



Universitat Autònoma
de Barcelona

**ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS
GENES *Rv0576-Rv0577* EN LA TINCIÓN CON
ROJO NEUTRO Y LA VIRULENCIA DE
*Mycobacterium tuberculosis***

NÚRIA ANDREU MARTÍN

2007

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina

Departament de Genètica i de Microbiologia

**Estudio de la implicación de los genes *Rv0576-Rv0577*
en la tinción con rojo neutro y la virulencia de
*Mycobacterium tuberculosis***

Tesis doctoral presentada por

Núria Andreu Martín

para optar al Grado de Doctora

Visto bueno del Director de la Tesis,

Dr. Isidre Gibert González

A la memoria de mi abuela

The blind men and the elephant

It was six men of Indostan
To learning much inclined,
Who went to see the Elephant
(Though all of them were blind),
That each by observation
Might satisfy his mind.

The First approached the Elephant,
And happening to fall
Against his broad and sturdy side,
At once began to bawl:
“God bless me! but the Elephant
Is very like a wall!”

The Second, feeling of the tusk,
Cried: “Ho! what have we here
So very round and smooth and sharp?
To me ’tis mighty clear
This wonder of an Elephant
Is very like a spear!”

The Third approached the animal,
And, happening to take
The squirming trunk within his hands,
Thus boldly up and spake:
“I see,” quoth he, “the Elephant
Is very like a snake!”

The Fourth reached out his eager hand,
And felt about the knee.
“What most this wondrous beast is like
Is mighty plain,” quoth he;
“’Tis clear enough the Elephant
Is very like a tree!”

The Fifth, who chanced to touch the ear,
Said: “E’en the blindest man
Can tell what this resembles most;
Deny the fact who can,
This marvel of an Elephant
Is very like a fan!”

The Sixth no sooner had begun
About the beast to grope,
Than, seizing on the swinging tail
That fell within his scope,
“I see,” quoth he, “the Elephant
Is very like a rope!”

And so these men of Indostan
Disputed loud and long,
Each in his own opinion
Exceeding stiff and strong,
Though each was partly in the right
And all were in the wrong!

Moral

So oft in theologic wars,
The disputants, I ween,
Rail on in utter ignorance,
Of what each other mean,
And prate about an Elephant
Not one of them has seen!

*American poet John Godfrey Saxe
(1816–1887), based on an Indian fable
(Riley, W. R., 2006)*

Índice

Resumen	ix
Abreviaturas	xi
1. Introducción.....	1
1.1. Historia y epidemiología de la tuberculosis	1
1.1.1. De la prehistoria a Robert Koch	1
1.1.2. El declive de la tuberculosis: 1850-1980	3
1.1.3. La reemergencia de la tuberculosis	5
1.2. Infección y enfermedad.....	7
1.3. Diagnóstico	10
1.3.1. Infección latente	10
1.3.2. Tuberculosis activa.....	11
1.3.3. Ensayos de susceptibilidad a fármacos	13
1.4. Tratamiento	15
1.4.1. Principios de la terapia múltiple.....	15
1.4.2. Tratamiento de la infección latente	15
1.4.3. Tratamiento en personas VIH-positivas.....	16
1.4.4. Cepas resistentes y multirresistentes	16
1.4.5. Nuevos fármacos	16
1.5. Prevención.....	18
1.5.1. BCG.....	18
1.5.2. Nuevas vacunas	19
1.6. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>: características generales	21
1.6.1. El género <i>Mycobacterium</i>	21
1.6.2. El complejo <i>M. tuberculosis</i>	23

1.6.3. Evolución del complejo <i>M. tuberculosis</i>	25
1.7. El genoma de <i>M. tuberculosis</i>	26
1.8. La envuelta celular de <i>M. tuberculosis</i>	28
1.8.1. Estructura, composición y biosíntesis	28
1.8.1.1. Membrana plasmática	29
1.8.1.2. El complejo ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglicano.....	31
1.8.1.3. Otros componentes de la pared celular	33
1.8.1.4. La cápsula.....	37
1.8.2. Actividades biológicas, patogenia y regulación.....	38
1.8.2.1. Importancia de la envuelta celular	38
1.8.2.2. Regulación de la composición de la envuelta	40
1.9. Interacciones huésped-patógeno	41
1.9.1. La fagocitosis y el fagosoma de <i>M. tuberculosis</i>	41
1.9.2. Estimulación de la respuesta inmune específica	43
1.9.3. Mecanismos efectores del macrófago activado.....	44
1.10. La tinción con rojo neutro	45
1.10.1. Introducción histórica.....	45
1.10.1.1. La tinción con rojo neutro como prueba de virulencia	45
1.10.1.2. Aspectos técnicos y observaciones sobre la tinción.....	47
1.10.1.3. La tinción con rojo neutro en la identificación y clasificación de las micobacterias.....	50
1.10.1.4. Estudios sobre el mecanismo de la tinción	52
1.10.2. Trabajos recientes sobre la tinción con rojo neutro	54
1.10.2.1. La tinción con rojo neutro y el sulfolípidos.....	54
1.10.2.2. Clonación de los genes implicados en la tinción con rojo neutro por complementación heteróloga de <i>M. smegmatis</i>	55
2. Objetivos	59

3. Materiales y métodos	61
3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	61
3.2. Métodos microbiológicos	65
3.2.1. Medios de cultivo, antibióticos y otras soluciones.....	65
3.2.1.1. Medios de cultivo	65
3.2.1.2. Antibióticos	68
3.2.1.3. Otras soluciones	68
3.2.2. Condiciones de crecimiento y conservación de las cepas.....	69
3.2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	69
3.2.2.2. <i>Mycobacterium</i>	69
3.3. Métodos citoquímicos.....	70
3.3.1. Tinción con rojo neutro	70
3.3.1.1. Tinción con rojo neutro en tubo	70
3.3.1.2. Tinción con rojo neutro en placa.....	71
3.3.2. Tinción con auramina.....	71
3.4. Métodos genéticos.....	72
3.4.1. Transformación de <i>E. coli</i>	72
3.4.2. Electroporación de <i>Mycobacterium</i>	74
3.5. Métodos de manipulación de DNA	77
3.5.1. Miniextracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	77
3.5.2. Obtención de DNA plasmídico de <i>Mycobacterium</i>	80
3.5.3. Digestión con enzimas de restricción.....	81
3.5.4. Desalado de DNA con columnas de agarosa	82
3.5.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	83
3.5.6. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa	84
3.5.7. Clonación en vectores plasmídicos	85

Índice

3.5.7.1. Obtención de extremos romos.....	86
3.5.7.2. Desfosforilación	86
3.5.7.3. Ligación.....	87
3.5.8. Amplificación y secuenciación de DNA.....	88
3.5.8.1. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	88
3.5.8.2. Secuenciación.....	89
3.6. Métodos de manipulación de RNA	91
3.6.1. Extracción de RNA total	91
3.6.2. Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA.....	95
3.6.2.1. Cuantificación espectrofotométrica	95
3.6.2.2. Análisis con el Bioanalyzer 2100 (Agilent)	96
3.7. Métodos de manipulación de proteínas	97
3.7.1. Obtención de extractos proteicos	97
3.7.1.1. <i>M. smegmatis</i>	97
3.7.1.2. <i>M. tuberculosis</i>	98
3.7.2. Determinación de la concentración de proteínas	99
3.7.3. Electroforesis de proteínas	99
3.7.4. Western-blot.....	103
3.8. Análisis de la expresión génica	106
3.8.1. RT-PCR (<i>Reverse Transcription-PCR</i>).....	106
3.8.2. Ensayo de la actividad β -galactosidasa.....	108
3.8.3. Microchips de DNA	111
3.9. Análisis de los lípidos de la envuelta de <i>M. tuberculosis</i>	118
3.9.1. Extracción de los lípidos de la envuelta de <i>M. tuberculosis</i>	118
3.9.1.1. Lípidos libres totales	119
3.9.1.2. Lípidos libres no polares	120

3.9.1.3. Ácidos micólicos.....	120
3.9.2. Cromatografía en capa fina (CCF).....	121
3.10. Análisis de la virulencia de <i>M. tuberculosis</i>	123
3.10.1. Cepas murinas y condiciones de estabulación	123
3.10.2. Modelo de infección	123
3.10.3. Histología e histometría	124
3.10.4. Monitorización de la respuesta inmune	125
3.10.5. Análisis estadístico.....	126
4. Resultados.....	127
4.1. Construcción y caracterización de los mutantes <i>Rv0576</i> y <i>Rv0577</i> en <i>M. tuberculosis</i>	127
4.1.1 Obtención de las cepas mutantes	127
4.1.2. Análisis fenotípico	130
4.1.2.1. Tinción con rojo neutro.....	130
4.1.2.2. Crecimiento y morfología colonial	130
4.1.2.3. Composición lipídica de la envuelta celular	132
4.1.3. Estudio de la virulencia.....	133
4.1.3.1. Análisis de la supervivencia de ratones inmunodeprimidos	133
4.1.3.2. Multiplicación y persistencia en ratones inmunocompetentes.....	134
4.1.3.3. Respuesta inmune	135
4.1.3.4. Histología e histometría	136
4.2. Estudio de la posible función reguladora de la proteína <i>Rv0576</i>	137
4.2.1. Efecto sobre la expresión del operón <i>Rv0576-Rv0577</i>	137
4.2.1.1. Análisis de la regulación	137
4.2.1.2. Delimitación del promotor del operón	140

4.2.2. Análisis de la expresión global de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$	143
4.3. Complementación de las cepas mutantes <i>Rv0576</i> y <i>Rv0577</i>.....	145
4.3.1. Complementación y tinción con rojo neutro.....	145
4.3.2. Estudio del efecto de la sobreproducción de la proteína <i>Rv0576</i> y de la posible dominancia de la mutación <i>Rv0577</i>	147
4.3.3. Construcción de nuevos mutantes <i>Rv0576</i> y <i>Rv0577</i>	147
4.3.4. Análisis de la virulencia de los mutantes complementados.....	150
4.4. Estudio de la variabilidad de los fenotipos rojo neutro y PDIM.....	152
4.4.1. Análisis de la heterogeneidad poblacional.....	153
4.4.2. Análisis de la estabilidad clonal.....	156
4.4.3. Análisis comparativo del transcriptoma de las cepas H37Rv, C27, C32 y C49.....	157
5. Discusión.....	161
5.1. Los genes <i>Rv0576-Rv0577</i> y la tinción con rojo neutro.....	161
5.1.1. Obtención de los mutantes <i>Rv0576</i> y <i>Rv0577</i> y estudio de la función de la proteína <i>Rv0576</i>	161
5.1.2. Comprobación de las cepas mutantes <i>Rv0576</i> y <i>Rv0577</i>	164
5.1.3. Estudio del fenotipo RN^- y $PDIM^-$ de las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$	165
5.1.4. Reinterpretación de los resultados previos obtenidos en <i>M. smegmatis</i>	168
5.2. Los genes <i>Rv0576-Rv0577</i> y la virulencia de <i>M. tuberculosis</i>.....	170
5.3. Variación fenotípica de la tinción con rojo neutro y de la síntesis de PDIM.....	173
5.3.1. Tinción con rojo neutro.....	173
5.3.2. Síntesis de PDIM.....	175
5.4. La tinción con rojo neutro y la envuelta celular.....	177
6. Conclusiones.....	179

7. Bibliografía	181
8. Anexo.....	205
8.1. Análisis comparativo de las cepas H37Rv, Δ76 y Δ76::Rv0576 con microchips de DNA	205
8.2. Análisis comparativo de las cepas H37Rv, C27, C32 y C49 con microchips de DNA	207
8.3. Variabilidad asociada a la tecnología de los microchips de DNA.....	208

Resumen

Actualmente se estima que 2 mil millones de personas están infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis, una enfermedad que afecta anualmente a 14 millones de personas causando la muerte a casi 2 millones de ellas. Las principales causas que han dado lugar a la reemergencia de la tuberculosis son la coinfección con el VIH, la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes y multirresistentes, y la baja eficacia de la actual vacuna. Esta situación requiere pues, la identificación de nuevos factores de virulencia de *M. tuberculosis* que puedan utilizarse como dianas terapéuticas o en la obtención de una vacuna más eficaz.

En este sentido en nuestro laboratorio, en colaboración con otros grupos, nos centramos en el estudio de la tinción con rojo neutro, una reacción citoquímica relacionada con la virulencia del bacilo de la tuberculosis, ya que permite diferenciar las cepas virulentas de las avirulentas y de la mayoría de las micobacterias ambientales. A pesar de que desde los años 1960 se había atribuido este comportamiento al sulfolípido, un componente de la envuelta celular de *M. tuberculosis*, trabajos recientes, como la tinción positiva de cepas deficientes en este lípido, han refutado esta relación. Así mismo, mediante la complementación heteróloga de *M. smegmatis*, una micobacteria saprófita rojo neutro negativa, se identificó el gen de *M. tuberculosis* *Rv0577* como el único necesario para conferir el carácter rojo neutro positivo a *M. smegmatis*. Este gen, que codifica una proteína de función desconocida, forma una unidad transcripcional con el gen *Rv0576*, un probable regulador transcripcional que podría estar también relacionado con la tinción.

Siguiendo esta misma línea, el principal objetivo de este trabajo ha sido analizar la posible implicación de los genes *Rv0576-Rv0577* en la tinción con rojo neutro y en la virulencia de *M. tuberculosis*. Para ello, por una parte se estudió la función de la proteína *Rv0576* mediante fusiones transcripcionales y el análisis de la expresión génica con microchips de DNA. De este modo se comprobó que el gen *Rv0576* codifica, efectivamente, un regulador transcripcional que reprime la expresión del operón *Rv0576-Rv0577*, no detectándose otros genes regulados. Por otra parte, se obtuvieron y caracterizaron los mutantes de *M. tuberculosis* en los genes *Rv0576* y *Rv0577*. Ambos mutantes mostraron unos fenotipos similares: eran rojo neutro negativos, presentaban una morfología colonial alterada, carecían de dimicocerosatos de ftiocerol (PDIM, unos

Resumen

lípidos de la envuelta celular), y eran altamente atenuados en ratones inmunodeprimidos e inmunocompetentes, induciendo una débil respuesta inmune y una menor patología. Sin embargo, los posteriores estudios de complementación pusieron de manifiesto que estos fenotipos no están relacionados con las deleciones de los genes *Rv0576* y *Rv0577*, si no que serían debidos a otras mutaciones producidas durante el proceso de obtención de los mutantes. Estos resultados y la construcción de nuevos mutantes en estos genes permiten descartar cualquier relación de los genes *Rv0576-Rv0577* con la tinción con rojo neutro y, muy probablemente, con la virulencia de *M. tuberculosis*.

Así mismo, el análisis de clones individuales de *M. tuberculosis* H37Rv ha permitido demostrar que esta bacteria, *in vitro*, forma poblaciones heterogéneas en cuanto a la tinción con rojo neutro y a la síntesis de PDIM. El fenotipo rojo neutro de la cepa salvaje se restablece con cierta frecuencia en los mutantes rojo neutro negativos, manteniendo una población mayoritariamente rojo neutro positiva. Mientras que no se ha observado la reversión de mutantes en la síntesis de PDIM, lo que contribuiría a la acumulación de estos mutantes hasta convertirse en la población mayoritaria con los sucesivos cultivos de la cepa *in vitro*. Estas observaciones, y la relación de la tinción con rojo neutro y de los PDIM con la virulencia de *M. tuberculosis*, ponen de manifiesto la necesidad de comprobar estos fenotipos antes de realizar el análisis de la virulencia de una determinada cepa o mutante de *M. tuberculosis*.

Abreviaturas

2D-CCF	Cromatografía en capa fina bidimensional
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> : albúmina sérica bovina
CCF	Cromatografía en Capa Fina
DAT	Diaciltrealosa
DOTS	<i>Directly Observed Therapy, Short-Course</i> : terapia de corta duración observada directamente
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> : DNA de doble cadena
GC	Guanina y Citosina
GTC	Guanidina Tiocianato
HPRT	Hipoxantina Fosforibosil Transferasa
Hyg	Higromicina
IFN- γ	Interferón- γ
IL	Interleucina
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> : óxido nítrico sintasa inducible
Km	Kanamicina
LAM	Lipoarabinomanano
LM	Lipomanano
ManLAM	Lipoarabinomanano manosilado
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> : sitio de clonación múltiple
MDR-TB	<i>Multidrug Resistant-Tuberculosis</i> : tuberculosis multirresistente
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> : complejo principal de histocompatibilidad
MK	Menaquinonas
NRA	<i>Neutral Red Activity</i> : actividad rojo neutro
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>Open Reading Frame</i> : marco abierto de lectura
PAT	Poliaciltrealosa
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> : tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> : Reacción en cadena de la polimerasa
PDIM	<i>Phthiocerol Dimycocerosate</i> : Dimicocerosato de ftiocerol

Abreviaturas

PGL	<i>Phenolic Glycolipid</i> : Glicolípido fenólico
PGRS	<i>Polymorphic GC-rich Repetitive Sequences</i> : secuencias repetitivas polimórficas ricas en GC
PIM	Fosfatidilinositol manósido
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i> : derivado proteico purificado
RN ⁻	Rojo neutro negativo
RN ⁺	Rojo neutro positivo
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficient</i> : Inmunodeficiencia combinada severa
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> : Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SL	Sulfolípido
Sm	Estreptomina
TAG	Triacilgliceroles
TAT	Triaciltrealosa
TDM	<i>Trehalose Dimycolate</i> : dimicolato de trealosa
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> : receptores Toll-like
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> : factor de necrosis tumoral- α
TMM	<i>Trehalose Monomycolate</i> : monomicolato de trealosa
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1. Introducción

1.1. Historia y epidemiología de la tuberculosis

1.1.1. De la prehistoria a Robert Koch

La tuberculosis es una enfermedad que ha afectado a la población humana desde la antigüedad. Existen abundantes evidencias arqueológicas que muestran que la tuberculosis era una enfermedad importante ya en el Egipto Predinástico de hace más de 5500 años. Estos indicios se han visto confirmados mediante estudios de DNA fósil que muestran además que la tuberculosis estuvo ampliamente presente en el antiguo Egipto desde el 3500 hasta el 500 a.C. (Zink *et al.*, 2003).

En Europa los primeros casos descritos de espondilitis (inflamación vertebral) tuberculosa datan del neolítico medio (4000 a.C.) en Italia (Formicola *et al.*, 1987; Canci *et al.*, 1996), Alemania y Dinamarca (2500-1500 a.C.) (Aufderheide y Rodríguez-Martín, 1998). El ejemplo más antiguo hallado en Inglaterra procede del periodo medio de la Edad de Hierro, hace aproximadamente 2200 años, y ha sido uno de los pocos en ser confirmados mediante el estudio de DNA fósil (Taylor *et al.*, 2005).

En América, los estudios paleopatológicos y paleomicrobiológicos han demostrado la existencia de la tuberculosis desde hace al menos 2000 años y, por lo tanto, mucho antes del contacto con Europa (Gómez i Prat y Mendonça de Souza, 2003). Actualmente, la hipótesis más aceptada es que la tuberculosis habría llegado a América con las migraciones, humanas o animales, que desde Asia cruzaron el puente de Beringia hace 10 000 ó 20 000 años (Daniel, T. M., 2000; Rothschild *et al.*, 2001). La tuberculosis habría persistido en algunos de los pequeños grupos nómadas dispersos por América, en niveles endémicos bajos, para posteriormente alcanzar niveles epidémicos con el establecimiento de comunidades sedentarias densamente pobladas (Daniel, T. M., 2000; Gómez i Prat y Mendonça de Souza, 2003). Factores como la diferente patogenia de las cepas europeas, o los determinantes socio-culturales explicarían el terrible impacto de la tuberculosis entre los Indios Americanos a pesar de la antigüedad de la tuberculosis en el continente.

Existen también numerosos registros a lo largo de la historia que describen manifestaciones y sintomatologías atribuibles a la tuberculosis. En los textos médicos cuneiformes de Babilonia aparecen descripciones de la tuberculosis pulmonar y de la

Introducción

meningitis tuberculosa (Wilson, J. V. K., 1996). Así mismo, en la literatura hindú (2000-1500 a.C) y China (2700 a.C.) aparecen varias referencias sobre los síntomas y características de la enfermedad (Aufderheide y Rodríguez-Martín, 1998).

Hipócrates (400 a.C.) realizó la primera descripción detallada de la tuberculosis, a la que se refirió bajo el término tisis, del griego consumirse. La destacó como la enfermedad más importante del momento y la única fatal en la mayoría de personas. Si bien relacionó su aparición y evolución con causas externas como el clima, indicaba que su origen era hereditario (The Internet Classics Archives, <http://classics.mit.edu/index.html>). Fue Aristóteles (350 a.C.) quien primero apuntó a la naturaleza contagiosa de la enfermedad, opinión mantenida también por Galeno (131-201 d.C.), uno de los médicos más importantes de la época romana, que introdujo algunos tratamientos. Durante los siguientes 1400 años no se avanzó en el conocimiento de la tuberculosis. La única causa posible de la aflicción era la intervención divina y, puesto que a los reyes franceses e ingleses se les atribuía propiedades curativas, el tratamiento más deseado para curar el “Mal de los Reyes” era ser tocados por los soberanos (Bloom y Murray, 1992). Se describió como “lupus vulgaris” la tuberculosis cutánea, y como escrófula la inflamación de los ganglios linfáticos del cuello.

La gran epidemia europea que se denominó la “Peste Blanca” se inició probablemente en el s. XVII y continuó durante los siguientes 200 años (Ruggiero, D., 2000). En Londres, en 1651, la tuberculosis era responsable de un 20 % del total de muertes, causando el fallecimiento de un 1 % de la población inglesa a finales del s. XVIII (Bloom y Murray, 1992). En París, las autopsias practicadas a principios del s. XIX indican que la tuberculosis era la responsable de una tercera parte de las muertes. Y, en Estados Unidos, desde la revolución americana hasta el s. XIX la tuberculosis causó un 20-25 % del total de muertes.

Durante este periodo se realizaron numerosos estudios anatómico-patológicos iniciados por Sylvius quien, en 1679, describió los nódulos pulmonares como tubérculos observando su evolución a cavidades (Bloom y Murray, 1992). Estos trabajos permitieron un conocimiento más detallado de la enfermedad, sin embargo, no existía un consenso en cuanto a asociar las diferentes manifestaciones patológicas a la tuberculosis, ni en cuanto a su origen contagioso. Si bien en 1546, G. Fracastoro incluyó la tisis en un trabajo sobre el contagio, la primera especulación creíble del carácter infeccioso de la tuberculosis la realizó Benjamin Marten quien, en 1722, afirmó que la

causa de la tuberculosis eran pequeños animáculos o sus semillas que se transmitían a través de la respiración de los enfermos (Bloom y Murray, 1992). En 1819, René Laënnec resumió y simplificó el conocimiento que se tenía hasta el momento de la tuberculosis, y reconoció la unidad de todas las manifestaciones de la enfermedad.

La demostración formal de la naturaleza contagiosa de la tuberculosis la realizó Jean-Antoine Villemin (1865) inoculando pus y fluidos de lesiones humanas y bovinas a conejos, que desarrollaban la enfermedad (Murray, J. F., 2004). Este hallazgo no fue reconocido por sus contemporáneos hasta que Cohnheim y Salomonsen consiguieron reproducir los experimentos contribuyendo a establecer el carácter infeccioso de la tuberculosis. Sin embargo, ninguno de ellos había sido capaz de aislar o visualizar el agente causal hasta que, en 1882, Robert Koch asombró al mundo presentando el bacilo de la tuberculosis como el agente etiológico de esta enfermedad. Para ello siguió lo que hasta nuestros días se ha conocido como los postulados de Henle-Koch: observó y aisló el bacilo de lesiones tuberculosas, lo cultivó *in vitro* y lo inoculó en animales, probando que se desarrollaba la misma enfermedad y que de las lesiones recuperaba de nuevo el bacilo de la tuberculosis (Murray, J. F., 2004).

1.1.2. El declive de la tuberculosis: 1850-1980

Ya mucho antes de demostrarse la naturaleza infecciosa de la tuberculosis su incidencia había empezado a disminuir en Europa y América gracias, probablemente, a las mejoras en las condiciones de vida y nutrición. Esta tendencia se mantendría hasta los años 1980, viéndose sólo alterada por las dos guerras mundiales. A las mejoras socioeconómicas hay que añadirle el mayor conocimiento de la enfermedad, que permitió una mejora en el diagnóstico, y la aceptación de su naturaleza infecciosa que inició los programas de control de la tuberculosis.

La falta de un tratamiento efectivo impulsó a Hermann Brehmer, en 1854, a establecer el primer sanatorio en Europa, ya que creía en los beneficios del ejercicio y la altitud para curar la tuberculosis (Ruggiero, D., 2000). Posteriormente, Edward Livingston Trudeau basándose en su propia recuperación, fundó el primer sanatorio en Estados Unidos en 1884. El número de sanatorios aumentó espectacularmente en Europa y América y, a partir de los años 1910, se implantaron los tratamientos quirúrgicos, como el neumotórax artificial (Ruggiero, D., 2000). Si bien hoy en día sabemos de la escasa eficacia de los sanatorios en cuanto al tratamiento de la

Introducción

tuberculosis, también es preciso reconocer que, como mínimo, lograban aislar a los pacientes evitando la transmisión de la enfermedad.

Los primeros intentos de encontrar una cura efectiva para la tuberculosis los realizó el propio Robert Koch quien, en 1890, anunció que un extracto del bacilo de la tuberculosis, al que denominó tuberculina, tenía propiedades terapéuticas (Kaufmann, S. H. E., 2003). Esta conclusión fue rápidamente desmentida por ensayos que mostraron la falta de eficacia del tratamiento y la existencia, en algunos casos, de reacciones secundarias severas. El mismo R. Koch pronto se dio cuenta, sin embargo, del potencial diagnóstico del extracto, opinión mantenida también por sus contemporáneos y, efectivamente, la versión moderna de la tuberculina se utiliza todavía hoy en día para el diagnóstico de la infección (Kaufmann, S. H. E., 2003). Otro avance importante para el diagnóstico y seguimiento de la tuberculosis fue el descubrimiento de los rayos X por W. K. von Roentgen en 1895, que tendrían rápidamente una implantación masiva (Ruggiero, D., 2000).

