuberculosis* presente actividad de biosíntesis de triglicéridos, ya que es de los pocos microorganismos capaces de producir una amplia variedad de moléculas lipídicas lipofílicas (palmitato, isoprenoides de cadena larga, fitiocerol, ácidos micólicos, etc.; figura 3). Al mismo tiempo, *M. tuberculosis* cuenta con una gran diversidad de sistemas de oxidación de ácidos grasos. Se considera que en total, esta bacteria cuenta con aproximadamente 250 enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, comparado con las 50 que se han reportado para *E. coli* (Cole y col., 1998).



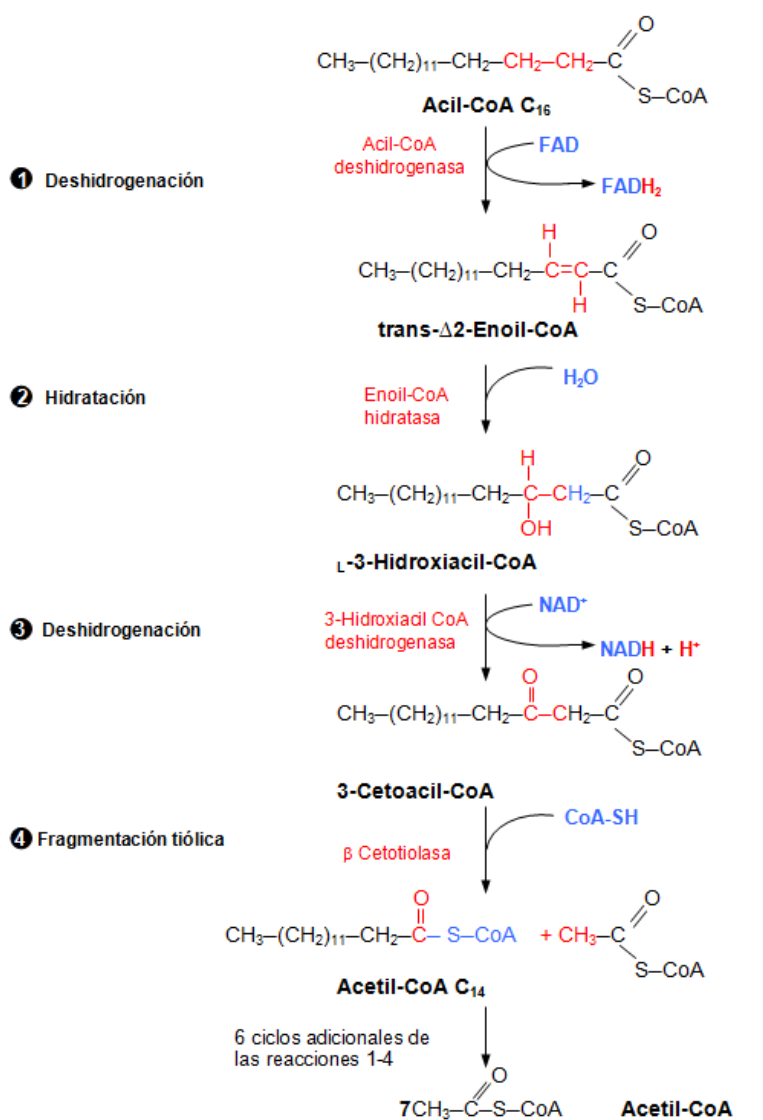
**Figura 3. Algunas moléculas lipofílicas complejas de la envoltura celular de *M. tuberculosis*.** DAT, diaciltrealosa; PAT, poliaciltrealosa; PGL, glicolípido fenólico; PDIM, fitiocerol dimicocerosato; SL, sulfolípido; MPM, manosil-β-1-fosfomicocétidos (Tomado de [Jackson y col., 2007](#)).

Algunas evidencias adicionales acerca de la utilización de lípidos como fuente de carbono por las micobacterias son las siguientes: Deb y colaboradores (2006), encontraron que al transferir el paquete celular de un cultivo de *M. tuberculosis* en fase de latencia inducida por hipoxia (fase caracterizada por la síntesis de triacilglicéridos) a PBS, ocurría la degradación de estos triglicéridos con la consecuente sobreexpresión de genes cuyos productos presentan actividad de lipasa-esterasa, entre los que destaca *lipY*, que presentó la mayor actividad de triacilglicerol lipasa y la liberación de productos de la  $\beta$  oxidación.

En otros estudios se ha comprobado que el gen *ic1*, que codifica para la isocitrato liasa se sobreexpresa tanto por *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* CSU93 y por *M. avium* cuando la fuente de carbono limitante es palmitato 10 mM ó acetato 3 mM (Höner y col., 1999). Además del gen *ic1*, *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. tuberculosis* Erdman y *M. tuberculosis* CDC1551 tienen un segundo gen que codifica para la isocitrato liasa denominado *aceA* (Cole y col., 1998; Höner y col., 1999). La importancia del gen *ic1* en la latencia fue demostrado por McKinney y col., (2000) en forma contundente con la cepa Erdman  $\Delta ic1$ , quienes observaron que la cepa era capaz de establecer una infección pulmonar aguda en ratón al igual que la cepa silvestre; sin embargo, después de la segunda semana de infección ocurrió una disminución acelerada en las UFC en pulmón; es decir, era incapaz de establecer una infección latente (McKinney y col., 2000). En 2005 se reportó que la eliminación del gen *ic1* ó *aceA* de *M. tuberculosis* Erdman genera una alteración del crecimiento de la bacteria dentro de macrófagos de ratón; mientras que con la eliminación de ambos genes, la bacteria pierde la capacidad de replicarse intracelularmente, favoreciendo la eliminación de ésta de los pulmones (Muñoz-Elias y McKinney, 2005).

El análisis del genoma de *M. tuberculosis* ha revelado que existe un gran número de genes que codifican para los componentes de la oxidación de los lípidos. Existen 36 genes homólogos a *fadD*, que codifican para las acil-CoA sintetasa. Una situación similar se presenta en el caso de los genes *fadE*, que codifican para la acil-CoA deshidrogenasa, que cataliza la deshidrogenación entre el carbono  $\alpha$  y  $\beta$  de una acil-CoA, primera reacción de la  $\beta$  oxidación (Figura 4). Existen 21 genes homólogos que

codifican para la enoil-CoA hidratasa (*echA*), la cual participa en la hidratación del acil-CoA. Posteriormente ocurre una deshidrogenación realizada por la enzima 3-hidroxi acil-CoA deshidrogenasa codificada por el gen *fadB*. La cuarta y última reacción de la  $\beta$ -oxidación consiste en un ataque del azufre nucleofílico del enlace fosfodiéster de la Coenzima A sobre el carbono ceto, de la 3-cetoacil-CoA, con la fragmentación del enlace  $\alpha$ - $\beta$  y con la consecuente liberación de acetil CoA (Cole y col., 1998).

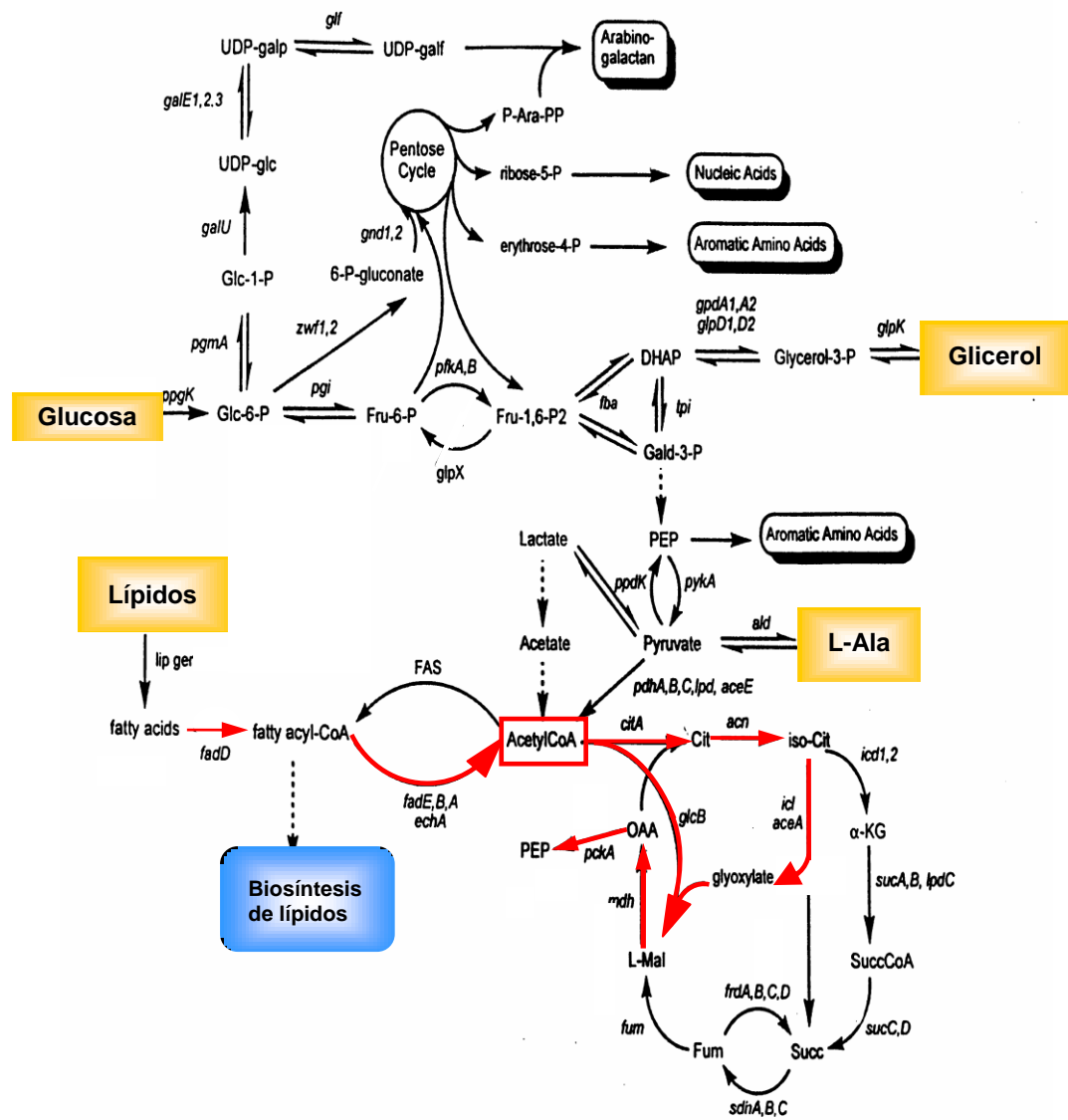


**Figura 4. Esquema de la  $\beta$  oxidación de un palmitoil-CoA.** El palmitoil-CoA, un acil-CoA saturado de 16 carbonos, sufre 7 ciclos de oxidación para dar ocho moléculas de acetil-CoA (Tomado de Mathews y van Holde, 1998).

La mayor parte de la degradación de los lípidos se realiza mediante la  $\beta$ -oxidación; sin embargo, muchos de los ácidos grasos de los lípidos naturales son insaturados; es decir, contienen uno ó más dobles enlaces y dado que estos enlaces se encuentran en configuración *cis*, deben intervenir la enoil-CoA isomerasa y la 2.4-dienoil-CoA reductasa. Además, una pequeña proporción de los lípidos naturales tienen cadenas de número impar, en este caso la fragmentación tiólica produce acetil-CoA y propionil-CoA (Cole y col., 1998).

¿Por qué es tan importante el gen *icl* para la micobacteria? Probablemente porque la acetil-CoA generada durante la  $\beta$ -oxidación tendría sólo dos destinos principales en el metabolismo de *M. tuberculosis*. El primero, la oxidación a través del ciclo de Krebs, y el segundo, la biosíntesis de ácidos grasos, ya que la acetil-CoA no puede experimentar una conversión a piruvato debido a la irreversibilidad de la reacción de la piruvato deshidrogenasa, y por lo tanto, no puede participar en la síntesis de carbohidratos; en contraste, el ciclo del glioxilato (donde participa *icl*), sí permite la síntesis neta de oxalacetato a partir de acetil-CoA, un precursor gluconeogénico eficiente (Figura 5; Muñoz-Elías y McKinney, 2006).

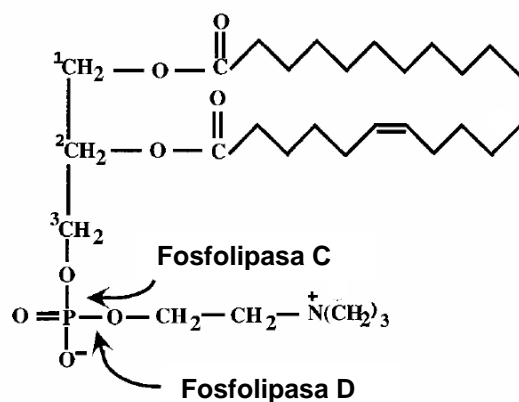
En el ciclo del glioxilato, la acetil-CoA se condensa con el oxalacetato para producir citrato, el cual reacciona con la aconitasa para dar isocitrato. La siguiente reacción es el punto en el que divergen el ciclo de Krebs y el del glioxilato, la reacción es catalizada por la isocitrato liasa (*icl*), que fragmenta el isocitrato en glioxilato y succinato (Figura 5). Posteriormente, el glioxilato acepta un acetato de otra acetil-CoA, en una reacción catalizada por la malato sintasa (*glcB*). El malato se deshidrogena para regenerar al oxalacetato, que es convertido a fosfoenolpiruvato en una reacción catalizada por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (*pckA*), iniciando así la gluconeogénesis. En las etapas posteriores, el fosfoenolpiruvato es transformado a glucosa por las enzimas que intervienen en la glicólisis. A partir de aquí y mediante el ciclo de las pentosas se sintetizan arabinogalactanas, arabinomananas, trealosa, glicolípidos, etc. Por otra parte la acetil-CoA también participaría en la biosíntesis de ácidos micólicos (Muñoz-Elías y McKinney, 2006).



**Figura 5. Metabolismo del carbono en las micobacterias.** En el esquema se muestran las diferentes fuentes de carbono que pueden utilizar las micobacterias y las diferentes vías metabólicas que siguen, con sus respectivas enzimas. OAA- oxalacetato; PEP- fosfoenolpiruvato (Tomado de Cole y col., 2005).

Finalmente, el hecho de que se proponga a los ácidos grasos como elemento clave durante la fase de persistencia no replicativa implica que la degradación de lípidos a partir de la célula hospedera sería vital durante esta fase; además de que la micobacteria tuviera mecanismos de transporte de lípidos exógenos a través de la envoltura celular micobacteriana.

Respecto a la degradación de lípidos se sabe que *M. tuberculosis* H37Rv posee 20 genes que codifican para lipasas hipotéticas y 4 para fosfolipasas. El análisis del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y de *M. tuberculosis* CDC1551 han mostrado la presencia de los 4 genes que codifican para fosfolipasas de tipo C, *plcA*, *plcB*, *plcC* y *plcD* (Cole y col, 1998); la actividad de fosfolipasa C se ha encontrado restringida a micobacterias patógenas. En cambio, la actividad de fosfolipasa tipo D (Figura 6) ha sido reportada tanto en micobacterias saprofiticas como en virulentas (Johansen y col., 1996).

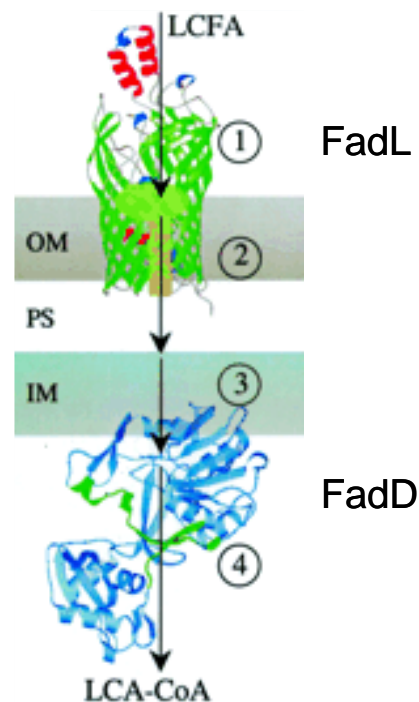


**Figura 6. Sitios de hidrólisis de las fosfolipasas C y D.** Se muestra la estructura de la fosfatidilcolina y se señala mediante flechas las posiciones de corte de las fosfolipasa C y D. (Johansen y col., 1996).

Adicionalmente, Raynaud y col. (2002), comprobaron la importancia de la fosfolipasa C en la virulencia de *M. tuberculosis* H37Rv en macrófagos y en un modelo murino. Estos investigadores encontraron una sobreexpresión de los genes *plcABC* de manera inmediata tras la infección de macrófagos derivados la línea promonocítica THP1. Además, comprobaron que estos genes son esenciales en el establecimiento de la infección latente en el modelo de ratón. Este grupo atribuye a la fosfolipasa C posibles funciones relacionadas a la virulencia. Por una parte, esta enzima podría proveer de nutrientes a la bacteria ó podría participar en la degradación de la membrana fagosomal ó podría interferir en los mecanismos de modulación de la respuesta inmune activando la cascada del ácido araquidónico.



Los mecanismos de transporte de ácidos grasos de cadena larga exógenos a través de la envoltura celular micobacteriana aún no han sido elucidados; en cambio en *E. coli* este mecanismo se encuentra bien establecido (Figura 7; DiRusso y Black., 2004). En este caso, se conoce que cuando la bacteria sensa la presencia de ácidos grasos de cadena larga en el ambiente, los capta a través de una proteína de membrana externa conocida como FadL que vía ligando induce un cambio conformacional dentro de la proteína que conlleva a la apertura de un canal de difusión y al paso de los ácidos grasos al espacio periplásmico. A su vez, el ambiente ácido que prevalece en el espacio periplásmico promueve la formación de ácido graso no cargado que puede pasar a través de membrana interna; y una vez en el citosol la acil CoA-ligasa lo esterifica a un Acil-CoA; *M. tuberculosis* posee 36 genes homólogos a fadD (Trivedi y col., 2004).



**Figura 7. Transporte de ácidos grasos de cadena larga en *E. coli*.** Los ácidos grasos de cadena larga exógenos (LCFA) se unen a la proteína de membrana externa FadL (1) y vía ligando induce un cambio conformacional dentro de la proteína que conlleva a la apertura de un canal de difusión y el paso de los ácidos grasos al espacio periplásmico (2). El ambiente ácido que prevalece en el espacio periplásmico promueve la formación de ácido graso no cargado que puede pasar a través de membrana interna (3). Una vez en el citosol la acil CoA-ligasa lo esterifica a un Acil-CoA (4); (Tomado de DiRusso y Black, 2004).

## 2. JUSTIFICACIÓN

En 1993 la Organización Mundial de la Salud declaró a la tuberculosis emergencia de salud pública. Actualmente, se estima que aproximadamente la tercera parte de la población mundial se encuentra infectada en forma latente con alguna cepa del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Hace algunas décadas se pensaba que la latencia era un estado de una actividad metabólica mínima; sin embargo, algunos resultados obtenidos de patrones de expresión genética durante la latencia de *M. tuberculosis*, muestran que, contrario a lo que se pensaba, la latencia es un estado de una actividad metabólica que le permite a la micobacteria persistir viable por largos periodos conservando la capacidad de reactivar la infección.

Algunos estudios previos sugieren que los lípidos podrían jugar un papel fundamental durante la latencia de *M. tuberculosis*. Esto se ve apoyado por la abundancia y complejidad de estas moléculas en la pared micobacteriana y en que el 8% del genoma de *M. tuberculosis* codifica para enzimas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos. Por lo tanto, la información que se obtenga del papel de los lípidos y los ácidos grasos durante la latencia de *M. tuberculosis* podría contribuir a entender la relación huésped-patógeno de este padecimiento y a proponer nuevas alternativas para ayudar al tratamiento y control de esta enfermedad.

### **3. HIPÓTESIS**

La sobreexpresión de algunos genes de *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en el metabolismo de lípidos durante la latencia inducida por hipoxia en presencia de ácidos grasos de cadena corta, será indicativo del papel que juegan dichos lípidos en la sobrevivencia de la micobacteria bajo las condiciones ambientales mencionadas.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de la latencia inducida por hipoxia en presencia de ácidos grasos, sobre la expresión de algunos genes involucrados en el metabolismo de lípidos de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

#### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la fase logarítmica y estacionaria de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta (propionato de sodio o valerato de sodio).
- Aislar el RNA total de *M. tuberculosis* H37Rv durante su crecimiento en fase logarítmica y en la fase estacionaria, así como durante la latencia *in vitro* inducida por hipoxia en presencia de ácidos grasos de cadena corta.
- Elaborar las curvas tipo de cuantificación absoluta por PCR-cuantitativa para cada uno de 15 genes a estudiar, involucrados en el ciclo celular (*dnaA* y *ftsZ*), en la producción de antígenos inmunodominantes (*esxA* y *fbpB*), en el metabolismo de lípidos (*fadD21*, *mmpL7*, *icl1*, Rv3130c, *lipY* y *groEL1*), en la hipoxia y la respuesta oxidativa (Rv2626c, Rv2660c, Rv3134c y *hmp*) y en la reactivación (*rpfB*); 2 genes control de latencia (*hspX* y *dosR*) y 2 normalizadores (P1 del *rrn* y el gen del rRNA 16S).
- Determinar el número de transcritos, mediante RT-PCR cuantitativa, de los 19 genes de *M. tuberculosis* H37Rv durante la latencia *in vitro* inducida por hipoxia en presencia de ácidos grasos de cadena corta.
- Analizar la expresión genética obtenida en medio Dubos y en medio Dubos adicionado de ácidos grasos de cadena corta.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Diseño experimental

Para determinar los cambios en la expresión genética de *M. tuberculosis* H37Rv durante su adaptación a la latencia inducida por hipoxia en presencia de ácidos grasos de cadena corta (propionato de sodio 0.1% o valerato de sodio 0.1%), se realizó una curva de crecimiento de *M. tuberculosis* en presencia de cada ácido graso; el comportamiento del cultivo se siguió mediante la medición de la absorbencia a 600 nm y mediante cuenta viable.

Posteriormente, se desarrolló el modelo de latencia *in vitro* de Wayne, en el cual la latencia es inducida mediante una disminución en la concentración de oxígeno. En este modelo se partió de un pre-inóculo obtenido de un cultivo de *M. tuberculosis* en fase logarítmica crecido en medio Dubos adicionado de albúmina-catalasa (AC) más ácidos grasos.

Una vez cumplidos los tiempos de incubación para alcanzar la fase logarítmica, la fase estacionaria y para inducir la latencia *in vitro* mediante hipoxia se procedió a extraer y purificar el RNA total; posteriormente se realizó la síntesis del cDNA y la cuantificación (mediante RT-PCR en tiempo real) de la expresión de los 15 genes a estudiar: *dnaA*, *ftsZ*, *fadD21*, *mmpL7*, *icl1*, Rv3130, *lipY*, *hmp*, Rrv3134c, Rv2660c, Rv2626c, *esxA*, *groEL1*, *rpfB* y *fbpB* (los cuales están involucrados en el ciclo celular, en el metabolismo de lípidos, en la latencia, en la repuesta oxidativa y en la reactivación del crecimiento), los 2 genes control de latencia (*hspX* y *dosR*) y los 2 normalizadores (P1 del *rrn* y el gen del rRNA 16S).

## 5.2 Material biológico

En todos los experimentos se empleó la cepa tipo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, donada por el Instituto Pasteur de Paris, Francia. Para el mantenimiento y los subcultivos de la cepa se empleó caldo Dubos [(Difco): 0.5 g/L de digerido pancreático de caseína, 2 g/L de asparagina, 0.2 g/L de polisorbato 80, 1 g/L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mg/L de citrato amónico de fierro, 10 mg/L de MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mg/L de CaCl<sub>2</sub> y 0.1 mg/L de ZnSO<sub>4</sub> pH 6.6] suplementado al 10% con albúmina-dextrosa-catalasa (ADC). El esquema general de trabajo se muestra en la figura 8.

## 5.3 Preparación de los cultivos experimentales

Todos los cultivos se inocularon con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv en fase logarítmica de crecimiento al 1% de concentración final; así, 1 mL de la cepa mantenida a -70°C se colocó en 100 mL de caldo Dubos adicionado de ADC, incubando a 37°C con agitación constante, hasta obtener una absorbencia a 600 nm de 0.4 (fase logarítmica). Al mismo tiempo se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen para comprobar la pureza del cultivo.

## 5.4 Curva de crecimiento

A fin de determinar el efecto de la presencia de dos ácidos grasos de cadena corta en el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv, se realizó una curva de crecimiento en medio Dubos, suplementado al 10% con albúmina-catalasa (AC) adicionado de propionato de sodio 0.1% o valerato de sodio 0.1%. Como control se realizó un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv en medio Dubos tradicional. El comportamiento de la población micobacteriana se siguió cada 24 horas, durante 30 días, mediante la medición de la absorbencia del cultivo a 600 nm y cuenta viable en agar Middlebrook 7H11 adicionado de ADC.

