



Caracterización de la reacción citoquímica de *Mycobacterium tuberculosis* con rojo neutro. Correlación con el contenido de Sulfolípido

The image contains several components related to the study of neutral red reaction in *Mycobacterium tuberculosis*:

- Test Tubes:** Two test tubes are shown. The left one, labeled 'Rt', contains a clear yellow liquid. The right one, labeled 'Rv', contains a turbid, reddish-brown suspension.
- Chemical Structures:** Two structures of neutral red are shown, labeled I and II. Structure I is the zwitterionic form: CN1C=NC2=C(N1)C=CC=C2N. Structure II is the protonated form: CN1C=NC2=C(N1)C=CC=C2[NH+].
- Petri Dish:** A petri dish showing a bacterial culture on a yellow agar medium with several small, reddish-orange colonies.
- Sulfolipid Structure:** A complex chemical structure of a sulfolipid, showing a glycerol backbone with a sulfate group and three fatty acid chains. The chains are labeled with their carbon numbers:  $C_{15}$ ,  $C_{17}$ , and  $C_{16}$ .

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>A. INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>A.1. Reseña histórica de la tuberculosis</b> .....                                  | <b>16</b> |
| <b>A.2. Estado actual de la tuberculosis</b> .....                                     | <b>17</b> |
| <b>A.3. Género <i>Mycobacterium</i></b> .....  | <b>18</b> |
| A.3.1. Morfología y características generales.....                                     | 18        |
| A.3.2. Condiciones generales de cultivo.....   | 19        |
| A.3.3. Clasificación.....  | 20        |
| A.3.4. Envoltura de las micobacterias.....   | 22        |
| A.3.4.1. Membrana plasmática.....  | 23        |
| Lipoarabinomanano (LAM).....   | 24        |
| A.3.4.2. Pared celular.....  | 25        |
| A.3.4.2.1. Peptidoglicano (PG).....  | 27        |
| A.3.4.2.2. Arabinogalactano (AG).....  | 30        |
| A.3.4.2.3. Ácidos micólicos.....   | 29        |
| A.3.4.2.4. Fosfolípidos (PL).....  | 31        |
| Fostatidilinositolmanósidos (PIM).....   | 31        |
| A.3.4.3. La cápsula.....   | 32        |
| A.3.4.3.1. Glicolípidos.....   | 33        |
| A.3.4.3.1.1. Micósidos.....  | 33        |
| A.3.4.3.1.1.1. Glicopeptidolípidos (GPL).....  | 33        |
| A.3.4.3.1.1.2. Fenolglicolípidos (PGL).....  | 34        |
| A.3.4.3.1.2. Lipooligosacáridos (LOS).....   | 34        |
| A.3.4.3.1.3. Aciltrehalosas.....   | 34        |
| A.3.4.3.1.3.1. Dimicolato de trehalosa (TDM).....                                      | 36        |
| A.3.4.3.1.3.2. Sulfolípidos (SL).....  | 37        |
| A.3.4.3.1.3.3. Otras acil trehalosas.....  | 39        |
| <b>A.4. Identificación y diferenciación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> ..... | <b>40</b> |
| A.4.1. La baciloscopia.....  | 41        |
| A.4.2. El cultivo.....   | 41        |
| A.4.3. Pruebas bioquímicas.....  | 41        |
| A.4.3.1. Niacina.....  | 42        |
| A.4.3.2. Reducción de nitrato.....   | 42        |
| A.4.3.3. Pirazinamidasas (PZA).....  | 43        |
| A.4.3.4. Resistencia a la TCH.....   | 43        |
| A.4.3.5. Catalasa.....   | 43        |
| A.4.4. Métodos moleculares de identificación.....                                      | 43        |
| A.4.4.1. Métodos de hibridación.....   | 43        |
| A.4.4.2. Métodos de amplificación.....   | 44        |
| A.4.4.3. RFLPs.....  | 44        |

|   |           |
|---|-----------|
| A.4.4.4. Identificación mediante HPLC .....   | 44        |
| <b>A.5. Tinción de <i>M. tuberculosis</i> con Rojo Neutro (RN): test de virulencia.....</b>   | <b>44</b> |
| A.5.1. El rojo neutro (RN).....   | 45        |
| A.5.2. Envoltura de <i>M. tuberculosis</i> y fijación de RN.....  | 46        |
| <b>A.6. El genoma de <i>M. tuberculosis</i>.....</b>  | <b>47</b> |
| A.6.1. Genes que codifican proteínas .....  | 47        |
| A.6.2. Elementos repetitivos y profagos.....  | 48        |
| <b>A.7. Métodos de expresión de genes en micobacterias .....</b>  | <b>48</b> |
| <b>A.8. Factores de virulencia de <i>M. tuberculosis</i> y su interacción con las células huésped .....</b>   | <b>50</b> |
| A.8.1. Factores de unión e invasión.....  | 50        |
| A.8.2. Toxinas y citotoxinas.....   | 50        |
| A.8.3. Acción del LAM .....   | 51        |
| A.8.4. Otros factores de virulencia .....   | 52        |
| <b>B. OBJETIVOS DEL TRABAJO .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>C. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>   | <b>58</b> |
| <b>C.1. Material biológico .....</b>  | <b>60</b> |
| C.1.1. Cepas bacterianas.....   | 60        |
| C.1.2. Vectores .....   | 60        |
| <b>C.2. Condiciones de cultivo, medios y conservación de cepas.....</b>   | <b>61</b> |
| C.2.1. Medios para el cultivo de micobacterias y <i>E. coli</i> .....   | 62        |
| C.2.2. Condiciones generales de cultivo.....  | 63        |
| C.2.3. Conservación de cepas.....   | 63        |
| <b>C.3. Fijación de micobacterias en placas de agar Middlebrook 7H10 modificado... 63</b>   |           |
| <b>C.4. Tinción de micobacterias con RN.....</b>  | <b>63</b> |
| C.4.1. Tinción en tubo (test de RN).....  | 64        |
| C.4.2. Tinción en placa de cultivo .....  | 64        |
| <b>C.5. Técnicas de análisis de glicolípidos.....</b>   | <b>64</b> |
| C.5.1. Extracción de glicolípidos.....  | 64        |
| C.5.2. Fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico: DEAE-celulosa .   | 65        |
| C.5.3. Purificación de SL mediante cromatografía de adsorción: Sílica-gel.....  | 67        |
| C.5.4. Análisis por cromatografía en capa fina analítica (CCF).....   | 67        |
| C.5.4.1. Análisis de fracciones por cromatografía unidimensional (CCF-1D)....   | 68        |
| C.5.4.2. Identificación de SL a partir de extractos de glicolípidos mediante cromatografía bidimensional (CCF-2D) y tinción con cresil violeta..... | 69        |
| <b>C.6. Determinación de la actividad de rojo neutro (NRA) a partir de muestras glicolípídicas.....</b>   | <b>69</b> |
| <b>C.7. Técnicas de biología molecular. Construcción y caracterización de una genoteca de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....</b>                     | <b>70</b> |
| C.7.1. Extracción de ADN.....   | 70        |

|  |            |
|--|------------|
| C.7.1.1. Extracción de ADN plasmídico y cosmídico a partir de <i>E. coli</i> .....   | 70         |
| C.7.1.1.1. Lisis alcalina .....  | 70         |
| C.7.1.1.2. Técnica del cloruro de litio .....  | 71         |
| C.7.1.1.3. Purificación por columnas utilizando tierra de diatomeas .....  | 72         |
| C.7.1.2. Extracción de ADN cosmídico a partir de <i>M. smegmatis</i> .....   | 73         |
| C.7.1.3 Extracción de ADN cromosómico de <i>M. tuberculosis</i> .....  | 73         |
| C.7.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción .....   | 74         |
| C.7.3. Electroforesis en gel de agarosa .....  | 75         |
| C.7.4. Purificación de fragmentos de ADN .....   | 76         |
| C.7.4.1. Purificación por columna GFX™ .....   | 76         |
| C.7.4.2. Electroelución .....  | 77         |
| C.7.5. Defosforilación de extremos de ADN .....  | 77         |
| C.7.6. Ligación de fragmentos de ADN .....   | 78         |
| C.7.7. Empaquetamiento <i>in vitro</i> de la cosmidoteca .....   | 78         |
| C.7.8. Transducción, amplificación y titulación de la cosmidoteca de<br><i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....                     | 79         |
| C.7.9. Preparación de células competentes, transformación y electroporación .....  | 80         |
| C.7.9.1. Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> .....   | 80         |
| C.7.9.2. Preparación de células electrocompetentes de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155... ..                            | 80         |
| C.7.9.3. Electroporación de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 y <i>E. coli</i> .....                                     | 82         |
| C.7.9.4. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> con CaCl <sub>2</sub> .....                                      | 83         |
| C.7.9.5. Transformación de células competentes (CaCl <sub>2</sub> ) de <i>E. coli</i> .....                                    | 83         |
| <b>C.8. Cribaje de la cosmidoteca de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv con RN .....</b>   | <b>83</b>  |
| <b>C.9. Secuenciación de ADN y análisis computacional .....</b>  | <b>85</b>  |
| <b>D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>88</b>  |
| <b>D.1. Tinción diferencial de <i>M. tuberculosis</i> con RN en tubo de ensayo y placa<br/>        de cultivo .....</b>        | <b>91</b>  |
| D.1.1. Tinción de células en tubo .....  | 91         |
| D.1.2. Tinción de colonias en placas de agar Middlebrook 7H10 modificado .....   | 98         |
| D.1.2.1. Fijación de micobacterias en agar Middlebrook 7H10 modificado .....   | 98         |
| D.1.2.2. Tinción de colonias con RN .....  | 99         |
| D.1.2.3. Aplicación de la técnica de tinción en placa .....  | 99         |
| <b>D.2. Fracciones glicolípídicas de la pared de <i>M. tuberculosis</i> .....</b>  | <b>100</b> |
| D.2.1. Obtención de extractos crudos .....   | 100        |
| D.2.2. Perfiles glicolípídicos y composición porcentual de los extractos crudos....  | 101        |
| D.2.3. Detección, purificación y cuantificación de SL .....  | 104        |
| <b>D.3. Correlación entre la composición glicolípídica de la pared y la NRA .....</b>  | <b>106</b> |
| <b>D.4. Construcción de la cosmidoteca de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y cribaje mediante<br/>        tinción con RN .....</b> | <b>110</b> |
| D.4.1. Obtención y fraccionamiento de ADN genómico de<br><i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....                                    | 111        |
| D.4.2. Construcción y análisis de la cosmidoteca en <i>E. coli</i> .....   | 111        |

|   |            |
|---|------------|
| D.4.3. Electroporación y caracterización de la cosmidoteca en<br><i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155..... | 113        |
| D.4.4. Cribaje de la cosmidoteca mediante tinción con RN.....   | 114        |
| <b>D.5. Análisis de las cepas RN+ de <i>M. smegmatis</i> (pYUB18::H37Rv) seleccionadas</b>                    | <b>115</b> |
| D.5.1. Perfiles glicolípidicos y detección de SL.....   | 116        |
| D.5.2. Región genómica de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv relacionada con la fijación<br>de RN .....             | 118        |
| <b>E. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>137</b> |
| <b>F. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>143</b> |
| <b>G. ARTÍCULOS.....</b>  | <b>157</b> |
| <b>H. AGRADECIMIENTOS .....</b>   | <b>173</b> |

# RESUMEN

## RESUMEN

La tuberculosis (TB) es en la actualidad uno de los problemas más importantes de salud pública en el mundo. En las últimas décadas esta enfermedad se ha visto potenciada por el resurgimiento de cepas multiresistentes (MRS) de *Mycobacterium tuberculosis* y por la co-infección con el virus de inmunodeficiencia humano (VIH). Para un control satisfactorio de la TB se requiere una nueva vacuna que sustituya al actual y poco efectivo Bacilo de Calmette y Guérin (BCG). En el diseño racional de una vacuna más efectiva, resulta fundamental el conocimiento adecuado de los antígenos y mecanismos involucrados en la virulencia y/o patogenicidad del bacilo tuberculoso.

La virulencia de *M. tuberculosis* se ha relacionado con diversas características fenotípicas. Entre las menos exploradas están las reacciones citoquímicas con diferentes colorantes básicos, y tal vez los estudios más prometedores en este campo han sido los que describen la tinción de las cepas virulentas de *M. tuberculosis* con rojo neutro (RN).

El principal objetivo de este trabajo ha sido evaluar el papel desempeñado por los glicolípidos de pared, especialmente sulfolípidos (SL) en la fijación de RN por parte de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*. Para lograrlo, se compararon los perfiles glicolípidicos de la pared de cepas de *M. tuberculosis* que fijan o no RN (*RN+* y *RN-* respectivamente) y así buscar una posible correlación entre la composición glicolípidica y la fijación del colorante. Por otra parte, se planteó conocer la región genómica posiblemente implicada en el carácter *RN+* de la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv. Para tal fin se construyó una genoteca de *M. tuberculosis* H37Rv, se transformó en la cepa *RN-* *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y mediante un cribaje por tinción con RN se buscaron colonias de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) que fijaran RN, (*RN+*), para su análisis.

En la primera parte del trabajo se optimizaron las mejores condiciones para teñir células de *M. tuberculosis* con RN en tubos de ensayo. Simultáneamente se desarrolló un método para fijar colonias de micobacteria en placas de agar Middlebrook 7H10-OADC modificado, un medio diseñado especialmente en este trabajo para tal fin. Las condiciones óptimas encontradas para teñir células de *M. tuberculosis* con RN se aplicaron en la tinción de colonias fijadas en placa. Los resultados de esta parte del trabajo permitieron desarrollar un método fácil y económico para diferenciar *M. tuberculosis* H37Ra, una cepa común de control en los laboratorios clínicos, de *M. tuberculosis* H37Rv y aislados clínicos (Soto *et al.*, 2002).

Para buscar una posible correlación entre la composición glicolípidica de la pared de *M. tuberculosis* y la fijación de RN, se purificaron diferentes fracciones glicolípidicas de la

pared mediante cromatografía en columna de intercambio iónico (DEAE) y se analizó su capacidad de fijar RN, lo que se denomina actividad de rojo neutro (NRA). Entre otros resultados, en esta parte del trabajo se pudo desarrollar un método fácil y fiable para la detección rápida de SL en cepas de *M. tuberculosis* por medio de cromatografía en capa fina (CCF) de dos dimensiones (Soto *et al.*, 2000).

En la segunda parte del trabajo se construyó una cosmidoteca de *M. tuberculosis* H37Rv empleando el cósmido “shuttle” pYUB18 y se transformó en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Se hicieron crecer las colonias de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv), se fijaron en placas de agar Middlebrook 7H10-OADC modificado y se tiñeron con RN. De esta forma, se identificaron tres colonias RN<sup>+</sup> de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, que se denominaron [9,12], [19,4] y [33,4]. Mediante secuenciación de ADN y análisis de restricción, se dedujo que las tres correspondientes cepas RN<sup>+</sup> de *M. smegmatis* compartían una región común del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv de aproximadamente 13,1 kpb, comprendida entre los marcos abiertos de lectura (ORFs) Rv0570 (*nrdZ*) y Rv0577 del genoma de *M. tuberculosis*.

Mediante secuencia nucleotídica, complementación de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y análisis de un mutante RN<sup>-</sup> obtenido a partir del recombinante RN<sup>+</sup> [33,4], se dedujo que los ORFs Rv0570, Rv0574c, Rv0575c, Rv0576 o Rv0577, estarían posiblemente implicados en el carácter RN<sup>+</sup> de las cepas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) que fijaban RN. De acuerdo a la secuencia completa de *M. tuberculosis* H37Rv, el producto codificado por Rv0570 (*nrdZ*) es similar (52,5%) a una ribonucleotidil reductasa de *Archaeoglobus fulgidus*, el de Rv0574 es similar (25,8%) a la proteína de encapsulación CapA de *Bacillus anthracis*, el de Rv0575c es similar (38,7%) a una monooxigenasa de *Streptomyces coelicolor*, el de Rv0576 es altamente homólogo a reguladores transcripcionales de la familia ArsR, y Rv0577 codifica el antígeno secretado de 27 kDa de *M. tuberculosis* (CFP30B).

También se analizaron los perfiles glicolipídicos de la pared de las cepas RN<sup>+</sup> [9,12], [19,4] y [33,4], se compararon mediante CCF con los obtenidos a partir de cepas RN<sup>+</sup> de *M. tuberculosis* como H37Rv y el aislado clínico MT103, y cepas RN<sup>-</sup> como *M. tuberculosis* H37Ra y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. No se encontraron glicolipidos exclusivos de *M. tuberculosis* H37Rv en las cepas RN<sup>+</sup> de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

Con el conjunto de resultados obtenidos en este trabajo, se pudo evaluar la relación entre los componentes glicolipídicos de la pared de *M. tuberculosis* y la reacción citoquímica de cepas virulentas con RN (*manuscrito en preparación*). Básicamente se concluyó que la relación tradicionalmente aceptada entre SL y fijación de RN es realmente cuestionable.

**ABREVIATURAS**

|               |   |
|---------------|---|
| ADN           | Ácido desoxiribonucleico                                |
| AFB           | Bacilos ácido alcohol resistentes                       |
| AG            | Arabinogalactano  |
| AM            | Arabinomanano   |
| ApG           | Glicolípidos apolares                                   |
| ARN           | Ácido ribonucleico                                      |
| BCG           | Bacilo de Calmette y Guérin                             |
| CCF           | Cromatografía en capa fina                              |
| CCF-1D        | Cromatografía en capa fina unidimensional               |
| CCF-2D        | Cromatografía en capa fina de dos dimensiones           |
| CF            | Cord factor   |
| DAT           | Diacil trehalosas                                       |
| DEAE          | Cromatografía en columna de DEAE celulosa               |
| EtOH          | Etanol  |
| GPL           | Glicopeptidolípidos                                     |
| HPLC          | Cromatografía líquida de alta eficiencia                |
| IFN- $\gamma$ | Interferón gamma  |
| IS            | Secuencia de inserción                                  |
| LAM           | Lipoarabinomanano                                       |
| LM            | Lipomanano  |
| LOS           | Lipooligosacáridos                                      |
| mAGP          | Esqueleto de la pared micobacteriana                    |
| MAIS          | Complejo de <i>M. avium-intracellulare-scrofulaceum</i> |
| MetOH         | Metanol   |
| MR            | Receptor de manosa                                      |
| MRS           | Cepas multiresistentes                                  |
| NRA           | Actividad de rojo neutro                                |
| NT            | Trehalosas neutras                                      |
| OD            | Densidad óptica   |
| OMS           | Organización Mundial de la Salud                        |
| ORF           | Marco abierto de lectura                                |
| PC            | Componentes polares                                     |
| PCR           | Reacción en cadena de la polimerasa                     |
| PE            | Fosfatidiletanolamina                                   |
| PI            | Fosfatidilinositol                                      |
| PIM           | Fosfatidilinositolmanósidos                             |
| PG            | Peptidoglicano  |
| PGL           | Fenolglicolípidos                                       |
| PL            | Fosfolípidos  |

|               |   |
|---------------|---|
| PP            | Fosfolípidos polares  |
| PPD           | Derivado proteico purificado                                |
| PPT           | Poliftieonil trehalosas                                     |
| PZA           | Pirazinamidasas   |
| RFLP          | Polimorfismo por el tamaño de los fragmentos de restricción |
| RN            | Rojo neutro   |
| <i>RN-</i>    | Rojo neutro negativo  |
| <i>RN+</i>    | Rojo neutro positivo  |
| SAL           | Lípidos fuertemente ácidos                                  |
| SL            | Sulfolípidos  |
| TCH           | Hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico                   |
| TDM           | Dimicolato de trehalosa ó cord factor (CF)                  |
| TNF- $\alpha$ | Factor de necrosis tumoral alfa                             |
| TB            | Tuberculosis  |
| UFC           | Unidades formadoras de colonia                              |

# INTRODUCCIÓN

## A. INTRODUCCIÓN

La TB es una enfermedad que ha acompañado al hombre a lo largo de su historia, y que todavía no se encuentra erradicada. Por el contrario, la TB produce actualmente el mayor número de muertes entre las enfermedades que tienen su origen en un agente infeccioso. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *M. tuberculosis*, de entre los cuales un 5-10 % del total de infectados desarrollarán la enfermedad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la TB posee una incidencia anual de 8,4 millones de nuevos casos y se prevén aproximadamente 10,2 millones de casos para el año 2005 (WHO, 2002).

El género *Mycobacterium* incluye una gran variedad de especies, desde saprófitas que viven libres en el medio ambiente hasta parásitos obligados, aunque en su mayoría no causan enfermedad. Los patógenos más importantes del género se encuentran agrupados en el complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*). Entre ellos *M. bovis*, el agente causal de la TB en bovinos, cabras, ovejas, gatos, etc., también produce eventualmente la enfermedad en humanos (Metchock *et al.*, 1999). *M. leprae*, que es el agente causal de la lepra, es el otro patógeno importante que produce infección en humanos. Cerca de 680,000 nuevos casos de lepra fueron detectados en 1999 (WHO, 2000).

Se han incrementado recientemente los casos de infección causada por micobacterias oportunistas, tales como *M. avium*, *M. kansasii* y *M. fortuitum* (Metchock *et al.*, 1999). Por ejemplo *M. avium* causa frecuentemente enfermedad en individuos inmunodeprimidos.

*M. tuberculosis* se identificó como el agente causal de la TB a finales del siglo XIX (Kock, 1882), y se dispone de una terapia eficaz con medicamentos contra la TB desde mediados del siglo XX. De forma complementaria, la vacunación con BCG se han venido utilizando como una de las principales herramientas para el control de la TB. A pesar de todo ello la TB persiste como un problema de salud pública tanto en países industrializados como en aquellos que se encuentran en vías de desarrollo. La baja eficiencia de la BCG y la aparición de cepas MDR a los medicamentos antituberculosos han comprometido seriamente el control de la TB. Por otra parte, la amplia diseminación del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), ha potenciado la persistencia actual de la TB. En consecuencia, el diagnóstico temprano, el correcto tratamiento terapéutico y la búsqueda de una nueva vacuna que reemplace la actual y poco eficiente BCG son algunos de los objetivos prioritarios para la investigación biomédica en TB para siglo XXI.

Actualmente se aplican diversas estrategias para buscar un el control de la TB. Las más relevantes apuntan hacia la obtención de cepas atenuadas, al estudio de antígenos inmunoreguladores de virulencia y/o patogenicidad, al diseño de una vacuna de ADN, a la búsqueda de nuevos medicamentos y a las inmunoterapias. Hasta el momento no se conoce con certeza cual será el camino que conducirá a la erradicación de la TB. Muy probablemente mediante la combinación de algunas de las anteriores estrategias se pueda lograr este gran objetivo.

## A.1. Reseña histórica de la tuberculosis

La TB es una enfermedad muy antigua que, paralelo al desarrollo de las técnicas de agricultura y domesticación de animales, toma importancia cuando el hombre empieza a tener vida en comunidad, (Daniel *et al.*, 1994). El bacilo tuberculoso se ha reconocido en esqueletos de la Edad de Piedra donde la TB posiblemente coexistía con otras enfermedades infecciosas. En momias egipcias y de la América precolombina también han sido encontradas algunas deformaciones óseas compatibles con el “mal de Pott” (TB ósea) (Salo *et al.*, 1994).

La TB era probablemente una enfermedad endémica en los animales mucho antes de afectar al hombre (Steele y Ranney, 1958). Se sospecha que las primeras infecciones tuberculosas en humanos podrían haber sido producidas por *M. bovis*. El carácter epidémico de la TB se incrementó lentamente por el aumento de la densidad de las poblaciones y se diseminó posteriormente por el mundo como consecuencia de las migraciones europeas en las distintas colonizaciones (Diamon, 1992). En los siglos XVIII y XIX la enfermedad tuvo su mayor prevalencia en Europa Occidental y Estados Unidos, como producto de las pésimas condiciones de trabajo y vivienda asociadas a la revolución industrial que potenciaron un gran aumento de los casos. Aproximadamente a finales del siglo XIX la enfermedad también sufrió una fuerte diseminación en Europa Oriental, Asia, África y América del Sur (Daniel *et al.*, 1994).

La TB también conocida como “Tisis” desde la época de Hipócrates, fue considerada una enfermedad hereditaria y su naturaleza infecciosa sólo fue establecida por Antoine Villemin en 1865. Este médico militar transfirió fluidos y pus de lesiones humanas y bovinas a conejos que desarrollaron la enfermedad. En 1882, el bacteriólogo alemán Robert Koch aisló y cultivó el bacilo tuberculoso al que denominó “bacilo de Koch”. Su trabajo experimental consistió en reproducir inicialmente la enfermedad mediante la infección de cobayas y conejos, y recuperar el bacilo en cultivo puro a partir de los animales infectados (Koch, 1882). Este rígido y sistemático procedimiento, denominado postulados de Koch, ha sido considerado como el criterio esencial para la aceptación de un determinado microorganismo como agente causal de una enfermedad infecciosa específica.

Koch también desarrolló una tinción para visualizar el bacilo tuberculoso utilizando una solución alcalina de azul de metileno. Frank Ziehl y Frederich Neelsen en 1883 modificaron esta tinción utilizando fucsina básica, y así desarrollaron la tinción de Ziehl-Neelsen que se utiliza actualmente en la detección de micobacterias.

En 1891, como producto de un trabajo exhaustivo de investigación durante más de una década encaminado a obtener un remedio para prevenir la TB, Koch reportó una sustancia obtenida evaporando el filtrado de bacilos tuberculosos cultivados entre 6 y 8 semanas en medio glicerinado, a la que denominó “tuberculina”. Afirmó que la inoculación de la tuberculina podría prevenir la enfermedad. Posteriormente el mismo investigador pudo concluir que la inmunidad frente a la TB no podría lograrse mediante inoculación del bacilo o productos derivados del mismo, ya que no actuaban sobre el bacilo sino a nivel del tejido enfermo. De todas formas la tuberculina se conservó como uno de los métodos diagnósticos de mayor fiabilidad.

En la primera década del siglo XX, Albert Calmette y Camille Guérin lograron evitar la agregación celular de un cultivo de una cepa virulenta de TB bovina, utilizando un medio a base de patata, glicerina, y suplementado con un detergente. Después de 39 pases de esta cepa observaron un cambio en la morfología colonial. Concientes de la importancia de la atenuación del bacilo tuberculoso para la producción de una posible vacuna, estudiaron esta cepa modificada durante 13 años. Observaron que su inoculación en bovinos, ratones, cerdos, cobayas y chimpancés evitaba la infección durante 30 días después de la infección con bacilo tuberculoso humano o bovino (Calmette, 1927). La cepa obtenida por Calmette y Guérin se convirtió en la primera vacuna viva atenuada contra la TB, y a pesar de su controvertida protección se administró durante varias décadas a neonatos de un gran número de países alrededor del mundo.

Simultáneamente, algunas observaciones pioneras hechas por L. Rénon (1906) concluyeron que en zonas donde funcionaban hornos de cal, no se había detectado ni un sólo caso de TB entre los trabajadores durante más de 10 años. De aquí se dedujo el posible poder curativo de las sales de cal y en general de algunos metales, que fue muy popular en Europa a principios del siglo XX. El danés Holger Mollgaard en 1924 cuando trabajaba sobre el uso terapéutico de metales pesados, sintetizó un compuesto inorgánico (auro-tiosulfato sódico) que al parecer producía una activación inmunitaria beneficiosa para el control de la TB. A pesar de que en 1935 se suspendió el uso en humanos de este medicamento, el auro-tiosulfato motivó el descubrimiento de los primeros antibióticos. Posteriormente con la estreptomycin descubierta por Waksman en 1943, el ácido para-aminosalicílico (PAS) descubierta por Lehman en 1946, la isoniazida (1952), el etambutol (1962) y la rifampicina (1967) se hizo posible tener un tratamiento eficaz y un control sobre la TB.

La combinación entre vacunación con BCG y la quimioterapia con drogas antituberculosas, se disminuyó considerablemente la TB en países industrializados a mediados del siglo XX. Esta estrategia se vio enormemente beneficiada por el bienestar socioeconómico y los avances en el control sanitario alcanzado en estos países. Hoy en día la TB es un buen ejemplo del uso inadecuado de los antibióticos y actualmente esta lejos de estar erradicada.

## A.2. Estado actual de la tuberculosis

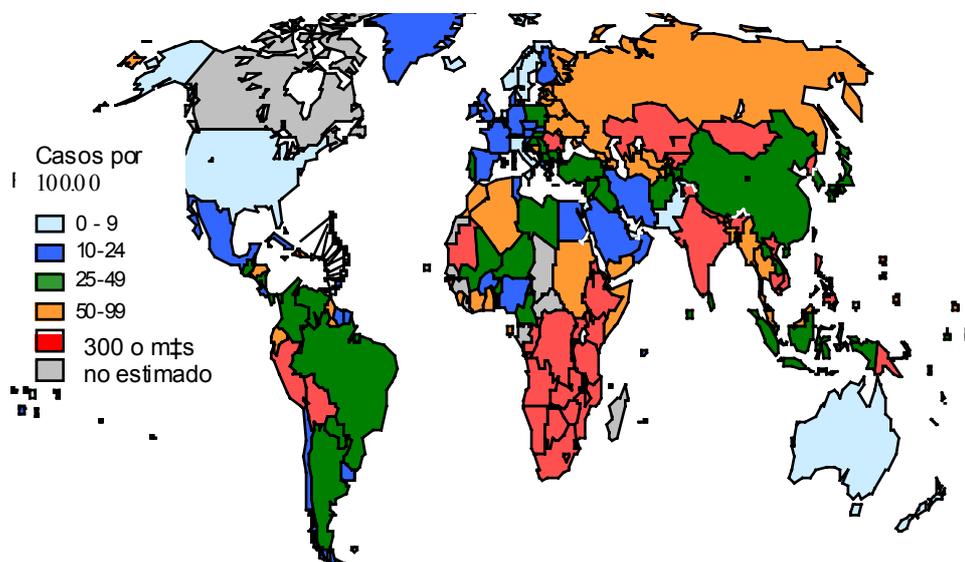
La TB además producir la muerte de cerca de 2 millones de personas al año, posee una prevalencia actual de aproximadamente 16 millones de casos (WHO, 2000).

La OMS en 1991 planteó para el año 2000 por medio de la introducción de un programa efectivo de control, la detección del 70% del total de casos de TB y la posibilidad del tratamiento satisfactorio del 85% de ellos. A partir de esta iniciativa, en 1995 se comenzó a implementar el programa DOTS (*Directly Observed Treatment, Short Course*), que consiste básicamente en un control y seguimiento directo del tratamiento de la TB por parte del personal médico sanitario local, en un total de 212 países alrededor del mundo.

La epidemia global de la TB continúa creciendo a pesar de las actuales medidas de control. El fracaso del tratamiento en muchos casos es debido al acceso limitado a los medicamentos, la mala calidad de algunos de ellos y la no accesibilidad a los programas de control (WHO, 2001). La principal consecuencia de

este fenómeno ha sido la creciente aparición de cepas MDR, un problema que se ha visto agudizado en pacientes inmunosuprimidos infectados con el VIH.

La TB en nuestros días afecta por igual a todos los continentes, especialmente en países con problemas socioeconómicos (Fig. 1). La guerra, pobreza, superpoblación, migraciones humanas y la ausencia de infraestructuras médicas adecuadas contribuyen a la diseminación de la enfermedad. Se calcula que para el año 2020 habrá 200 millones de enfermos y morirán 35 millones de personas por esta enfermedad (WHO, 2000).



**Figura 1. Incidencia global de la tuberculosis en el año 2000.** (Modificada a partir de WHO, 2002).

La aplicación de un sistema eficiente de control y, especialmente, el desarrollo de una nueva vacuna eficaz son objetivos urgentes para acceder a un futuro control de la TB.

### **A.3. Género *Mycobacterium***

#### **A.3.1. Morfología y características generales**

Las micobacterias son bacilos rectos o ligeramente curvos, de entre 0,2-0,7  $\mu\text{m}$  de grosor y 1,0-10 $\mu\text{m}$  de longitud. La alta concentración de lípidos en su pared celular (60% en peso) las hace fuertemente hidrofóbicas, muy resistentes a agentes químicos y con una

reducida permeabilidad a los diferentes colorantes (Wayne y Kubica, 1986). Las micobacterias se colorean con dificultad mediante la tinción de Gram (Metchock *et al.*, 1999), pero una vez teñidas resisten a la decoloración por alcoholes acidificados, por lo que se consideran ácido-alcohol resistentes y Gram positivas. La tinción más característica de las micobacterias es la de Ziehn-Neelsen.

Las micobacterias son microorganismos inmóviles, aerobios o microaerófilos, que no esporulan ni se encapsulan. De acuerdo al manual de Bergey's , el crecimiento de las micobacterias es similar a micelios o filamentos fragmentados en elementos cocoides o rectos (Wayne y Kubica, 1986). La morfología de sus colonias puede variar desde bacterias lisas hasta rugosas entre las distintas especies (Tzukamura, 1981). De igual forma, la mayoría de las especies presentan más de una morfología colonial.

Algunas especies poseen la propiedad de sintetizar pigmentos carotenoides que les otorgan coloraciones que varían entre amarillentas o anaranjadas y rosáceas.

Las micobacterias son resistentes a muchos antimicrobianos de amplio espectro. Por otra parte son sensibles a la estreptomycin, un aminoglicósido que actúa a nivel ribosomal inhibiendo la síntesis de algunas proteínas bacterianas (Zhang y Telenti, 2000), y a la rifampicina que actúa a nivel de síntesis de ácidos nucleicos (Blanchard, 1996). También son sensibles a otros antimicrobianos que actúan en diferentes dianas celulares, tales como la isoniazida (síntesis de ácidos micólicos), pirazinamida (actúa como profármaco), etambutol (síntesis de arabinogalactano, "AG") y fluoroquinonas (inhibición de la ADN girasa). Algunos de estos antimicrobianos poseen una acción exclusiva sobre las micobacterias.

### **A.3.2. Condiciones generales de cultivo**

Las micobacterias requieren de métodos especiales para su estudio debido a su crecimiento lento, o muy lento, y a la especial composición de sus medios de cultivo. Muchas especies saprófitas como *M. smegmatis* pueden crecer en medios con amonio como fuente de nitrógeno, glicerol o glucosa como fuente de carbono, y algunas sales minerales. Las especies patógenas como *M. tuberculosis* necesitan medios mas completos. El caso más complicado es *M. leprae* que no ha podido ser cultivada fuera de células vivas o animales.

Los medios de cultivo más característicos son el Löwestein-Jensen, a base de huevo coagulado, y también semisintéticos con base de agar como el Middlebrook 7H10 y 7H11. Los medios líquidos más utilizados son el Sauton y el Middlebrook 7H9, enriquecidos generalmente con glicerol al 0,5%. Debido a la alta hidrofobicidad de su pared celular, las micobacterias tienden a crecer en forma de agregados en la superficie de los medios líquidos. Los agregados de bacterias pueden ser dispersados suplementando del medio con detergentes aniónicos como el Tween-80 que es derivado del sorbitán mono-oleato.

Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 30-45°C y su tiempo de replicación entre 2-20 horas (Wayne y Kubica, 1986). La velocidad de crecimiento está influenciada por el número de organismos viables en el inóculo inicial. La aparición de colonias en el medio de cultivo puede tardar entre 2-60 días (Tsukamura, 1981)

### A.3.3. Clasificación

El género *Mycobacterium* es el único miembro de la familia *Mycobacteriaceae* que a su vez pertenece al orden de los *Actinomycetes* (Wayne y Kubica, 1986) y suborden *Corynebacterineae*. Esta familia se caracteriza por tener en su ADN un contenido de G+C entre 62-70%, similar al encontrado en géneros de otras bacterias Gram positivas filogenéticamente similares como *Nocardia* (66-69%) y *Rhodococcus* (59-69%).

Cientos de especies de micobacterias han sido descritas pero sólo 41 de ellas han sido incluidas en la "Approved Lists of Bacterial Names" (Skerman *et al.*, 1980). El género *Mycobacterium* se ha clasificado en dos grandes grupos taxonómicos basados en su velocidad de crecimiento: micobacterias de crecimiento rápido y de crecimiento lento (Fig. 2). Las micobacterias de crecimiento rápido, como *M. smegmatis* tienen un tiempo de replicación entre 2-5 horas. A partir de un inóculo diluido y bajo condiciones óptimas de cultivo, sus colonias crecen en menos de 7 días. Por otra parte, las de crecimiento lento que tienen un tiempo de replicación de 13 horas aproximadamente, necesitan más de una semana para producir colonias bajo condiciones similares.

De acuerdo a su pigmentación las micobacterias se pueden dividir en tres grupos: las fotocromógenas, como *M. kansasii* y *M. marinum*, que necesitan de luz para la formación de sus pigmentos, las escotocromógenas como *M. gordonae*, que producen pigmentación incluso en la oscuridad, y finalmente las no cromógenas, que no sintetizan pigmentos como *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Wayne y Kubica, 1986).

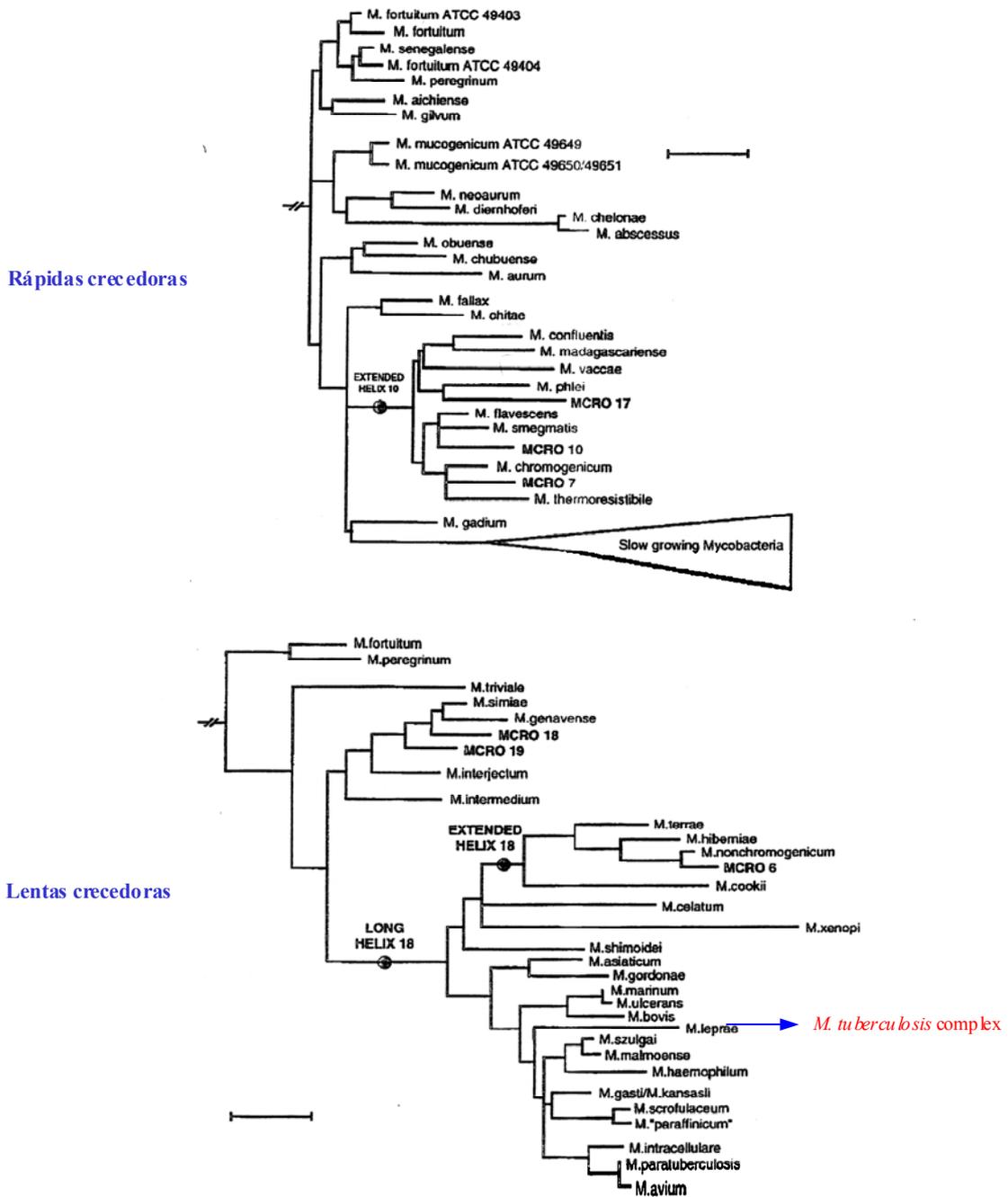


Figura 2 . Clasificación de las micobacterias de acuerdo a su velocidad de crecimiento. Modificada a partir de Springer *et al.*, (1996).

De acuerdo a la estructura de su pared celular, el género *Mycobacterium*, al igual que *Corynebacterium* y *Nocardia*, se clasifica en el quimiotipo IV, al poseer cantidades significativas de ácido

*meso*-diaminopimélico, arabinosa y galactosa (Lechevalier y Lechevalier, 1970). Este quimiotipo posee en su estructura ácidos micólicos de alto peso molecular (30-90 átomos de carbono).

Mediante análisis por hibridación ADN/ARN y ADN/ADN, y estudios de comparación de las secuencias del rARN 16S, se confirma la relación filogenética tradicional entre micobacterias de crecimiento rápido y de crecimiento lento. Además, a pesar de las diferencias bioquímicas evidentes entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* y demás miembros del complejo *M. tuberculosis*, su homología observada mediante hibridación ADN/ADN y la secuencia de sus rARN 16S valida fuertemente su clasificación dentro del mismo complejo (Frothingham, 1995).

También existe una posible correlación entre el número de ribosomas, que esta directamente relacionado con los operones utilizados para sintetizar rARN (*rrn*), y la velocidad de crecimiento de las micobacterias. Se ha demostrado que micobacterias de crecimiento rápido como *M. phlei* y *M. smegmatis* poseen dos operones *rrn* (*rrnA* y *rrnB*), mientras que micobacterias de crecimiento lento como *M. leprae* y *M. tuberculosis* poseen un único operón *rrn* (Bercovier *et al.*, 1986).

### A.3.4. Envoltura de las micobacterias

La envoltura micobacteriana es un conjunto muy complejo de moléculas que además de constituir la interfase entre la bacteria y la célula huésped, la protege, le da forma y le proporciona los mecanismos necesarios para el tráfico de sustancias entre el interior y exterior celular. El conocimiento de su estructura es indispensable para entender la relación entre las micobacterias patógenas y las células huésped. Se conocen actividades biológicas importantes de algunos componentes de la envoltura de las micobacterias que contribuyen a su patogenicidad. Estos componentes están muy probablemente implicados en procesos de protección ante la respuesta inmunitaria del huésped y de resistencia a los antimicrobianos (Daffé y Draper, 1998).

Aunque las micobacterias sean organismos Gram positivos, la composición de su envoltura difiere un poco de la de otras bacterias del mismo grupo. Se cree que la gran composición en lípidos de la pared de las micobacterias hace muy lento su crecimiento, debido principalmente al alto consumo energético en su biosíntesis y a la baja permeabilidad hacia el exterior.

Los principales componentes estructurales de la envoltura de las micobacterias son: la membrana plasmática, la pared y la cápsula (Fig. 3) (Brennan y Nikaido, 1995).

Para ver esta película, debe  
disponer de QuickTime™ y de  
un descompresor Photo - JPEG.

**Figura 3. Representación esquemática de la pared de las micobacterias.** (Chatterjee, 1997).

### **A.3.4.1. Membrana plasmática**

La membrana plasmática de *Mycobacterium*, como la de otras bacterias, cumple básicamente la función de protección osmótica y de transporte de iones y moléculas. Su estructura esta constituida por una bicapa lipidica a la que están asociadas proteínas y algunos lipopolisacáridos distintivos como lipoarabinomanano (LAM) y lipomanano (LM). También están asociados a su estructura fosfolípidos como fosfatidilinositolmanósidos (PIM), fosfatidilgliceroles, cardiolipinas y fosfatidiletanolaminas (PE) (Besra *et al.*, 1997). Algunos de estos lípidos (PIM y PE) han sido también extraídos mecánicamente a partir de las capas más externas de la envoltura de las micobacterias (Ortalo-Magné *et al.*, 1995). Por estudios de microscopía electrónica se ha podido conocer que no existe una membrana externa adicional, característica de las bacterias Gram negativas, corroborando así el carácter de Gram positivo de las micobacterias (Silva y Macedo, 1983). También existe evidencia de la interacción entre la parte más externa de la membrana plasmática, y la parte inicial de pared celular que hace la función de barrera impermeable similar a la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Brennan y Nikaido, 1995).

## Lipoarabinomanano (LAM)

El LAM es un importante lipopolisacárido de la envoltura que se encuentra presente en todas las especies de micobacterias. No se conoce con certeza su posición en la envoltura, aunque se ha demostrado que se encuentra anclado a la membrana plasmática. Se considera que el LAM atraviesa toda la envoltura de la micobacteria, ha sido posible su extracción de la mayoría de las capas de la envoltura celular. La reactividad de células completas de micobacterias con anticuerpos dirigidos contra LAM (Daffé y Etienne, 1999) sugiere que este lipooligosacárido se encuentra presente en las capas más externas de la envoltura. La teoría de que LAM atraviesa toda la envoltura micobacteriana ha sido incluso corroborada por el modelo alternativo de pared celular publicado recientemente (Dmitriev *et al.*, 2000).

El LAM está compuesto por un grupo PI anclado a la membrana plasmática y unido de forma covalente a AM. La estructura de su parte polisacárida posee una cadena principal de subunidades D-Man<sub>p</sub> unidas por enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$ , a la cual unen residuos D-Man<sub>p</sub> por enlaces  $\alpha(1\rightarrow2)$  y residuos D-Araf unidos a su vez por enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  (Fig. 4) (Azuma *et al.*, 1968). Además de manosa y arabinosa, también está compuesto por glicerol, inositol, fosfato, lactato, succinato, palmitato y tuberculoestearato (Hunter *et al.*, 1986). Los grupos palmitato y tuberculoestearato están asociados al PI, mientras que sus grupos succinato y lactato supuestamente esterifican algunos grupos hidroxilo de su parte polisacárida.

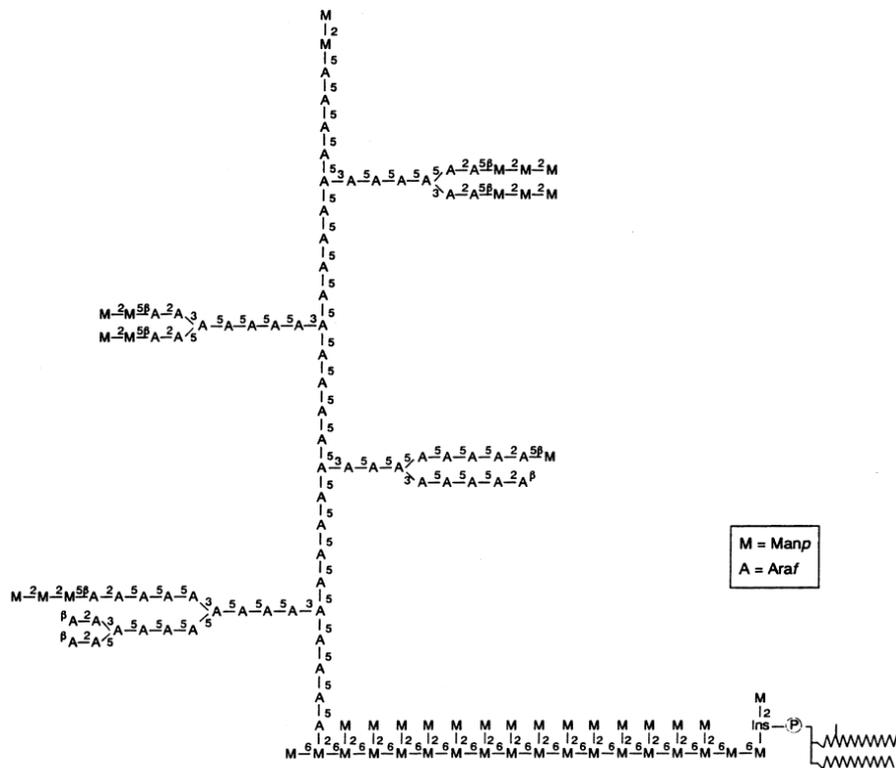


Figura 4. Estructura molecular del LAM de *M. tuberculosis*. (Besra y Chatterjee, 1994).

Los extremos de LAM en las especies patógenas y de crecimiento lento (*M. tuberculosis* y *M. bovis*) generalmente terminan en residuos de manosa (ManLAM), a diferencia de los de las especies de crecimiento rápido (*M. smegmatis*) que terminan en residuos de PI (AraLAM) (Daffé y Draper, 1998).

Se ha sugerido que el LAM está implicado en el proceso de unión e internalización de las micobacterias virulentas al macrófago, a través del receptor de manosa (MR) (Daffé y Etienne, 1999). El ManLAM de la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv se une fuertemente al MR, mientras que el mismo polisacárido de la cepa atenuada H37Ra, o el PI de *M. smegmatis*, se une de forma poco eficiente al MR.

Tanto la mitad PI como el AM de la estructura del LAM presentan importantes actividades biológicas independientes. En su conjunto exhiben un amplio espectro de funciones inmunoregulatoras como la activación de células T, la inhibición de la activación de macrófagos murinos mediada por interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), el secuestro de radicales libres de oxígeno potencialmente citotóxicos y la regulación en los macrófagos de la producción de citoquinas involucradas en las manifestaciones clínicas de la TB y la lepra (Besra y Chatterjee, 1994).

#### **A.3.4.2. Pared celular**

La base estructural de la pared micobacteriana es el esqueleto insoluble (mAGP) formado por la unión covalente entre peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y los ácidos micólicos. El mAGP se encuentra asociado mayoritariamente a lípidos y glicolípidos de forma no covalente. El PG está unido preferentemente a lípidos (ésteres de ácidos micólicos), a diferencia de otras bacterias Gram positivas donde se encuentra asociado a proteínas o polisacáridos (Lederer *et al.*, 1975).

La abundante presencia de ácidos micólicos en la pared celular le confiere a las micobacterias un carácter altamente hidrofóbico. Los ácidos micólicos presumiblemente están organizados formando una barrera al flujo de moléculas polares. El flujo de moléculas a través de la pared se incrementa a medida que se aleja de la membrana plasmática, hasta la parte más externa donde se hace mayor (Liu *et al.*, 1996).

La estructura tridimensional de la pared de las micobacterias se conoce clásicamente como una organización de cadenas de PG y AG organizadas en capas horizontales ubicadas en forma paralela a la membrana plasmática. Asociada a ellas estaría una monocapa de cadenas carbonadas de ácidos micólicos de forma perpendicular al PG y AG en la parte externa, estableciendo una especie de barrera hidrofóbica que haría las funciones de membrana externa (Chatterjee, 1997) (Fig. 3).

Recientemente se ha descrito un modelo tridimensional de la pared celular en el que el PG y el AG están organizados en cadenas helicoidales cortas ubicadas perpendicularmente a la membrana citoplasmática (Dmitriev *et al.*, 2000). Este nuevo modelo considera una estructura sólida y elástica donde los ácidos micólicos están fuertemente empaquetados explicando así la alta hidrofobicidad y la resistencia a los antimicrobianos.

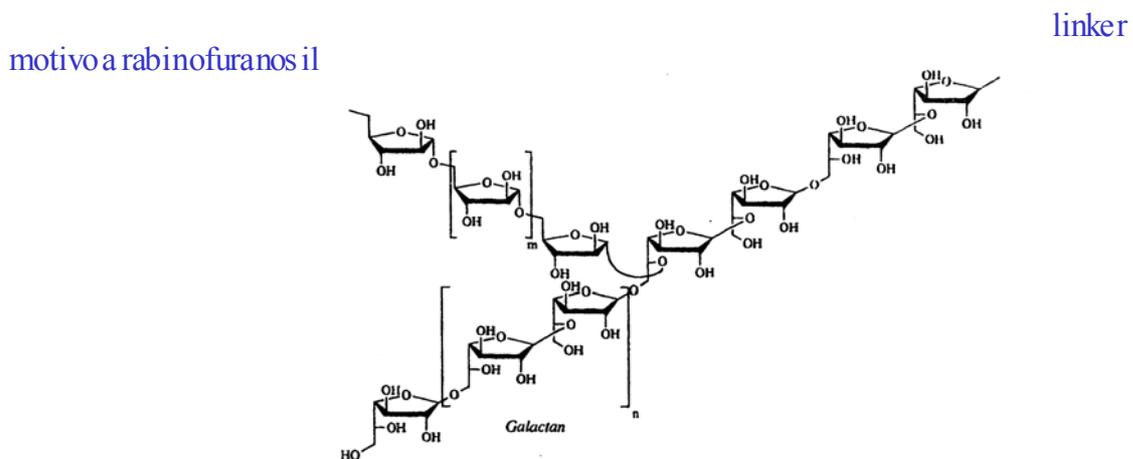
Cualquiera que sea el modelo correcto, la estructura fundamental de la pared proporciona las bases estables de los procesos que deben ocurrir entre el interior y exterior celular, resumidos en: secreción de proteínas, secreción de lípidos y toma de moléculas.



### A.3.4.2.2. Arabinogalactano (AG)

El AG en la mayoría de las micobacterias representa aproximadamente el 35% de su pared celular (Draper, 1982). Este polisacárido también está presente en otras bacterias relacionadas como corinebacterias, rododocos y nocardias. El AG es un compuesto serológicamente activo que posee reactividad cruzada con antiseros producidos contra la pared de diferentes especies de micobacterias, e incluso también con anticuerpos que reconocen la pared de otras bacterias relacionadas (Daffé *et al.*, 1990).

Algunos estudios desarrollados desde hace varias décadas han demostrado que el AG está compuesto exclusivamente de D-galactofuranos y D-arabinofuranos, azúcares muy raros en la naturaleza (Chatterjee, 1997). Estos azúcares se organizan en el AG de una forma muy inusual en comparación a otras bacterias. Mediante análisis de los oligómeros liberados por depolimerización parcial del AG per-O-metilado, se ha podido establecer que el AG está compuesto por tres cadenas de arabinano (27 D-arabinofuranos) unidas a un núcleo de homogalactano (32 residuos de D-galactofuranosa) que alterna linealmente uniones 5 y 6  $\beta$ -D-galactofuranosa (Fig. 6). Las cadenas de homoarabinano están compuestas por residuos lineales de  $\alpha$ -D-arabinofuranosa, con ramificaciones producidas por uniones 3,5  $\alpha$ -D-arabinofurasil (Daffé y Draper, 1998). El extremo no reducido de las cadenas de arabinano está formado por unidades de pentaarabinosa.



**Figura 6. Arabinogalactano.** El AG se une por el linker a la molécula de PG. Modificada a partir de Lee *et al.*, (1996)

El efecto antimicrobiano del etambutol sobre las micobacterias se fundamenta en la inhibición de la biosíntesis de AG. La síntesis de tanto el D-arabinano como D-galactano es inhibida impidiendo la unión de ácidos micólicos.

Se conoce el efecto inhibitorio del AG sobre la proliferación de células T (Moreno *et al.*, 1988). También se ha demostrado recientemente que mutantes de *M. smegmatis* defectivos en galactofurano a condiciones no permisivas presentan un crecimiento deficiente, lo que hace evidente el papel esencial del AG en el crecimiento micobacteriano (Pan *et al.*, 2001).

### **A.3.4.2.3. Ácidos micólicos**

Los ácidos micólicos son ácidos grasos  $\alpha$ -ramificados y  $\beta$ -hidroxilados de alto peso molecular ( $C_{70}$ - $C_{90}$ ) que se encuentran presentes en todas las especies de micobacterias (Assileneau y Lederer, 1950). También están presentes en corinebacterias y nocardias, pero las cadenas de sus ácidos grasos no son tan largas como en las micobacterias. Los ácidos micólicos se encuentran principalmente esterificando al AG (Fig. 3), y también de forma fluida esterificando trehalosa para formar dimicolatos de trehalosas (TDM), o monomicolatos de trehalosa (MMT).

Se conocen dos familias de ácidos micólicos:  $\alpha$ -micolatos, sin ningún grupo funcional oxigenado, y los micolatos oxigenados (Fig. 7). La  $\alpha$ -ramificación de los ácidos micólicos se conserva en todas las familias variando su longitud. Está compuesta por una cadena insaturada cuyo tamaño puede variar entre 20-26 átomos de carbono. La  $\beta$ -ramificación puede variar entre 40-60 átomos de carbono, presentar una o dos insaturaciones (dobles enlaces o anillos de ciclopropano) y grupos ceto, epoxi metoxi, o carboxílicos estableciendo así la principal clasificación de los micolatos.

$\alpha$ - micolatos

ketomicolatos

metoximocolatos

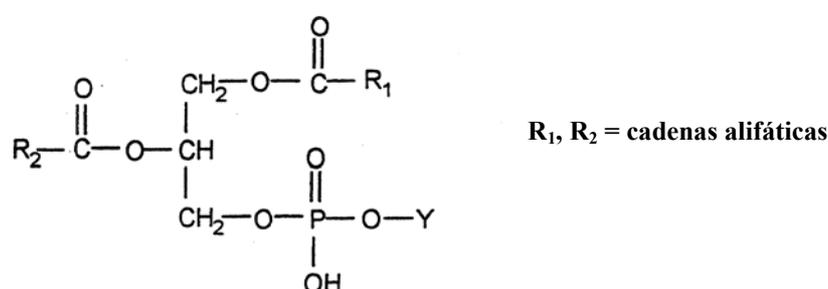
**Figura 7. Micolatos de *Mycobacterium tuberculosis*.** Modificada a partir de Lee *et al.*, (1996).

Las diferentes especies de micobacterias generalmente contienen mezclas complejas de diferentes tipos de micolatos, que pueden ser fraccionadas por cromatografía en columna o por CCF. El ejemplo más representativo de fraccionamiento y clasificación es el análisis mediante CCF-2D de micolatos obtenidos mediante metanólisis ácida y alcalina (Minnikin *et al.*, 1984). Los diferentes patrones obtenidos son útiles y aceptados en la clasificación taxonómica de las micobacterias (Goodfellow y Magee, 1998).

### A.3.4.2.4. Fosfolípidos (PL)

Los PL generalmente se encuentran asociados a la membrana celular de las bacterias. Debido a la alta composición en manosa de las micobacterias, sus PL se encuentran fuertemente relacionados a la estructura de su pared celular (Goren y Brennan, 1979).

Los PL de las micobacterias son constituidos casi exclusivamente por fosfodiácilglicerol derivados del ácido fosfatídico, tales como: fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, PE y manósidos del PI (Fig. 8 y tabla 1). Los PIM son los más comunes y mejor caracterizados entre los PI. Los PIM y PE se encuentran habitualmente presentes en las micobacterias y organismos relacionados (Minnikin, 1982).



**Figura 8. Estructura general de los fosfolípidos de las micobacterias.**

**TABLA 1. Fosfolípidos presentes en las micobacterias**

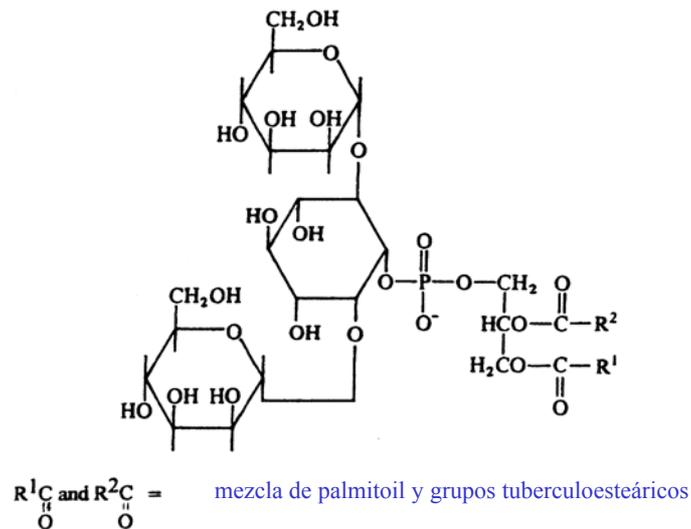
| Sustituyente en Y  | Fosfolípido                       |
|--------------------|-----------------------------------|
| Glicerol           | Fosfatidilglicerol                |
| Fosfatidilglicerol | Difosfatidilglicerol              |
| Inositol           | Fostatidilinositol (PI)           |
| Inositol manósido  | Fosfatidilinositolmanósidos (PIM) |
| Etanolamina        | Fosfatidiletanolamina             |

### Fostatidilinositolmanósidos (PIM)

Los PIM son fosfolípidos que intervienen activamente en la interacción entre la micobacteria y la célula huésped. Estos compuestos actúan como adhesinas permitiendo la unión al macrófago por medio de MR y facilitando así su fagocitosis (Vergne y Daffé, 1998).

La estructura de los PIM está constituida fundamentalmente por una mitad glicerol fosfato unida en la posición L-1 a un anillo de inositol, al cual también están unidos glicosídicamente dos residuos de manosa

en las posiciones 2 y 6 (Fig. 9). Los mono-(PIM) y diacil-fosfatidilinositol dimanósidos (PIM<sub>2</sub>) son mayoritarios en corinebacterias y nocardias, mientras que los penta-(PIM<sub>5</sub>) y exa-(PIM<sub>6</sub>) son característicos de las micobacterias especialmente en *M. tuberculosis* (Ballou *et al.*, 1965). También se conoce la presencia de mono y diacilfosfatidilinositol pentamanósidos en *M. tuberculosis*. Se han aislado moléculas de PIM<sub>2</sub> a partir de *M. tuberculosis*, conteniendo dos, tres y hasta cuatro residuos acilados adicionales.



**Figura 9.** Fosfatidilinositolmanósidos (PIM). Modificada a partir de Besra y Chatterjee, (1994).

### **A.3.4.3. La cápsula**

Mediante algunos experimentos de microscopía electrónica realizados hace varias décadas, se evidenció la existencia de una capa externa a la pared celular en todas las especies de micobacterias. Esta capa externa, denominada cápsula, constituye la interfase entre la micobacteria y el huésped (Chapman *et al.*, 1959; Rastogi *et al.*, 1986). La cápsula, entre otras funciones, controla los componentes que pueden alcanzar el interior de la bacteria, protege del ataque por agentes antimicrobianos y modula la respuesta inmune del huésped (Daffé y Etienne, 1999).

Esta capa superficial varía en grosor y apariencia (fibrilar, granular u homogénea) dependiendo de la especie. Algunas técnicas de preparación de muestras y los medios de cultivo pueden influir en su variación. La composición de la cápsula varía cualitativa y cuantitativamente según la especie de micobacteria. Se encuentra constituida principalmente por polisacáridos, proteínas y sólo pequeñas cantidades de lípidos, formando una matriz que se enriquece en lípidos a medida que se aproxima a la pared celular (Ortalo-Magné *et al.*, 1995). Los componentes de la cápsula no se encuentran unidos de forma covalente al esqueleto mAGP. En su estructura se encuentran presentes mayoritariamente glucano, AM y otros oligo y polisacáridos. Los polisacáridos de la cápsula evidencian su naturaleza aniónica al reaccionar fuertemente con el rojo de rutenio, un colorante utilizado en la identificación de polisacáridos ácidos (Picard *et al.*, 1984). Algunos lípidos como PIM y PI que se encuentran mayoritariamente en la membrana, también se pueden presentar en la cápsula en pequeñas cantidades.

#### **A.3.4.3.1. Glicolípidos**

Las micobacterias sintetizan una gran variedad de glicolípidos de estructura característica, algunos de ellos muy abundantes en la envoltura y expuestos directamente en la superficie bacteriana.

Entre los componentes de la envoltura, los glicolípidos debido a su efecto inhibitorio sobre las actividades antimicrobiales de los macrófagos y sobre la limfoproliferación, se pueden considerar como posibles factores de virulencia (Vergne y Daffé, 1998).

##### **A.3.4.3.1.1. Micósidos**

El estudio de los micósidos se realizó inicialmente mediante microscopía infrarroja, durante la caracterización de fracciones inmunoactivas presentes en la pared de algunas micobacterias patógenas. Estos supuestos lípidos especie-específicos detectados en la pared se denominaron “micósidos”

##### **A.3.4.3.1.1.1 Glicopeptidolípidos (GPL)**

Los GPL son los principales glicolípidos de la capa más externa de las micobacterias del grupo *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* (MAIS), aunque también en micobacterias saprófitas como *M. smegmatis*.

Los GPL desempeñan un papel fundamental en la supervivencia de las micobacterias en el macrófago. Se conoce que estos glicolípidos inhiben la proliferación *in vivo* e *in vitro* de células esplénicas mononucleares (Puzo, 1990). En su estructura presentan un núcleo lipopeptidil que consiste en una cadena acílica (C<sub>30</sub>) y un tripéptido compuesto de los aminoácidos D-fenilalanina, D-*allo*-treonina, y D-alanina (Vergne y Daffé, 1998). Presentan también un grupo sacaridilo unido al hidroxilo de la *allo*-treonina o L-alaninol.

Los GPL definen los diferentes serotipos del grupo *MAIS*. También están involucrados en la morfología lisa de algunas cepas de *M. smegmatis*.

### **A.3.4.3.1.1.2 Fenolglicolípidos (PGL)**

Los PGL se encuentran en micobacterias patógenas obligadas y oportunistas que incluyen el complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis* y *M. bovis*), *M. leprae*, *M. marinum*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans*, como también en *M. kansasii* y *M. canetti*.

La parte lipídica de los PGL esta compuesta por fenol-tiocerol esterificado por dos ácidos grasos multiramificados (micocerósico o tioceránico). Su parte glucosídica está compuesta por entre uno a cuatro azúcares que en ocasiones se presentan *O*-metilados.

El PGL de *M. leprae* (PGL-I) es el principal componente de la zona transparente observada por microscopía electrónica alrededor del bacilo leproso. Este glicolípidos también ha sido detectado en células de hígado de armadillos infectados con *M. leprae* (Asselineau y Lanéelle, 1998). La presencia de anticuerpos contra PGL-I en pacientes leproso define su utilidad para la serodiagnos de la lepra.

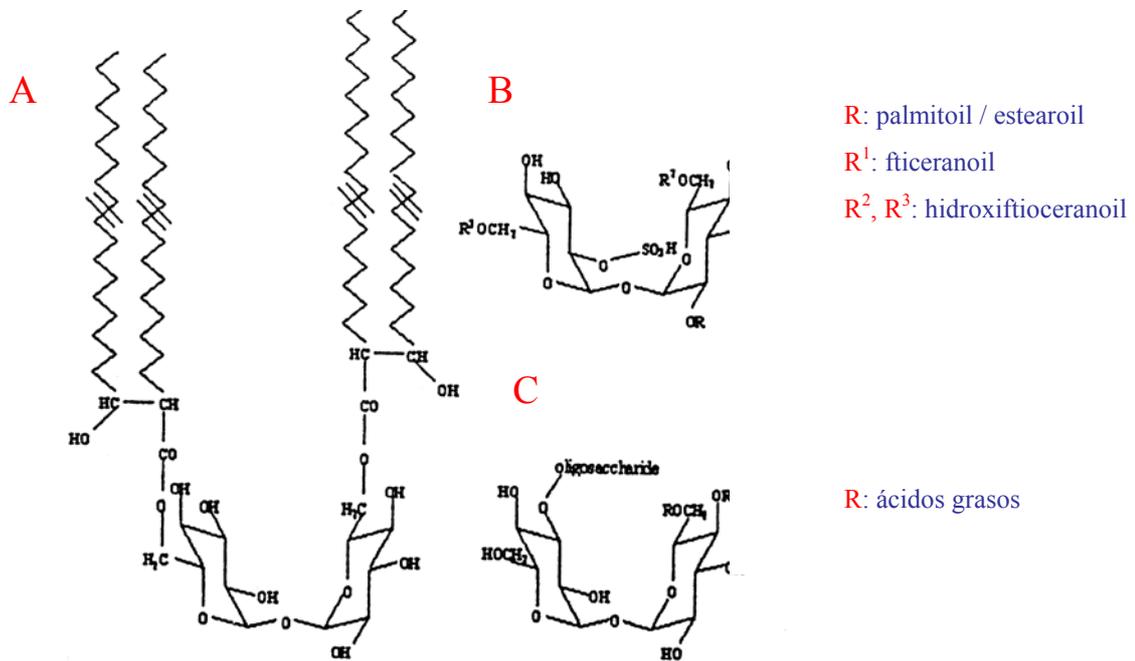
### **A.3.4.3.1.2. Lipooligosacáridos (LOS)**

Los LOS son antígenos que se encuentran en algunas especies de micobacterias como por ejemplo *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. canetti*, etc. En su estructura se encuentra un núcleo común de poliacil trehalosas *O*-metiladas, que está glicosilado por una unidad mono o polisacárida. En una misma micobacteria los LOS se presentan como una mezcla de compuestos que se diferencian por la composición del núcleo oligosacárido y por el número de ácidos grasos que la substituyen.

Mediante estudios inmunoquímicos se ha demostrado que los LOS se encuentran expuestos en la superficie micobacteriana. Algunas características como la inmunogenicidad, la mediación en la unión a micobacteriófagos y la rugosidad de la morfología colonial son asociadas a la presencia de LOS (Asselineau y Lanéelle, 1998).

### **A.3.4.3.1.3. Aciltrehalosas**

A mediados del siglo XX, Middlebrook y colaboradores (1947) observaron que los cultivos de las cepas virulentas de *M. tuberculosis* en medio líquido, se podían diferenciar de los de cepas avirulentas o de micobacterias no tuberculosas por su crecimiento característico en forma de “cuerdas ó serpentinadas”. Los mismos autores desarrollaron un método citoquímico para la diferenciación entre cepas virulentas y avirulentas de *M. tuberculosis* de acuerdo a su capacidad de fijar el colorante básico RN (Dubos y Middlebrook, 1948). Basado en sus observaciones, Middlebrook postuló que los compuestos estructurales de la envoltura de *M. tuberculosis* relacionados con la fijación de RN podrían estar implicados en la virulencia del bacilo tuberculoso. La búsqueda de estos compuestos condujo a la descripción de dos de los principales tipos de glicolípidos derivados de la trehalosa: el “cord factor” y los sulfolípidos (Fig. 10).