En 1908, Albert Calmette y Camille Guérin, con la intención de evitar la agregación celular de las micobacterias, cultivaron el bacilo de la tuberculosis bovino, *Mycobacterium bovis*, en un medio que contenía bilis de buey. Tras 39 pases observaron la aparición de una variante morfológica que resultó ser avirulenta y que protegía de la infección por *M. tuberculosis* en animales (Bloom y Murray, 1992). Esta variante, que se denominó bacilo de Calmette y Guérin (BCG), se utilizó tras 231 pases en ensayos clínicos (1921-1927) que mostraron que protegía de la tuberculosis en niños. Durante los años 1930 se realizaron diversos ensayos que probaron la seguridad de la vacuna administrada intradérmicamente, extendiéndose su uso de forma masiva tras la Segunda Guerra Mundial (Andersen y Doherty, 2005). Hoy en día, la BCG es todavía la vacuna más ampliamente utilizada a nivel mundial aunque, como se comentará más adelante, su eficacia es motivo de controversia (ver apartado 1.5.1).

Finalmente, en medio de la Segunda Guerra Mundial, llegó el triunfo más importante sobre la tuberculosis: la quimioterapia. Ya hacía años que se usaban la penicilina y las sulfonamidas para el tratamiento de otras enfermedades infecciosas, pero estos antibióticos no presentaban actividad frente a *M. tuberculosis*. Hubo que esperar hasta 1943 para que Schatz y Walkman probaran que la estreptomycin, aislada de *Streptomyces griseus*, inhibía el crecimiento de *M. tuberculosis*. Inmediatamente se realizaron pruebas en cobayas y en 1944 se administró por primera vez a una paciente

que se hallaba en estado crítico y que se curó de forma sorprendente (Daniel, T. M., 2005). Los tratamientos generalizados se iniciaron en 1947 y en unos pocos meses se detectaron los primeros mutantes resistentes a la estreptomina. Por suerte, casi de forma simultánea, Jorgen Lehman describió el ácido *p*-aminosalicílico y, en 1952, los laboratorios Squibb, Roche y Bayer informaron sobre la eficacia de la isoniazida, aislada ya en 1912. Estos descubrimientos fueron muy importantes porque permitieron establecer una terapia múltiple eficaz contra las cepas resistentes a alguno de los antibióticos. Posteriormente, se introdujeron el resto de antibióticos usados hoy en día para el tratamiento de la tuberculosis: cicloserina (1955), kanamicina (1957), rifampicina (1965), etionamida (1966), etambutol (1968) y pirazinamida (1970). Finalmente en los años 1970, tras varios estudios y ensayos clínicos realizados por el *British Medical Research Council*, se implantó la actual terapia de corta duración (Duncan, K., 2003)

El establecimiento de la quimioterapia hizo que muchos sanatorios cerraran y que otros modificaran su enfoque terapéutico. El continuo declive de la morbilidad de la tuberculosis hizo que se perdiera el interés por esta enfermedad, deteniéndose los programas de control de la tuberculosis y cerrándose los centros y unidades de tuberculosis incluyendo los del *British Medical Research Council* y los de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

1.1.3. La reemergencia de la tuberculosis

A pesar del optimismo generalizado en los países desarrollados, que creían que la vacunación masiva y la quimioterapia permitirían eliminar la tuberculosis, en 1984 el número de casos notificados en EEUU no disminuyó al mismo ritmo que en años anteriores, y rápidamente se invirtió la tendencia incrementándose cada año el número de notificaciones (Raviglione, M. C., 2003). Esto hizo saltar la alarma a nivel mundial, observándose que se estaba produciendo también un estancamiento en el descenso de notificaciones en muchos países europeos y un incremento en otros, principalmente en la Europa del Este. En los países en vías de desarrollo las primeras estimaciones, realizadas a principios de los 1990, mostraron que las notificaciones de tuberculosis se habían doblado o incluso triplicado en algunos países africanos en tan sólo 10 años. A nivel mundial, la OMS estimó que en 1990 se habían producido 8 millones de nuevos casos de tuberculosis y 2,9 millones de muertes, de las cuales el 95% ocurrían en los

Introducción

países subdesarrollados (Raviglione, M. C., 2003). Esta situación obligó a la OMS, en 1993, a declarar la tuberculosis una emergencia de salud pública global.

Sin duda la epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) fue la principal causa de la reemergencia de la tuberculosis. El estado inmunodeprimido de los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) da lugar a un aumento tanto en la probabilidad de desarrollar tuberculosis en caso de infección, como en la mortalidad asociada a la enfermedad, produciendo un fatal efecto en la morbilidad de la tuberculosis (Godfrey-Faussett y Ayles, 2003).

Así mismo, los primeros estudios fiables realizados a mediados de los 1990 pusieron de manifiesto el problema de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes y multirresistentes a fármacos (MDR-TB, *Multidrug Resistant-Tuberculosis*) (Espinal, M. A., 2003). Esta circunstancia dificulta el tratamiento de la tuberculosis, aumentando el periodo contagioso y la mortalidad asociada a la enfermedad.

Además, la situación global de la tuberculosis ponía en evidencia la falta de eficacia de la vacuna BCG, de aplicación generalizada durante muchos años.

Estos factores, importantes en la reemergencia de la tuberculosis, hay que enmarcarlos en un contexto social en el que el incremento de la inmigración y de la pobreza en las grandes ciudades favoreció un aumento en la transmisión y el desarrollo de la enfermedad. Aún así, estos determinantes no habrían tenido un efecto tan importante de haber existido unos programas de control de la tuberculosis adecuados, a nivel local y sobre todo global. Como consecuencia de este fallo en los sistemas de control muchos casos de tuberculosis no se diagnosticaban y, de los diagnosticados, muchos no recibían un tratamiento adecuado produciéndose reactivaciones y la aparición de cepas resistentes y MDR-TB. El resultado final fue el incremento en la transmisión, y por lo tanto en la incidencia de la tuberculosis, y en la mortalidad asociada a la enfermedad (Bloom y Murray, 1992).

La respuesta a esta preocupante situación se inició en los años 1994-1995 con la implementación de la estrategia conocida como DOTS (*Directly Observed Therapy, Short-Course*, terapia de corta duración observada directamente). Esta estrategia consta de 5 elementos encaminados a incrementar la detección de nuevos casos; implementar una terapia estandarizada y controlada que permita aumentar la tasa de curación; garantizar un sistema de suministro de antibióticos; y hacer un seguimiento

documentado de todos los casos, que permita conocer la situación de la enfermedad y el resultado de los tratamientos (Raviglione, M. C., 2003). En el año 1999, se estableció la estrategia conocida como “DOTS-Plus” para estudiar la viabilidad de proyectos para controlar las MDR-TB en países pobres en recursos. Y también se impulsaron programas para coordinar el control de la tuberculosis con el del SIDA (Raviglione, M. C., 2003).

Estos esfuerzos están empezando a dar sus primeros resultados. Aunque globalmente la incidencia de la tuberculosis sigue creciendo, la tasa de incremento se ha ido reduciendo siendo de sólo un 0,6% en 2004 (WHO, 2006a). Esta tendencia refleja el impacto que ha tenido la implantación de la DOTS aplicada ya en 182 países en 2005, cubriendo un 77% de la población mundial (Sharma y Liu, 2006). A pesar de estas mejoras, en 2004 se estimó que se habían producido 8,9 millones de nuevos casos y que la tuberculosis había causado 1,7 millones de muertes a nivel mundial (WHO, 2006a). Por lo tanto, es preciso todavía un gran esfuerzo para controlar la enfermedad, sobre todo en la región africana y en la Europa del Este, principales responsables del incremento en la incidencia global de la tuberculosis. En 2006, la OMS ha lanzado la nueva *Stop TB Strategy* que, basándose en la DOTS, pretende además reforzar los sistemas sanitarios, mejorando los servicios y aumentando los recursos humanos, así como prestar una atención especial a la coinfección con el VIH y a las cepas MDR-TB, y promover la investigación para el desarrollo de nuevos fármacos, pruebas de diagnósticos y vacunas (WHO, 2006a).

1.2. Infección y enfermedad

Aunque una tercera parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* (WHO, 2006a), sólo en un 5% ó 10% de los casos se desarrolla la enfermedad, ya sea en el primer o segundo año tras la infección (tuberculosis primaria) o por reactivación de la infección a lo largo de la vida (tuberculosis posprimaria) (Fig. 1.1). En el resto de casos la infección permanece latente toda la vida.

Cuando se desarrolla tuberculosis activa, la localización de la enfermedad, la severidad, y el desenlace son muy variables. En un 85% de los casos la tuberculosis se limita a los pulmones, con manifestaciones que pueden variar desde una infiltración leve hasta enfermedad severa, destructiva y crónica (Hopewell y Jasmer, 2005). Mientras que, en aproximadamente un 15% de los casos, la tuberculosis es

Introducción

extrapulmonar pudiéndose desarrollar en cualquier parte del cuerpo. Las formas extrapulmonares más frecuentes son la linfática y pleural, seguidas de la genitourinaria, y la miliar, una de las formas más graves caracterizada por la diseminación hematológica de grandes cantidades de bacterias por todo el cuerpo (Hopewell y Jasmer, 2005).

Este cuadro difiere mucho en las personas coinfectadas con el VIH, ya que su estado inmunodeprimido supone un aumento tanto en la probabilidad de desarrollar una tuberculosis activa en los casos de nueva infección, como en la tasa de reactivación de infecciones latentes (Godfrey-Faussett y Ayles, 2003). Así, si el riesgo de que una persona inmunocompetente desarrolle tuberculosis activa durante su vida es del 5% al 10%, en el caso de una persona coinfectada con el VIH el riesgo anual puede exceder el 10%. La mortalidad por tuberculosis es también más alta en los individuos VIH-positivos ya que en muchos casos se producen tuberculosis extrapulmonares de más difícil diagnóstico y peor pronóstico.

Las diferentes manifestaciones de la infección por *M. tuberculosis* reflejan el balance entre el bacilo y la respuesta inmune del huésped siendo esta última determinante en el desenlace de la infección. Además del diferente grado y tipo de patogenia de la cepa de *M. tuberculosis*, existen varios factores de riesgo del huésped que favorecen el desarrollo de la enfermedad como la malnutrición, el alcoholismo, tratamientos inmunosupresores o la edad. También se han identificado algunos desórdenes genéticos que predisponen a la tuberculosis como alteraciones en las vías de señalización del interferón- γ (IFN- γ) o la interleucina 12 (IL-12), polimorfismos en el gen *NRAMP1*, o mutaciones en el receptor de la vitamina D (Fernando y Britton, 2006).

La infección ocurre por inhalación de partículas con *M. tuberculosis* producidas por un enfermo con tuberculosis activa al toser, hablar o estornudar (Fig. 1.1). Se estima que son suficientes entre 1 y 10 bacilos para producir la infección (Bloom y Murray, 1992). Los bacilos que logran llegar a los alvéolos son fagocitados por los macrófagos residentes y por las células dendríticas. En la mayoría de personas expuestas a *M. tuberculosis* la inmunidad innata es capaz de evitar la infección (Flynn, J. L., 2004). Sin embargo, en muchos casos, los macrófagos alveolares, los monocitos reclutados de la corriente sanguínea y las células dendríticas son incapaces de contener la infección. *M. tuberculosis* sobrevive y se multiplica en el interior de estas células, diseminándose a los nódulos linfáticos pulmonares y, eventualmente, a otras localizaciones (Fig. 1.1). Esto expone al sistema inmune a cantidades crecientes de antígenos micobacterianos

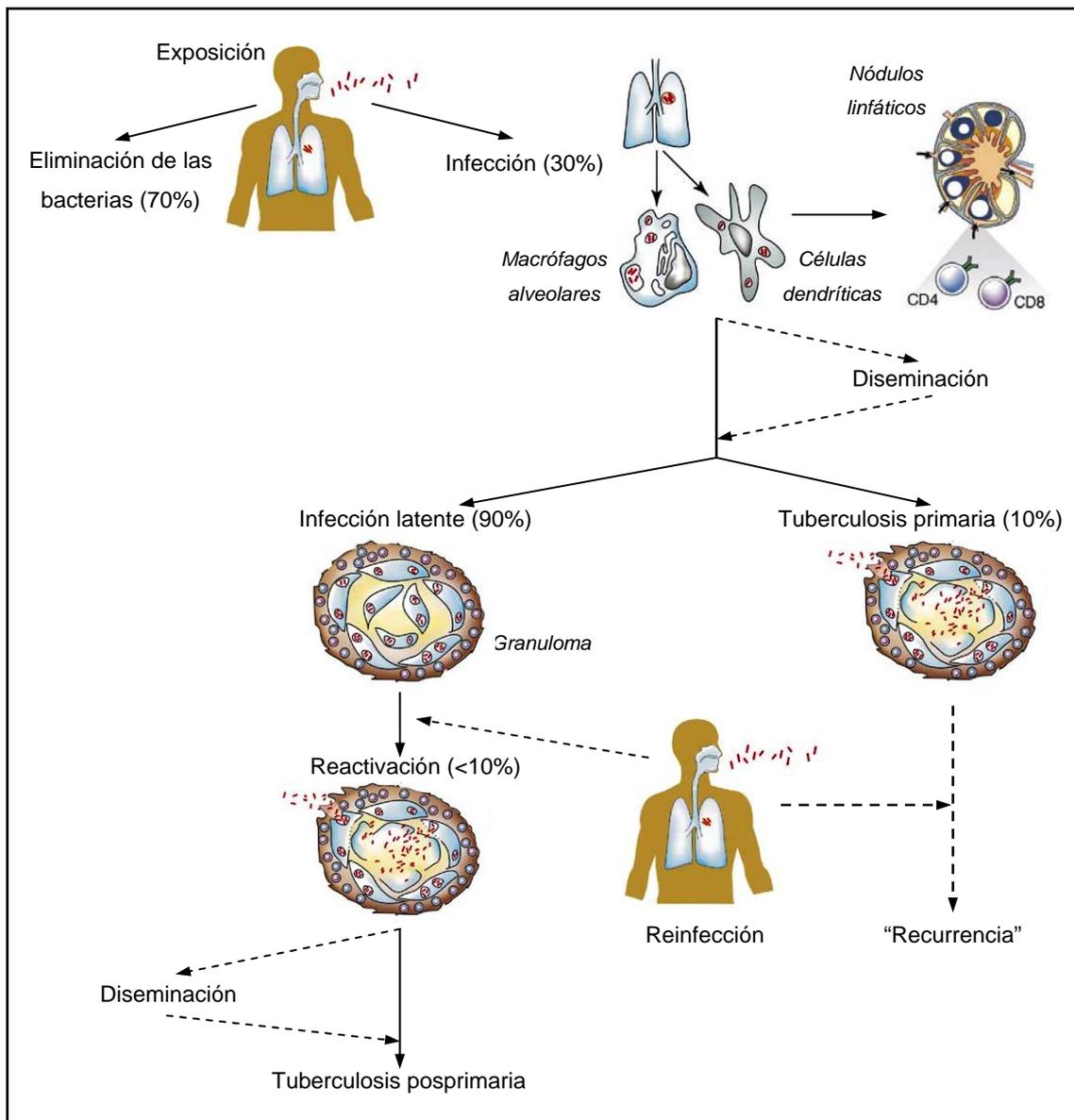


Figura 1.1 Curso de la infección por *M. tuberculosis*. Adaptado de Sharma, S. K, 2005, y Eddine *et al.*, 2006.

desarrollándose la respuesta inmune adquirida. La manifestación patológica de esta respuesta son los granulomas, agregados de células inmunes que rodean el foco de infección y que se pueden desarrollar en cualquier tejido infectado (Cosma *et al.*, 2003).

Inicialmente los granulomas están formados por macrófagos infectados, fagocitos mononucleares inmaduros y linfocitos efectores que activan los macrófagos e intervienen también en la eliminación de las bacterias y de las células infectadas (Zahrt, T. C., 2003). Posteriormente, los macrófagos se diferencian en células epitelioides y se fusionan formando células gigantes multinucleadas. En algunos granulomas se constituye además un área necrótica central (caseificación) que contiene restos

Introducción

acelulares y, en ocasiones, bacterias extracelulares. Finalmente, los granulomas pueden evolucionar mediante fibrosis y calcificación del tejido adyacente, en lesiones que rara vez contienen bacilos viables.

En la mayoría de los casos estas estructuras consiguen controlar el crecimiento del bacilo y evitar su diseminación. Aún así, el hecho de que se pueda producir una reactivación muestra que el sistema inmune es incapaz de erradicar la infección. La localización y el estado metabólico del bacilo en las personas con infección latente no están del todo claros (Orme, I., 2001). El microorganismo podría encontrarse en un estado durmiente no replicativo, o replicándose activamente pero siendo eliminado por la respuesta inmune, o metabólicamente alterado con ciclos replicativos limitados o infrecuentes (Flynn y Chan, 2001).

En aquellos individuos en que se desarrolla tuberculosis activa, ya sea primaria o posprimaria, la inmunidad celular es incapaz de contener la multiplicación del bacilo que infecta nuevos macrófagos e invade el parénquima circundante, produciéndose la destrucción tisular como consecuencia de la respuesta inflamatoria (Fig. 1.1). La diseminación puede ocurrir pronto tras la infección, por vía linfática o hematógena, o bien por licuefacción y rotura del granuloma vaciándose el contenido en el interior de vasos sanguíneos (diseminación hematógena). Si la cavitación del granuloma se produce en el interior de los bronquios (diseminación broncógena), el bacilo se puede transmitir a otros individuos mediante los aerosoles producidos por el enfermo.

1.3. Diagnóstico

1.3.1. Infección latente

El carácter crónico de la infección por *M. tuberculosis* supone un enorme reservorio de posibles enfermos futuros. Por ello, el diagnóstico y tratamiento de la infección son un punto clave en la estrategia de control de la tuberculosis, especialmente en los casos de contagio reciente y en los grupos de riesgo (niños, VIH-positivos, etc.).

Hasta hace poco, la única herramienta de que se disponía para la detección de la infección latente era la prueba cutánea de la tuberculina, en la que se mide la respuesta de hipersensibilidad retardada frente a la PPD (*Purified Protein Derivative*: derivado proteico purificado), una versión moderna de la tuberculina de R. Koch. El diámetro de la induración formada en el lugar de aplicación sirve para estimar la probabilidad de

infección, que depende de los factores de riesgo del individuo y de su estado inmunológico.

Los muchos años de experiencia han mostrado la utilidad clínica de la prueba de la tuberculina en la predicción del desarrollo de tuberculosis activa. Pero también han puesto de manifiesto sus limitaciones en cuanto a la baja sensibilidad en personas inmunodeprimidas y en niños, la inespecificidad frente a *M. bovis* BCG y otras micobacterias por reacción cruzada de antígenos, la falta de reproducibilidad y la inestabilidad de la reacción en el tiempo (Whalen, C. C., 2005). Aún así, el bajo coste y la independencia de un laboratorio han hecho que esta prueba haya sido ampliamente utilizada y que se mantenga aún como la principal herramienta de diagnóstico de la infección latente. Actualmente, se están llevando a cabo investigaciones para identificar nuevos antígenos que, solos o en combinación, puedan utilizarse en una prueba cutánea con sensibilidad y especificidad mejoradas (Laal y Skeiky, 2005).

Como alternativa a la prueba de la tuberculina, se ha desarrollado una nueva generación de pruebas de diagnóstico que se basan en la producción de IFN- γ por parte de las células T en respuesta a antígenos de *M. tuberculosis*. Inicialmente, se usó como antígeno la PPD pero, actualmente, se utilizan antígenos más específicos de *M. tuberculosis*, lo que permite obviar los problemas de especificidad de la prueba de la tuberculina, con una sensibilidad comparable y prometedora en individuos inmunodeprimidos (Pai *et al.*, 2006a). Otras ventajas de este tipo de pruebas son la objetividad en la obtención del resultado, la rapidez, que se requiere una única visita del paciente, y la posibilidad de repetir el ensayo sin que se produzca efecto recuerdo. Actualmente se están realizando investigaciones para mejorar la sensibilidad mediante la incorporación de nuevos antígenos, y para reducir el coste y mejorar el formato para su uso en países con pocos recursos (Pai *et al.*, 2006a).

1.3.2. Tuberculosis activa

El principal obstáculo en el control de la tuberculosis sigue siendo la detección de los nuevos casos para poder iniciar rápidamente el tratamiento. Este problema, especialmente importante en los países en vías de desarrollo, se debe tanto a causas socioeconómicas que impiden el adecuado establecimiento de las técnicas de diagnóstico y el acceso de los enfermos a los sistemas de salud, como a la falta de técnicas de diagnóstico asequibles, rápidas y precisas.

Introducción

La diversidad en las manifestaciones clínicas de la tuberculosis se traduce también en una gran variedad de síntomas, a menudo sistémicos e inespecíficos, que dificultan mucho el diagnóstico clínico. Los síntomas generales incluyen debilidad, anorexia, pérdida de peso, malestar y fiebre; pudiéndose producir otros en función del órgano involucrado (Hopewell y Jasmer, 2005). Aunque en muchos casos se observan alteraciones mediante radiografía o tomografía, a menudo no son específicas de la tuberculosis por lo que se requiere detectar el bacilo para confirmar el diagnóstico.

En los países desarrollados, los pasos que se siguen en el diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis son: examen microscópico, cultivo, identificación de *M. tuberculosis* y análisis de la susceptibilidad a los fármacos (Heifets y Desmond, 2005). Sin embargo, en los países en vías de desarrollo el diagnóstico de laboratorio se limita, en los casos en que exista, al examen microscópico de frotis de esputo. La importancia del examen microscópico radica en que permite identificar los casos más contagiosos, ya que sólo aquellos pacientes con tuberculosis pulmonar productiva presentan un resultado frotis-positivo (Heifets y Desmond, 2005). Para la identificación de las micobacterias se utiliza la tinción ácido-alcohol resistente, basada en la capacidad de estas bacterias de retener un colorante tras el tratamiento con una solución ácido-alcohólica. El procedimiento clásico utilizado es la tinción de Ziehl-Neelsen, sustituida en los países desarrollados por la tinción fluorescente con auramina. Aunque es una técnica rápida y específica que únicamente precisa de un microscopio, su límite de detección es de 10^3 - 10^4 bacilos por mL de esputo (Heifets y Desmond, 2005).

El cultivo como herramienta de diagnóstico, aunque mucho más sensible que el examen microscópico e imprescindible en los pacientes paucibacilares (tuberculosis frotis-negativa, extrapulmonar y pediátrica), presenta el inconveniente del lento crecimiento de *M. tuberculosis* retrasando el diagnóstico en 4 ó 6 semanas. El sistema BACTEC (Beckton Dickinson) supuso un gran avance en este sentido ya que permite la detección radiométrica del crecimiento en medio líquido, en tan sólo 1 ó 2 semanas (Heifets y Desmond, 2005). Posteriormente, se han ido desarrollando sistemas alternativos que utilizan sensores colorimétricos o fluorescentes, y sistemas no automatizados que reducen la necesidad de equipamiento (Heifets y Desmond, 2005). Actualmente, el cultivo en medio líquido es el método diagnóstico más sensible de que se dispone, pero su coste y la necesidad de infraestructura limitan su uso en países pobres en recursos.

La necesidad de un diagnóstico rápido ha impulsado el desarrollo de otras pruebas para detectar *M. tuberculosis* directamente en las muestras clínicas. Existen varios ensayos comerciales basados en la amplificación de ácidos nucleicos. Estos ensayos, en general, presentan una elevada especificidad, pero la sensibilidad es baja y variable por lo que no pueden sustituir los métodos convencionales de microscopía y cultivo (Nahid *et al.*, 2006). Otros inconvenientes son el coste y que se requiere un laboratorio con la tecnología adecuada, por lo que las investigaciones actuales están dirigidas a aumentar la sensibilidad y a simplificar los protocolos (Pai *et al.*, 2006b). Otra aproximación para acelerar el diagnóstico consiste en la utilización de micobacteriófagos que, tras infectar *M. tuberculosis*, son detectados por amplificación y formación de calvas en *M. smegmatis*, o por la luz producida por la luciferasa incorporada en los fagos (Kalantri *et al.*, 2005). En general este tipo de pruebas son rápidas (2 ó 3 días), relativamente fáciles de realizar y específicas, pero son poco y variablemente sensibles y requieren de un laboratorio con infraestructura similar a la necesaria para realizar cultivos (Kalantri *et al.*, 2005).

Otro campo que ha recibido también gran atención ha sido el de las pruebas inmunológicas. Existen docenas de ensayos comerciales, dirigidos mayormente a la detección de anticuerpos frente a *M. tuberculosis*, aunque ninguno es lo suficientemente preciso como para sustituir la microscopía o el cultivo (Laal y Skeiky, 2005). El uso de antígenos purificados, en lugar de fracciones totales, ha permitido aumentar la especificidad de los ensayos, pero como los antígenos reconocidos en las diferentes formas y fases de la enfermedad son distintos, al limitar el número de antígenos se reduce también la sensibilidad. El uso de proteínas recombinantes, incorrectamente plegadas o sin modificaciones postraduccionales, contribuye también a la baja sensibilidad de estas pruebas (Laal y Skeiky, 2005). Los estudios actuales se dirigen a la identificación de nuevos antígenos, expresados *in vivo* por *M. tuberculosis* en las diferentes fases de la enfermedad, y a la mejora de los sistemas de producción de proteínas recombinantes (Laal y Skeiky, 2005).

1.3.3. Ensayos de susceptibilidad a fármacos

La creciente prevalencia de MDR-TB requiere el análisis de las posibles resistencias en los aislados clínicos para poder detectar y tratar adecuadamente los casos de MDR-TB, previniendo así la propagación de estas cepas. Si bien el análisis sistemático no es factible en países pobres en recursos, es imprescindible realizar los

Introducción

ensayos en pacientes con un riesgo elevado de resistencia, como aquéllos tratados sin éxito, con recurrencia tras abandonar el tratamiento, o en contacto con MDR-TB (WHO, 2006b).

Las pruebas de susceptibilidad a fármacos pueden ser fenotípicas, si se analiza el crecimiento en presencia de antibióticos; o genotípicas, mediante la detección de mutaciones. Además, pueden ser directas si se realizan sobre la muestra clínica, o indirectas si se utiliza un cultivo. Aunque el método directo es más rápido, si el resultado no es válido se debe repetir la prueba usando el método indirecto.