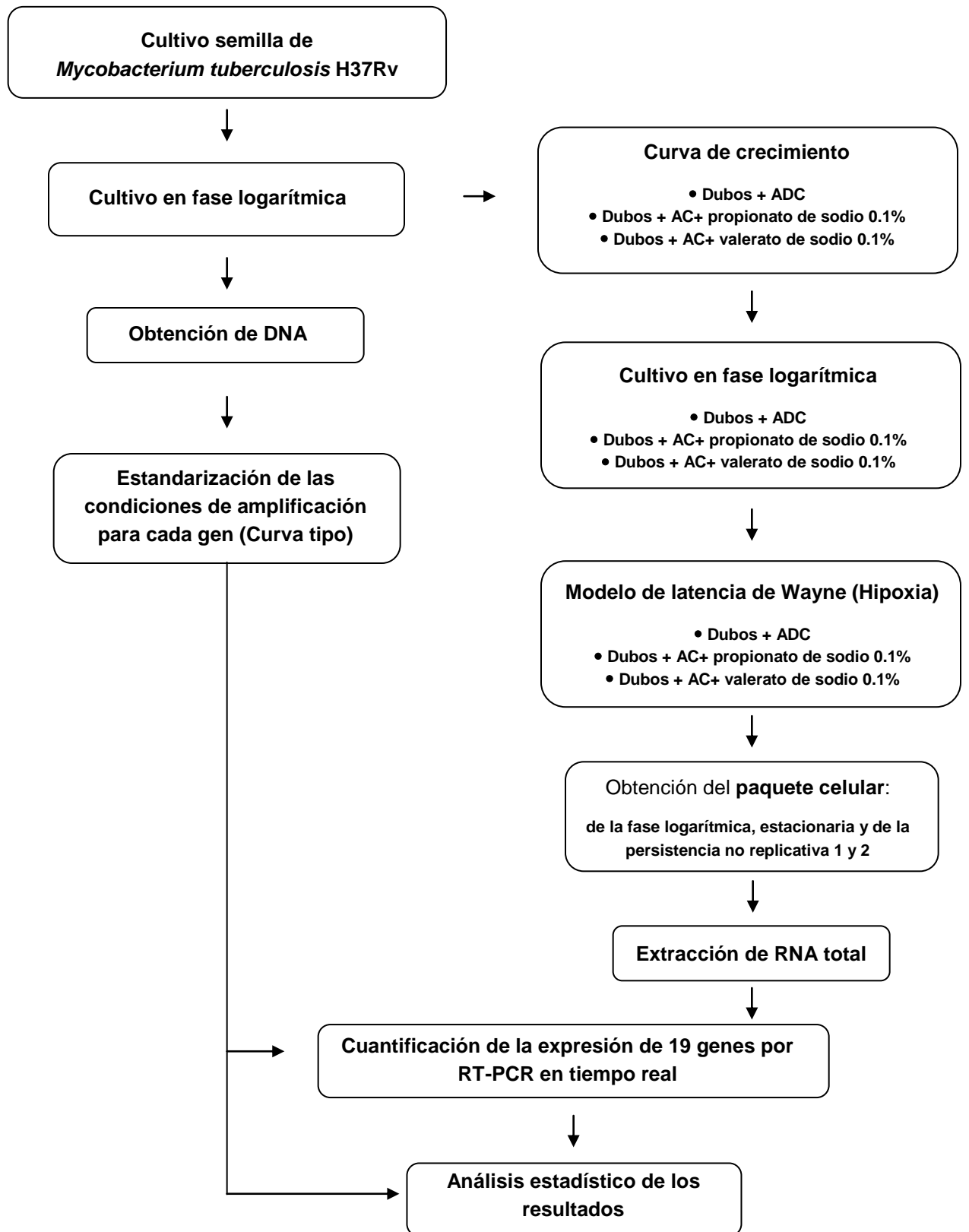


Figura 8. Esquema general de trabajo.

## 5.5 Obtención del DNA genómico

Se colocaron 200 mL de un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv en fase logarítmica de crecimiento en una botella para centrifuga (Beckman) y se centrifugaron durante 10 min a 8,670 x g a 4°C. El paquete celular se resuspendió en 1 mL de cloruro de guanidinio 6 M, posteriormente 500 µL de esta suspensión se colocaron en tubos de 2 mL con tapón de rosca y se incubaron a -70°C (ultracongelador) durante dos horas.

El rompimiento de la células se realizó mediante 3 ciclos de choques térmicos, cada uno compuesto por una incubación a -70°C (baño de hielo seco-etanol) durante 10 min y una incubación a 65°C (baño maría) durante 10 min. Posteriormente, a cada lisado se le adicionó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó suavemente y se centrifugó a temperatura ambiente a 16,000 x g durante 5 min.

Posteriormente, la fase acuosa se recuperó en un microtubo limpio, a éste se le adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1); se agitó suavemente y se centrifugó nuevamente a 16,000 x g durante 5 min a temperatura ambiente (éste paso se repitió dos veces). Nuevamente se recuperó la fase acuosa y se le adicionó en forma gradual dos volúmenes de etanol absoluto frío. Los tubos se colocaron a -70°C durante 24 h para favorecer la precipitación del DNA.

Transcurrido este tiempo los tubos se centrifugaron a 16,000 x g durante 15 min a temperatura ambiente; posteriormente se decantó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 500 µL de etanol al 70%, después se eliminó el exceso de etanol en el secador denominado "DNA110 Speed Vac". Finalmente, el DNA se resuspendió en regulador tris-EDTA 1X (TE) y se almacenó a -20°C hasta su uso (González-y-Merchand y col., 1996).

La calidad del DNA se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, el gel se visualizó con un transiluminador de luz UV. La concentración del DNA se determinó por espectrofotometría mediante el Nano Drop ND-1000.



## 5.6 Genes candidatos y diseño de sus iniciadores

Los nombres de los genes que se estudiaron en el presente trabajo se muestran en la tabla 3, en donde además se señala el producto del gen así como la función de cada uno de ellos. Para el diseño de los iniciadores se utilizó el programa “Primer Premier 4.0”; dichos iniciadores se seleccionaron en base a los siguientes requerimientos: su Tm debe estar entre 60 y 65°C, debe producir un amplificado de 70 a 150 pb y la Tm de dicho amplificado debe ser menor a 90°C.

**Tabla 3. Genes propuestos para este estudio**

Gen	Producto	Función en <i>M. tuberculosis</i>
<i>dnaA</i>	Proteína iniciadora de replicación	Replicación del DNA
<i>ftsZ</i>	Proteína formadora del septo	División celular
<i>fadD21</i>	Acil-CoA sintetasa	Degradación de lípidos
<i>mmpL7</i>	Proteína transmembranal de transporte conservada	Translocación de fitoceroildimicocerosato a nivel de membrana
<i>icl1</i>	Isocitrato liasa	Cataliza la fragmentación del isocitrato en glioxilato y succinato
Rv3130	Probable diacilglicerol-acil sintetasa	Biosíntesis de triacilglicéridos
<i>lipY</i>	Probable lipasa-esterasa	Triacilglicerol hidrolasa
<i>hmp</i>	Homóloga a la flavohemoglobina de <i>E. coli</i>	Involucrada en el metabolismo anaeróbico y en la protección contra estrés oxidativo
<i>esxA</i>	Proteína de 6 KDa, ESAT-6	Induce la producción de INF- $\gamma$ durante la primera fase de la respuesta inmune
<i>fbpB</i>	Antígeno 85 complejo B, micolil transferasa 85B,	Proteína B-unión a fibronectina, posee actividad de micoliltransferasa
<i>hspX</i>	$\alpha$ -cristalina	Proteína chaperona
<i>dosR</i>	Proteína reguladora del regulón de hipoxia <i>dosR/S</i>	Regulación de la transcripción durante la hipoxia
Rv3134c	Proteína hipotética conservada	Desconocida (relacionado con latencia)
Rv2660c	Proteína hipotética	Desconocida (relacionado con latencia)
Rv2626c	Probable Inosina 5' monofosfato deshidrogenasa	Desconocida (relacionado con latencia)
<i>groEL1</i>	Chaperonina GroEL	Regula la síntesis de ác. micólicos y la formación de biopelículas
<i>rpfB</i>	Factor promotor de la reactivación	Participa en la reactivación del crecimiento después del estado de latencia
P1 ( <i>rrs</i> )	<i>rrs</i> , zona de promotores	Promotor del rDNA
16S ( <i>rrs</i> )	Subunidad ribosomal del 16S	Subunidad ribosomal del 16S

## **5.7 Confirmación de la especificidad de los iniciadores mediante secuenciación**

Con el fin de confirmar la especificidad de los iniciadores diseñados en nuestro laboratorio, los productos de PCR obtenidos con cada par de iniciadores se purificaron, empleando el kit QIAquick Gel Extraction® (QIAGEN), clonaron (Sambrook y Rusell, 2001) y secuenciaron empleando el kit Big Dye Terminator Ready (Perkin-Elmer) en un secuenciador ABY PRISM 310 (Genetic Analyzer System, Perkin-Elmer) en el Instituto de Fisiología de la UNAM. Las secuencias obtenidas se compararon con las almacenadas en la base de datos del GenBank por medio de blast (URL3).

## **5.8 Elaboración de las curvas tipo para los 19 genes micobacterianos**

### **a) Amplificación del DNA**

Para llevar a cabo la amplificación, se empleó el kit para PCR LightCycler® FastStar DNA master SYBR Green I (Roche). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ L colocando: 6.3  $\mu$ L de agua desionizada estéril; 1.2  $\mu$ L  $MgCl_2$  (25 mM) ó la concentración correspondiente para cada par de iniciadores; 1  $\mu$ L de la mezcla de reacción SYBR Green, 0.5  $\mu$ L de la mezcla de los iniciadores correspondientes (20  $\mu$ M) y 1  $\mu$ L del DNA ó del cDNA.

Los capilares se colocaron en el termociclador LightCycler® 1.5 (Roche) y se aplicó el programa descrito a continuación: un ciclo a 95°C durante 5 min, 35 ciclos en las siguientes condiciones: 95°C durante 8s, temperatura de alineamiento correspondiente para cada par de iniciadores durante 8s y 72°C durante 8s (en este punto se hizo la medición de fluorescencia), posteriormente se incrementó la temperatura de 60°C a 95°C a una velocidad de 0.1°C por s, durante esta fase se midió la fluorescencia en forma continua para construir la curva de disociación, y un ciclo final de 37°C durante 20s.

## **b) Determinación de las curvas tipo de cada gen**

Para poder realizar la cuantificación de la expresión de cada gen en la fase logarítmica y estacionaria de crecimiento; y en los diferentes tiempos establecidos para los modelos de latencia de Wayne, se realizó una curva tipo de concentración de DNA para cada gen. Para este fin, se empleó el DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv obtenido y cuantificado como menciona en el punto 5.5.

A partir de un tubo con una concentración de  $10^8$  genomas/ $\mu\text{L}$  de DNA, se realizaron diluciones decimales hasta obtener  $10^3$  genomas/ $\mu\text{L}$ . Las concentraciones correspondientes a  $10^7$ - $10^3$  genomas ó copias de DNA/ $\mu\text{L}$ , se utilizaron para llevar a cabo la curva tipo de amplificación mediante la PCR cuantitativa (PCR en tiempo real), estandarizando las condiciones de reacción para cada gen; en todos los casos se empleó el kit para PCR LightCycler® FastStar DNA master SYBR Green I y el termociclador LightCycler® 1.5 (Roche). Posteriormente, se construyeron las curvas tipo graficando en el eje de las ordenadas intensidad de fluorescencia y en las abcisas el ciclo de PCR; se generaron las fórmulas linearizadas. A partir de estos gráficos se determinó la eficiencia de reacción así, como el coeficiente de correlación. Además, se construyeron las curvas de desnaturalización para los productos de amplificados de los 19 genes a estudiar. Para estas últimas curvas, se graficó en el eje de las ordenadas la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura.

## **5.9 Modelo de hipoxia de Wayne modificado**

Dado que el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de dos ácidos grasos de cadena corta sobre la expresión genética de *M. tuberculosis* H37Rv durante su adaptación a la latencia, se estandarizó el modelo de Wayne adicionado de cada uno de ellos (Wayne y Hayes, 1996).

Se partió de un pre-inóculo obtenido de la siguiente manera: dos mililitros de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv se inocularon en 200 mL de caldo Dubos suplementado con AC adicionado de propionato de sodio 0.1% o valerato de sodio 0.1%. El cultivo se incubó a 37°C en agitación a 200 rpm en frascos de 500 mL (Boeco), con la tapa floja, a fin de asegurar una buena oxigenación, hasta obtener una absorbencia de 0.4 a 600 nm (fase logarítmica). Se separaron 100 mL de dicho cultivo, los cuales se colocaron en una botella y se centrifugaron a 8,760 x g a 4°C durante 10 min.

La pastilla se resuspendió en 10 mL de medio y se transfirió a una botella de 300 mL con un agitador magnético de teflón que contenía 190 mL de caldo Dubos suplementado con AC adicionado de cada uno de los ácidos grasos. Al igual que en modelo de Wayne la relación aire/líquido fue de 0.5. Durante la fase de estandarización de los modelos de Wayne en presencia de ácidos grasos se adicionaron 600 µL de una solución de azul de metileno (500 µg/mL); finalmente, el frasco se cerró y selló con una cinta teflón (Dupont<sup>TM</sup>), a fin de asegurar que no existiera intercambio de oxígeno con el exterior.

Dichos cultivos se incubaron a 37°C sobre una parrilla con agitación magnética, de tal forma que la agitación no ocasionara disturbios en la superficie del cultivo, con la intención de permitir una difusión homogénea del poco oxígeno presente. El cultivo se observó diariamente hasta determinar el momento de la reducción total del azul de metileno (desaparición de la tonalidad azul en el cultivo que corresponde a una concentración de oxígeno menor al 0.02%).

Una vez determinado el tiempo de cultivo ideal para la inducción de la latencia *in vitro*, se repitió la metodología antes mencionada, omitiendo la adición del azul de metileno. De acuerdo a Wayne, la muestra se tomó 24 h antes de la reducción completa del azul de metileno, momento en el que se alcanza la condición de hipoxia.

## **5.10 Obtención de las micobacterias en fase logarítmica, fase estacionaria y en la fase de Persistencia No Replicativa 1 y 2**

Una vez cumplidos los tiempos de incubación para alcanzar la fase logarítmica, la fase estacionaria y para inducir la latencia *in vitro* mediante hipoxia (fase de persistencia no replicativa 1 y 2) se procedió a la obtención de las micobacterias. Para lo cual, 100 mL de cultivo se mezclaron con 4 volúmenes de GnCl 6 M (4°C) y se centrifugaron durante 10 min a 8,670 x g a 4°C.

Posteriormente cada una de las pastillas obtenidas se resuspendieron en un volumen total de 2 mL con regulador GnCl 6M, se colocaron en tubos con tapón de rosca que contenían 500 µl de perlas de vidrio de 150-212 µm de diámetro (sigma). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

## **5.11 Extracción de RNA total**

La extracción del RNA total se realizó mediante lisis mecánica, la cual consistió en someter el paquete celular a 3 ciclos de aceleración, a una velocidad de 4 m/s durante 45 s en el Fast-Prep™ (Bio101 THERMO), en presencia de regulador de lisis y 0.5 mL de perlas de vidrio (156-212 µm SIGMA, USA), seguido de 4 ciclos de aceleración a una velocidad de 6.5 m/s durante 15 s. Después, los tubos se centrifugaron a 16,000 x g durante 5 min a 4°C. Posteriormente, a cada lisado se le adicionó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó suavemente y se centrifugó a 4°C a 16,000 x g durante 5 min.

Posteriormente, la fase acuosa se recuperó en un microtubo limpio, a éste se le adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1); se agitó suavemente y centrifugó 5 min a 16,000 x g (éste paso se repitió dos veces). Nuevamente se recuperó la fase acuosa. Se realizó una precipitación selectiva del RNA para lo cual a la fase acuosa se le adicionó en forma gradual (gota a gota) 0.4 volúmenes de etanol absoluto frío.

## 5.12 Purificación del RNA

En ésta fase se llevaron a cabo tres lavados rigurosos, utilizando TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>), y un lavado final utilizando etanol.

**Primer lavado:** Los tubos que se obtuvieron en la fase anterior se centrifugaron a 16,000 x g durante 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, la pastilla se lavó con etanol al 75%, nuevamente los tubos se centrifugaron a 16,000 x g por 10 min a 4°C, posteriormente se eliminó el exceso de alcohol teniendo cuidado de no llevarse la pastilla. Ésta se resuspendió en 100 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (agua de DEPC). A la solución se le agregó 1 mL de TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>) y se agregaron 100 µL de cloroformo; se agitaron e incubaron 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 16,000 x g durante 20 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo limpio, se le agregaron 500 µL de isopropanol y se dejó precipitar a -20°C toda la noche. Éste procedimiento se repitió dos veces más.

**Cuarto lavado:** Los tubos obtenidos del tercer lavado se centrifugaron a 16,000 x g durante 20 min a 4°C, se eliminó el isopropanol y se le agregó 1 mL de etanol al 75%, posteriormente se centrifugaron a 16,000 x g durante 5 min a 4°C. Se eliminó el etanol y la pastilla se secó. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en un volumen adecuado de agua DEPC, incubando 1 min a 55°C.

Para comprobar la ausencia de DNA en las muestras de RNA total, 1 µL de cada RNA, se probó por PCR empleando iniciadores específicos para el gen del rRNA 16S de micobacterias (KK4:5´ CTCACCCGTTGCGCACTCG 3´ y RAC8: 5´ CACTGGTG CCTCCCGTAGG 3´) y para la proteína ribosomal 12 (S12F: 5´ CCAACCATCCAGCA GCTGGT 3´ y S12R: 5´ CCTTCAGAGCCGCGGTCT 3´); como control positivo de la reacción de PCR, se empleó DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv.

En forma simultánea se estableció la integridad del RNA, en este caso; 1 µL de la muestra se analizó en el bioanalizador mediante el uso de “chip” Prokaryote RNA Nano de Agilent Technology. Finalmente, se determinó la concentración de RNA por espectrofotometría. El RNA total se mantuvo a -70°C hasta su uso.

### 5.13 Trascrición reversa del RNA total (obtención de cDNA)

En todo momento se empleó el “kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR de invitrogen™”, conforme al siguiente protocolo:

1 µg/µL de RNA total	1 µL
Iniciadores al azar (50 ng/µL)	3 µL
dNTP's (10 mM)	1 µL
H <sub>2</sub> O DEPC	5 µL

La mezcla anterior se incubó a 65°C durante 5 min, a fin de eliminar las estructuras secundarias en el RNA total, inmediatamente después se transfirió a 4°C durante 2 minutos. En forma simultánea se preparó la siguiente mezcla de reacción y se agregó al RNA anterior:

Regulador RT 10 x	2 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µL
DTT (0.1 M)	2 µL
RNasaOUT (40 unidades/µL)	1 µL

Posteriormente la mezcla se incubó a 25°C por 2 min; después se adicionó 1 µL de la enzima SuperScript™ II RT (50 unidades/µL) y se continuó con la incubación a 25°C durante 10 min. Posteriormente la mezcla de reacción se incubó a 42°C durante 50 min. La enzima se inactivó calentando la mezcla a 70°C por 15 min. La mezcla se transfirió a un baño de hielo. Finalmente, a cada tubo se adicionó 1 µL de RNasa H (2 unidades/µL) e incubó a 37°C durante 20 min.

En cada uno de los cDNA obtenidos se cuantificó la expresión de cada uno de los genes a estudiar, mediante la técnica de PCR en tiempo real de acuerdo al punto 5.8a los resultados se interpolaron en la curva tipo.

#### **5.14 Análisis estadístico de los resultados**

A fin de detectar diferencias significativas en la expresión genética entre las condiciones estudiadas, se efectuó un análisis paramétrico de varianza bifactorial (Two Way ANOVA), empleando para ello el software estadístico SIGMASTAT 3.5. Se estableció la fuente de carbono y la condición de crecimiento como variables independientes, y el logaritmo de la expresión genética como la variable dependiente. El logaritmo de dicha expresión se usó a fin de homogeneizar las varianzas de los resultados de la expresión genética.



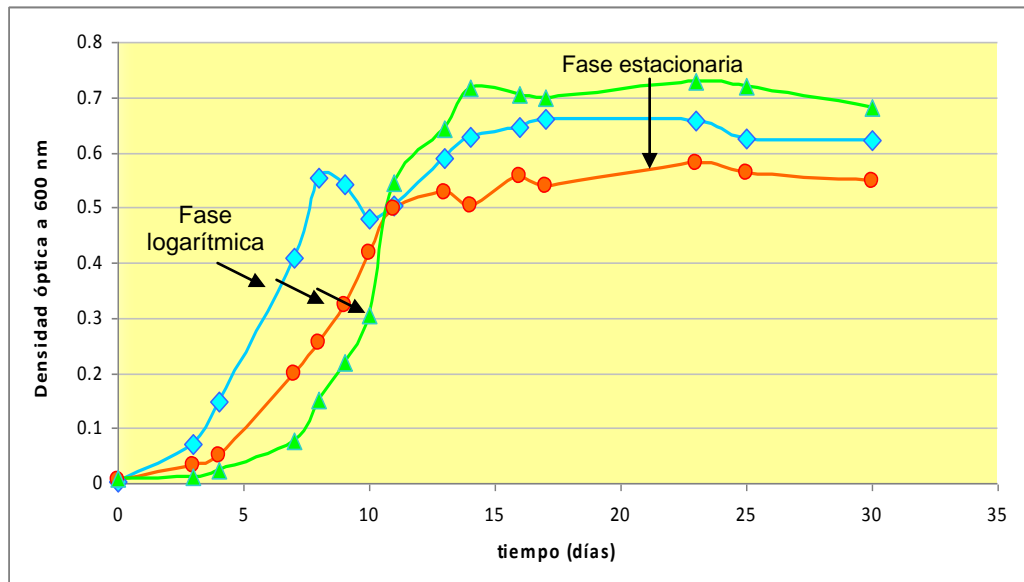
## RESULTADOS

### 6.1 Establecimiento del crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta

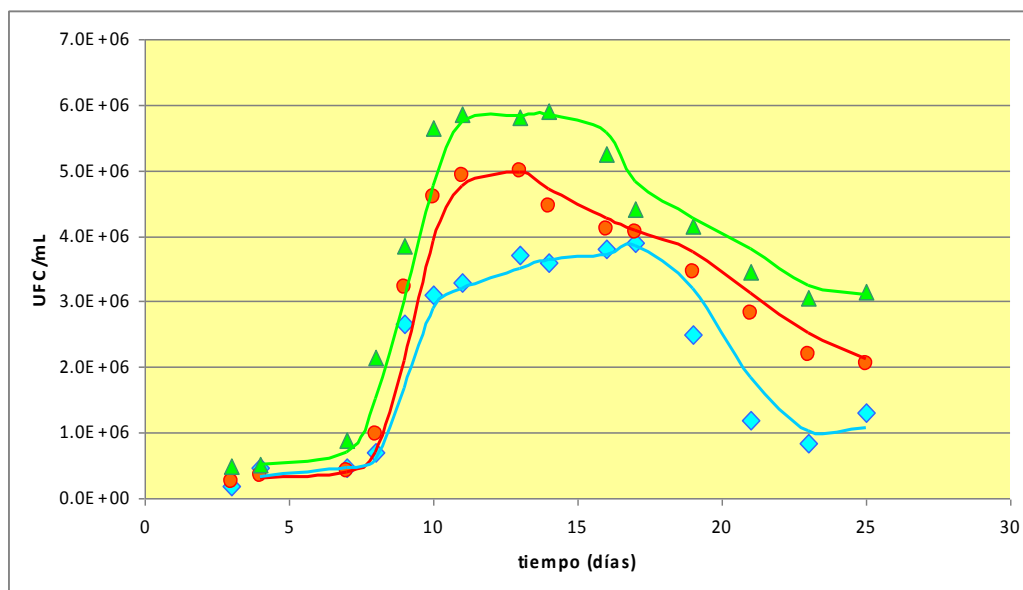
Para determinar el efecto de los ácidos grasos sobre *M. tuberculosis* H37Rv, se evaluó el crecimiento de dicha cepa en presencia de cada uno de los ácidos grasos al 0.1% en el medio Dubos suplementado tanto con albúmina-dextrosa-catalasa (ADC), 10%, como con albúmina-catalasa (AC), 10%. Como control se utilizó el crecimiento de la cepa en medio Dubos suplementado con ADC al 10% sin ácido graso.

Al comparar el crecimiento de la micobacteria en los diferentes medios observamos que ésta fue capaz de crecer en presencia de ácidos grasos de cadena corta al 0.1% tanto en aquellos suplementados con ADC como en los suplementados con AC.

Posteriormente, se procedió a elaborar la curva de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de los ácidos grasos estudiados; como control se utilizó medio Dubos tradicional. En la figura 9, se presenta la gráfica de la absorbencia del cultivo respecto al tiempo; se observó que las tres curvas muestran un patrón de crecimiento similar. En la dicha gráfica se establece que la fase logarítmica de crecimiento ocurre entre el cuarto y el décimo día, y que a partir del día 14, el cultivo entra en fase estacionaria. En la figura 10, se observa un comportamiento similar al obtenido por absorbencia; sin embargo, después del día 14 se presentó un descenso en el número de UFC/mL, lo cual puede deberse no sólo a que las bacterias estén muriendo, sino también a que conforme transcurre el tiempo, *M. tuberculosis* tiende a formar grumos difíciles de disgregar.



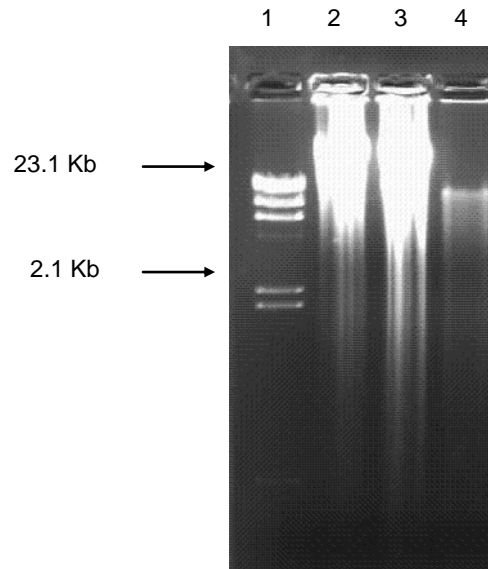
**Figura 9. Curva de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta (densidad óptica).** ▲ Medio Dubos suplementado al 10% con ADC (control); Medio Dubos suplementado al 10% con AC adicionado con: ● propionato de sodio 0.1% ó ◆ valerato de sodio 0.1%.



**Figura 10. Curva de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta (cuenta viable).** ▲ Medio Dubos suplementado al 10% con ADC (control); Medio Dubos suplementado al 10% con AC adicionado con: ● propionato de sodio 0.1% ó ◆ valerato de sodio 0.1%.

## 6.2 Aislamiento de DNA genómico de *M. tuberculosis*

En la figura 11 se muestra que el DNA de *M. tuberculosis* H37Rv presentó la calidad adecuada para la realización de los experimentos subsecuentes.



**Figura 11. Electroferograma del DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv.** Carril 1, Marcador de tamaño molecular (DNA genómico del fago  $\lambda$  digerido con HindIII); carriles 2, 3 y 4, DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv.