**Figura 10. Glicolípidos derivados de la trehalosa.** Dimicolato de trehalosa (A), sulfolípidos (B) y lipooligosacáridos (C). Modificada a partir de Asselineau y Lanéelle, (1998).

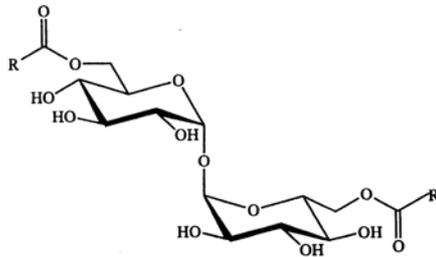
Las aciltrehalosas son compuestos que comparten una estructura  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil  $\alpha$ -D-glucopiranosido o  $\alpha$ -D-trehalosa) y se agrupan en diferentes familias (Fig. 10). Este disacárido característico también se encuentra presente en otras bacterias, además de hongos, algas e insectos, en los que cumple una función de reserva energética.

### A.3.4.3.1.3.1. Dimicolato de trehalosa (TDM)

H. Bloch (1950) observó que las “cuerdas o serpentina” formadas por las cepas virulentas de *M. tuberculosis* al crecer en medio líquido, se disociaban fácilmente por medio de una extracción suave con éter de petróleo. El extracto lipídico obtenido resultaba tóxico al ser inyectado en ratones. La identificación inicial del principal compuesto constituyente del extracto etéreo condujo al descubrimiento del “cord factor”. Posteriormente se ha demostrado que el “cord factor” no es el responsable del crecimiento en cordones de las cepas virulentas, éste glicolípidos se ha encontrado presente en todas las micobacterias, excepto *M. leprae*.

Estructuralmente el “cord factor” es un 6,6'-dimicolato de  $\alpha$ , $\alpha'$ -D-trehalosa (TDM) (Fig. 11). Su trehalosa se encuentra esterificada por los mismos ácidos micólicos presentes en la pared celular, los cuales difieren en el número de átomos de carbono a los ácidos micólicos presentes en el “cord factor” de *Nocardia*, *Rhodococcus* (Itoneda *et al.*, 1970) o *Corynebacterium* (Seen *et al.*, 1967). Aunque inicialmente la

localización del TDM se asumió en la superficie celular, algunos estudios de la composición glicolípida de la parte más superficial de la envoltura de determinadas micobacterias lo identifican únicamente en la superficie en *M. aurum* (Ortalo-Magné *et al.*, 1996).



**Figura 11. 6'-Dimicolato de trehalosa, "Cord Factor".** (Lee *et al.*, 1996).

Entre las principales actividades biológicas reconocidas para el TDM se encuentran su efecto inductor de toxicidad sistémica mediada por citoquinas (Kato, 1973) y su efecto sinérgico con los SL de *M. tuberculosis* en la disfunción de las mitocondrias (Kato, 1974). También es reconocida su actividad granulogénica, junto a su efecto sobre la liberación de factores quimiotácticos por los macrófagos (Matsugana *et al.*, 1990). Es importante resaltar su acción en la desintegración estructural *in vivo* de las membranas de las mitocondrias, que implica una disminución de la respiración y de la fosforilación (Kato, 1970). Se conoce que induce la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF) (Silva y Faccioli, 1988) y la migración de los leucocitos (Goren y Brennan, 1979). Recientemente se ha demostrado que el TDM es un componente importante en la respuesta innata del macrófago frente a la infección tuberculosa, especialmente en la producción de mediadores de la respuesta inflamatoria como IL-6 e IL12, pero no de óxido nítrico (Indrigo *et al.* 2002).

### A.3.4.3.1.3.2. Sulfolípidos (SL)

Los SL son componentes exclusivos de la pared de *M. tuberculosis* y han sido relacionados con la tinción de cepas virulentas con RN. Aún cuando corresponde a Middlebrook la primera descripción de los SL, fue Goren quien los caracterizó (Goren 1970a y 1970b). A partir de *M. tuberculosis* H37Rv aisló un material ácido que describió como una familia de aciltrehalosas sulfatadas (Fig. 12) con cuatro grupos acilo: tres de ellos sobre el primer residuo de glucosa y uno sobre el residuo que tiene unido un grupo sulfato.

Mediante cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa) se identificaron cinco miembros de la familia de SL. El principal denominado SL-I, es 2,3,6,6'-tetracil  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -trehalosa 2'-sulfato. Los ácidos grasos palmítico, esteárico y polimetil ramificados (hidroxiftioceránico y ftioceránico) esterifican la trehalosa (Fig. 12) (Goren *et al.*, 1976a). Diferentes combinaciones de estos ácidos originan las cinco familias de SL presentes en *M. tuberculosis* H37Rv (tabla 2).

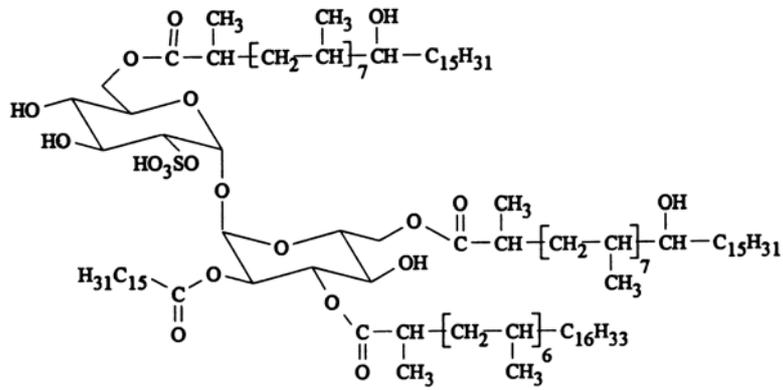


Figura 12. SL-I de *M. tuberculosis*. (Besra y Chatterjee, 1994).

TABLA 2. Sulfolípidos de *M. tuberculosis*. (Besra y Chatterjee, 1994).

| Sulfolípido | Acilación | Número de residuos acilo |              |                     |
|-------------|-----------|--------------------------|--------------|---------------------|
|             |           | Palmitato/Estearato      | ftioceranato | Hidroxiftioceranato |
| SL-I        | 2,4,6,6'  | 1                        | 0            | 3                   |
| SL-I'       | 2,3,6,6'  | 1                        | 0            | 3                   |
| SL-II       | 2,3,6,6'  | 1                        | 1            | 2                   |
| SL-II'      | 2,3,6,6'  | 1                        | 2            | 1                   |
| SL-III      | 2,3,6     | 1                        | 0            | 1                   |

Algunas actividades biológicas interesantes han sido descritas para el SL-I. Ejerce un efecto sinérgico junto al TDM contra las membranas de las mitocondrias (Kato, 1974), estimula la generación de superóxidos y el bloqueo de la respuesta a lipopolisacáridos e IFN- $\gamma$  en neutrófilos humanos (Pabst *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1991), como también estimula el bloqueo de la iniciación de monocitos por TNF- $\alpha$ . Los SL despertaron gran interés al conocerse que aparentemente evitaban la fusión fagosoma-lisosoma (Goren *et al.*, 1976b), pero mediante rigurosos experimentos se demostró posteriormente que existían artefactos experimentales que hacían dudosa esta característica (Goren *et al.*, 1987a y b).

### A.3.4.3.1.3.3. Otras acil trehalosas

En *M. phlei* y *M. smegmatis* se encuentran trehalosas esterificadas con ácidos fleicos. Además existen trehalosas exclusivas de *M. tuberculosis* como las polifiteoniltrehalosas (PPT).

También se encuentran las 2,3-diaciltrehalosas (DAT), en las que la molécula de trehalosa está esterificada por dos ácidos grasos polimetilados en el extremo carboxilo terminal (Baer, 1993).

Las triaciltrehalosas (TAT) son similares a las DAT pero poseen una tercera molécula de ácidos grasos esterificando la trehalosa (Muñoz *et al.*, 1997).

#### **A.4. Identificación y diferenciación de *M. tuberculosis***

El diagnóstico de la TB se ha basado fundamentalmente en: la identificación bacteriológica del bacilo tuberculoso, el análisis radiológico de pacientes, y la aplicación del test de la tuberculina o PPD. Con menor frecuencia el examen histológico ha servido para la detección de las formas extrapulmonares de la enfermedad.

El uso de la baciloscopia, o detección de bacilos AFB mediante la tinción de Ziehl-Neelsen (Kent y Kubica, 1985), ha sido una de las herramientas más importantes para la detección del bacilo tuberculoso y por lo tanto para el diagnóstico de la TB en el laboratorio clínico. A pesar de ello, hasta la demostración del bacilo tuberculoso en cultivo, un procedimiento que requiere de varias semanas para conocer el resultado final, no se cuenta con un diagnóstico certero de la enfermedad.

Diferenciar *M. tuberculosis* de otras micobacterias representa un aspecto clínico muy relevante. Después de detectar los AFB, es necesaria su confirmación mediante la obtención del cultivo y la realización de algunos test bioquímicos para la identificación de *M. tuberculosis*. Los tests que rutinariamente se realizan son: la acumulación de niacina (Konno, 1956), reducción de nitratos (Virtanen, 1960), actividad pirazinamidasasa (PZA) (Wayne, 1974), resistencia a la hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico o TCH (Bönicke, 1958), o la actividad catalasa (Kent y Kubica, 1986).

El incremento del número de casos de TB también ha forzado el desarrollo de nuevas técnicas de detección e identificación del bacilo tuberculoso que básicamente han permitido la reducción del tiempo de cultivo en un medio sólido tradicional. Mediante las técnicas actuales, se ha logrado una identificación rápida, sensible y específica del complejo tuberculoso mediante cultivos radiométricos en medio BACTEC 7H12. Este sistema también es utilizado para detectar la resistencia a fármacos (Roberts *et al.*, 1991). En la actualidad se dispone de algunos métodos moleculares de identificación y por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

### A.4.1. La baciloscopia

En la baciloscopia se basa el diagnóstico bacterioscópico de la TB. Debido a que todas las especies de micobacteria son ácido alcohol resistentes, un AFB positivo no es una evidencia suficiente para el diagnóstico de la TB. La baciloscopia por sí sola no especifica la presencia de *M. tuberculosis*.

La detección de AFB mediante la tinción de Ziehl-Neelsen se puede realizar directamente a partir de la muestra clínica, concentrada o no, lo que equivale a una rápida indicación de la existencia de micobacterias. Específicamente las muestras son teñidas con fenol de fuscina para después ser tratadas con alcohol acidificado. Las micobacterias retienen el colorante a diferencia de otras bacterias que no pueden incorporarlo. Después de la tinción los bacilos se ven de color rojo al microscopio óptico, en forma de cordones, agrupamientos o en empalizada (Joklik *et al.*, 1986).

### A.4.2. El cultivo

El cultivo es un método muy sensible. Esta metodología produce resultados positivos hasta con una concentración de 10 bacilos/ml de muestra (Farga, 1989). El medio sólido Lowenstein-Jensen es históricamente el más utilizado para el aislamiento de *M. tuberculosis*. Los medios agar Middlebrook 7H10 (Middlebrook *et al.*, 1960) y 7H11 (Cohn *et al.*, 1968) permiten un crecimiento más rápido del cultivo con mayores posibilidades para el estudio de la morfología colonial. El medio selectivo 7H11 contiene sustancias que inhiben el crecimiento de otras bacterias que sobrevivan al pretratamiento enzimático y fuertemente alcalino al que se somete la muestra aislada del paciente.

Los medios líquidos pueden ser utilizados para un aislamiento primario de *M. tuberculosis* a partir de esputo, únicamente si son selectivos. El más conocido es el caldo Middlebrook 7H12 (Middlebrook *et al.*, 1977) también conocido comercialmente como BACTEC 12B (*Becton-Dickinson*). Este medio parte del sistema BACTEC TB-460 TB (*Johnson laboratories*), se utiliza principalmente para la detección radiométrica del crecimiento, como. El crecimiento de *M. tuberculosis* se puede detectar en 10 días, al medir la liberación de CO<sub>2</sub> radioactivo que se desprende al metabolizar ácido palmítico <sup>14</sup>C incorporado inicialmente en el medio. Este sistema incluye una solución decontaminante (PANTA) compuesta por una combinación de 5 antibióticos.

El MGIT (*Mycobacteria growth indicator tubes*) es un método rápido no radioactivo para crecimiento de micobacterias. Consiste en tubos con caldo Middlebrook 7H9-OADC, PANTA y glicerol, con un indicador fluorescente dentro de silicona en el fondo. El crecimiento de la micobacteria se detecta mediante la aparición de fluorescencia de color naranja al exponer los tubos a la luz UV (365 nm).

### A.4.3. Pruebas bioquímicas

La identificación de *M. tuberculosis* se puede lograr mediante una combinación de tres test: producción de niacina, reducción de nitratos y catalasa. El resultado se puede corroborar con los tests de resistencia a TCH y PZA.

### **A.4.3.1 Niacina**

La niacina es útil para la identificación de *M. tuberculosis* (Konno, 1956), pero también produce resultados positivos con otras micobacterias como *M. simiae* y algunas cepas de BCG. El test de la niacina se basa en la capacidad de algunas micobacterias para producir ácido nicotínico, que al reaccionar con bromuro de cianógeno produce un compuesto intermediario que al reaccionar con anilina adquiere una coloración amarilla.

### **A.4.3.2 Reducción de nitrato**

Este test se fundamenta en la reducción de nitratos por ciertas micobacterias productoras de enzimas nitrato reductasas. Su aplicación permite la diferenciación entre *M. tuberculosis* (positivo) y *M. bovis*, (negativo) (Virtanen, 1960), pero otras especies como *M. smegmatis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, *M. phlei* y *M. vaccae* también producen reducción de nitratos.

### **A.4.3.3 Pirazinamidasasa (PZA)**

El test de la PZA detecta la presencia de la enzima que convierte la pirazinamida en ácido pirazinóico (Wayne, 1974). Todas las cepas de *M. bovis* incluyendo BCG son PZA negativas, mientras que *M. tuberculosis* y otros miembros del complejo tuberculoso como *M. africanum* son PZA positivos. La PZA puede encontrarse en cultivos de cepas de *M. tuberculosis* susceptibles a PZA.

### **A.4.3.4 Resistencia a la TCH**

Todas las micobacterias a excepción de *M. bovis* crecen en medio Middelbrook 7H10 o 7H11 suplementado con 1-5 µg/ml de TCH (Bönike, 1958).

### **A.4.3.5 Catalasa**

El test de la catalasa se utiliza para la identificación del complejo tuberculoso, pero no permite diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Kent y Kubica, 1985). Se basa en la capacidad de algunas micobacterias de poseer una catalasa estable a 68°C que descompone peróxido de hidrógeno y libera oxígeno gaseoso en forma de espuma persistente. Específicamente *M. tuberculosis* y *M. bovis* poseen catalasa que no es activa a una temperatura mayor de 60°C.

## **A.4.4. Métodos moleculares de identificación**

En el laboratorio clínico, las pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de especies bacterianas han sido complementadas con otras técnicas moleculares de identificación como la hibridación ADN-ARN, las sondas de ADN y la amplificación de secuencias específicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas estas técnicas también han resultado muy útiles en la identificación de micobacterias no tuberculosas de interés clínico

### **A.4.4.1. Métodos de hibridación**

Estos métodos utilizan sondas de ADN específicas para la identificación de especies. Se han desarrollado sondas para la identificación del complejo tuberculoso, basadas en la secuencia del ADN que codifica para la subunidad 16S del rARN. Mediante hibridación

específica se consigue la unión estable entre la sonda de ADN y el ARN bacteriano complementario. Algunas de estas sondas como la AccuProbe (*Gen-Probe*) se encuentran asociadas a compuestos quimioluminiscentes.

#### **A.4.4.2. Métodos de amplificación**

Las técnicas de amplificación pueden detectar un número de bacilos inferior a los niveles mínimos de sensibilidad detectados por cultivo a partir de una muestra bacteriológica. Este tipo de diagnóstico puede ser realizado hasta en algunas horas.

Se han desarrollado distintas técnicas para la identificación de *M. tuberculosis* basadas en la PCR, en las que se amplifican regiones específicas de especie como por ejemplo los genes *mtp40* (Parra *et al.*, 1991) y *oxyR* (Sreevatsan *et al.*, 1996).

#### **A.4.4.3. RFLPs**

Esta técnica se basa en la hibridación de ADN genómico de *M. tuberculosis* con una sonda derivada de la secuencia de inserción IS6110. Debido al polimorfismo originado por el número y posición de las secuencias IS6110, es posible la diferenciación y tipificación de las diferentes cepas de *M. tuberculosis*. Los RFLPs utilizando la IS6110, es la única metodología actualmente disponible para la diferenciación de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* H37Ra (Bifani *et al.*, 2000)

#### **A.4.4.4. Identificación mediante HPLC**

A partir de extractos lipídicos obtenidos por saponificación, o hidrólisis ácida y derivatización, se pueden establecer patrones únicos de ácidos micólicos asociados con cada especie, que se pueden comparar con los patrones para cada especie de micobacterias disponibles en las bases de datos de HPLC. Esta metodología se ha utilizado para la identificación de micobacterias de crecimiento lento como el complejo *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, etc. (Buttler *et al.*, 1991).

### **A.5. Tinción de *M. tuberculosis* con RN: test de virulencia**

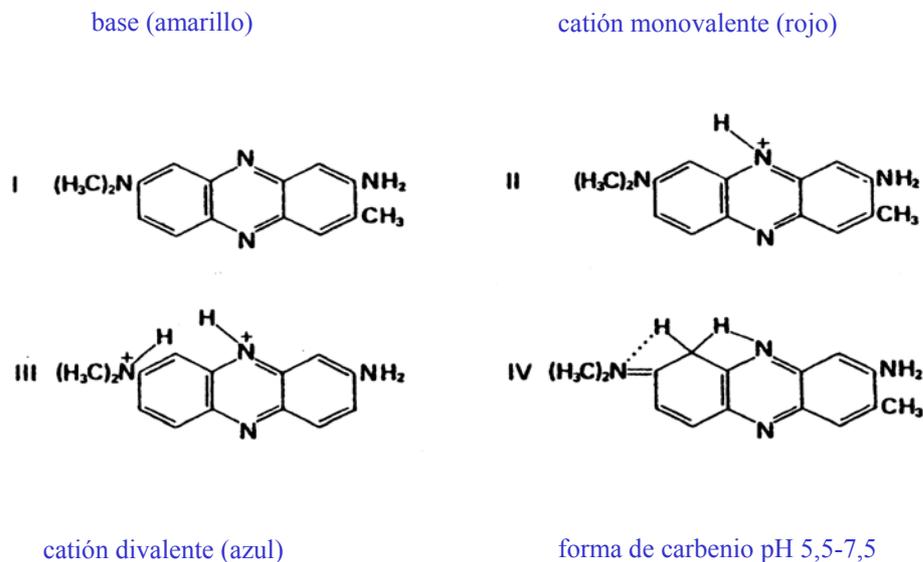
A mediados del siglo XX, algunos estudios encaminados a la búsqueda de marcadores fenotípicos correlacionados con la virulencia del bacilo tuberculoso se enfocaron en la reacción de las diferentes cepas con sustancias colorantes. Se utilizaron diferentes colorantes ácidos como azul de tripán, rojo congo, azul de

metanilo, etc. (Desbordes *et al.*, 1955) y colorantes básicos como RN, azul de nilo, azul de metileno, etc. (Desbordes, 1952; Desbordes y Furnier, 1954). Los resultados más concluyentes y que produjeron mayor atención se obtuvieron utilizando RN y azul de nilo (Desbordes, 1952; Desbordes y Furnier, 1954).

Algunos trabajos pioneros de Middlebrook condujeron a la obtención de un test para la identificación de cepas virulentas de *M. tuberculosis* de acuerdo a su capacidad de fijar de RN (Dubos y Middlebrook, 1948). De acuerdo con este “test de virulencia”, algunas cepas como H37Rv toman una coloración roja al fijar RN en un medio alcalino, mientras que cepas avirulentas como H37Ra conservan su coloración amarilla a iguales condiciones. Algunos estudios posteriores aplicando el “test del RN” a cientos de aislados clínicos mostraron que las cepas virulentas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* se teñían de rojo al reaccionar con RN (Richmond y Cummings, 1950; Morse *et al.*, 1953; Hughes *et al.*, 1955).

### A.5.1. El rojo neutro (RN)

El RN: N<sup>8</sup>, N<sup>8</sup>, 3-trimetil-2,8 monohidrocloruro de fenacinediamina (C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>Cl), es una base relativamente débil (Gurr, 1962). Sus sales son rápidamente descompuestas originando cambios de color en solución acuosa, lo que le otorga excelentes características como indicador de pH (Fig. 13). El RN se presenta de coloración roja en solución de carácter ácido, volviéndose amarilla a pH entre 6,8 y 8,0. Además, presenta una absorción máxima entre 540-542 nm (Lillie, 1977). Este colorante se utiliza principalmente en tinciones histológicas para la identificación de células nerviosas.



**Figura 13. Formas de ionización del RN.** La forma básica (I) de coloración amarilla se presenta a pH mayor de 8,0, y la forma ácida (II) de coloración roja, a pH menor de 6,8. Modificada a partir de (Lillie, 1977).

## 5.2. Envoltura de *M. tuberculosis* y fijación de RN

Para entender la tinción de las cepas virulentas de *M. tuberculosis* con RN, Middlebrook estudió los posibles compuestos estructurales responsables de la fijación del colorante (Middlebrook, *et al.*, 1959). Sus estudios iniciales mostraron que una suave extracción con hexano era suficiente para extraer la coloración roja de las cepas virulentas teñidas con RN. Esto sugirió que la tinción era producida por la presencia de un factor presente en la cápsula de las micobacterias virulentas (Dubos y Middlebrook, 1948). Después de algunos estudios analíticos y estructurales adicionales, se concluyó que los SL, y PL en un menor grado, eran los compuestos posiblemente implicados en la tinción de cepas virulentas de *M. tuberculosis* con RN (Middlebrook *et al.*, 1959; Goren *et al.*, 1974).

### A.5.3. Actividad de rojo neutro (NRA)

Middlebrook estimó la capacidad de fijar RN de extractos de *M. tuberculosis* obtenidos mediante extracción con hexano-decilamina (Middlebrook *et al.*, 1959). Básicamente mezcló los extractos orgánicos con una solución acuosa de RN, y al dejar separar las fases (orgánica superior y acuosa inferior) estimó la cantidad del complejo lípido ácido-RN formado al medir la absorbancia a 540 nm de la fase orgánica. A la OD<sub>540</sub>/mg bacterias, la denominó “actividad de rojo neutro” (NRA).

Después de estimar la NRA de *M. tuberculosis* H37Rv, H37Ra, *M. bovis* Vallé y dos cepas de BCG, Middlebrook correlacionó este parámetro con la capacidad de fijar RN por parte de células completas (test de RN). Las cepas virulentas como H37Rv, que fijan RN, mostraron un elevado valor de NRA, lo que se relacionó directamente con la virulencia de las cepas.

En el mismo trabajo, con ayuda de una serie de análisis bioquímicos, analíticos y espectrofotométricos, se concluyó que el principal compuesto presente en el extracto hexano-decilamina de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y responsable de la NRA tenía características fuertemente ácidas y apariencia de sulfolípidos (Middlebrook *et al.*, 1959). También le asignó a los PL cierta contribución a la NRA, pero en un menor grado.

Goren posteriormente se basó en las observaciones de Middlebrook para desarrollar un sofisticado método analítico para calcular el contenido de SL de las cepas de *M. tuberculosis*, utilizando la estimación de la NRA (Goren *et al.*, 1974). Entre 40 aislados clínicos encontró una correlación estadística significativa entre el contenido de lípidos fuertemente ácidos (SAL): SL y PL, y la virulencia en cobayas. El alto contenido de SAL de algunas cepas avirulentas de bacilo tuberculoso llevaron a concluir que la presencia de este tipo de compuestos no se podía considerar como un criterio suficiente para la expresión de virulencia. A pesar de todo ello, el NRA se utilizó como un indicador de virulencia *in vitro* (Grange *et al.*, 1978).

Actualmente SL y PL son considerados como los compuestos responsables de la fijación de RN por las cepas virulentas de *M. tuberculosis* (Daffé y Draper, 1998; Rivera-Marrero *et al.*, 2002).

## A.6. El genoma de *M. tuberculosis*

La reciente determinación de la secuencia de los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv (<http://www.pasteur.fr/Tuberculist>) (Cole *et al.* 1998), el aislado clínico CDC1551 (Valway *et al.*, 1998) (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/med.html>), de *M. leprae* (<http://genolist.pasteur.fr/Leproma>) (Cole *et al.*, 2001) y de *M. bovis* BCG-Pasteur 1173D2 (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/M.bovis/>) ha hecho una contribución importante para el estudio de los determinantes de virulencia, patogenicidad y resistencia a antibióticos de las micobacterias. Esta información podría contribuir a potenciar el desarrollo de una nueva generación de vacunas para el control de la tuberculosis y la lepra.

El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv está constituido por 4,411,532 pb, distribuidos en 3,924 posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), lo que corresponde aproximadamente al 91% de su capacidad codificante. El contenido de G+C es del 65,6% y su constancia a lo largo del genoma indica una escasa probabilidad de transferencia horizontal de islas de patogenicidad de composición atípica.

Existen regiones denominadas PGRS (secuencias polimórficas ricas en G+C) repetidas a lo largo del genoma, que poseen un contenido de G+C del 80%, muy por encima del promedio para el genoma de las micobacterias, y que traducen para proteínas ricas en glicina. Recientemente se ha podido demostrar que el tamaño de las PE-PGRS varía entre las diferentes micobacterias y aislados clínicos de *M. tuberculosis*, sugiriendo que estas proteínas realmente están implicadas en la variabilidad antigénica de las micobacterias (Banu *et al.*, 2002).

El crecimiento lento de *M. tuberculosis* respecto a otros procariotas, se podría explicar, indirectamente, por algunas características de su genoma: únicamente el 59% de los genes se transcriben en la misma dirección de la replicación del cromosoma, la extensa separación del operon “rRNA” respecto al *oriC*, (1,500 kpb), el escaso número de factores  $\sigma$  (13), y que sólo posea 43 de los 61 posibles tRNA.

### A.6.1. Genes que codifican proteínas

Únicamente al 58% de los posibles ORFs encontrados en el genoma de *M. tuberculosis*, se les ha asignado funcionalidad mediante comparación con los genes registrados en los bancos de datos de otras bacterias. Los ORFs de *M. tuberculosis* se han clasificado en 11 grupos diferentes de acuerdo con la funcionalidad de sus proteínas codificadas (tabla 3). Para un 16% de los ORFs de *M. tuberculosis* no se ha encontrado funcionalidad. Es posible que codifiquen para proteínas específicas de las micobacterias.

**TABLA 3. Clasificación de los ORFs de *M. tuberculosis* H37Rv de acuerdo con la funcionalidad de sus proteínas codificadas.**

| Clase | Función | Nº de | % del total | Tamaño | % |
|-------|---------|-------|-------------|--------|---|
|-------|---------|-------|-------------|--------|---|

|    |   | genes | de genes | total (kpb) | c.c. |
|----|---|-------|----------|-------------|------|
| 1  | Metabolismo de lípidos                          | 225   | 5,7      | 372         | 9,3  |
| 2  | Ruta de información                             | 207   | 5,2      | 243         | 6,1  |
| 3  | Procesos celulares y de la pared                | 517   | 13,0     | 620         | 15,5 |
| 4  | RNAs de transferencia                           | 50    | 1,3      | 10          | 0,2  |
| 5  | IS y fagos                                      | 137   | 3,4      | 100         | 2,5  |
| 6  | Proteínas PE y PEE                              | 67    | 4,2      | 283         | 7,1  |
| 7  | Intermediarios del metabolismo y la respiración | 877   | 22,0     | 985         | 24,6 |
| 8  | Proteínas de función desconocida                | 607   | 15,3     | 396         | 9,9  |
| 9  | Proteínas reguladoras                           | 188   | 4,7      | 162         | 4,0  |
| 10 | Proteínas hipotéticamente conservadas           | 911   | 22,9     | 739         | 18,4 |
| 11 | Virulencia, detoxificación y adaptación         | 91    | 2,3      | 95          | 2,4  |

Tabla modificada a partir de Brosch *et al.* (2000).

Una característica muy particular es que más del 20% del genoma de *M. tuberculosis* codifica para dos grandes familias de proteínas ricas en glicina: las PE y PPE. Estas proteínas poseen dominios Pro-Glu y Pro-Pro-Glu respectivamente en el extremo amino, y también se han relacionado con variabilidad antigénica (Cole *et al.*, 1998).

El codón de iniciación en el 61% de los genes es ATG, pero el 35% de los genes utiliza GTG debido al alto contenido de G+C.

## A.6.2. Elementos repetitivos y profagos

Aproximadamente el 3,4% del genoma de *M. tuberculosis* corresponde a secuencias de inserción (IS) y profagos.

Hasta el momento en genoma de *M. tuberculosis* se han definido 56 elementos IS (IS6110, IS1081, IS1547, etc.) el, que pertenecen a 8 familias: IS3, IS5, IS21, IS30, IS110, IS256, ISL3 y IS1535. La mayoría de estos elementos móviles se encuentran insertados en regiones intergénicas no codificantes y en puntos preferentes.

También se encuentran presentes dos profagos, PhiRv1 y PhiRv2 que podrían estar implicados en la adquisición de nuevos genes. Algunos de los genes de estos profagos presentan similitud con los codificados por bacteriófagos de *Streptomyces*.

## A.7. Métodos de expresión de genes en micobacterias

Los experimentos de expresión de genes en micobacterias son relativamente recientes, debido a la dificultad que ha conllevado el desarrollo de herramientas genéticas adecuadas de transformación. La complejidad de la pared celular ha sido una de los principales obstáculos para el desarrollo de métodos eficientes de transformación.

Entre los métodos hasta desarrollados la fecha se encuentran: la transformación de protoplastos con ADN de fago (Jacobs *et al.*, 1987), la introducción de ADN mediante bacteriófagos recombinantes (Jacobs *et al.*, 1991), la transferencia conjugativa de plásmidos “shuttle” desde *E. coli* a *M. smegmatis* (Lazraq *et al.*, 1991) y la transformación de plásmidos por electroporación.

En la actualidad la electroporación es la herramienta más utilizada para la transformación de micobacterias. El primer paso lo supuso el desarrollo de la cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, que posee una eficiencia de transformación 3-4 órdenes mayor que *M. tuberculosis* (Snapper *et al.*, 1990), y la descripción del plásmido pAL5000 (Ranes *et al.*, 1990.)

Por medio de la transformación de *M. smegmatis* con cósmidos recombinantes conteniendo grandes regiones de genoma (30-45 kpb), ha sido posible la expresión de algunos componentes estructurales complejos de la pared de *Mycobacterium*, como es el caso de los GPL de *M. avium* que han sido expresados en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (Belisle *et al.*, 1991). Este tipo de compuestos son generalmente codificados por una combinación de genes distribuidos en regiones extensas del genoma.

## **A.8. Factores de virulencia de *M. tuberculosis* y su interacción con las células huésped**

A pesar que desde el siglo XIX se identificó a *M. tuberculosis* como el agente etiológico de la TB (Koch, 1882), en la actualidad se sabe muy poco sobre los mecanismos específicos de virulencia del bacilo tuberculoso. El crecimiento lento, y lo relativamente complejo para desarrollar técnicas moleculares de análisis, ha dificultado considerablemente el trabajo con micobacterias.

*M. tuberculosis* es un patógeno intracelular facultativo que infecta y se multiplica eficientemente en células fagocíticas profesionales como monocitos y macrófagos (Kaufmann, 2001). También puede persistir en células no especializadas como fibroblastos y células epiteliales (Arriaga *et al.*, 2002). Realmente se sabe muy poco sobre la forma como el bacilo tuberculoso entra en las células eucarióticas, de los factores de virulencia que habilitan su supervivencia y multiplicación en las células huésped, y de cómo se relaciona todo ello con el desarrollo de la enfermedad.

### **A.8.1. Factores de unión e invasión**

*M. tuberculosis* posee diferentes mecanismos de entrada y supervivencia en el macrófago dependiendo del grado de virulencia de las cepas. Además, únicamente bacterias vivas pueden entrar en células fagocíticas no especializadas por lo que muy probablemente, la micobacteria, controla las señales de entrada en la célula huésped (Filley y Rook, 1991). Recientemente se ha demostrado que *M. tuberculosis* contiene genes, como los cuatro operones “mce”, que posiblemente regulan la entrada en las células eucarióticas. Al introducir un operón de genes *mce* en *E. coli*, se induce la entrada y supervivencia de *E. coli* en células HeLa (Arruda *et al.*, 1993).

Algunas proteínas de unión a fibronectina de *M. tuberculosis* podrían estar implicadas en la entrada de las micobacterias en los macrófagos. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas homólogas a fibronectina, inhiben la unión de *M. leprae* a células epiteliales y de Schwann (Schhorey *et al.*, 1995).

Algunas enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa inactivan los radicales de oxígeno producidos por los macrófagos activados (Zhang *et al.*, 1991). De igual forma *M. tuberculosis* tiene la capacidad de escapar del fagosoma y residir en el citoplasma.

### **A.8.2. Toxinas y citotoxinas**

La actividad hemolítica que está regulada en *M. tuberculosis* por genes como el que codifica para la enzima fosfolipasa-C (PLC): *plcA*, *plcB*, *plcC* y *plcD* (Leao *et al.*, 1995; Johansen *et al.*, 1996), se encuentra relacionada con el grado de virulencia de las cepas y con las diferencias en su ubicación intracelular. Se conoce que *M. tuberculosis* posee un mayor grado de actividad hemolítica que *M. bovis* BCG y además una

ruta endocítica diferencial en el macrófago (King *et al.*, 1993). De esta forma la actividad hemolítica podría explicar parcialmente la evasión del fagosoma por parte de cepas virulentas del bacilo tuberculoso.

También se ha demostrado recientemente que PLC está directamente relacionado con la virulencia de *M. tuberculosis*. Los genes *plc* son expresados activamente durante las primeras 24 horas de infección en macrófagos. Se observó que los mutantes múltiples *plcABC* y *plcABCD* son atenuados en las fases tardías de infección en modelo murino (Raynaud *et al.*, 2002)

### **A.8.3. Acción del LAM**

El LAM ha sido tradicionalmente relacionado con la virulencia de *M. tuberculosis*. Experimentalmente se conoce que LAM purificado a partir de cepas virulentas de *M. tuberculosis* no induce la producción de TNF- $\alpha$ , a diferencia del obtenido a partir de cepas menos virulentas. Este comportamiento es producido muy probablemente por la composición diferencial de los azúcares en las terminaciones de la molécula de LAM. El efecto final de LAM en la célula huésped es la inhibición de la producción de radicales de nitrógeno y de la activación mediada por IFN- $\gamma$  (Chan *et al.*, 1991; Sibley *et al.*, 1988).