Los métodos fenotípicos clásicos implican el cultivo de *M. tuberculosis* en presencia de los fármacos, bajo condiciones estándares, y se pueden realizar en cualquiera de los medios utilizados en el diagnóstico. El tipo de medio escogido dependerá de cuestiones económicas y determinará el tiempo que se tarde en obtener el resultado (Heifets y Desmond, 2005). Otras pruebas fenotípicas desarrolladas para acelerar el análisis de la susceptibilidad a fármacos utilizan indicadores redox para detectar el crecimiento en microplacas tras 5 ó 7 días de incubación (Heifets y Desmond, 2005). O bien realizan el seguimiento mediante observación microscópica del crecimiento en forma de cuerdas, característico de *M. tuberculosis* (Pai *et al.*, 2006b). Este último método ha dado muy buenos resultados, permite analizar la susceptibilidad a fármacos en tan sólo 8 días y sólo requiere de un microscopio. También se han adaptado las pruebas basadas en micobacteriófagos mediante el tratamiento del cultivo inicial de *M. tuberculosis* con antibióticos. El proceso global se completa en 12 días y los resultados son similares a los obtenidos con los métodos clásicos (Heifets y Desmond, 2005). Actualmente se están mejorando estas pruebas para poderlas realizar directamente sobre la muestra clínica.

Los métodos genotípicos se basan en la detección de las mutaciones asociadas a las resistencias a antibióticos. Existen muchos y diferentes ensayos basados en la amplificación por PCR de la región de interés y el posterior análisis, por diferentes métodos, de la secuencia amplificada (Forbes *et al.*, 2005). Algunas pruebas permiten identificar *M. tuberculosis* y, simultáneamente, mutaciones asociadas con resistencia. Las ventajas de este tipo de métodos son la rapidez, la elevada reproducibilidad (especialmente en los casos de baja resistencia) y que se pueden usar cultivos poco crecidos o mixtos. El inconveniente que presentan, a parte del coste y el equipamiento necesario, es que existen diferentes mutaciones asociadas a una misma resistencia y no

todas se conocen y, además, la presencia de la mutación no siempre implica resistencia. Por lo tanto, la utilidad de estas pruebas de momento es limitada (Forbes *et al.*, 2005).

1.4. Tratamiento

1.4.1. Principios de la terapia múltiple

El tratamiento de la tuberculosis se divide en una fase inicial o intensiva y una fase de continuación. Durante los 2 meses de la fase inicial se administran conjuntamente isoniazida, pirazinamida, rifampicina y etambutol. La finalidad de esta terapia múltiple es prevenir la aparición de resistencias, eliminar tanto las bacterias que se están replicando activamente en las cavitaciones (isoniazida) como aquellas que se encuentran en lesiones cerradas con condiciones ácidas (pirazinamida), y evitar recurrencias eliminando las bacterias persistentes (rifampicina) (Onyebujoh *et al.*, 2005). En la fase de continuación se administra rifampicina e isoniazida para eliminar las bacterias resistentes a la rifampicina. Esta fase dura 4 ó 7 meses dependiendo del éxito de la fase inicial, el cual se determina por el resultado del cultivo tras los dos primeros meses de tratamiento (Onyebujoh *et al.*, 2005).

A pesar de la efectividad y rentabilidad de este tratamiento, la larga duración del mismo y el hecho de que a las pocas semanas remitan los síntomas hacen que muchos pacientes lo abandonen. El fracaso en el tratamiento de la tuberculosis no sólo tiene implicaciones individuales si no que supone también un problema social ya que implica una prolongación en la transmisión y la aparición de cepas resistentes. Por ello, es responsabilidad de los sistemas de salud pública prescribir el tratamiento adecuado y garantizar el cumplimiento del mismo, suministrando los fármacos directamente al paciente y observando como los toma bajo lo que se conoce como tratamiento observado directamente o DOT (*Directly Observed Treatment*) (Onyebujoh *et al.*, 2005).

1.4.2. Tratamiento de la infección latente

Si se cumple correctamente el tratamiento de la infección, la probabilidad de desarrollar tuberculosis se reduce en un 75% (Whalen, C. C., 2005). La terapia consiste en isoniazida administrada durante 6 ó 9 meses; o rifampicina durante 4 meses si se sospecha que la cepa puede ser resistente a la isoniazida, aunque la efectividad de este tratamiento no se ha estudiado en profundidad (Blumberg *et al.*, 2005).

1.4.3. Tratamiento en personas VIH-positivas

El tratamiento de la tuberculosis y de la infección en personas coinfectadas con el VIH es similar al descrito anteriormente (Blumberg *et al.*, 2005). Sin embargo, la coinfección con el VIH afecta negativamente el resultado del tratamiento, aumentando tanto la tasa de fatalidad como de recurrencias. Este efecto se puede mitigar administrando la terapia antirretroviral aunque su aplicación es compleja como consecuencia de los efectos tóxicos y la interacción de ambos tipos de fármacos, y de la aparición del síndrome de reconstitución inmune que puede exacerbar los síntomas y lesiones de la tuberculosis (Harries *et al.*, 2006).

Un problema importante es la interacción entre fármacos. Los inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleosídicos y los inhibidores de proteasa utilizados en la terapia antirretroviral son metabolizados por el sistema de citocromos P450 3A (CYP3A) del hígado. La rifampicina es un potente inductor de estas enzimas por lo que no se debería utilizar conjuntamente con estos fármacos (Harries *et al.*, 2006). La rifabutina, un derivado de la rifampicina desarrollado en los últimos años, induce niveles de CYP3A más bajos, sin embargo, su elevado precio limita todavía su uso.

1.4.4. Cepas resistentes y multirresistentes

Las cepas resistentes a un único fármaco son comunes, pero se ha comprobado que los pacientes responden bien a la terapia estándar (Onyebujoh *et al.*, 2005). En cambio, los casos de MDR-TB (definidos como resistentes al menos a la isoniazida y la rifampicina) son mucho más difíciles de tratar, con terapias de 2 años de duración basadas en fármacos más tóxicos, más caros y menos activos que los fármacos de primera línea. Aunque existen unas recomendaciones generales para el tratamiento de las MDR-TB, el régimen adoptado depende de cada caso. El tratamiento debería decidirse por o en contacto con expertos en MDR-TB y requiere un seguimiento continuado de la respuesta del paciente (WHO, 2006b).

1.4.5. Nuevos fármacos

El tratamiento de la tuberculosis, aunque efectivo, requiere notables mejoras para reducir su duración y evitar las interacciones con otros fármacos, especialmente con los antirretrovirales. Así mismo, se precisan nuevos antibióticos capaces de combatir de un modo sencillo y eficaz las MDR-TB. Esta necesidad ha impulsado numerosos estudios en los últimos años, fruto de colaboraciones públicas y privadas,

que han resultado en más de 26 compuestos nuevos con al menos 11 en fases avanzadas de los ensayos preclínicos y clínicos (Tabla 1.1).

Las estrategias que se están utilizando en el desarrollo de nuevos fármacos incluyen el análisis de librerías de compuestos químicos y de antibióticos, la modificación de compuestos conocidos para mejorar su actividad y/o farmacocinética, y el diseño de nuevos compuestos dirigidos a dianas específicas identificadas como indispensables para el crecimiento de *M. tuberculosis* (Onyebujoh *et al.*, 2005). Otras aproximaciones estarían dirigidas a aumentar la permeabilidad de la pared celular, a resensibilizar las bacterias resistentes, y a modular la respuesta inmune.

Tabla 1.1. Principales fármacos para el tratamiento de la tuberculosis en desarrollo clínico (Onyebujoh *et al.*, 2005; Spigelman y Gillespie, 2006; Andries *et al.*, 2005).

Compuesto	Descripción	Actividad
<u>Fluoroquinolonas</u> Moxifloxacino, gatifloxacino, levofloxacino	- Derivados sintéticos del ácido nalidíxico. - Inhiben la DNA girasa.	- Se utilizan en el tratamiento de MDR-TB. - No interaccionan con los antirretrovirales. - Reducción del tratamiento por sustitución del etambutol o la isoniazida.
<u>Rifamicinas</u> Rifabutina, rifapentina, rifalazil.	- Derivados de la rifampicina con mayor vida media.	- No son útiles para tratar MDR-TB. - Inductores del sistema CYP3A, aunque la rifabutina en menor nivel. - Utilidad en regímenes discontinuos.
<u>Diarilquinolonas</u> R207910 (TMC207 o J)	- Descubiertas de una librería de compuestos químicos. - Actúan sobre ATP sintasa. - Larga vida media.	- Elevada actividad <i>in vitro</i> , incluyendo MDR-TB. Específicas para micobacterias. - Resultados preclínicos prometedores en reducción del tratamiento. - Completados con éxito los ensayos en fase I.
<u>Nitroimidazopirano</u> PA-824	- Afecta a la síntesis proteica y a la síntesis de ácidos grasos de la pared celular.	- Actividad bactericida y esterilizante en ratón frente a cepas sensibles y resistentes. - Activo en microaerofilia-anaerobiosis: eliminación de bacterias persistentes. - No causa inhibición significativa de los isozimas del citocromo P450. - Se han iniciado los ensayos en fase I.

También se están llevando a cabo ensayos para acortar el tratamiento de la infección latente mediante combinaciones de fármacos de primera y segunda línea (Blumberg *et al.*, 2005), o complementando la quimioterapia con inmunoterapia para estimular una respuesta inmune capaz de eliminar las bacterias persistentes. Esta estrategia ha sido seguida, entre otros, por Cardona y colaboradores que han

Introducción

desarrollado una vacuna terapéutica formada por fragmentos detoxificados de *M. tuberculosis* incluidos en liposomas (Cardona, P-J, 2006). Esta vacuna se administraría en 2 dosis tras 4 semanas de quimioterapia con isoniazida. Los resultados obtenidos en animales son muy positivos y en breve se iniciarán los ensayos clínicos.

A pesar de estos esperanzadores progresos en el desarrollo de nuevos fármacos se requieren muchos ensayos para determinar el tratamiento óptimo, tanto por lo que se refiere a la duración del mismo como a la combinación óptima de fármacos (Spigelman y Gillespie, 2006). Son por lo tanto necesarias nuevas técnicas y protocolos, y una inversión importante en infraestructuras y en recursos humanos, para poder aprovechar a la práctica los avances conseguidos en los últimos años (Spigelman y Gillespie, 2006).

1.5. Prevención

1.5.1. BCG

La única vacuna profiláctica de que se dispone para prevenir la tuberculosis sigue siendo la BCG. Desde sus inicios la eficacia de esta vacuna ha sido motivo de controversia y han sido muchos los ensayos realizados para analizar su funcionamiento. Las principales conclusiones que se derivan de estos estudios son que la vacunación infantil confiere protección frente a las formas pediátricas más severas, pero no evita la infección por *M. tuberculosis* (sólo controla la multiplicación inicial) y la protección disminuye a los 10-20 años de edad (WHO, 2004). Los resultados de protección frente a la tuberculosis pulmonar en adultos varían según las regiones. En general confiere cierta protección en adultos PPD negativos, pero no en individuos PPD positivos ya sea por vacunación previa, por infección latente o por sensibilización con micobacterias ambientales (WHO, 2004).

Teniendo en cuenta estas observaciones y que es una vacuna económica y relativamente segura (sólo se han descrito reacciones adversas en personas inmunodeprimidas), la OMS recomienda la vacunación en niños de áreas donde la tuberculosis es endémica. Mientras que, en zonas con baja incidencia de tuberculosis y con sistemas de control adecuados, es decisión de cada país utilizarla de forma generalizada o selectivamente en grupos de alto riesgo (WHO, 2004). Hasta el momento más de 3 mil millones de personas han recibido la BCG y cada año se vacunan más de 100 millones de niños (WHO, 2004).

En los últimos años diversos estudios han intentado esclarecer las causas de la baja y variable eficacia de la BCG. Así, se ha comprobado que existen distintas cepas vacunales que difieren, entre sí y con la cepa ancestral, genética y fenotípicamente (Oettinger *et al.*, 1999; Behr, M., 2002; Brosch *et al.*, 2007). Estas cepas se habrían establecido con la distribución de la cepa original a productores locales y su mantenimiento en el laboratorio. La sobreatenuación de las cepas resultantes contribuiría a explicar la baja eficacia de la vacuna, con una estimulación deficiente de las distintas poblaciones de células T, especialmente de las células T CD8 (Agger y Andersen, 2002). Sin embargo, no existen evidencias claras sobre si las diferencias entre cepas se traducen también en distintos niveles de protección (Behr, M., 2002). Actualmente, la explicación más aceptada de las discrepancias observadas en los ensayos de eficacia en adultos es la mayor sensibilización frente a micobacterias ambientales de los habitantes de zonas tropicales (Andersen y Doherty, 2005). Esta sensibilización induciría una inmunidad frente a *M. tuberculosis* similar a la conferida por la BCG, por lo que la subsiguiente vacunación no mejoraría el nivel de protección (hipótesis del enmascaramiento), o bien impediría la multiplicación de la BCG limitando la respuesta inmune frente a la vacuna (hipótesis del bloqueo) (Andersen y Doherty, 2005).

Estas observaciones son importantes y han marcado el diseño y desarrollo de las nuevas vacunas necesarias frente a la forma más prevalente de la enfermedad, la tuberculosis pulmonar en adultos, y eficientes también en individuos previamente sensibilizados.

1.5.2. Nuevas vacunas

Se están siguiendo dos aproximaciones, no excluyentes, en el desarrollo de nuevas vacunas. La primera consiste en sustituir la BCG por una vacuna capaz de conferir una protección más duradera en individuos *naive*; mientras que la segunda radica en potenciar la respuesta inmune protectora en individuos previamente vacunados.

En los últimos años se han probado centenares de candidatos en modelos animales y unos pocos han entrado, o están a punto de hacerlo, en las fases iniciales de los ensayos clínicos (Tabla 1.2). Las estrategias utilizadas en el diseño de las nuevas vacunas incluyen vacunas vivas, como mutantes atenuados de *M. tuberculosis*, cepas

Introducción

recombinantes de BCG u otras micobacterias; y vacunas de subunidades, ya sean antígenos administrados con adyuvantes, vacunas de DNA, o antígenos de *M. tuberculosis* presentados por vectores bacterianos o víricos.

Tabla 1.2. Nuevas vacunas en fases avanzadas de los ensayos preclínicos o en ensayos clínicos (Martín *et al.*, 2006; Sambandamurthy *et al.*, 2006; Eddine *et al.*, 2006).

Candidato	Descripción	Resultados	Fase de desarrollo
SO2	- <i>M. tuberculosis</i> con delección del gen <i>phoP</i> del sistema de dos componentes PhoP/R implicado en la virulencia.	- Altamente atenuada. - Induce una mayor respuesta inmune. - Mayor seguridad y protección que BCG.	- Ensayos preclínicos en primates.
mc ² 6030	- <i>M. tuberculosis</i> con sendas delecciones en <i>panCD</i> , de síntesis de pantotenato, y en RD1 (región delecionada en BCG).	- Multiplicación limitada <i>in vivo</i> . - Más segura que BCG y protección similar.	- Ensayos en fase I previstos para 2006.
rBCG30	- BCG recombinante que sobreexpresa el antígeno 85B.	- Induce una mayor respuesta inmune. - Seguridad similar que BCG y protección mayor.	- Ensayos en fase I completados en EEUU e iniciados en Sudáfrica.
rBCG ΔureC-hly+	- BCG deficiente en ureasa que expresa la listeriolisina de <i>Listeria monocitogenes</i> . - Favorece la salida de antígenos del fagosoma e induce apoptosis.	- Mayor estimulación de las células T CD8. - Más atenuada y mayor protección que BCG.	- Ensayos clínicos en fase I previstos en 2007.
MVA85A	- Virus vaccinia Ankara con el gen del antígeno 85A.	- Potencia y alarga la respuesta de BCG.	- Ensayos en fase I completados. - Ensayos en fase II iniciados.
Mtb72f	- Vacuna proteica formada por fusión de los antígenos Mtb32 y Mtb39.	- Protección similar a BCG como vacuna inicial. - Útil como vacuna de recuerdo.	- Ensayos en fase I completados.
Ag85B- ESAT-6	- Proteína de fusión. - Sustitución de ESAT-6 por TB10.4 para no interferir en las pruebas de diagnóstico.	- Protección similar a BCG como vacuna inicial. - Útil como vacuna de recuerdo.	- Se han iniciado los ensayos clínicos en fase I.

Las ventajas del uso de vacunas vivas son que contienen una gran variedad de antígenos, que persisten más tiempo en los tejidos y que son en sí mismas excelentes adyuvantes; mientras que las desventajas radican básicamente en la seguridad, sobre todo en personas inmunodeprimidas. Este tipo de vacunas serían útiles para la

sustitución de la BCG pero no como vacuna de recuerdo ya que, si la hipótesis del bloqueo es correcta, no se multiplicarían en individuos previamente sensibilizados.

Las vacunas de subunidades presentan la ventaja de ser seguras y definidas, pudiéndose dirigir más específicamente el tipo de respuesta inmune generada. Sin embargo, la eficacia de este tipo de vacunas no sólo depende de los antígenos utilizados si no también de otros factores que estimulen la respuesta inmune celular como adyuvantes (Andersen y Doherty, 2005). La importancia de las vacunas de subunidades reside en su utilidad en individuos previamente sensibilizados por lo que se están ensayando principalmente como vacunas de recuerdo (Tabla 1.2).

Teniendo en cuenta el gran reservorio de personas infectadas, además de vacunas profilácticas es importante también disponer de vacunas posinfección, capaces de impedir la reactivación y evitar la reinfección. Esta estrategia tendría un efecto más inmediato sobre la incidencia y la mortalidad de la tuberculosis. El principal problema de este tipo de vacunas es que tienen que inducir una inmunidad protectora sin exacerbar los síntomas de la infección (fenómeno de Koch). En este sentido, actualmente se está estudiando el uso de la vacuna MVA85A (Tabla 1.2) en personas infectadas por *M. tuberculosis*.

Otro aspecto importante en el desarrollo de vacunas es la identificación de marcadores de protección. Considerando el lento curso de la infección por *M. tuberculosis* y la baja incidencia de la enfermedad, los ensayos de protección deberían realizarse durante años en grupos numerosos. El uso de marcadores inmunológicos permitiría reducir la duración e identificar las mejores combinaciones de vacunas (Eddine *et al.*, 2006).

1.6. Mycobacterium tuberculosis: características generales

1.6.1. El género *Mycobacterium*

M. tuberculosis pertenece al género *Mycobacterium*, el único miembro de la familia *Mycobacteriaceae* dentro del orden *Actinomycetales* (Eutzéby, J. P., 1997). El término *Mycobacterium* fue acuñado por Lehman y Neumann en 1896 para incluir *M. leprae* y *M. tuberculosis*. Los miembros del género *Mycobacterium* son bacilos rectos o ligeramente curvados, de 0,2 μm a 0,6 μm de ancho y de 1,0 μm a 10 μm de largo (Rastogi *et al.*, 2001). Son bacterias aerobias o microaerofílicas, no formadoras de esporas, con temperaturas óptimas de crecimiento que oscilan entre los 20°C y los 50°C

Introducción

y tiempos de duplicación de 2 h a 24 h. Algunas características distintivas de las micobacterias son la resistencia a la decoloración por una solución ácido-alcohólica, la presencia de ácidos micólicos de 60-90 carbonos que se hidrolizan por pirólisis en ésteres de ácidos grasos de 22-26 carbonos, y un contenido de guanina y citosina (GC) del 62-70% (Rastogi *et al.*, 2001).

Actualmente existen más de 120 especies aceptadas dentro del género *Mycobacterium* (Eutzéby, J. P., 1997) que se dividen en función de la velocidad de crecimiento en micobacterias de crecimiento rápido, si forman colonias en medio sólido en menos de 7 días como *M. smegmatis*, y micobacterias de crecimiento lento, si requieren más de 7 días como *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Rastogi *et al.*, 2001). En base a la pigmentación, las micobacterias se clasifican en fotocromógenas, si sólo producen pigmentos en presencia de luz como *M. kansasii* y *M. marinum*; escotocromógenas, si sintetizan pigmentos incluso en la oscuridad como *M. gordonae* y *M. scrofulaceum*; y no cromógenas, si no sintetizan pigmentos como *M. avium* y *M. tuberculosis* (Rastogi *et al.*, 2001).

Desde un punto de vista ecológico las micobacterias se pueden dividir en patógenos obligados, patógenos oportunistas y saprófitos (Hartmans *et al.*, 2005). Los patógenos obligados o estrictos son aquellos que naturalmente no se multiplican fuera de un organismo vivo e incluyen patógenos humanos como *M. leprae* y *M. tuberculosis*, y patógenos animales como *M. bovis*. Entre los patógenos oportunistas o potenciales destacan las micobacterias de crecimiento lento *M. avium*, *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. scrofulaceum*, y las micobacterias de crecimiento rápido *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*. Este grupo incluye micobacterias aisladas de diferentes biotopos naturales pero que pueden causar infecciones, especialmente en personas inmunodeprimidas, y en heridas traumáticas o quirúrgicas. Las micobacterias saprófitas se han aislado de gran variedad de ambientes e incluyen unas pocas micobacterias de crecimiento lento como *M. gordonae* o *M. terrae*, y la mayoría de micobacterias de crecimiento rápido como *M. smegmatis*. Algunas de las micobacterias saprófitas se han aislado como flora acompañante en procesos patológicos en contadas ocasiones (Rastogi *et al.*, 2001). De hecho, el número de micobacterias asociadas a procesos patológicos humanos asciende ya a más de 60, lo que constituye un verdadero reto para el laboratorio clínico (Heifets y Desmond, 2005).

Las distintas especies de micobacterias tradicionalmente se han clasificado en base a la velocidad y temperatura de crecimiento, la pigmentación y morfología colonial, requerimientos culturales (oxígeno, piruvato) y la capacidad de crecer en presencia de un 5% de NaCl o de inhibidores como el *p*-nitrobenzoato o la hidroxilamina. También se utilizan características bioquímicas como las actividades ureasa, arilsulfatasa o catalasa, y propiedades específicas de los enzimas como la termorresistencia de la catalasa (Rastogi *et al.*, 2001). El número de pruebas bioquímicas necesarias para clasificar las micobacterias ha ido aumentando con el número de especies descritas por lo que, para facilitar el análisis de toda esta información, en los años 1970, se adoptó la taxonomía numérica que posibilitó la clasificación de las especies en grupos discretos.

Posteriormente, el uso de técnicas moleculares como la hibridación DNA-DNA y la secuenciación del rRNA 16S ha permitido establecer una relación filogenética más clara que coincide a grandes rasgos con los estudios de taxonomía numérica (Hartmans *et al.*, 2005). Esta filogenia separa las micobacterias en dos grandes grupos coincidentes con la clasificación en base a la velocidad de crecimiento, e indica que las micobacterias de crecimiento lento evolucionaron a partir de las de crecimiento rápido (Hartmans *et al.*, 2005).

A nivel clínico, la identificación de las micobacterias se simplifica en unas pocas pruebas bioquímicas escogidas según la velocidad de crecimiento y la pigmentación de la micobacteria aislada. Una herramienta útil en la clasificación es el análisis del patrón de ácidos micólicos y de los ésteres de pirólisis, únicos en muchas de especies. También existen pruebas comerciales basadas en sondas de rDNA o en la amplificación de ácidos nucleicos para la identificación de las principales micobacterias patógenas (Forbes *et al.*, 2005). Recientemente se ha desarrollado una base de datos y una prueba para la secuenciación del rDNA 16S que permite la identificación de hasta 80 especies de micobacterias. Otras pruebas no comerciales incluyen la amplificación y restricción de la región hipervariable del rDNA 16S o del gen *hsp65* (Forbes *et al.*, 2005).

1.6.2. El complejo *M. tuberculosis*

Los estudios de taxonomía numérica y, posteriormente, el análisis de la homología del DNA pusieron de manifiesto la elevada similitud de algunas micobacterias entre sí (Sreevatsan *et al.*, 1997), sugiriendo incluso que corresponderían

Introducción

a una única especie. Estas micobacterias se han mantenido como especies diferentes por cuestiones prácticas y en base a ciertas diferencias fenotípicas y epidemiológicas (preferencia de huésped), pero se han agrupado en complejos. Así, *M. tuberculosis* pertenece al complejo del mismo nombre que incluye, además, otras 7 especies (Tabla 1.3): *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, “*M. canettii*”, *M. caprae* (Aranaz *et al.*, 2003), y *M. pinnipedii* (Cousins *et al.*, 2003). Además de *M. tuberculosis*, son patógenos humanos “*M. canettii*”, una variante que forma colonias lisas aislada de pacientes en raras ocasiones; *M. africanum*, que causa tuberculosis en el África subsahariana; y *M. bovis*, responsable del 6% de los casos de tuberculosis en humanos antes de la introducción de la pasteurización. *M. microti* es naturalmente atenuado en humanos, por lo que se utilizó como vacuna en los 1970, pero en alguna ocasión se ha identificado como causante de enfermedad en personas inmunodeprimidas (van Sooligen, *et al.*, 1998).

Todos los miembros del complejo *M. tuberculosis* presentan tiempos de duplicación de 24 h y tardan de 3 a 6 semanas en formar colonias. Morfológicamente existen ciertas diferencias entre algunas especies (Tabla 1.3), pero el patrón de ácidos micólicos es idéntico en todas ellas. Por lo general, las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* se pueden diferenciar mediante las pruebas de producción de niacina, reducción de nitratos, susceptibilidad a la pirazinamida y susceptibilidad a la hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH) (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Diferenciación de los miembros del complejo *M. tuberculosis*. Eugónica: crecimiento abundante; disgónica: crecimiento pobre. PZA: pirazinamida, S: sensible, R: resistente. Adaptado de Cole, S. T., 2002; Aranaz *et al.*, 2003 y Cousins *et al.*, 2003.

Especie	Huéspedes	Colonias	Niacina	Nitrato	PZA	TCH
<i>M. africanum</i>	Humanos	Rugosas, disgónicas	+ / -	+ / -	S	R / S
<i>M. bovis</i>	Vacas, humanos...	Lisas, disgónicas	-	-	R	S
<i>M. bovis</i> BCG		Rugosas, eugónicas	-	-	R	S
<i>M. canetti</i>	Humanos	Muy lisas, eugónicas	+	+	S	R
<i>M. caprae</i>	Cabras, cerdos...	Lisas	-	-	S	S
<i>M. microti</i>	Ratones de campo	Pequeñas	+	-	S	S
<i>M. pinnipedii</i>	Pinnípedos	Rugosas, disgónicas	-	-	S	S
<i>M. tuberculosis</i>	Humanos	Rugosas, eugónicas	+	+	S	R

A nivel genotípico, la mayoría de pruebas de amplificación de ácidos nucleicos utilizadas en la identificación de micobacterias y en el diagnóstico de la tuberculosis no

permiten diferenciar las especies del complejo *M. tuberculosis* entre sí, ya que se basan en la secuencia del rRNA 16S y en otros loci idénticos en la mayoría de ellas. Los métodos utilizados en la identificación de los miembros del complejo *M. tuberculosis* incluyen la mayoría de los utilizados para el genotipaje de las cepas de *M. tuberculosis* como los basados en la IS6110, una secuencia de inserción presente en el genoma de estas especies en número y posición variables; el análisis de repeticiones directas y de los espaciadores del locus de repeticiones directas (*spoligotyping*); y el estudio de las secuencias repetitivas polimórficas ricas en GC (PGRS, *Polymorphic GC-rich Repetitive Sequences*). También es útil la detección de polimorfismos nucleotídicos simples en determinados genes, o el análisis de las regiones de diferencia, delecionadas en miembros del complejo respecto a *M. tuberculosis* (Fig. 1.2).