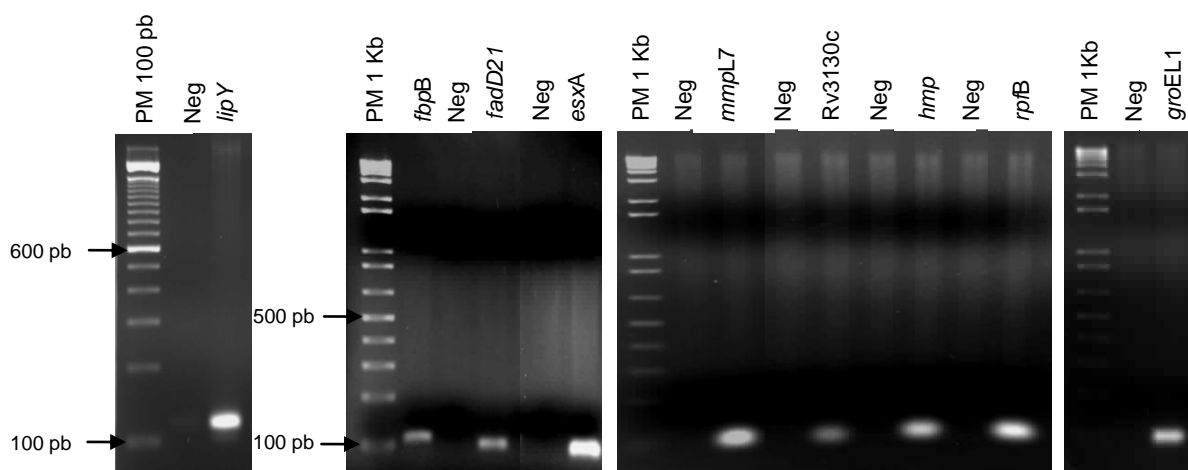
## 6.3 Genes candidatos y diseño de sus iniciadores

Se diseñaron 9 pares de iniciadores con base en el proyecto del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv empleando el programa “primer premier versión 4.0”. En la tabla 4 se muestra la secuencia de los iniciadores seleccionados, así como el tamaño de los amplificados. Los iniciadores se probaron por PCR convencional empleando DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv; de esta forma se comprobó que los iniciadores sí amplificaban a los genes empleados en este estudio (Figura 12); en esta figura se observan los amplificados correspondientes a los 9 genes. Además, se corroboró su especificidad por secuenciación automática (Tabla 5). Por otra parte, para los otros 10 genes del estudio se utilizaron los iniciadores diseñados en un trabajo previo de nuestro laboratorio (González-Mejía, 2006).

**Tabla 4. Iniciadores utilizados para la PCR en tiempo real de 9 genes de *M. tuberculosis* H37Rv.**

Gen	Secuencia del iniciador (5' → 3')	Tamaño del amplificado (pb)
<i>esxA</i>	F: ATGACAGAGCAGCAGTGGAA R: CAAGGAGGGAATGAATGGAC	88
<i>fadD21</i>	F: TCGTGGCTGCCGTTCT R: CCAGCGGGCTAGTGAGTT	94
<i>fbpB</i>	F: ACCCGGCTATGGGTTTATT R: ACTTCAGGTTGCTGCTACGA	106
<i>groEL1</i>	F: GTCAGCAAGGACGACACGG R: CGATCTCGGCACGCAAGT	88
<i>hmp</i>	F: AGCGGGTAGCGGCATCA R: TCGCGGTTGGCGTAGAG	93
<i>lipY</i>	F: GCAAGTGCCGATTTACCC R: CCACGCTGACGTTGGAGAC	119
<i>rpfB</i>	F: CCGCAATCGGATCAAGAA R: CGACCTCCCGGCTCAT	95
Rv3130c	F: TTGCCAACCGCCTTCC R: TCGCCACGGTGACAACA	87
<i>mmpL7</i>	F: CCGCAGGACCAGCCTTACT R: GGGATCTCACCACCAGTCG	93

Todos los iniciadores se diseñaron empleando el programa "primer premier versión 4.0".



**Figura 12. Electroferograma de los fragmentos amplificados por PCR de los 9 genes de *M. tuberculosis* H37Rv.** La electroforesis se efectuó en gel de agarosa al 1.5%. Neg, control negativo de la PCR (agua).

**Tabla 5. Resumen de los resultados de las búsquedas de las secuencias analizadas mediante BLAST\*.**

Gen	Blast	Identidad
<i>fbpB</i>	<a href="#">emb BX842578.1</a> <i>M.tb</i> H37Rv complete genome; segment 7/13. Secreted antigen 85-B	106/106 (100%)
<i>fadD21</i>	<a href="#">emb BX842575.1</a> <i>M.tb</i> H37Rv complete genome; segment 4/13. Probable fatty-acid-CoA ligase FADD21	52/56 (92%)
<i>esxA</i>	<a href="#">gb FJ014499.1</a> <i>M.tb</i> H37Rv. 6 kDa early secretory antigenic	69/72 (95%)
<i>hmp</i>	<a href="#">emb BX842583.1</a> <i>M.tb</i> H37Rv complete genome; segment 12/13. Possible hemoglobine-retaded protein HMP	93/93 (100%)
Rv3130	<a href="#">BX842582.1</a> <i>M.tb</i> H37Rv complete genome; segment 11/13. Conserved hipothetical proteina	87/87 (100%)
<i>lipY</i>	<a href="#">BX842581.1</a> <i>M.tb</i> H37Rv complete genome; segment 10/13. PE-PGRS family protein, probably triacilglycerol lipase	108/108 (100%)
<i>mmpL7</i>	<a href="#">emb BX842581.1</a> <i>M.tb</i> H37Rv complete genome; segment 10/13. Conserved transmembrane transport protein MMPL7	60/62 (96%)
<i>rpfB</i>	<a href="#">emb BX842575.1</a> <i>M.tb</i> H37Rv complete genome; segment 4/13. Probable resuscitation-promoting factor rpfB	69/72 (95%),
<i>groEL1</i>	emb X60350.1  <i>M.tb</i> . groE gene for KCS and 10-kDa products	47/53 (88%)

\*<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

#### 6.4 Construcción de las curvas tipo para la técnica de RT-PCR en tiempo real

Para la realización de las curvas tipo se empleó el siguiente protocolo:

- 1) Se determinó el peso molecular del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv

PM del genoma = Tamaño del genoma (pb) x Peso promedio de un pb

$$4,411,529 \text{ pb} \times 650 \text{ Da} = 2,867,493,830 \text{ Da}$$

- 2) Se determinó el peso en el cual se encuentran  $10^8$  genomas

$$\begin{array}{r} 2,867,493,830 \text{ —————} 6.022 \times 10^{23} \text{ genomas (Avogadro)} \\ \times \text{ —————} 10^8 \\ \hline X = 4.76 \times 10^{-7} \text{ g ó } 0.476 \text{ } \mu\text{g} \end{array}$$

- 3) Se determinó la concentración del DNA obtenido (0.74  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

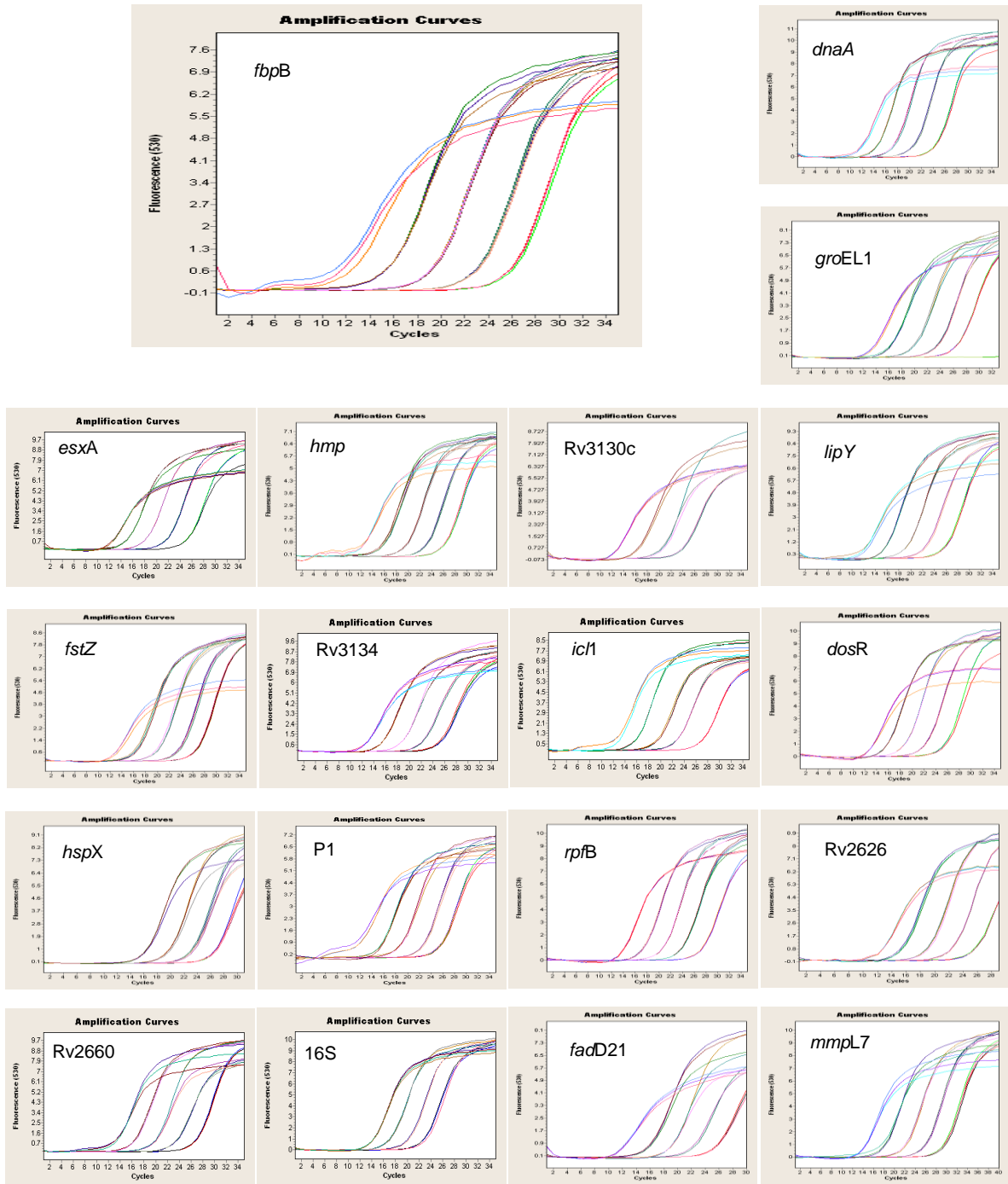
4) Se ajustó la concentración de DNA a  $10^8$  genomas/ $\mu\text{L}$ , para lo cual 64.3  $\mu\text{L}$  de la solución original se aforaron a 100  $\mu\text{L}$  de agua.

A partir de la solución que contenía  $10^8$  genomas se realizaron diluciones decimales hasta obtener  $10^3$  genomas/ $\mu\text{L}$ . Las diluciones  $10^7$ - $10^3$  se amplificaron mediante PCR cuantitativa, para cada uno de los 19 genes a estudiar. Las condiciones de reacción se estandarizaron para cada amplicón, según la tabla 6, en donde se muestra que la concentración de magnesio utilizado estuvo entre 2 y 4 mM, la temperatura de alineamiento entre 55 y 64°C y el número de ciclos fue de 35.

Posteriormente, se construyeron las curvas tipo graficando en el eje de las ordenadas intensidad de fluorescencia y en las abcisas el ciclo de PCR (Figura 13); en esta figura se muestra que a mayor número de copias de DNA, la fluorescencia debida a la amplificación se detectó en un menor número de ciclos de la PCR. Por ejemplo, para el gen *fbpB* (ag85), la fluorescencia comenzó a detectarse en el ciclo 11 cuando la muestra contaba con  $10^6$  copias de DNA; mientras que para  $10^5$  copias, la fluorescencia se detectó hasta el ciclo 15. Se generaron las formulas linealizadas de la reacción, a fin de poder interpolar puntos experimentales en ésta; los resultados se muestran en la figura 14. En cada una de las curvas se determinó la eficiencia de reacción así como el coeficiente de correlación, encontrando en todos los casos una eficiencia de reacción cercana a 2 y coeficiente de correlación cercano a la unidad. Así mismo se demostró mediante análisis del producto de PCR por curva de desnaturalización, que no se presentaron productos inespecíficos en la reacción (Figura 15), ya que en cada una de las gráficas para los 19 genes, solo se presenta un pico ó producto de desnaturalización, indicativo de que durante la PCR cuantitativa solo se generó el amplicón correspondiente para el cual los iniciadores fueron diseñados.

**Tabla 6. Condiciones de reacción estandarizadas para las PCR cuantitativas.**

<b>Gen</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	<b>Temperatura de alineamiento (°C)</b>	<b>Número de ciclos</b>
<i>fbpB</i>	4	55	35
<i>fadD21</i>	4	55	35
<i>esxA</i>	4	55	35
<i>hmp</i>	3	56	35
<i>mmpL7</i>	2	56	35
Rv3130	3	58	35
<i>rpfB</i>	4	58	35
<i>groEL1</i>	4	58	33
<i>lipY</i>	4	58	35
Rv2626	4	62	35
Rv2660	4	62	35
<i>icl1</i>	3	62	35
<i>dosR</i>	4	62	35
<i>fstZ</i>	4	62	35
<i>hspX</i>	4	62	35
P1	4	62	35
16S	4	62	35
<i>dnaA</i>	4	64	35
Rv3134	4	64	35



**Figura 13. Curvas tipo de los 19 genes a estudiar.** En el eje de las ordenadas se grafica la fluorescencia y en el de las abscisas el ciclo de PCR. Todas las curvas se realizaron por triplicado. “Threshold” es el umbral del número de copias. Cada gráfica presenta cinco curvas de izquierda a derecha que contienen  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3$  moléculas de DNA (a excepción de 16S, *hspX* y Rv3130).



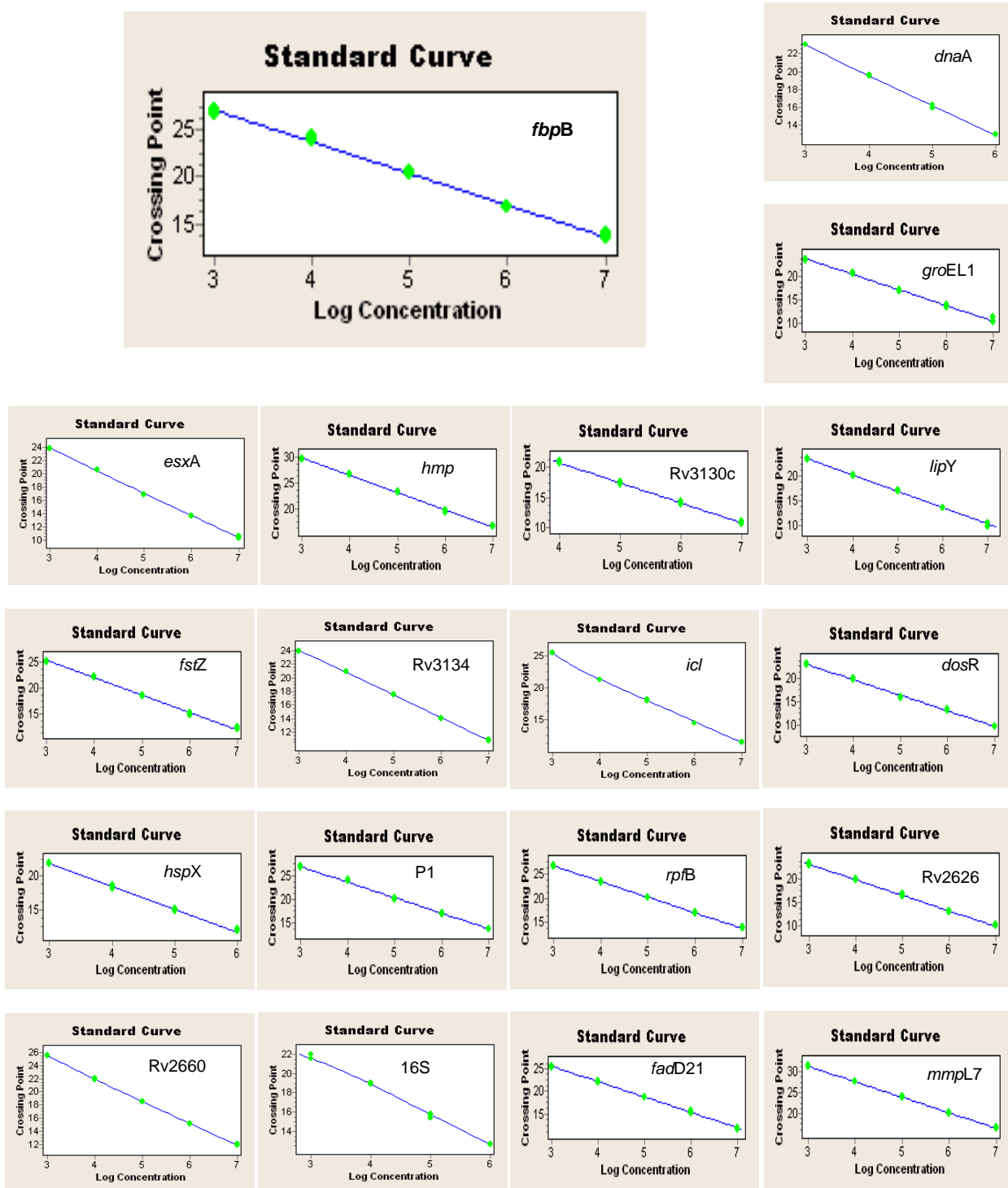
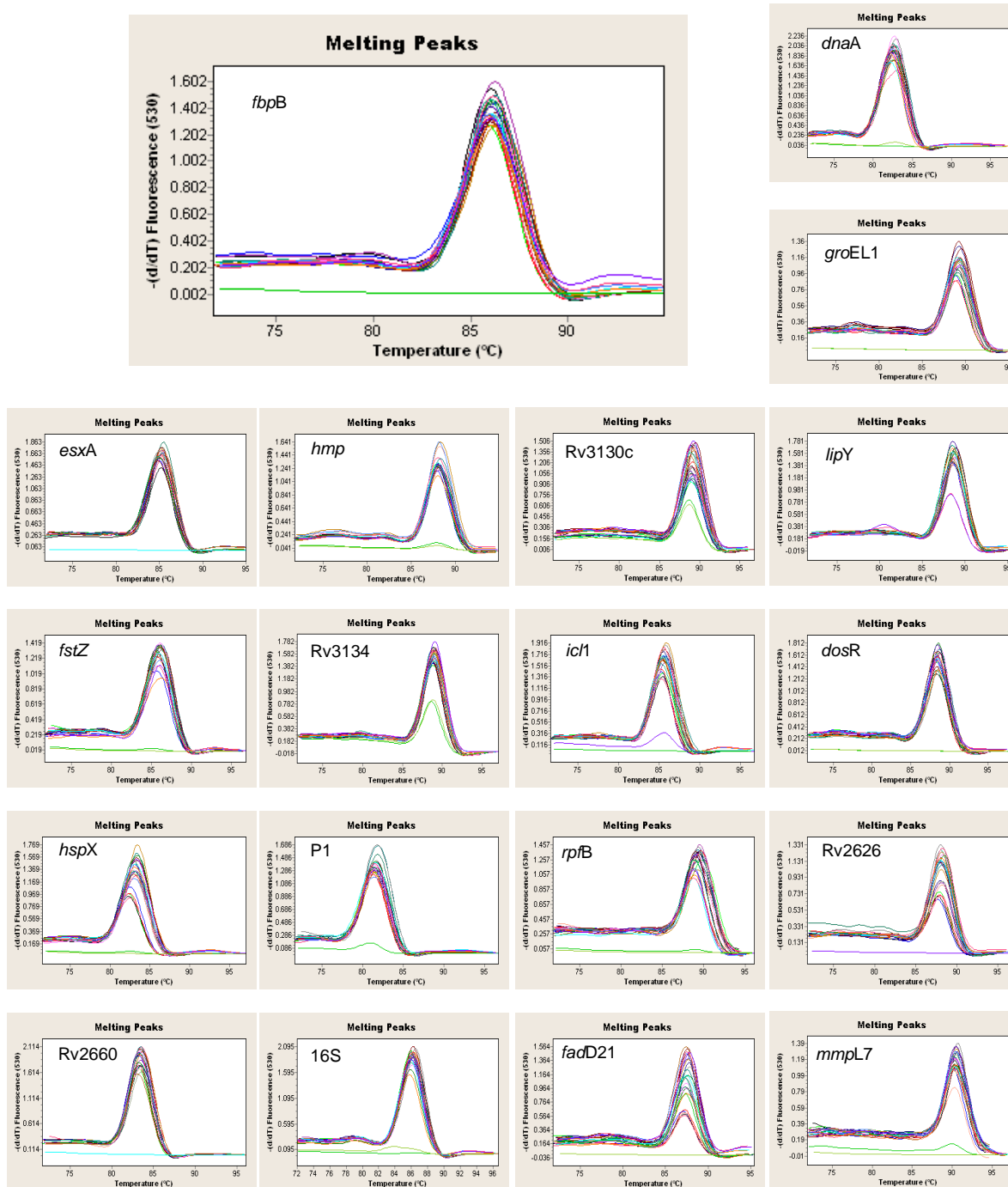


Figura 14. Linearización de las curvas tipo para los 19 genes a estudiar. En el eje de las ordenadas se presenta el número de ciclos; en el eje de las abscisas se muestra la concentración del producto expresada en número de copias/ $\mu$ g de copias



**Figura 15. Curvas de desnaturalización para los productos de amplificación de los 19 genes a estudiar.** En el eje de las ordenadas se presenta la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura. “Threshold” es el umbral de detección de desnaturalización de los ácidos nucleicos.

## 6.5 Estandarización del modelo de latencia *in vitro* de *M. tuberculosis* H37Rv

Se determinó el momento de la reducción parcial y total del azul de metileno en el cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, en el medio Dubos tradicional y en Dubos adicionado de cada uno de los ácidos grasos; es decir, el tiempo en que ocurre la desaparición parcial y total de la tonalidad azul del cultivo. Por lo tanto, se establecieron los tiempos para llevar a cabo las extracciones del RNA total en experimentos subsecuentes (Tabla 7); en estos tiempos los cultivos se encuentran en la fase de adaptación a la hipoxia (NRP1) y en anaerobiosis (NRP2).

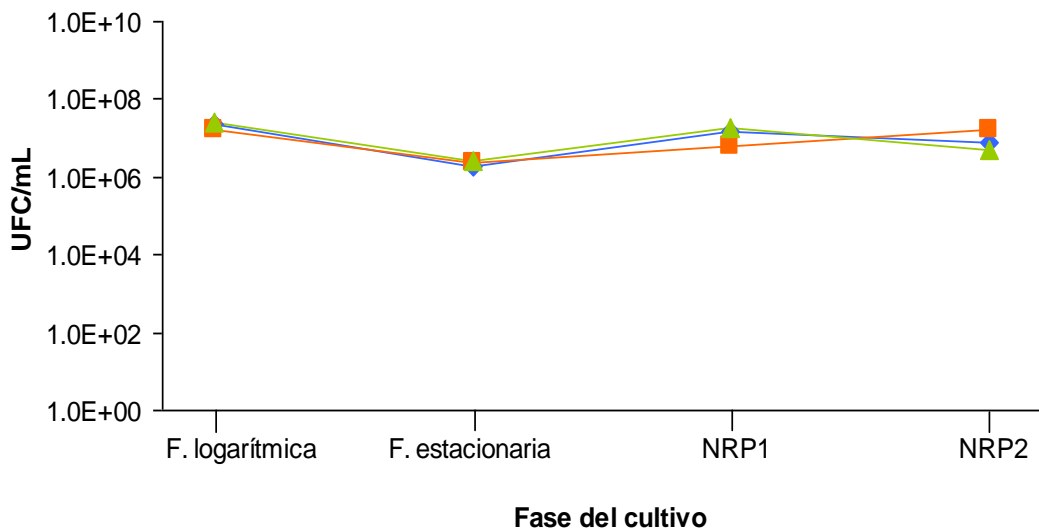
**Tabla 7. Establecimiento de la reducción parcial y total del azul de metileno en el modelo de Wayne.**

Medio de cultivo	Fase	Tiempo (días)
Dubos + ADC	NRP1	5
	NRP2	6
Dubos + AC + propionato de sodio 0.1%	NRP1	5
	NRP2	18
Dubos + AC + valerato de sodio 0.1%	NRP1	5
	NRP2	15

## 6.6 Viabilidad de *M. tuberculosis* durante su adaptación a la latencia por hipoxia

Para determinar el efecto de la hipoxia en presencia de ácidos grasos de cadena corta sobre la viabilidad de las células de *M. tuberculosis* H37Rv se determinaron las UFC/mL tanto durante su adaptación a la latencia, como en la fase logarítmica y estacionaria de crecimiento.

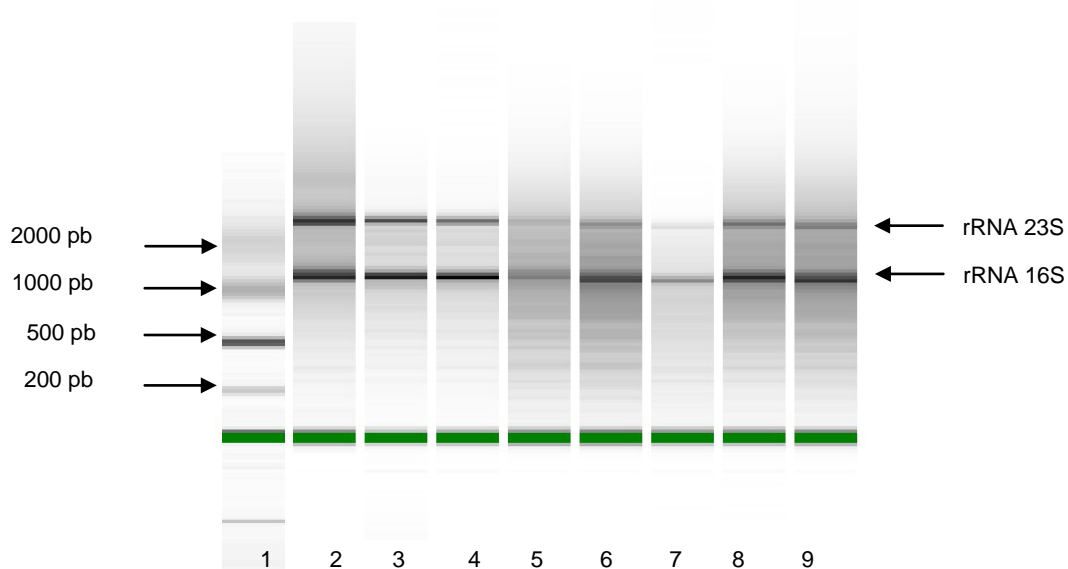
Al determinar las UFC/mL de *M. tuberculosis* H37Rv en medio Dubos se observó una disminución de la fase logarítmica a la fase estacionaria de  $2.55 \times 10^7$  UFC/mL a  $2.50 \times 10^6$  UFC/mL, por otra parte, durante la adaptación a la latencia por hipoxia se observó que tanto en la fase NRP1 como en la NRP2 las UFC/mL se mantuvieron respecto a la fase logarítmica de crecimiento. Un comportamiento similar fue observado en medio Dubos adicionado de ácidos grasos de cadena corta (Figura 16).