#### A.8.4. Otros factores de virulencia

El TDM ha sido tradicionalmente relacionado con la virulencia de *M. tuberculosis* (Middlebrook *et al.*, 1947). La capacidad de supervivencia en el pulmón del ratón de cepas de BCG a las que se les ha extraído el TDM, es notablemente inferior a la de la misma cepa no delipidificada (Silva *et al.*, 1985). De igual forma al inocular TDM a ratones infectados con BCG aumenta su capacidad infectiva causando rápidamente la muerte del animal (Bloch y Noll, 1953).

Por otro lado la cantidad de TDM también estaría involucrada en la virulencia de *M. tuberculosis*. Las cepas avirulentas como H37Ra poseen una menor cantidad de TDM en su envoltura celular en comparación al que se encuentra en la cepa virulenta H37Rv (Middlebrook *et al.*, 1947).

Como se ha mencionado anteriormente, el SL-I está relacionado con la virulencia de *M. tuberculosis* (Goren *et al.*, 1974). Este compuesto estructural activa los neutrófilos que inducen la producción de radicales de oxígeno (Zhang *et al.*, 1991), activa la actividad antimicrobiana en neutrófilos y en monocitos, e induce la producción de proteínas inflamatorias que producen daño de las células huésped (Zhang *et al.*, 1988).

Por otro lado se ha demostrado que la ureasa intracelular de *M. tuberculosis* genera amonio, que a su vez inhibe acidificación del lisosoma evitando la fusión fagosoma-lisosoma (Clemens *et al.*, 1995).

Algunas moléculas implicadas en el transporte de hierro hacia el interior del bacilo tuberculoso se han relacionado con virulencia (Barclay y Ratledge, 1988). El hierro libre es limitado en el huésped, por lo que la micobacteria produce moléculas como exoquelinas o sideróforos que presentan una afinidad muy alta por este metal. Las exoquelinas unen hierro en el ambiente extracelular y lo importan hacia el interior de la bacteria vía micobactinas que son moléculas presentes en la pared micobacteriana.



# **OBJETIVOS**



## B. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Con el fin de estudiar los componentes estructurales y los genes relacionados con la tinción con RN de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Analizar cepas *RN+* y *RN-* de *M. tuberculosis* mediante cromatografía en columna (DEAE) y capa fina (CCF) para establecer una posible correlación entre la composición glicolípídica, especialmente de SL, y la fijación de RN.
2. Diseñar una metodología adecuada para el cribaje de colonias de micobacteria, mediante tinción con RN en placa de cultivo.
3. Construir una genoteca de la cepa *RN+* *M. tuberculosis* H37Rv en el cósmido “shuttle” pYUB18, transformarla en la cepa *RN-* *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, y realizar un cribaje de colonias con RN.
4. Comparar los perfiles glicolípídicos de las cepas *RN+* de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) seleccionadas, con los de cepas *RN+* y *RN-* de *M. tuberculosis*.
5. Determinar el/los genes posiblemente implicados en la tinción con RN de las cepas *RN+* de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) seleccionadas.



# MATERIAL Y MÉTODOS



## C. MATERIAL Y MÉTODOS

### C.1. Material biológico

#### C.1.1. Cepas bacterianas

Las diferentes cepas de *Mycobacterium* y *E. coli* utilizadas en este trabajo se muestran en la tabla 4.

**TABLA 4. Cepas bacterianas utilizadas.**

| Cepa  | Procedencia                   |
|---|-------------------------------|
| <i>M. tuberculosis</i> H37Rv                        | ATCC 27294                    |
| <i>M. tuberculosis</i> H37Ra                        | ATCC 25177                    |
| <i>M. canetti</i>                                   | CIPT 1400100-059              |
| <i>M. tuberculosis</i> 511/K                        | HUGTP                         |
| <i>M. tuberculosis</i> MT-103                       | Instituto Pasteur             |
| Otros aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> * | HUGTP, HSP                    |
| <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155             | (Snaper <i>et al.</i> , 1993) |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'                        | (Stratagene)                  |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$                         | (Stratagene)                  |

(\*) cepas 92/K, 267/K, 322/K, 530/K y 620/K; HUGTP (Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España), HSP (Hospital de Sant Pau, Barcelona, España).

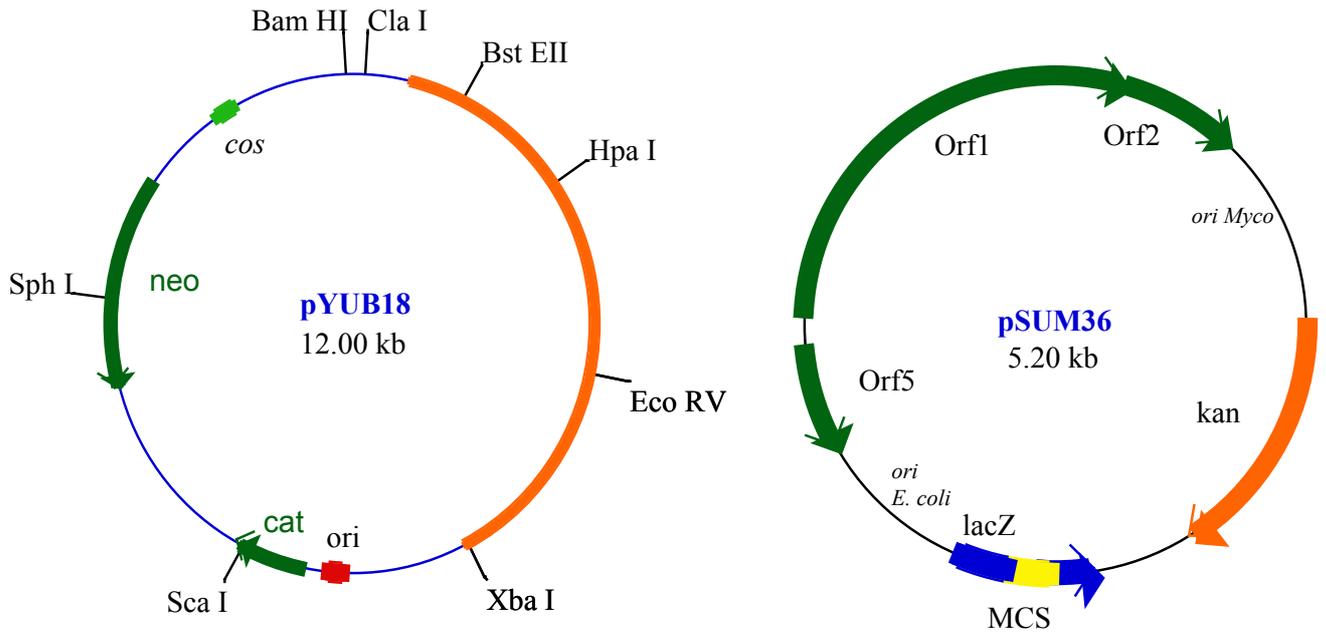
#### C.1.2. Vectores

La genoteca de *M. tuberculosis* H37Rv se construyó en el cósmido “shuttle” pYUB18 (Fig. 14) (Jacobs *et al.*, 1991). Este vector es derivado del cósmido pYUB12 (Jacobs *et al.*, 1986) y se caracteriza por contener:

- a- un origen de replicación de *E. coli*,
- b- el origen de replicación del plásmido de *M. fortuitum* pAL5000 (Ranes *et al.*, 1990), replicativo en micobacterias,
- c- un gen de resistencia a kanamicina (Kan) funcional tanto en *E. coli* como en micobacteria,
- d- la secuencia *cos* proveniente del bacteriofago  $\lambda$  que le permite la posibilidad de ser empaquetado en cabezas de fago  $\lambda$ , y
- e- un sitio único de clonación (*Bam* HI).

Para la construcción de la genoteca se seleccionó el cósmido pYUB18 debido a que permite la inserción de fragmentos grandes de genoma, limitando el cribaje a unos cuantos cientos de clones.

El plásmido “shuttle” pSUM36 (Aínsa *et al.*, 1996) también derivado de pAL5000, se utilizó como vector en el análisis de la región genómica de *M. tuberculosis* H37Rv relacionada con la fijación de RN.



**Figura 14.** Cósmido “shuttle” pYUB18 (Jacobs *et al.*, 1991) y plásmido pSUM36 (Aínsa *et al.*, 1996). La región de color naranja en pYUB18 y los ORFs de color verde en pSUM36 provienen de pAL5000.

## C.2. Condiciones de cultivo, medios y conservación de cepas

### C.2.1. Medios para el cultivo de micobacterias y *E. coli*.

Los medios que se utilizaron para el cultivo de bacterias se muestran en la tabla 5.

**TABLA 5. Medios de cultivo para micobacteria y *E. coli*.**

|                 | Micobacteria  | <i>E. coli</i>                  |
|-----------------|---|---------------------------------|
|                 | Lowestein-Jensen ( <i>Bio-Mérieux</i> ).  | agar Luria-Bertani (LB)         |
| <b>Sólidos</b>  | agar Middlebrook 7H10 agar ( <i>Difco</i> )<br>agar Middlebrook 7H10 modificado*<br>agar Luria-Bertani (LB) | agar MacConkey ( <i>Difco</i> ) |
| <b>Líquidos</b> | Middlebrook 7H9 Broth ( <i>Difco</i> )<br>Sauton (Roberts <i>et al.</i> , 1991)<br>caldo LB                 | caldo LB<br>SOC                 |

(\*) El agar Middlebrook 7H10 modificado (agar al 1%) se diseñó especialmente para este trabajo

El caldo LB está compuesto por: triptona 10 g/l, extracto de levadura (*Difco*) 5 g/l, y NaCl 5 g/l, pH 7.6. Por su parte, el agar LB posee la misma composición del caldo más 1,5% de bacto-agar (*Difco*).

El medio SOC está compuesto por: 20 g/l bacto-triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub> y 20 mM glucosa, pH 7,0.

El medio Middlebrook 7H9 se utilizó enriquecido con 10% de ADC (albúmina sérica bovina (BSA) factor V al 5%, dextrosa al 2% y catalasa al 0,004%) y 0,05% de tween 80 (poli-etileno 20 sorbitán monooleato). El medio 7H10 se utilizó enriquecido con 10% de OADC (ADC más ácido oleico al 0,05%) y 0,05% de glicerol.

Las células de *E. coli* XL1-Blue MRF' utilizadas para la infección con bacteriófago  $\lambda$ , se cultivaron en caldo LB suplementado con MgSO<sub>4</sub> 10 mM y maltosa 0,2%.

Para la selección de micobacterias y *E. coli* con Kan, se utilizó una concentración de 50  $\mu$ g/ml y 25  $\mu$ g/ml respectivamente, y de 25  $\mu$ g/ml para la selección *E. coli* con tetraciclina.

### C.2.2. Condiciones generales de cultivo

Todos los cultivos de *E. coli* y micobacterias en medio líquido y sólido se incubaron a 37°C. Los cultivos *E. coli* y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 en medio líquido se incubaron con agitación a 150 rpm, y los de *M. tuberculosis* a 80 rpm.

Para el análisis de glicolípidos, las micobacterias se cultivaron en placas de agar 7H10-OADC a 37°C durante 5 semanas.

Para sembrar *E. coli* y micobacterias en placas de cultivo, se tomaron alícuotas de las bacterias en medio líquido y se repartieron bajo condiciones estériles sobre la superficie del agar con la ayuda de perlas de vidrio de entre 2,5-3 mm de diámetro.

### C.2.3. Conservación de cepas

Para la conservación de cepas de micobacterias y *E. coli*, se partió de un cultivo en medio líquido en fase estacionaria. Se les añadió glicerol hasta una concentración final del 15% bajo condiciones estériles, se repartieron en alícuotas y se congelaron a -20°C.

## C.3. Fijación de micobacterias en placas de agar Middlebrook 7H10 modificado

Las placas de 7H10-OADC modificado se diseñaron para fijar colonias de micobacteria en medio sólido. Estas placas se prepararon al 1% de agar (p/v), una concentración menor que la indicada en la fórmula estándar del agar Middlebrook 7H10 (1,5% p/v) (Dubos y Middelbrook, 1947; Roberts *et al.*, 1991). Para la fijación de bacterias se utilizó el siguiente protocolo:

- 1- Inocular las bacterias con la ayuda de un asa bacteriológica introduciéndolas ligeramente a 1-2 mm de la superficie del agar 7H10-OADC modificado.
- 2- Incubar las bacterias de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* a 37°C durante 4 semanas y 3-5 días respectivamente. Mantener las placas de cultivo selladas con *Parafilm*<sup>TM</sup> durante la incubación.
- 3- Secar las placas de cultivo con la ayuda del flujo de una cabina de seguridad biológica III hasta que el agar alcance un grosor de 1-1,5 mm aproximadamente.

## C.4. Tinción de micobacterias con RN

La tinción de células de micobacteria con RN se realizó en cabina de bioseguridad tipo III. Para las tinciones se utilizó agua desionizada durante todo el procedimiento.

### **C.4.1. Tinción en tubo (test de RN)**

- 1- Hacer crecer las micobacterias en agar Middlebrook 7H10-OADC.
- 2- Tomar algunas colonias con ayuda de una asa bacteriológica e introducir las en un tubo de vidrio de tapa rosca conteniendo 5 ml de metanol (MetOH) acuoso al 50%.
- 3- Incubar a temperatura ambiente durante 1 h.
- 4- Retirar el sobrenadante y lavar las células nuevamente con MetOH (paso 2).
- 5- Desechar el sobrenadante y añadir 5 ml de RN (*Merck*) al 0.002% en buffer barbiturato (barbiturato de sodio al 1% (*Panreac*) en NaCl al 5%, pH 9,8).
- 6- Incubar a temperatura ambiente.

La tinción de cepas de *M. tuberculosis* se valoró a partir de 30 min de incubación con el colorante, mientras que para otras cepas se hizo entre 1 y 24 h de reacción. Una coloración roja adquirida por las bacterias después de reaccionar con el buffer de tinción, se consideró como una reacción positiva con el RN (RN+).

### **C.4.2. Tinción en placa de cultivo**

- 1- Añadir 20 ml de MetOH acuoso al 50% a cada placa de agar 7H10-OADC modificado conteniendo las colonias previamente fijadas.
- 2- Incubar a temperatura ambiente durante 1h.
- 3- Desechar el sobrenadante y lavar las colonias nuevamente (paso 3).
- 4- Añadir 20 ml de RN al 0,002% en buffer barbiturato, asegurando que las colonias queden completamente sumergidas en el buffer de tinción.
- 5- Incubar finalmente las placas a temperatura ambiente.

Se consideró como una reacción positiva (RN+) cuando las colonias toman una coloración roja en el fondo amarillo del buffer de tinción después de 1-24 h de reacción.

## **C.5. Técnicas de análisis de glicolípidos**

### **C.5.1. Extracción de glicolípidos**

Los extractos glicolipídicos se obtuvieron mediante una doble extracción con MetOH y cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) (Muñoz *et al.*, 1997).

- 1- Hacer crecer las micobacterias en placas de 7H10-OADC, recuperar las bacterias a partir de la superficie de las placas de cultivo con la ayuda de un asa, y resuspenderlas en una solución de  $\text{CHCl}_3$ :MetOH (1:2, v/v).
- 2- Agitar vigorosa a temperatura ambiente durante 48 h. De esta forma se facilita la extracción de los lípidos libres de mayor polaridad.
- 3- Dejar decantar la suspensión y filtrar el extracto obtenido. Los lípidos libres se recuperan disueltos en la fase líquida.
- 4- Resuspender nuevamente la fase sólida en  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (2:1, v/v) e incubar durante 48 h a temperatura ambiente con agitación. De esta forma se favorece la extracción de los lípidos libres de menor polaridad.
- 5- Mezclar los extractos orgánicos obtenidos en un matraz previamente tarado, concentrar y someter a partición con  $\text{CHCl}_3$ :MetOH:H<sub>2</sub>O (8:4:2, v/v/v). Como producto de la partición se forman dos fases inmiscibles, la inferior (orgánica) que contiene el extracto glicolipídico y la fase acuosa superior.
- 6- Evaporar la fase orgánica hasta sequedad en un rotavapor.
- 7- Cuantificar el extracto en una balanza analítica.

### **C.5.2. Fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico: DEAE-celulosa**

Los extractos glicolipídicos se fraccionaron inicialmente por cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-celulosa (DEAE). Este tipo de cromatografía se fundamenta en el intercambio de los lípidos polares en su forma ionizada con la DEAE en su forma acetato, y en la adsorción de las partes no ionizadas altamente polares de los lípidos complejos.

- 1- Resuspender una cantidad de DEAE (dietilo-amino-etilo, *Merck*) de aproximadamente 100 veces la masa de lípidos a fraccionar, en 5 volúmenes de MetOH .
- 2- Empaquetar la DEAE-celulosa en una columna de vidrio de 100 cm largo y 2,5 cm de diámetro.
- 3- Regenerar la DEAE-celulosa en su forma acetato mediante la elución a través de la columna, en su orden y volúmenes respecto a la cantidad de DEAE-celulosa empaquetada, del sistema de solventes relacionados en la tabla 6.

**TABLA 6. Regeneración de la columna de DEAE.**

| Orden | Eluyente   | Composición* | Volúmenes |
|-------|--|--------------|-----------|
| 1°    | MetOH  | 100%         | 1         |
| 2°    | CHCl <sub>3</sub> :MetOH:NH <sub>4</sub> OH:NH <sub>4</sub> Ac | ¶            | 4         |
| 3°    | MetOH  | 100%         | 3         |
| 4°    | CH <sub>3</sub> COOH (†)                                       | 100%         | 3         |
| 5°    | CH <sub>3</sub> COOH:CH <sub>3</sub> Cl                        | 50:50        | 1         |
| 6°    | CH <sub>3</sub> Cl   | 100%         | 1         |

(¶) mezcla de CHCl<sub>3</sub>:MetOH:NH<sub>4</sub>OH (80:20:2, v/v/v) al 0,01M en acetato de amonio. (†) CH<sub>3</sub>COOH (ácido acético); (\*) = v/v.

- 4- Dejar salir el CHCl<sub>3</sub> (tabla 6, eluyente 6°) hasta el nivel superior de la DEAE-celulosa. Aplicar a continuación muy cuidadosamente por las paredes columna, con la ayuda de una pipeta *Pasteur*, el extracto lipídico disuelto en el mínimo volumen de CHCl<sub>3</sub>
- 5- Pasar por la columna continuamente y sin interrupción, el sistema de solventes seleccionado (tabla 7) a un flujo de 3 ml/min aproximadamente.
- 6- Recolectar las fracciones eludidas de la columna, en matraces de vidrio o tubos de ensayo previamente tarados, dependiendo de su volumen.
- 7- Concentrar las fracciones recuperadas de gran volumen en un rotavapor y las de menor volumen bajo corriente de nitrógeno en un baño seco a 50°C.
- 8- Guardar las fracciones evaporadas protegidas de la luz a 4°C hasta su análisis.

En el presente trabajo los lípidos neutros se eluyeron con CHCl<sub>3</sub>, los lípidos cargados se eluyeron con concentraciones crecientes de MetOH en CHCl<sub>3</sub>, los PL con la misma mezcla anterior mas una pequeña cantidad de agua, y el resto de lípidos altamente acidificados o polares se eluyeron añadiendo acetato de amonio (NH<sub>4</sub>Ac) al solvente y con MetOH al 100% (tabla 7) (Soto *et al.*, 2000).

**TABLA 7. Sistema de solventes para la elución de la columna de DEAE.**

| Orden | Eluyente                 | Composición* | Volúmenes |
|-------|--------------------------|--------------|-----------|
| 1°    | CHCl <sub>3</sub>        | 100%         | 3         |
| 2°    | CHCl <sub>3</sub> :MetOH | 90:10        | 2         |

|    |  |         |   |
|----|--|---------|---|
| 3° | CHCl <sub>3</sub> :MetOH                                       | 80:20   | 2 |
| 4° | CHCl <sub>3</sub> :MetOH                                       | 70:30   | 2 |
| 5° | CHCl <sub>3</sub> :MetOH                                       | 60:40   | 2 |
| 6° | CHCl <sub>3</sub> :MetOH:H <sub>2</sub> O                      | 60:35:8 | 2 |
| 7° | CHCl <sub>3</sub> :MetOH:NH <sub>4</sub> OH:NH <sub>4</sub> Ac | ¶       | 2 |
| 8° | MetOH  | 100%    | 3 |

(¶) mezcla de CHCl<sub>3</sub>:MetOH:NH<sub>4</sub>OH (80:20:2, v/v/v) al 0,01M en NH<sub>4</sub>Ac; (\*) = v/v, ó v/v/v.

### C.5.3. Purificación de SL mediante cromatografía de adsorción:

#### Silica-gel

Las fracciones obtenidas a partir de la columna de DEAE que contenían SL “contaminado” con otros compuestos, especialmente PL y PIM, se concentraron y se sometieron a cromatografía de adsorción con Sílica-gel 60 (230-400 mesh, *Merck*). En este tipo de cromatografía los lípidos quedan unidos a la sílica mediante fuerzas iónicas y polares. Cuanto más polar es el lípido, más fuertemente es retenido en la columna. Los lípidos serán separados de la columna por el paso de solventes de polaridad cada vez mayor.

Para el empaquetamiento y desarrollo de la columna, básicamente se utilizó el procedimiento utilizado para la DEAE pero equilibrando la sílica con CHCl<sub>3</sub> (C.5.2.). Al tratarse de una pequeña cantidad de glicolípidos (80 mg aproximadamente) se utilizó una columna de vidrio del tamaño de una pipeta *Pasteur* de 10 ml. Una vez montada la columna se pasaron por la columna 2 volúmenes de CHCl<sub>3</sub>, se aplicó inmediatamente después la muestra y los glicolípidos se eluyeron utilizando concentraciones crecientes de MetOH en CHCl<sub>3</sub> (tabla 8) a un flujo de 1ml/m. Las fracciones recolectadas se concentraron y se almacenaron a 4°C hasta su análisis por CCF.

**TABLA 8. Sistema de solventes para la elución de la columna de Sílica-gel 60.**

| Orden | Eluyente                                  | Composición * | Volúmenes |
|-------|---|---------------|-----------|
| 1°    | CHCl <sub>3</sub>                         | 100%          | 3         |
| 2°    | CHCl <sub>3</sub> :MtOH                   | 96:4          | 2         |
| 3°    | CHCl <sub>3</sub> : MtOH                  | 94:6          | 2         |
| 4°    | CHCl <sub>3</sub> : MtOH                  | 92:8          | 2         |
| 5°    | CHCl <sub>3</sub> : MtOH                  | 90:10         | 2         |
| 6°    | CHCl <sub>3</sub> : MtOH                  | 50:50         | 2         |
| 7°    | CHCl <sub>3</sub> :MetOH:H <sub>2</sub> O | 60:35:8       | 3         |
| 8°    | MetOH                                     | 100%          | 1         |

(\*) = v/v, ó v/v/v.

## **C.5.4. Análisis por cromatografía en capa fina analítica (CCF)**

### **C.5.4.1. Análisis de fracciones por cromatografía unidimensional (CCF-1D)**

Para el análisis por CCF-1D de las fracciones purificadas mediante DEAE o Sílica-gel, se utilizó el siguiente procedimiento:

- 1- Aplicar en réplica 10 µl de cada fracción de glicolípido (20 mg/ml en CHCl<sub>3</sub>) sobre placas de Sílica-gel 60 de soporte de vidrio (20x20 cm de tamaño y 0,25 mm de grosor, *Merck*).
- 2- Colocar las placas en una cámara de vidrio saturada previamente con los solventes de elución. La saturación con los vapores se hace más eficiente al colocar un papel de filtro sobre una de las paredes de la cámara, y tocando con uno de sus extremos el solvente.
- 3- Desarrollar las cromatografías hasta que el solvente ascienda por capilaridad a 2 cm aproximadamente del borde superior de la placa.
- 4- Sacar las placas de la cámara y dejarlas secar a temperatura ambiente.
- 5- Introducir las placas en una campana de extracción.
- 6- Pulverizar sobre una de ellas antrona (*Sigma*) al 1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (p/v) y calentar 1-2 min a 115°C, para visualizar los compuestos carbohidratados que se presentarán coloración azul.
- 7- Pulverizar sobre la otra placa, óxido de molibdeno al 1,3% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,2M (Molybdenum blue reactive, *Sigma*) y calentar a 120°C por 2-3 min, para identificar la presencia de PL que se teñirán de azul.

Para visualizar los glicolípidos apolares se utilizaron los sistemas de solventes CHCl<sub>3</sub>:MetOH (99:1, 95:5 y 85:15, v/v), para los glicolípidos de mayor polaridad como el SL y TDM los sistemas CHCl<sub>3</sub>:MetOH:H<sub>2</sub>O (60:12:1 y 30:8:1, v/v/v), y para desarrollar los glicolípidos más polares como los PL y los PIM, se utilizó CHCl<sub>3</sub>:MetOH:H<sub>2</sub>O (60:35:8, v/v/v) (Muñoz *et al.*, 1997; Daffé *et al.*, 1991).

Se utilizaron SL, TDM, DAT y LOS previamente purificados, como patrones para la identificación de compuestos.

### **C.5.4.2. Identificación de SL a partir de extractos de glicolípidos mediante cromatografía bidimensional (CCF-2D) y tinción con cresil violeta**

Para la identificación de SL por CCF-2D se utilizó el siguiente procedimiento:

- 1- Disolver por duplicado 1 mg de extracto crudo de glicolípidos en 25  $\mu$ l de  $\text{CHCl}_3$  y aplicar en réplica sobre láminas de Sílica-gel alcohol resistentes de 20x20 cm de tamaño (*Schleicher and Schuell*).
- 2- Colocar las placas en una cámara de vidrio saturada (apartado C.5.4.1.2.) con  $\text{CHCl}_3$ :MetOH:H<sub>2</sub>O (60:12:1, v/v/v) para desarrollar la primera dirección de la cromatografía (apartado C.5.4.1.3.).
- 3- Sacar las placas de la cámara y dejarlas secar a temperatura ambiente.
- 4- Introducir nuevamente las placas en una cámara saturada con  $\text{CHCl}_3$ :MetOH:H<sub>2</sub>O (75:12:1, v/v/v, Soto *et al.*, 2000) y desarrollar la segunda dirección de forma similar a la primera dirección.
- 5- Sacar las placas de la cámara, secarlas a temperatura ambiente y utilizar una de ellas para determinar la presencia de carbohidratos con antrona (apartado C.5.4.1.5.).
- 6- Tomar la otra placa y sumergirla en cresil violeta (*Sigma*) al 0,02% en  $\text{CH}_3\text{COOH}$  acuoso al 1%. Mantener la placa sumergida en la solución de tinción durante 2-3 min a temperatura ambiente, hasta la aparición de manchas de coloración rojo-violeta que corresponderán al SL-I. El resto componentes se teñirán de color azul-violeta.
- 7- Inmediatamente después de visualizar el SL-I, lavar los cromatogramas 2-3 veces con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 1% (15 min / lavado) para eliminar el exceso de colorante. Es importante evaluar los cromatogramas cuando todavía permanezcan húmedos.

Se utilizaron SL-I y CF de *M. tuberculosis* H37Rv como patrones de identificación.

### **C.6. Determinación de la actividad de rojo neutro (NRA) a partir de muestras glicolípídicas**

La actividad de RN se determinó tanto para extractos crudos de glicolípidos, como para las fracciones derivadas de ellos obtenidos mediante fraccionamiento por DEAE.

- 1- Disolver entre 50-200  $\mu$ g de glicolípido en 4 ml de n-hexano.
- 2- Mezclar vigorosamente se con 12 ml de RN acuoso al 0,002% y dejar reposar durante 5 min hasta la separación de fases.

- 3- Tomar 1 ml de la fase orgánica coloreada, mezclar con 4 ml de hidrocloreuro de etanol (4 ml de HCl 12N mezclado con 96 ml de EtOH absoluto) y medir inmediatamente la OD<sub>540</sub> de la mezcla en una cubeta de cuarzo de 1 cm.
- 4- Calcular la NRA ( OD<sub>540</sub>/mg de extracto crudo inicial).

## **C.7. Técnicas de biología molecular. Construcción y caracterización de una genoteca de *M. tuberculosis* H37Rv**

### **C.7.1. Extracción de ADN**

#### **C.7.1.1. Extracción de ADN plasmídico y cósmico a partir de *E. coli***

Para el aislamiento de plásmidos y cósmidos a partir de *E. coli* se utilizaron varios procedimientos dependiendo de la cantidad y la calidad deseada.

##### **C.7.1.1.1. Lisis alcalina**

Esta técnica se utilizó para la extracción de plásmidos y cósmidos para analizar con enzimas de restricción (Sambrook *et al.*, 1989).

- 1- Hacer crecer a partir de una colonia aislada un cultivo en LB a 37°C durante toda la noche.
- 2- Tomar 1,5 ml de cultivo y centrifugar a 3,000 rpm por 10 min.
- 3- Resuspender en 100 µl de solución I (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris HCl, pH 8,0), añadir lisozima a una concentración final de 4 mg/ml e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
- 4- Añadir 200 µl de solución II (0,2 M NaOH, 1% SDS) recién preparada, mezclar varias veces por inversión e incubar en hielo durante 5 min.
- 5- Añadir 150 µl de solución III (5M acetato de potasio, 11,5% (v/v) ácido acético glacial) conservada a 4°C. Mezclar vigorosamente e incubar en hielo durante 5 min.
- 6- Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min.
- 7- Pasar el sobrenadante a un tubo limpio, añadir un volumen de fenol: CHCl<sub>3</sub>:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar vigorosamente.
- 8- Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min.

- 9- Pasar el sobrenadante a un tubo limpio, añadir igual volumen de  $\text{CHCl}_3$ : alcohol isoamílico (24:1) y mezclar vigorosamente.
- 10- Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min.
- 11- Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y repetir 2 veces mas la extracción con fenol: $\text{CHCl}_3$ :alcohol isoamílico (25:24:1).
- 12- Recuperar el sobrenadante y pasarlo a un tubo limpio. Añadir 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 4,8 y 0,6 volúmenes de isopropanol e incubar en hielo durante 5 min.
- 13- Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min.
- 14- Recuperar el precipitado de ADN, añadir 1 ml de EtOH al 70%, mezclar suavemente por inversión y centrifugar 12,000 rpm durante 5 min.
- 15- Secar el precipitado de ADN, resuspender en 50  $\mu\text{l}$  de agua desionizada, añadir 1  $\mu\text{l}$  de RNAsa (10 mg/ml) e incubar a 37°C durante 15 min.

### **C.7.1.1.2. Técnica del cloruro de litio**

Esta técnica se utilizó para el análisis de recombinantes por restricción, y en la obtención de ADN para la transformación de células competentes.

- 1- Hacer crecer un cultivo en LB, a partir de una colonia aislada, a 37°C durante toda la noche.
- 2- Tomar 1,5 ml de un cultivo y centrifugar a 3,000 rpm durante 10 min.
- 3- Resuspender el precipitado de células con 200  $\mu\text{l}$  de solución I (lisis alcalina, apartado C.7.1.1.1.).
- 4- Añadir 400  $\mu\text{l}$  de solución II, homogenizar por inversión e incubar en hielo durante 5 min.
- 5- Añadir 300  $\mu\text{l}$  de solución III, homogenizar por inversión e incubar en hielo durante 5 min.
- 6- Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
- 7- Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio, añadir 600  $\mu\text{l}$  de isopropanol e incubar a temperatura ambiente por 5 min.
- 8- Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
- 9- Desechar el sobrenadante y secar el precipitado obtenido.
- 10- Resuspender el precipitado en 200  $\mu\text{l}$  de TE (10 mM Tris HCl, 1mM EDTA pH 8,0), añadir 200  $\mu\text{l}$  de LiCl 5M e incubar a -20°C durante 5 min.
- 11- Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min y recuperar el sobrenadante.
- 12- Añadir 1 ml de EtOH absoluto, incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
- 13- Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.

- 14- Lavar el precipitado de ácidos nucleicos con 1 ml de EtOH al 70% y centrifugar a 12,000 rpm
- 15- Secar el precipitado y resuspender en 30  $\mu$ l de TE. Al final tratar la mezcla con 1  $\mu$ l de RNAsa (10 mg/ml) a 37°C durante 15 min.

### **C.7.1.1.3. Purificación por columnas utilizando tierra de diatomeas**

Esta técnica se aplicó para la extracción de ADN utilizado para secuencia nucleotídica.

- 1- Hacer crecer un cultivo a partir de una colonia aislada en LB, a 37°C durante toda la noche.
- 2- Tomar 1,5 ml y centrifugar a 12,000 rpm durante 1 min.
- 3- Eliminar el medio de cultivo y resuspender las células en 200  $\mu$ l de solución I (lisis alcalina, apartado C.7.1.1.1.).
- 4- Añadir 200  $\mu$ l de solución II y homogenizar cuidadosamente por inversión hasta que se aclare la mezcla.
- 5- Añadir 200  $\mu$ l de solución III y homogenizar vigorosamente con *vortex*.
- 6- Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min.
- 7- Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio, añadir 1 ml de tierra de diatomeas (Ref: D5509, *Sigma*), homogenizar, e incuba la suspensión durante 1 min a temperatura ambiente.
- 8- Pasar la suspensión por una minicolumna (Wizard® minicolumns, *Promega*) acoplada a una jeringa estéril de 10 ml.
- 9- Pasar por la columna 2 ml de solución de lavado (EtOH 70%).
- 10- Separar la columna de la jeringa, acoplarla a un tubo *ependorf* de 1,5 ml y centrifugar a 12,000 rpm durante 30 seg.
- 11- Acoplar nuevamente la columna a un tubo *ependorf* de 1,5 ml limpio, añadir 50  $\mu$ l de agua desionizada precalentada a 80°C, e incubar durante 1 min.
- 12- Centrifugar durante 1 min a 12,000 rpm y recuperar el ADN disuelto en el agua.

Para la preparación de la tierra de diatomeas:

- Lavar la tierra de diatomeas mediante agitación suave con 10 volúmenes (p/v) de agua desionizada.
- Decantar durante un mínimo de 3 h.

- Desechar el sobrenadante y resuspender en 15 volúmenes (p/v) de hidrocloreuro de guanidina (Ref: G3272, *Sigma*) 6M, en 20 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl.

### **C.7.1.2. Extracción de ADN cosmídico a partir de *M. smegmatis***

Para la extracción de cósmidos a partir de *M. smegmatis* se utilizó un método basado en la extracción de plásmidos a partir de *E. coli* por lisis alcalina:

- 1- Inocular una colonia aislada en 10 ml de 7H9-ADC-Tween 80 (0,05%), e incubar a 37°C con agitación hasta la fase estacionaria de crecimiento (24-48 h).
- 2- Centrifugar 5 ml del cultivo a 12,000 rpm durante 3 min.
- 3- Desechar el medio de cultivo y resuspender las células con ayuda de *vortex* en 200 µl de solución I (lisis alcalina, apartado C.7.1.1.1.).
- 4- Añadir a la mezcla lisozima a una concentración final de 10 mg/ml e incubar a 37°C entre 16-24 h.
- 5- Añadir 200 µl de solución II, homogenizar por inversión e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
- 6- Añadir 200 µl de solución III, incubar en hielo durante 5 min y centrifugar a 12,000 rpm durante 7 min.
- 7- Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio y purificar por el método de columna y tierra de diatomeas.