1.6.3. Evolución del complejo *M. tuberculosis*

La inusualmente elevada similitud nucleotídica entre los miembros del complejo *M. tuberculosis* (99,9% o superior) sugiere que estas especies son la progenie clonal de un único progenitor exitoso tras un cuello de botella hace unos 20 000 años (Sreevatsan *et al.*, 1997). Puesto que las tasas de transferencia y de recombinación de DNA en los miembros del complejo *M. tuberculosis* son despreciables, varios autores han usado los polimorfismos hallados en estas especies para establecer la filogenia del complejo (Brosch *et al.*, 2002; Mostowy *et al.*, 2002; Huard *et al.*, 2006). Así, a partir del ancestro común habría divergido inicialmente "*M. canettii*" y, posteriormente, dos linajes: uno del que habría derivado *M. tuberculosis* y otro del que habrían resultado *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. caprae* y, finalmente, *M. bovis* (Fig. 1.2). Como tanto "*M. canettii*" como *M. tuberculosis* causan enfermedad en humanos, estos autores concluyeron que el ancestro común habría sido también patógeno humano. Estas observaciones contradicen la hipótesis, aceptada hasta el momento, de que *M. tuberculosis* habría evolucionado de *M. bovis* con la domesticación de animales (Brosch *et al.*, 2002).

Recientemente, un estudio más completo de "*M. canettii*" y otras variantes lisas ha mostrado una notable diversidad genética en estas cepas, lo que indicaría que habrían divergido del ancestro común hace mucho tiempo (Gutiérrez *et al.*, 2005). Estos estudios muestran que la edad del ancestro del bacilo de la tuberculosis podría ser muy superior a la estimada inicialmente. Este contexto permitiría explicar la exquisita

adaptación del ciclo infeccioso de *M. tuberculosis* ya que supone una coevolución huésped-patógeno de millones de años (Brisse *et al.*, 2006).

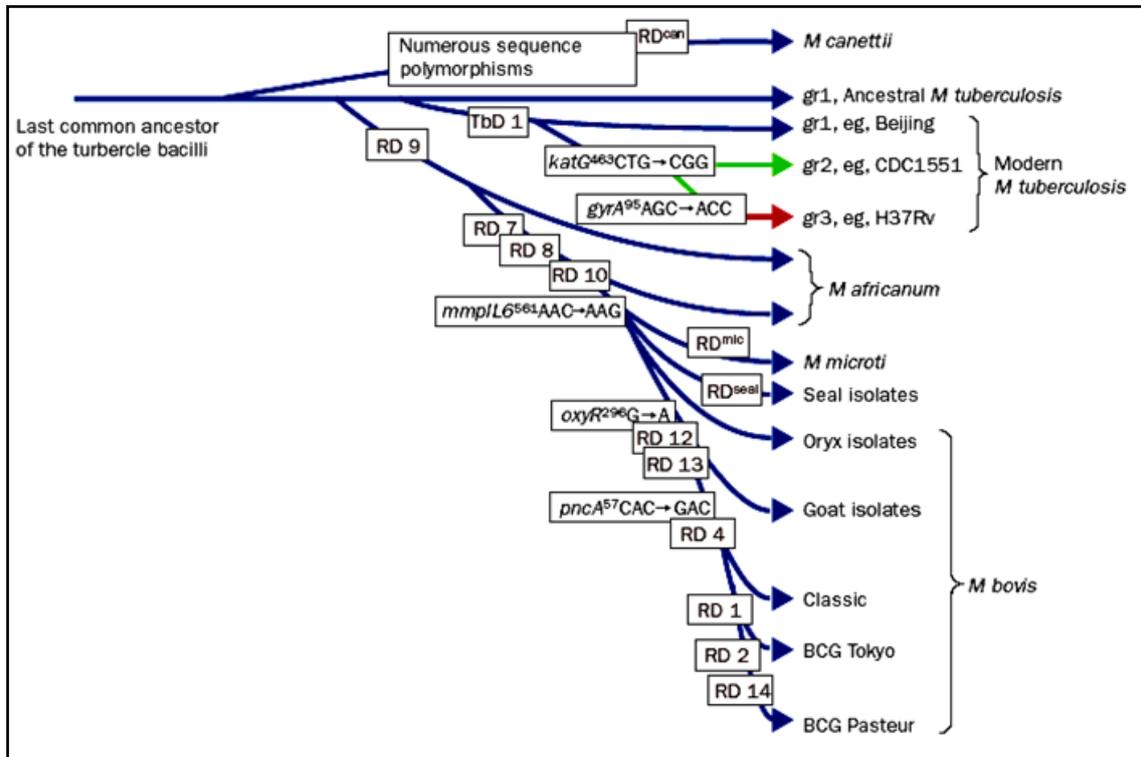


Figura 1.2. Evolución de los miembros del complejo *M. tuberculosis* según la presencia o ausencia de las regiones de diferencia conservadas y polimorfismos en 5 genes (Brosch *et al.*, 2002).

1.7. El genoma de *M. tuberculosis*

El genoma de la cepa de laboratorio *M. tuberculosis* H37Rv comprende 4,4 Mb con 4043 genes predichos (incluyendo 50 RNAs estables), lo que supone el 92% de la capacidad codificante potencial (Brodin *et al.*, 2005). Presenta un contenido en GC elevado (65,6%) y relativamente constante, con la excepción de ciertas regiones con un mayor porcentaje de GC y que corresponden a una gran familia de genes que incluyen las PGRS (Cole *et al.*, 1998). Sólo el 59% de los genes se transcriben con la misma polaridad que la replicación, lo cual, junto con la presencia de un único operón de rRNA localizado a 1,5 Mb del origen de replicación, se ha relacionado con infrecuentes ciclos de replicación y con la baja tasa de crecimiento del bacilo (Cole *et al.*, 1998). Tras la reanotación del genoma un 52% de las proteínas predichas tienen una función asociada y sólo un 10% no presentan similitud con otras proteínas y podrían ser exclusivas de *M. tuberculosis* (Camus *et al.*, 2002). Un 51% de las proteínas han surgido por duplicación génica (Cole *et al.*, 1998).

Del genoma se deduce que *M. tuberculosis* tiene la capacidad de sintetizar todos los aminoácidos, vitaminas y cofactores esenciales, así como el potencial metabólico de adaptarse a ambientes aeróbicos, microaerófilicos y anaeróbicos (Brodin *et al.*, 2005). Aunque pudiera sorprender la capacidad anabólica de *M. tuberculosis*, un patógeno intracelular que podría captar los metabolitos del huésped, concuerda con varios estudios que muestran que el fagosoma micobacteriano es pobre en nutrientes (Muñoz-Eliás y McKinney, 2005). Otro aspecto destacable, referente en este caso al anabolismo de lípidos, es que *M. tuberculosis* contiene en su genoma representantes de todos los sistemas de biosíntesis de lípidos y policétidos conocidos (Cole *et al.*, 1998). Estas enzimas permiten la síntesis tanto de los componentes de la envuelta celular, importantes para la virulencia del bacilo, como de las micobactinas, policétidos implicados en la captación de hierro.

En cuanto al catabolismo, *M. tuberculosis* contiene los enzimas necesarios para la glicólisis, la vía de las pentosa fosfato, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el ciclo del glioxilato (Cole *et al.*, 1998) y el ciclo del metilcitrato (Muñoz-Eliás *et al.*, 2006). También se han detectado un elevado número de oxigenasas, oxidorreductasas y deshidrogenasas, y 20 citocromo P450 monooxigenasas; lo que indica que *M. tuberculosis* puede oxidar gran variedad de sustratos confirmando observaciones experimentales previas (Cole *et al.*, 1998). Crecientes evidencias sugieren que los lípidos son la principal fuente de carbono utilizada por *M. tuberculosis* durante la infección. Esto concordaría con los más de 100 enzimas del ciclo de la β -oxidación codificados en el genoma del bacilo. Así mismo, la presencia de 20 lipasas apuntaría a la hidrólisis de lípidos de la membrana del fagosoma como uno de los mecanismos de obtención de lípidos (Muñoz-Eliás y McKinney, 2005).

A nivel de regulación se han detectado 13 factores sigma, dos sistemas de transducción de señal diferentes, formados por 11 sistemas de dos componentes y 11 Ser/Thr proteincinasas, y otros 100 reguladores transcripcionales (Cole *et al.*, 1998).

En cuanto al DNA repetitivo, además de los genes duplicados, de 56 secuencias de inserción y de dos profagos, se han descubierto otros elementos como el locus de repeticiones directas que es la base del *spoligotyping*. La familia REP13E12 está formada por 7 repeticiones, distribuidas por el genoma, que presentan cierta similitud a elementos móviles. Las MIRUs (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) son repeticiones dispersas, presentes en 65 copias en 41 loci, la mitad de las cuales codifica

Introducción

un marco abierto de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) solapado con los genes colindantes. Las PGRS y las MPTR (*Major Polymorphic Tandem Repeats*) son repeticiones en tándem que forman parte de los genes que codifican las proteínas ricas en glicina PE y PPE, generando importantes polimorfismos que se han asociado con variación antigénica (Gordon y Supply, 2005). El DNA repetitivo, además de ser la base de las herramientas de epidemiología molecular, parece tener un papel importante en la generación de diversidad y evolución de las micobacterias constituyendo la principal fuente de variación entre las cepas y especies del complejo *M. tuberculosis*. Un ejemplo interesante lo constituye el genoma de *M. leprae* cuya reducción en tamaño y organización en mosaico parecen haber resultado de sucesivas recombinaciones entre secuencias repetitivas dispersas (Gordon y Supply, 2005).

1.8. La envuelta celular de *M. tuberculosis*

1.8.1. Estructura, composición y biosíntesis

Las micobacterias presentan una envuelta celular característica que se puede dividir en tres componentes estructurales: membrana plasmática, pared celular y cápsula

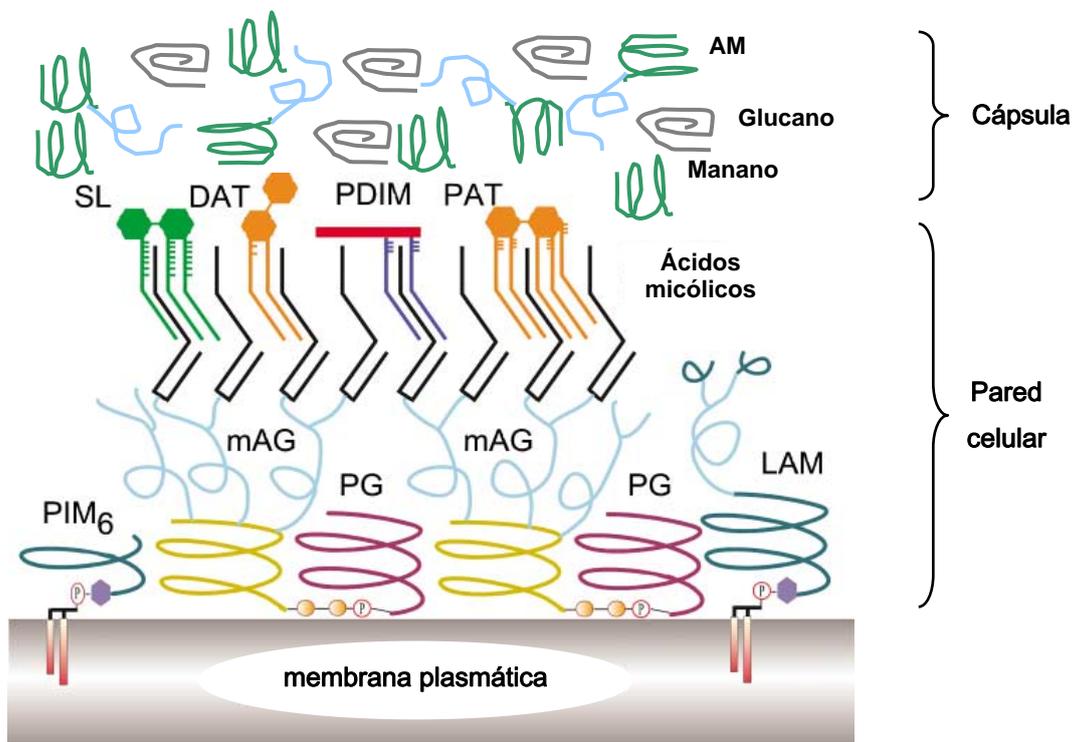


Figura 1.3. Representación simplificada de la envuelta celular de *M. tuberculosis*. No se muestran las proteínas, presentes en los 3 compartimentos, ni las porinas. Existen variaciones sobre este modelo que se describen en el texto. AM: arabinomanano, SL: sulfolípidos, DAT y PAT: di- y poliactilrealosas, PDIM: dimicocerosato de ftiocerol, PIM: fosfatidilinositol manósidos, mAG micolil-arabinogalactano, PG: peptidoglicano, LAM: lipoarabinomanano. Modificado de Minnikin *et al.*, 2002.

(Fig. 1.3). La pared celular que rodea la membrana plasmática está formada por el complejo ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglicano y por otros componentes no unidos covalentemente, principalmente lípidos y glicolípidos.

Esta división, conceptualmente simplificada, es más compleja a la práctica. En muchos casos es difícil discernir experimentalmente la localización de algunos lípidos, especialmente entre la pared y la cápsula, y algunos se han aislado en más de un compartimiento (Daffé y Draper, 1998). Hay que tener en cuenta, además, que en la micobacteria en crecimiento, la envuelta celular es una estructura dinámica en continua reconstrucción.

1.8.1.1. Membrana plasmática

La membrana plasmática de las micobacterias es funcional y estructuralmente similar a la de otras bacterias Gram positivas. Está formada principalmente por fosfatidilglicerol, cardiolipina, fosfatidiletanolamina, y fosfatidilinositol manósidos (PIM) (Daffé y Draper, 1998). Los PIM, hallados exclusivamente en los

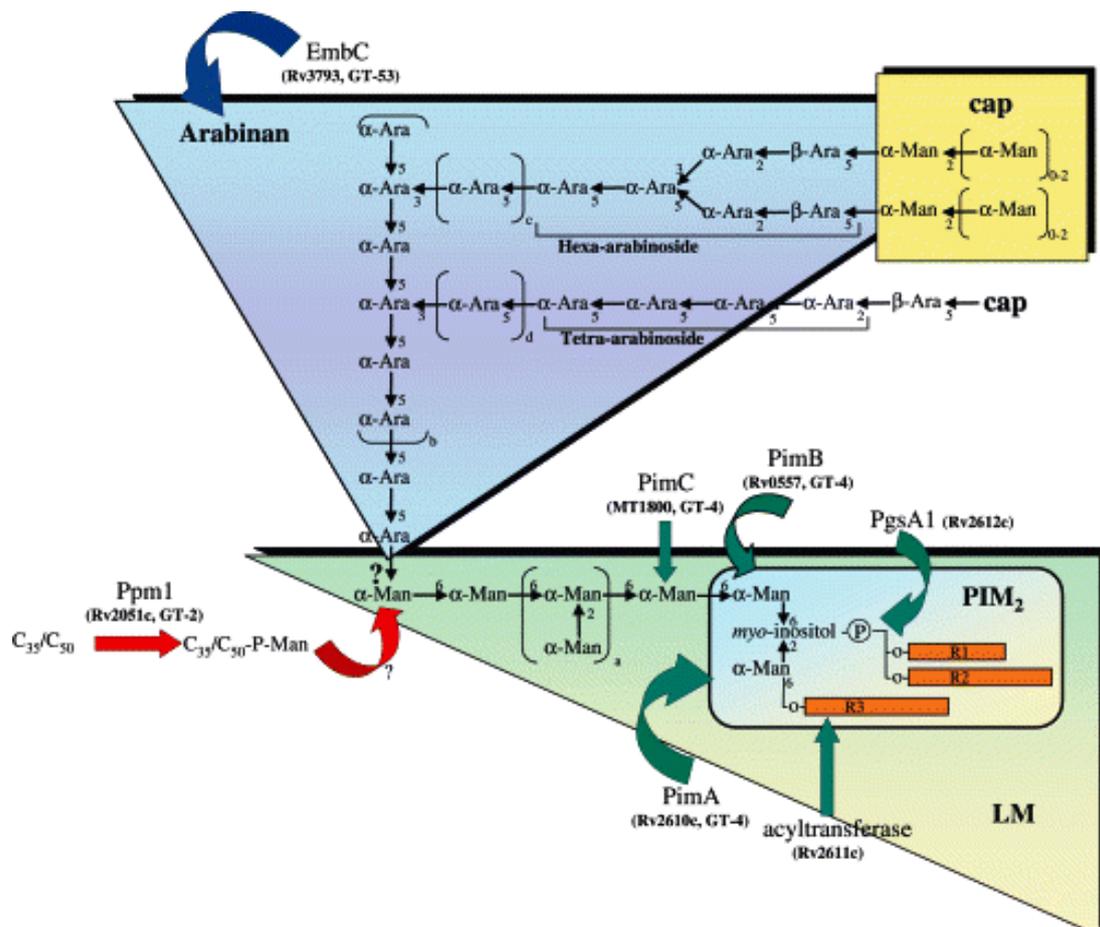


Figura 1.4. Estructura y biosíntesis del ManLAM, LM y PIM2. R1, R2 y R3: ácidos grasos. C₃₅/C₅₀-P-Man: poliprenol monofosfomanosa. Los valores de a, b, c, y d, son específicos de cada especie. Figura de Briken *et al.*, 2004.

Introducción

Actinomycetales, estarían localizados preferentemente en la parte externa de la bicapa lipídica y serían responsables de la asimetría de la membrana de las micobacterias.

Los PIM constituyen también la base del lipomanano (LM) y del lipoarabinomanano (LAM), dos lipoglicanos presentes en la envuelta de todas las micobacterias. En el LM, el PIM está glicosilado con un núcleo manano, de longitud y ramificación variable según la especie (Fig. 1.4). La posterior glicosilación del manano con arabinano da lugar al LAM cuyos extremos no reducidos de las cadenas arabinosil laterales, están modificados diferencialmente según la especie (Fig. 1.4). En *M. tuberculosis* (y también en *M. leprae* y *M. avium*) estas terminaciones son manósidos lo que ha introducido la nomenclatura ManLAM (Kremer y Besra, 2005). En la figura 1.4 se detalla la estructura del principal PIM de *M. tuberculosis*, del LM, y del LAM, así como los enzimas, identificados hasta el momento, que intervienen en la síntesis de estos compuestos. La síntesis del LAM es inhibida por el fármaco antituberculoso etambutol que probablemente actúa sobre la arabinosiltransferasa EmbC (Kremer y Besra, 2005).

La localización del LM y el LAM es todavía incierta (Daffé y Draper, 1998). Algunos experimentos de inmunodetección los emplazan en la superficie celular, mientras que otros modelos los sitúan anclados a la membrana a través de los PIM con la parte glicosídica atravesando la pared celular. Otra posibilidad sería que sirvieran de anclaje del esqueleto de la pared celular en la membrana plasmática.

En la membrana plasmática se hallan también otros lípidos como glicosilfosfoliprenoles, implicados en la síntesis de determinados componentes de la pared celular, y menaquinonas (MK) esenciales en el transporte de electrones (Brennan y Nikaido, 1995). La membrana contiene también muchas proteínas importantes para la fisiología de la bacteria. Recientemente, varios trabajos de proteómica han permitido identificar centenares de estas proteínas, incluyendo proteínas integrales con dominios transmembrana y proteínas periféricas asociadas a la membrana (Gu *et al.*, 2003; Mawuenyega *et al.*, 2005). La mayoría de estas proteínas intervienen en procesos metabólicos de obtención de energía, degradación de ácidos grasos y síntesis de lípidos, o en el metabolismo de macromoléculas. Otro grupo importante lo constituyen las proteínas implicadas en procesos celulares de transporte y de división celular (Gu *et al.*, 2003; Mawuenyega *et al.*, 2005).

1.8.1.2. El complejo ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglicano

El esqueleto o núcleo de la pared celular consta de peptidoglicano, unido covalentemente a arabinogalactano, esterificado a su vez con ácidos micólicos. El peptidoglicano está formado por unidades alternantes de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-glicolilmurámico al que se unen las cadenas laterales de L-alanil-D-isoglutamil-*meso*-diaminopimelil-D-alanina (Mahapatra *et al.*, 2005). Además del grupo *N*-glicolil del ácido murámico, otra característica diferencial del peptidoglicano de las micobacterias es el tipo y elevado número de enlaces entre las cadenas peptídicas. Aunque no se ha estudiado en detalle la biosíntesis del peptidoglicano en las micobacterias, la presencia en el genoma de *M. tuberculosis* de genes homólogos a los implicados en la biosíntesis de esta estructura en *E. coli*, sugiere que tendría lugar por un proceso similar (Mahapatra *et al.*, 2005).

El 10% de los ácidos murámicos del peptidoglicano forma enlaces fosfodiéster con un diglicosil de *N*-acetilglucosamina-ramnopiranososa, el cual está unido al galactano del arabinogalactano y constituye, por tanto, la unión entre el peptidoglicano y el arabinogalactano (Mahapatra *et al.*, 2005). El arabinogalactano es un polímero formado por motivos definidos de arabinofuranosas y galactofuranosas, dos azúcares raros en la naturaleza. El galactano consiste en una cadena lineal de unas 30 galactosas con enlaces alternantes. Mientras que, las cadenas de arabinano, de las que puede haber 2 ó 3, están unidas a residuos galactosa cercanos al extremo reducido del galactano y consisten en cadenas lineales de arabinosas con motivos hexaarabinosil ramificados en el extremo no reducido. En las micobacterias de crecimiento lento existe además un residuo galactosamina por unidad de arabinogalactano.

La síntesis del arabinogalactano se inicia en un decaprenil fosfato con la síntesis del diglicosil fosfato de unión con el peptidoglicano, seguida de la extensión de las cadenas galactano y arabinano, mientras el intermediario es transportado a través de la membrana plasmática (Mahapatra *et al.*, 2005). La mayoría de los detalles enzimáticos y genéticos de este complejo proceso se han definido y, puesto que los mutantes en estos genes no son viables, constituyen dianas muy interesantes para el diseño de nuevos fármacos. El etambutol también inhibe la síntesis del arabinogalactano interfiriendo en la polimerización del arabinano actuando, probablemente, sobre la arabinosiltransferasa EmbB (Zhang *et al.*, 2005).

Introducción

Unidos por enlaces éster a dos terceras partes de las arabinosas terminales del arabinogalactano, se encuentran los ácidos micólicos. Estos ácidos grasos α -alquil ramificados y β -hidroxilados presentan una cadena lateral saturada de 20 a 25 carbonos y una cadena principal o meromicolato de 50 a 60 carbonos que puede estar modificada con dobles enlaces, grupos ceto, metoxi, epoxi y anillos ciclopropilo (Fig. 1.5) (Kremer y Besra, 2005). Los ácidos micólicos se dividen, según si contienen o no un grupo funcional oxigenado, en micolatos oxigenados y α -micolatos, respectivamente. Éstos, a su vez, se subdividen en varias clases dependiendo del tipo de modificaciones que presenten. Los α -micolatos están presentes en todas las micobacterias mientras que la distribución del resto de clases es característica, aunque no exclusiva, de cada especie. *M. tuberculosis* contiene, además de α -micolatos, cetomicolatos y metoximicolatos (Fig. 1.5). Dentro de cada clase de ácidos micólicos existe una microheterogeneidad intra e interespecífica en cuanto a la longitud de las cadenas, y la posición de los grupos funcionales.

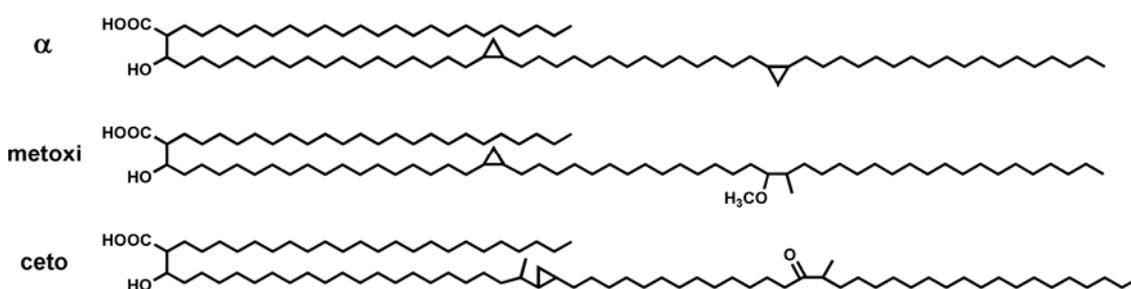


Figura 1.5. Estructura de los ácidos micólicos de *M. tuberculosis*.

La biosíntesis de los ácidos micólicos conlleva 5 pasos: (1) síntesis de ácidos grasos saturados de C₂₄ a C₂₆ para formar las α -ramificaciones; (2) síntesis de ácidos grasos de C₅₀ a C₅₆ que constituirán el meromicolato; (3) introducción de los grupos funcionales en la cadena meromicolato; (4) condensación Claisen entre las dos cadenas previa a la reducción final para formar el ácido micólico; y (5) transferencia del ácido micólico al arabinogalactano y otros aceptores (Kremer y Besra, 2005). La mayoría de los enzimas implicados se han caracterizado bioquímica y/o genéticamente y constituyen buenos candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos. Así, la isoniazida y la etionamida son dos profármacos que actúan inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos.

Existen dos modelos de la estructura del esqueleto de la pared celular. El primero sitúa el peptidoglicano y el arabinogalactano en dos capas independientes, paralelas a la membrana plasmática. Mientras que el segundo, basándose en estudios de modelaje de mecánica molecular, sugiere una alternancia de cadenas helicoidales de arabinogalactano y peptidoglicano formando una única capa, perpendicular al plano de la membrana plasmática (Fig. 1.3) (Mahapatra *et al.*, 2005). Los ácidos micólicos formarían una monocapa compacta, con las cadenas alquil paralelas entre ellas y perpendiculares al plano de la membrana plasmática, constituyendo una barrera de permeabilidad externa (Fig. 1.3) (Draper y Daffé, 2005).