**Figura 16. Viabilidad de *M. tuberculosis* H37Rv durante su adaptación a la latencia en presencia de ácidos grasos de cadena corta.** En el eje de las ordenadas se muestran las UFC/mL, en escala logarítmica. En el eje de las abscisas se muestran las diferentes condiciones de estudio en medio Dubos ▲ ó en medio Dubos + propionato de sodio 0.1% ■ ó en medio Dubos + valerato de sodio ◆.

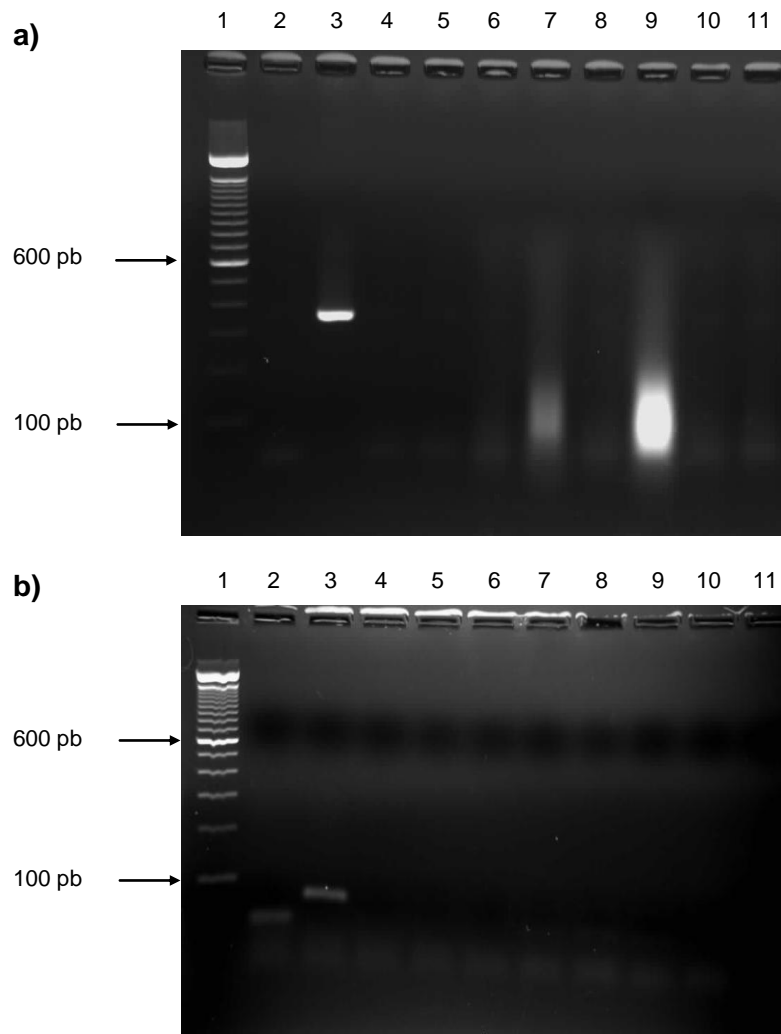
## 6.7 Extracción del RNA total

Se realizó la obtención del RNA total (González-y-Merchand y col., 1996) de *M. tuberculosis* H37Rv a partir de dos lotes de cultivos en: fase logarítmica, fase estacionaria y en fase de latencia *in vitro* (NRP1 y NRP 2) en medio Dubos suplementado con AC adicionado de propionato de sodio al 0.1 % o adicionado con valerato de sodio al 0.1%. La integridad del RNA se comprobó mediante el análisis de 1  $\mu$ L de la muestra en el bioanalizador (Agilent). La calidad de los diferentes lotes de RNA fue adecuada en todos los casos para continuar con los experimentos de RT-PCR, ya que las bandas correspondientes al rRNA 23S y rRNA 16S se observaron con una calidad adecuada en el electroferograma (sólo se presenta un electroferograma representativo; Figura 17).



**Figura 17. Electroferograma del RNA total de *M. tuberculosis* H37Rv.** Se utilizó el “chip” Prokaryote RNA Nano de Agilent Technology. El RNA fue obtenido a partir de un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv crecido en medio Dubos suplementado al 10% con AC adicionado de propionato de sodio 0.1%. Carril 1) Marcador de tamaño molecular; carriles 2 y 3) RNA total de la fase logarítmica; carriles 4 y 5) RNA total de la fase estacionaria; carriles 6 y 7) RNA total de la fase de persistencia no replicativa 1; 8 y 9) RNA total de la fase de persistencia no replicativa 2.

Para comprobar la ausencia de DNA en las muestras de RNA total, 1  $\mu$ g de cada RNA, se probó por PCR empleando iniciadores específicos para los genes del RNA 16S de micobacterias (KK4 y RAC8) y para la proteína ribosomal 12 (S12F y S12R); como control positivo de la reacción de PCR, se empleó DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv. Como se muestra en la figura 18a y 18b, respectivamente, no se detectó amplificado alguno en las muestras, por lo tanto, nuestro RNA total se encontraba libre de DNA.

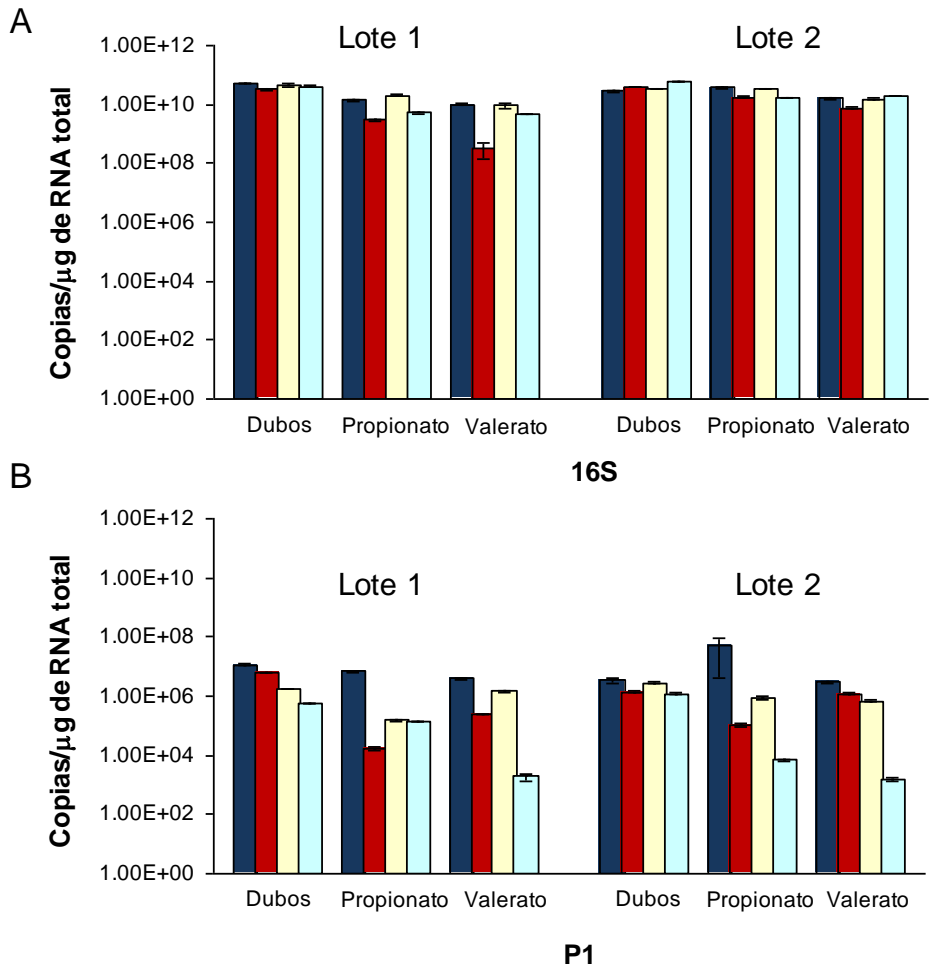


**Figura 18. Electroferograma de la PCR utilizando como molde el RNA de *M. tuberculosis* H37Rv obtenido en diferentes condiciones.** a) PCR donde se emplearon iniciadores específicos para el gen RNA 16S de micobacterias; b) PCR donde se emplearon iniciadores específicos para el gen que codifica a la proteína ribosomal 12 (*rsp12*). El RNA fue obtenido a partir de un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv crecido en medio Dubos suplementado al 10% con AC adicionado de propionato de sodio 0.1%. Carril 1, Marcador de tamaño molecular (100 pb); carril 2, Control negativo de PCR; carril 3, Control positivo de PCR (DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv), carriles 4 y 5, RNA total de la fase logarítmica; carriles 6 y 7, RNA total de la fase estacionaria; carriles 8 y 9, RNA total de la fase de persistencia no replicativa; carriles 10 y 11) RNA total de la fase de persistencia no replicativa 2. Nota: En el control negativo (carril 2) de la figura b, se observó una banda inespecífica de ~60 pb. Para comprobar que el control negativo funcionaba como tal esta misma reacción se realizó mediante PCR-tiempo real, el análisis de las curvas de desnaturalización para los productos de amplificación corroboró que la reacción era negativa.

## 6.8 Cuantificación de la expresión genética de *M. tuberculosis* H37Rv en el modelo de latencia *in vitro* de Wayne en presencia de ácidos grasos

Se cuantificó la expresión del gen que codifica al rRNA 16S (16S) y a la región del promotor P1 del rRNA (P1) para determinar su posible papel como genes normalizadores de la expresión genética en presencia de los ácidos grasos de cadena corta en las distintas condiciones estudiadas. Se encontró que 16S fue el gen que más se expresó tanto en cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv en medio Dubos como en el medio adicionado de propionato ó valerato de sodio ( $4.91 \times 10^{10}$  copias/ $\mu\text{g}$  de RNA) (Figura 19A); además la expresión de dicho gen fue similar en la fase logarítmica, fase estacionaria y la latencia *in vitro* tanto en medio Dubos como medio adicionado de ácidos grasos de cadena ya que no existió diferencia estadísticamente significativa en la expresión de dicho gen respecto a la adición de un ácido graso de cadena corta (Figura 19A).

En las condiciones estudiadas la expresión del promotor P1 del rRNA no fue similar durante la fase logarítmica, estacionaria y la latencia *in vitro* para un mismo medio de cultivo, ni entre los medios adicionados de ácidos grasos de cadena corta. De manera complementaria, el análisis estadístico confirmó que estas diferencias sí fueron significativas (Figura 19B). Por lo tanto, en las gráficas subsecuentes, la expresión genética se reporta en forma normalizada con el gen 16S; es decir el valor final de transcritos es el resultado de dividir el número de copias del gen de estudio por  $\mu\text{g}$  de RNA total entre el número de copias del gen 16S por  $\mu\text{g}$  de RNA total. El resultado de la operación anterior en todos los casos fue un número negativo, ya que el gen 16S se expresó más en todos los cultivos; de tal forma que en el eje de las ordenadas de las figuras 20, 21 y 22 se muestra la expresión normalizada en escala logarítmica en orden inverso, es decir donde se detectó una mayor expresión genética la barra será más pequeña mientras que donde haya una menor expresión la barra de expresión será más alta.



**Figura 19. Expresión genética de los dos posibles normalizadores en *M. tuberculosis* en presencia de ácidos grasos de cadena corta.** A) Cuantificación de la expresión del gen 16S. B) Cuantificación de la expresión del gen P1. En el eje de las ordenadas se muestra el número de copias de cada amplicón por  $\mu\text{g}$  de RNA total en escala logarítmica, y en el eje de las abscisas se muestran el gen estudiado en diferentes condiciones (■ Fase logarítmica, ■ Fase estacionaria, ■ Persistencia no replicativa 1 y ■ Persistencia no replicativa 2).

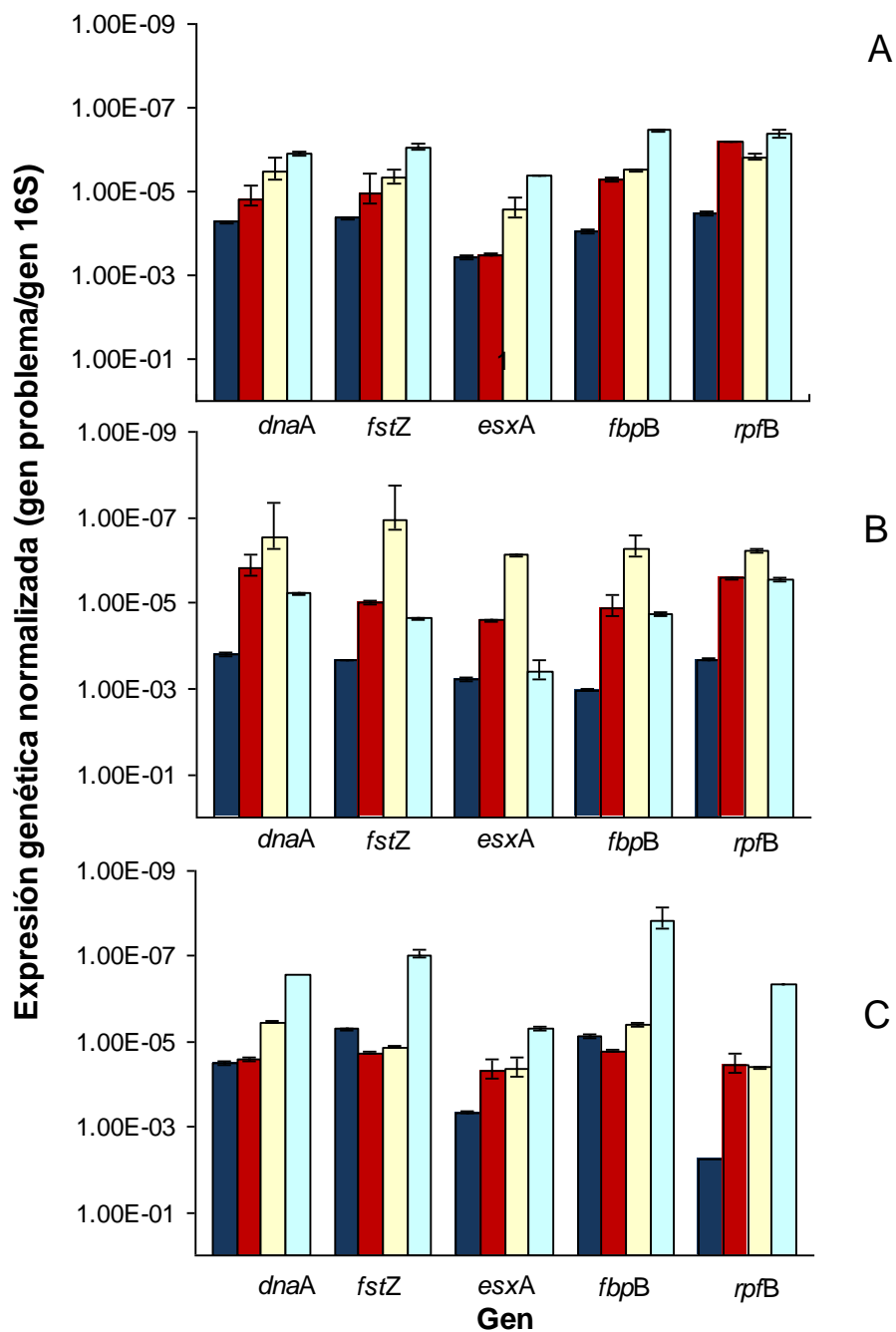
En el granuloma prevalecen condiciones ambientales hostiles para el crecimiento de las micobacterias, como la falta de oxígeno y nutrientes, la acidificación del medio y la producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nitroso. Además de estas condiciones ambientales, en el granuloma se presenta una respuesta inmune activa que participa en su mantenimiento y en el aislamiento de la infección (Stewart y col., 2003). Debido a lo anterior, en el presente estudio se cuantificó la expresión de 17 genes de *M. tuberculosis* H37Rv, relacionados con el ciclo celular, expresión de antígenos inmunodominantes, reactivación, respuesta a la hipoxia, estrés oxidativo, metabolismo de lípidos y reactivación.



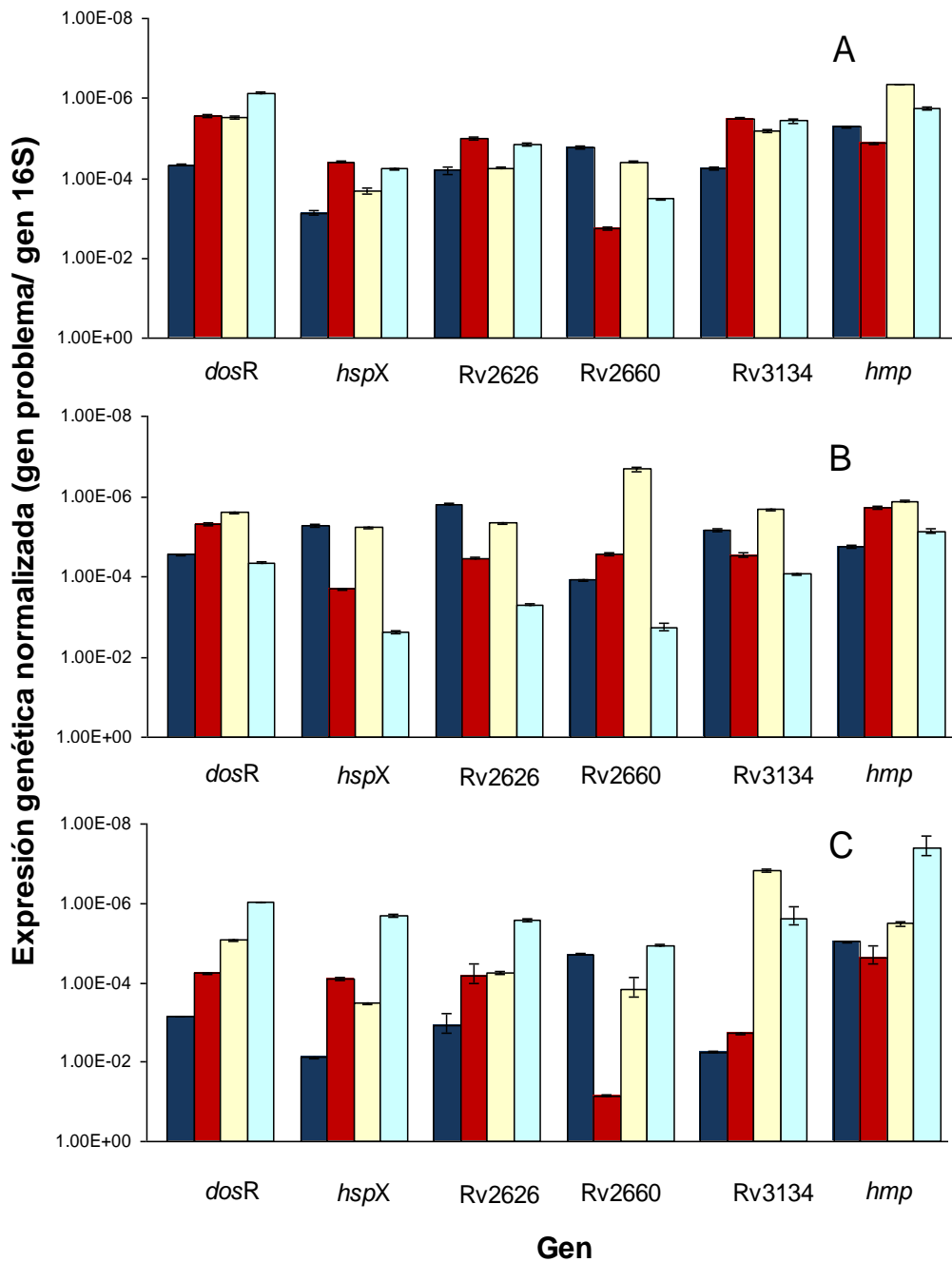
En medio Dubos sin ácidos grasos para los genes involucrados en el ciclo celular (*dnaA* y *fstZ*), en la producción de antígenos inmunodominantes (*esxA* y *fbpB*) así como en la reactivación (*rfpB*), en general se observó un patrón caracterizado por una disminución en la expresión genética durante la fase estacionaria de crecimiento y la latencia *in vitro* (NRP1 y NRP2) respecto a la fase logarítmica. Este patrón sólo difiere para la expresión de *esxA*, donde observa que la expresión de dicho gen fue muy similar tanto en la fase logarítmica como en la fase estacionaria de crecimiento (Figura 20A). Al igual que con el caso anterior, en el cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv crecido en presencia de propionato, el patrón de expresión fue muy similar en todas las condiciones (Figura 20B); sin embargo, es de llamar la atención un aumento en la expresión genética durante la fase NRP2 de la latencia, con respecto a la fase estacionaria y la NRP1, la cual es más evidente en el gen *esxA*. Además, los cultivos en presencia de valerato de sodio (Figura 20C) muestran que el gen *fbpB* fue el que presentó una disminución notoria durante la fase NRP2 de la latencia.

En el presente estudio se encontró una alta variabilidad de la expresión de *dosR* entre las condiciones estudiadas. En el caso particular de los cultivos en medio Dubos, se observó una mayor cantidad de transcritos durante la fase logarítmica de crecimiento; en cambio, se observó una marcada disminución de la cantidad de transcritos durante la fase NRP1 y NRP2 (Figura 21A). Cabe mencionar que todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las condiciones y tiempos establecidos durante la fase de estandarización del modelo de Wayne en presencia de ácidos de cadena corta, de tal forma que la presencia de transcritos durante la fase logarítmica sugieren que quizá algunos de los genes que regula dicho regulón podrían resultar necesarios durante la infección progresiva (Voskiul, 2004).

En figura 21A también se observaron patrones de expresión similares en comportamiento pero en distinto orden de magnitud entre los genes, tal es el caso de los genes *hspX* (que codifica para la proteína  $\alpha$ -cristalina), Rv2626 y Rv3134 (ambos relacionados con la latencia; Yuan y col., 1996; Cunningham y Spreadbury, 1998; Voskiul, 2004). Los tres genes presentaron una disminución en su expresión durante condiciones de estrés para el cultivo, como son la fase estacionaria y la latencia (NRP1 y NRP2) respecto a la fase logarítmica.



**Figura 20. Expresión de los genes involucrados en el ciclo celular, en la producción de antígenos y en la reactivación en *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta.** En el eje de las ordenadas se muestra la expresión genética de cada gen normalizada con el gen rRNA 16S, en escala logarítmica en orden inverso. En el eje de las abscisas se muestran el gen estudiado en diversas condiciones. A) Medio Dubos, B) Medio Dubos + propionato de sodio 0.1% y C) Medio Dubos + valerato de sodio 0.1% (■ Fase logarítmica, ■ Fase estacionaria, ■ Persistencia no replicativa 1 y ■ Persistencia no replicativa 2).



**Figura 21. Expresión de los genes involucrados en hipoxia y en la respuesta oxidativa en *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta.** En el eje de las ordenadas se muestra la expresión genética de cada gen normalizada con el gen rRNA 16S, en escala logarítmica en orden inverso. En el eje de las abscisas se muestran el gen estudiado en diversas condiciones. A) Medio Dubos, B) Medio Dubos + propionato de sodio 0.1% y C) Medio Dubos + valerato de sodio 0.1% (■ Fase logarítmica, ■ Fase estacionaria, ■ Persistencia no replicativa 1 y ■ Persistencia no replicativa 2).

En el presente trabajo el gen Rv2660 (Figura 21A) mostró un aumento en el número de transcritos durante la fase estacionaria y la fase NRP2 (100 y 18 veces mayor respectivamente, respecto a la fase logarítmica). Este gen codifica para una proteína hipotética asociada a la entrada de los cultivos en la fase estacionaria e hipoxia; sin embargo, se han detectado niveles muy bajos de su expresión durante la fase logarítmica de crecimiento (Boon y col., 2001; Voskuil, 2004). En cuanto al gen *hmp*, que codifica una proteína homóloga a la flavohemoglobina descrita en *E. coli*, la cual se ha involucrado en el metabolismo anaeróbico y en la protección contra el estrés oxidativo y nitrosativo (Hu y col., 1999), se observó el mayor nivel de expresión en los cultivos crecidos en medio Dubos durante la fase estacionaria de crecimiento (Figura 21A).

En presencia de propionato de sodio 0.1%, de acuerdo con el patrón de expresión, los genes se pueden dividir en dos grupos, el primero incluye a *dosR*, Rv2660 y a *hmp*, los cuales se caracterizaron por presentar una disminución gradual en el número de transcritos entre la fase logarítmica, la fase estacionaria y la latencia (NRP1) seguida por un aumento en el número de transcritos durante la fase NRP2; incluso a un nivel superior al observado durante la fase logarítmica (1.5 veces más para *dosR* y 15.5 veces más para Rv2660). El segundo grupo de genes incluye a *hspX*, Rv2626 y a Rv3134, los cuales presentan un marcado aumento en el número de transcritos durante la fase estacionaria de crecimiento y en la fase de latencia *in vitro* (NRP2) con respecto a la fase logarítmica de crecimiento (para el gen *hspX* se presentó un aumento de 35 y 445 veces, respectivamente) (Figura 21B).