Cuando la cantidad de ADN recuperado es muy pequeña, el plásmido obtenido se retransforma en *E. coli*.

### **C.7.1.3. Extracción de ADN cromosómico de *M. tuberculosis***

- 1- Inocular 20 ml de 7H9-ADC-Tween 80 a partir de una cepa congelada, o de colonias hechas crecer en medio sólido. Incubar a 37°C con agitación (90 rpm) hasta la saturación del cultivo (14-21 días)
- 2- Inocular 1/100 del precultivo inicial en 20 ml (preparación a pequeña escala) o entre 200 y 1,000 ml (preparación a gran escala) de 7H9-ADC-tween.
- 3- Incubar a 37°C con agitación (90 rpm ) durante 14-21 días.

- 4- Centrifugar las células a 4,500 rpm durante 10 min a 4°C y resuspender en 1/10 de volumen de cultivo (paso 2) en TE (pH 8,0).
- 5- Centrifugar nuevamente como en 3, desechar el sobrenadante y congelar el precipitado de bacterias a -20°C durante mínimo 4 h.
- 6- Una vez descongeladas las bacterias, resuspender en 1/100 de volumen inicial de cultivo (paso 2) en TE (pH 8,0) y extraer con 1 volumen de CHCl<sub>3</sub>:metanol (2:1) agitando suavemente en plataforma rotatoria durante 5 min.
- 7- Centrifugar a 12,000 rpm durante 20 min. En este punto se obtienen dos fases (acuosa y orgánica) y una interfase bacteriana. Decantar y recuperar cuidadosamente la interfase bacteriana.
- 8- Incubar las células delipidificadas a 55°C hasta que se evapore la totalidad del solvente orgánico.
- 9- Resuspender en 1/100 del volumen de cultivo (paso 2) en TE (pH 8,0), agitar vigorosamente y añadir 0,1 volúmenes. de Tris-HCl (pH 9,0).
- 10- Añadir 0,01 volúmenes. de lisozima (10 mg/ml) e incubar a 37°C durante 12-16 h.
- 11- Añadir 0.1 volúmenes de SDS 10% y 0,01 volúmenes. de proteinasa-K (10 mg/ml), mezclar por inversión e incubar a 55°C durante 3 h. Si al final la solución se vuelve homogénea y viscosa, adicionar nuevamente SDS hasta un el 2% y 0,01 volúmenes. de proteinasa-K e incubar nuevamente a 55°C durante 1 h adicional.
- 12- Extraer con 1 volumen. de fenol:CHCl<sub>3</sub>:alcohol isoamílico (25:24:1) mediante agitación suave en plataforma rotatoria durante 30 min. El fenol debe estar a pH 7,8 y recién preparado.
- 13- Centrifugar a 12,000 rpm durante 30 min.
- 14- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio, añadir 1 volumen. de CHCl<sub>3</sub>: alcohol isoamílico (24:1), agitar suavemente durante 5 min y centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min.
- 15- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio, añadir 0,1 volúmenes. de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 1 volumen de isopropanol, mezclar cuidadosamente por inversión e incubar a 4°C durante 1 h.
- 16- Centrifugar a 12,000 rpm durante 30 min.
- 17- Lavar con EtOH al 70% y centrifugar a 12,000 rpm.
- 18- Secar el precipitado y resuspender en 400 µl TE (pH 8,0) para un volumen inicial de 200 ml de cultivo (paso 2) (Belisle *et al.*, 1998).

### **C.7.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Para la construcción de la librería de *M. tuberculosis* H37Rv y la caracterización de recombinantes, se utilizaron las enzimas de restricción *Sau* 3A, *Bam* HI, *Pst* I, *Eco* RI, *Bgl* II, *Eco* RV y *Sca* I (Boehringer-Mannheim).

En las digestiones de ADN plasmídico se añadieron 2 U enzima /  $\mu\text{g}$  de ADN incubando a  $37^\circ\text{C}$  durante 1-2 h. Para cósmidos recombinantes se incubó durante toda la noche.

Para la digestión parcial de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv se utilizó el método de diluciones seriadas de la enzima frente a una concentración constante de ADN (Ausbel *et al.*, 1993).

- 1- Hacer una mezcla de reacción (100  $\mu\text{l}$ ) con el ADN genómico disuelto en buffer de digestión 1X.
- 2- Repartir la mezcla en 5 tubos *ependorf* de 1,5 ml: 30  $\mu\text{l}$  en el primer tubo, 20  $\mu\text{l}$  en el segundo a cuarto tubo, y 10  $\mu\text{l}$  en el último.
- 3- Añadir enzima al primer tubo a una concentración final de 0,5 U/ $\mu\text{g}$  de ADN.
- 4- Pasar inmediatamente 10  $\mu\text{l}$  de la reacción del primer tubo al segundo y así sucesivamente, hasta el tubo quinto.
- 5- Incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 min.
- 6- Frenar la reacción inmediatamente con EDTA a una concentración final de 20 mM.

En la construcción de la cosmidoteca de *M. tuberculosis* H37Rv se diluyeron 45  $\mu\text{g}$  de ADN en buffer de digestión 1X de *Sau* 3A.

### **C.7.3. Electroforesis en gel de agarosa**

La visualización de ADN después de extraído o cortado con enzimas de restricción, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa.

- 1- Disolver la agarosa mediante calentamiento, a una concentración entre 0,7-1,0% en buffer TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 0,2 M EDTA, pH 8,0).
- 2- Añadir bromuro de etidio a una concentración final de 1,5 mg/ml.
- 3- Verter la agarosa fusionada sobre un molde de geles con peine.
- 4- Una vez gelificada la agarosa, retirar el peine y pasar el gel a una cubeta de electroforesis con TBE 1X.
- 5- Aplicar la muestras de ADN disueltas al 15% en solución de azul de bromofenol (0,0025% azul de bromofenol, 10% sacarosa, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0), en los pozos del gel.
- 6- Desarrollar la electroforesis razón de 5V/cm de gel durante 40 min para la separación de fragmentos de ADN en geles de 10 cm de longitud.
- 7- Una vez desarrollada la electroforesis, visualizar el ADN con radiación UV.
- 8- Fotografiar el gel.

Para analizar los cortes parciales de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv con *Sau* 3A, se utilizaron geles de 20 cm al 0,4 % de agarosa preparados en TBE 0,5X previamente autoclavado. Los geles se prepararon sobre una base previamente elaborada de agarosa al 1% en TBE 0,5X sin bromuro de etidio. Estos geles se desarrollan a 20 V durante toda la noche y se tiñeron por inmersión en bromuro de etidio (1,5 mg/ml) durante 10-20 min. Como control de peso molecular se utilizó el fago  $\lambda$  (*Boehringer-Mannheim*) digerido con *Pst* I, *Hind* III, *Xho* I, o *Bst* I.

Para visualizar el ADN se utilizó un transiluminador TFX-20C (*Vilber Lourmet*) a una longitud de onda de 254 nm, en un cuarto oscuro. Los geles se fotografiaron con una cámara “MP4-Land Camera” (*Polaroid*) utilizando película *Polaroid* 667, o con el sistema “Gel Doc 2000” (*BioRad*).

### C.7.4. Purificación de fragmentos de ADN

Para recuperar ADN a partir de geles de agarosa, se utilizaron diferentes métodos dependiendo del tamaño del fragmento a purificar.

#### C.7.4.1. Purificación por columna GFX™

Los fragmentos de ADN con tamaño menor a 30 kpb, se purificaron con el sistema “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (*Pharmacia*):

- 1- Visualizar los fragmentos ADN en el gel utilizando luz UV (360 nm).
- 2- Cortar el fragmento de ADN con un bisturí estéril intentando recuperar el mínimo de agarosa. Es importante exponer el ADN lo menos posible a la radiación UV.
- 3- Pesar el fragmento de agarosa y pasarlo a un tubo *epENDORF* estéril. No procesar mas de 300 mg de agar por reacción de purificación.
- 4- Añadir “buffer de captura” (NaI 5 M) a razón de 10  $\mu$ l / 10 mg de agarosa. Mezclar con *vortex* e incubar a 50°C durante 5-15 min hasta que la agarosa se funda completamente.
- 5- Transferir la mezcla a una columna de purificación acoplada a un tubo *epENDORF* de 1,5 ml, e incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
- 6- Centrifugar la columna a 12,000 rpm durante 30 seg.
- 7- Desechar el filtrado y añadir 500  $\mu$ l de “buffer de lavado” (EtOH al 70%).
- 8- Centrifugar durante 30 seg a 12,000 rpm.
- 9- Pasar la columna a un tubo *epENDORF* nuevo, añadir 50  $\mu$ l de agua desionizada en el centro de la columna y centrifugar a 12,000 rpm durante 1 min. El ADN se recupera disuelto en el agua.

### C.7.4.2. Electroelución

Este método se utilizó para la purificación de fragmentos de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv entre 30-45 kpb, obtenidos mediante digestión parcial con *Sau* 3A (Sambrook *et al.*, 1989).

- 1- Visualizar los fragmentos de ADN en el gel mediante radiación UV (360 nm).
- 2- Cortar las bandas de gel con un bisturí estéril, e introducirlas en una bolsa de diálisis de 2,5 cm de ancho.
- 3- Añadir entre 1,5 y 3,0 ml de TBE 0,5X autoclavado, cerrar la bolsa herméticamente y sumergirla en el centro de una cámara de electroforesis para geles de agarosa conteniendo TBE 0,5X. Es importante que la agarosa quede ubicada dentro de la bolsa de diálisis en el extremo más lejano del electrodo negativo.
- 4- Aplicar 100 V durante 1 h. La migración de ADN a la solución de TBE se puede controlar con la ayuda de una lámpara UV de mano “*shorthand*” (Sigma).
- 5- Una vez finalizada la migración del ADN, invertir los electrodos y aplicar nuevamente un voltaje de 100 V durante 1-2 min para asegurar que no quede ADN adherido a las paredes de la bolsa de diálisis.
- 6- Recuperar la solución de TBE 0,5X (que contiene el ADN) y extraer con fenol:CHCl<sub>3</sub>:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) (C.7.1.3.12-14).
- 7- Añadir 1/10 (v/v) de acetato de sodio 3M (pH 4.8) y 2,5 volúmenes de EtOH, e incubar a -20°C durante 15 min.
- 8- Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C. Desechar el sobrenadante.
- 9- Lavar el precipitado con EtOH al 70%.
- 10- Secar el precipitado de ácidos nucleicos y disolver en 30 µl agua desionizada.

### C.7.5. Defosforilación de extremos de ADN

Para la defosforilación de los extremos cohesivos de pYUB18 o pSUM36 linealizado, se utilizó fosfatasa alcalina de intestino de ternera (*Boehringer-Mannheim*) en buffer de defosforilación 1X (0,1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl a pH 8,5) a una concentración de 0,04 U de enzima/pmol extremos cohesivos.

- 1- Disolver el ADN previamente cortado en buffer de defosforilación 1X, a un volumen final de 50 µl.
- 2- Añadir la fosfatasa alcalina a la concentración recomendada por el fabricante.

- 3- Incubar a 37°C durante 1 h.
- 4- Añadir EDTA a una concentración final de 0,005M y calentar a 65°C durante 10 min para parar la reacción.

### C.7.6. Ligación de fragmentos de ADN

Para las ligaciones de fragmentos de ADN en la construcción de la cosmidoteca de *M. tuberculosis* H37Rv y los subclonajes, se utilizó la enzima T7 ADN ligasa (*Gibco BRL*).

- 1- Mezclar el vector defosforilado y los insertos de ADN, en buffer de ligación 1X a una proporción vector:inserto (1:10) en un volumen máximo de 20 µl de reacción.
- 2- Calentar la mezcla a 65°C durante 1 min, e incubar en hielo por 1 min.
- 3- Añadir 4 U ligasa/µg de vector.
- 4- Mezclar suavemente sin añadir burbujas e incubar a 16°C durante toda la noche.

En la construcción de la cosmidoteca (pYUB18::H37Rv) la ligación se realizó en buffer 1X (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% (p/v) PEG 8000, 50 mM Tris-HCl pH 7,6) a una concentración de 50 ng de ADN total /µl de reacción de ligación y a una concentración de 1,3 U ligasa /pmol de extremos de vector.

### C.7.7. Empaquetamiento *in vitro* de la cosmidoteca

El producto de la ligación entre los fragmentos de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv digeridos parcialmente con *Sau* 3A (30-45 kpb) y pYUB18 cortado con *Bam* HI, se empaquetó en cabezas de bacteriófago λ utilizando el sistema “Gigapack III Plus Packaging Extract” (*Stratagene*):

- 1- Descongelar en hielo un extracto de empaquetamiento (25 µl), que contiene las cabezas y colas de λ.
- 2- Añadir inmediatamente 4 µl (200 ng) de la mezcla de ligación, homogenizar cuidadosamente sin introducir burbujas e incubar a 22°C durante 2 h.
- 3- Añadir 500 µl de buffer SM (0,1 M NaCl, 16 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) y 0,01% gelatina) y 20 µl de CHCl<sub>3</sub>, mezclar cuidadosamente y centrifugar durante 10 seg a 12,000 rpm.
- 4- Recuperar el sobrenadante que contiene las partículas de bacteriófago recién reconstituidas y guardar a 4°C hasta su titulación.

### **C.7.8. Transducción, amplificación y titulación de la cosmidoteca de *M. tuberculosis* H37Rv**

Una vez empaquetada la cosmidoteca en las partículas del bacteriófago  $\lambda$ , se procedió a su transducción en la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' de la siguiente forma:

- 1- Hacer un cultivo a partir de una colonia aislada en LB-MgSO<sub>4</sub>-maltosa hasta una OD<sub>600</sub> = 0,8.
- 2- Centrifugar a 1,500 rpm durante 10 min y resuspender las células bajo condiciones estériles en MgSO<sub>4</sub> 10 mM hasta una OD<sub>600</sub> = 0,5.
- 3- Mezclar por separado 25  $\mu$ l de células disueltas en MgSO<sub>4</sub> 10 mM, con 25  $\mu$ l de reacción de empaquetamiento diluida 1:10 y 1:50 en buffer SM, e incubar a 37°C durante 30 min.
- 4- Añadir 200  $\mu$ l de LB e incubar a 37°C durante 1 h. Mezclar suavemente por inversión cada 15 min.
- 5- Sembrar las células en LB-Kan e incubar a 37°C durante toda la noche. Calcular el título de los fagos después de 18 h de incubación .

El resto de la reacción de empaquetamiento se transdujo en la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' y se plaquéó en LB-kan de tal forma que se obtuvieran aproximadamente 500 colonias / placa. Una vez crecidas la células transducidas se recolectaron con ayuda de un asa y se disolvieron en 10 ml de LB. A partir de 1 ml de esta suspensión se aisló cósmido recombinante para transformar *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, el resto de la mezcla se diluyó en glicerol al 15% y se guardó a -80°C.

### **C.7.9. Preparación de células competentes, transformación y electroporación**

Para la transformación de *E. coli* se utilizó la electroporación, o el método clásico de transformación de células competentes preparadas con  $\text{CaCl}_2$ . La transformación de cósmidos en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 se realizó mediante electroporación.

#### **C.7.9.1. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli***

- 1- Inocular una colonia aislada en 5 ml de LB, e incubar a 37°C con agitación durante toda la noche.
- 2- En un matraz de 2 l, inocular 200 ml de LB fresco con 2 ml del cultivo anterior, e incubar a 37°C con agitación fuerte (250 rpm) hasta alcanzar una  $\text{OD}_{600} = 0,7$  aproximadamente.
- 3- Incubar en hielo durante 30 min. A partir de este momento el procedimiento se continua permanentemente en hielo.
- 4- Centrifugar a 5,000 rpm durante 5 min a 4°C, desechar el sobrenadante y lavar a continuación las células con 200 ml de agua desionizada, estéril y fría. Es importante no agitar fuertemente.
- 5- Centrifugar las células a iguales condiciones (paso 4) y repetir el lavado con agua.
- 6- Lavar con 100 ml de glicerol al 10% y centrifugar (paso 4).
- 7- Resuspender las células al final en 2 ml de glicerol al 10%, en un baño de nieve carbónica mezclada con EtOH.
- 8- Guardar las células en alícuotas de 40  $\mu\text{l}$  a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### **C.7.9.2. Preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155**

- 1- Inocular una colonia aislada y fresca en 20 ml de 7H9-ADC-Tween 80 contenidos en un matraz de 1 l conteniendo aproximadamente 20 perlas de vidrio de 2,5-3 mm de diámetro.
- 2- Incubar con agitación (200 rpm ) a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (entre 2-3 días).
- 3- Inocular 5 ml del cultivo anterior en 200 ml de 7H9-ADC-Tween 80 en un matraz de 2 l con perlas de vidrio (paso 1), e incubar con agitación (200 rpm) a 37°C hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> entre 0,8 y 1,0 (16-20 h aproximadamente).
- 4- Incubar en hielo durante 1,5 h.
- 5- Centrifugar a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C y desechar el sobrenadante.
- 6- Lavar las células con 200 ml de agua desionizada fría mediante agitación suave.
- 7- Centrifugar a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C.
- 8- Lavar nuevamente con 200 ml de glicerol 10% frío y centrifugar como (paso 7).
- 9- Resuspender las células en 12 ml de glicerol al 10% frío y centrifugar nuevamente (paso 5).
- 10- Resuspender las células en 2 ml de glicerol al 10%.
- 11- Repartir finalmente en alícuotas de 80 µl en baño de nieve carbónica con EtOH y guardarlas a –80°C hasta su uso.

### C.7.9.3 Electroporación de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *E. coli*.

La electroporación se utilizó para la transformación de células con plásmidos, cósmidos o mezclas de ligación.

- 1- Descongelar en hielo una alícuota de 40  $\mu$ l de células electrocompetentes de *E. coli*, o de 80  $\mu$ l de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.
- 2- Añadir la misma cantidad de agua desionizada fría, mezclar cuidadosamente, añadir 1-10 ng de ADN, e incubar en hielo durante 2 min.
- 3- Pasar inmediatamente la mezcla de células y ADN a una cubeta de electroporación de 2 mm de ventana (*BioRad*) evitando la formación de burbujas, e incubar en hielo durante 1 min.
- 4- Someter la cubeta en un equipo “GenPulser™” (*Biorad*) a una descarga de 2,500 voltios, bajo las condiciones de: 25  $\mu$ F capacitancia y 1,000  $\Omega$  de resistencia para *M. smegmatis*, o 200  $\Omega$  para *E. coli*.
- 5- Dependiendo del caso, añadir inmediatamente 1 ml de LB, o de 7H9-OADC, a las células de *E. coli* o *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 respectivamente. Pasar a un tubo estéril e incubar con agitación suave a 37°C durante 1-3 h. Para la selección con Kan, incubar 1h las células de *E. coli* o 3 h las de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.
- 6- Sembrar las células electroporadas en placas de agar (LB para *E. coli* y 7H10-OADC para *M. smegmatis*), e incubar a 37°C hasta la aparición de colonias. Las colonias de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 tardan generalmente entre 3 y 5 días en aparecer.

En la electroporación de la cosmidoteca de *M. tuberculosis* H37Rv en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 se utilizaron 250ng de mezcla de cósmidos recombinantes extraídos a partir de *E. coli*.

El ADN proveniente de una mezcla de ligación, se sometió a microdializado antes de la electroporación:

- a- Añadir 20 ml de agua desionizada estéril en una placa de Petri.
- b- Suspender sobre la superficie del agua, una membrana *Millipore* de 0,05  $\mu$ m poro y de 1,5 cm de diámetro.
- c- Colocar la mezcla de ligación sobre la membrana.
- d- Dejar la mezcla de ligación sobre la membrana entre 45 min y 1 h.
- e- Recuperar la mezcla con una micropipeta. En este momento el ADN se encuentra listo para la electroporación.

#### **C.7.9.4. Preparación de células competentes de *E. coli* con $\text{CaCl}_2$**

- 1- Inocular una colonia fresca en 10 ml de LB e incubar a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento.
- 2- Inocular 100 ml de LB con 1 ml del cultivo anterior, e incubar a 37°C con agitación fuerte (250 rpm) hasta alcanzar una  $\text{OD}_{600} = 0,5$  aproximadamente.
- 3- Incubar en hielo durante 10 min
- 4- Centrifugar a 5,000 rpm durante 5 min.
- 5- Resuspender las células en 20 ml de  $\text{CaCl}_2$  50 mM frío, e incubar en hielo durante 30 min.
- 6- Centrifugar a 5,000 rpm y resuspender en 5 ml de glicerol al 10% frío.
- 7- Transformar inmediatamente, o guardar las células en alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **C.7.9.5. Transformación de células competentes ( $\text{CaCl}_2$ ) de *E. coli***

- 1- Descongelar 200  $\mu\text{l}$  las células competentes en hielo y añadir cuidadosamente el ADN (10-100 ng) sin producir burbujas.
- 2- Incubar en hielo durante 30 min.
- 3- Incubar durante 45 seg a 42°C en un baño de agua.
- 4- Añadir inmediatamente 1 ml de medio SOC, e incubar a 37°C con agitación suave durante 1 h (selección con Kan).
- 5- Sembrar las células en placas de LB e incubar a 37°C hasta la aparición de colonias. Es recomendable sembrar diluciones 1:10 y 1:100 de la transformación.

#### **C.8. Cribaje de la cosmidoteca de *M. tuberculosis* H37Rv con RN**

Para el cribaje de la cosmidoteca de *M. tuberculosis* H37Rv transformada en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 se aplicó el método desarrollado en este trabajo de tinción con RN de colonias de micobacteria crecidas y fijadas en placas de agar Middlebrook 7H10 modificado.

- 1- Se hicieron crecer réplicas de 3,000 colonias de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) en placas de agar Middlebrook 7H10-OADC modificado-Kan (50 colonias/placa) a 37°C durante 3 días.
- 2- Una vez crecidas las colonias, se fijaron a las placas y se tiñeron con RN.
- 3- Las colonias RN<sup>+</sup> de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) seleccionadas se sembraron y se sometieron a tres rondas sucesivas de purificación por tinción con RN.
- 4- Las cepas finalmente seleccionadas se hicieron crecer individualmente en agar Middlebrook 7H10-OADC / Kan (25 µg/ml) durante 5 días, se obtuvieron extractos glicolipídicos y se analizaron mediante CCF-1D y CCF-2D

Además, se aislaron los cósmidos recombinantes a partir de las colonias RN<sup>+</sup> de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) seleccionadas, y se caracterizaron mediante digestión con *Pst* I, *Eco* RI, *Eco* RV y *Sca* I, y secuenciación de ADN.

## C.9. Secuenciación de ADN y análisis computacional

Se secuenciaron los extremos de los insertos genómicos contenidos en los cósmidos recombinantes de las cepas *RN+* de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) seleccionadas.

Se utilizó el método de secuenciación automática mediante el sistema “Big Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit” (*Applied Biosystems*).

Para la secuenciación se utilizaron los “primers” PY1 y PY2 diseñados corriente arriba y corriente abajo respectivamente del sitio de clonación *Bam* HI de pYUB18. La secuencia de los “primers” es:

|      |    |                       |    |
|------|----|-----------------------|----|
| PY1: | 5′ | GGAGCGGCACGCCCCGACATG | 3′ |
| PY2: | 5′ | CTCGTCGGCATCGATGTACT  | 3′ |

El “primer” PY1 se diseñó a partir de la secuencia nucleotídica reportada de pAL5000 (Ranes *et al.*, 1990) y PY2 a partir de la secuencia parcial obtenida de pYUB18 utilizando PY1.

La reacción de secuencia estaba compuesta por:

- 1-4 µl de ADN (1 µg de cósmido recombinante)
- 4 µl de “primer” (0,8 pmol/µl)
- 2,0 µl de mezcla de reacción 10X (dNTPs, Taq ADN polimerasa y buffer de reacción)
- agua hasta un volumen final de 20 µl.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PM50 (*MJ Research*) y se sometieron al siguiente programa:

|                       |      |        |      |
|-----------------------|------|--------|------|
| Denaturación inicial: | 94°C | 4 min  | 1 X  |
| Anillaje-extensión:   | 65°C | 4 min  | 25 X |
|                       | 94°C | 45 seg |      |
| Extensión final:      | 72°C | 5 min  | 1X   |

Las mezclas de reacción se purificaron por precipitación con EtOH:

- 1- Añadir una mezcla de 64 µl de EtOH al 95% y 16 µl de agua desionizada a los 20 µl de mezcla de reacción, e incubar en hielo durante 10 min.
- 2- Centrifugar a 14,000 rpm durante 20 min a 4°C.
- 3- Desechar cuidadosamente el sobrenadante, añadir 200 µl de EtOH frío al 70% y centrifugar a 14,000 rpm durante 2 min.
- 4- Secar a 37°C hasta evaporar completamente el EtOH.

Una vez precipitadas las reacciones, se analizaron en geles de poliacrilamida al 6% en un “373 ADN Sequencer” (*Applied Biosystem*) en el Servicio de Secuenciación de ADN de la Universidad de Barcelona.

Las secuencias obtenidas de ADN se compararon, utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990), con la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y el genoma de *M. tuberculosis* registrado en TubercuList (<http://www.genolist.pasteur.fr/TubercuList>)



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo se dividen en cinco partes:

1. Tinción diferencial de *M. tuberculosis* con RN en tubo de ensayo y placa de cultivo,
2. análisis de la composición glicolípídica de la pared de cepas de *M. tuberculosis* RN+ y RN-,
3. análisis de la contribución de los glicolípidos de pared a la tinción con RN,
4. construcción de una genoteca de *M. tuberculosis* H37Rv y su cribaje mediante tinción con RN, y
5. análisis de las colonias RN+ de *M. smegmatis* (pYUB18::H37Rv) seleccionadas.

La finalidad de la primera parte del trabajo consistió en desarrollar un método de tinción de colonias de *M. tuberculosis* con RN en placa de cultivo. Inicialmente se buscaron las condiciones óptimas de tinción de células en tubo de ensayo para aplicarlas a la tinción de colonias en placa. Para ésta última se necesitó desarrollar un método eficiente de fijación de colonias de micobacteria a las placas de cultivo, que se logró mediante el uso de agar Middlebrook 7H10-OADC modificado.

A continuación se buscó una posible correlación entre la composición glicolípídica de la pared de *M. tuberculosis*, especialmente la presencia de SL, y la fijación de RN, por medio del análisis de la reactividad de las fracciones glicolípídicas de la pared con el RN (NRA).

En la segunda parte del trabajo se construyó una genoteca de *M. tuberculosis* H37Rv, se transformó en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y se realizó un cribaje con RN, aplicando la metodología desarrollada para la tinción de colonias en placa.

Finalmente se analizaron las cepas RN+ de *M. smegmatis* (pYUB18::H37Rv) seleccionadas y se determinó su perfil glicolípídico mediante CCF, para poder relacionarlo con el carácter RN+. Mediante secuencia de ADN y análisis de restricción de un mutante RN- se buscaron los genes relacionados con la tinción de las colonias RN+ de *M. smegmatis*.

## D.1. Tinción diferencial de *M. tuberculosis* con RN en tubo de ensayo y placa de cultivo

### D.1.1. Tinción de células en tubo

La diferenciación entre cepas virulentas y avirulentas de *M. tuberculosis* mediante tinción con RN consiste básicamente en que las cepas virulentas, como H37Rv, adquieren una coloración roja después de algunos minutos de reacción con el colorante (Dubos y Middlebrook, 1948).

Con el fin de iniciar un estudio encaminado a caracterizar la tinción con RN de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*, en este trabajo se evaluaron inicialmente las mejores condiciones de fijación del colorante en las diferentes cepas.

Se partió del protocolo original de tinción descrito por Dubos y Middlebrook (1948). Al reproducirlo, se pudieron hacer varias observaciones sobre las características generales de la técnica de tinción.

Inicialmente se apreció que la solución de buffer barbiturato recién preparada posee un pH de 9,8 aproximadamente, que le otorga a la reacción un ambiente claramente alcalino. A pesar de que los autores sugieren el uso de cualquier otro sistema de buffer alcalino, en este trabajo se continuó utilizando el buffer barbiturato (pH 9,8) para obtener resultados lo más comparables con la técnica original.

Siguiendo con el desarrollo del protocolo también se observó que el buffer barbiturato adquiere una coloración amarilla intensa en contacto con el RN. Esta característica se puede explicar debido a que el RN (monohidrocloreto de N<sup>8</sup>, N<sup>8</sup>, 3-trimetil-2,8 fenacina diamina) es una base relativamente débil, y a un pH > 8,0 se desprotona el nitrógeno más básico (monohidrocloreto) de su fenacina originándose la forma básica del colorante caracterizada por su coloración amarilla en solución acuosa (Fig.13). La tonalidad adquirida por el buffer de tinción posee una intensidad suficiente que contrasta con el color original de las micobacterias.

Después de hacer las anteriores observaciones generales sobre el buffer de tinción, el test de RN se aplicó a varias cepas de *M. tuberculosis* (tabla 9).

Se observó, que tanto en los lavados con MetOH al 50% como en la reacción de tinción, las células siempre se conservaron en el fondo del tubo de ensayo, por lo que no se hizo necesario centrifugar para hacer una valoración correcta de la coloración final de las bacterias.

La coloración adquirida por algunas cepas se evidenció a partir de los 5 min de reacción con el buffer de tinción. Después de 30 min de reacción se observó una estricta correlación entre las cepas virulentas y la coloración roja adquirida por las células (tabla 9).

**TABLA 9. Test del RN sobre diferentes cepas de micobacterias.**

| Cepa | Coloración |
|------|------------|
|------|------------|

---

|   |            |
|---|------------|
| <i>M. tuberculosis</i> H37Rv                        | roja       |
| <i>M. tuberculosis</i> H37Ra                        | original   |
| <i>M. canetti</i>                                   | rosa tenue |
| <i>M. tuberculosis</i> 511/K                        | roja       |
| <i>M. tuberculosis</i> MT-103                       | roja       |
| Otros aislados clínicos ( <i>M. tuberculosis</i> )* | roja       |
| <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155             | amarilla   |

---

(\*) cepas 92/K, 267/K, 322/K, 530/K y 620/K se aislaron de pacientes tuberculosos diagnosticados por aislamiento e identificación de *M. tuberculosis* en cultivo.

Por la apariencia de las bacterias teñidas, se podría deducir que la fijación del colorante se efectúa en la parte más externa de las micobacterias (Fig. 15A y B). En este caso, al contrario de lo que sucede al adicionar el RN en el buffer barbiturato, el colorante que se fija en la superficie de las bacterias sufre una protonación en el nitrógeno básico de su fenacina que origina un cambio de la coloración amarilla que ha tomado al estar disuelto en el buffer alcalino, a una coloración roja al ser fijado en la superficie celular. Como se ha mencionado anteriormente, la forma ionizada de color rojo del RN es característica de las soluciones ácidas del colorante (Fig. 13). Por lo tanto, es muy probable que la coloración característica adquirida por las cepas virulentas al reaccionar con RN sea producida por efecto de los componentes ácidos presentes en la capa más externa de la pared, expuestos a reaccionar con el colorante después de lavar con MetOH al 50%.

Para ver esta película, debe  
disponer de QuickTime™ y de  
un descompresor Photo - JPEG.

Para ver est  
disponer de (   
un descompre

C

**Figura 15. Diferenciación de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv mediante tinción con RN en tubo de ensayo (A y B) y placa de cultivo (C).**

La cepa control *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 adquirió la misma tonalidad amarilla del buffer de tinción, que es más intensa que la coloración original de las bacterias. Esto también podría sugerir que las células de

*M. smegmatis* también fijan RN en su envoltura tal como lo hacen las cepas virulentas de *M. tuberculosis* pero, al contrario que en ellas, las moléculas de colorante fijado conservan su estado protonado de coloración amarilla (Fig. 13). Esto podría indirectamente sugerir que la envoltura de *M. smegmatis* posee un carácter ligeramente básico que mantiene el RN en su estado protonado (amarillo).

En la mayoría de los casos la coloración roja adquirida por las cepas virulentas de *M. tuberculosis* al fijar RN se diferenciaba fácilmente de la coloración amarilla característica del buffer de tinción. También se observó que al aplicar el test sobre cepas como *M. canetti*, el contraste de la coloración de las bacterias con el buffer de tinción no era tan claro como el caso de otras cepas virulentas. Por lo tanto, se decidió estudiar algunas variables de la técnica con el fin de encontrar mejores condiciones que produjeran un mayor contraste de tonalidades en la reacción de tinción. Para esta parte del estudio se utilizó como control positivo *M. tuberculosis* H37Rv y como control negativo *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

Se evaluaron los siguientes parámetros: la concentración de RN, la concentración de barbiturato de sodio en el buffer de tinción y el número de lavados con MetOH al 50%.

Al variar la concentración de RN se obtuvieron los resultados de la tabla 10.

**TABLA 10. Efecto de la variación de la concentración de colorante en el test de RN.**

| % RN    | Coloración                              |                              | Valoración del test |
|---------|---|------------------------------|---------------------|
|         | <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 | <i>M. tuberculosis</i> H37Rv |                     |
| 0,00025 | amarilla                                | amarilla                     | -                   |
| 0,0005  | amarilla                                | amarilla                     | -                   |
| 0,0010  | amarilla                                | amarilla                     | -                   |
| 0,0015  | amarilla                                | roja                         | +                   |
| 0,0020  | amarilla                                | roja                         | +                   |
| 0,0030  | roja                                    | roja                         | -                   |

De acuerdo a los resultados obtenidos, se dedujo que para obtener una correcta coloración de las células, la concentración óptima de RN en el buffer de tinción debería oscilar entre el 0,0015 y 0,0020%. En el protocolo descrito originalmente por Dubos y Middlebrook (1948) el RN se utiliza al 0,0020% en el buffer de tinción. De acuerdo a los resultados obtenidos (tabla 10), esta concentración se encuentra entre las más adecuadas para la tinción, por lo que se continuó utilizando en la aplicación del test.

Al utilizar concentraciones de RN superiores a 0,0020%, el colorante se fijó indistintamente en la superficie celular de todas las cepas de micobacterias, incluida el control negativo. Este comportamiento podría ser debido muy probablemente a una saturación de moléculas en la solución de tinción que podría

originar una pérdida de solubilidad del colorante, lo que lo haría más susceptible a precipitar y ser fijado sobre la superficie de las bacterias.

A continuación se decidió evaluar la concentración de barbiturato de sodio en el buffer de tinción y su efecto en la coloración del medio de reacción (tabla 11).

**TABLA 11. Variación de la concentración de barbiturato de sodio en el test de RN.**

| %<br>barbiturato<br>en NaCl 5% | pH   | Coloración                              |                              | Valoración del test |
|--------------------------------|------|---|------------------------------|---------------------|
|                                |      | <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 | <i>M. tuberculosis</i> H37Rv |                     |
| 0                              | 5,5  | amarilla                                | amarilla                     | -                   |
| 0,1                            | 6,0  | amarilla                                | roja                         | +                   |
| 0,2                            | 7,4  | amarilla                                | roja                         | +                   |
| 1,0                            | 9,8  | amarilla                                | roja                         | +                   |
| 2,0                            | 10,5 | amarilla                                | roja                         | +                   |

El buffer barbiturato se ajustó a pH 9,8 con NaOH antes de añadir RN al 0,0020%.