1.8.1.3. Otros componentes de la pared celular

Asociados al esqueleto de la pared celular, pero no covalentemente unidos, se encuentran lípidos libres, PIM, fosfatidiletanolamina, triacilgliceroles (TAG) y proteínas. Los lípidos libres, denominados así porque son fácilmente extraíbles con solventes, comprenden una extraordinaria variedad de estructuras, algunas comunes en todas las micobacterias y otras presentes sólo en algunas especies. *M. tuberculosis* contiene principalmente dimicolato de trealosa (TDM, *Trehalose Dimycolate*), diaciltrealosas (DAT), triaciltrealosas (TAT), poliaciltrealosas (PAT), sulfolípidos (SL), dimicocerosatos de ftiocerol (PDIM, *Phthiocerol Dimycocerosates*) y glicolípidos fenólicos (PGL, *Phenolic Glycolipid*).

Aunque la mayoría de ácidos micólicos se encuentran formando parte del esqueleto de la pared celular, algunos se hallan en formas glicosiladas como lípidos libres, principalmente monomicolatos de trealosa (TMM, *Trehalose Monomycolate*) y TDM (Kremer y Besra, 2005). El TDM o *cord factor* se aisló inicialmente buscando el factor responsable de la disposición en forma de cuerdas de las células de *M. tuberculosis*, una morfología asociada con la virulencia del bacilo. Sin embargo, estudios posteriores han mostrado que este lípido está ampliamente distribuido en el género *Mycobacterium*, con la notable excepción de *M. leprae* que sólo contiene TMM también presente en el resto de micobacterias. De hecho, el TMM es el sustrato utilizado por los antígenos del complejo 85 (Ag85A-Ag85C) para transferir ácidos micólicos al arabinogalactano y al TMM formando el complejo micolil-arabinogalactano y TDM, respectivamente. Los micolatos de trealosa reflejan, por lo tanto, la composición de ácidos micólicos de cada especie (Kremer y Besra, 2005).

Introducción

Otros glicolípidos con trealosa incluyen los SL y las DAT, TAT y PAT (Fig. 1.6). Los SL, exclusivos de *M. tuberculosis*, se caracterizan por presentar un grupo sulfato en la posición 2' de la trealosa y por estar acilados con ácidos grasos multimetilramificados denominados ácidos ftioceránicos e hidroxiftioceránicos (Kremer y Besra, 2005). Los SL son una familia de compuestos que se diferencian en el número y tipo de sustituyentes acil siendo el más mayoritario el SL-I (Fig. 1.6). La policétido sintasa Pks2 interviene en la síntesis de los ácidos ftioceránicos de los SL (Sirakova *et al.*, 2001). El gen *pks2* se localiza en el cromosoma junto a *papA1* y *mmpL8*, codificando este último una proteína de membrana que interviene en el transporte de un precursor de SL parcialmente acilado (Domenech *et al.*, 2004). Recientemente, se ha comprobado que *papA1* y *papA2* (separado por 2 ORF de los otros genes de síntesis de SL), codifican sendas aciltransferasas necesarias para la síntesis de SL (Bhatt *et al.*, 2007).

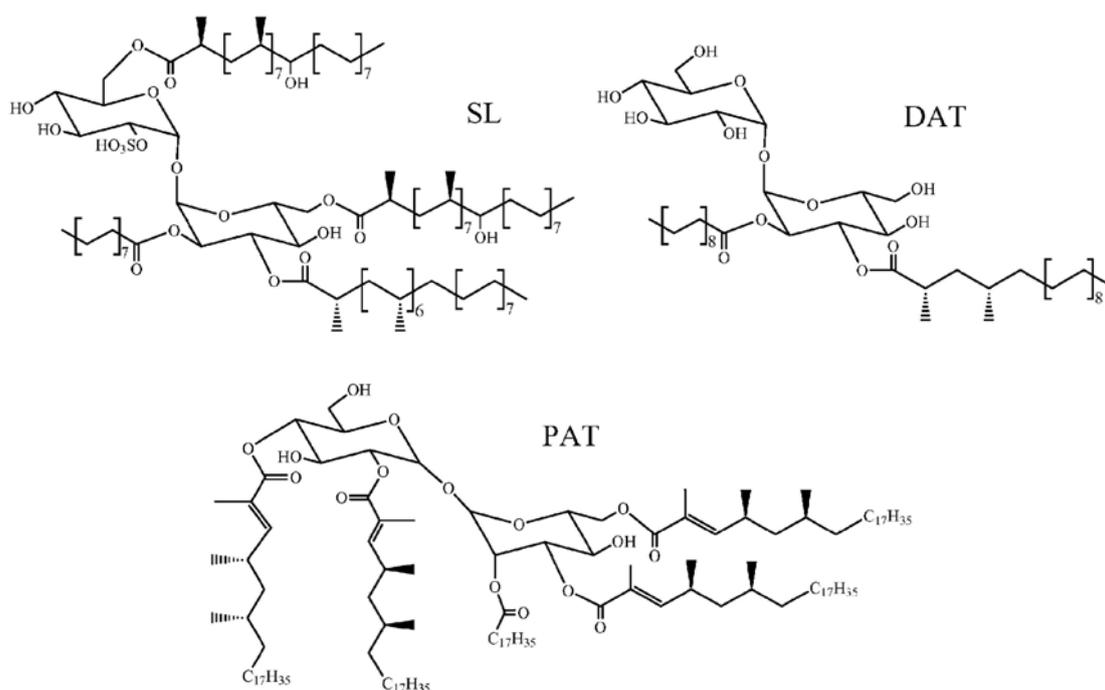


Figura 1.6. Estructura de los principales glicolípidos basados en trealosa de *M. tuberculosis* (Jackson *et al.*, 2007).

Las DAT, TAT y PAT están esterificadas con ácidos grasos di- y trimetilramificados denominados micolipenatos y micosanoatos, y ácidos grasos saturados de C₁₆ a C₁₉ (Fig. 1.6) (Kremer y Besra, 2005). Están presentes en *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. fortuitum*. La policétido sintasa Msl3 se ha identificado como necesaria para la síntesis de los micolipenatos y micosanoatos (Dubey *et al.*, 2002). El gen *msh3* presenta una mutación sin sentido en la cepa de *M. tuberculosis*

H37Rv Pasteur (utilizada en la secuenciación del genoma) lo que da lugar a los ORFs *pks3* y *pks4* que forman un locus, análogo al de síntesis de SL, con los genes *papA3* y *mmpL10*.

Los PDIM son las principales ceras de *M. tuberculosis* y están presentes también en otras especies relacionadas. Están formados por una larga cadena denominada ftiocerol, esterificada con dos ácidos grasos polimetil-ramificados denominados ácidos micocerósicos o ácidos ftioceránicos, según la estereoquímica de sus centros quirales (Fig. 1.7A) (Onwueme *et al.*, 2005). Existen 4 formas de PDIM según si contienen en la cadena ftiocerol un grupo metoxi (ftiocerol A y B) (Fig. 1.7A), un grupo ceto (ftiodiolona) o un grupo hidroxil (ftiotriol). La distribución de estas variantes es particular de cada especie, así como la longitud de las cadenas (Onwueme *et al.*, 2005).

Otros lípidos relacionados con los PDIM son los PGL o dimicocerosatos de glicosilfenolftiocerol (Fig. 1.7A). Estos glicolípidos se describieron, inicialmente, en *M. bovis* y *M. kansasii* y se denominaron micósidos. Posteriormente se describieron en otras especies, incluyendo “*M. canettii*” y *M. leprae* en el que constituyen el 2% de la masa del bacilo (Vergne y Daffé, 1998). En *M. tuberculosis* sólo se han detectado PGL en algunos aislados clínicos y se ha sugerido que la causa de que la mayoría de cepas, incluyendo la cepa H37Rv, no los sintetizan sería un cambio en el patrón de lectura por una microdelección (1 ó 7 pb) en los ORF *pks15/1*, que forman un único ORF en las cepas productoras (Constant *et al.*, 2002). La principal diferencia entre los PGL de las distintas especies reside en el número y tipo de metil-azúcares, pudiendo existir más de un tipo de PGL en una misma especie. Los ftiocerolos y los ácidos micocerósicos de los PGL corresponden a los de los PDIM de la misma especie (Onwueme *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha progresado notablemente en el estudio de la biosíntesis de los PDIM y PGL, tanto desde un punto de vista enzimático como genético, habiéndose identificado un cluster de más de 30 genes implicados en la síntesis de estos lípidos (Fig. 1.7B) (Onwueme *et al.*, 2005). Así, el gen *mas* codifica la ácido micocerósico sintasa. Mientras que, el operón *ppsA-ppsE* codifica la policétido sintasa modular que sintetiza las cadenas ftiocerol y fenolftiocerol a partir de moléculas precursoras, sintetizadas a su vez por la policétido sintasa Pks15/1 en el caso del fenolftiocerol. Otras proteínas destacables codificadas en este locus incluyen acil-CoA ligasas, que activarían los precursores ftiocerol y fenolftiocerol; metiltransferasas, que participarían en la metilación de los azúcares del PGL; glicosiltransferasas, que

Introducción

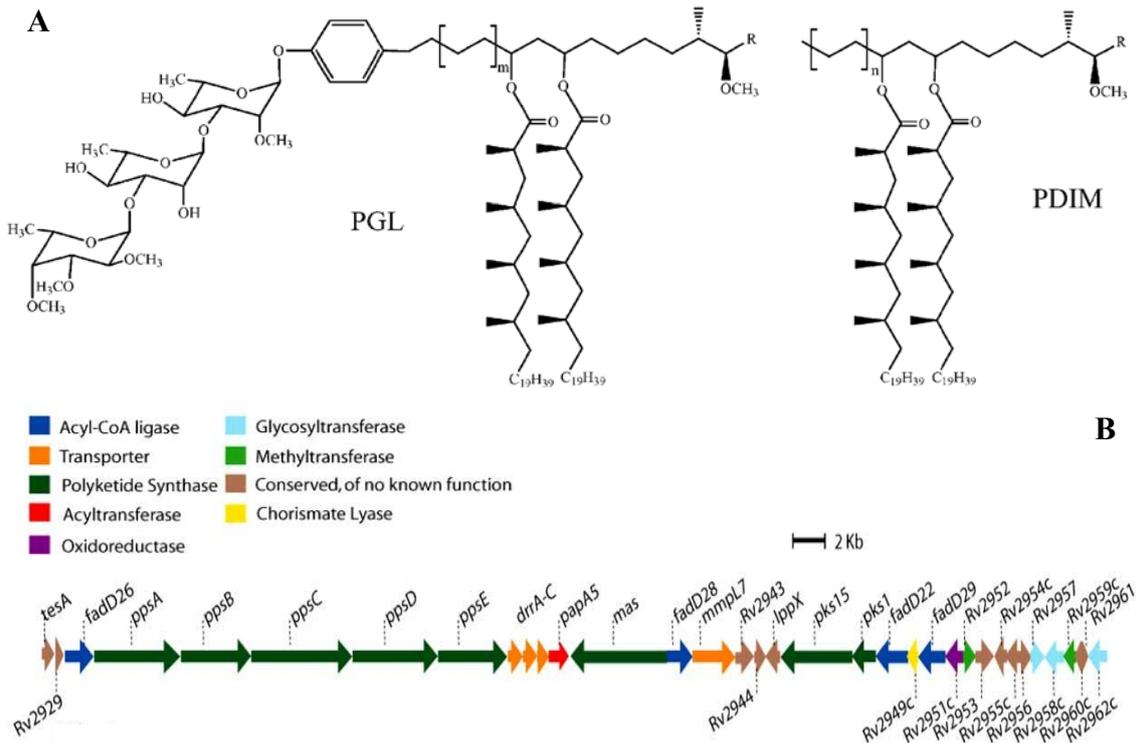


Figura 1.7. A) Estructura del principal PGL de *M. tuberculosis* y de los PDIM. La cadena ftiocerol corresponde a ftiocerol A, si R=CH₃, o a ftiocerol B si R=H. Modificado de Jackson *et al.*, 2007. **B)** Locus de síntesis de PDIM y PGL. Modificado de Onwueme *et al.*, 2005.

catalizan la glicosilación del fenolftiocerol; la aciltransferasa PapA5, que diacila el ftiocerol y el glicosilfenolftiocerol; y varios transportadores importantes para la correcta localización de los PDIM y PGL en la pared celular (Onwueme *et al.*, 2005). Estudios recientes sugieren que otras poliketido sintasas, no incluidas en el cluster PDIM-PGL, participarían también en la síntesis de estos lípidos, aunque el papel de estos enzimas está pendiente de confirmación.

El elevado número de enzimas de síntesis y modificación de lípidos codificados en el genoma de *M. tuberculosis* sugiere que podría producir otros lípidos, más minoritarios, no identificados hasta el momento. Así, recientemente, se ha descrito una nueva familia de manosil-β-1-fosfolípidos, denominados manosil-β-1-fosfomicótidos, presentes en *M. tuberculosis*, *M. avium* y *M. bovis* BCG pero no en las especies saprófitas *M. phlei*, *M. smegmatis* y *M. fallax* (Matsunaga *et al.*, 2005).

Si bien la estructura y biosíntesis de la mayoría de los lípidos libres se conoce en profundidad, su organización en la pared celular es todavía conjetural. Hace ya más de 20 años Minnikin propuso que los ácidos micólicos del esqueleto de la pared celular formarían una bicapa asimétrica con otros lípidos (Brennan y Nikaido, 1995). Este

modelo ha sido respaldado por numerosos y diferentes estudios en estos años, sin embargo, la naturaleza exacta de los lípidos de la capa externa se desconoce. Varios autores proponen que los lípidos libres con largas cadenas metil-ramificadas (TDM, SL, DAT, etc.) podrían complementar las α -ramificaciones de los ácidos micólicos, intercalándose con las cadenas meromicolato, complementadas por ácidos grasos de cadenas más cortas, como los de los PIM (Fig. 1.3) (Brennan y Nikaido, 1995). Esto permitiría que las partes más polares de los glicolípidos quedaran situadas externamente formando una superficie hidrofílica, con una estructura global análoga a la de otras membranas biológicas (Draper, P., 1998). La principal crítica de este modelo es que el tipo y cantidad de lípidos libres difiere considerablemente en las distintas especies como para formar una estructura común a todas ellas. Por ello, se ha sugerido que los TAG y fosfolípidos, presentes en las capas más externas de la envuelta de todas las micobacterias, podrían formar la bicapa lipídica con los ácidos micólicos, mientras que los lípidos libres se situarían más externamente (Draper, P., 1998).

Además, en la pared celular se hallan también proteínas, incluyendo porinas que atravesarían la capa lipídica. Aunque se ha detectado la actividad de dos porinas diferentes en *M. tuberculosis*, no se han podido aislar ni identificar por estar en muy baja concentración (Draper y Daffé, 2005). Sí se ha caracterizado una proteína formadora de canal de baja actividad denominada OmpATb (Draper y Daffé, 2005). El análisis del proteoma de la pared celular ha permitido identificar unas 300 proteínas de las que 131 son exclusivas de la pared (Mawuenyega *et al.*, 2005). Estas proteínas están asociadas a la síntesis y modificación de macromoléculas, al metabolismo energético y a la envuelta celular. Así mismo se han detectado muchas de las proteínas de síntesis de lípidos de pared, así como proteínas implicadas en la secreción de péptidos/proteínas, y diferentes antígenos conocidos (Mawuenyega *et al.*, 2005).

1.8.1.4. La cápsula

La parte más externa de la envuelta celular de las micobacterias consiste en una mezcla de polisacáridos, proteínas y lípidos denominada cápsula, aunque sus componentes no están unidos covalentemente a la pared celular (Draper y Daffé, 2005). Los primeros indicios de la existencia de una cápsula se limitaban a la observación de una zona electrotransparente alrededor de las micobacterias patógenas cuando se encontraban en el fagosoma de células infectadas (Daffé y Etienne, 1999). Posteriormente, el uso de técnicas mejoradas en la preparación de las muestras para el

microscopio electrónico ha permitido observar esta estructura en micobacterias crecidas *in vitro*.

Los primeros estudios de la composición de la cápsula se realizaron en *M. leprae* y *M. lepraemurium*, cuyas cápsulas consisten en PGL y glicopeptidolípidos, respectivamente (Daffé y Etienne, 1999). Sin embargo, en otras micobacterias, que no sintetizan estos lípidos, o en muy baja cantidad, la cápsula está formada por polisacáridos y proteínas, en proporción variable según la especie y fase de crecimiento, y una pequeña cantidad de lípidos (2%-5%) (Daffé y Etienne, 1999).

El componente principal de la cápsula de *M. tuberculosis* son los polisacáridos glucano, arabinomanano y manano (Draper y Daffé, 2005). El glucano consiste en unidades repetitivas de 5 ó 6 residuos glucosil, sustituidos con un residuo oligoglicosil (mono- a pentaglicosil). El arabinomanano consta de una cadena manano como la del LM, y una cadena arabinano como la del araginogalactano con oligomanósidos en el extremo no reducido. El manano que se halla libre es también como el del LM (Draper y Daffé, 2005). Los pocos lípidos presentes en la cápsula estarían localizados más internamente y corresponden a los lípidos libres más externos de la pared. En cuanto a las proteínas de la cápsula, la mayoría se han detectado también en el sobrenadante de los cultivos. En realidad, todos los componentes de la cápsula se han detectado en el medio de cultivo, y esta secreción ocurriría igualmente en el huésped, como muestran estudios con cultivos celulares o la presencia de PGL incluso en la sangre de pacientes infectados con *M. leprae* (Draper y Daffé, 2005).

1.8.2. Actividades biológicas, patogenicidad y regulación

1.8.2.1. Importancia de la envuelta celular

La inusual composición y estructura de la envuelta celular es responsable de muchas de las características del género *Mycobacterium* como la ácido-alcohol resistencia, el crecimiento en forma de cuerdas de algunas especies, la morfología colonial y la extraordinaria resistencia de las micobacterias a agentes físicos y químicos (Barry, C. E. III, 2001a). La elevada impermeabilidad de la envuelta celular es también en gran parte responsable de la ineficacia frente a las micobacterias de la mayoría de los antimicrobianos de uso común. Estas características se atribuyen mayormente a la capa de ácidos micólicos de cuya composición depende la permeabilidad relativa de la pared celular (Kremer *et al.*, 2000).

Tabla 1.4. Actividades biológicas de los lipoglicanos, glicolípidos y ceras de *M. tuberculosis* (Vergne y Daffé, 1998; Briken *et al.*, 2004; Kremer y Besra, 2005; Onwueme *et al.*, 2005; y Jackson *et al.*, 2007).

Compuesto	Molécula purificada	Cepas mutantes
PIM	<ul style="list-style-type: none"> - Inducción de respuesta granulomatosa por reclutamiento de células NK. - Adhesión a células no fagocíticas. 	No viables
LM	<ul style="list-style-type: none"> - Inducción de respuesta proinflamatoria. 	No descritos
ManLAM	<ul style="list-style-type: none"> - Interacción con células fagocíticas. - Inhibición de: <ul style="list-style-type: none"> - maduración del fagosoma - activación de macrófagos - respuesta proinflamatoria 	No descritos
TDM	<ul style="list-style-type: none"> - Toxicidad. Alteración de respiración y fosforilación oxidativa mitocondriales. - Inmunoestimulación. - Granulomagénico. 	No descritos
SL	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la estimulación de macrófagos. - Activación de neutrófilos. - Efecto sinérgico con TDM. 	<ul style="list-style-type: none"> - Mutante <i>pks2</i>: no afecta a la virulencia <i>in vitro/in vivo</i>. - Mutante <i>mmpL8</i>: <i>in vivo</i> menor virulencia y menor producción de citocinas antiinflamatorias.
DAT, PAT	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la migración de leucocitos. - DAT: inhibición de linfoproliferación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Mutante <i>msl3</i>: estimulación de la entrada en células fagocíticas y no fagocíticas <i>in vitro</i>. No afecta a la virulencia <i>in vivo</i>.
PGL	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición de la linfoproliferación*. - Inhibición respuesta proinflamatoria. - Supresión de la respuesta oxidativa de monocitos*. - Activación del complemento*. 	<ul style="list-style-type: none"> - Mutante <i>pks15/pks1</i>: incremento de la producción de citocinas proinflamatorias <i>in vitro</i>. Mayor supervivencia de ratones infectados, sin afectar a la diseminación ni la proliferación bacilares.
PDIM	<ul style="list-style-type: none"> - No tienen efecto sobre macrófagos ni células dendríticas <i>in vitro</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Mutantes en varios genes: <i>In vitro</i>: mayor permeabilidad de la pared celular, mayor susceptibilidad a óxido nítrico, inducción de citocinas proinflamatorias. Atenuados <i>in vivo</i>.

*Actividades descritas para el PGL de *M. leprae*.

La importancia de la envuelta celular en la patogenia resulta obvia ya que constituye la interfase entre la micobacteria y el huésped. En este sentido la envuelta determina qué moléculas del bacilo son detectadas por el sistema inmunitario, y qué moléculas del huésped acceden al interior de la bacteria. Las actividades biológicas de la envuelta celular y su implicación en la patogenia pueden dividirse en dos tipos: resistencia pasiva e intervención activa (Daffé y Draper, 1998). La resistencia pasiva, definida como la capacidad de permanecer inafectado o recuperarse de los ataques del

huésped, resulta evidente de la estructura y composición de la envuelta. Así, la cápsula impediría la difusión de macromoléculas (enzimas degradativos y bactericidas) a partes más internas de la envuelta, y la capa de ácidos micólicos impediría el acceso de moléculas más pequeñas. La inusual estructura química del arabinogalactano y el peptidoglicano contribuiría también a la resistencia frente a enzimas degradativos (Daffé y Draper, 1998). Otras pequeñas moléculas como el peróxido de hidrógeno, el superóxido y el óxido nítrico, utilizadas por los macrófagos para eliminar las bacterias, serían secuestradas por el LAM y otros glicolípidos, como el PGL.

En cuanto a la intervención activa, se han descrito actividades biológicas a muchos de los componentes de la envuelta celular (Tabla 1.4). Muchos de estos estudios se han realizado con compuestos purificados, por lo que se debe tener en cuenta la accesibilidad y cantidad de estas moléculas en la bacteria para establecer la significación de estas actividades *in vivo* (Daffé y Draper, 1998). La obtención de mutantes en componentes específicos ha ayudado a determinar su importancia en la virulencia, sin embargo, los resultados se deben tomar también con precaución, ya que pueden ser un efecto indirecto de alteraciones en la estructura global de la envuelta y/o en la secreción de proteínas y otros compuestos (Barry, C. E. III, 2001a).

1.8.2.2. Regulación de la composición de la envuelta

Muchas bacterias son capaces de variar la fluidez de la membrana, modificando su composición en función de las condiciones ambientales. De un modo análogo, las micobacterias modulan la estructura y composición de los ácidos micólicos en función de la fase de crecimiento, la temperatura y otras condiciones ambientales (Kremer *et al.*, 2000). Así, el ratio de cetomicolatos y metoximicolatos aumenta cuando *M. tuberculosis* crece en condiciones de microaerofilia o en el interior de macrófagos. Estas observaciones se han visto respaldadas por estudios de transcriptómica y proteómica que muestran una regulación de los genes de síntesis de ácidos micólicos en diferentes condiciones de crecimiento. Algunos de los reguladores identificados incluyen el factor sigma alternativo SigM (Raman *et al.*, 2006), y Rel_{Mtb} que controla la respuesta astringente (Dahl *et al.*, 2003). Además, la actividad de algunos de los enzimas de síntesis de ácidos micólicos está modulada por Ser/Thr proteincinasas y por la fosfatasa PstP, que responderían a condiciones ambientales (Molle *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación de la composición de la envuelta celular por proteólisis intramembrana mediada por la proteasa Rv2869c (Makinoshima y Glickman, 2005). Este sistema regula genes de síntesis de ácidos micólicos, PIM y PDIM, en respuesta a la presencia/ausencia de Tween en el medio.

La regulación de la síntesis de los glicolípidos y lipoglicanos de *M. tuberculosis* es muy importante durante el proceso de infección, teniendo en cuenta las actividades de estos compuestos y que en muchos casos pueden tener efectos antagónicos sobre la respuesta inmune. Los estudios de transcriptómica han permitido comprobar que la expresión de algunos de los genes de síntesis de estos compuestos responde a las condiciones de crecimiento, y que está regulada por varios factores sigma alternativos. Así, el sistema de dos componentes PhoP/PhoR reprime algunos de los genes de síntesis de PDIM e induce la expresión de los genes de síntesis de DAT, PAT y SL (Gonzalo Asensio *et al.*, 2006; Walters *et al.*, 2006). Mientras que, la síntesis del LAM está regulada por EmbR, cuya actividad está controlada por las Ser/Thr proteincinasas PknA, PknB y PknH y por la fosfatasa PstP (Sharma *et al.*, 2006). De este modo el ratio LM/LAM, importante en la respuesta inmune, estaría modulado en respuesta a diferentes señales ambientales.

1.9. Interacciones huésped-patógeno

Cuando *M. tuberculosis* alcanza el pulmón interacciona con células del huésped, principalmente macrófagos, pero también células dendríticas y células epiteliales. El reconocimiento, mediado por receptor, de *M. tuberculosis* por estos tipos celulares, desencadena una respuesta proinflamatoria, controlada por citocinas y quimiocinas que reclutan células mononucleares e inducen la formación de los granulomas. El efectivo control del crecimiento de *M. tuberculosis* y el mantenimiento de los granulomas, con la mínima patología, dependen de una correcta estimulación de la respuesta inmune, modulada por diversos compuestos producidos por *M. tuberculosis*.

1.9.1. La fagocitosis y el fagosoma de *M. tuberculosis*

La fagocitosis de *M. tuberculosis* está mediada por varios receptores, principalmente receptores del complemento, el receptor de manosa y los receptores scavenger de tipo A (Fenton *et al.*, 2005). Estos receptores interactúan con diversos ligandos del bacilo como el ManLAM, el glucano, la hemaglutinina de unión a

Introducción

heparina, las proteínas PE-PGRS, y el complejo Ag85. Además, la fagocitosis está modulada por otras moléculas del huésped como la fibronectina, el colesterol, y las proteínas surfactantes A y D. Estas interacciones regulan la respuesta inicial del macrófago inhibiéndose, en general, la respuesta tóxica y la fusión del fagosoma y el lisosoma (Fenton *et al.*, 2005).