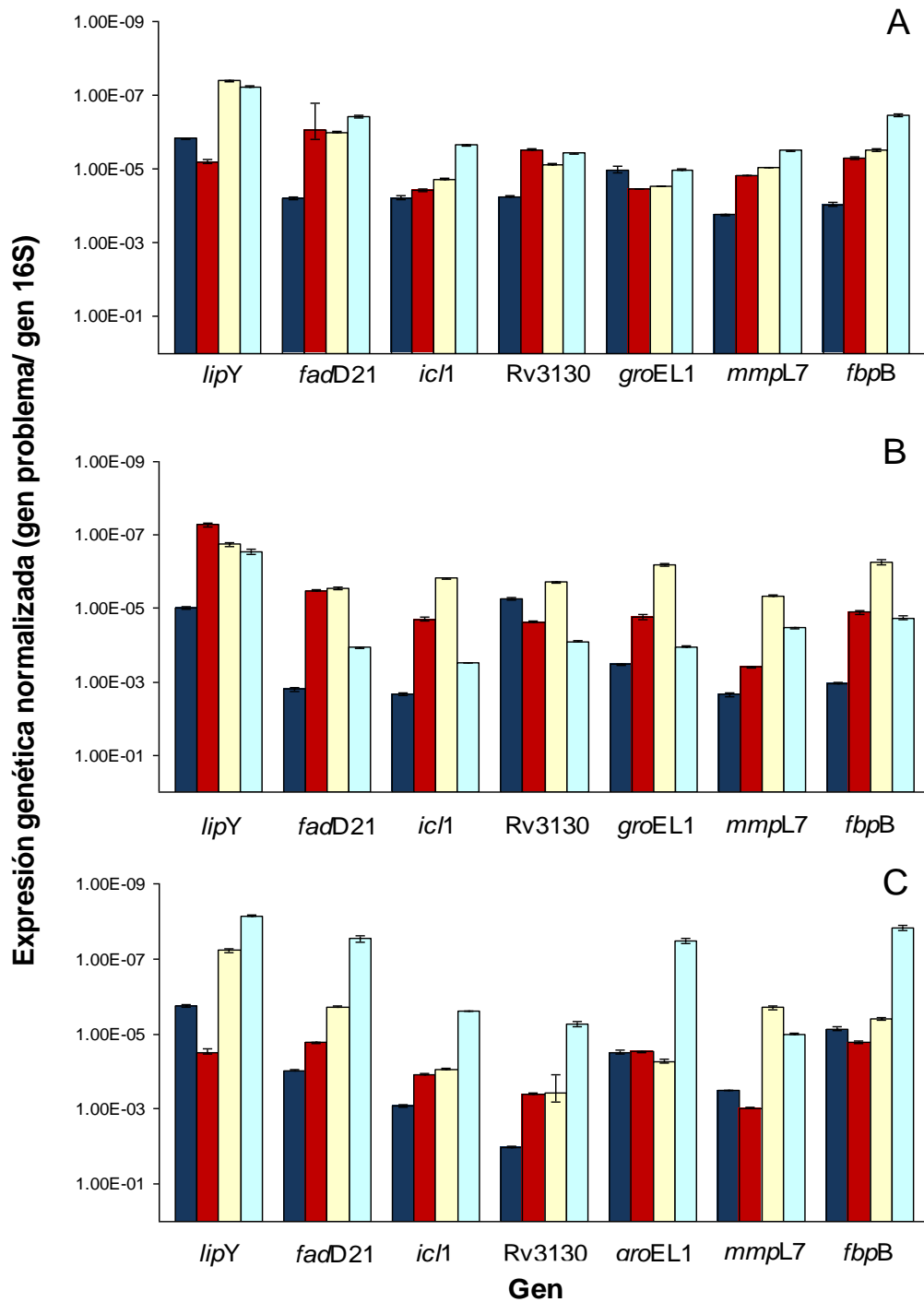
En presencia de valerato de sodio 0.1%, se presentó un comportamiento heterogéneo de los genes en estudio; por ejemplo, se observó un aumento en la expresión del gen Rv2660, durante la fase estacionaria de crecimiento; en contraste, se observó una marcada disminución en el número de transcritos para este mismo gen durante la fase logarítmica y la fase NRP2. En tanto para el gen *hspX*, las condiciones en donde se detectó el mayor número de transcritos fue durante la fase logarítmica de crecimiento y la fase NRP1 (Figura 21C).

En la figura 22 se muestran los patrones de expresión de los genes relacionados con el metabolismo de lípidos cuando *M. tuberculosis* es cultivada en presencia de ácidos grasos de cadena corta en diferentes condiciones.

En medio Dubos, en general se observa un perfil de expresión homogéneo para los distintos genes estudiados, en el cual se observó un mayor número de transcritos durante la fase logarítmica de crecimiento y una disminución durante la fase estacionaria de crecimiento y la latencia *in vitro*; a excepción del gen *lipY*, que codifica para una triacilglicerol-esterasa (Côtés y col., 2007; Mishra y col., 2008), en donde se presenta una mayor expresión durante la fase estacionaria (Figura 22A).

A diferencia del perfil de expresión genético observado en medio Dubos, la presencia de propionato (Figura 22B) induce la expresión de *fadD21* e *icl1*, genes involucrados en la degradación de ácidos y en el ciclo del glioxilato respectivamente (Niederweis, 2008) a niveles semejantes a los encontrados en la fase logarítmica. Respecto al gen Rv3130, involucrado en la biosíntesis de lípidos de reserva, se observó un incremento significativo en sus niveles de expresión en presencia de propionato de sodio durante dos condiciones de estrés; la fase estacionaria (4 veces) y la fase NRP2 (14 veces) respecto a la fase logarítmica de crecimiento (Figura 22B). Esto confirma que durante la latencia inducida por hipoxia se presenta un aumento en la síntesis y en la acumulación de triglicéridos (Deb y col., 2006). Finalmente, los genes *mmpL7*, *groEL1* y *fbpB* involucrados en la biosíntesis y transporte lípidos a través de la membrana, presentan un patrón de expresión similar, donde característicamente se observa una mayor actividad durante la fase logarítmica de crecimiento, explicado por un incremento en la biosíntesis de lípidos de membrana para las nuevas células generadas durante la división celular.

En presencia de valerato de sodio, se observa que el gen *lipY* se expresó en mayor cantidad durante la fase estacionaria de crecimiento. Por otra parte se observa una mayor actividad transcripcional para los genes *fadD21*, *groEL1*, *icl1*, *fadD21* y *fbpB* durante la fase logarítmica de crecimiento y una drástica disminución para estos mismos genes durante la fase NRP2 (Figura 22C).



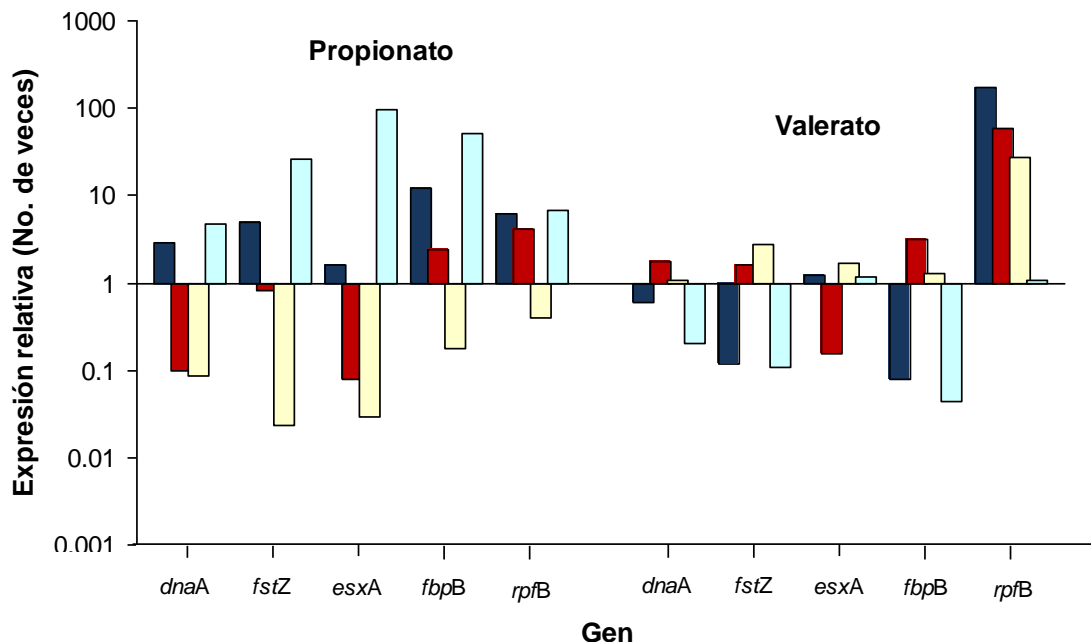
**Figura 22. Expresión de los genes involucrados en metabolismo de lípidos en *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de ácidos grasos de cadena corta.** En el eje de las ordenadas se muestra la expresión genética de cada gen normalizada con el gen rRNA 16S, en escala logarítmica en orden inverso. En el eje de las abscisas se muestran el gen estudiado en diversas condiciones. A) Medio Dubos, B) Medio Dubos + propionato de sodio 0.1% y C) Medio Dubos + valerato de sodio 0.1% (■ Fase logarítmica, ■ Fase estacionaria, ■ Persistencia 1 y ■ Persistencia no replicativa 2).

A fin de realizar un análisis complementario de las diferencias que existen en la expresión de los 17 genes cuantificados en las distintas condiciones estudiadas, se dividió el valor obtenido de la expresión normalizada de cada uno de los genes estudiados en presencia de propionato o valerato, entre la expresión genética normalizada del mismo gen en medio Dubos (sin ácido graso). El valor de 1 representa la expresión de cada gen en el medio Dubos control (sin ácido graso). A partir de los valores obtenidos se construyeron las gráficas de expresión relativa mostradas en las figuras 23, 24 y 25.

Como se observa en la figura 23, se demostró que los genes *dnaA* y *fstZ* tuvieron una mayor expresión en la fase logarítmica de crecimiento y en la latencia *in vitro* (NRP2) en presencia de propionato; durante esta última fase se detectaron 4.7 veces más transcritos para el gen *dnaA* que durante la misma en el medio Dubos. En contraste, los medios adicionados de valerato, presentaron un perfil de expresión genética diferente al obtenido en presencia de propionato.

En el caso de los genes *esxA* y *fbpB*, que codifican para la proteína ESAT-6 y el antígeno 85 (ag85B) respectivamente, se encontró una mayor expresión de ambos genes en la fase NRP2 en presencia de propionato; durante esta fase se detectaron 98 y 52 veces más transcritos para *esxA* y *fbpB* respecto a la expresión en medio Dubos sin ácidos grasos a diferencia de la NRP1, donde se presenta una expresión inferior a la observada en el medio control. Además, para este grupo de genes encontramos una marcada disminución en la actividad transcripcional durante la fase NRP1 en todos los genes estudiados; esta actividad estuvo disminuida 11 veces para *dnaA*, 50 veces para *fstZ*, 33 veces para *esxA*, 5.5 veces para *fbpB* y 2.4 veces menos para *rpfB*, respecto a la encontrada en el medio sin ácidos grasos.

En cuanto a la expresión relativa de los genes *dnaA*, *fstZ* y *fbpB* en presencia de valerato se observó un perfil de expresión totalmente diferente al obtenido en cultivos con propionato (Figura 23). El perfil obtenido con valerato se caracterizó por presentar una menor sobreexpresión de los genes respecto a lo obtenido en el medio sin ácidos grasos en la mayoría de las condiciones estudiadas, excepto durante la NRP2, en donde se presentó una disminución en el número de transcritos.



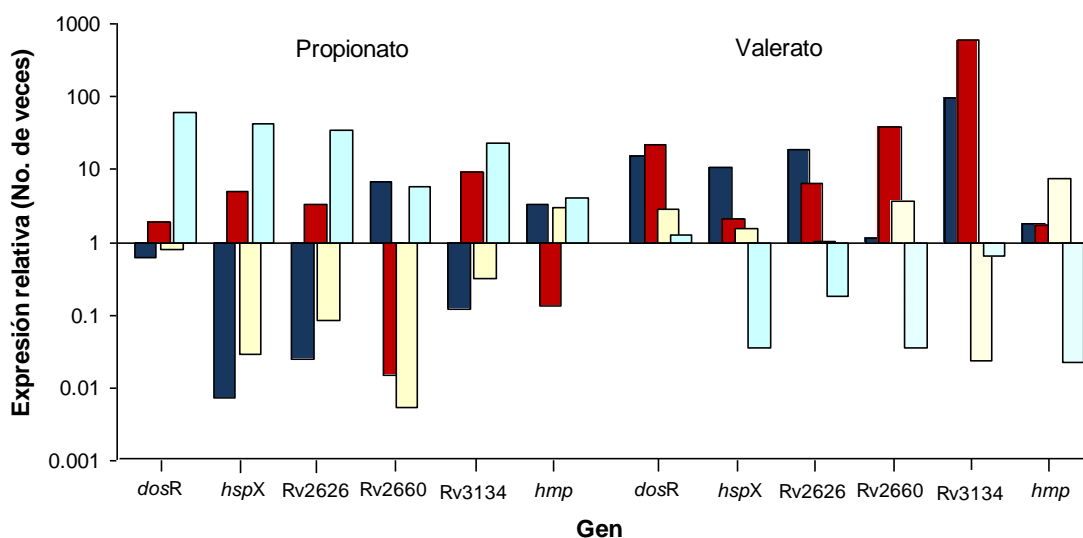
**Figura 23. Expresión relativa de los genes involucrados en el ciclo celular, en la producción de antígenos y en la reactivación en *M. tuberculosis* H37Rv.** En el eje de las ordenadas se muestra la relación de la expresión genética en presencia de propionato o valerato de sodio 0.1% respecto al medio Dubos (sin ácido graso). El valor de 1 representa la expresión de cada gen en el medio Dubos control (sin ácido graso). En el eje de las abscisas se muestran el gen estudiado en diversas condiciones (■ Fase logarítmica, ■ Fase estacionaria, ■ Persistencia no replicativa 1 y ■ Persistencia no replicativa 2).

Por otra parte, en la figura 24 se muestra la relación de la expresión genética relativa para los genes relacionados con la respuesta a la hipoxia y al estrés oxidativo. En el presente estudio encontramos una variabilidad alta de la expresión de *dosR* entre las condiciones estudiadas. En presencia de propionato observamos una mayor cantidad de transcritos durante la fase NRP2 de la latencia (61 veces más que en el medio sin ácidos grasos). En cambio en presencia de valerato de sodio la fase logarítmica y la fase estacionaria de crecimiento fueron las condiciones en donde prevaleció una mayor expresión de *dosR* (15 ó 21 veces más que en el medio sin ácidos grasos).

Respecto a los genes *hspX* y *Rv2626* se observó que en presencia de propionato se presentó un aumento significativo en el número de transcritos durante la fase estacionaria (5 veces) así como durante la fase de NRP2 (43 veces) respecto a la expresión sin ácidos grasos (Figura 24), a diferencia de la expresión observada en presencia de valerato en donde se presenta una disminución drástica en la expresión del gen *hspX* en la fase NRP2 (25 veces menos).



Es importante hacer notar que la expresión del gen Rv3134 de *M. tuberculosis* H37Rv cuando esta cepa fue cultivada en presencia de propionato fue semejante al encontrado entre *hspX*, Rv2626 e incluso *dosR*. En la figura 24 se observa un mayor número de transcritos de Rv3134 durante la fase NRP2 de la latencia seguido por la fase estacionaria (23 y 9 veces más respecto al medio sin ácidos grasos); sin embargo, en presencia de valerato de sodio, la fase donde se observó un mayor número es la fase estacionaria de crecimiento (602 veces más respecto al medio sin ácidos grasos). Por otra parte, se observó una drástica disminución en la expresión durante la NRP1.



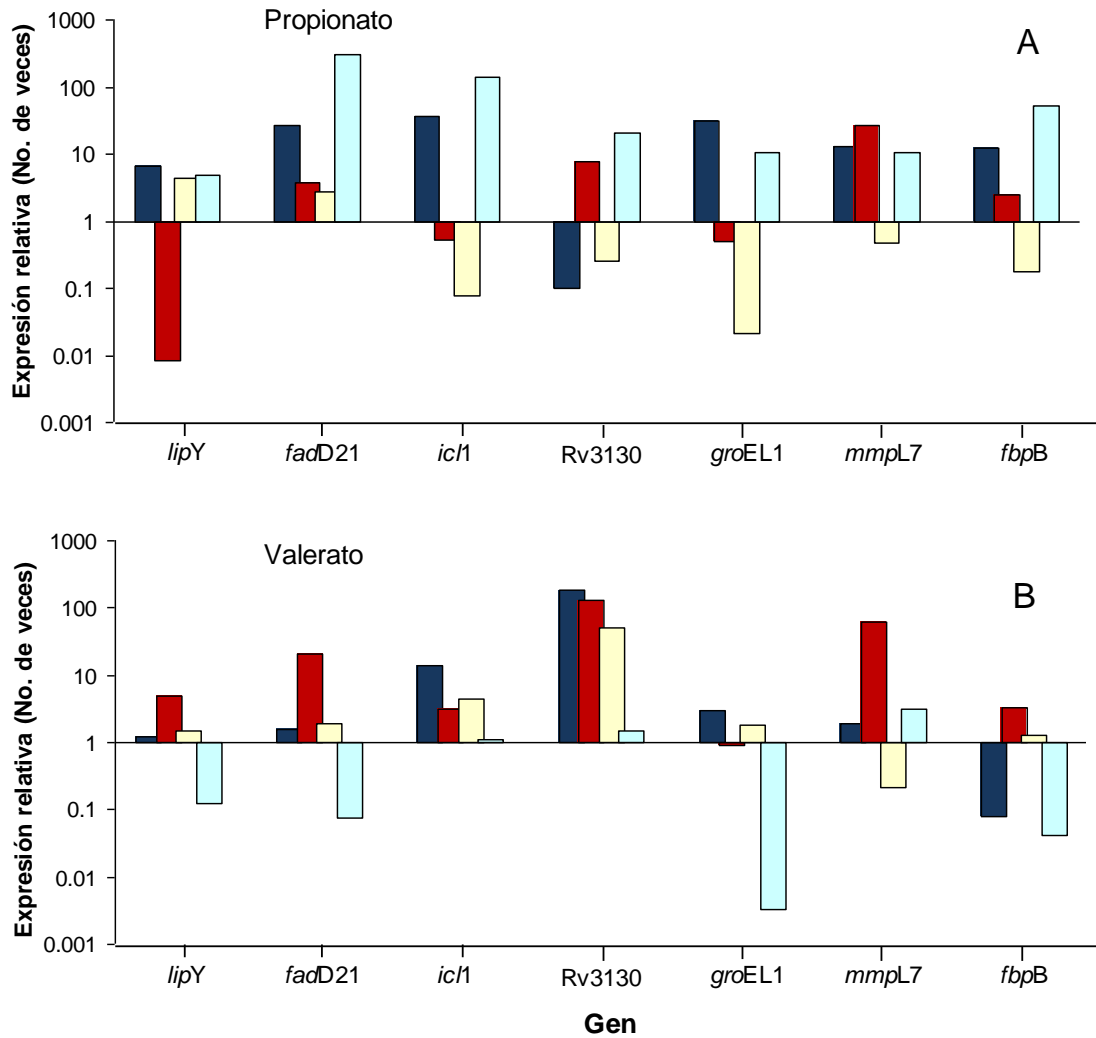
**Figura 24. Expresión relativa de los genes involucrados en hipoxia y en la respuesta oxidativa en *M. tuberculosis* H37Rv.** En el eje de las ordenadas se muestra la relación de la expresión genética en presencia de propionato o valerato de sodio 0.1% respecto al medio Dubos (sin ácido graso). El valor de 1 representa la expresión de cada gen en el medio Dubos control (sin ácido graso). En el eje de las abscisas se muestran el gen estudiado en diversas condiciones (■ Fase logarítmica, ■ Fase estacionaria, ■ Persistencia no replicativa 1 y ■ Persistencia no replicativa 2).

Otro de los resultados de la figura 24 fue que en los cultivos con propionato se presentó un nivel similar de expresión del gen *hmp* durante la latencia (3 y 4 veces menos respectivamente); sin embargo, en presencia de valerato de sodio se presentó una disminución significativa de la expresión de este gen en la fase de NRP2 (50 veces menos).

En la figura 25 se muestra la relación de la expresión genética relativa de los genes relacionados con el metabolismo de lípidos. En cuanto a los genes involucrados en el catabolismo de ácidos grasos (*lipY* y *fadD21*), se observó que en presencia de propionato de sodio su expresión permaneció elevada durante la fase logarítmica y la NRP2 (para *lipY*, 5 y 6 veces más que en medio sin ácidos grasos en tanto que para *fadD21* 78 y 307 veces más, respectivamente). En cambio, en presencia de valerato de sodio la mayor actividad transcripcional para estos genes se presentó durante la fase estacionaria (5 y 19 veces más respecto al medio sin ácidos grasos respectivamente). Respecto al gen *ic1*, observamos que en presencia de propionato se presentó una sobreexpresión para dicho gen durante la fase logarítmica y la fase NRP2, ya que encontramos 37 y 136 veces más transcritos, respectivamente. En tanto que en presencia de valerato (Figura 25A), se observó una sobreexpresión menor en todas las condiciones estudiadas (14, 3, 4 y 1 veces más, respectivamente en la fase logarítmica, estacionaria, NRP1 y NRP2).

En cuanto a la expresión de los genes *fbpB*, *mmpL7* y *groEL1*, los cuales participan en la biosíntesis de lípidos ó en el transporte de estos a través de la membrana (Kremer y col., 2002; Jain y col., 2007), se detectó un mayor número de transcritos en presencia de propionato de sodio en la fase NRP2 de la latencia con respecto al medio sin ácido graso. Para el gen *mmpL7* se detectó un incremento de 11 veces; en tanto que para el *groEL1* el incremento fue de 23 y para *fbpB* fue de 52 veces. Por otro lado, en presencia de valerato de sodio el cultivo muestra una disminución de la expresión de estos genes durante la latencia (NRP1 y NRP2) respecto al medio sin ácidos grasos (Figura 25B).

Finalmente, se observó un incremento significativo en la expresión del gen Rv3130 en presencia de propionato de sodio durante dos condiciones de estrés; la fase NRP2 y la fase estacionaria (20 y 7 veces) respecto a la fase logarítmica de crecimiento (Figura 25A). En tanto que en presencia de valerato de sodio el incremento en el número de transcritos se presentó en todas las condiciones probadas (185, 132, 51 y 1.5 veces, respectivamente, en la fase logarítmica, estacionaria, NRP1 y NRP2) con respecto al medio sin ácido graso (Figura 25B).



**Figura 25. Expresión relativa de los genes involucrados en el metabolismo de lípidos en *M. tuberculosis* H37Rv.** A) Relación propionato/ Dubos, B) Relación valerato/ Dubos. En el eje de las ordenadas se muestra la relación de la expresión genética en presencia de propionato o valerato de sodio 0.1% respecto al medio Dubos (sin ácido graso). El valor de 1 representa la expresión de cada gen en el medio Dubos control (sin ácido graso). En el eje de las abscisas se muestran el gen estudiado en diversas condiciones (■ Fase logarítmica, ■ Fase estacionaria, ■ Persistencia no replicativa 1 y ■ Persistencia no replicativa 2).

## 7. DISCUSIÓN

El siglo XX comenzó con un interés renovado por la Tb, a la luz de los nuevos descubrimientos que surgían en este siglo: se contaba con una terapia relativamente eficaz contra la Tb, se produjo la vacuna BCG y se sabía que el humano es el único nicho ecológico conocido de *M. tuberculosis*; de tal forma, que se llegó a pensar que la Tb podría ser controlada e incluso que sería erradicada para finales del siglo XX. Los constantes brotes de Tb en la tercera parte del siglo XX hicieron evidente que la Tb no sería erradicada. La investigación epidemiológica y biomédica reveló las dos causas más importantes de este hecho: 1) El surgimiento del SIDA, que ha hecho reemerger la Tb en el sector de la población VIH positiva; 2) La capacidad de *M. tuberculosis* para persistir en la población de manera latente. Este segundo factor es muy importante, dado que el control de la Tb no solo implica eliminar a la micobacteria de los individuos con Tb activa, sino eliminarla también de la tercera parte de la población mundial que actualmente se encuentra infectada de manera latente. Esta estrategia que en principio pareciera imposible, sería incluso inútil, en virtud de que las terapias farmacológicas actuales son ineficaces contra la forma latente de la Tb (Stewart y col., 2003; Lopez-Alvarez y col., 2010).

Por otra parte, la reemergencia de la Tb paralela al incremento de personas inmunocomprometidas resaltó el papel del sistema inmune en el establecimiento de un frágil balance entre la micobacteria y el sistema inmune, caracterizado por una respuesta inmune suficiente para controlar la infección pero insuficiente para eliminar a la micobacteria, por lo que resulta esencial conocer las características fisiológicas del estado de latencia de *M. tuberculosis*, a fin de encontrar sitios blancos para las nuevas terapias farmacológicas (Ulrichs y Kaufmann, 2006).

Entre los factores ambientales que prevalecen en el interior del granuloma y que han sido considerados inductores de transición entre el crecimiento activo y el estado de latencia incluyen la falta de nutrientes, los valores extremos de pH y la falta de oxígeno. Todos ellos ampliamente estudiados de forma particular (Wayne y Hayes 1996; Betts y col., 2002; Fisher y col., 2002) e incluso de manera simultánea en el modelo multiéstrés propuesto por Deb y colaboradores (2009). Sin embargo, la

capacidad de *M. tuberculosis* de persistir por largos periodos en el hospedero depende en gran parte de su capacidad para adquirir y utilizar nutrientes del granuloma. Algunos estudios previos sugieren que los ácidos grasos podrían jugar un papel fundamental durante la fase de latencia; sin embargo, la fuente y el tipo de ácidos grasos que pueden ser utilizados por *M. tuberculosis* durante esta fase no se encuentran bien establecidos (Muñoz-Elias y McKinney, 2006). Con respecto a lo anterior, se ha observado que las micobacterias presentan un cambio metabólico durante la infección *in vivo*; en los primeros 10 días de infección murina dichos microorganismos requieren de transportadores de azúcares para sobrevivir y posteriormente, requieren de enzimas involucradas en el ciclo del glioxilato (McKinney y col., 2000; Sasseti y Rubin, 2003). En relación a *icl*, que codifica para la isocitrato liasa, se ha observado su sobreexpresión en macrófagos cuando la fuente de carbono limitante es palmitato ó acetato (Schnappinger y col., 2003; Timm y col., 2003). Por otra parte, Gräbner y Meerbach encontraron que el surfactante pulmonar, característicamente rico en una compleja mezcla de ácidos grasos de cadena larga como el dipalmitoil fosfatidilcolina, era internalizado por macrófagos pulmonares y metabolizado a través del ciclo del glioxilato por las micobacterias (Gräbner y Meerbach, 1991). Finalmente, *M. tuberculosis* posee 20 genes que codifican para lipasas hipotéticas y 4 genes que codifican para las fosfolipasas C (*pci*ABCD) enzimas que posiblemente participan en la liberación de ácidos grasos de la membrana fagosomal, además, se ha comprobado que estos genes son esenciales para la virulencia en el modelo de ratón (Cole y col., 1998; URL2; Raynaud y col., 2002).