Como se observa en la tabla 11, se puede obtener una tinción adecuada de las células al utilizar un amplio rango de concentraciones de barbiturato de sodio en el buffer de tinción. Las células de *M. tuberculosis* H37Rv se tiñeron claramente de rojo al utilizar barbiturato de sodio entre 0,1 y 2%. Es importante mencionar que el pH del buffer se hizo menos básico a medida que se disminuía la concentración de barbiturato por debajo del 1%, por lo que siempre se ajustó a 9,8 antes de añadir el colorante.

A pesar de que al utilizar bajas concentraciones de barbiturato de sodio se obtuvo una coloración amarilla menos intensa en el buffer de tinción que aumentaba el contraste de color con las bacterias, se producía un efecto de pérdida de alcalinidad en el medio de reacción. En estos casos se necesitó ajustar el buffer de tinción a pH 9,8.

Por otra parte, no se obtuvieron resultados positivos con el test al utilizar el buffer de tinción a un pH < 9. Las células de cepas avirulentas como *M. tuberculosis* H37Ra tomaron una coloración rosa al final de la reacción de tinción.

De acuerdo a lo observado, por facilidades de manipulación y reproducibilidad se continuó utilizando buffer barbiturato: 1% barbiturato de sodio en 5% NaCl, pH 9,8, para obtener resultados lo más comparables con el test original.

Finalmente se evaluó el efecto de la variación del número de lavados con MetOH acuoso al 50% sobre el test. Se comparó el resultado al desarrollar la técnica sin lavar la bacterias, con 1 y con 2 lavados con MetOH (tabla 12).

TABLA 12. Efecto de los lavados con metanol al 50% en el test del RN.

| Nº de lavados | Coloración                              |                              | Valoración del test |
|---------------|---|------------------------------|---------------------|
|               | <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 | <i>M. tuberculosis</i> H37Rv |                     |
| ninguno       | roja                                    | roja                         | -                   |
| 1             | amarilla                                | roja                         | +                   |
| 2             | amarilla                                | roja                         | +                   |

Al analizar los resultados obtenidos (tabla 12) se puede observar claramente que para desarrollar un test fiable de tinción es indispensable lavar al menos una vez con MetOH al 50%. Al teñir *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 sin lavar previamente con MetOH al 50%, las células tomaron una coloración roja al final de la reacción. Al realizar un solo lavado también se obtuvieron resultados satisfactorios en el test.

El estudio de la variabilidad de los lavados con MetOH permitió analizar algunos fundamentos de la técnica que se relacionan directamente con la composición de la envoltura de las cepas virulentas y de los controles negativos analizados.

Al parecer el efecto del lavado con MetOH al 50% consiste básicamente en la eliminación de algunos componentes de carácter ácido presentes en la cápsula. Algunos compuestos extraídos por los lavados con MetOH al 50% se analizaron mediante CCF. Este análisis mostró la presencia de PIM, entre otros compuestos fuertemente cargados, en el sobrenadante de lavado tanto a partir de células de *M. tuberculosis* como de *M. smegmatis*. Este resultado podría explicar la coloración roja adquirida indistintamente por las células al reaccionar con RN sin ser previamente lavadas con MetOH. Al no ser extraído el exceso de estos compuestos fuertemente alcalinos, las células siempre adquirirán una coloración roja.

En el caso de *M. smegmatis* se ha demostrado la presencia de una alta cantidad de proteínas, GPL y de una capa de oligosacáridos ácidos en su cápsula (Daffé y Etienne, 1999). Al no lavar *M. smegmatis*, el RN podría reaccionar con los oligosacáridos ácidos de la cápsula adquiriendo una coloración roja al final de la reacción. La coloración que, por lo tanto, adquieren las células de *M. smegmatis* lavadas con MetOH al 50% al reaccionar con RN, depende de las características ácidas de los compuestos más externos de la pared celular expuestos después del lavado.

En el caso de *M. tuberculosis*, además de oligosacáridos ácidos, su cápsula está compuesta por proteínas y una alta proporción de polisacáridos neutros como glucano, AM y manano (Daffé y Draper, 1998). Se ha demostrado también la presencia de PIM en las capas más externas de la envoltura de *M. tuberculosis* (Ortalo-Magné *et al.*, 1995). Por lo tanto en la envoltura de *M. tuberculosis* sin lavar existe una

cantidad de compuestos de carácter ácido como PIM, que podría ser suficiente para reaccionar con RN a pesar del posible enmascaramiento de la reacción de tinción por los polisacáridos neutros también presentes en la cápsula.

## **D.1.2 Tinción de colonias en placas de agar Middlebrook 7H10 modificado**

Una vez conocidas las condiciones adecuadas para la diferenciación entre cepas virulentas y avirulentas de *M. tuberculosis* con RN en tubo de ensayo, se aplicaron en la diferenciación de colonias en placa de cultivo.

### **D.1.2.1. Fijación de micobacterias en agar Middlebrook 7H10 modificado**

La inmovilización de las colonias en el agar se hizo esencial para desarrollar una técnica clara y reproducible de diferenciación en placa.

Las condiciones óptimas seleccionadas para la tinción en tubo se aplicaron inicialmente en la diferenciación de colonias crecidas en medio Sauton y Middlebrook 7H10-OADC. En los primeros ensayos se observó un desprendimiento masivo de las colonias después de añadir la solución de lavado (MetOH al 50%). Las colonias de *M. tuberculosis* se desprendían por efecto de los lavados en menor proporción que las de *M. smegmatis* crecidas bajo las mismas condiciones. Se hacía evidente que las placas donde se cultivaba *M. tuberculosis* al permanecer en incubación a 37°C durante mucho más tiempo, se encontraban más secas respecto a las de *M. smegmatis* en el momento de los lavados. Así pues, el grado de humedad del medio de cultivo se convirtió en un parámetro crítico en la fijación de las colonias.

De esta forma se decidió probar el secado de las placas de cultivo antes la tinción. Las placas se trataron con el flujo de una cabina de bioseguridad (TipoIII) y después se tiñeron las colonias. Se observó claramente que el desprendimiento de colonias en los lavados disminuyó considerablemente, deduciéndose por lo tanto que las colonias se habían fijado de forma mas eficiente al agar mediante el proceso de secado.

El paso siguiente consistió en utilizar agar Middlebrook 7H10-OADC modificado (1% en agar), con el que se obtuvieron excelentes resultados. Una vez secadas las placas, no se observó desprendimiento de las colonias durante los procedimientos de lavado y/o reacción con el buffer de tinción. Al utilizar una baja concentración de agar (1%) en el medio, las placas de cultivo retuvieron menor humedad, lo que facilitó el proceso de secado y aseguró una mayor eficiencia en la fijación de las colonias.

El procedimiento combinado de inocular las bacterias dentro del agar (apartado C.3.), el uso de medio Middlebrook 7H10-OADC modificado y el secado de las placas de cultivo después de crecidas las colonias, permitió diseñar un método de fijación de colonias de micobacteria en placa de cultivo de potencial utilidad en la diferenciación de micobacterias mediante tinción con colorantes u otros marcadores fenotípicos.

Es importante mencionar que la técnica de fijación de colonias en placa de cultivo podría tener una potencial aplicación en la identificación de cepas con anticuerpos. Por ejemplo en el clonaje y expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de GPL de *M. avium* por complementación de *M. smegmatis* (Belisle *et al.*, 1991), la selección de clones se realizó mediante inmunoblot a partir de colonias fijadas en nitrocelulosa. Se podría realizar un inmunoblot sobre colonias fijadas en placa para la identificación de cepas utilizando anticuerpos dirigidos contra componentes específicos de la pared.

### D.1.2.2. Tinción de colonias con RN

Las colonias de aislados clínicos de *M. tuberculosis* y de la cepa H37Rv crecidas y fijadas en agar Middlebrook 7H10-OADC modificado se pudieron diferenciar fácilmente de la cepa H37Ra, y de *M. smegmatis* por medio de la tinción con RN. Al igual que la prueba en tubo, las colonias de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*, y de la cepa H37Ra tomaron una coloración roja y amarilla respectivamente al final de la tinción con RN en la misma placa de cultivo (Fig. 15C). Las colonias de *M. smegmatis* mostraron el mismo comportamiento que la cepa avirulenta H37Ra.

Los estudios de diferenciación de cepas virulentas y avirulentas de *M. tuberculosis* con RN se han desarrollado únicamente en tubos de ensayo. En este trabajo también se logró esta diferenciación a partir de colonias crecidas y fijadas en placas de agar Middlebrook 7H10-OADC modificado. Los claros resultados que se obtuvieron en la diferenciación en placa de colonias de *M. tuberculosis* H37Rv, de H37Ra y *M. smegmatis* (Fig. 15), se convirtieron en un parámetro de control clave para el diseño de un método de cribaje con RN de una genoteca de *M. tuberculosis* H37Rv transformada en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

### D.1.2.3. Aplicación de la técnica de tinción en placa

La aplicación directa más importante de las técnicas de tinción con RN estudiadas en este trabajo es sin duda la diferenciación entre las cepas virulentas de *M. tuberculosis* como H37Rv y los aislados clínicos, de las cepas avirulentas como H37Ra. Actualmente se conoce la relevancia que tiene la diferenciación entre las mencionadas cepas para el normal funcionamiento del laboratorio moderno de micobacteriología.

Se ha incrementado recientemente el estudio de las diferencias genómicas (Pascopella *et al.*, 1994; Brosch *et al.*, 1998; Rivera-Marrero *et al.*, 1998; Rindi *et al.*, 1999) y de la supervivencia en las células huésped (Zhang *et al.*, 1998; Akaki *et al.*, 2000; Keane *et al.*, 2000) entre las cepas virulentas y avirulentas de *M. tuberculosis*, como H37Rv y H37Ra. Una diferenciación certera entre ellas es únicamente posible mediante genotipado (RFLP) utilizando la secuencia de inserción IS6110 (van Soolingen *et al.*, 1993; Bifani *et al.*, 2000). A pesar de que la técnica del RFLP es un método fiable y bien estandarizado, no ha sido posible su aplicación generalizada en los laboratorios de micobacteriología debido a que posee unos requerimientos técnicos complejos y costosos.

Por otra parte, no existen tests bioquímicos estándar para diferenciar *M. tuberculosis* H37Rv de H37Ra (Middlebrook *et al.*, 1947; Tsukamura, 1981; Wayne y Kubica, 1986), por lo tanto se necesitan

métodos fáciles y rápidos para su diferenciación. La aplicación de técnicas como la tinción con RN permitiría una excelente alternativa para la diferenciación entre las variantes de la cepa H37 (Steeken y Gardner, 1946) y en general de cepas virulentas y avirulentas de *M. tuberculosis* (Soto *et al.*, 2002). La utilización de la técnica de diferenciación de colonias mediante tinción en placas de agar posee la ventaja de reducir la manipulación de las células, además de ser posible el análisis de diferentes muestras simultáneamente.

La diferenciación por tinción con RN y otros colorantes básicos como el azul de nilo (Soto *et al.*, 2002) podría ser útil en los casos en que se sospecha la contaminación de aislados clínicos de *M. tuberculosis* con la cepa de referencia H37Ra u otras cepas avirulentas de *M. tuberculosis*. Tanto H37Ra como H37Rv son cepas bien caracterizadas, se encuentran ampliamente distribuidas en los laboratorios de micobacteriología y son utilizadas frecuentemente como cepas de referencia.

La contaminación accidental de aislados clínicos con la cepa H37Ra es relativamente frecuente y es una causa importante del aumento en la incidencia de pacientes diagnosticados con TBC caracterizados por ser positivos en un cultivo pero negativos en la detección de AFB “*negative smears, one positive*” (NSOP) (Burman *et al.*, 1997; Nivin *et al.*, 1998). Se conoce que hasta un 56% de NSOP pueden proceder de una contaminación cruzada con H37Ra en el laboratorio. La principal consecuencia de los NSOP es un falso diagnóstico de TBC. La aplicación de técnicas fiables de diferenciación de H37Ra podría evitar tratamientos anti-tuberculosos innecesarios. La disponibilidad de métodos fáciles para la diferenciación posee por lo tanto una importancia relevante en el laboratorio clínico.

## **D.2. Fracciones glicolípídicas de la pared de *M. tuberculosis***

### **D.2.1. Obtención de extractos crudos**

Una vez evaluadas las características de la técnica de tinción con RN y la aplicación en la diferenciación de colonias en tubo y en placa, se evaluó la posible implicación de los glicolípidos de pared de *M. tuberculosis* en la fijación de RN.

Esta parte del trabajo se desarrolló a partir de extractos glicolípidicos obtenidos mediante extracción de las micobacterias con solventes orgánicos. El protocolo utilizado para la obtención de extractos permitió la recuperación de una gran proporción de glicolípidos presentes en la pared celular de *M. tuberculosis*. Aproximadamente entre 30-50 mg de extracto crudo / g de micobacteria en peso húmedo. Utilizando el sistema de extracción CHCl<sub>3</sub>:MetOH (1:2 y 2:1, v/v) se obtuvo una amplia representación de glicolípidos en los extractos crudos. Adicionalmente, el tratamiento de los extractos con CHCl<sub>3</sub>:MetOH:H<sub>2</sub>O (8:4:2, v/v/v) permitió la separación en la fase acuosa de algunas proteínas y azúcares altamente polares presentes en la cápsula que también son extraídos con el CHCl<sub>3</sub>:MetOH. La presencia de estos azúcares en la fase acuosa se determinó mediante CCF-ID, tinción con antrona y comparación con diferentes patrones glicolípidicos.

## D.2.2. Perfiles glicolípidicos y composición porcentual de los extractos crudos

Aproximadamente 0,2 g de extracto crudo de cada cepa se fraccionó por duplicado mediante DEAE. Al final de la cromatografía en columna se recuperó entre el 90-99% de glicolípidos presentes en el extracto crudo inicial.

Mediante DEAE y CCF se pudieron determinar los perfiles glicolípidicos para cepas de *M. tuberculosis* (tabla 13) de diferente grado de virulencia. Como control negativo se utilizó la cepa *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18). De acuerdo con el análisis mediante CCF-1D, todas las cepas de *M. tuberculosis* analizadas presentaron una distribución glicolípídica muy similar. Se detectaron los glicolípidos más característicos de *M. tuberculosis* como: PPT (Daffé y Draper, 1998), DAT, CF y PIM (Dobson *et al.*, 1985; Minnikin *et al.*, 1987; Lemassu *et al.*, 1992). La cepa de *M. canetti* presentó un perfil glicolípídico distinto de las cepas de *M. tuberculosis* analizadas. En esta cepa se encontró un alto contenido de PGL, coincidiendo con perfiles glicolípidicos de *M. canetti* reportados anteriormente (Laszlo *et al.*, 1992).

**TABLA 13. Perfiles glicolípidicos de las diferentes cepas *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18), determinado mediante DEAE y CCF.**

| Cepa                                    | SL | PPT | TDM, PIM y PL | DAT | GPL |
|---|----|-----|---------------|-----|-----|
| <i>M. tuberculosis</i> H37Rv            | +  | +   | +             | +   | -   |
| <i>M. tuberculosis</i> H37Ra            | -  | -   | +             | +   | -   |
| <i>M. tuberculosis</i> 511/K            | +  | +   | +             | +   | -   |
| <i>M. tuberculosis</i> MT-103           | -  | +   | +             | +   | -   |
| <i>M. canetti</i>                       | -  | -   | +             | +   | -   |
| <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 | -  | -   | +             | -   | +   |

A partir del extracto crudo de la cepa control *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18) se obtuvo un perfil glicolípídico similar a los descritos previamente para las cepas de *M. smegmatis* (Minnikin *et al.*, 1987). La cepa *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18) presentó un alto contenido de GPL, además de la presencia de TDM, PIM y PL.

Una vez analizados los perfiles glicolípidicos de las diferentes cepas, las fracciones recuperadas mediante DEAE se reagruparon en 6 nuevas fracciones clasificadas de acuerdo a su polaridad. Estas nuevas fracciones se denominaron: glicolípidos apolares (ApG), trehalosas neutras (NT), fosfolípidos neutros (NP), sulfolípidos (SL), fosfatidilinositolmanósidos (PIM) y fosfolípidos polares (PP) (Fig. 16). La única excepción correspondió para el SL que se detectó únicamente en *M. tuberculosis* H37Rv y en el aislado clínico 511/K entre las cepas analizadas (tabla 13). Para cada cepa también se determinó la composición porcentual,

respecto a la cantidad inicial de extracto glicolípido, de las 6 fracciones reagrupadas después del análisis mediante DEAE (Fig. 16).

La fracción ApG de *M. tuberculosis* H37Rv, MT-103, 511/K y *M. canetti* estaba compuesta principalmente por PPT, a diferencia de las cepas H37Ra y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 en donde este glicolípido no se detectó. Las cepas *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18) y *M. canetti* presentaron un mayor contenido de ApG que las demás cepas estudiadas. En *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18) la ApG alcanzó un 68% del extracto crudo inicial (Fig. 16), notablemente la fracción más abundante de entre las 6 fracciones reagrupadas, y que estaba compuesta principalmente por GPL.

Por otra parte, la fracción NT estaba compuesta principalmente por TDM y DAT en todas las cepas analizadas. Las DAT no se detectaron en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18).

Las fracciones PIM y PP correspondieron a más del 40 % del extracto glicolípido en las cepas de *M. tuberculosis*. Los extractos de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18) y *M. canetti* presentaron una composición menor en PP y PIM, correspondiendo aproximadamente a un 22-23% del extracto crudo inicial.

%

**Figura 16. Composición glicolípídica de las diferentes cepas de micobacteria.** Glicolípidos apolares (**ApG**), trehalosas neutras (**NT**), fosfolípidos neutros (**NP**), sulfolípidos (**SL**), fosfatidilinositolmanósidos (**PIM**) y fosfolípidos polares (**PP**).

Mediante comparación de los perfiles glicolípídicos de las diferentes cepas con su capacidad de fijar RN, se pudo deducir una clara correlación entre las cepas *RN-* como *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18) y *M. canetti* y su alta composición en glicolípidos apolares y de carácter neutro (Fig. 16).

Por otra parte al analizar las cepas de *M. tuberculosis*, tanto las *RN+* (H37Rv, 511/K y MT-103) como la *RN-*, H37Ra, presentaron indistintamente un alto contenido en glicolípidos de carácter polar. (tabla 9, Fig. 16).

Es muy importante resaltar las características encontradas en la cepa H37Ra. Esta micobacteria atenuada presentó un perfil glicolípídico muy similar a las demás cepas tuberculosas (cepas *RN+*) donde predomina un alto contenido de glicolípidos de carácter polar (PP y PIM), pero sus células no fijan el RN (*RN-*). Este resultado muestra una primera evidencia de que no existe una correlación clara entre el contenido glicolípídico de carácter polar y/o ácido con un resultado positivo en el test de RN, en contra de lo que se

afirmaba en la bibliografía original (Goren *et al.*, 1974). Así, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que el contenido de lípidos de carácter ácido como PP y PIM no implican la fijación de RN.

### D.2.3. Detección, purificación y cuantificación de SL

El contenido de SL inicialmente se determinó en las diferentes cepas mediante CCF-1D (tabla 13). La presencia de SL detectada por CCF se corroboró posteriormente para algunas las cepas (tabla 13) mediante su purificación por DEAE.

En experimentos realizados por duplicado, se encontró que la cantidad de SL en las cepas H37Rv y 511/K correspondía al 5,9 y 3,8% (p/p) respectivamente del extracto crudo inicial. No se detectó SL mediante CCF o por DEAE en el aislado clínico MT-103 ni en las cepas H37Ra, *M. canetti* y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18).

Al analizar la distribución de SL entre las cepas de *M. tuberculosis* se pudo observar que no todas las cepas RN+ contienen SL. Por ejemplo MT-103 es RN+ como las demás cepas virulentas (tabla 9) pero carece de SL. De esta forma la correlación tradicionalmente establecida y todavía aceptada (Rivera-Marrero *et al.*, 2002) entre contenido de SL y fijación de RN es realmente cuestionable.

Por otra parte, una determinación fiable de SL se ha obtenido tradicionalmente mediante el fraccionamiento de extractos lipídicos por DEAE y su monitorización por CCF. En este trabajo también se desarrolló y aplicó un método fácil para la detección de SL mediante una combinación de CCF-2D (Fig. 17) y tinción con cresil violeta (Soto *et al.*, 2000). Aplicando la técnica diseñada, se pudo determinar la presencia de SL en H37Rv y en los aislados clínicos, y la ausencia de este glicolípido en MT-103. Este resultado coincide perfectamente con los análisis obtenidos mediante DEAE (tabla 13).

Para ver esta película, debe  
disponer de QuickTime™ y de  
un descompresor GIF.

**Figura 17. Identificación de SL mediante CCF-2D a partir de extractos glicolipídicos de *M. tuberculosis*.** H37Ra (A), H37Rv (B), *M. canetti* (C) y 511/K (D). Las flechas indican la primera (1) y segunda (2) dirección en el desarrollo de los cromatogramas. Componentes polares (PC), sulfolípidos (SL-I), Dimicolato de trehalosa (CF) y componentes apolares (AC).

Para el diseño de esta técnica de detección de SL se adaptó una metodología que se utilizó a mediados del siglo XX en la detección de sulfátidos (ésteres sulfúricos de glicolípidos) a partir de sedimentos urinarios mediante cromatografía en papel. Esta técnica se utilizaba en el diagnóstico de leucodistrofias metacromáticas (Svennerholm, 1963). En nuestro trabajo se modificó la técnica de Svennerholm reemplazando la cromatografía en papel por CCF-2D en Sílica-gel. Con los sistemas de elución utilizados para desarrollar los cromatogramas en la CCF-2D, la señal correspondiente a SL se pudo separar claramente de los compuestos apolares, TDM y otros componentes polares (PC) minoritarios (Fig. 17). Además, por medio de la tinción metacromática con cresil violeta, el SL se pudo detectar en los cromatogramas por su coloración rojo-violeta fácilmente distinguible de los demás componentes glicolipídicos que adquieren tonalidades azules al reaccionar con el colorante. La tinción de los glicolípidos con cresil violeta presenta dos

ventajas evidentes frente al revelado con antrona. Por una parte los SL adquieren una coloración rojo-violeta que se diferencia claramente de las tonalidades azules que toman los demás componentes del extracto glicolípido. Algunos componentes de carácter ácido como PL y PIM también adquieren tonalidades rojo-violeta, pero permanecen en el punto de inoculación de la muestra con los sistemas de elusión utilizados. Por otra parte la coloración de los glicolípidos revelados con cresil violeta se conserva durante aproximadamente 1 h al mantener los cromatogramas sumergidos en la solución de lavado (1% ácido acético), mientras que la coloración azul de los glicolípidos revelados con antrona se pierde unos minutos después debido al efecto de la luz. Esta pérdida de coloración puede conducir a errores y confusión en la identificación de los diferentes compuestos.

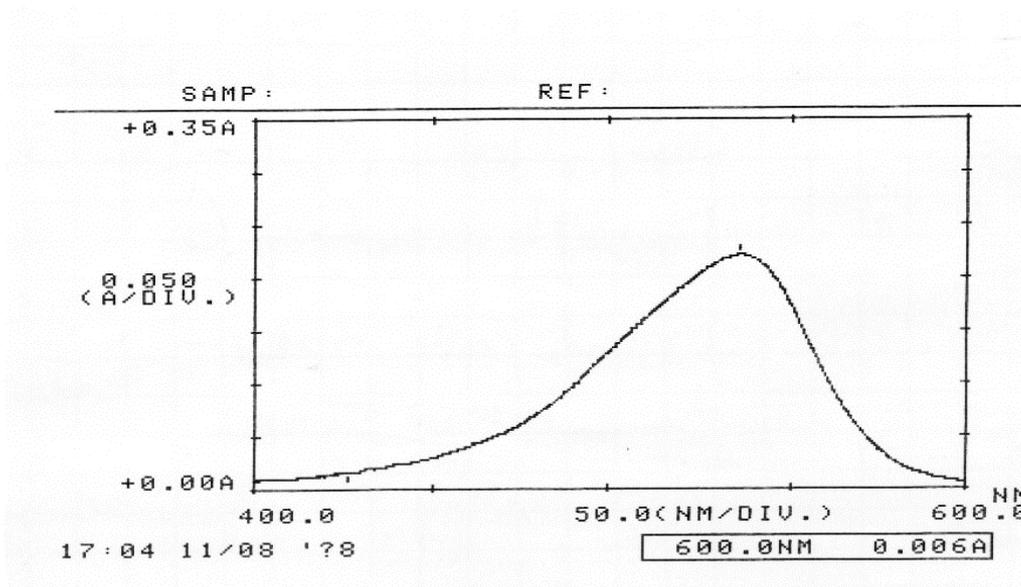
La metodología para la detección de SL desarrollada en este trabajo posee unas ventajas evidentes sobre otras técnicas utilizadas anteriormente. La técnica se puede aplicar a pequeñas cantidades de extracto glicolípido obtenidas mediante una simple extracción con  $\text{CHCl}_3$ :MetOH (Soto *et al.*, 2000). Aplicando la técnica diseñada se pudo detectar SL a partir de sólo 1 mg de extracto crudo, una cantidad que puede ser obtenida fácilmente a partir de la micobacteria recuperada de una sola placa de cultivo crecida durante 4-5 semanas. De una placa de cultivo se pudieron recuperar entre 2-4 mg de extracto crudo, cantidad suficiente para la visualización de SL. Los métodos conocidos hasta la fecha requieren el fraccionamiento por medio de la prolongada y laboriosa DEAE de extractos glicolípidicos obtenidos mediante sofisticados sistemas de extracción con solventes orgánicos (Dobson *et al.*, 1985; Minnikin *et al.*, 1986) y su posterior análisis mediante CCF-2D.

La CCF-2D combinada con la tinción con cresil violeta, se podría convertir en una herramienta clave para realizar estudios completos de la distribución de SL en cepas de *M. tuberculosis*. Muy pocos estudios de este tipo se han realizado hasta la fecha debido a la poca disponibilidad de métodos fáciles y fiables para la detección de SL. Este tipo de estudios se justifican por la aparente importancia que ha mostrado el SL en la virulencia del bacilo tuberculoso y su papel en la regulación de la respuesta inmune de las células huésped (Goren *et al.*, 1974; Kato y Goren, 1974; Goren *et al.*, 1976b; Pabst *et al.*, 1988; Brozna *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1991). Además, el contenido de SL podría ser correlacionado con otros marcadores de virulencia, transmisibilidad o resistencia a las drogas antituberculosas.

### **D.3. Correlación entre la composición glicolípida de la pared y la NRA**

Para encontrar una posible correlación entre los glicolípidos de pared, especialmente el SL, y la fijación de RN en cepas de *M. tuberculosis*, se evaluó la NRA de los extractos glicolípidicos fraccionados mediante DEAE. La composición porcentual de las fracciones reagrupadas después de la DEAE (Fig. 16) se utilizó para determinar la NRA, que se estimó como la  $\text{OD}_{540}$  /mg de extracto crudo.

Por otra parte, mediante espectrometría ultravioleta se pudo determinar que los diferentes complejos glicolípido-RN presentan una absorbancia máxima entre 535-540 nm (Fig. 18). En este trabajo, la NRA se determinó a 540 nm.



**Figura 18. Espectro UV del complejo extracto glicolípido de *M. tuberculosis*-RN.**

Para la estimación de la NRA se utilizaron entre 50-200  $\mu\text{g}$  de las fracciones glicolípídicas, una pequeña cantidad que asegura una disolución completa de la muestra en n-hexano. Cantidades pequeñas de glicolípidos al reaccionar con el RN producen una relación lineal entre  $\text{OD}_{540}$  y la concentración de complejo glicolípido-RN, que hace posible que se puedan sumar las NRA obtenidas para las diferentes fracciones de la DEAE de un mismo extracto glicolípido. La NRA total estimada de las fracciones se comparó con la NRA obtenida a partir del extracto crudo completo antes del fraccionamiento por DEAE.

Se obtuvo un valor muy similar y aproximado a 3,5 para las NRA de los extractos glicolípídicos de H37Rv, MT-103, 511/K y H37Ra antes de la DEAE (Fig 19). Por el contrario se obtuvo un valor menor y cercano a 1,3 para *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18) y *M. canetti*. Por otra parte, las NRA totales estimadas mediante adición de cada una de las fracciones reagrupadas (Fig. 20) correspondieron aproximadamente al 76-99% de las NRA de los extractos antes del fraccionamiento.

**Figura 19. Reactividad con RN (NRA) de los extractos glicolipídicos de las diferentes micobacterias.**

La mayor contribución al NRA entre las fracciones obtenidas por DEAE correspondió a las fracciones PP y PIM en todas las cepas analizadas. Por el contrario, una contribución mucho menor se obtuvo por parte de las fracciones ApG, NT, NP y SL.

**Figura 20. Reactividad con RN (NRA) de las fracciones obtenidas mediante fraccionamiento por DEAE, a partir de los extractos glicolipídicos de las diferentes micobacterias.**

En el presente trabajo con la idea de conocer los componentes estructurales relacionados con la fijación de RN en las cepas virulentas de *M. tuberculosis*, se correlacionó el test de fijación de RN por parte de las células completas, la composición glicolipídica de la pared y la reactividad (NRA) de estos glicolípidos de pared con el RN. Es importante mencionar que el enfoque abordado en este trabajo, o sea la comparación entre la tinción de células con RN, la cuantificación por purificación y pesado de glicolípidos y NRA, la estimación de su NRA para cepas tanto *RN+* como *RN-* no había sido considerada anteriormente.

En los estudios pioneros se estableció una correlación entre el contenido de SL y /o PL y la fijación de RN en las cepas virulentas de *M. tuberculosis* (Middlebrook *et al.*, 1959; Goren *et al.*, 1974). En aquellos trabajos, la NRA se relacionó indirectamente con los componentes ácidos que retienen RN y más específicamente con la estimación del contenido de SL y PL en las diferentes cepas. En la metodología utilizada, la NRA se estimó a partir de extractos de n-hexano con decilamina al 0,05% de *M. tuberculosis* H37Rv, beneficiándose la extracción de lípidos ácidos como PL y en especial SL a partir de células completas (Goren, 1970a; Dhariwal *et al.*, 1984). Por lo tanto, la extracción orgánica selectiva con n-hexano-decilamina al 0,05% puede excluir para el análisis algunos compuestos que también podrían reaccionar con RN.

En el presente trabajo en el que se utiliza un sistema de extracción más general, CHCl<sub>3</sub>:MetOH (2:1 y 1:2, v/v), se evitó la deficiencia producida por la extracción selectiva de compuestos glicolipídicos de la pared.

Entre las cepas *RN+* estudiadas, el SL no se detectó en el aislado clínico MT-103. Por lo tanto se hizo muy interesante la comparación de la composición glicolipídica y la NRA de las diferentes fracciones glicolipídicas de pared de MT-103, con las de cepas *NR+* que sí contienen SL como H37Rv y 511/K, y las de la cepa *NR-* H37Ra, que tampoco contiene SL (tabla 13).

La baja reactividad de la fracción SL con el RN (NRA) en comparación a las otras fracciones glicolipídicas como los PP y PIM (Fig. 20) y su ausencia en una cepa claramente *RN+* como lo es MT-103, disminuye notablemente la posibilidad de que este glicolípido sea el responsable de la fijación del colorante en las cepas virulentas.

Por otra parte, la composición porcentual encontrada para las fracciones PP y PIM en las cepas *NR+* MT-103, 511/K y H37Rv, y la *NR-* H37Ra es muy similar (Fig. 16). También, la NRA estimada para esas mismas fracciones es muy similar para todas las cepas analizadas (Fig. 20) indistintamente de ser *RN+* o *RN-*. El conjunto de estos resultados podría indirectamente sugerir que tampoco PIM y PP sean posiblemente responsables de la fijación del colorante por parte de las cepas virulentas.

De todas formas, se tiene que reconocer que en la superficie de la pared de *M. tuberculosis* existe una serie de compuestos aniónicos capaces de captar RN. Esta característica puede ser inferida a partir, entre

otros, de los experimentos de marcaje de micobacterias con rojo de rutenio. Por medio de esta técnica se ha demostrado la existencia de una interacción específica entre componentes aniónicos de la pared celular y el colorante (Picard *et al.*, 1994). De esta forma se ha evidenciado el carácter aniónico de la pared celular de algunas micobacterias.

En el presente trabajo, al descartar los PP y PIM (fuertemente aniónicos) como posibles responsables de la fijación del RN, se podría pensar que la fijación del colorante puede ser producida o por glicolípidos ácidos no mayoritarios de difícil detección, o por compuestos de carácter no glicolípido. Una hipótesis que podría explicar parcialmente la reactividad con RN de aislados clínicos y otras cepas virulentas de *M. tuberculosis* que no poseen SL, y que había sido asignada a los PL en trabajos anteriores (Middlebrook *et al.*, 1959). También se podría sugerir la posibilidad de que los glicolípidos polares con una mayor capacidad de captar RN se encuentren más expuestos en la superficie de cepas *RN+* que de cepas *RN-*, o que de alguna forma en las cepas *RN-* los glicolípidos altamente aniónicos no sean tan accesibles al RN.

Mediante el análisis por DEAE se encontró que cepas como *M. canetti* y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18) poseen una menor composición en PP y PIM. Un menor contenido en glicolípidos aniónicos podría generar menor acidez en la parte más externa de la pared disminuyendo la capacidad potencial de fijar RN, en comparación con las cepas *RN+* de *M. tuberculosis*, que poseen un alto contenido de estos glicolípidos aniónicos (PP y PIM) en su envoltura.

El análisis mediante DEAE también mostró un contenido muy superior de ApG en las cepas *RN-* como *M. canetti* y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18). Estas cepas poseen además un bajo contenido de glicolípidos aniónicos. La reactividad con RN en este tipo de cepas se puede ver alterada por la alta concentración en glicolípidos apolares (ApG) en la superficie de su pared celular que otorgaría indirectamente una característica hidrofóbica, que dificultaría la accesibilidad de las moléculas cargadas de RN y por lo tanto la fijación del colorante, lo que podría también explicar parcialmente la no reactividad con RN de esas cepas.

#### **D.4. Construcción de la cosmidoteca de *M. tuberculosis* H37Rv y cribaje mediante tinción con RN**

Otro de los objetivos planteados en este trabajo era buscar la región genómica de *M. tuberculosis* H37Rv posiblemente relacionada con la fijación del RN. Para lograr este fin se planteó utilizar la complementación heteróloga mediante la construcción de una genoteca de ADN genómico en el cósmido pYUB18, su transformación en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y la selección de los recombinantes que fijaran el colorante. Los resultados obtenidos en la tinción con RN de colonias de cepas virulentas y avirulentas de *M. tuberculosis* y de *M. smegmatis* en placa, animaban a la aplicación de esta estrategia.