M. tuberculosis también interacciona con los macrófagos a través de receptores de reconocimiento de patrón, como los receptores Toll-like (TLR, *Toll-like Receptor*) que median la activación de las células de la respuesta innata a través de diversas cascadas de señales (Fenton *et al.*, 2005). La estimulación de los TLR modula la fagocitosis, la fusión fagosoma-lisosoma y la producción de citocinas que regulan a su vez la respuesta inmune. *M. tuberculosis* activa las células vía TLR2 y TLR4, siendo el LM, el ManLAM y varias lipoproteínas los principales agonistas identificados. La unión de LM induce la producción de las citocinas proinflamatorias IL-12 y del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor- α*) vía TLR2 (Flynn y Chan, 2005). Mientras que la unión de la lipoproteína de 19 kDa al TLR2 inhibe la presentación de antígenos, dificultando la posterior estimulación de la respuesta inmune adaptativa (Fenton *et al.*, 2005). Además, la activación del TLR2 y, sobre todo, del TLR4 inducen la apoptosis de las células infectadas, un proceso importante en la presentación de antígenos a los linfocitos (Fenton *et al.*, 2005). El balance entre estas respuestas determinará el tipo y eficiencia de la respuesta inmune desarrollada.

Tras la fagocitosis, *M. tuberculosis* reside en vacuolas con membrana, deficientes en los complejos H⁺-ATPasa responsables de la acidificación de los fagosomas (Russell, D. G., 2005). Estas vacuolas son estructuras dinámicas que interaccionan con la vía endocítica temprana sin llegar a fusionarse con los lisosomas, lo que permite a *M. tuberculosis* sobrevivir y multiplicarse.

Varios estudios sugieren que la maduración de los fagosomas de *M. tuberculosis* está detenida en un punto inicial del proceso. Las vacuolas de *M. tuberculosis* retienen la GTPasa Rab5 que, en condiciones normales, regula la biogénesis del endosoma. Rab5 une fosfatidilinositol 3-cinasas que producen fosfatidilinositol 3-fosfato en la parte citosólica de la membrana vacuolar. El fosfatidilinositol 3-fosfato recluta a su vez diferentes proteínas, como EEA1 necesaria para la sustitución de Rab5 por Rab7 característica de estados más avanzados de la maduración. Este proceso está regulado por Ca²⁺/calmodulina (Russell, D. G., 2005). El punto exacto en que la maduración está

detenida es todavía incierto. Varios estudios sugieren que *M. tuberculosis* inhibe la producción de Ca^{2+} asociada normalmente a la fagocitosis (Hesvitk *et al.* 2005). Esto interferiría en la activación por calmodulina de la fosfatidilinositol 3-cinasa o de la unión de EEA1 al fosfatidilinositol 3-fosfato, con la consiguiente interrupción de la maduración del fagosoma (Hesvitk *et al.* 2005). El ManLAM se ha asociado con la inhibición de la producción de Ca^{2+} y, junto con la fosfatasa ácida SapM, con el mantenimiento de unos niveles bajos de fosfatidilinositol 3-fosfato en los fagosomas micobacterianos (Deretic *et al.*, 2006).

1.9.2. Estimulación de la respuesta inmune específica

Los macrófagos y las células dendríticas tienen un papel crucial en la estimulación de la respuesta inmune específica a través de la presentación de antígenos y la producción de citocinas. *M. tuberculosis* es capaz de inhibir la presentación de antígenos por parte de los macrófagos, mientras que induce la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) y de moléculas CD1 presentadoras de lípidos, en las células dendríticas. Por ello, y por su capacidad de migrar a los ganglios linfáticos, se considera que las células dendríticas son esenciales en la estimulación de células T *naives* durante la infección por *M. tuberculosis* (Flynn y Chan, 2005).

Las células dendríticas pueden captar antígenos libres o fagocitar microorganismos y restos celulares procedentes de apoptosis o necrosis celular (Mendelson *et al.*, 2005). La endocitosis de *M. tuberculosis* por las células dendríticas está mediada por la lectina de tipo C DC-SIGN, a través de ligandos como el ManLAM (Mendelson *et al.*, 2005). *M. tuberculosis* también interacciona con los TLR de las células dendríticas modulando su activación; así, la lipoproteína de 19 kDa induce la producción de las citocinas proinflamatorias IL-12, TNF- α e IL-6 vía TLR-2 (Mendelson *et al.*, 2005). Una vez endocitados, los bacilos se localizan en vacuolas que pueden madurar a endosomas/lisosomas tardíos facilitando el procesamiento y presentación de antígenos (Mendelson *et al.*, 2005).

Tras la captación de antígenos, las células dendríticas experimentan un proceso de maduración, crítico para la correcta estimulación de las células T. Este proceso implica la expresión de receptores de quimiocinas para migrar a los ganglios linfáticos, la expresión de moléculas presentadoras de antígenos y moléculas coestimuladoras, y la

producción de IL-12 para inducir una respuesta Th1 esencial en el control de la infección por *M. tuberculosis* (Mendelson *et al.*, 2005). *In vitro* se ha comprobado que la endocitosis de *M. tuberculosis* puede estimular la maduración de las células dendríticas, induciendo la producción de IL-12 vía TLR2; o bien inhibirla mediante la producción de IL-10 en respuesta a la unión ManLAM-DC-SIGN (Flynn y Chan, 2005). Estas diferencias influirían, finalmente, en la inducción de una respuesta inmune adaptativa o en la inducción de tolerancia, por lo que se han asociado con el grado de virulencia de *M. tuberculosis* (Mendelson *et al.*, 2005).

Una vez en los ganglios linfáticos, las células dendríticas estimulan la activación y proliferación de las células T en células efectoras de diferentes subtipos, incluyendo células T CD4 y CD8, células T $\gamma\delta$, y células T restringidas para CD1 (Mendelson *et al.*, 2005). Las células T activadas migran a los lugares de inflamación donde reconocen los antígenos presentados por las células infectadas. La principal función de las células T sería activar los macrófagos mediante la producción de IFN- γ y TNF- α . Además, algunas funciones efectoras incluirían la producción de perforinas y granulinas para lisar los macrófagos infectados y eliminar las bacterias, y la inducción de la apoptosis de los macrófagos infectados vía TNF- α o vía interacción Fas/FasL.

1.9.3. Mecanismos efectores del macrófago activado

La activación de los macrófagos para la eliminación de *M. tuberculosis* requiere las citocinas IFN- γ y TNF- α . Las células NK y las células T $\gamma\delta$ producen IFN- γ en respuesta a diversos antígenos de *M. tuberculosis* antes de que se desarrolle completamente la respuesta adaptativa (Mendelson *et al.*, 2005). Posteriormente, el IFN- γ es producido por las células Th1 CD4 y CD8, mientras que el TNF- α lo producen principalmente las células T CD4 y los macrófagos. *M. tuberculosis* altera la respuesta de los macrófagos al IFN- γ , antagónicamente en algunos casos y sinérgicamente en otros (Schnappinger *et al.*, 2006).

Algunos de los mecanismos efectores del macrófago activado incluyen la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno, mediante la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), e intermediarios reactivos de oxígeno (Flynn y Chan, 2001). El mecanismo bactericida de estos últimos no sería demasiado importante en la infección por *M. tuberculosis*, ya que el bacilo dispone de diversos mecanismos de resistencia como la producción de enzimas detoxificantes. Aunque también se han descrito factores

de resistencia a los intermediarios reactivos de nitrógeno, la capacidad bactericida de estos compuestos sería más importante, como muestra la mayor sensibilidad de ratones deficientes en iNOS a la infección por *M. tuberculosis* (Flynn y Chan, 2001).

En el macrófago activado, además, se desbloquea la maduración de los fagosomas que se fusionan con los lisosomas permitiendo la eliminación de las bacterias (Russell, D. G., 2005). Estudios recientes implican a la GTPasa LRG-47 (o IRGM) en este proceso. Esta proteína, cuya expresión se induce en respuesta al IFN- γ , actuaría como mediador de la respuesta de los macrófagos activados frente a *M. tuberculosis*, en un proceso independiente de iNOS. Los ratones deficientes en LRG-47 son incapaces de controlar la infección (Russell, D. G., 2005).

La activación de los macrófagos por el IFN- γ también induce autofagia, una vía degradativa mediante la que se engloban componentes citoplasmáticos en una vacuola que se fusiona con el lisosoma (Deretic, V., 2006). Este proceso, que forma parte de la homeostasis celular, se ha reconocido recientemente como un mecanismo efector de la respuesta inmune innata y específica frente a patógenos intracelulares. Además de permitir la eliminación de las bacterias, la autofagia es también importante en la presentación de antígenos por el MHC II. La GTPasa LRG-47 también se ha relacionado con la inducción de autofagia mediada por IFN- γ (Deretic, V., 2006).

La apoptosis es otro mecanismo de control del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* (Bocchino *et al.*, 2005). A diferencia de la necrosis, la apoptosis es un proceso autolimitado, no induce una respuesta inflamatoria patológica, y los restos celulares son rápidamente eliminados por los fagocitos circundantes. La endocitosis de estas vesículas apoptóticas por las células dendríticas es esencial en la presentación de antígenos para la estimulación de las células T CD8 (Bocchino *et al.*, 2005). Algunos compuestos de *M. tuberculosis*, como el LM o la lipoproteína de 19 kDa, inducen la apoptosis de macrófagos mientras que otros, como el ManLAM, la inhiben.

1.10. La tinción con rojo neutro

1.10.1. Introducción histórica

1.10.1.1. La tinción con rojo neutro como prueba de virulencia

Durante los años 1930 y 1950 se llevaron a cabo numerosos estudios encaminados a identificar marcadores de virulencia de *M. tuberculosis*. Inicialmente,

Introducción

estos trabajos se fijaron en características morfológicas, como la rugosidad de la colonia o la disposición en forma de cuerdas de las células (Steenken *et al.*, 1934; Middlebrook *et al.*, 1947). Posteriormente, se desarrollaron diversas reacciones citoquímicas basadas en la reducción de colorantes redox (Bloch, H., 1950; Wilson *et al.*, 1952), o en la tinción con colorantes básicos (Desbordes, J., 1953; Desbordes y Fournier, 1954). En este contexto Dubos y Middlebrook, en 1948, describieron la tinción con rojo neutro (Dubos y Middlebrook, 1948). Estos autores observaron que la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv, en un ambiente alcalino en el que el rojo neutro es amarillo, reducía y fijaba el colorante en su forma ácida tiñéndose de rojo (rojo neutro positivo, RN⁺); mientras que la cepa avirulenta H37Ra permanecía amarilla en las mismas condiciones (rojo neutro negativo, RN⁻). El análisis de 22 cepas del bacilo de la tuberculosis de origen humano y bovino, y de la cepa atenuada BCG les permitió concluir que la capacidad de reducir el rojo neutro era característica de las cepas virulentas.

Esta reacción pronto despertó el interés de muchos investigadores que realizaron numerosos estudios para comprobar la validez de esta técnica como marcador de virulencia (Hauduroy y Posternak, 1949; Viallier y Tigaud, 1953; Morse *et al.*, 1953; Hughes *et al.*, 1954). En estos trabajos se analizaron centenares de bacilos de la tuberculosis aislados de lesiones patológicas humanas, bovinas y aviares, así como cepas de laboratorio. También se estudiaron centenares de micobacterias no tuberculosas, bacterias de otros géneros y levaduras. Todos los bacilos de la tuberculosis virulentos dieron un resultado positivo para la tinción mientras que, la cepa avirulenta *M. tuberculosis* H37Ra, la cepa atenuada BCG, casi todas las micobacterias no tuberculosas y el resto de bacterias y levaduras analizadas fueron RN⁻. Además, en varios de estos trabajos los resultados de la tinción se compararon con la capacidad de causar enfermedad en cobayas, obteniéndose una buena correlación entre cultivo positivo para el bacilo de la tuberculosis, virulencia en animal y tinción con rojo neutro (Richmond y Cummings, 1950; Morse *et al.*, 1953; Hughes *et al.*, 1954).

Aún así, se describieron algunas excepciones. Hauduroy y Posternak (1949) detectaron 4 micobacterias no tuberculosas RN⁺, aunque con cierto grado de virulencia en cobaya. Richmond y Cummings (1950) aislaron de un rábano una micobacteria no patógena pero RN⁺ que corresponde al actual *M. terrae*, un saprófito que raramente se ha asociado con patología en humanos. El caso contrario fue documentado por Ingrao y

Vetere (1952) con 5 micobacterias no tuberculosas, virulentas para la cobaya pero RN⁻ (aunque no analizaron las micobacterias recuperadas del animal). A pesar de estas raras excepciones los diferentes autores coincidieron en la utilidad de la reacción con rojo neutro como prueba de virulencia para el bacilo de la tuberculosis, y resaltaron las ventajas económicas, de rapidez y seguridad, frente al método utilizado normalmente, la inoculación de cobayas.

1.10.1.2. Aspectos técnicos y observaciones sobre la tinción

Además de estudiar la relación de la tinción con la virulencia, varios trabajos profundizaron en aspectos más técnicos de la reacción. El rojo neutro es un colorante indicador de pH de la familia de las fenazinas, rojo a pH ácido virando a amarillo a pH 6,8-8,0. Este cambio de color responde a una protonación en el nitrógeno del anillo central (Lillie, R. D., 1977) (Fig. 1.8). En la tinción con rojo neutro el colorante está en un ambiente alcalino y es amarillo, las cepas avirulentas lo fijan en la forma básica mientras que las cepas virulentas lo hacen en la forma catiónica roja. Por lo tanto, para que la reacción se produzca correctamente, hay varios parámetros que se deben tener en cuenta: presencia de contaminantes ácidos, pH del tampón de tinción y concentración del colorante.

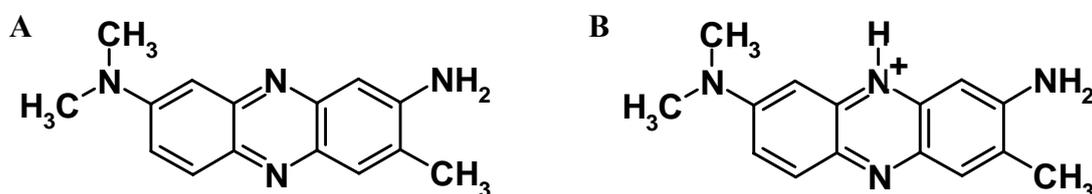


Figura 1.8. Formas de ionización del rojo neutro. En un ambiente alcalino (pH>8) el colorante está en su forma básica y es amarillo (A). En un ambiente ácido (pH<6,8) el colorante se encuentra en su forma catiónica monovalente y es rojo (B).

En su artículo de 1948, Dubos y Middlebrook señalaban que la tinción se podía ver enmascarada por componentes del medio de cultivo por lo que era necesario lavar las células antes de teñirlas. Indicaron que los mejores resultados se obtenían con dos lavados de 1 hora a 37°C con metanol al 50%. Contrariamente, Viallier y Tigaud que visualizaban al microscopio la tinción de colonias resuspendidas en agua, afirmaban que la ausencia de lavados con metanol no afectaba al resultado (Viallier y Tigaud, 1953). Desbordes y colaboradores (1955a), que analizaron el efecto de lavados con agua, metanol, metanol+éter, acetona y metanol+acetona, obtuvieron los resultados más

Introducción

claros al lavar con metanol+éter y los peores con agua, recomendando en cualquier caso, realizar dos lavados previos a la tinción.

En cuanto al tampón de tinción, Dubos y Middlebrook usaron tampón barbital sugiriendo que se podía usar cualquier tampón que fuera alcalino. Esta opinión fue mantenida también por el resto de autores que especificaron además que el pH debía ser de 8,9 (Hauduroy y Posternak, 1949; Viallier *et al.*, 1950). Desbordes y colaboradores estudiaron el efecto del pH sobre la tinción confirmando la necesidad de realizar la reacción a pH básico ya que a pH muy ácido ninguna cepa se teñía y a pH neutro se teñieron todas de color rosa (Desbordes *et al.*, 1955b).

Aunque Dubos y Middlebrook no especificaron la concentración de colorante que utilizaban, sí que indicaron que la cantidad de colorante retenido por las células de las cepas virulentas equivalía al 1% de su peso seco; y que si se usaba una concentración suficientemente baja, las células fijaban todo el colorante y el tampón de tinción quedaba incoloro. Richmond y Cummings (1950) fueron los primeros en precisar que usaban una concentración final de rojo neutro del 0,002% (p/v), recomendada también por Hughes y colaboradores (1954) y adoptada en la mayoría de trabajos subsiguientes. Desbordes y colaboradores (1955b) hallaron que la reacción era tanto más rápida cuanto mayor era la dilución de rojo neutro.

Otra observación interesante hace referencia a la intensidad de la tinción. Varios autores describieron diferencias en la coloración de las distintas cepas (Hauduroy y Posternak, 1949; Viallier *et al.*, 1950; Richmond y Cummings, 1950; Morse *et al.*, 1953). Así, mientras que las cepas avirulentas se teñían de amarillo, la cepa atenuada BCG adquiría una coloración rosácea característica, y las cepas virulentas se teñían con diferentes tonalidades de rojo pero siempre más que la BCG. La intensidad de la tinción era característica de cada cepa y se mantenía en el tiempo. Aunque el resultado de la tinción se correlacionaba con la virulencia, varios trabajos mostraron que la intensidad de la tinción de las cepas positivas no estaba directamente relacionada con el grado de virulencia en el animal (Richmond y Cummings, 1950; Viallier y Tigaud, 1952a). En 1964, otros autores realizaron un estudio similar, incorporando además un método de cuantificación de la cantidad de colorante fijado por las células, ya fuera en la forma ácida roja o en la forma básica amarilla (Muftic y Tuncman, 1964). Para ello eliminaban el colorante no unido mediante un lavado con metanol al 50%, y extraían el colorante retenido por las células tratándolas durante 10 horas con una solución fuertemente

ácida. Observaron que no existía una correlación entre el resultado de la tinción y la cantidad de colorante unido, ni entre la intensidad de la tinción o la cantidad de rojo neutro y el grado de virulencia en animal (Muftic y Tuncman, 1964).

Viallier y Tigaud, en un intento de obtener una lectura objetiva de la reacción, desarrollaron un método espectroscópico de cuantificación de la tinción (1952b). Utilizando este método y la observación con el microscopio de colonias teñidas, estudiaron la tinción en las distintas fases de crecimiento. Observaron que los cultivos jóvenes (de menos de 4 días) no se teñían, mientras que todas las células en fase exponencial se teñían, y sólo lo hacían el 80% de las células en fase estacionaria (Viallier y Tigaud, 1953). Tanto analizando las colonias como el cultivo líquido, advertían que sólo se teñían las células en división. Sin embargo, también señalaron que las bacterias no viables, ya fuera inactivadas en la autoclave o tratadas con antibióticos o por otros métodos, conservaban la capacidad de teñirse (Viallier y Tigaud, 1953). Así mismo, estudiaron la estabilidad de la tinción al mantener las cepas en el laboratorio. Aunque ésta no variaba si se mantenían en un medio rico, al cultivar las células en medio pobre la intensidad de la tinción disminuía con las resiembras hasta perderse, siendo este efecto tanto más rápido cuanto más pobre era el medio. Estas cepas que se habían vuelto RN⁻ eran todavía virulentas en cobaya, aunque en menor grado, y al recuperarlas del animal habían recobrado la capacidad de teñirse (Viallier y Tigaud, 1953).

Por último también se estudió la tinción de bacterias *in vivo*. Viallier y Tigaud (1953) resaltaron que todos los intentos que habían realizado para teñir los bacilos directamente en muestras patológicas habían resultado negativos. Más adelante, Segal y Bloch se propusieron estudiar las bacterias crecidas *in vivo*, comparándolas con las mismas crecidas en medio de cultivo. Para ello infectaban ratones con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, recuperando posteriormente los bacilos de homogenados de pulmón por centrifugación diferencial. En varios trabajos describieron que existían diferencias metabólicas, bioquímicas, inmunogénicas y patogénicas entre las bacterias crecidas *in vivo* e *in vitro*. Entre estas diferencias se incluía también la tinción con rojo neutro, negativa en *M. tuberculosis* recuperado del animal (Segal, W., 1965). Se comprobó que éste no era un efecto del proceso de separación, sometiendo la cepa crecida *in vitro* al mismo protocolo. Segal atribuyó esta diferencia a la distinta composición lipídica de *M. tuberculosis* crecido *in vivo* y no descartaba la posibilidad

de que el compuesto responsable de la tinción fuera secretado cuando *M. tuberculosis* se multiplicaba *in vivo*.

1.10.1.3. La tinción con rojo neutro en la identificación y clasificación de las micobacterias

Durante los años en que se desarrolló y estudió la tinción con rojo neutro se produjo un paulatino reconocimiento de la existencia de otras micobacterias, diferentes de *M. tuberculosis*, capaces de causar patología en humanos. La introducción de la quimioterapia a finales de los años 1940 supuso un aumento en el uso del cultivo para el diagnóstico de la tuberculosis, ya que permitía analizar la sensibilidad a fármacos (Wayne, L. G., 2000). Hasta entonces, el diagnóstico se había limitado a la observación de bacilos ácido-alcohol resistentes directamente en la muestra concentrada, por lo que muchas micobacterias atípicas se diagnosticaban como *M. tuberculosis*. El aislamiento rutinario de las micobacterias resultó en un incremento del número de casos en los que se identificaban, como causantes de la enfermedad, micobacterias con características diferentes de *M. tuberculosis* que se denominaron micobacterias atípicas (Wayne, L. G., 2000). El hecho de que muchas de estas micobacterias fueran además resistentes a los fármacos antituberculosos urgía el desarrollo de técnicas para su identificación.

La clasificación de Runyon, según la velocidad de crecimiento y la formación de pigmentos, significó sin duda una revolución en la sistemática de las micobacterias y fue rápidamente adoptada por los laboratorios clínicos (Wayne, L. G., 2000). Aunque permitía una interpretación aproximada de la significación patológica que podía tener la micobacteria aislada, pronto se hizo evidente que los grupos de Runyon eran en sí heterogéneos y que se requería una identificación más precisa. Además de desarrollarse nuevas pruebas y adaptarse las utilizadas en la clasificación de otras bacterias, las pruebas de virulencia, diseñadas inicialmente para diferenciar el bacilo de la tuberculosis del resto de micobacterias, se reevaluaron para la sistemática de las recién reconocidas micobacterias de crecimiento lento (Wayne, L. G., 2000). La tinción con rojo neutro de muchas de las cepas analizadas fue negativa, pero también se aislaron un buen número de cepas RN⁺, tanto fotocromógenas como escotocromógenas y no cromógenas (Koch y Kroll, 1960; Tarshis, M. S., 1963; Kaur y Chitkara, 1964; Lal *et al.*, 1972). Se observaron diferencias en la intensidad de la tinción que era fuerte o moderada en el caso de *M. tuberculosis* y leve o moderada en el de las micobacterias atípicas RN⁺ (Tarshis, M. S., 1963).

Puesto que la tinción de las micobacterias atípicas era variable, Wayne desarrolló una prueba modificada con la que obtenía un resultado uniformemente positivo para todas las micobacterias atípicas virulentas (Wayne, *et al.*, 1957). Para ello, cultivaba las micobacterias sobre membranas o filtros y teñía directamente las microcolonias, observando al microscopio el resultado de la tinción y la formación de cuerdas en las cepas RN⁺. Realizaba la tinción con una solución saturada de rojo neutro en alcohol ácido, después las “revelaba” con un tampón básico y eliminaba con etanol el colorante no unido. Aunque algunas micobacterias avirulentas (tanto saprófitas como *M. tuberculosis* H37Ra) con este método eran RN⁺, las diferenciaba de las virulentas por que no formaban cuerdas (Krasnow *et al.*, 1955). Posteriormente, desarrolló una prueba semicuantitativa que, en función del pH y del tiempo que tardaban las células en decolorarse, le permitía diferenciar algunas micobacterias atípicas entre sí y de las micobacterias saprófitas y *M. tuberculosis* (Wayne, L. G., 1959). El método modificado de Wayne era algo más útil en la clasificación de las micobacterias que la tinción clásica y permitía, junto con la formación de cuerdas, determinar la virulencia las micobacteria. Sin embargo, el mecanismo de la reacción probablemente difería del de la tinción clásica, como muestra el hecho que cepas avirulentas y atenuadas, como *M. tuberculosis* H37Ra y *M. bovis* BCG, se tiñeran igual que las cepas virulentas.

Tanto la tinción con rojo neutro como el resto de pruebas estudiadas, por sí solas, no permitían identificar todas las micobacterias, por lo que se ensayaron combinaciones de pruebas para la clasificación de las micobacterias. Tarshis evaluó el uso conjunto de la prueba de la peroxidasa, la producción de niacina, el crecimiento en tioglicolato, la formación de cuerdas y la tinción con rojo neutro (Tarshis, M. S., 1961 y 1963). La combinación de estos métodos le permitía clasificar la mayoría de micobacterias, y la tinción con rojo neutro, junto con la formación de cuerdas, posibilitaba la determinación de la virulencia de casi todas las micobacterias (Tarshis, M. S., 1961). Finalmente, en 1972, otros autores investigaron la incidencia de las micobacterias atípicas en la tuberculosis humana y presentaron un esquema de identificación y clasificación basado en una combinación de pruebas bioquímicas y culturales que incluían la tinción con rojo neutro (Lal *et al.*, 1972).

A parte de la posible utilidad de la tinción, junto con otras pruebas, en la clasificación e identificación de las micobacterias, estos estudios muestran que, si bien la tinción con rojo neutro es una prueba de virulencia para *M. tuberculosis* (ya que

permite diferenciar las cepas virulentas de las avirulentas o atenuadas y de la mayoría de micobacterias saprófitas), no sería extensible como prueba de virulencia para todas las micobacterias ya que el resultado es variable para las micobacterias patógenas oportunistas.

1.10.1.4. Estudios sobre el mecanismo de la tinción

El desarrollo de las pruebas de virulencia, incluida la tinción con rojo neutro, perseguía dos finalidades: (1) disponer de un método rápido y fácil para la identificación de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*, y (2) profundizar en los mecanismos de patogenicidad mediante la identificación de los compuestos responsables de las características diferenciales entre cepas virulentas y avirulentas.