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la expresión genética de *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de propionato o valerato de sodio al 0.1% (ácidos grasos de 3 y 5 carbonos respectivamente, miscibles en agua), ya que hasta hoy se desconocen los mecanismos de transporte de los ácidos grasos de cadena larga a través de la envoltura de *M. tuberculosis*, además se consideró que éstos ácidos grasos podrían generarse a partir de la degradación de ácidos grasos de cadena larga (Niederweis, 2008). Por otra parte, se conocían estudios previos que reportaban que *M. tuberculosis* era capaz de crecer en presencia de estos compuestos (Muñoz-Elias y McKinney y col., 2005; Jain y col., 2007) a diferencia del efecto bacteriostático inducido por ácidos grasos de cadena larga (Youmans y Youmans, 1953).

Al comparar el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en los diferentes medios, comprobamos que dicha micobacteria es capaz de crecer en presencia de ácidos grasos de cadena corta al 0.1%, tanto en medios suplementados con ADC como AC es decir, en ausencia de glucosa. En las figuras 9 y 10, se observa que la adición de estos ácidos grasos al medio no afecta el patrón de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv bajo las condiciones estudiadas ya que los tiempos en los que se establece la fase logarítmica y estacionaria de crecimiento son semejantes a los observados en el medio sin ácidos grasos. Esto a diferencia del efecto tóxico descrito para el propionil-CoA que en *Rodopseudomonas sphaeroides*, *Aspergillus nidulans* y *Penicillium viridicatum* actúa como inhibidor de la piruvato deshidrogenasa (Brock y Buckel, 2004). En la figura 10 sin embargo, se observó una disminución en el número de UFC/mL a partir del día 20, esta disminución fue más marcada en presencia de ácido grasos de cadena corta. Este comportamiento pudiera ser derivado de la dificultad de disgregar acumulados de micobacterias en la fase estacionaria; que a su vez, podrían ser el reflejo de un aumento de lípidos de envoltura celular en presencia de ácidos grasos de cadena corta que incrementaron las interacciones hidrofóbicas.

Por otra parte, durante el establecimiento del modelo de latencia *in vitro* de *M. tuberculosis* H37Rv en presencia de estos ácidos grasos observamos que su adición no tuvo un efecto en la cantidad de tiempo en que se logró la hipoxia ya que ésta fase se presentó al quinto día de incubación tanto en el medio Dubos sin ácidos grasos como en los medios adicionados de propionato ó valerato. En contraste, sí tuvo un efecto significativo en el tiempo en que se presentó la fase de anaerobiosis (NRP2) en los distintos modelos de latencia (día 6, día 18 y día 15, respectivamente para medio Dubos sin ácidos grasos, medio con propionato y medio con valerato) (Tabla 7).

Una vez estandarizado el modelo de latencia *in vitro* en presencia de ácidos grasos procedimos a determinar el efecto de la hipoxia y de la anaerobiosis sobre la viabilidad de *M. tuberculosis* H37Rv. El comportamiento obtenido resultado de graficar el número de UFC/mL en medio Dubos en las diferentes condiciones estudiadas (Figura 16) muestra una disminución en el número de UFC/ml de la fase logarítmica a la estacionaria de  $2.55 \times 10^7$  UFC/mL a  $2.50 \times 10^6$  UFC/ml, esta disminución pudiera ser el reflejo de un agotamiento de los nutrientes en el medio, acumulación de detritos

celulares ó de compuestos derivados del metabolismo propio de la micobacteria ó a la disminución del espacio, entre otros factores característicos de la fase estacionaria (Madigan y col., 2004).

Por otra parte, durante la latencia (con y sin ácido graso) observamos que tanto en la fase NRP1 como en la NRP2 las UFC/mL se mantuvieron semejantes respecto a la fase logarítmica de crecimiento, este comportamiento esta muy acorde con el modelo de Wayne y Hayes (1996). Cabe recordar que en este modelo después de transferir el paquete celular de un cultivo en fase logarítmica a condiciones hipóxicas, la micobacteria continua dividiéndose pero a una menor velocidad hasta reducirse a niveles no perceptibles durante la fase NRP2 (Figura 16). Es decir, la hipoxia induce un efecto bacteriostático sobre las micobacterias (Wayne y Hayes, 1996).

### **7.1 Genes normalizadores para la RT-PCR en tiempo real**

En el campo de las micobacterias se han estudiado varios normalizadores, entre ellos:

- 1) El gen *aroB* que codifica para la enzima 3-dihidrocinato sintasa, esencial en la vía de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos; sin embargo, se ha demostrado su alta variabilidad durante la hipoxia de *M. tuberculosis* H37Rv (Desjardin y col., 2001).
- 2) El gen *rrs* que codifica para el rRNA 16S. Se ha demostrado la homogeneidad en su expresión tanto en cultivos *in vitro* como *in vivo*, empleando *M. tuberculosis* H37Rv como cepa experimental. Sin embargo, no se ha comprobado su eficacia en el modelo Wayne (Timm y col., 2003; Desjardin y col., 2001).
- 3) La región del promotor P1 del rRNA 16S). La homogeneidad de su expresión bajo diferentes medios y puntos de la curva de crecimiento sólo ha sido comprobada en micobacterias de crecimiento rápido (Menéndez y col., 2005). Su utilidad durante la hipoxia de micobacterias del MTC no ha sido investigada.
- 4) *sigA*, codifica para la subunidad  $\delta^A$  de la RNA polimerasa que es responsable de la transcripción de la mayoría de los genes esenciales de *M. tuberculosis*. Debido a esto, se pensó que sería un buen gen normalizador y actualmente es muy usado tanto en cultivos *in vitro* como *in vivo* (Timm y col., 2003; Schnappinger y col., 2003). A pesar de la estabilidad en su expresión en diversas condiciones, está demostrado que la hipoxia, el crecimiento en fase estacionaria y la falta de nutrientes en *M. tuberculosis* H37Rv afectan fuertemente su expresión (Manganelli y col., 1999).

Nuestros resultados respecto al estudio de dos posibles normalizadores indican que 16S fue el gen que más se expresó tanto en cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv en medio Dubos como en el medio Dubos adicionado de propionato ó valerato de sodio ( $4.91 \times 10^{10}$  copias/ $\mu\text{g}$  de RNA) (Figura 19A); además, la expresión de dicho gen fue similar en la fase logarítmica, fase estacionaria y la latencia *in vitro* tanto en medio Dubos como medio adicionado de ácidos grasos de cadena corta ya que no existió diferencia estadísticamente significativa en la expresión de dicho gen en las condiciones antes descritas (Figura 19A).

En las condiciones estudiadas la expresión del promotor P1 del rRNA no fue similar durante la fase logarítmica, estacionaria y la latencia *in vitro* para un mismo medio de cultivo, ni entre los medios adicionados de ácidos grasos de cadena corta. De manera complementaria, el análisis estadístico confirmó que estas diferencias sí fueron significativas (Figura 19B). Por lo tanto, en las gráficas subsecuentes, la expresión genética se reportó en forma normalizada con el gen 16S; es decir el valor final de transcritos es el resultado de dividir el número de copias del gen de estudio por  $\mu\text{g}$  de RNA total entre el número de copias del gen 16S por  $\mu\text{g}$  de RNA total.

## **7.2 Genes asociados al ciclo celular, a la reactivación y a la secreción de antígenos inmunodominantes**

Se ha observado que cuando *M. tuberculosis* se cultiva en condiciones de estrés como la hipoxia ó la falta de nutrientes así como en biopsias de cadáveres, la micobacteria experimenta algunos cambios morfológicos, como un aumento del volumen celular, engrosamiento de la pared celular ó duplicación de cromosoma, que en conjunto podrían indicar que la micobacteria detiene su crecimiento justo antes de llegar a la división celular (Wayne y Hayes, 1996; Voskuil, 2004; Voskuil y col. 2004; Hett y Rubin, 2008); es decir, que la latencia es aparentemente un estado de ausencia de la multiplicación bacteriana. Varios estudios sugieren que este fenómeno, lejos de ser un reflejo de una disminución del metabolismo celular general, es en realidad el resultado de una serie de cambios morfológicos y metabólicos que favorecen la permanencia de la micobacteria en el hospedero de manera latente, permitiéndole



esperar a que las condiciones dentro del hospedero le sean favorables para reactivar su crecimiento y generar una infección progresiva (Kell y col., 1985; Muñoz-Elias y col., 2005; Hett y Rubin, 2008).

En el presente estudio se determinó la expresión de *dnaA*, debido a que es el principal indicador y regulador de la replicación del genoma bacteriano (Qin y col., 1999), ya que DnaA funciona como el regulador transcripcional de sí mismo y de un gran número de genes, tales como *ftsY* y *ftsQ*, en los que el análisis de sus posibles zonas promotoras ha revelado la presencia de secuencias muy similares a TTCA/GGCACA, secuencia consenso de unión a DnaA (Cole y col., 1998). También se estudió la expresión de *ftsZ*, que codifica para la proteína formadora de septo que interviene en la etapa final de la división celular es decir que participa después de que ha ocurrido la replicación, condensación y reparto del cromosoma (Hett y Rubin, 2008). Los resultados del presente estudio demostraron que durante la latencia *in vitro* la micobacteria posee actividad transcripcional relacionada con el ciclo celular, aunque el nivel de expresión es menor al obtenido durante la fase logarítmica, tanto en medio Dubos sin ácidos grasos como en aquel que sí los contiene (Figura 20).

Como se observa en la figura 23, los genes *dnaA* y *ftsZ* presentaron una mayor expresión en la fase logarítmica de crecimiento y en la latencia *in vitro* (NRP2), incluso *dnaA* presentó 4.7 veces más transcritos durante la fase NRP2 en el medio adicionado de propionato respecto al medio Dubos. El nivel de expresión de *dnaA* durante la fase NRP2 indica que durante la latencia; la división celular se detiene después de que ha ocurrido la duplicación del cromosoma; lo que sugiere que la micobacteria podría estar preparada para reactivar su crecimiento de forma rápida cuando las condiciones dentro del hospedero le sean favorables. El aumento en el número de transcritos para *dnaA* y *ftsZ* no se ve reflejado en un incremento en el número de UFC durante esta fase; lo que podría sugerir que en esta fase podría estar ocurriendo la muerte de algunas micobacterias y simultáneamente otras podrían estar dividiéndose, lo que explicaría un nivel constante de la población micobacteriana en estas condiciones. Otra hipótesis que podría explicar este comportamiento es la relacionada con el surgimiento de una población latente no cultivable que permanece en el pulmón pero que por técnicas microbiológicas convencionales no puede ser

determinada (Muñoz-Elias y col., 2005). Además, encontramos una marcada disminución en la actividad transcripcional durante la fase NRP1 para estos genes; esta actividad presentó una disminución 11 veces menos para *dnaA*, y 50 veces menos para *ftsZ* respecto a la encontrada en el medio sin ácidos grasos en esta misma fase.

En cuanto a la expresión relativa de los genes *dnaA* y *ftsZ* en presencia de valerato de sodio se observó un perfil de expresión totalmente diferente al obtenido en cultivos crecidos en propionato de sodio (Figura 23). Este perfil se caracterizó por presentar una actividad transcripcional semejante a la observada en medio Dubos sin ácidos grasos en la mayoría de las condiciones estudiadas, excepto durante la NRP2, en donde se presentó una disminución en el número de transcritos respecto al medio Dubos.

Respecto al gen *rpfB*, que codifica para un posible factor promotor de la reactivación, detectamos un mayor número de transcritos durante la fase logarítmica de crecimiento, respecto al número de transcritos detectado en las fases relacionadas con estrés, tanto en medio sin ácidos grasos como en medio adicionado de ellos (Figura 20). Este comportamiento puede estar ligado a la posible actividad del factor promotor de la reactivación B, que participa en la degradación de la pared celular en forma semejante a la lisozima, la cual rompe las uniones glicosídicas 1,4 entre la glucosamina y el ácido acetilmurámico de la peptidoglicana (Hett y col., 2007; Hett y col., 2008); por lo tanto, resulta lógico detectar una mayor actividad transcripcional para este gen durante la fase logarítmica y una disminución durante la fase estacionaria y la latencia *in vitro*. Como se mencionó previamente, durante la hipoxia se han observado cambios a nivel de la envoltura celular, como la pérdida de la capacidad de teñirse por la técnica de Ziehl-Neelsen (Muñoz-Eliás y col., 2005) un engrosamiento de la envoltura celular; sin embargo, estos cambios no han sido del todo caracterizados en *M. tuberculosis* (Wayne y Hayes. 1996). En contraste, se sabe que cuando *E. coli* entra en un estado persistencia no replicativa modifica rápidamente su peptidoglicana, incrementando el número de entrecruzamientos con el ácido diaminopimélico (Tuomanen y Cozens., 1987). Algo similar se ha observado en esta misma fase en *Enterococcus faecalis*, donde adicionalmente se ha observado

una mayor resistencia a la ruptura mecánica y enzimática respecto a la mostrada durante la fase logarítmica y estacionaria (Signoretto y col., 2000). De tal forma que RpfB tendría un papel fundamental durante la reactivación del crecimiento ya sea originado por una inmunosupresión ó por la presencia de oxígeno ó nutrientes en el ambiente.

Los genes *esxA* y *fbpB* codifican para las proteínas secretadas ESAT-6 y el antígeno 85B, respectivamente. La proteína ESAT-6 es el antígeno principal para linfocitos T, induce la producción de  $INF\gamma$  durante la primera fase de la respuesta inmune y contribuye a desarrollar la respuesta inmune antituberculosis (Berthet y col., 1998), en tanto que el antígeno 85B es una proteína de unión a fibronectina, que forma parte del mecanismo de patogenicidad de la micobacteria y que además posee actividad de micolil transferasa (Renshaw y col., 2005). Se ha reportado que ambas proteínas forman un complejo (relación 1:1) que se une a la superficie de la célula hospedera. Esta relación sólo se conservó durante nuestro estudio cuando *M. tuberculosis* fue cultivada en presencia de propionato de sodio (Figura 20B); además, detectamos que el mayor número de transcritos se presentó durante la fase logarítmica de crecimiento ya que estos antígenos se secretan en mayor cantidad durante las fases tempranas de la infección; posteriormente encontramos una reducción en su expresión 6.3 veces menos para la fase estacionaria; 38 y 169 veces para la fase NRP1 y NRP2 respectivamente (Fig 20B). Recientemente se ha sugerido que contrario a lo que se pensaba, la expresión de este par de genes durante la fase temprana de la infección podría beneficiar más a la micobacteria que al hospedero, ya que al ser altamente inmunogénicas reclutas a un gran número de linfocitos, y estos, a su vez, a otros, de tal forma que es un mecanismo de expansión de la infección utilizada por la micobacteria (Bold y Ernst, 2009). De tal forma que la presencia de propionato parece contribuir a la patogénesis y a mantener la expresión de dicha proteína durante la fase NRP2 ya que se detectaron 100 veces más transcritos del gen *esxA* respecto al medio sin ácidos grasos. El efecto fisiológico de esta proteína durante la latencia aún no se encuentra bien establecido. (Figura 23).

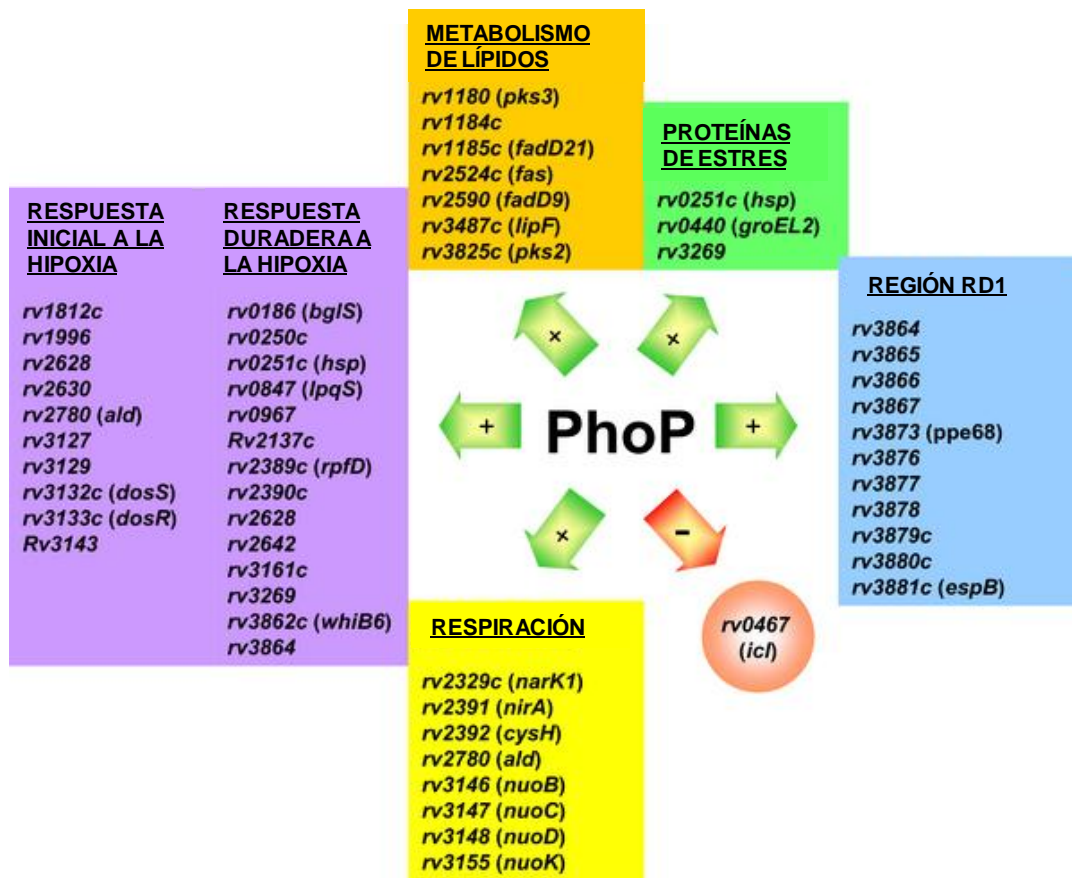
### 7.3 Genes asociados a la hipoxia y a la respuesta oxidativa

Se sabe que la baja concentración de oxígeno es un fuerte inductor de la latencia *in vitro* y muy seguramente *in vivo*; Boon y col., (2001), así como Boon y Dick., (2002), demostraron que una de las proteínas sobreexpresadas bajo estas condiciones correspondía con la descripción de un regulador transcripcional. Posteriormente, Sherman y col., (2001) demostraron que, en efecto, este sistema regula una gran cantidad de genes y se nombró “*dos*” (Dormancy survival). Hasta el 2008 se sabía que el sistema de transcripción de dos componentes *dosR/S*, era el principal mediador de la respuesta a la hipoxia en *M. tuberculosis* (Rustad y col., 2009). Este locus (*dosR/S*) refleja el sistema clásico de dos componentes formado de una proteína sensora, histidín fosfocinasa, y una reguladora de la respuesta. Este regulón controla la sobreexpresión de 52 genes y la represión de 19 (Kendall y col., 2004). Es importante mencionar que *dosR* regula la expresión genética mediante su dominio de unión a la secuencia consenso 5'TTSGGGACTWWAGTCCCSAA3' (S=C/G; W=A/T) presente en una ó varias copias en la región promotora de los genes que componen dicho regulón (Park y col., 2003). Sin embargo, algunos investigadores han atribuido también a este gen un papel no relacionado a la latencia. Por ejemplo, este sistema se expresa también en presencia de etanol, peróxido de hidrógeno y S-nitrosoglutatión (Kendall y col., 2004); así mismo, se ha demostrado su expresión después de infectar macrófagos, ratones y cobayos; en estas condiciones característicamente se ha encontrado replicación bacteriana significativa (Schappinger y col., 2003; Shi y col., 2003). Además, *dosR* se ha encontrado sobreexpresado constitutivamente en *M. tuberculosis* Beijing, que característicamente presenta acumulación de triacilglicéridos (Reed y col., 2007). Lo anterior sugiere que el papel de DosR podría no estar relacionado exclusivamente con la latencia en *M. tuberculosis*.

Rustad y colaboradores (2009), proponen en base a los patrones transcripcionales obtenidos de una cepa deficiente en *dosR*, expuesta a dos modelos de hipoxia (incluido el modelo de Wayne), que la latencia puede estar originada por una respuesta transcripcional mucho más grande que el sistema de dos componentes *dosR/S* y que se mantiene durante un periodo prolongado. Gonzalo-Asencio y colaboradores (2008), demostraron que después de una respuesta inicial a la hipoxia

(relacionada a con la actividad del regulón *dosR*), *M. tuberculosis* establece una respuesta duradera regulada por el regulón PhoP. Esto sugiere que PhoP podría ser el enlace entre la respuesta inicial y la duradera a la hipoxia en *M. tuberculosis*.

La figura 26 muestra algunos de los genes regulados por PhoP, entre los cuales se incluye algunos genes relacionados con la respuesta inicial y duradera a la hipoxia, genes involucrados en la respiración, genes codificados dentro de la región de diferenciación 1 (RD1), y los genes relacionados con el metabolismo de lípidos y proteínas de estrés.



**Figura 26. El regulón PhoP en *M. tuberculosis*.** Genes regulados por PhoP, tanto los regulados en forma positiva  $\uparrow$  como en forma negativa  $\downarrow$ , entre los cuales se incluye algunos genes relacionados con la respuesta inicial y duradera a la hipoxia, genes involucrados en la respiración, genes codificados dentro de la región de diferenciación 1 (RD1), y los genes relacionados con el metabolismo de lípidos y proteínas de estrés (Modificada de Gonzalo-Asencio y col., 2008).

En el presente estudio se encontró una alta variabilidad de la expresión de *dosR* entre las condiciones estudiadas (Figura 21). En el caso particular de los cultivos en medio Dubos sin ácidos grasos, se observó una mayor cantidad de transcritos durante la fase logarítmica de crecimiento; en cambio, se observó una marcada disminución de la cantidad de transcritos durante la fase NRP1 y NRP2 (Figura 21A).

En las figuras 21A y 24 se observaron patrones de expresión similares entre los genes *hspX*, Rv2626 y Rv3134, ya que se ha encontrado que la expresión de *dosR* (Rv3133) regula la expresión de *hspX* (que codifica para la proteína  $\alpha$ -cristalina) y la de los genes Rv2626 y Rv3134 (relacionados con la latencia) (Bagchi y col., 2005). Los tres genes presentaron una disminución en su expresión durante condiciones de estrés para el cultivo como son la fase estacionaria y la latencia (NRP1 y NRP2) respecto a la fase logarítmica.

En el presente trabajo el gen Rv2660 (Figura 21A) mostró un aumento en el número de transcritos durante la fase estacionaria y la fase NRP2 (100 y 18 veces mayor respectivamente, respecto a la fase logarítmica). Este gen codifica para una proteína hipotética asociada a la entrada de los cultivos en la fase estacionaria e hipoxia; sin embargo, se han detectado niveles muy bajos de su expresión durante la fase logarítmica de crecimiento (Boon y col., 2001; Voskuil, 2004).

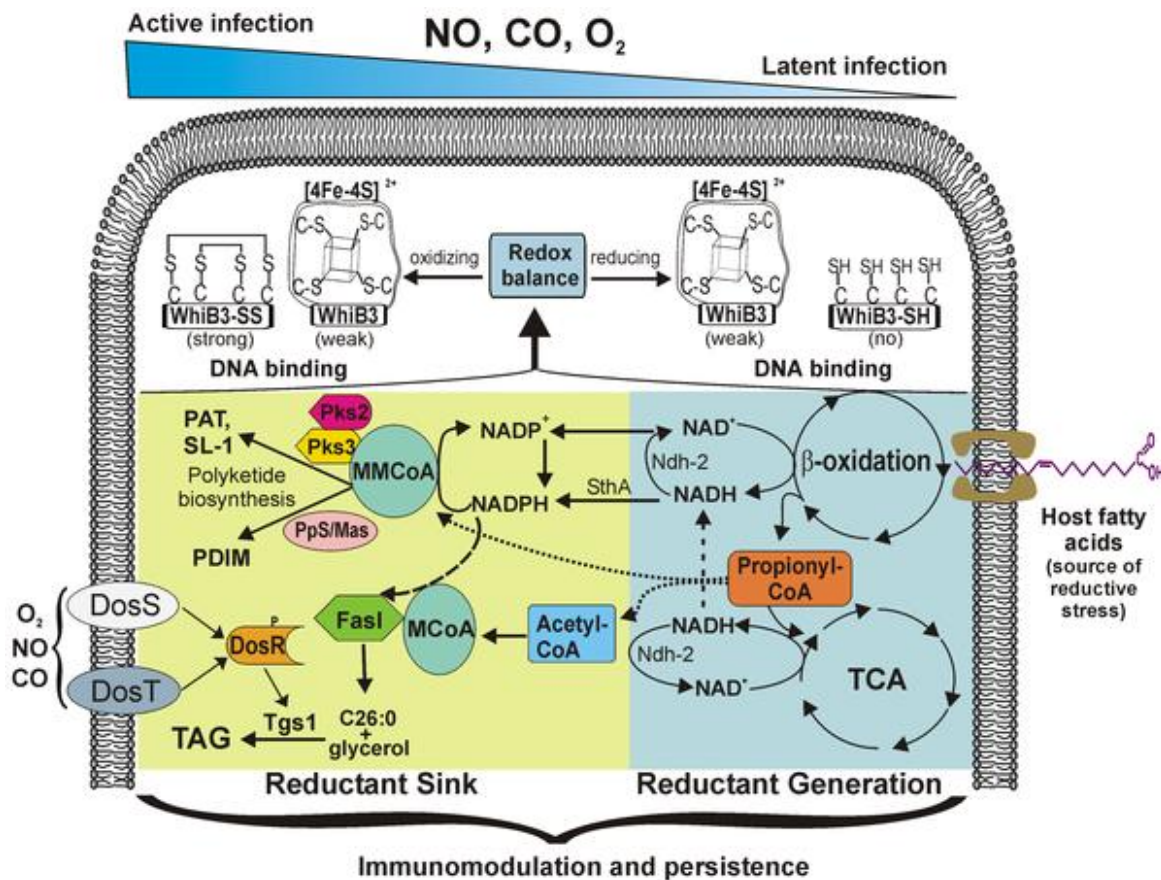
En cuanto al gen *hmp*, que codifica una proteína homóloga a la flavohemoglobina descrita en *E. coli*, la cual se ha involucrado en el metabolismo anaeróbico y en la protección contra el estrés oxidativo (Hu y col., 1999), el mayor nivel de expresión en los cultivos en medio Dubos se observó durante la fase estacionaria de crecimiento (Figura 21A). En presencia de propionato el menor nivel de expresión de dicho gen se presentó en la fase estacionaria y en la fase NRP2, donde se presentó un incremento en la expresión de los genes involucrados en biosíntesis de lípidos de membrana, por lo que quizá podría haber una posibilidad de este incremento en la biosíntesis proteja a la micobacteria de estrés oxidativo y por ello no hubiera la necesidad de transcribir a *hmp* durante estas dos fases de estrés.