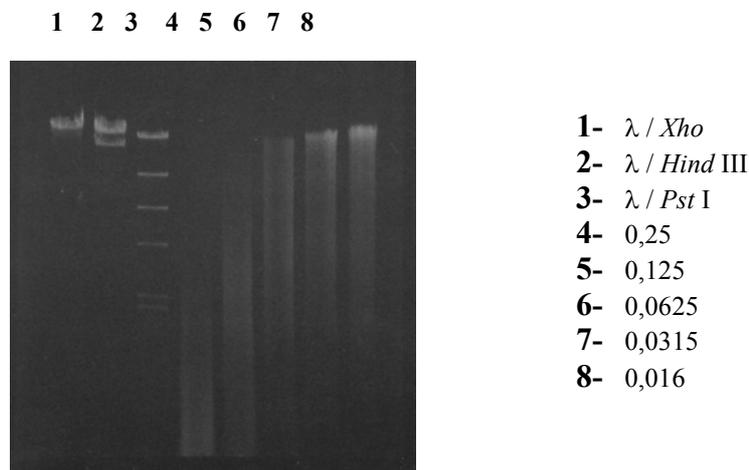
La complementación heteróloga ha sido una técnica utilizada en la clonación y caracterización de los genes relacionados con la biosíntesis de algunos componentes complejos de la pared celular de las micobacterias (Belisle *et al.*, 1991; Houssaini-Iraqi *et al.*, 1992). Por ejemplo, utilizando esta técnica se han

podido expresar en una micobacteria saprófita como lo es *M. smegmatis*, los componentes responsables de la biosíntesis de los GPL de la micobacteria patógena *M. avium* (Belisle *et al.*, 1991), y los responsables de la carotenogénesis de *M. aurum* (Houssaini-Iraqi *et al.*, 1992). Mediante complementación en *M. tuberculosis* H37Ra también se han podido determinar fragmentos genómicos asociados con la virulencia de H37Rv (Pascopella *et al.*, 1994).

#### D.4.1. Obtención y fraccionamiento de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv

Con el protocolo utilizado se pudo extraer ADN genómico de buena calidad. Mediante análisis por electroforesis en agarosa al 0,4% se pudo observar que el ADN se encontraba íntegro y que poseía un tamaño superior a 40 kpb. Al cortar este ADN con las enzimas de restricción *BamH* I, *Pst* I y *EcoR* I se obtuvo un patrón de “bandeo discreto” que evidenció la buena calidad del ADN genómico extraído.

Antes de realizar los cortes parciales del ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv con *Sau3A* I, se determinaron las mejores condiciones para obtener fragmentos de tamaño superior a 30 kpb. Aplicando el método de diluciones seriadas (Ausbel *et al.*, 1993) se obtuvieron fragmentos entre 30-45 kpb mediante digestión a una concentración de 0,0625 unidades de *Sau3A* I/ $\mu$ g de ADN genómico a 37°C durante 5 min (Fig. 21).



**Figura 21.** Digestión parcial de ADN genómico de *M. tuberculosis* con *Sau3A* I. Las concentraciones utilizadas de enzima corresponden a Unidades de fosfatasa alcalina /  $\mu$ g de ADN (carriles 4 a 8).

#### D.4.2 Construcción y análisis de la cosmidoteca en *E. coli*

La cosmidoteca se construyó en el cósmido “shuttle” pYUB18 que permite la clonación de fragmentos de ADN de gran tamaño. En muchos casos las regiones genómicas que codifican para la síntesis de algunos componentes metabólicos y estructurales de las micobacterias se encuentran generalmente distribuidas en segmentos genómicos de un tamaño superior a 10 kpb (Belisle *et al.*, 1991; Hinshelwook y Stoker, 1992; Pascopella *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 1996). Para el análisis de este tipo de agrupaciones génicas se ha requerido de genotecas en las que en sus clones individuales están representadas regiones grandes de genoma.

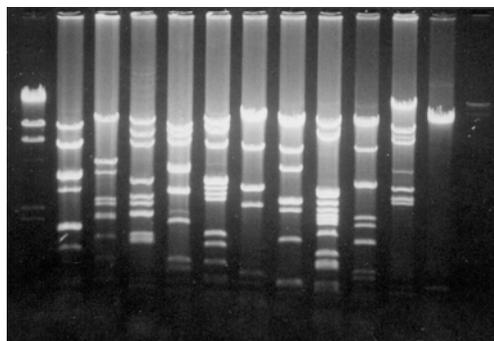
Una vez obtenidos los fragmentos de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv de tamaño superior a 30 kpb, para su purificación se aplicaron dos métodos diferentes: las columnas GFX<sup>TM</sup> (Pharmacia) y la electroelución. En los ensayos preliminares se encontró que mediante electroelución se obtenían los mejores rendimientos, por lo que este método se seleccionó para purificar los fragmentos de ADN genómico a ligar en pYUB18.

En la ligación se probaron diferentes proporciones de extremos de vector:inserto (1:1, 1:3, 1:5 y 1:10) que se electroporaron inicialmente en *E. coli* XL-1 Blue MRF'. Se encontró que la proporción vector:inserto (1:10) producía una mayor eficiencia de ligación. Esta proporción se utilizó finalmente en la ligación de pYUB18 con los fragmentos genómicos de H37Rv purificados.

Un total de 200 ng de mezcla de ligación se empaquetaron en cabezas de fago “Gigapac III plus” (Stratagene). Al transducir el total de la reacción de empaquetamiento en *E. coli* XL1-Blue MRF' se obtuvieron aproximadamente 3,300 colonias resistentes a Kan. Al final se obtuvo una cosmidoteca con una eficiencia de  $4,9 \times 10^5$  ufc/ $\mu$ g de pYUB18.

Se seleccionaron al azar 10 colonias de la cosmidoteca, se extrajeron sus respectivos cósmidos recombinantes y se analizaron mediante cortes con *Pst* I. Se observó que la totalidad de los cósmidos analizados eran recombinantes y con patrones de restricción con *Pst* I diferentes. El tamaño observado de los insertos de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv contenidos en el pYUB18 se encontraba entre 25-37 kpb aproximadamente (Fig. 22).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



**Figura 22. Recombinantes pYUB18::H37Rv cortados con *Pst* I.**  $\lambda$  /*Pst* I (1), pYUB18::H37Rv /*Pst* I (2-11), pYUB18 /*Pst* I, y  $\lambda$  /*Xho* I (13).

A continuación aplicando la expresión:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-a/b) \quad (\text{http://www.bath.ac.uk}),$$

donde, **N**, corresponde al número de clones requeridos; **P**, la probabilidad de representación de los genes; **a**, el promedio de los insertos en la cosmidoteca; y **b**, el tamaño del genoma, se estimó que aproximadamente el 99% del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv estaba representado en 575 clones de la cosmidoteca construida. Por lo tanto, el genoma de *M. tuberculosis* estaba aproximadamente representado entre 5-6 veces en las 3,300 colonias obtenidas de la cosmidoteca.

Después de recolectar y resuspender el total de las colonias en 10 ml de LB con un 15% de glicerol, se obtuvo un título de la cosmidoteca de  $5 \times 10^8$  ufc/ml.

### D.4.3. Electroporación y caracterización de la cosmidoteca en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155

Al electroporar en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 los 250 ng de cósmidos recombinantes (pYUB18::H37Rv) extraídos a partir de la cosmidoteca construida en *E. coli*, se obtuvieron aproximadamente 2,500 colonias resistentes a Kan. De acuerdo a este resultado se pudo estimar que la cosmidoteca electroporada en *M. smegmatis* tenía una eficiencia de  $1 \times 10^4$  ufc/ $\mu$ g de ADN.

Al analizar 20 colonias seleccionadas al azar de la cosmidoteca en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 mediante cortes con *Pst* I, se encontró que únicamente 6 de los recombinantes extraídos (el 30%) contenían insertos genómicos de *M. tuberculosis* H37Rv. Además, mediante restricción con las enzimas *Cla* I, *Sph* I y *Eco*R V se pudo deducir que el pYUB18 de los cósmidos no recombinantes, aparentemente no presentaba delecciones en su ADN.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta primera caracterización se pudo observar que la electroporación en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 produjo un aumento de la proporción de pYUB18 no recombinante respecto a los resultados obtenidos anteriormente en *E. coli*.

Con el fin de explicar el aumento de cósmidos no recombinantes, en primera instancia se podría pensar que los insertos grandes de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv (31 kpb aproximadamente) ligados en el pYUB18 son inestables en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. También existe la posibilidad de que la electroporación hubiera beneficiado la entrada de pYUB18 no recombinante. Una tercera posibilidad sería que se haya producido un fenómeno de recombinación entre los insertos de *M. tuberculosis* H37Rv y el genoma de *M. smegmatis*.

Para analizar la participación de la recombinación, se procedió a estudiar este fenómeno sobre un mutante RecA<sup>-</sup> de *M. smegmatis*. Para esto, la cosmidoteca se electroporó nuevamente en la cepa *M. smegmatis* HS42 (Papavinasundaram *et al.*, 1998) para su análisis.

Al cortar con *Pst* I los cósmidos recombinantes extraídos de 20 colonias de la cosmidoteca electroporada en HS42, se encontró un porcentaje de pYUB18 no recombinante muy similar al obtenido en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Este resultado sugirió que la pérdida de los insertos de los recombinantes después de la electroporación muy probablemente no se producía por un fenómeno de recombinación.

Al no lograrse incrementar la representación de recombinantes en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, se decidió considerar un 30% de cósmidos recombinantes para calcular el número mínimo de colonias necesarias para el cribaje de la cosmidoteca con RN.

#### D.4.4. Cribaje de la cosmidoteca mediante tinción con RN

El tamaño medio encontrado de los fragmentos genómicos de la cosmidoteca en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 es muy similar al encontrado en *E. coli*. (31 kpb). Además al conocer que la cosmidoteca en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 sólo tenía aproximadamente un 30% de recombinantes, se pudo calcular que se necesitaban cribar con RN un mínimo de 1,916 colonias, para cubrir por lo menos una vez el 99% del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

En las 3,000 colonias de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) teñidas con RN, teóricamente se analizó 1,5 veces el genoma de *M. tuberculosis*. Inicialmente se detectaron 8 colonias de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) que adquirieron una coloración rojiza al ser teñidas con RN (RN+).

La intensidad de coloración roja tomada por estas 8 colonias RN+ de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) era menor que la normalmente adquirida por colonias de *M. tuberculosis* H37Rv. Esta menor intensidad de coloración podría sugerir inicialmente que la capacidad para fijar RN del componente relacionado con el carácter RN+ de *M. tuberculosis*, o su expresión, se ven visiblemente disminuidas en *M. smegmatis*. De todas formas, las colonias de RN+ de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) fijaron suficiente RN para poder ser distinguidas de las cepas control *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18) que adquirieron coloración amarilla.

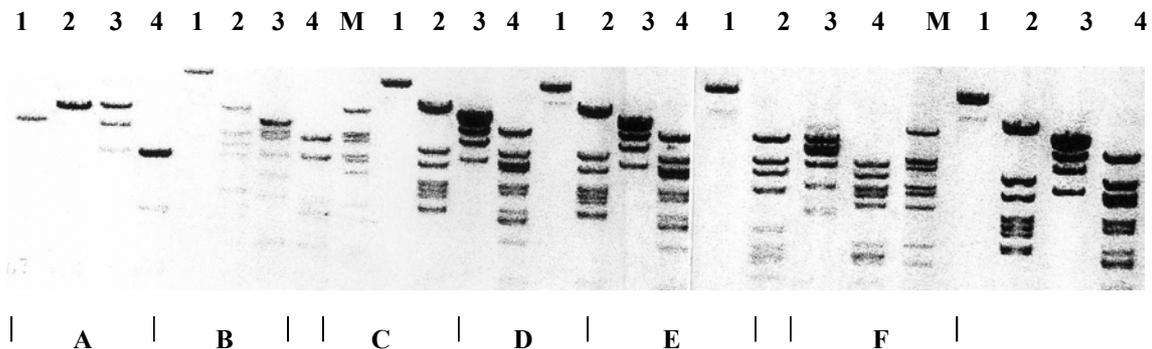
De las colonias RN+ de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) inicialmente seleccionadas, se hicieron réplicas que se sometieron a 3 rondas consecutivas de purificación mediante resiembra en 7H10-OADC modificado y tinción con RN. Al final únicamente 5 de las cepas seleccionadas conservaron su carácter RN+.

Los cósmidos recombinantes extraídos a partir de las cepas de *M. smegmatis* RN+, incluidas las falsas positivas, se re-electroporaron individualmente en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Estos nuevos re-transformantes se sometieron a tinción con RN. Se observó que un 10-20% de las colonias obtenidas después de la re-electroporación de los recombinantes, a partir de cada cepa RN+ y de las falso positivas, no fijaban RN.

Quedó claro que el 10-20% de las colonias RN- obtenidas al re-electroporar cósmidos recombinantes extraídos a partir de las cepas RN+ de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv), sufrieron algún tipo de modificación en su pared celular producida como consecuencia de la electroporación, ó muy probablemente

como producto de la delección de genes, debido a la inestabilidad de los insertos grandes de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv en los recombinantes. La misma inestabilidad que se había detectado en la electroporación de la cosmidoteca en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

La identidad de las 5 cepas *RN*<sup>+</sup> de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) seleccionadas se analizó inicialmente mediante restricción con las enzimas *Pst* I y *EcoR* I (Fig. 23). Como resultado de esta caracterización preliminar se encontró un mismo patrón de restricción para 3 de ellas, y patrones de restricción diferentes para las dos cepas restantes. Estos resultados sugirieron que en las cepas con patrones de restricción similar se encontraba insertada la misma región del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Una de estas cepas [33,4] junto a las dos restantes con patrones de restricción diferentes [9,12] y [19,4], se seleccionaron finalmente para el análisis de su perfil glicolipídico y la determinación de la región genómica de *M. tuberculosis* H37Rv relacionada con la fijación de RN .



**Figura 23.** Análisis mediante restricción de los recombinantes *RN*<sup>+</sup> de *M. smegmatis* (pYUB18::H37Rv). Recombinantes sin cortar (1) y cortados con *Pst* I (2), *EcoR* I (3), *EcoR* I y *Pst* I (4) respectivamente. Control de pYUB18 (A), cósmidos recombinantes: [19,4] (B), [60,4] (C), [33,4] (D), [9,12] (E) y [55,41] (F), y  $\lambda$  / *BstE* II (M).

#### D.5. Análisis de las cepas *RN*<sup>+</sup> de *M. smegmatis* (pYUB18::H37Rv) seleccionadas

### D.5.1. Perfiles glicolipídicos y detección de SL

Los perfiles glicolipídicos de las cepas recombinantes [9,12], [19,4] y [33,4] se determinaron mediante CCF-1D y 2D, y se compararon con los de las cepas control *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18). El extracto crudo de *M. tuberculosis* H37Rv se utilizó como control.

En la obtención de los extractos glicolipídicos, mediante la extracción con CHCl<sub>3</sub>:MetOH se recuperaron entre 35-50 mg de extracto crudo por cada gramo de micobacteria húmeda, lo que corresponde al 3,5-5% del material húmedo de partida. Este rendimiento es muy similar al obtenido en este mismo trabajo para la obtención de extractos glicolipídicos de cepas de *M. tuberculosis* (apartado D.2.1.)

El análisis mediante CCF-1D mostró que los perfiles glicolipídicos de las cepas RN+ [9,12], [19,4] y [33,4] eran muy similares a los de las cepas RN- *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18). También se observó que los PL, PIM, TDM y GPL correspondieron a los glicolípidos más abundantes, tal como era de esperar para cepas de *M. smegmatis* (Minnikin *et al.*, 1984; Dobson *et al.*, 1985). La única diferencia significativa detectada correspondió a la mayor composición de algunos PGL en las cepas control *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18) respecto a las cepas recombinantes RN+.

También es importante recalcar que, mediante CCF, no se detectó la presencia de los glicolípidos más característicos de *M. tuberculosis* como PPT y SL, en los extractos glicolipídicos de las cepas recombinantes RN+ de *M. smegmatis*.

La ausencia de SL en los extractos glicolipídicos de las cepas recombinantes RN+ de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) también se corroboró mediante CCF-2D (Fig. 24), aplicando la técnica rápida de detección de SL a partir de extracto crudo desarrollada en este mismo trabajo (Soto *et al.*, 2000). Este resultado corrobora nuestras observaciones previas, donde se dedujo que el SL y otros glicolípidos de carácter ácido al parecer no son los responsables de la fijación del RN, como mínimo en la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

Para ver esta película, debe  
disponer de QuickTime™ y de  
un descompresor Photo - JPEG.

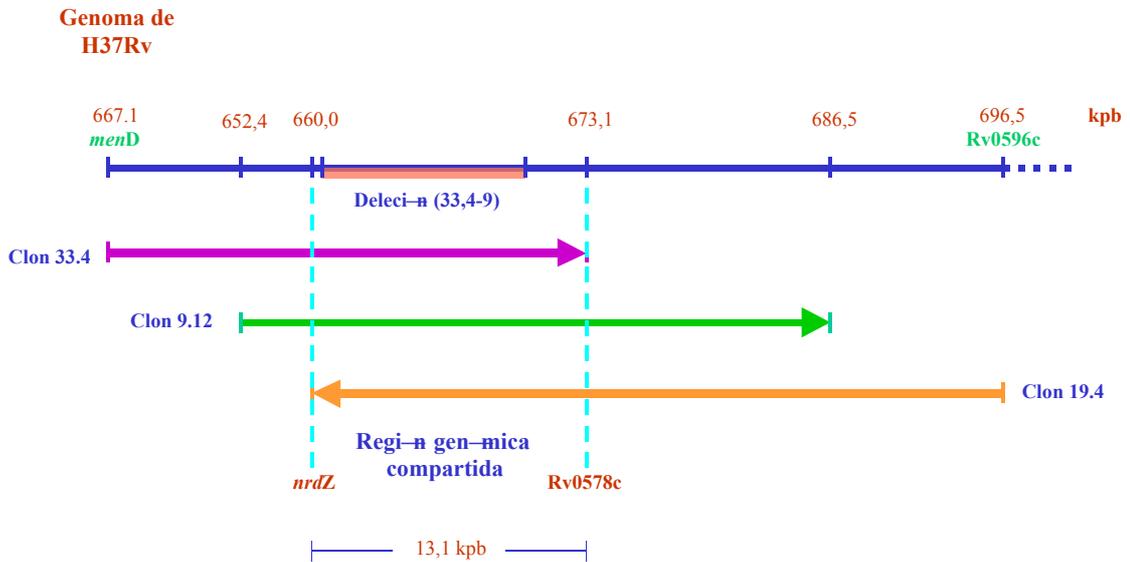
**Figura 24. Análisis mediante CCF-2D de los extractos glicolipídicos de las cepas RN+ de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv). *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (A), *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155/pYUB18 (B), [33,4] (C) y *M. tuberculosis* H37Rv (D). Las flechas indican la primera (1) y segunda (2) dirección en el desarrollo de las cromatografías. Glicopeptidolípidos (GPLs), componentes polares (PC), sulfolípidos-I (SL-I), dimicolato de trehalosa (CF) y componentes apolares (AC).**

### D.5.2. Región genómica de *M. tuberculosis* H37Rv relacionada con la fijación de RN

Utilizando los “primers” PY1 y PY2 se secuenciaron los extremos de los insertos genómicos de *M. tuberculosis* H37Rv unidos a pYUB18 en los cósmidos recombinantes [9,12], [19,4] y [33,4]. A partir de secuencias parciales de aproximadamente 250-350 pb, los fragmentos de ADN genómico secuenciados se compararon utilizando el programa BLAST con la base de datos TubercuList.

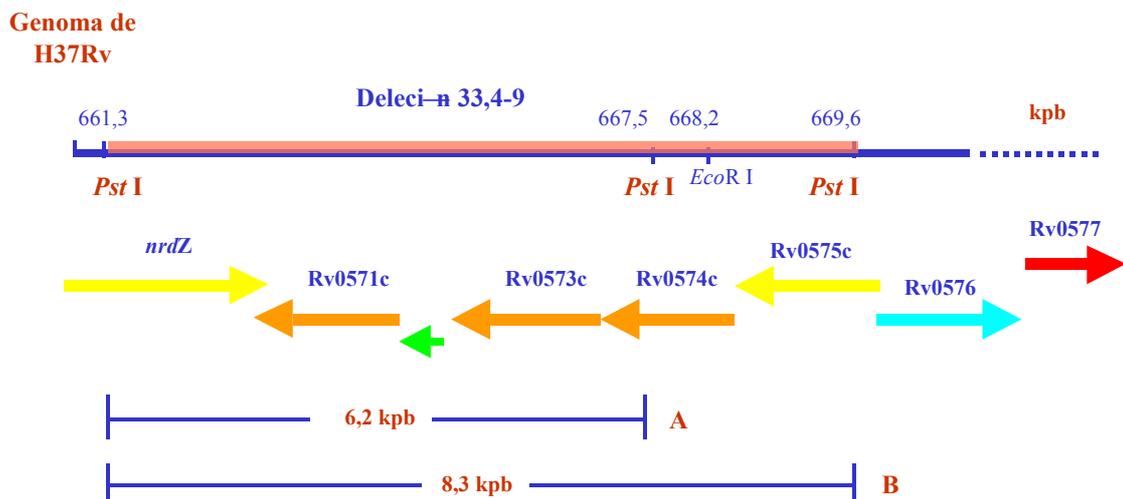
Las comparaciones genómicas mostraron que los cósmidos recombinantes [9,12], [19,4] y [33,4] cubrían una región de aproximadamente 48 kpb del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv comprendida entre las posiciones 647,1 kpb, correspondiente al gen *menD*, y 696,5 kpb ubicado en el ORF Rv0596c (Cole *et al.*, 1998) (Fig. 25). También se pudo determinar que los tres cósmidos recombinantes compartían una región de aproximadamente 13,1 kpb ubicada entre las posiciones 660,0 kpb (Rv0568) y 673,1 kpb (Rv0578c) del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Fig. 25).

Por otra parte, con el fin de obtener mayor información sobre la región genómica relacionada con la fijación de RN en *M. tuberculosis* H37Rv, se analizó un mutante *RN*<sup>-</sup>, denominado [33,4-9], obtenido después de la re-electroporación en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 del cósmido recombinante [33,4]. Mediante restricción con las enzimas *EcoR* I y *Pst* I, se encontró que este mutante, había sufrido, como mínimo, una delección (*Pst* I - *Pst* I) de aproximadamente 8,3 kpb, (Fig. 26, “Fragmento B”) ubicada casualmente dentro de los 13,1 kpb compartidos por los tres cósmidos recombinantes [9,12], [19,4] y [33,4] (Fig. 25 y 26). De acuerdo con el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, la región deleccionada en [33,4-9] comienza en el marco abierto de lectura Rv0570 (*nrdZ*) y se determinó que se extendía hasta la región 5' del gen Rv0575c mediante análisis por restricción y secuencia nucleotídica. La pérdida del carácter *RN*<sup>+</sup> en el mutante [33,4-9] situaría este fenotipo en los productos codificados por los genes de la región deleccionada. Por consiguiente, el análisis de la región genómica relacionada con la fijación del RN se centró los genes deleccionados en [33,4-9].



**Figura 25. Organización de los cósmidos recombinantes [9,12], [19,4] y [33,4] en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.** La flechas indican la orientación de los clones respecto a *Bam*H I de pYUB18, y la ubicación de los extremos de los insertos de *M. tuberculosis* H37Rv, determinada por secuencia nucleotídica.

El fragmento (*Pst* I - *Pst* I) de 6,2 kpb comprendido entre los ORFs *Rv0570* (*nrdZ*) y *Rv0574* (Fig. 26, "Fragmento A") se subclonó en pSUM36 y se electroporó en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Al teñir con RN las colonias obtenidas se observó que no fijaban el colorante. A partir de este resultado se pudo deducir que los ORFs incluidos en este fragmento de 6,2 kpb (de *Rv0571* a *Rv0573c*), por sí solos no le otorgan el carácter *RN*+ a *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.



**Figura 26. Organización del locus de *M. tuberculosis* H37Rv deleccionado en [33,4-9].** Región de la delección subclonada en pSUM36 y electroporada en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (A), región genómica total deleccionada en [33,4-9] (B).

De acuerdo a los resultados obtenidos por el análisis del mutante [33,4-9] y la clonación del fragmento (*Pst* I – *Pst* I) en *M. smegmatis*, es muy probable que la región genómica que la otorga a las cepas RN+ de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) la capacidad de fijar RN, se encuentre relacionada con el marco abierto de lectura Rv0570 (*nrdZ*) ó los comprendidos entre Rv0574 y Rv0577.

El gen *nrdZ* se encuentra descrito de acuerdo a TubercuList como de función desconocida, pero posee un 52,5% y 43,7% de identidad con los que codifican para la subunidad grande de la ribonucleotidil reductasa de *Archaeoglobus fulgidus* y *Thermoplasma acidophilum*, respectivamente. La ribonucleotidil reductasa es una enzima regulada alostéricamente, dependiente del ciclo celular, que cataliza el paso único de la reducción de los 2' –ribonucleótidos a 2' –deoxiribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN (Riera *et al.*, 1997). En *Mycobacterium tuberculosis*, como en los eucariotas y en ciertas bacterias, la ribonucleotidil reductasa está compuesta por dos subunidades: la R1, que corresponde a la subunidad grande de 84 kDa (Yang *et al.*, 1994) y la R2 que corresponde a la subunidad pequeña de 36,5 kDa que esta codificada por los genes *nrdF1* y *nrdF2* (Yang *et al.*, 1997).

También de acuerdo con TubercuList, el ORF Rv0574c corresponde a una proteína de función desconocida que presenta un 25,8% de identidad con la proteína de encapsulación CapA de *Bacillus anthracis*. El gen *capA* se encuentra ubicado en una región compuesta por tres cistrones: *capB*, *capC* y *capA*, que producen proteínas de 44, 16 y 46 kDa respectivamente (Makino *et al.*, 1989). Mediante experimentos de mutagénesis, complementación, análisis de la secuencia de aminoácidos, localización y sensibilidad a diferentes tratamientos fisicoquímicos, se determinó que las proteínas Cap de *B. anthracis* corresponden a enzimas asociadas a la membrana y relacionadas con la polimerización de ácido D-glutámico. La cápsula de *B. anthracis* está compuesta por el compuesto polianiónico, poli-D-glutamato, y está relacionada al igual que la de otras bacterias como *Neisseria meningitidis* con la resistencia a la fagocitosis.

De igual forma Rv0574c también presenta una menor homología con el gen *ywsC* de *Bacillus subtilis*, que forma parte de un operón constituido por cuatro genes directamente relacionados con la producción de ácido gama-poliglutámico (PGA) (Urushibata *et al.*, 2002). El gen *ywsC* codifica la PGA sintetasa, una enzima fundamental en la síntesis de ácido PGA a partir de ácido D-glutámico.

Se ha podido establecer recientemente que ciertas proteínas de *M. tuberculosis* poseen la función de regular la síntesis de poliglutamina. La presencia de poliglutamina en la pared celular está relacionada con la virulencia de *M. tuberculosis* (Hart *et al.*, 2000). La síntesis de este compuesto estructural está regulada por la poliglutamina sintasa, que a su vez está codificada por el gen *glnA1*, y es una de las 10 proteínas de *M. tuberculosis* más exportadas al medio de cultivo. La excreción de poliglutamina sintasa es a una actividad

exclusiva de las micobacterias patógenas y se relaciona con la presencia de poli-L-glutamato/glutamina en la pared celular de *M. tuberculosis* (Hart y Horwitz, 1999).

La asociación entre componentes estructurales aniónicos de la envoltura y la virulencia se ha podido establecer en algunos patógenos intracelulares facultativos. Por ejemplo, mediante mutagénesis por transposición se han obtenido mutantes de *Listeria monocytogenes* defectivos en la invasión y supervivencia en células cerebrales. Se ha demostrado que algunas regiones genómicas mutadas y que están relacionadas con la pérdida de la virulencia, corresponden a genes que codifican para proteínas implicadas en la biosíntesis de posibles compuestos polianiónicos de la pared celular (Autret *et al.*, 2001). De esta forma el producto de la expresión de Rv0574c compartido por los tres recombinantes *RN+* de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) podría ser interesante en el estudio de la virulencia y patogenicidad de *M. tuberculosis*, y su posible relación con el carácter *RN+*.

El ORF Rv0575c de acuerdo con la secuencia de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) se considera como un gen relacionado con el metabolismo y respiración celular. Más específicamente la proteína codificada tiene un 38,7% de identidad con una monooxigenasa de *Streptomyces coelicolor*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el gen Rv0576 también se podría relacionar con el carácter *RN+* de las cepas [9,12], [19,4] y [33,4]. Este gen codifica para un posible regulador transcripcional, que teóricamente lo implica en funciones reguladoras. Específicamente el producto codificado por Rv0576 es altamente homólogo con el represor transcripcional SmtB de *Synechococcus* PCC7942 (TubercuList). El represor SmtB pertenece a la familia ArsR, que son proteínas metaloreguladoras negativas de genes que codifican para bombas de eflujo o quelantes intracelulares de metales (VanZile *et al.*, 2000). El operón “smt” de *Synechococcus* PCC7942 contiene dos genes, *smtA* y *smtB*, que se transcriben divergentemente y que desempeñan un papel en la respuesta celular al exceso de zinc.

El gen Rv0577 (TB27.3) codifica para el antígeno excretado de 27 kDa (CFP30B) presente en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* (Rosenkrands *et al.*, 2000). El antígeno CFP30B posee un punto isoeléctrico de 4,26 lo que le otorga características claramente aniónicas. También posee excelentes propiedades antigénicas en modelo murino (Rosenkrands *et al.*, 2000). Se ha podido demostrar que las proteínas presentes en los filtrados de cultivo de *M. tuberculosis* poseen componentes inmunogénicos que pueden producir al menos una inmunidad parcial frente a la infección con micobacterias (Pal y Horwitz, 1992). Por ejemplo, las proteínas ESAT-6 son una familia de potentes antígenos secretados al medio, de los cuales se conoce que estimulan las células T y que poseen características inmunogénicas (Elhay *et al.*, 1998). También existen otras proteínas que se secretan al medio, como el Ag85 que además de ser antigénica e inmunogénica, se le ha reconocido capacidad de unión a la fibronectina (Wilker y Harboe, 1992) que la relaciona directamente con la colonización de las células del huésped.

Desde este punto de vista, el antígeno de 27 kDa codificado por el gen TB27.3 se podría relacionar posiblemente con la virulencia de las cepas de *M. tuberculosis* debido a su antigenicidad, y que al ser una proteína de secreción, es muy probable que posea características inmunoreguladoras sobre las células huésped.

En los estudios previos sobre la identificación de los componentes estructurales de *M. tuberculosis* responsables de la fijación de RN, nunca se consideró la posibilidad de que compuestos de carácter no glicolipídico estuvieran relacionados con esta reacción citoquímica. Por los resultados obtenidos en este trabajo no se puede descartar que algunos componentes como las proteínas, tengan una función relevante en la fijación del RN. La mayoría de los genes presentes en la región que posiblemente está relacionada con el carácter *RN+* son de naturaleza proteica.

En este trabajo también se ha contribuido en la evaluación del papel desempeñado por los lípidos fuertemente ácidos de la pared, como el SL, en la fijación de RN y sobre todo, en diseñar una estrategia alternativa para la identificación de los componentes estructurales que participan en esta reacción citoquímica (Soto *et al.*, 2002, manuscrito en preparación). Presumiblemente, el conocimiento de los compuestos estructurales que fijan el RN contribuirá a entender las bases fundamentales del comportamiento citoquímico de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*, y también a profundizar en el estudio de la virulencia del bacilo tuberculoso.



# **CONCLUSIONES**



## **E. CONCLUSIONES**

### **1. Tinción diferencial de *M. tuberculosis* con RN en tubo de ensayo y placa de cultivo**

- 1.1. La tinción con RN en tubo de ensayo o en placa de cultivo es un método fácil, rápido y económico para diferenciar *M. tuberculosis* H37Ra de *M. tuberculosis* H37Rv y aislados clínicos, alternativo a la diferenciación por genotipado mediante RFLPs.
- 1.2. Se ha desarrollado un método de fijación de colonias de micobacteria en placa de agar con potencial aplicación en la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis*.

### **2. Análisis de la composición glicolípida de la pared de cepas de *M. tuberculosis* y su contribución a la tinción con RN**

- 2.1. El perfil glicolípido de la pared es muy similar entre cepas *RN-* y cepas *RN+* de *M. tuberculosis*.
- 2.2. La reactividad con el RN (NRA) de los glicolípidos de la pared de cepas *RN-* de *M. tuberculosis* es muy similar a la de los glicolípidos de cepas *RN+*.
- 2.3. La NRA de los SL es mucho menor a la de otros glicolípidos de la pared celular de *M. tuberculosis* como PIM y PL.
- 2.4. Los resultados obtenidos demuestran que los SL, PIM y PL, no están relacionados con la fijación de RN en cepas virulentas de *M. tuberculosis*.
- 2.5. La detección de SL mediante la técnica combinada de CCF-2D y tinción con cresil violeta, es un método fácil y reproducible para la determinación de este compuesto en extractos glicolípidicos crudos.

### **3. Aislamiento mediante complementación heteróloga en *M. smegmatis*, de la región cromosómica capaz de conferir el carácter *RN+* de *M. tuberculosis* H37Rv**

- 3.1. Mediante la introducción de una cosmidoteca de *M. tuberculosis* H37Rv en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, se ha demostrado que el carácter RN<sup>+</sup> es transferible de una especie patógena a una saprofita.
- 3.2. Existen regiones genómicas responsables del carácter RN<sup>+</sup> en *M. tuberculosis* H37Rv.

#### **4. Análisis de los perfiles glicolipídicos de las cepas RN<sup>+</sup> de *M. smegmatis***

- 4.1. La no detección de glicolípidos exclusivos de *M. tuberculosis* en las cepas RN<sup>+</sup> de *M. smegmatis* (pYUB18::H37Rv) demuestra que no están implicados en el carácter RN<sup>+</sup>.
- 4.2. Los análisis mediante CCF y DEAE mostraron que los SL no estaban presentes en las cepas RN<sup>+</sup> de *M. smegmatis* (pYUB18::H37Rv), por lo que se cuestiona la relación tradicionalmente aceptada entre el contenido de SL y el carácter RN<sup>+</sup> en las cepas virulentas de *M. tuberculosis*.

#### **5. Región genómica de *M. tuberculosis* relacionada con la fijación de rojo neutro**

- 5.1. Las cepas RN<sup>+</sup> de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (pYUB18::H37Rv) [9,12], [19,4] y [33,4] comparten una región ubicada entre las posiciones 660,0 kpb (Rv0568) y 673,4 kpb (Rv0578c) del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.
- 5.2. El análisis de la región genómica de *M. tuberculosis* H37Rv compartida por [9,12], [19,4] y [33,4], apunta a los genes Rv0570, Rv0574c, Rv0575c, Rv0576 ó Rv0577 como posibles implicados en la fijación de RN. Estos genes codifican respectivamente para una posible ribonucleotidil reductasa, una proteína de función desconocida pero similar a la proteína de encapsulación CapA de *B. anthracis*, una posible oxidoreductasa, un probable regulador de transcripción de la familia ArsR y el antígeno de secreción de 27 kDa (CFP30B).