El primer estudio del mecanismo de la tinción con rojo neutro se publicó tan sólo dos años después de la descripción de la reacción (Asselineau y Lederer, 1950). Estos autores extrajeron con cloroformo las “ceras” de diferentes cepas, previamente tratadas con alcohol-éter, y las separaron en una fracción soluble en acetona hirviendo y otra insoluble en las mismas condiciones. La fracción soluble constituía la fracción mayoritaria de las cepas atenuadas, mientras que en las cepas virulentas la mayor parte de las “ceras” se encontraban en la fracción insoluble. La fracción soluble de las cepas virulentas contenía principalmente ácidos micólicos y la fracción insoluble consistía en un lipopolisacárido con fósforo y nitrógeno. La tinción con rojo neutro de estas fracciones mostró que el lipopolisacárido se teñía fuertemente y que los ácidos micólicos lo hacían débilmente. Como no detectaron estos compuestos en las cepas atenuadas RN⁻ y las fracciones correspondientes no se teñían, concluyeron que el lipopolisacárido y, en menor medida, los ácidos micólicos eran responsables de la tinción. Trabajos posteriores mostrarían que el lipopolisacárido corresponde en realidad al peptidoglicano y el arabinogalactano (Singleton *et al.*, 1970), por lo que resulta realmente sorprendente que no lo detectaran en las cepas atenuadas, al igual que en el caso de los ácidos micólicos.

El mismo año otros autores, utilizando colorantes indicadores de oxidorreducción, encontraron diferencias en el potencial de oxidorreducción de las cepas virulentas y avirulentas. Sugirieron que el rojo neutro penetraría en las células y los diferentes enzimas de oxidorreducción harían que las cepas virulentas se tiñeran de rojo y de amarillo las avirulentas (Desbordes y Fournier, 1950). Posteriormente, los

propios autores descartaron este mecanismo en vista de que, según Viallier, las bacterias esterilizadas en la autoclave se teñían (Paraf *et al.*, 1952).

En la literatura alemana se encuentran otras dos referencias sobre el mecanismo de la reacción. En el primero, la tinción se atribuyó a ácidos grasos libres aislados en extractos de cloroformo (Kölbel, H., 1957). Mientras que, en el segundo, estudiaron la reacción de diferentes componentes celulares purificados (lípidos, proteínas y polisacáridos), y concluyeron que las endoproteínas, probablemente complejos de glicoproteínas y lipoproteínas, eran responsables de la tinción (Hirsch y Cattaneo, 1958).

Estos trabajos quedarían olvidados cuando, en 1959, Middlebrook y colaboradores aislaron el SL como compuesto responsable de la tinción (Middlebrook *et al.*, 1959). Para ello obtuvieron extractos con hexano y decilamina (0,05%) de las cepas virulentas *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* Vallée, de dos cepas de BCG y de la cepa avirulenta H37Ra; y cuantificaron espectrofotométricamente la capacidad de estos extractos de fijar el rojo neutro de una solución acuosa (actividad rojo neutro o NRA, *Neutral Red Activity*). Este valor se correlacionaba bien con el resultado de la tinción, por lo que concluyeron que el extracto contenía el compuesto responsable de la tinción. El posterior fraccionamiento del extracto de la cepa H37Rv por cromatografía en columna, les permitió aislar dos fracciones con la mayor parte de la NRA del extracto y que contenían azufre. Caracterizaron parcialmente el SL comprobando que se trataba de un lípido no descrito hasta el momento. Como el extracto de la cepa avirulenta H37Ra no fijaba el rojo neutro y no contenía SL concluyeron que este componente de la envuelta celular era el responsable de la tinción.

A partir de este trabajo la atención se centró en el SL. Middlebrook dirigió dos estudios en los que se conseguía una purificación parcial del SL y se establecía una correlación significativa entre la capacidad infectiva en cobayas y la cantidad de SL producido por aislados clínicos de *M. tuberculosis* (Ito *et al.*, 1961; Gangadharam *et al.*, 1963). Goren demostró que el SL era en realidad una familia de aciltrealosas sulfatadas cuyo componente mayoritario era el SL-I del que dilucidó la estructura (1970a y 1970b). El valor de NRA se utilizó para desarrollar un método analítico para la cuantificación de SL (Goren *et al.*, 1974) y también se propuso como un indicador *in vitro* de la virulencia (Grange *et al.*, 1978). Estas observaciones hicieron que la idea de que el SL era el responsable de la tinción con rojo perdurara hasta nuestros días (Daffé and Draper, 1998; Rivera-Marrero *et al.*, 2002).

1.10.2. Trabajos recientes sobre la tinción con rojo neutro

1.10.2.1. La tinción con rojo neutro y el sulfolípid

En realidad de los trabajos de Middlebrook y Goren no se deduce una relación tan clara entre SL y tinción. Middlebrook analizó el extracto de una cepa de BCG, parcialmente atenuada y RN⁺, y no detectó SL (Middlebrook *et al.*, 1959). Atribuyó la tinción de esta cepa a fosfolípidos, aunque no los cuantificó ni en ésta ni en las otras cepas analizadas. Goren probó que *M. bovis*, RN⁺, no sintetiza SL (Goren, M. B., 1970a) y también en este caso se asignó la fijación de rojo neutro a los fosfolípidos. Así mismo, Goren y colaboradores demostraron que los extractos de hexano, cuya NRA se había correlacionado con el resultado de la tinción, contenían en realidad una mezcla de lípidos ácidos, incluyendo fosfolípidos y SL (Goren *et al.*, 1974). Si bien en algunas cepas, como la H37Rv, la NRA de estos extractos se debía principalmente al SL, en otras cepas de *M. tuberculosis*, los fosfolípidos y/u otros compuestos acídicos contribuían mayormente a la NRA (Goren *et al.*, 1974). Además, se debe tener en cuenta que la tinción con rojo neutro se caracteriza por la capacidad de las células de fijar el colorante en su forma ácida en un ambiente alcalino, y estos trabajos se basaban en la NRA, que se estima en un ambiente neutro o ácido, por lo que no tiene porque reflejar la reacción citoquímica original.

Teniendo en cuenta estas observaciones, en nuestro laboratorio en colaboración con la Dra. Marina Luquin del Departament de Genètica i de Microbiologia de la UAB, se planteó estudiar la relación del SL y otros lípidos acídicos con la tinción. Inicialmente, se estudió la técnica, estableciéndose que las mejores condiciones para obtener una tinción diferencial clara son: realizar dos lavados con metanol al 50% y utilizar para la tinción una solución de rojo neutro al 0,002% en barbital a pH 9,8 (Soto, C. Y., 2002; y Soto *et al.*, 2002). Los resultados se evaluaban al cabo de 1 y 24 h.

Con la tinción estandarizada se analizaron 27 aislados clínicos de *M. tuberculosis* y las cepas de laboratorio H37Rv y H37Ra (Soto, C. Y., 2002; y Soto *et al.*, 2002). Las cepas virulentas fueron todas RN⁺, mientras que la cepa avirulenta H37Ra era RN⁻. El análisis del contenido en SL de estas cepas reveló que todas producían SL excepto la cepa H37Ra y, sorprendentemente, el aislado clínico MT103 (Soto, C. Y., 2002). El hecho de que una cepa de *M. tuberculosis* virulenta y RN⁺ no sintetizara SL, cuestionaba seriamente la relación entre este glicolípid y la tinción.

Posteriormente, la tinción de un mutante de *M. tuberculosis* H37Rv en el gen *pks2* (Sirakova *et al.*, 2001), deficiente en la síntesis de SL, mostró que era RN⁺ como la cepa salvaje, descartando definitivamente que existiera una relación directa entre este glicolípido y la tinción con rojo neutro de *M. tuberculosis* (Andreu *et al.*, 2004a).

Para estudiar si los fosfolípidos u otros lípidos ácidos de *M. tuberculosis* estaban implicados en la tinción, se purificaron y cuantificaron los lípidos más relevantes de un aislado clínico de *M. tuberculosis*, de la cepa MT103, y de las cepas de laboratorio H37Rv y H37Ra (Soto, C. Y., 2002). Este estudio mostró que el perfil glicolípídico de las cepas de *M. tuberculosis* RN⁺ y RN⁻ es muy similar cuantitativa y cualitativamente; que los valores de NRA de los extractos de lípidos totales son también análogos entre las cepas RN⁺ y RN⁻; y que la mayor contribución a la NRA, tanto en las cepas RN⁺ como en las RN⁻, corresponde a los fosfolípidos y PIM, siendo mucho menor la del SL. Esto permitió concluir que ni el SL, ni los fosfolípidos, ni los PIM están directamente relacionados con la fijación de rojo neutro de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*. Tampoco se pudo establecer una correlación entre el contenido de otros lípidos y la tinción (Soto, C. Y., 2002).

1.10.2.2. Clonación de los genes implicados en la tinción con rojo neutro por complementación heteróloga de *M. smegmatis*

Una vez descartada la implicación del SL y otros lípidos ácidos en la tinción, y teniendo en cuenta la relación de la tinción con la virulencia de *M. tuberculosis*, se planteó identificar el compuesto responsable de esta reacción citoquímica. Para ello se construyó una genoteca de *M. tuberculosis* H37Rv en *M. smegmatis*, una micobacteria no patógena y de crecimiento rápido utilizada por estos motivos como huésped heterólogo en estudios moleculares de *M. tuberculosis*. Puesto que *M. smegmatis* es RN⁻, el aislamiento de clones recombinantes RN⁺ y el posterior análisis de los genes clonados permitirían identificar los genes implicados en la tinción. Para facilitar el análisis de los clones recombinantes de *M. smegmatis*, inicialmente se desarrolló un método de tinción en placa (Soto, C. Y., 2002) y, posteriormente, se utilizó un medio de cultivo modificado que contenía rojo neutro (Andreu *et al.*, 2004b). De este modo se consiguieron aislar 5 clones recombinantes de *M. smegmatis* RN⁺. El análisis del contenido lipídico de estos clones mostró que era muy similar al de la cepa salvaje de *M. smegmatis* y no permitió detectar SL ni ningún otro lípido característico de *M. tuberculosis* (Soto, C. Y., 2002).

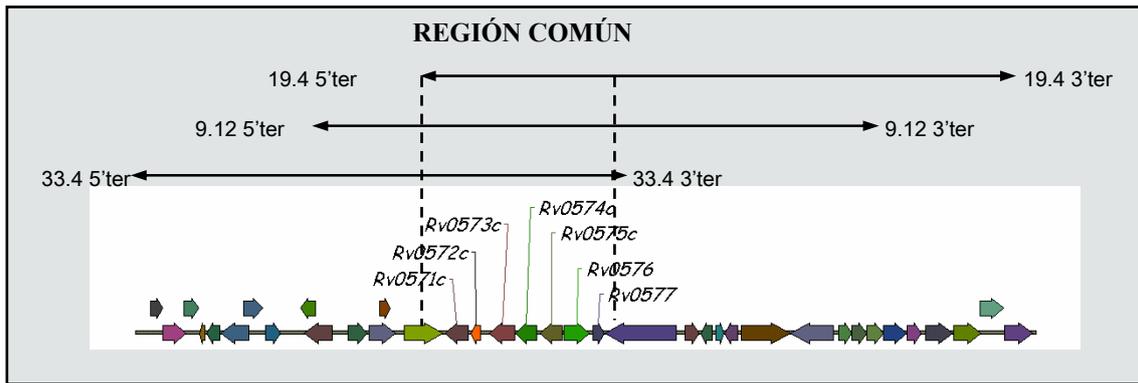


Figura 1.9. Localización, en el cromosoma de *M. tuberculosis*, de los insertos de los clones recombinantes de *M. smegmatis* RN⁺ 9.12, 33.4 y 19.4; así como de la región común y los 7 ORF completos que contiene. Adaptado de Andreu *et al.*, 2004b.

La secuenciación de los extremos de los insertos de los clones de *M. smegmatis* RN⁺ permitió establecer una región común de 11 kb que contenía 7 ORFs completos (Fig. 1.9). Mediante posteriores deleciones y clonaciones de los genes de la región común, se determinó que el gen *Rv0577* era el único necesario para conferir el fenotipo RN⁺ a *M. smegmatis* (Fig. 1.10) (Andreu *et al.*, 2004b). La expresión de la proteína *Rv0577* se comprobó mediante Western-blot, correlacionándose con el fenotipo rojo neutro de los clones de *M. smegmatis*. El análisis transcripcional del gen *Rv0577* reveló que se cotranscribe con el gen *Rv0576* (Andreu *et al.*, 2004b), que codifica un posible regulador transcripcional de la familia SmtB/ArsR, con el dominio de unión al DNA en el extremo N-terminal.

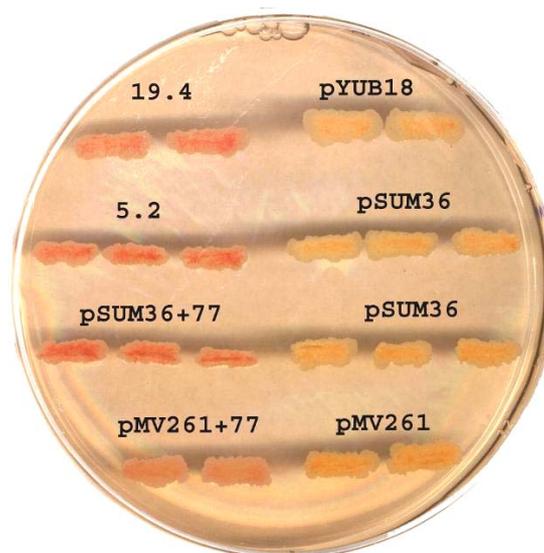


Figura 1.10. Clones recombinantes de *M. smegmatis* crecidos en medio modificado con rojo neutro. Se muestran los clones RN⁺ 19.4, aislado de la genoteca; 5.2, con los genes *Rv0575c*, *Rv0576* y *Rv0577*; y pSUM36+77 y pMV261+77, únicamente con el gen *Rv0577*. Los clones RN⁻ son los controles correspondientes, con el vector sin inserto. Adaptado de Andreu *et al.*, 2004b.

Los resultados obtenidos en *M. smegmatis* indican pues que el producto del gen *Rv0577* estaría relacionado con la tinción con rojo neutro de los clones recombinantes de *M. smegmatis*, ya sea directamente en la fijación y reducción del colorante o indirectamente mediante la síntesis del compuesto responsable. Así mismo, el gen *Rv0576*, que forma un operón con el gen *Rv0577*, podría estar relacionado con la tinción participando en la función de la proteína *Rv0577* o bien regulando su expresión.

El gen *Rv0577*, exclusivo del complejo *M. tuberculosis* (Huard *et al.*, 2003), codifica una proteína de función desconocida similar a proteínas hipotéticas y a hidroxilasas de *Streptomyces*. La proteína *Rv0577*, también denominada TB27.3 y CFP32, corresponde al antígeno de 27 kDa CFP30B aislado del sobrenadante de cultivos jóvenes (Rosenkrands *et al.*, 2000). Las proteínas aisladas de este compartimiento, al ser secretadas o estar situadas en la superficie celular, serían importantes en la interacción huésped-patógeno; por lo que han centrado el interés de muchas investigaciones para el desarrollo de vacunas de subunidades y de pruebas de diagnóstico. La proteína *Rv0577* se ha detectado en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis y es reconocida por el suero de enfermos pero no por el de infectados o vacunados (Huard *et al.*, 2003; Benabdeselem *et al.*, 2006). Además, los niveles de esta proteína se han correlacionado con los niveles de la citocina inmunosupresora IL-10 (Huard *et al.*, 2003). El exceso de producción de IL-10 y del factor de crecimiento tumoral TGF- β , observados durante la tuberculosis activa, inhibe los efectos de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ y el TNF- α , y se ha asociado con el progreso de la enfermedad (Flynn y Chan, 2001). Todas estas observaciones sugerirían un posible papel de la proteína *Rv0577* en la virulencia de *M. tuberculosis*.

2. Objetivos

El trabajo realizado en esta tesis se enmarca dentro de una línea de investigación que tiene como principal objetivo el estudio de los determinantes genéticos implicados en la virulencia de *M. tuberculosis*. En concreto, el propósito planteado fue el estudio de las bases moleculares de la tinción con rojo neutro de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*.

En este contexto, y tras haber identificado en trabajos previos el gen *Rv0577* de *M. tuberculosis* como el único necesario para conferir el carácter rojo neutro positivo a *M. smegmatis*, el siguiente paso era estudiar la relación de este gen con la tinción en *M. tuberculosis*. Para ello nos planteamos obtener un mutante de *M. tuberculosis* deficiente en el gen *Rv0577*, y evaluar la capacidad de este mutante de fijar el rojo neutro.

Así mismo, como el gen *Rv0577* forma una unidad transcripcional con el gen *Rv0576* (que codifica un posible regulador transcripcional), nos propusimos construir un mutante de *M. tuberculosis* en el gen *Rv0576* para estudiar la función de esta proteína, y el efecto sobre la expresión del gen *Rv0577* y sobre la tinción con rojo neutro.

Por último, nos planteamos establecer el papel de las proteínas *Rv0576* y *Rv0577* en la patogenia de *M. tuberculosis*, analizando la virulencia de las cepas mutantes en el modelo experimental de ratón.

Los objetivos concretos que se plantearon al iniciarse este trabajo fueron:

1. Obtención de los mutantes de *M. tuberculosis* en los genes *Rv0576* y *Rv0577*.
2. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes.
3. Estudio de la posible función reguladora de la proteína *Rv0576*, análisis de la expresión e identificación de los genes regulados.
4. Análisis de la virulencia en ratón, de las cepas de *M. tuberculosis* mutantes en los genes *Rv0576* y *Rv0577*.

3. Materiales y métodos

3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las características y procedencia de las principales cepas bacterianas y de los plásmidos utilizados en este trabajo, se resumen en las Tablas 3.1 y 3.2. Los oligonucleótidos (Roche), secuencia y aplicación, se describen en la Tabla 3.3.

Tabla 3.1. Descripción de las principales cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Nombre	Genotipo relevante*	Fuente/Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>recA1 endA1 hsdR17 gyrA96 supE44 thi-1 relA1</i> $\Delta(lacZYA-argF)U169 deoR \Phi 80lacZ\Delta M15$	Clontech
<i>M. smegmatis</i>		
mc ² 155		Snapper <i>et al.</i> , 1990
pSM128	mc ² 155 <i>attB</i> ::pSM128	Este trabajo
pSM128+Fus1	mc ² 155 <i>attB</i> ::pSM128+Fus1	Este trabajo
pSM128+Fus9	mc ² 155 <i>attB</i> ::pSM128+Fus9	Este trabajo
pSM128+Fus2	mc ² 155 <i>attB</i> ::pSM128+Fus2	Este trabajo
pSM128+Fus3	mc ² 155 <i>attB</i> ::pSM128+Fus3	Este trabajo
pSM128+Fus4	mc ² 155 <i>attB</i> ::pSM128+Fus4	Este trabajo
pSM128+FusMut	mc ² 155 <i>attB</i> ::pSM128+FusMut	Este trabajo
FusC	pSM128 (pJAM2+76)	Este trabajo
Fus1	pSM128+Fus1 (pJAM2+76)	Este trabajo
Fus9	pSM128+Fus9 (pJAM2+76)	Este trabajo
Fus2	pSM128+Fus2 (pJAM2+76)	Este trabajo
Fus3	pSM128+Fus3 (pJAM2+76)	Este trabajo
Fus4	pSM128+Fus4 (pJAM2+76)	Este trabajo
FusMut	pSM128+FusMut (pJAM2+76)	Este trabajo
<i>M. tuberculosis</i>		
H37Ra		ATCC 25177
H37Rv	$\Delta pks15/1, msl3Y488ocre$	Instituto Pasteur
H37Rv	$\Delta pks15/1$	ATCC 27294
H37Rv::p1NIL Δ 76gm	H37Rv (Pasteur) <i>Rv0575c</i> ::p1NIL Δ 76gm	Este trabajo
H37Rv::p1NIL Δ 77gm	H37Rv (Pasteur) <i>Rv0576</i> ::p1NIL Δ 77gm	Este trabajo
Δ 76	H37Rv::p1NIL Δ 76gm (p1NIL Δ 76gm ⁻) $\Delta Rv0576$	Este trabajo
Δ 77	H37Rv::p1NIL Δ 77gm (p1NIL Δ 77gm ⁻) $\Delta Rv0577$	Este trabajo
pSM128	H37Rv (ATCC 27294) <i>attB</i> ::pSM128	Este trabajo
Fus1	H37Rv (ATCC 27294) <i>attB</i> ::pSM128+Fus1	Este trabajo
Δ 76 pSM128	Δ 76 <i>attB</i> ::pSM128	Este trabajo

Materiales y métodos

Nombre	Genotipo relevante*	Fuente/Referencia
$\Delta 76$ FusI	$\Delta 76$ attB::pSM128+FusI	Este trabajo
$\Delta 76$::Rv0576	$\Delta 76$ attB::pMV361+76	Este trabajo
$\Delta 76$ (pSUM36+76)	$\Delta 76$ (pSUM36+76)	Este trabajo
$\Delta 76$ (pSUM36+76+77)	$\Delta 76$ (pSUM36+76+77)	Este trabajo
$\Delta 77$::Rv0577	$\Delta 77$ attB::pMV361+77	Este trabajo
$\Delta 77$ (pSUM36+77)	$\Delta 77$ (pSUM36+77)	Este trabajo
$\Delta 77$ (pSUM36+76+77)	$\Delta 77$ (pSUM36+76+77)	Este trabajo
H37Rv::Rv0576	H37Rv (ATCC 27294) attB::pMV361+76	Este trabajo
(pMV261)	H37Rv (ATCC 27294) (pMV261)	Este trabajo
(pMV261 $\Delta 77$)	H37Rv (ATCC 27294) (pMV261 $\Delta 77$)	Este trabajo
C27	H37Rv (ATCC 27294) RN ⁺ PDIM ⁻	Este trabajo
C32	H37Rv (ATCC 27294) RN ⁻ PDIM ⁻	Este trabajo
C49	H37Rv (ATCC 27294) RN ⁺ PDIM ⁺	Este trabajo

*O fenotipo relevante si se desconoce el genotipo.

Tabla 3.2. Descripción de los principales plásmidos utilizados en este trabajo. OriE: replicón de *E. coli*. OriM: replicón de *Mycobacterium*. MCS: *Multiple Cloning Site*: sitio de clonación múltiple.

Nombre	Características relevantes	Fuente/Referencia
p1NIL	- Vector de clonación para la obtención de mutantes en <i>Mycobacterium</i> - Km ^R , OriE, MCS, <i>PacI</i>	Parish y Stoker, 2000
pGOAL19	- Vector con casete de genes marcadores para p1NIL - Ap ^R , <i>PacI</i> - <i>hyg</i> -P _{Ag85} <i>lacZ</i> -P _{hsp60} <i>sacB</i> - <i>PacI</i> , OriE	Parish y Stoker, 2000
p1NIL+77.1	- p1NIL con las últimas 1016 pb del ORF <i>Rv0576</i> y las primeras 276 pb del ORF <i>Rv0577</i>	Este trabajo
p1NIL $\Delta 77$	- p1NIL+77.1 con un fragmento de 1,1 kb incluyendo las últimas 92 pb del gen <i>Rv0577</i>	Este trabajo
p1NIL $\Delta 77$ gm	- p1NIL $\Delta 77$ con el casete de genes marcadores <i>hyg</i> -P _{Ag85} <i>lacZ</i> -P _{hsp60} <i>sacB</i> de pGOAL19	Este trabajo
pSUM36	- Vector de clonación para <i>Mycobacterium</i> - Km ^R , OriE, OriM, <i>lacZ</i> ::MCS	Aínsa <i>et al.</i> , 1996
5.2	- pSUM36 con los genes <i>Rv0575c</i> - <i>Rv0576</i> - <i>Rv0577</i> completos y 1,5 kb del gen <i>Rv0578c</i>	Andreu <i>et al.</i> , 2004b
5.2 $\Delta 76$	- 5.2 con delección <i>EcoRV</i> - <i>NruI</i> del ORF <i>Rv0576</i> (+122 a +1108*)	Este trabajo
p1NIL $\Delta 76$	- p1NIL con fragmento <i>SacI</i> - <i>XhoI</i> de 5.2 $\Delta 76$ que incluye 924 pb de <i>Rv0575c</i> , Δ <i>Rv0576</i> y 513 pb de <i>Rv0577</i>	Este trabajo
p1NIL $\Delta 76$ gm	- p1NIL $\Delta 76$ con el casete de genes marcadores <i>hyg</i> -P _{Ag85} <i>lacZ</i> -P _{hsp60} <i>sacB</i> de pGOAL19	Este trabajo
pSM128	- Vector integrativo para la obtención de fusiones con <i>lacZ</i> en <i>Mycobacterium</i> - Sm ^R , OriE, attP/int, T4t- <i>ScaI</i> -sRBS-cIII <i>lacZ</i>	Dussurget <i>et al.</i> , 1999

Nombre	Características relevantes	Fuente/Referencia
pSM128+Fus1	- pSM128 con la fusión del fragmento -238 a +115* de <i>Rv0576</i> y <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSM128+Fus9	- pSM128 con el fragmento -238 a +115* de <i>Rv0576</i> clonado en orientación contraria al <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSM128+Fus2	- pSM128 con la fusión del fragmento -188 a +115* de <i>Rv0576</i> y <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSM128+Fus3	- pSM128 con la fusión del fragmento -125 a +115* de <i>Rv0576</i> y <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSM128+Fus4	- pSM128 con la fusión del fragmento -55 a +115* de <i>Rv0576</i> y <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSM128+FusMut	- pSM128 con la fusión del fragmento -238 a +115* de <i>Rv0576</i> con las mutaciones A-43T, A-42G, A-40G, T-36C, G-23A, C-22G	Este trabajo
pJAM2	- Vector de expresión inducible para <i>Mycobacterium</i> - Km ^R , OriE, OriM, P _{amiC} -MCS-6 his	Triccas <i>et al.</i> , 1998
pJAM2+76	- pJAM2 que contiene el ORF <i>Rv0576</i> bajo el control del promotor de la acetamidasa.	Este trabajo
pMV361	- Vector de expresión integrativo para <i>Mycobacterium</i> - Km ^R , OriE, P _{hsp60} , attP/int	Stover <i>et al.</i> , 1991
pMV361+76	- pMV361 que contiene el ORF <i>Rv0576</i> bajo el control del promotor del gen <i>hsp60</i> _{BCG}	Este trabajo
pSUM36+76	- pSUM36 con el gen <i>Rv0576</i> , incluyendo 209 pb de la región promotora	Este trabajo
pSUM36+76+77	- pSUM36 con el operón <i>Rv0576-Rv0577</i> (incluyendo 209 pb de la región promotora) y 1,5 kb del ORF <i>Rv0578c</i>	Andreu <i>et al.</i> , 2004b
pMV361+77	- pMV361 que contiene el ORF <i>Rv0577</i> bajo el control del promotor del gen <i>hsp60</i> _{BCG}	Este trabajo
pSUM36+77	- pSUM36+76+77 con delección <i>EcoRV-NruI</i> del ORF <i>Rv0576</i>	Andreu <i>et al.</i> , 2004b
pMV261	- Vector de expresión para <i>Mycobacterium</i> - Km ^R , OriE, OriM, P _{hsp60}	Stover <i>et al.</i> , 1991
pMV261Δ77	- pMV261 que contiene la construcción Δ <i>Rv0577</i> de p1NILΔ77gm bajo el control del promotor <i>hsp60</i> _{BCG}	Este trabajo

*Posición respecto al codón de inicio de la traducción.