En la figura 24, se compara la expresión relativa de los genes involucrados en hipoxia en el modelo de Wayne en presencia de propionato o valerato de sodio en relación a Dubos sin ácidos grasos, se observa que el tipo de ácido graso adicionado al sistema de Wayne tiene un efecto directo sobre el patrón de expresión. En presencia de propionato se induce una sobreexpresión para este grupo de genes durante la fase estacionaria y durante la fase NRP2. Sólo por mencionar algunos datos para estas 2 fases, para *dosR* se observaron 2 y 61 veces más transcritos *dosR* respectivamente; en tanto que para *hspX* se expresaron 5 y 42 veces más transcritos respectivamente y para Rv3134 9 y 22.3 veces más transcritos respectivamente, comparados con los niveles de expresión obtenidos en medio Dubos sin ácidos grasos. La adición de valerato ocasiona una represión de la expresión de estos genes respecto a la obtenida en el medio control.

Esta diferencia en comportamiento podría sugerir que el tipo de ácido graso, y consecuentemente la ruta metabólica relacionada con su utilización tienen un impacto en la división celular, y en la biosíntesis de lípidos tanto de reserva como de envoltura celular (Figuras 23 y 25). Incluso nos permite sugerir que además del papel estructural de los lípidos en la pared micobacteriana, la abundancia y diversidad estos podrían formar parte de un mecanismo de protección contra la hipoxia, la anaerobiosis y el estrés oxidativo-nitrosoxidativo y por lo tanto favorecer el establecimiento de la latencia. Singh y colaboradores (2009), proponen un complejo mecanismo que integra el estado de óxido reducción en las diferentes fases de desarrollo de la Tb con el metabolismo de lípidos. En este mecanismo la proteína reguladora WhiB3 modula el anabolismo de lípidos de membrana, como la poliaciltrealosa (PAT), los sulfolípidos (SL), el fitiocerol dimicocerosato (PDIM) o los lípidos de reserva como los triglicéridos (TAG) con la finalidad de neutralizar el estrés reductivo generado del catabolismo de lípidos del hospedero durante la infección o generados durante la hipoxia. En este mecanismo destacan las diferentes rutas de asimilación de propionil-CoA o metilmalonil-CoA (Figura 27).

## 7.4 Genes asociados al metabolismo de lípidos

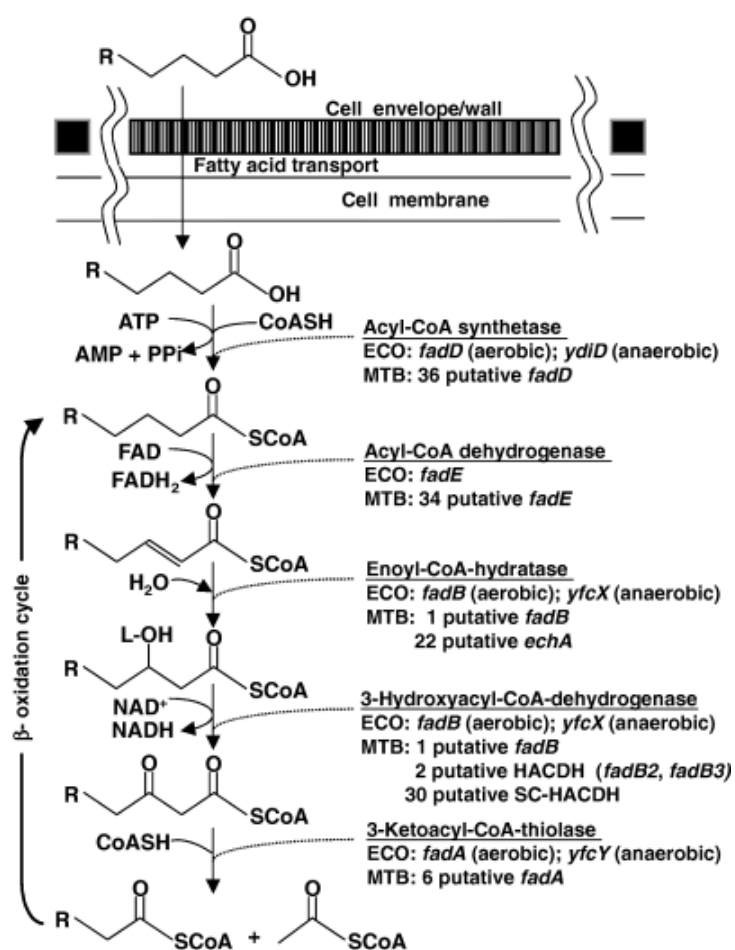
A fin de tratar de relacionar la forma en que el propionato o el valerato pueden afectar la fisiología de la micobacteria y consecuentemente afectar la expresión de los genes estudiados, se mencionarán algunos aspectos básicos de las posibles rutas bioquímicas utilizadas para metabolizar dichos ácidos grasos. Primero, ambos compuestos grasos tendrían que ser internalizados a la micobacteria, ya sea a través de proteínas específicas de transporte para ácidos grasos o mediante difusión simple a través de la membrana (Figura 28; Nikaido, 2003; Trivedi y col., 2004).



**Figura 27. Modelo de disipación del estrés reductivo durante la persistencia de *M. tuberculosis*.** En este mecanismo la proteína reguladora WhiB3 modula el anabolismo de lípidos de membrana como poliáciltrealosa (PAT), sulfolípidos (SL), fitocerosano dimicocerosato (PDIM) o lípidos de reserva como los triglicéridos (TAG) con la finalidad de neutralizar el estrés reductivo generado del catabolismo de lípidos del hospedero durante la infección o generados durante la hipoxia. En este mecanismo destacan las diferentes rutas de asimilación de propionil-CoA o metilmalonil-CoA (Tomado de Singh y col., 2009).

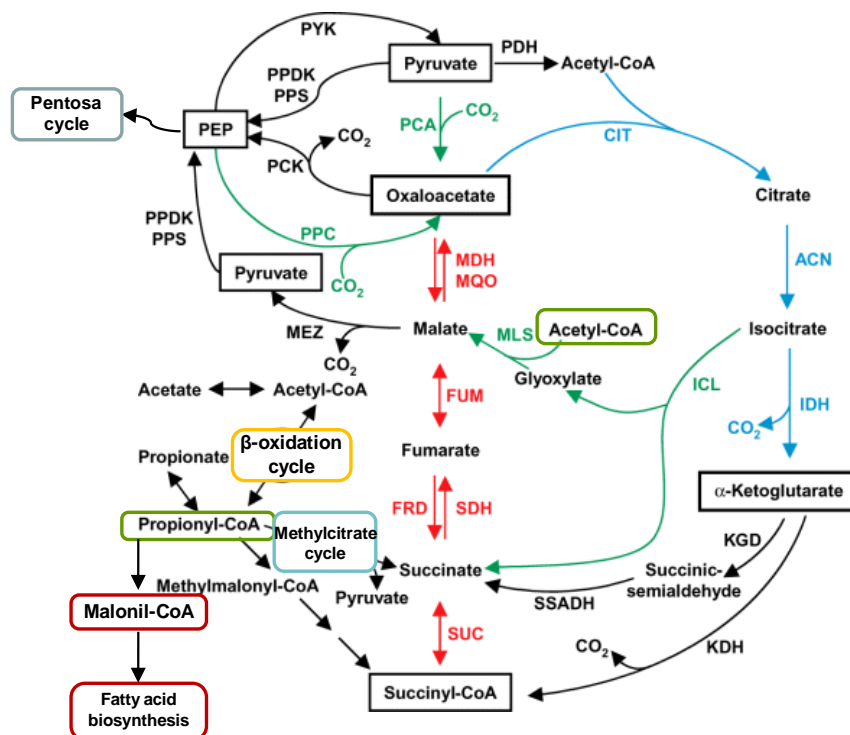


En segundo lugar, una vez en el citoplasma el valerato entraría al ciclo de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Figura 28), de tal forma que al final de un ciclo de  $\beta$  oxidación el valerato se habría degradado a acetil-CoA y a propionil-CoA. Bajo condiciones favorables para el crecimiento de la micobacteria, el acetil-CoA podría oxidarse a través del ciclo de Krebs; sin embargo, en condiciones de estrés como la hipoxia este compuesto entra a una ruta anaplerótica de obtención de energía conocida como ciclo del glioxilato (Muñoz-Elías y McKinney, 2006)



**Figura 28. Esquema de la  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos en micobacterias.** Se señalan algunos genes homólogos a los involucrados en  $\beta$ -oxidación en bacterias, hongos y mamíferos. Genes encontrados en *E. coli* (ECO) y genes relacionados en *M. tuberculosis* (MTB); (Tomado de: Muñoz-Elías y McKinney, 2006).

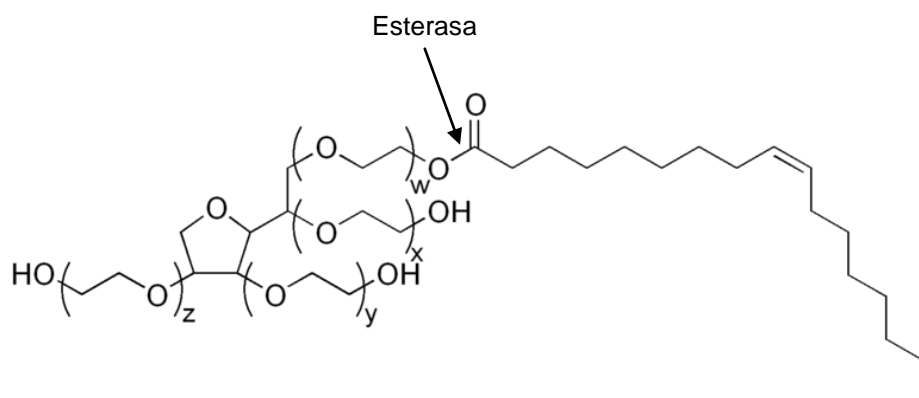
En el ciclo del glioxilato, la acetil-CoA se condensa con el oxalacetato para producir citrato, el cual reacciona con la aconitasa para dar isocitrato. La siguiente reacción es el punto en el que divergen el ciclo de Krebs y el glioxilato, la reacción es catalizada por la isocitrato liasa (*icl*), que fragmenta el isocitrato en glioxilato y succinato (Figura 29). Posteriormente, el glioxilato acepta un acetato de otra acetil-CoA, en una reacción catalizada por la malato sintasa (*glcB*). El malato se deshidrogena para regenerar al oxalacetato, que es convertido a fosfoenolpiruvato en una reacción catalizada por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (*pckA*), iniciando así la gluconeogénesis. En las etapas posteriores, el fosfoenolpiruvato es transformado a glucosa por las enzimas que intervienen en la glicólisis. A partir de aquí y mediante el ciclo de las pentosas se sintetizan arabinogalactanas, arabinomananas, trealosa, glicolípidos, etc. Por otra parte el acetil-CoA y el propionil-CoA, también participaría en la biosíntesis de lípidos de membrana como el ácido micólico y los sulfolípidos, entre otras moléculas lipofílicas (Muñoz-Elías y McKinney, 2006).



**Figura 29. Rutas metabólicas relacionadas con la utilización de acetil-CoA y de propionil-CoA en *M. tuberculosis*.** En presenta algunas rutas para los productos obtenidos de la degradación de un lípido vía  $\beta$  oxidación, como es el ciclo del glioxilato (ruta señalada por flechas de color verde), la vía del metilcitrato y la de metilmalonil-CoA. Además se señala otra ruta que podría seguir el propionato en la biosíntesis de lípidos (Tomado de Muñoz-Elías y McKinney, 2006).

Por otra parte, en *M. tuberculosis* se conocen 2 rutas hipotéticas para metabolizar propionato ó propionil-CoA; la vía metilmalonil-CoA y la vía metilcitrato. Sin embargo, experimentalmente se ha visto que en presencia de propionato, *M. tuberculosis* utiliza preferentemente la vía metilcitrato (Muñoz-Elías y col., 2006). Esta ruta involucra la ruptura de metilisocitrato a succinato y piruvato en una reacción catalizada por metilisocitrato liasa (Figura 29), contradictoriamente no se ha encontrado ningún homólogo al gen que codifica para esta enzima en *M. tuberculosis*. Muñoz-Elías y McKinney (2005), proponen que posiblemente *icl1* o *aceA* podría utilizar como sustrato tanto al isocitrato como al metilisocitrato.

En relación a los resultados del presente trabajo, en la figura 22A observamos que la mayor cantidad de transcritos para el gen *lipY*, que codifica para una triacilglicerol-esterasa, se presenta durante la fase estacionaria de crecimiento en medio Dubos sin ácidos grasos; esta actividad es 17 veces mayor a la actividad presentada durante la fase logarítmica de crecimiento en estas mismas condiciones (Singh y col., 2010). Esta actividad sólo puede explicarse a partir de la utilización de algún lípido propio de la micobacteria, ya que durante la fase estacionaria de crecimiento pudiera darse la muerte de algunas micobacterias debido a la falta de nutrientes o a la acidificación del medio o bien a la utilización de polisorbato 80 (Tween 80; figura 30) que forma parte del medio Dubos base.



**Figura 30. Estructura del polisorbato 80.** Dentro de la estructura del polisorbato 80 se observa el sitio de corte de una lipasa, la cual generaría la liberación de ácido oleico.

En cuanto a la expresión del gen *fadD21*, contrario a lo que se esperaba, se encontró un mayor número de transcritos en medio adicionado de propionato en todas las condiciones estudiadas. Sólo por mencionar un resultado, durante la fase NRP2 se encontraron 307 veces más transcritos que durante esta misma fase en el medio Dubos sin ácidos grasos. Puesto que el propionato es un ácido graso pequeño que no necesitaría entrar al ciclo de  $\beta$ - oxidación, el elevado nivel de expresión podría estar relacionado a la utilización de algún lípido propio de la micobacteria o bien a la utilización de polisorbato 80 (Tween 80; figura 30) que forma parte del medio Dubos base. Otra posibilidad es que el gen que codifica para esta enzima participara tanto en la degradación de lípidos como en su biosíntesis. En cambio, en presencia de valerato la mayor actividad transcripcional se presentó durante la fase estacionaria (20 veces más respecto al medio sin ácidos grasos).

Respecto al efecto de la adición al medio de propionato o valerato de sodio sobre la expresión de *ic1*, se observó que dichos ácidos grasos inducen una sobreexpresión del gen *ic1*, en las diferentes condiciones estudiadas, esta actividad es más evidente en el medio adicionado de propionato de sodio durante la fase logarítmica y NRP2 respecto a la expresión encontrada en el medio control ya que encontramos 36 y 137 veces más transcritos. La sobreexpresión de *ic1* durante la fase la fase NRP2 en presencia de propionato es indicativo del papel que juega dicho lípido en la sobrevivencia de la micobacteria bajo las condiciones ambientales mencionadas.

Dentro de los resultados obtenidos en los genes relacionados con el anabolismo de lípidos, podemos dividir su análisis en dos partes. La primera se refiere a la expresión del gen Rv3130, involucrado en la biosíntesis de lípidos de reserva, cuyo producto tiene actividad específica de triacilglicerol sintasa inducible durante la latencia debida a hipoxia (Daniel y col., 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un incremento en el número de transcritos en medios adicionados de propionato durante dos condiciones de estrés; la fase estacionaria y la fase NRP2 (14 veces; figura 22B).

Cuando comparamos la expresión relativa con respecto al medio sin ácidos grasos en presencia de propionato (Figura 25A), se observó que este patrón se conserva, ya que se encontraron 8 y 21 veces más transcritos del gen Rv3130 en la fase estacionaria y la NRP2. Esto indicaría que la presencia de propionato está induciendo la biosíntesis y la acumulación de triglicéridos durante estas dos condiciones de estrés. De tal forma que pareciera que la falta de oxígeno induce la biosíntesis de lípidos de reserva que dicho microorganismo pudiera utilizar durante estas mismas fases de estrés como ocurre *in vivo*, donde predomina más de una condición estrés como la falta de nutrientes, de tal forma que los triglicéridos pudieran ser degradados durante esta fase. La biosíntesis y acumulación de triglicéridos también podría relacionarse con un mecanismo de compensación del estrés reductivo derivado de la utilización de ácidos grasos (Daniel y col., 2004; Singh y col., 2010). Por otro lado, la adición de valerato al medio de cultivo aparentemente no induce el aumento en la actividad transcripcional relacionada con la biosíntesis de triglicéridos durante las condiciones estrés (Figura 25B).

La segunda parte de este análisis involucra a los genes relacionados con la biosíntesis de lípidos de membrana ya que, la acetil-CoA y el propionil-CoA, derivados del metabolismo del valerato o del propionato, podrían participar prácticamente de forma inmediata en la biosíntesis de moléculas lipofílicas como el ácido micólico, el sulfolípidos 1 ó el fitioceroldimicocerosato (PDIM), ya que todas ellas tienen como precursor al malonil-CoA o al metilmalonil-CoA (Bhatt y col., 2007). En este estudio se seleccionaron tres genes relacionados con la biosíntesis de lípidos de membrana, el gen *groEL1* que modula la biosíntesis de ácidos micólicos de cadena corta (C56-C58) que parecen intervenir en la formación de biopelículas y en la resistencia frente a algunos antibióticos (Ojha y col., 2005; Ojha y col., 2008). El gen *mmpL7* que codifica para una proteína transmembranal que participa en la translocación de PDIM a nivel de membrana; este lípido es necesario para el crecimiento y la virulencia de la bacteria en el ratón (Jail y col., 2007). Y el gen *fbpB* que cataliza la transferencia de micolatos a nivel de membrana (Kremer y col., 2002).

En cuanto a la expresión de los genes *fbpB*, *mmpL7* y *groEL1*, se detectó un mayor número de transcritos en presencia de propionato en la fase NRP2 de la latencia con respecto al medio sin ácido graso. Para el gen *mmpL7* se detectó un incremento de 11 veces; en tanto que para el *groEL1* el incremento fue de 11 veces y para *fbpB* fue de 52 veces. Esto confirma que, durante la fase NRP2 en presencia de propionato de sodio, la micobacteria sintetiza una mayor cantidad de lípidos de membrana, algunos asociados a virulencia. Esta actividad podría relacionarse con un mecanismo de compensación del estrés reductivo derivado de la utilización de ácidos grasos.

Finalmente, el aumento de la actividad transcripcional relacionada a estos lípidos de membrana podría influir en la resistencia observada frente a algunos antibióticos en la latencia. En presencia de valerato de sodio el cultivo muestra una disminución de la expresión de estos genes durante la latencia (NRP1 y NRP2) respecto al medio sin ácidos grasos (Figura 25B), lo que podría sugerir que en presencia de valerato la micobacteria no puede inducir mecanismos que le permitan adaptarse a la latencia eficientemente, y esto se ve reflejado en un bajo nivel transcripcional tanto para genes relacionados con el metabolismo de lípidos como para algunos genes relacionados con hipoxia.

## 8. CONCLUSIONES

1. Se estableció el modelo de latencia de Wayne en presencia de propionato o valerato de sodio 0.1%. La hipoxia se presentó al quinto día tanto en el medio Dubos sin ácidos grasos como en los adicionados de ácidos grasos, en tanto que la anaerobiosis se presentó en día 6, día 18 y día 15, respectivamente para medio Dudos sin ácidos grasos, medio con propionato y medio con valerato.
2. El gen del rRNA 16S fue mejor normalizador que su región promotora P1 para *M. tuberculosis* H37Rv cultivada bajo diferentes condiciones ambientales.
3. El modelo de latencia *in vitro* representó una condición de estrés tanto en medio Dubos como en Dubos adicionado de propionato o valerato, lo cual condujo a una disminución en la expresión durante la fase estacionaria y la fase NRP1 de los genes *dnaA* y *ftsZ*, involucrados en el ciclo celular de *M. tuberculosis* H37Rv.
4. En presencia de propionato se induce una sobreexpresión para los genes involucrados en hipoxia (*dosR*, *hspX*, Rv2626 y Rv3134) durante la fase estacionaria y la fase NRP2, en tanto que la adición de valerato ocasiona una represión de estos genes respecto a la obtenida en medio Dubos.
5. En presencia de propionato y valerato la micobacteria se induce una sobreexpresión para el gen *icl1* en las diferentes condiciones estudiadas, esta actividad fue más evidente en la fase logarítmica y en la fase NRP2. Por otra parte, en presencia de propionato durante la fase estacionaria y la fase NRP2 se observó una mayor sobreexpresión de los genes Rv3130 (relacionado con la biosíntesis y acumulación de triglicéridos), *mmpL7*, *groEL1* y para *fbpB* (relacionados con la biosíntesis de lípidos de membrana).
6. En presencia de valerato la micobacteria no puede inducir mecanismos que le permitan adaptarse a la latencia eficientemente; esto se ve reflejado por un bajo nivel transcripcional tanto para los genes relacionados con el metabolismo de lípidos como para algunos genes relacionados con la hipoxia.

## 9. PERSPECTIVAS

- Se sugiere la complementación de los resultados, mediante el estudio de la expresión diferencial de proteínas, empleando electroforesis de dos dimensiones así como mediante el estudio de cambios morfológicos mediante microscopia de transmisión y de barrido.
- También sería recomendable emplear cromatografía en capa fina para confirmar el consumo ó la producción de lípidos de reserva o de envoltura celular.
- Se sugiere realizar una cinética de expresión genética, en presencia de propionato o valerato que incluya algunos puntos entre la hipoxia y la anaerobiosis, de tal forma que la información que se obtenga podría contribuir a entender la fase adaptación a la latencia en *M. tuberculosis* y el establecimiento de la peristencia.
- Se sugiere realizar la misma metodología adicionando al modelo de hipoxia de Wayne ácidos grasos de cadena larga y/ó colesterol, para tener un panorama de expresión genética que parezca a la latencia *in vivo*.
- Se sugiere establecer un modelo de reactivación que permita contribuir a comprender a nivel transcripcional los cambios involucrados en la reactivación del crecimiento y el establecimiento de una infección activa.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez HM y Steinbüchel A. 2002. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60:367-376.
- Bagchi G, Chauhan S, Sharma D y Tyagi JS. 2005. Transcription and autoregulation of the Rv3134c-*devR-devS* operon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 151:4045-4053.
- Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P y Gicquel B. 1998. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology.* 144:3195-3203.
- Betts JC, Lukey PT, Robb LV, McAdam RA y Duncan K. 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol.* 43:717-731.
- Bhatt A, Molle V, Besra GS, Jacobs WR y Klemer L. 2007. The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol Microbiol.* 64:1442-1454.
- Bold TD y Ernst JD. 2009. Who benefits from granulomas, mycobacteria or host?. *Cell.* 36:17-19.
- Boon C y Dick T. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. *J Bacteriol.* 184:6760-6767.
- Boon C, Li R, Qi R y Dick T. 2001. Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induced in the Wayne dormancy model. *J Bacteriol.* 183:2672-2676.
- Brock M y Buckel W. 2004. On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. *Eur J Biochem.* 271:3227-3241.
- Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol.* 9:452-458.
- Cole ST., Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S, Eiglmeier K, Gas S, Barry C, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingwort T, Connor T, Davies R, Devlin K, Fertwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston J, Taylor K, Whitehead S y Barrell B. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393: 544-557. (Erratum 396:190, 1998).
- Cole ST, Eisenach KT, McMurray DN y Jacobs WR. 2005. Tuberculosis and the tubercle bacillus. *American Society for Microbiology.* Washington, DC. pp. 295 y 321.

- Cooper AM, Callaham JE, Griffin JP, Roberts AD y Orme IM. 1995. Old mice are able to control low-dose aerogenic infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 63:3559-3565.
- Côtes K, Dhouib R, Douchet I, Chahinian H, de Caro A, Carrière F y Canaan S. 2007. Characterization of an exported monoglyceride lipase from *Mycobacterium tuberculosis* possibly involved in the metabolism of host cell membrane lipids. *Biochem J*. 408:417-427.
- Cotran SR, Kumar V y Collins T. 2004. Robbins, Patología estructural y funcional. Sexta edición. Mc Graw Hill Interamericana. México. pp. 370-375; 754-757.
- Cunningham AF y Spreadbury CL. 1998. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton  $\alpha$ -crystallin homolog. *J Bacteriol*. 180:801-808.
- Daniel J, Deb C, Dubey VS, Sirakova TD, Abomoelak B, Morbidoni HR y Kolattukudy PE. 2004. Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *J Bacteriol*. 186:5017-5030.
- Deb C, Daniel J, Sirakova TD, Abomoelak B, Dubey VS y Kolattukudy PE. 2006. A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 281:3866-3875.
- Deb C, Lee CM, Dubey VS, Daniel J, Abomoelak B, Sirakova TD, Pawar S, Rogers L y Kolattukudy PE. 2009. A novel in vitro multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. *PLoS One*. 4:e6077.
- Desjardin LE, Haye LG, Sohaskey CD, Wayne LG y Eisenach KD. 2001. Microaerophilic induction of the alpha-crystallin chaperone protein homologue (hspX) mRNA of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 183:5311-5316.
- DiRusso CC y Black PN. 2004. Bacterial long chain fatty acid transport: gateway to a fatty acid-responsive signaling system. *J Biol Chem*. 279:49563-49566.
- Fisher MA, Plikaytis BB y Shinnick TM. 2002. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol*. 184:4025-4032.
- Garton NJ, Christensen H, Minnikin DE, Adegbola RA y Barer MR. 2002. Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria *in vitro* and in sputum. *Microbiology*. 148:2951-2958.
- Gräbner R y Meerbach W. 1991. Phagocytosis of surfactant by alveolar macrophages *in vitro*. *Am J Physiol*. 261:L472-L477.