# **BIBLIOGRAFÍA**



## F. BIBLIOGRAFÍA

**Ainsa, J., Martin, C., Cabeza, M., De la Cruz, F. y Mendiola, M.** (1996). Construction of a family of *Mycobacterium/Scherichia coli* shuttle vectors derived from pAL5000 and pACY184: their use for cloning an antibiotic-resistance gene from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene*. **176**: 23-26.

**Akaki, T., K. Sato, T. Shimizu, y H. Tomioka.** 2000. Changes in antibacterial activity of murine peritoneal macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* after prolonged *in vitro* precultivation. *Kekkaku*. **75**: 477-482.

**Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. y Lipman, D.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

**Arriaga, A. K., Orozco, E. H., Aguilar, L. D., Rook, G. A. W. y Hernández-Pando, R.** (2002). Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* **128**: 229-237.

**Arruda, S., Bomfim, G., Knights, R., Huima-Byron, T., y Riley, L.W.** (1993). Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science*. **261**: 1454-1457.

**Asselineau, J. y Lederer, E.** (1950). Structure of the mycolic acid of mycobacteria. *Nature*. **166**: 782-783.

**Asselineau, J. y Lanéelle, G.** (1998). Mycobacterial lipids: A historical perspective. *Front. Biosci.* **3**: e164-174.

**Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K.** (1993). Current Protocol in molecular biology. Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience, N. Y.

**Autret, N., Dubail, I., Trieu-Cuot, P., Berche, P. y Charbit, A.** (2001). Identification of new genes involved in the virulence of *Listeria monocytogenes* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect. Immun.* **69**: 2054-2065.

**Azuma, I., Yamamura, Y. y Fukushi, K.** (1968). Fractionation of mycobacterial cell wall. Isolation of arabinose mycolate and arabinogalactan from cell wall fraction of *Mycobacterium tuberculosis* strain Aoyama B. *J. Bacteriol.* **96**: 1885-1887.

**Ballou, C. E., Vilkas, E. y Lederer, E.** (1963). Structural studies on the myo-inositol phospholipids of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **238**: 69-76.

**Banu, S., Honore, N., Saint-Joanis, B., Philpot, D., Prevost, M. C. y Cole, S.** (2002). Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol. Microbiol.* **44**: 9-19.

**Barclay, R. y Ratledge, C.** (1988). Mycobactins and exochelins of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, and other related species. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 771-776.

- Belisle, J.T., Pascopella, L., Inamine, J.M., Brennan, P.T. y Jacobs, W.R.** (1991). Isolation and expression of a gene cluster responsible for biosynthesis of the glycopeptidolipid antigens of *Mycobacterium avium*. *J. Bacteriol.* **173**: 6991-6997.
- Belisle, J. y Sonnenberg M.** (1998). Isolation of genomic DNA from Mycobacteria. En: *Mycobacteria Protocols, Methods in Molecular Biology*. Parish, T. & Stoker, N. G. (eds), Humana Press, Londres. **101**, 31-44.
- Bercovier, H., Kafri,, O. y Sela, S.** (1986). Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem. Res. Commun.* **136**: 1136-1141.
- Besra, G. S., y Chatterjee, D.** (1994). Lipids and carbohydrates of *M. tuberculosis*. En: *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Bloom, B. R. (ed), Washington. pp.285-306.
- Besra, G.S., Morehouse, C.B., Rittner, C.M., Waechter, C.J., y Brennan, P.J.** (1997). Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. *J Biol Chem* **272**: 18460-18466.
- Bifani, P., Moghazeh, S., Shopsis, B., Driscoll, J., Ravikovitch, A. y Kreiswirth, B. N.** (2000). Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants: distinguishing the mycobacterial laboratory strain. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3200-3204.
- Blanchard, J. S.** (1996). Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 215-239.
- Bloch, H.** (1950). Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. *J. Exp. Med.* **91**: 197-218.
- Bloch, H. y Noll, H.** (1953). Studies on the virulence of tubercle bacilli. Variation in the virulence effect elicited by Tween 80 and thiosemicarbazone. *Br. J. Exp. Pathol.* **97**: 1-16.
- Bönicke, R.** (1958). Die differenzierung humaner und boviner tuberkelsterien mit hilfe von thiophen-2-carbonsäure-hydrazid. *Naturwissenschaften.* **46**: 329-393.
- Brennan, P.J. y Nikaido, H.** (1995). The envelope of Mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **64**: 29-63.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Soravito, C., Barrel, B., G. y Cole, S. T.** (1998). Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect. Immun.* **66**: 2221-2229.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Garnier, T., Tekaia, F., Yerman, E. y Cole, S.** (2000). Genomics, biology, and evolution of *Mycobacterium tuberculosis* complex. En: *Molecular genetics of mycobacteria*. Hatfull, G. y Jacobs, W. R. (eds). ASM press, Washington, P. 22.
- Brozna, J., Horan, M., Rademacher, J., Pabst, K. y Pabst, M.** (1991). Monocyte responses to sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*: Inhibition of priming for enhanced release of superoxide, associated with increased secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, and altered protein phosphorylation. *Infect. Immun.* **59**: 2542-2548.
- Burman, W. J., Stone, B. L. Reves, R.R., Wilson, M. L., Yang, Z., El-Hajj, H., Bates, J. H. y Cave, M.D.** (1997). The incidence of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**: 321-326.

**Butler, W. R., Jost, K., C. y Kilburn, J. O.** (1991). Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2468-2472.

**Calmette, A.** (1927). *La Vaccination Preventive Contra la Tuberculosis*. p 250. Masson et Cie, Paris.

**Chan, J., Fan, X., Hunter, S. W., Brennan, P. J. y Bloom, B. R.** (1991). Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* **59**: 1755-1761.

**Chapman, G. B., Hanks, J., H. y Wallace, J. H.** (1959). An electron microscope study of the disposition and fine structure of *Mycobacterium lepraemurium* in mouse spleen. *J. Bacteriol.* **77**: 205-211.

**Chatterjee, D.** (1997). The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**: 579-588.

**Clemens, D. L., Lee, B. Y. y Horwitz, M. A.** (1995). Purification, characterization, and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction. *J. Bacteriol.* **177**: 5644-5652.

**Cohn, M. L., Waggoner, R. F. y McClatchy, J. K.** (1968). The 7H11 medium for the culture of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* **98**: 295-296.

**Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry 3rd, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K. y Barrell, B.G.** (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**: 537-544.

**Cole, S. T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K. D., Thomson, N.R., Wheeler, P. R., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward JR. y Barrell, B. G.** (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* **409**: 1007-1011.

**Daffé, M., Brennan, P. J. y McNeil, M.** (1990). Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analyses. *J. Biol. Chem.* **12**: 6734-6743.

**Daffé, M., McNeil, M. y Brennan, P.** (1991). Novel type-specific lipooligosaccharides from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* **30**: 378-388.

**Daffé, M. y Draper, P.** (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **39**: 131-203.

**Daffé, M. y Etienne, G.** (1999). The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle lung Dis.* **79**: 153-169.

- Daniel, M.T., Bates, J.H. y Downes, K.A.** (1994). History of tuberculosis. En: *Tuberculosis*. Bloom, B.R. (ed.) Washington, D. C. ASM, pp. 13-24.
- Desbordes, J.** (1952). Mise en évidence in vitro de la "non virulence" de germes A. A. R. par une réaction au bleu de nil. *Ann. Inst. Pasteur*. **83**: 809-810.
- Desbordes, J. y Fournier, E.** (1954). Action des substances colorantes sur les mycobactéries I. Colorants basiques. Étude de la cinétique de la réaction. *Ann. Int. Pasteur*. **86**: 657-660.
- Desbordes, J., E. Fournier y Alix, D.** (1955). Action des substances colorantes sur les mycobactéries II. Colorants basiques. Influence du pH. *Ann. Inst. Pasteur*. **88**: 120-124.
- Dhariwal, K., Dhariwal G. y Goren, M.** (1984). Observations on the ubiquity of the *Mycobacterium tuberculosis* sulfatides in mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* **130**: 641-646.
- Diamon, J. M.** (1992). The arrow of disease. *Discover*. **13**: 64-73.
- Dmitriev, B.A., Ehlers, S., Rietschel, E.T. y Brennan, P.J.** (2000). Molecular mechanics of the mycobacterial cell wall: From horizontal layers to vertical scaffolds. *Int J Med Microbiol* **290**: 251-258.
- Dobson, G., Minnikin, D., Minnikin, S., Parlett, J., Goodfellow, M., Ridell, M. y Magnusson, M.** (1985). Systematic analysis of complex mycobacterial lipids. En: *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (eds.), Academic Press, Londres. pp. 237-265.
- Draper, P.** (1982). The anatomy of mycobacteria. En: *The Biology of Mycobacteria*. Ratledge, C. & Standford, J. (eds), Academic Press, Londres. vol. 1, pp. 9-52.
- Dubos, R. J. y Middlebrook, G.** (1947). Media for tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.* **56**: 334-345.
- Dubos, R. J. y Middlebrook, G.** (1948). Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.* **58**: 698-699.
- Elhay, M. J., Oettinger, T. y Andersen, P.** (1998). Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT-64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pigs. *Infect. Immun.* **66**: 3454-3456.
- Farga, V.** (1989). *Tuberculosis*. Mediterráneo (ed). Santiago de Chile.
- Filley, E. A. y Rook, G. A. W.** (1991). Effect of mycobacteria on sensitivity to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* **59**: 2567-2572.
- Frothingham, R.** (1995). Differentiation of strains in *Mycobacterium tuberculosis* complex by DNA sequence polymorphisms, including rapid identification of *M. bovis* BCG. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 840-844.
- Goodfellow, M. y Magee, J. G.** (1998). Taxonomy of Mycobacteria. En: *Mycobacteria. I Basic Aspects*. Gangadharam, P. R. J. & Jenkins, P. A. (eds). Chapman & Hall Medical Microbiology Series, International Thomson Publishing, Nueva York. pp. 1-71.
- Goren, M. B.** (1970a), Sulfolipid-I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Rv. I. *Biochim. Biophys. Acta.* **120**: 116-126.

- Goren, M. B.** (1970b), Sulfolipid-I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Rv. II. *Biochim. Biophys. Acta.* **120**: 116-126.
- Goren, M. B., Brokl, O. y Schaefer, W. B.** (1974). Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: Correlation of virulence with elaboration of sulfatides and strongly acidic lipids. *Infect. Immun.* **9**: 142-149.
- Goren, M. B., Brokl, O., Roller, P., Fales, H. M. y Das, B. C.** (1976a). Sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*: The structure of the principal sulfatide (SL-I). *Biochemistry.* **15**: 2728-2734.
- Goren, M. B., D'Arcy Hart, P., Young M. R. y Armstrong, J. A.** (1976b). Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **73**: 2510-2514.
- Goren, M. B. y Brennan, P. J.** (1979). Mycobacterial lipids: chemistry and biologic activities in tuberculosis. Youmnas, G. P. (ed). W. B. Saunders Company, Philadelphia. pp. 63-193.
- Goren, M. B., Vatter, A. E. y Fiscus, J.** (1987a). Polyanionic agents do not inhibit phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **41**: 122-129.
- Goren, M. B., Vatter, A. E. y Fiscus, J.** (1987b). Polyanionic agents as inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages: evolution of an alternative interpretation. *J. Leukoc. Biol.* **41**: 111-121.
- Grange, J., Aber, V., Allen, B., Mitchison, D. y Goren, M.** (1978). The correlation of Bacteriophage types of *Mycobacterium tuberculosis* with guinea-pig virulence and in vitro indicators of virulence. *J. Gen. Microbiol.* **108**: 1-7.
- Gurr, E.** (1962). *Staining animal tissues, Practical and theoretical.* Leonard Hill (ed.), Londres. p. 566.
- Hart, G. y Horwitz, M.** (1999). An inhibitor of exported *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets. *J. Exp. Med.* **189**: 1425-1435.
- Hart, G., Zamecnik, P. C., Tang, J. Y., Tabatadze, D. y Horwitz, M.** (2000). Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **97**: 418-423.
- Hauduroy, P. y Cevey, M.** (1953). Importance des réactions cyto-chimiques pour la détermination de la virulence des mycobactéries et intérêt por la classification. *Annal. Inst. Pasteur.* **84**: 1034-1035.
- Hinshelwood, S. y Stoker, N. G.** (1992). Cloning of mycobacterial histidine synthesis genes by complementation of a *Mycobacterium smegmatis* auxotroph. *Mol. Microbiol.* **6**,2887-2895.
- Houssaini-Iraqi, M., Lazraq, M. H., Clavel-Seres, S., Rastogi, N. y David, H. L.** (1992). Cloning and expression of *Mycobacterium aurum* carotenogenesis genes in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**: 239-244.

- Hughes, D., Moss, M., Hood, M. y Henson, M.** (1954). Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*: Evaluation of a test using neutral red indicator. *Am. J. Clin. Pathol.* **24**: 621-625.
- Hunter, S. W., Gaylord, H. y Brennan, P. J.** (1986). Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharides from the leprosy and tubercle bacilli. *J. Biol. Chem.* **261**: 12345-12351.
- Indrigo, J., Junter, R., y Actor, J. K.** (2002). Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. *Microbiology* **148**: 1991-1998.
- Ioneda, T., Lederer, E. y Rozants, R.** (1970). Sur la structure des diesters de tréhalose "cord factor" produit par *Nocardia asteroides* et *Nocardia rhodochrous*. *Chem. Phys. Lip.* **4**: 375-392.
- Jacobs, W., Barrett, J., Clark-Curtiss, J. y Curtiss, R.** (1986). In vivo repackaging of recombinant cosmid molecules for analyses of *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, and Mycobacterial genomic libraries. *Infect. Immun.* **52**: 101-109.
- Jacobs, W. R., Tuckman, M. y Bloom, B. R.** (1987). Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid. *Nature.* **327**: 532-535.
- Jacobs, W., Kalpana, G., Cirillo, J., Pascopella, L., Snapper, S., Udani, R., Jones, W., Barletta, R. y Bloom, B.** (1991). Genetic systems for Mycobacteria. *Methods Enzymol.* **204**: 537-555.
- Jackson, M., Berthet, F., Otal, I., Rauzier, J., Martin, C., Gicquel B. y Guilhot, C.** (1996). The *Mycobacterium tuberculosis* purine biosynthetic pathway: Isolation and characterization of the *purC* and *purL* genes. *Microbiology.* **142**: 2439-2447.
- Johansen, K.A., Gill, R.E. y Vasil, M. L.** (1996). Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in Mycobacteria. *Infect. Immun.* **64**: 3259-3266.
- Joklik, W. K., Willet, H. P. y Amos, D. B.** (1986). Microbiología Zinsser. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Kato, M.** (1970). Action of a toxic glycolipid of *Corynebacterium diphtheriae* on mitochondrial structure and function. *J. Bacteriol.* **101**: 709-716.
- Kato, M.** (1973). Effect of anti-cord factor antibody on experimental tuberculosis in mice. *Infect. Immun.* **7**: 14-21.
- Kato, M. y Goren, M.** (1974). Synergistic action of cord factor and mycobacterial sulfatides on mitochondria. *Infect. Immun.* **10**: 733-741.
- Kaufmann, S. H. E.** (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis?. *Nat. Rev. Immunol.* **1**: 20-30
- Keane, J., Remold, H. G. y H. Kornfeld.** (2000). Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J. Immunol.* **164**: 2016-2020.
- Kent, P. T., y Kubica, G. P.** (1985). Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services Publications (CDC) 86-8230. Center for Disease Control, Atlanta.

- King, C. H., Mundayoor, S., Crawford, J. T. y Shinnick, T. M.** (1993). Expression of contactdependent cytolytic activity by *Mycobacterium tuberculosis* and isolation of the genomic locus that encodes the activity. *Infect. Immun.* **61**: 2708-2712.
- Koch, R.** (1882). Die Ätiologie der tuberkulose. Berliner Klinischen Wochenschrift. **15**:221-230.
- Konno, K.** (1956). New chemical method to differentiate human-type tubercle bacilli from other mycobacteria. *Science.* **124**: 985.
- Laszlo, A., Papa, F. y David, H.** (1992). Thin-layer chromatography systems for the identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. Kansasii*, *M. gastri* and *M. Marinum*. *Res. Microbiology.* **143**: 519-524.
- Lazraq, R., Clavel-Seres, S. y David H. L.** (1991). Transformation of distinct mycobacterial species by shuttle vectors derived from the *Mycobacterium fortuitum* pAL500 plasmid. *Curr. Microbiol.* **22**: 9-13.
- Leao, S. C., Rocha, C. L., Murillo, L. A., Parra, C. A. y Patarroyo, M. E.** (1995). A species-specific nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a protein that exhibits hemolytic activity when expressed in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**: 4301-4306.
- Lechevalier, M. P. y Lechevalier, H. A.** (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. System. Bacteriol.* **20**: 435-444.
- Lederer, E., Adam, A., Ciorbaru, R., Petit, J. F. y Wietserbin, J.** (1975). Cell walls of mycobacteria and related organisms; chemistry and immunostimulant properties. *Mol. Cell. Biochem.* **7**: 87-104.
- Lee, R., Brennan, P. y Besra, G.** (1996). *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. En: *Current Topics in Microbiology and Immunology.* **215** pp. 1-27.
- Lemassu, A., Lévy-Frébault, V. V., Lanéelle, M. A. y Daffé, M.** (1992). Lack of correlation between colony morphology and lipooligosaccharide content in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1535-1541.
- Lillie, R. D.** (1977). *H. J. Conn's Biological Stains. A handbook on the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory.* Ninth edition. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- Liu, J., Barry, C. E. 3<sup>rd</sup>., Besra, G. S. y Nikaido, H.** (1999). Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* **22**: 29545-29551
- Makino, S., Uchida, I., Terakado, N., Sasakawa C. y Yoshikawa, M.** (1989). Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **171**: 722-730.
- Matsugana, I., Oka, S., Inove, T. y Yano, I.** (1990). Mycolyl glycolipids stimulate macrophages to release chemotactic factors. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 49-54.
- Metchcok, B. G., Nolte, F. S., y Wallace, R. J.** (1999). *Mycobacterium*. En: *Manual of Clinical Microbiology.* Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. y Tenover, R. H. (eds). ASM, Washington. pp.399-437.

- Middlebrook, G., Dubos, R. J. y Pierce, C.** (1947). Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* **82**: 175-184.
- Middelbrook, G, Coleman, Ch. y Schaefer, W.** (1959). Sulfolipid from virulent tubercle bacilli. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **45**: 1801-1804.
- Middlebrook, G., Cohn, M., L., Dye, W. E., Russel, W., F. y Levy, D.** (1960). Microbiologic procedures of value in tuberculosis. *Acta Tuberc. Scand.* **38**: 66-81.
- Middlebrook, G., Riggardo, Z. y Tigertt, W. D.** (1977). Automatable radiometric detection of growth of *M. tuberculosis* in selective media. *Am. Rev. Respir. Dis.* **115**: 1066-1069.
- Minnikin, D. E.** (1982). Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. En: *The Biology of Mycobacteria*. Ratledge, C. & Standford, J. (eds). Academic Press, Londres. vol. 1, pp. 95-184.
- Minnikin, D., Minnikin, S., Parlett, J., Goodfellow M. y Magnusson, M.** (1984). Mycolic acid patterns of some species of *Mycobacterium*. *Arch. Microbiol.* **139**: 225-231.
- Minnikin, D., Parlett, J., Dobson, G., Goodfellow, M., Magnusson, M. y Ridell, M.** (1986). Lipids profiles of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. En: *Mycobacterial of Clinical Interest*. Casal M. (ed). Elsevier, Amsterdam. pp. 75-78.
- Minnikin, D., Ridell, M., Parlett, J. y Bolton, R.** (1987). Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* lipid antigens by thin-layer chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**: 175-177.
- Moreno, C., Mehlert, A. y Lamb, J.** (1988). The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T-cell proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* **74**: 206-210.
- Morse, W., Dail, M. and Oiatzky, I.** (1953). An study of the neutral red reaction for determining the virulence of Mycobacteria. *Am. J. Pub. Healt.* **43**: 36-39.
- Muñoz, M., Lanéelle, M., Luquin, M., Torrelles, J., Julian, E., Ausina, V. y Daffé, M.** (1997). Occurrence of an antigenic triacyl trehalose in clinical isolates and reference strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**: 251-259.
- Nivin, B., Fujiwara, P. I., Hannifin, J. y Kreiswirth, B. N.** (1998). Cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis*: An epidemiological and laboratory investigation. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **19**: 500-503.
- Ortalo-Magné, A., Dupont, M.A., Lemassu, A., Andersen, A.B., Gounon, P. y Daffe, M.** (1995). Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology.* **141**: 1609-1620.
- Ortalo-Magné, A., Lemassu, A., Lanéelle, M., Bardou, F., Silve, G., Gounon, P., Marchal, G. y Daffé, M.** (1996). Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other Mycobacterial species. *J. Bacteriol.* **178**: 456-461.
- Pabst, M., Gross, J., Brozna, J. y Goren, M.** (1988). Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **140**: 634-640.

- Pal, P. G. y Horwitz, H. A.** (1992). Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* **60**: 4781-4792.
- Pan, F., Jackson, M., Ma, Y. y Mc Neil, M.** (2001). Cell wall core galactofuran synthesis is essential for growth of mycobacteria. *J. Bacteriol.* **183**: 3991-3998.
- Papavinasasundaram, K. G. Colston, M. J. y Davis, E. O.** (1998). Construction and complementation of a *recA* deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis* reveals that the intein in *Mycobacterium tuberculosis recA* does not affect RecA function. *Mol. Microbiol.* **30**: 525-534.
- Parra, C. A., Londoño, L. P., Del Portillo, P. y Patarroyo, M. E.** (1991). Isolation, characterization, and molecular cloning of a specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen gene: identification of a species-specific sequence. *Infect. Immun.* **59**: 3411-3417.
- Pascopella, L., Collins, F. M., Martin, J. M., Lee, M. H., Hatfull, G. F., Stover, C. K., Bloom, B. R. y Jacobs, W. R.** 1994. Use of in vivo complementation in *Mycobacterium tuberculosis* to identify a genomic fragment associated with virulence. *Infect. Immun.* **62**: 1313-1319.
- Picard, B., Frehel, C. y Rastogi, N.** (1984). Cytochemical characterization of mycobacterial outer surfaces. *Acta Leprol.* **95**: 227-235.
- Puzo, G.** (1990). The carbohydrate- and lipid- containing cell wall of mycobacteria, phenolic glycolipids: structure and immunological properties. *Crit. Rev. Microbiol.* **17**: 305-327.
- Ranes, M.G., Rauzier, J., Lagranderie, M., Gheorghiu, M. y Gicquel, B.** (1990). Functional analysis of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*: Construction of a "Mini" *Mycobacterium- Escherichia coli* shuttle vector. *J. Bacteriol.* **172**: 2793-2797.
- Rastogi, R., Frehel, C. y David H. L.** (1986). Triple-layered structure of mycobacterial cell wall: evidence for the existence of a polysaccharide-rich outer layer in 18 mycobacterial species. *Curr. Microbiol.* **13**: 237-242.
- Raynaud, J. M., Guilhot, C., Rauzier, J., Bordat, Y., Pelicic, V., Manganelli, R., Shith, I., Gicquel, B. y Jackson, M.** (2002). Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **45**: 203-217.
- Richmond, L. y Cummings, M.** (1950). An evaluation of methods of testing the virulence of acid-fast bacilli. *Am. Rev. Tuberc.* **62**: 632-637.
- Riera, J., Robb, F., Weiss, R. y Fontecave, M.** (1997). Ribonucleotide reductase in the archaean *Pyrococcus furiosus*: A critical enzyme in the evolution of DNA genomes?. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 475-478.
- Rindi, L., N. Lari, y Garzelli, C.** (1999). Search for genes potentially involved in *Mycobacterium tuberculosis* virulence by mRNA differential display. *Biochem. Bioph. Res. Com.* **258**: 94-101.
- Rivera-Marrero, C. A., Burroughs, M. A., Mase, R. A., Vannberg, F. O., Leimbach, D. L., Roman, J. y Murtagh, J. J. Jr.** (1998). Identification of genes differentially expressed in *Mycobacterium tuberculosis* by differential display PCR. *Microb. Pathogenesis.* **25**: 307-316.
- Rivera-Marrero, C. A., Ritzenthaler, J. D., Newburn, S. A., Roman, J. y Cummings, R. D.** (2002). Molecular cloning and expression of a novel glycolipid sulfotransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* **148**: 783-792.

**Roberts, E. D., Koneman, E. W. y Kim., Y. K.** (1991). *Mycobacterium*. En: *Manual of Clinical Microbiology*. Balows, A. Hausler, W. J. Jr., Herrmann, K. L., Isenberg, H. D. & Shadomy, H. J. (ed). 5<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp.304-339

**Rosenkrands, I., Welding, K., Jacobsen, S., Hansen C. V., Florio, W., Gianetri, I. y Andersen, P.** (2000). Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis*. **21**: 935-948.

**Salo, W. L., Aufderheide, A. C., Buikstra, J. y Holcomb, T.A.** (1994). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci. USA*. **91**: 2091-2094.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Schorey, J. S., Li, Q., McCourt, D. W., Bong-Mastek, M., Clark-Curtiss, J. E., Ratliff, T. L. y Brown, E. J.** (1995). A *Mycobacterium leprae* gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infect. Immun.* **63**: 2652-2657.

**Seen, M., Ionedá, T., Pudles, J. y Lederer, E.** (1967). Spectrométrie de masse de glycolipids. I. Structure du "cord factor" de *Corynebacterium diphtheriae*. *Eur. J. Biochem.* **1**: 353-356.

**Sibley, L. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J., Krahenbuhl, J. L.** (1988). Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon mediated activation of macrophages. *Infect. Immun.* **56**: 1232-1236.

**Silva, M. T. y Macedo, P. M.** (1983). Comparative ultrastructural study of the membranes of *Mycobacterium leprae* and of cultivable mycobacteria. *Biol. Cell.* **47**: 383-386.

**Silva, C. L., Ekizlerian, S. M. y Fazioli, R. A.** (1985). Role of cord factor in the modulation of infection caused by mycobacteria. *Am. J. Pathol.* **118**: 238-247.

**Silva, C. L. y Faccioli, L. H.** (1988). Tumor necrosis factor (cachetin) mediates induction of cachexia by cord factor from mycobacteria. *Infect. Immun.* **56**: 3067-3971.

**Skerman, V. B. D., Mac Gowan, V. y Sneath, P. H. A.** (1980). Approved lists of bacterial names. *Int. J. System Bacteriol.* **30**: 225-420.

**Snapper, S., Melton, R., Mustafa, S., Kieser, T. y Jacobs, W.** (1990). Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1911-1919.

**Soto, C., Cama, M., Gibert, I. y Luquin M.** (2000). Application of an easy and reliable method for sulfolipid-I detection in the study of its distribution in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**: 103-107.

**Soto, C., Andreu, N., Gibert, I. y Luquin, M.** (2002). Simple and rapid differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates through two cytochemical tests using neutral red and Nile blue stains. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3021-3024.

**Springer, B., Wu, W., Bodmer, T., Haase, G., Pfyffer, G. E., Kroppenstedt, R. M., Schröder, K. H., Emler, S., Kilburn, J. O., Kirschner, P., Telenti, A., Coyle, M. B. y Böttger, E.C.** (1996). Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1100-1107.

- Sreevatsan, S., Escalante, P., Pan, X., II, D. A. G., Siddiqui, S., Khalaf, C. N., Kreiswirth, B. N., Bifani, P., Adams, L. G., Ficht, T., Perumaalla, V. S., Cave, M. D., van Embden, J. D. A., y Musser, J. M.** (1996). Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2007-2010.
- Steele, J. H. y Ranney, A. F.** (1958). Animal tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.* **77**: 908-922.
- Steenken, W., y Gardner, L.** (1946). History of H37 strain of tubercle bacillus. *Am. Rev. Tuberc.* **54**: 62.
- Svennerholm, L.** (1963). Chromatographic determination of sulfatides. *Acta. Chem. Scand.* **17**: 1170-1172.
- Tsukamura, M.** (1981). A review of the methods of identification and differentiation of *Mycobacterium*. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 841-861.
- Urushibata, Y., Tokuyama, S. y Tahara, Y.** (2002). Characterization of the *Bacillus subtilis* *ywsC* gene, involved in gamma-polyglutamic acid production. *J. Bacteriol.* **184**: 337-343.
- Valway, S. E., Sanchez, M. P., Shinnick, T.F., Orme, I., Agerton, T., Hoy, D., Jones, J. S., Westmoreland, H. y Onorato, I. M.** (1998). An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N. Engl. J. Med.* **338**: 633-639.
- van Soolingen, D. P., de Haas, E., Hermans, P. W., Groenen, P. M. y van Embden, J. D.** (1993). Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1987-1995.
- VanZile, M. L., Cosper, N. J., Scott, R. A. y Giedroc, D. P.** (2000). The zinc metalloregulatory protein of *Synechococcus* PCC7942 SmtB binds a single zinc ion per monomer with high affinity in a tetrahedral coordination geometry. *Biochemistry.* **39**: 11818-11829.
- Vergne I. y Daffé, M.** (1998). Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells. *Front. Biosci.* **3**, d865-876.
- Virtanen, S.** (1960). A study of nitrate reduction by mycobacteria. *Act. tuberc. Scand. Suppl.* **48**: 1-119.
- Wayne, L. G.** (1974). Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.* **119**: 107-159.
- Wayne, L.G. y Kubica, G.P.** (1986). Family Mycobacteriaceae. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Holt, J.G., Sneath, P.H.A., Mair, N.S. y Sharpe, M.E. (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1435-1457.
- WHO.** World Health Organization Report on Infectious Diseases 2000. Overcoming Antimicrobial Resistance. WHO/ CDS/ 2000. ([www.who.int/infectious-disease-report-2000](http://www.who.int/infectious-disease-report-2000)).
- WHO.** World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2001. WHO/ CDS/ TB/ 2001. 275. Geneva: WHO, 2001. ([www.who.int](http://www.who.int)).
- WHO.** World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2002. WHO/ CDS/ TB/ 2002. 275. Geneva: WHO, 2002. ([www.who.int](http://www.who.int)).

**Wilker, H. G. y Harboe, M.** (1992). The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* **56**: 648-661.

**Yang, F., Lu, G. y Rubin, H.** (1994). Isolation of ribonucleotide reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, and cloning, expression, and purification of the large subunit. *J. Bacteriol.* **176**: 6738-6743.

**Yang, F., Curran, S. C., Li, L. S., Avarbock, D., Graf, J. D., Chua, M. M., Lu, G., Salem, J. y Rubin, H.** (1997). Characterization of two genes encoding the *Mycobacterium tuberculosis* ribonucleotide reductase small subunit. *J. Bacteriol.* **179**: 6408-6415.

**Zhang, L., Goren, M. B., Holzer, T. J. y Andersen B. R.** (1988). Effect of *Mycobacterium tuberculosis* derived sulfolipid I on human phagocytic cells. *Infect. Immun.* **56**: 2876-2883.

**Zhang, L., English, D. y Andersen, B.** (1991). Activation of human neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis* derived sulfolipid-I. *J. Immunol.* **146**, 2730-2736.

**Zhang, M., Gong, J., Lin, Y. y Barnes. P.** (1998). Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. *Infect. Immun.* **66**:794-799.

**Zhang, Y., Lathigra, R., Garbe, T., Catty, D. y Young, D.** (1991). Genetic analysis of superoxide dismutase, the 23 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **5**: 381-391.

**Zhang, Y. y Telenti, A.** (2000). Genetics of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. En: *Molecular Genetics of Mycobacteria*. Hatfull, G. F.& Jacobs, W. R., (eds). ASM Press, Whashington, D. C. pp.235-254.

# ARTÍCULOS



## G. ARTÍCULOS

- I. **Soto, C., Cama, M., Gibert, I. y Luquin, M. (2000)** “Application of an easy and reliable method for sulfolipid-I detection in the study of its distribution in *Mycobacterium tuberculosis* strains”. *FEMS Microbiology Letters*. **187**:103-107.
  
- II. **Soto, C., Andreu, N., Gibert, I. y Luquin, M. (2002)**. “Simple and rapid differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra from *M. tuberculosis* clinical isolates through two cytochemical tests using neutral red and Nile blue stains”. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 3021-3024.



## Artículo I

**Soto, C.**, Cama, M., Gibert, I. y Luquin, M. (2000) “Application of an easy and reliable method for sulfolipid-I detection in the study of its distribution in *Mycobacterium tuberculosis* strains”. *FEMS Microbiology Letters*. **187**:103-107.















## Artículo II

**Soto, C., Andreu, N., Gibert, I. y Luquin, M. (2002).** “Simple and rapid differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra from *M. tuberculosis* clinical isolates through two cytochemical tests using neutral red and nile blue stains”. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 3021-3024.











## H. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que con su apoyo en los buenos y malos momentos han hecho posible que este trabajo se haya hecho realidad.

Inicialmente a quienes durante mi permanencia en Barcelona contribuyeron al desarrollo de mi tesis:

A la Dra. Marina Luquin por su confianza, por acogerme en su grupo de trabajo después de haber tocado muchas puertas cuando llegué a este país y que todo era tan nuevo y extraño para mí.

Al Dr. Isidre Gibert por darme la orientación necesaria para trabajar en un área tan “especial” como lo es la genética de las micobacterias.

A Manuel Muñoz por haberme enseñado de forma paciente y desinteresada las técnicas básicas del trabajo con lípidos, y por haber hecho agradables muchas horas de trabajo con su entretenida conversación.

A Esther Julián por su compañerismo, sus buenos consejos, por siempre tener una respuesta a mis preguntas, y especialmente por la corrección crítica y minuciosa de este manuscrito.

A Josep, Mercè, Lidia, Ignasi, Irma, Eduard y Núria por ser excelentes compañeros de laboratorio.

También quiero agradecer de forma muy especial a Toni, Ana, Xavy Carbo, Mar, Jordi, Dani y Manel, del laboratorio de Microbiología Aplicada del IBB de la UAB, por haberme hecho sentir como uno más de la familia.

Para manifestarle mis agradecimientos a Pilar sería muy poco unas cuantas líneas, no conozco la forma de dar infinitas gracias únicamente con palabras. A ella se lo debo todo y mucho más. Le agradezco inmensamente por estar siempre ahí, y por su incondicional compañía en las buenas y en las malas durante estos años....

También debo hacer una mención muy especial al grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza, que tanta colaboración me ha brindado durante mi estancia en esa ciudad:

Al Dr. Carlos Martin por la confianza que siempre ha tenido en mi trabajo, por su apoyo incondicional, su ejemplo de disciplina, y especialmente por transmitirme optimismo y actitudes positivas para afrontar el trabajo en investigación.

A José Antonio Aínsa por su clara orientación y sus útiles consejos tanto científicos como de la vida diaria.

A Santiago Uranga por ser tan buen colega, y por su asistencia técnica tan útil y oportuna.

A Pedro Almeida por ayudarme a entender que "no solo de ciencia vive el hombre".

A Carmen Lafoz por su ejemplo de trabajo ordenado y por su ayuda técnica.

Finalmente a Isabel Otal, Sofía Samper, Ana Belén Gómez, Esther Pérez, Virginie Mick, , Santiago Ramón, Jesús Gonzalo, Nadia Ferrer, Irene Santos y Marisa Nieto por su excelente compañerismo.