- González-Mejía A. 2006. Expresión genética durante la latencia *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii* y *Mycobacterium tuberculosis* Beijing. Tesis de Maestría. ENCB, IPN.
- González-y-Merchand JA, Estrada-García I, Colston MJ, Cox RA. 1996. A novel method for the isolation of mycobacterial DNA. FEMS Microbiol Lett. 135:71-77.
- Gonzalo-Asensio J, Mostowy S, Harders-Westerveen J, Huygen K, Hernández-Pando R, Thole J, Behr M, Gicquel B y Martín C. 2008. PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence. PLoS One. 3:e3496.
- Hett EC, Chao MC, Steyn AJ, Fortune SM, Deng LL y Rubin EJ. 2007. A partner for the resuscitation-promoting factor. Mol Microbiol. 66:658-668.
- Hett EC, Chao MC, Deng LL y Rubin EJ. 2008. A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor. PLoS Pathog. 4:e1000001.
- Hett EC y Rubin EJ. 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. Microbiol Mol Biol Rev. 72:126-156.
- Hirsch JG. 1955. Biochemical factors which may influence the rate of tubercle bacilli in tissues. Ciba Found. Symp. En experimental tuberculosis, bacillus and host. Boston. pp. 115-127.
- Höner ZB, Miczac A, Swenson DL y Russell DG. 1999. Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 181:7161-7167.
- Hu Y, Butcher PD, Mangan JA, Rajandream MA y Coates AR. 1999. Regulation of *hmp* gene transcription in *Mycobacterium tuberculosis*: effects of oxygen limitation and nitrosative and oxidative stress. J Bacteriol. 181:3486-3493.
- Jain M, Petzold CJ, Schelle MW, Leavell MD, Mougous JD, Bertozzi CR, Leary JA y Cox JS. 2007. Lipidomics reveals control of *Mycobacterium tuberculosis* virulence lipids via metabolic coupling. Proc Natl Acad Sci USA. 104:5133-5138.
- Jackson M, Stadthagen G y Gicquel B. 2007. Long-chain multiple methyl-branched fatty acid-containing lipids of *Mycobacterium tuberculosis*: biosynthesis, transport, regulation and biological activities. Tuberculosis. 87:78-86.
- Johansen KA, Gill RE y Vasil ML. 1996. Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in mycobacteria. Infect Immun. 64:3259-3266.
- Kell DB, Mukanolava GY, Yotyakoya PU y Kaprelyants AS. 1985. A summary of recent work on dormancy in non sporulating bacteria: It's significance for marine microbiology and biotechnology. J Marine Biotechnol. 3:24-25.

- Kendall SL, Moyahedzadeh F, Rison SC, Wernisch I, Parish T, Duncan K, Betts JC y Stoker NG. 2004. The *Mycobacterium tuberculosis dosRS* two-component system is induced by multiple stresses. *Tuberculosis*. 84:247-255.
- Kremer L, Maughan WN, Wilson RA, Dover LG y Besra GS. 2002. *The M. tuberculosis* antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. *Lett Appl Microbiol*. 34:233-237.
- Loebel RO, Shorr E y Richardson HB. 1933. The influence of adverse conditions upon the respiratory metabolism and growth of human tubercle bacilli. *J Bacteriol*. 26:139-200.
- Lucas H, Brikmann E, Ernest HJ, Friemann W, Gaerther W, Gülck W, Heidt H, Jürgens K, Kluge G, Lehman GF, Lons H, Lübnow H, Michaelsen W, Hüller PH, Panka DG, Sander W, Rosenbaan J, Scheele H, Schemersahl K, Schoger G, Stoeckel W, Tepe HJ y Winkler A. 1979. El aparato respiratorio y sus enfermedades. En el gran libro de la salud. 8ª Ed. Reader Digest. México. pp 412-419.
- Lopez-Alvarez R, Badillo-Lopez C, Cerna-Cortes JF, Castillo-Ramirez I, Rivera-Gutierrez S, Helguera-Repetto AC, Hernandez-Pando R, Samper S y Gonzalez-y-Merchand JA. 2010. First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance. *BMC Microbiology*. 10:82.
- Madigan M, Martingo JM y Parker J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª ed. Pearson-Prentice Hall. pp 144-145.
- Manganelli R, Dubnau E, Tyagi S, Kramer FR y Smith I. 1999. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 31:715-724.
- Mathews KC y van Holde KE. 1998. Bioquímica. 2ª ed. McGraw Hill Interamericana. España. pp 703.
- McCune RM y Tompsett R. 1956. The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. The persistence of drug-susceptible tubercle bacilli in the tissues despite prolonged antimicrobial therapy. *J Exp Med*. 104:737-762.
- McKinney JD, Höner zu Bentrup K, Muñoz-Elías EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson D, Sacchettini JC, Jacobs WR y Russell DG. 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*. 406:735-738.
- Menéndez M del C, Rebollo MJ, Núñez M del C y Cox RA. 2005. Analysis of the precursor rRNA fractions of rapidly growing mycobacteria: Quantification by methods that include the use of a promoter (*rrnA* P1) as a novel standard. *J Bacteriol*. 187:534-543.
- Meylan PR, Richman DD y Kombluth RS. 1992. Reduced intracellular growth of mycobacteria in human macrophages cultivated at physiologic oxygen pressure. *Am Rev Respir Dis*. 145:218-225.

- Mishra KC, de Chastellier C, Narayana Y, Bifani P, Brown AK, Besra GS, Katoch VM, Joshi B, Balaji KN y Kremer L. 2008. Functional role of the PE domain and immunogenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* triacylglycerol hydrolase LipY. *Infect Immun.* 76:127-140.
- Muñoz-Elías EJ y McKinney JD. 2005. *M. tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for *in vivo* growth and virulence. *Nat Med.* 11: 638-644.
- Muñoz-Elías EJ y McKinney JD. 2006. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell Microbiol.* 8:10-22.
- Muñoz-Elías EJ, Timm J, Botha T, Chan WT, Gomez JE, McKinney JD. 2005. Replication dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in chronically infected mice. *Infect Immun.* 73:546-51.
- Niederweis M. 2008. Nutrient acquisition by mycobacteria. *Microbiology.* 154:679-692.
- Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:593-656.
- Nyka W. 1974. Studies on the effect of starvation on mycobacteria. *Infect Immun.* 9:843-850.
- Ojha A, Anand M, Bhatt A, Kremer L, Jacobs WR Jr, Hatfull GF. 2005. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell.* 123:861-873.
- Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D, Hsu T, Trivelli X, Guerardel Y, Alahari A, Kremer L, Jacobs WR Jr y Hatfull GF. 2008. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol.* 69:164-174.
- Park HD, Guinn K, Harrell MI, Liao R, Voskuil M, Tompa M, Schoolnik G y Sherman D. 2003. Rv3133c/*dosR* is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 48:833-843.
- Qin MN, Madiraju M y Rajagopalam M. 1999. Characterization of the functional replication origin of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene.* 233:121-130.
- Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, Manganelli R, Smith I, Gicquel B y Jackson M. 2002. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 45:203-217.
- Reed MB, Gagneux S, DeRiemer K, Small P y Barry C. 2007. The W-Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated. *J Bacteriol.* 189:2583-2589.

- Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, Muskett FW, Kelly G, Frenkiel TA, Gordon SV, Hewinson RG, Burke B, Norman J, Williamson RA y Carr MD. 2005. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO J.* 24:2491-2498.
- Rhoades ER, Frank AA y Orme IM. 1997. Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis.* 78:57-66.
- Rustad TR, Harrell MI, Liao R y Sherman DR. 2008. The enduring hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE.* 3:e1502.
- Rustad TR., Sherrid AM, Minch KJ y Sherman DR. 2009. Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell Microbiol.* 11:1151-1159.
- Sambrook J y Russell DW. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Vol. 1(3).
- Sasseti CM y Rubin EJ. 2003. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:12989-12994.
- Schnappinger D, Ehrt S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, Monahan IM, Dolganov G, Efron B, Butcher PD, Nathan C y Schoolnik GK. 2003. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J Exp Med.* 198:693-704.
- Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, Liao R, Harrell MI y Schoolnik GK. 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding  $\alpha$ -crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:7534-7539.
- Shi L, Jung JY, Tyagi S, Gennaro L y North R. 2003. Expression of Th1 mediated immunity in mouse lung induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription patterns characteristic of nonreplicating persistence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:241-246.
- Singh A, Crossman DK, Mai D, Guidry L, Voskuil MI, Renfrow MB y Steyn AJ. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. *PLoS Pathog.* 5:e1000545.
- Singh G, Singh G, Jadeja D y Kaur J. 2010. Lipid hydrolyzing enzymes in virulence: *Mycobacterium tuberculosis* as a model system. *Crit Rev Microbiol.* En prensa.
- Signoretto C, Lleò MM, Tafi MC y Canepari P. 2000. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol.* 66:1953-1959.
- Smith DW, Balasubramanian V y Wiegshaus E. 1991. A guinea pig model of experimental airborne tuberculosis for evaluation of the response to chemotherapy: the effect on bacilli in the initial phase of treatment. *Tubercle.* 72:223-231.

- Stewart GR y Young DB. 2002. Tuberculosis vaccines. *Brit Med.* 62:73-86.
- Stewart GR, Robertson DB y Young BD. 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol.* 1:97-105.
- Timm JF, Post FA, Bekker LG, Walther GB, Manganelli R, Chan WT, Tsenova L, Gold B, Smith I, Kaplan G y McKinney D. 2003. Differential expression of iron, carbon and oxygen-responsive mycobacterial genes in the lung of chronically infected mice and tuberculosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:14321-14326.
- Trivedi OA, Arora P, Sridharan V, Tickoo R, Mohanty D y Gokhale RS. 2004. Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature.* 428:441-445.
- Tuomanen E y Cozens R. 1987. Changes in peptidoglycan composition and penicillin-binding proteins in slowly growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 169:5308-5310.
- Ulrichs T y Kaufmann SH. 2006. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol.* 208:261-269.
- Voskuil MI. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during environmental conditions associated with latency. *Tuberculosis.* 84:138-143.
- Voskuil MI, Visconti KC y Schoolnik GK. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. *Tuberculosis.* 84:218-227.
- Wayne LG. 1976. Dynamics of submerged growth of *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and microaerophilic conditions. *Am Rev Respir Dis.* 114:807-811
- Wayne LG y Hayes LG. 1996. An *in vitro* model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun.* 64:2062-2069.
- Wayne LG y Sohaskey CD. 2001. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Microbiol.* 55:139-163.
- Youmans AS y Youmans GP. 1954. Studies on the metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. IV. The effect of fatty acids on the growth of *M. tuberculosis* var. *hominis*. *J. Bacteriol.* 67:731-733.
- Yuan Y, Crane D, Simpson R, Zhy Y, Hickey M, Sherman D y Barry C. 1996. The 16 kDa  $\alpha$ -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:9578-9583.
- Zhang Y y Yew WW. 2009. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 13:1320-1330.

## **URL (Uniform Resource Locators) consultados**

- URL1, Organización mundial de la salud 2007.  
<http://www.who.int/research/en/>  
Página consultada en mayo del 2010.
- URL2, TubercuList World Wide Web Server.  
<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>  
Página consultada en febrero del 2009.
- URL3, National Center for Biotechnology Information  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>  
Página consultada en mayo del 2009.



## APENDICE I REACTIVOS Y SOLUCIONES

### A) Solución de lisis

Cloruro de guanidinio 6M	57.6 g
Tween 80 al 10%	1 mL
EDTA 0.5 M	2 mL
$\beta$ Mercaptoetanol	6.8 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	100 mL

### B) TBE 10x

Tris 100 mM	108.9 g
Ác. bórico	55.60 g
EDTA 0.5 M	50 mL
H <sub>2</sub> O	1 L

### C) TE 10x

Tris 100 mM	12.1g
EDTA 10 mM	0.2 mL de una solución 0.5 M
H <sub>2</sub> O	1 L

El pH se ajustó a 7.6 y se esterilizó en autoclave.

### D) Albúmina-Dextrosa-Catalasa

Albúmina bovina	50.0 g
Dextrosa	20.0 g
Catalasa	0.04 g
NaCl	8.5 g
H <sub>2</sub> O	1 L

A la solución salina se adicionó la albúmina, esta disolvió suavemente para no producir espuma, posteriormente se adicionó la dextrosa y la catalasa. Finalmente, la solución se filtró a través de una unidad de 0.22  $\mu$ m. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

## APENDICE II RESULTADOS

1.-Expresión genética normalizada obtenida para los 17 genes analizados en medio Dubos, en medio Dubos adicionado de propionato o valerato.

Gen	Fase	Expresión genética normalizada		
		Dubos	Propionato	Valerato
<i>lipY</i>	Log	1.46E-06±6.67E-08	9.69E-06±9.69E-07	1.79E-06±1.13E-07
	Est	6.21E-06±8.80E-07	5.30E-08±6.34E-09	3.05E-05±5.07E-06
	NRP1	4.10E-08±2.32E-09	1.81E-07±1.70E-08	6.00E-08±7.37E-09
	NRP2	5.90E-08±3.27E-09	2.85E-07±4.98E-08	7.22E-09±1.91E-10
<i>fadD21</i>	Log	6.04E-05±5.12E-06	1.60E-03±1.82E-04	9.46E-05±5.35E-06
	Est	8.50E-07±6.89E-07	3.20E-06±2.27E-07	1.72E-05±7.34E-07
	NRP1	9.99E-07±3.69E-08	2.76E-06±2.00E-07	1.88E-06±7.16E-08
	NRP2	3.81E-07±2.00E-08	1.17E-04±5.69E-06	2.94E-08±5.34E-09
<i>icl1</i>	Log	5.97E-05±7.73E-06	2.13E-03±1.21E-04	8.43E-04±9.05E-05
	Est	3.80E-05±3.31E-06	2.01E-05±2.26E-06	1.18E-04±3.23E-06
	NRP1	1.91E-05±7.73E-07	1.50E-06±4.24E-08	8.62E-05±7.25E-07
	NRP2	2.24E-06±9.26E-08	3.06E-04±2.28E-06	2.42E-06±3.80E-08
Rv3130	Log	5.55E-05±2.45E-06	5.54E-06±4.37E-07	1.04E-02±2.89E-04
	Est	2.94E-06±6.42E-08	2.29E-05±4.29E-07	3.90E-04±2.15E-05
	NRP1	7.48E-06±2.66E-07	1.94E-06±1.38E-07	3.80E-04±2.53E-04
	NRP2	3.74E-06±2.23E-07	7.81E-05±3.57E-06	5.49E-06±7.26E-07
<i>groEL1</i>	Log	1.05E-05±2.45E-06	3.34E-04±8.97E-06	3.16E-05±3.97E-06
	Est	3.36E-05±6.42E-08	1.70E-05±2.57E-06	3.02E-05±1.41E-06
	NRP1	2.97E-05±2.66E-07	6.34E-07±4.10E-08	5.49E-05±6.35E-06
	NRP2	1.04E-05±2.23E-07	1.10E-04±5.07E-06	3.39E-08±5.45E-09
<i>mmpL7</i>	Log	1.75E-04±1.52E-06	2.23E-03±2.63E-04	3.27E-04±4.48E-06
	Est	1.49E-05±3.84E-07	3.91E-04±1.85E-05	9.47E-04±1.80E-05
	NRP1	9.30E-06±1.08E-07	4.43E-06±3.36E-07	2.01E-06±2.43E-07
	NRP2	3.16E-06±1.07E-07	3.38E-05±1.52E-06	1.01E-05±3.45E-07

Gen	Fase	Expresión genética normalizada		
		Dubos	Propionato	Valerato
<i>dosR</i>	Log	4.69E-05±2.41E-06	2.83E-05±1.85E-06	7.08E-04±1.65E-05
	Est	2.67E-06±2.12E-07	5.06E-06±4.04E-07	5.81E-05±1.29E-06
	NRP1	3.12E-06±3.03E-07	2.54E-06±1.127E-07	8.66E-06±3.40E-07
	NRP2	7.3E-07±2.58E-08	4.49E-05±2.21E-06	9.29E-07±2.83E-08
<i>hspX</i>	Log	7.37E-04±7.36E-05	5.38E-06±5.60E-07	7.81E-03±2.99E-04
	Est	3.94E-05±1.01E-06	2.00E-04±9.44E-06	8.15E-05±6.59E-06
	NRP1	2.11E-04±2.94E-05	5.98E-06±3.56E-07	3.29E-04±1.08E-05
	NRP2	5.81E-05±2.22E-06	2.43E-03±1.31E-04	2.07E-06±2.20E-07
Rv2626	Log	6.49E-05±1.32E-05	1.57E-06±6.28E-08	1.20E-03±6.01E-04
	Est	1.05E-05±9.58E-07	3.41E-05±1.95E-06	6.78E-05±3.40E-05
	NRP1	5.62E-05±3.07E-06	4.64E-06±2.95E-07	5.81E-05±4.71E-06
	NRP2	1.46E-05±1.18E-06	5.00E-04±3.26E-05	2.7E-06±1.99E-07
Rv2660	Log	1.74E-05±1.44E-06	1.20E-04±4.53E-06	1.97E-05±6.97E-07
	Est	1.80E-03±1.72E-04	2.71E-05±1.94E-06	7.04E-02±4.40E-03
	NRP1	3.91E-05±2.12E-06	2.12E-07±3.09E-08	1.46E-04±7.37E-05
	NRP2	3.28E-04±1.71E-05	1.86E-03±3.83E-04	1.13E-05±3.80E-07
Rv3134	Log	5.77E-05±6.85E-06	6.80E-06±4.87E-07	5.60E-03±2.25E-04
	Est	3.15E-06±1.04E-07	2.87E-05±3.09E-06	1.90E-03±9.71E-05
	NRP1	6.55E-06±6.04E-07	2.118E-06±1.20E-07	1.52E-07±1.81E-08
	NRP2	3.72E-06±3.56E-07	8.52E-05±3.85E-06	2.39E-06±1.20E-06
<i>hmp</i>	Log	5.22E-06±1.75E-07	1.75E-05±1.28E-06	9.43E-06±5.52E-07
	Est	1.35E-05±5.09E-07	1.84E-06±1.55E-07	2.34E-05±1.17E-05
	NRP1	4.43E-07±1.08E-08	1.3E-06±7.35E-08	3.3E-06±3.28E-07
	NRP2	1.83E-06±1.78E-07	7.54E-06±9.38E-07	4.03E-08±2.07E-08

Gen	Fase	Expresión genética normalizada		
		Dubos	Propionato	Valerato
<i>dnaA</i>	Log	5.45E-05±3.12E-06	1.54E-04±1.10E-05	3.23E-05±2.97E-06
	Est	1.49E-05±7.44E-06	1.45E-06±7.32E-07	2.62E-05±1.88E-06
	NRP1	3.30E-06±1.70E-06	2.82E-07±2.36E-07	3.48E-06±2.57E-07
	NRP2	1.26E-06±1.04E-07	5.97E-06±2.99E-07	2.58E-07±8.03e-8
<i>ftsZ</i>	Log	4.32E-05±3.12E-06	2.16E-04±7.27E-06	5.13E-06±2.84E-07
	Est	1.13E-05±7.44E-06	9.40E-06±8.71E-07	1.83E-05±1.13E-06
	NRP1	4.76E-06±1.70E-06	1.09E-07±9.15E-08	1.31E-05±4.27E-07
	NRP2	8.48E-07±1.04E-07	2.27E-05±9.52E-07	9.14E-08±1.88E-08
<i>esxA</i>	Log	3.68E-04±4.83E-05	6.04E-04±5.96E-05	4.53E-04±3.58E-05
	Est	3.20E-04±1.20E-05	2.54E-05±9.55E-07	4.95E-05±2.49E-05
	NRP1	2.66E-05±1.34E-05	7.71E-07±2.95E-08	4.54E-05±2.30E-05
	NRP2	4.20E-06±1.20E-07	4.11E-04±2.09E-04	4.86E-06±3.74E-07
<i>fbpB</i>	Log	9.13E-05±1.11E-05	1.10E-03±4.76E-05	7.30E-06±7.93E-07
	Est	5.12E-06±6.67E-07	1.25E-05±6.39E-06	1.61E-05±9.91E-07
	NRP1	3.16E-06±2.11E-07	5.57E-07±2.86E-07	4.10E-06±3.52E-07
	NRP2	3.52E-07±2.07E-08	1.84E-05±2.25E-06	1.51E-08±7.81E-09
<i>rpfB</i>	Log	3.29E-05±2.67E-06	2.05E-04±5.57E-06	5.56E-03±2.24E-04
	Est	6.25E-07±5.44E-09	2.63E-06±1.87E-07	3.67E-05±1.85E-05
	NRP1	1.47E-06±2.24E-07	5.89E-07±5.84E-08	4.05E-05±2.07E-06
	NRP2	4.22E-07±9.82E-08	2.86E-06±2.78E-07	4.51E-07±5.38E-08

2.-Expresión genética relativa obtenida para los 17 genes analizados en medio Dubos adicionado de propionato o valerato.

Gen	Fase	Expresión relativa	
		Propionico	Valérico
<i>dnaA</i>	Log	↑2.83	↓1.7
	Est	↓10	↑1.76
	NRP1	↓11	↑1.05
	NRP2	↑4.72	↓5
<i>ftsZ</i>	Log	↑5.00	↓8.33
	Est	↓1.2	↓1.61
	NRP1	↓50	↑2.76
	NRP2	↑26.71	↓9.01
<i>esxA</i>	Log	↑1.64	↑1.23
	Est	↓12.5	↓6.25
	NRP1	↓33.3	↑1.71
	NRP2	↑97.97	↑1.16
<i>fbpB</i>	Log	↑12.01	↓12.5
	Est	↑2.44	↑3.15
	NRP1	↓5.5	↑1.30
	NRP2	↑52.30	↓25
<i>rpfB</i>	Log	↑6.25	↑169.25
	Est	↑4.21	↑58.69
	NRP1	↓2.5	↑27.58
	NRP2	↑6.77	↑1.07

Gen	Fase	Expresión relativa	
		Propionato	Valerato
<i>dosR</i>	Log	↓1.7	↑15.08
	Est	↑1.89	↑21.74
	NRP1	↓1.2	↑2.78
	NRP2	↑61.47	↑1.27
<i>hspX</i>	Log	↓100	↑10.60
	Est	↑5.09	↑2.07
	NRP1	↓33.3	↑1.56
	NRP2	↑41.80	↓25
Rv2626	Log	↓50	↑18.45
	Est	↑3.26	↑6.48
	NRP1	↓12.5	↑1.03
	NRP2	↑34.25	↓5.5
Rv2660	Log	↑6.88	↑1.13
	Est	↓50	↑39.12
	NRP1	↓100	↑3.73
	NRP2	↑5.68	↓33.3
Rv3134	Log	↓8.3	↑97.06
	Est	↑9.14	↑602.43
	NRP1	↓3.1	↓0.50
	NRP2	↑22.95	↓1.5
<i>hmp</i>	Log	↑3.35	↑1.81
	Est	↓7.14	↑1.73
	NRP1	↑2.94	↑7.46
	NRP2	↑4.11	↓50

Gen	Fase	Expresión relativa	
		Propionato	Valerato
<i>lipY</i>	Log	↑6.64	↑1.23
	Est	↓100	↑4.90
	NRP1	↑4.41	↑1.46
	NRP2	↑4.83	↓8.33
<i>fadD21</i>	Log	↑26.45	↑1.57
	Est	↑3.77	↑20.24
	NRP1	↑2.76	↑1.89
	NRP2	↑307.33	↓125
<i>icl1</i>	Log	↑35.67	↑14.12
	Est	↓1.9	↑3.11
	NRP1	↓12.5	↑4.52
	NRP2	↑136.49	↑1.08
Rv3130	Log	↓10	↑186.60
	Est	↑7.77	↑132.44
	NRP1	↓3.8	↑50.84
	NRP2	↑20.86	↑1.47
<i>groEL1</i>	Log	↑31.85	↑3.01
	Est	↓2	↓1.1
	NRP1	↓50	↑1.85
	NRP2	↑10.56	1
<i>mmpL7</i>	Log	↑12.76	↑1.87
	Est	↑26.17	↑63.40
	NRP1	↓2.08	↓4.5
	NRP2	↑10.68	↑3.20
<i>fbpB</i>	Log	↑12.01	↓12.5
	Est	↑2.44	↑3.32
	NRP1	↓5.55	↑1.28
	NRP2	↑52.30	↓25

↑Sobreexpresado, ↓ Reprimido respecto al medio Dubos

# Differential expression of *dnaA* and *dosR* genes among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex under oxic and hypoxic conditions

Claudia Badillo-López, Arturo González-Mejía, A. Cecilia Helguera-Repetto, Laura P. Salas-Rangel, Sandra Rivera-Gutiérrez, Jorge F. Cerna-Cortés, Jorge A. González-y-Merchand\*

Department of Microbiology, National School of Biological Sciences, National Polytechnical Institute, Mexico, D.F., Mexico

Received 12 December 2009 · Accepted 27 February 2010

**Summary.** Major differences regarding the pathology and host immune response of the Beijing and Canettii genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* have been reported; however, studies on the genetic expression of these genotypes during in vitro dormancy are scarce. This study examined the expression of five cell-cycle-related genes and two dormancy-related genes in *M. canettii*, *M. tuberculosis* H37Rv, and *M. tuberculosis* Beijing during the Wayne model of dormancy. The results showed that under hypoxic conditions the three tuberculosis genotypes were able to transcribe genes involved in DNA replication and cellular division. In addition, *dosR* was found to be up-regulated in *M. tuberculosis* Beijing during the exponential growth phase but down-regulated under hypoxic conditions. In this genotype, the replication-related gene *dnaA* was also strongly down-regulated. These latter two findings suggest that, compared to *M. tuberculosis* H37Rv and *M. canettii*, the Beijing genotype has a lower capacity to synthesize *dosR*, *hspX*, and *dnaA* mRNAs during in vitro dormancy. [Int Microbiol 2010; 13(1):9-13]

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis* complex · differential gene expression · hypoxia · cell cycle

## Introduction

Tuberculosis (TB), a disease caused by microorganisms belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), causes 9 million new infections and 2 million deaths each year [[http://www.who.int/tb/country/global\\_tb\\_database/](http://www.who.int/tb/country/global_tb_database/)]. Recent epidemiological data suggest that the evolution of TB is strongly related to the MTC strain; for example,

Lopez et al. [8], using the BALB/c mouse model of pulmonary TB, observed important differences in disease pathology and host immune response after infection with *M. tuberculosis* strains from the major genotypes found worldwide: *M. canettii*, *M. tuberculosis* H37Rv, and *M. tuberculosis* Beijing [8]. *M. canettii* infection induced a slowly progressive disease characterized by delayed bacterial multiplication, limited pneumonia, steadily increasing granuloma development, but no mortality. Conversely, Beijing infection consistently induced accelerated bacterial multiplication, early and massive pneumonia, and premature host death.

The Beijing/W lineage of *M. tuberculosis* (originally identified on the basis of strain IS6110 fingerprinting and spoligotype patterns) has attracted considerable attention over the past decade because of its increased virulence and

\*Corresponding author: J.A. González-y-Merchand  
Departamento de Microbiología  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN  
Colonia Santo Tomás, Delegación Miguel Hidalgo  
México, D.F., 11340 México  
Tel/Fax +55-57296000, ext. 62495  
E-mail: jgonzal1212@yahoo.com.mx