Tabla 3.3. Descripción de los principales oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia ^A 5'-3'	Posición	Aplicación
77Up1	CCGTCACAAGGAGACTGTGC	+294 ^B	Oligo. directo utilizado en la construcción del mutante <i>Rv0577</i>
Hin77Lw1	AAGCTTGTCCACCACCAGCATCGAC	+276 ^C	Oligo. reverso utilizado en la construcción del mutante <i>Rv0577</i>
Kpn77Up2	GGTACCGGCTGACATCCGTC	+715 ^C	Oligo. directo utilizado en la construcción del mutante <i>Rv0577</i>
77Lw2	AATCCCGGAGCCATTACC	+1813 ^C	Oligo. reverso utilizado en la construcción del mutante <i>Rv0577</i>

Material es y métodos

Nombre	Secuencia ^A 5'-3'	Posición	Aplicación
577Up	AGTCCTCGATCGCCTCATC	-74 ^C	Oligo. directo utilizado en la comprobación del mutante <i>Rv0577</i>
577Lw	CGGCAGCTTCTAGCATTCTC	+848 ^C	Oligo. reverso utilizado en la comprobación del mutante <i>Rv0577</i>
576UpNde	CATATGCTGGAAGTCGCGGC	0 ^B	Oligo. directo utilizado en la comprobación del mutante <i>Rv0576</i> y para clonar el ORF <i>Rv0576</i>
576LwHin	AAGCTTGGTGGCGGACACGT	+1310 ^B	Oligo. reverso utilizado en la comprobación del mutante <i>Rv0576</i> y para clonar el ORF <i>Rv0576</i>
576UpSca	AGTACTCCCAGAAGTCGATCATGTAGC	-238 ^B	Oligo. directo utilizado en la construcción de las fusiones Fus1 y FusMut
576LwSca	AGTACTGAACGGGTGACCGTGA ACT	+115 ^B	Oligo. reverso utilizado en la construcción de todas las fusiones
T4t	GACCCTAGAGGTCCCCTTTTT	-122 ^D	Oligo. directo utilizado en la comprobación de la orientación de las fusiones en pSM128
amiC	CCACCACCCGATAAGAGAAA	-31 ^E	Oligo. directo utilizado en la comprobación de la clonación de <i>Rv0576</i> en pJAM2
FusUp2	AGTACTATCACTGTCGGGGTGTGG	-188 ^B	Oligo. directo utilizado en la construcción de la fusión Fus2
FusUp3	AGTACTGCACCGCTAATCGCTACTTT	-125 ^B	Oligo. directo utilizado en la construcción de la fusión Fus3
FusUp4	AGTACTCGTTGCCCTTGATCAATAC	-55 ^B	Oligo. directo utilizado en la construcción de la fusión Fus4
FusMutUp	CTTGATCTGTGCGT <u>C</u> AGTGAGCGAGAAAC G	-44 ^B	Oligo. directo utilizado en la mutación de la posible secuencia de unión del regulado <i>Rv0576</i>
FusMutLw	CGTTCTCGCTCACTGACGC <u>C</u> AGATCAAG	-19 ^B	Oligo. reverso utilizado en la mutación de la posible secuencia de unión del regulado <i>Rv0576</i>
Phsp60	GGCATAGCGGAGTGCTAAGA	-210 ^F	Oligo. directo utilizado en la comprobación de las clonaciones en pMV361
576Lw	CTGCAGTTCGGCGTGCCTTG	+1367 ^B	Oligo. directo utilizado para amplificar el gen <i>Rv0576</i>
pSUMLw	GTTTTCCCAGTCACGACGTTG	+28 ^E	Oligo. reverso que hibrida en el vector pSUM36
577UpBam	GGATCCCAAGAGAAGCGAATA	+3 ^C	Oligo. directo utilizado en la clonación de $\Delta Rv0577$
577LwPst	CTGCAGCCTATTGCTGCGGTG	788 ^C	Oligo. reverso utilizado en la clonación de $\Delta Rv0577$
HPRT s	GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTG		Oligo. directo utilizado en la amplificación del gen <i>Hprt1</i> por Real-Time PCR
HPRT as	GATTCAACTTGCCTCATCTTAGGC		Oligo. reverso utilizado en la amplificación del gen <i>Hprt1</i> por Real-Time PCR

Nombre	Secuencia ^A 5'-3'	Posición	Aplicación
IFN- γ s	AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG		Oligo. directo utilizado en la amplificación del gen <i>Ifnγ</i> por Real-Time PCR
IFN- γ as	GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG		Oligo. reverso utilizado en la amplificación del gen <i>Ifnγ</i> por Real-Time PCR
TNF- α s	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA		Oligo. directo utilizado en la amplificación del gen <i>Tnf</i> por Real-Time PCR
TNF- α as	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC		Oligo. reverso utilizado en la amplificación del gen <i>Tnf</i> por Real-Time PCR
INOS s	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT		Oligo. directo utilizado en la amplificación del gen <i>Nos2</i> por Real-Time PCR
INOS as	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG		Oligo. reverso utilizado en la amplificación del gen <i>Nos2</i> por Real-Time PCR
RANTES s	GAAGGAACCGCCAAGT		Oligo. directo utilizado en la amplificación del gen <i>Ccl5</i> por Real-Time PCR
RANTES as	AGAGCAAGCGATGACAG		Oligo. reverso utilizado en la amplificación del gen <i>Ccl5</i> por Real-Time PCR

^ALas dianas de restricción se muestran en cursiva y las mutaciones en negrita.

^BPosición 5' del oligonucleótido respecto al inicio de traducción del gen *Rv0576*.

^CPosición 5' del oligonucleótido respecto al inicio de traducción del gen *Rv0577*.

^DPosición 5' del oligonucleótido respecto al ATG del gen *lacZ* en pSM128.

^EPosición 5' del oligonucleótido respecto al ATG del gen *amiE* de *M. smegmatis*.

^FPosición 5' del oligonucleótido respecto al ATG del gen *hsp60*.

^GPosición 5' del oligonucleótido respecto al ATG del gen *lacZ* en pSUM36.

3.2. Métodos microbiológicos

3.2.1. Medios de cultivo, antibióticos y otras soluciones

3.2.1.1. Medios de cultivo

Medio LB (Luria Bertani) (Miller, J. H., 1992)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar (Sólo medios sólido)	17 g

Añadir 1 L de agua destilada y esterilizar en la autoclave durante 15 min a 121°C. Dispensar en placas de Petri y guardar a 4°C. En el caso de medio LB líquido, disolver completamente el medio y dispensarlo antes de esterilizarlo; guardar a temperatura ambiente.

Medio TB (Terrific Broth) (Tartof y Hobbs, 1987)

Triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 mL

Añadir 900 mL de agua destilada y esterilizar en la autoclave (15 min a 121°C). Dejar enfriar hasta 50°C-60°C y añadir 100 mL de la siguiente solución salina previamente esterilizada en la autoclave:

KH ₂ PO ₄	0,17 M
K ₂ HPO ₄	0,72 M

Dispensar en condiciones de esterilidad, en botellas de 100 mL estériles. Incubar 24 h a 37°C para comprobar que no se ha contaminado el medio. Desechar aquellas botellas en las que se observe crecimiento y guardar el resto a temperatura ambiente.

Medio Middlebrook 7H9

Middlebrook 7H9 broth (Difco)	4,7 g
Tween 80	0,5 mL

Añadir 900 mL de agua destilada y disolver con agitación y temperatura. Esterilizar en la autoclave a 121°C durante 10 min. Dejar enfriar hasta 50°C-60°C y añadir 100 mL de suplemento ADC estéril. Para cultivos de menor volumen es conveniente preparar alícuotas de 90 mL de medio en botellas de 100 mL y autoclavar por separado, para minimizar la manipulación del medio y evitar contaminaciones.

Suplemento ADC:

BSA (Albúmina sérica bovina) fracción V	5 g
Glucosa	2 g
Catalasa	3 mg

Disolver completamente en 70 mL de agua destilada. Ajustar el volumen a 100 mL con agua destilada y esterilizar por filtración con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro. Para cultivos de menor volumen recoger el filtrado en alícuotas de 10 mL. Incubar 24 h a 37°C para descartar contaminaciones. Guardar a 4°C.

Medio Middlebrook 7H10

Middlebrook 7H10 agar (Difco)	19 g
Glicerol	5 mL

Añadir 895 mL de agua destilada y disolver con agitación y temperatura. Esterilizar en la autoclave a 121°C durante 10 min. Dejar enfriar hasta 50°C-60°C y añadir 100 mL del suplemento OADC estéril. Dispensar en placas de Petri y guardar a 4°C.

Suplemento OADC:

BSA fracción V	5 g
Glucosa	2 g
Catalasa	4 mg
Ácido oleico	0,056 mL
NaCl	0,85 g

Disolver completamente en 70 mL de agua destilada. Ajustar el volumen a 100 mL con agua destilada y esterilizar por filtración con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro. Incubar 24 h a 37°C para detectar posibles contaminaciones. Guardar a 4°C.

Medio Middlebrook 7H10 con rojo neutro (Andreu *et al.*, 2004b)

Middlebrook 7H10 agar (Difco)	19 g
Glicerol	5 mL

Añadir 645 mL de agua destilada y disolver con agitación y temperatura. Añadir 250 mL de solución de rojo neutro. Esterilizar en la autoclave a 121°C durante 10 min. Dejar enfriar hasta 50°C-60°C y añadir 100 mL del suplemento OADC estéril. Dispensar en placas de Petri y guardar a 4°C, protegido de la luz, no más de 2 meses.

Solución de rojo neutro:

Rojo neutro (Sigma) 0,2 % (p/v)	0,250 mL
Sodio 5,5-dietilbarbiturato (Panreac)	2,5 g
NaCl	15 g

Disolver el sodio 5,5-dietilbarbiturato y el NaCl en agua destilada. Ajustar a un volumen final de 250 mL. Medir el pH y ajustar a 9,8 si fuera necesario. Añadir 0,250 mL de rojo neutro al 0,2% en agua (p/v).

3.2.1.2. Antibióticos

Los antibióticos utilizados se disolvieron en agua desionizada y se esterilizaron por filtración con filtros de 0,22 μm ; excepto la higromicina que se compraba en solución estéril (Roche). Se preparaban soluciones *stock* 1000 veces concentradas que se guardaban a -20°C y se utilizaban directamente para suplementar los medios sólidos, enfriados a unos 50°C - 60°C , antes de preparar las placas. Estas soluciones se diluían 10 veces con agua desionizada estéril para obtener una solución de trabajo que se conservaba a 4°C y que se añadía directamente a los medios líquidos. Las concentraciones de los antibióticos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Concentraciones de los antibióticos utilizados para los cultivos de *E. coli*, *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*.

Antibiótico	Conc. <i>stock</i> mg/mL	Conc. final ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>E. coli</i>	<i>Mycobacterium</i>
Ampicilina	50	50	
Kanamicina monosulfato (Km)	50	50	25
Higromicina B (Hyg) (Roche)	50	100	100
Estreptomicina sulfato (Sm)	25	25	25

3.2.1.3. Otras soluciones

Los medios de cultivo se suplementaron con otras soluciones en determinadas pruebas realizadas en este trabajo.

5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal)

Se utilizó, disuelto en *N,N* dimetil formamida, para suplementar las placas de LB a una concentración de $40 \mu\text{g/mL}$ y las placas de Middlebrook 7H10 a una concentración de $50 \mu\text{g/mL}$, a partir de una solución *stock* de 40mg/mL .

Sacarosa

Se utilizó una solución *stock* a una concentración del 50%, esterilizada por filtración, para suplementar las placas de Middlebrook 7H10 a una concentración final del 2% (p/v). Puesto que el volumen que se debe añadir es importante, el medio de cultivo se disolvía en un volumen de agua proporcionalmente menor para que el volumen final quedara ajustado.

Acetamida

Se utilizó para suplementar medios líquidos de Middlebrook 7H9 a una concentración del 0,2% (p/v), usando una solución *stock* 10 veces concentrada esterilizada por filtración.

3.2.2. Condiciones de crecimiento y conservación de las cepas

3.2.2.1. *Escherichia coli*

Los cultivos de las diferentes cepas bacterianas de *E. coli* se realizaron en medio líquido LB, mientras que los cultivos de noche para extracciones de DNA plasmídico se realizaron en el medio altamente rico TB. Cuando se requería, estos medios se suplementaban con las concentraciones de antibióticos adecuadas (Tabla 3.4). Se partía de una colonia aislada del microorganismo que se inoculaba en 10 mL de medio y se incubaba a 37°C con una agitación de 180 rpm-220 rpm. El crecimiento del cultivo se controlaba, en caso necesario, midiendo la densidad óptica (OD) a una longitud de onda de 550 nm. Las siembras en medio sólido se realizaron en placas de Petri con medio LB, con los suplementos adecuados, y se incubaron a 37°C.

Las cepas de *E. coli* se conservaban en placas de LB, suplementadas según el caso, mantenidas a 4°C y resembradas mensualmente. También se mantenían las cepas congeladas a -20°C en viales de cultivo glicerizados [glicerol a una concentración final del 20% (v/v)].

3.2.2.2. *Mycobacterium*

Los cultivos de las diferentes cepas bacterianas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* se realizaron en medio líquido Middlebrook 7H9 con los suplementos indicados. En el caso de *M. smegmatis* se partía de una colonia aislada que se inoculaba en 10 mL de medio y se incubaba a 37°C con una agitación de 200 rpm durante 3-5 días. Los cultivos de *M. tuberculosis* se realizaban en frascos de cultivo (TPP) de 25 cm² para 10 mL de medio (75 cm² para 100 mL) que se incubaban en la estufa a 37°C durante 3 semanas. Estos cultivos se utilizaban como inóculo para cultivos de mayor volumen realizando una dilución 1/100 e incubándolos, en las mismas condiciones, durante 24 h-48 h en el caso de *M. smegmatis* y durante 1 semana en el de *M. tuberculosis*. El seguimiento del crecimiento se llevaba a cabo midiendo la OD a una longitud de onda de 600 nm. Teniendo en cuenta el lento crecimiento de *M. tuberculosis*, es especialmente importante hacer un control negativo del medio,

incubando una alícuota en las mismas condiciones que los cultivos, para asegurarnos de que no hay contaminantes.

Las siembras en medio sólido se realizaron en placas de Petri con medio Middlebrook 7H10 suplementado según el caso. Las placas de *M. smegmatis* se incubaban a 37°C durante 3-5 días y durante 3-4 semanas las de *M. tuberculosis*. En ambos casos, para evitar la desecación, las placas se sellaban con dos capas de Parafilm® y, además, las placas de *M. tuberculosis* se incubaban dentro de bolsas.

Las cepas de *M. smegmatis* se conservaban en las placas mantenidas a 4°C y resembradas mensualmente. Las cepas de *M. tuberculosis* se conservaban a 37°C y se resembraban cada 4-6 semanas. También se mantenían las cepas congeladas a -20°C en viales con leche descremada al 20% (p/v).

La manipulación de *M. tuberculosis* se llevó a cabo en el laboratorio NSB-3 IBF/014.2 situado en el Institut de Biotecnologia i de Biomedicina de la UAB, donde se dispone de las barreras físicas, equipamiento y procedimientos de trabajo que garantizan la seguridad necesaria para trabajar con microorganismos de nivel 3 y, más concretamente, con *M. tuberculosis*. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del “Manual de seguridad y procedimientos normalizados de trabajo” del propio laboratorio, cuya finalidad es asegurar que los trabajos que se realizan cumplen la legislación vigente, tanto española como europea, así como las directrices recomendadas por la OMS, el “Centers for Disease Control y Prevention” (CDC) y el “National Institutes of Health” (NIH) de los EEUU. De este modo se siguieron procedimientos de bioseguridad y de funcionamiento estándares que garantizaron la seguridad del personal investigador así como la de la comunidad.

3.3. Métodos citoquímicos

3.3.1. Tinción con rojo neutro

3.3.1.1. Tinción con rojo neutro en tubo

La tinción con rojo neutro en tubo se adaptó a pequeña escala, a partir del protocolo descrito por Soto y colaboradores (2002). Se partía de un cultivo de *M. tuberculosis* en medio sólido, del que se tomaban células con ayuda del asa de Kölle y se añadían a un tubo *eppendorf* que contenía 1 mL de metanol al 50% (v/v). Las células se incubaban durante 1 h a 37°C, agitándolas regularmente. A continuación, se eliminaba el sobrenadante y se realizaba un nuevo lavado con metanol al 50%. Por

último se eliminaba el metanol, se añadía 1 mL de una solución de rojo neutro (Sigma) al 0,002% en tampón barbital [sodio 5,5-dietilbarbiturato (Panreac) al 1% y NaCl al 5% pH 9,8] y se incubaba durante 1 h a 37°C. En paralelo se teñían la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv como control positivo y la cepa avirulenta *M. tuberculosis* H37Ra como control negativo. El resultado se evaluaba transcurridas 1 y 24 horas.

3.3.1.2. Tinción con rojo neutro en placa

La tinción de *M. tuberculosis* con rojo neutro en placa se adaptó del protocolo descrito por Soto (2002).

Para realizar esta tinción es importante que al sembrar las bacterias se introduzcan ligeramente en el interior del medio sólido, ya que esto evita el desprendimiento de las colonias al efectuar los posteriores lavados. En la misma placa se sembraban 4 controles positivos (*M. tuberculosis* H37Rv) y 4 controles negativos (*M. tuberculosis* H37Ra) distribuidos en diferentes posiciones de la placa.

Una vez crecidas las bacterias, se añadían 20 mL de metanol al 50%, con la ayuda de una pipeta Pasteur, muy lentamente para evitar el desprendimiento de las colonias. Las placas se incubaban durante 1 h a 37°C agitándolas ocasionalmente. A continuación con una pipeta Pasteur se eliminaba el metanol al 50% del primer lavado y se efectuaba un segundo lavado con metanol al 50% siguiendo el mismo procedimiento. Por último se realizaba un tercer lavado de 30 min a 37°C con 20 mL de tampón barbital (pH 9,8), para eliminar los restos de metanol que podrían acidificar el medio impidiendo una correcta tinción. Finalmente, se añadían 20 mL de la solución de tinción (rojo neutro al 0,002% en tampón barbital pH 9,8) y se incubaban las placas a 37°C durante 1 h antes de efectuar la lectura.

3.3.2. Tinción con auramina

Como ya se ha comentado, esta tinción se basa en que las micobacterias resisten la decoloración con una solución ácido-alcohólica (generalmente, HCl al 3% en etanol), gracias al elevado contenido lipídico de su pared celular. En este trabajo se usó para analizar la morfología y organización celulares de diferentes cepas de *M. tuberculosis*.

Procedimiento

- Centrifugar 1 mL de cultivo de *M. tuberculosis* durante 1 min a 10 000 rpm. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de tampón fosfato

Materiales y métodos

salino (PBS, *Phosphate Buffer Saline*). Alternativamente también se puede realizar a partir de bacterias crecidas en medio sólido y resuspendidas en PBS.

- Precalentar los portaobjetos a 60°C-65°C.
- Distribuir una película de la suspensión bacteriana sobre el portaobjetos y fijar durante 10 min a 60°C-65°C.
- Aplicar una película de auramina (Maim) sobre las bacterias fijadas, e incubar 30 min en la oscuridad.
- Decantar la auramina con cuidado.
- Lavar bien con la solución ácido-alcohol (Maim) y dejar actuar 5 min.
- Decantar la solución ácido-alcohol.
- Distribuir una película de KMnO₄ (Maim) y dejar actuar 5 min.
- Lavar con abundante agua y dejar secar.
- Las células se observaron con el microscopio de fluorescencia Olympus BX51, usando el filtro FITC. Las imágenes fueron capturadas con la cámara acoplada al microscopio equipado con el software CytoVision® (Applied Imaging).

PBS 8X

Na ₂ HPO ₄ (80 mM)	1,13 g
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O (80 mM)	1,11 g
NaCl (4 M)	23,38 g

Disolver en 70 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7,4 y enrasar con agua destilada a 100 mL. Esterilizar por filtración. Diluir a la concentración de trabajo con agua desionizada estéril.

3.4. Métodos genéticos

3.4.1. Transformación de *E. coli*

El método que se utilizó para introducir DNA plasmídico en *E. coli* fue el de inducción de la competencia mediante el tratamiento con cloruro cálcico. Durante este proceso las células, procedentes de un cultivo en fase exponencial, se tratan con una solución de CaCl₂ 100 mM y se mantienen en hielo. Los iones calcio se unen a la pared bacteriana formando complejos de carga positiva de modo que al añadir el DNA, de carga negativa, éste se une a los iones calcio formando complejos DNasa resistentes. Estos complejos se pueden deshacer, sometiendo las células a un choque térmico, formándose poros en la membrana por donde se introduce el DNA en el interior de la

célula. A continuación las células se incuban en medio rico para favorecer su recuperación y la expresión fenotípica de los genes marcadores. Las células que han incorporado el DNA se seleccionan en medio rico selectivo.

Preparación de células competentes

- A partir de un cultivo de noche hacer una resiembra 1/100 en 100 mL de medio LB e incubar a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcance una OD₅₅₀ de 0,5-0,6.
- Incubar el cultivo durante 10 min en hielo.
- Centrifugar el cultivo en tubos estériles durante 10 min a 5000 rpm y 4°C.
- Desechar el sobrenadante en condiciones estériles y resuspender las células en 20 mL de CaCl₂ 100 mM frío.
- Incubar la suspensión celular en hielo durante 30 min.
- Centrifugar durante 10 min a 5000 rpm y 4°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender cuidadosamente el pellet bacteriano en 4 mL de CaCl₂ 100 mM frío.
- Añadir 1,5 mL de glicerol al 50% (v/v) estéril. Hacer alícuotas de 100 µL, congelarlas en nieve carbónica y guardar a -80°C.

Transformación

- Mezclar en un tubo *ependorf* 100 µL de células competentes y 10 ng-100 ng de DNA plasmídico, e incubar durante 30 min en hielo.
- Someter las células a un choque térmico a 42°C durante 90 s.
- Añadir 800 µL de medio LB e incubar a 37°C durante 1 h.
- Sembrar las células en las placas selectivas adecuadas e incubar durante 12 h-18 h a 37°C.

Soluciones

CaCl₂ 100 mM

CaCl₂ 1,47 g

Disolver en 80 mL de agua destilada. Ajustar el volumen a 100 mL y esterilizar en la autoclave a 121°C durante 15 min. Guardar a temperatura ambiente.

3.4.2. Electroporación de *Mycobacterium*

En los últimos 20 años se han desarrollado múltiples sistemas genéticos que han permitido un importante avance en el conocimiento de la biología de las micobacterias. Un ejemplo clave ha sido la optimización de las técnicas de electroporación que ha permitido la manipulación y el estudio genético de diferentes especies de *Mycobacterium*. En este procedimiento las células se someten a un pulso eléctrico de alto voltaje que despolariza la membrana celular, abriéndose poros transitorios que permiten la entrada del DNA en la célula. Las micobacterias pueden soportar voltajes elevados durante largos periodos de tiempo, por lo que se utiliza un medio de electroporación de gran resistencia (glicerol al 10%) y una resistencia en paralelo elevada, para obtener constantes de tiempo largas que proporcionan mejores eficiencias de transformación.

El protocolo utilizado en este trabajo es el descrito por Parish y Stoker (1998) con ligeras modificaciones. Se utilizó el Gene Pulser Xcell™ Electroporation System de BIO-RAD y cubetas de 0,2 cm de separación entre los electrodos.

Los protocolos de preparación de células competentes de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* son similares. Se diferencian en que el proceso se realiza a 0°C en el caso de *M. smegmatis*; mientras que, para *M. tuberculosis* la preparación se lleva a cabo a temperatura ambiente, ya que se ha comprobado que mejora la eficiencia de transformación (Wards y Collins, 1996). Puesto que la eficiencia de transformación es menor en *M. tuberculosis*, la cantidad de células que se electropora es 5 veces superior que en *M. smegmatis*.

En el caso de *M. tuberculosis* es especialmente importante asegurarse, mediante el seguimiento de la OD₆₀₀, que los cultivos se encuentren en fase exponencial en el momento de procesarlos. Algunos protocolos, además, recomiendan añadir glicina al cultivo, a una concentración final del 1,5%, 1 ó 2 días antes de procesarlo, ya que debilita la pared celular favoreciendo la entrada del DNA. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos comprobado que la adición de glicina disminuye la viabilidad celular y no mejora, si no empeora, la eficiencia de transformación, por lo que no recomendamos su utilización.

El procedimiento de electroporación es extremadamente sensible a la concentración de sales presentes en la muestra de DNA por lo que, si existe la

posibilidad de un exceso de sales en la muestra, el DNA debería desalarse (lavando con etanol al 70%, dializando, o bien usando una columna de agarosa). Si bien la eficiencia de transformación no se ve alterada por la cantidad de DNA utilizado, el volumen de DNA usado es crítico, ya que puede alterar la conductividad de la muestra, por lo que es importante no añadir cantidades superiores a 5 μL .

Preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis*

- Inocular una colonia fresca de *M. smegmatis* en 10 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar durante 2 ó 3 días a 37°C con una agitación de 200 rpm.
- Hacer una resiembra 1/100 en 100 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcance una OD₆₀₀ de 0,8-1 (16 h-20 h aproximadamente).
- Incubar el cultivo en hielo durante 90 min. Esta preincubación en hielo incrementa las eficiencias de transformación hasta 4 veces, pero no se debe exceder este tiempo ya que disminuye el número de transformantes probablemente a causa de un aumento en la lisis celular.
- Centrifugar el cultivo en tubos estériles durante 10 min a 3000 g y 4°C.
- Desechar el sobrenadante en condiciones estériles y resuspender las células en 50 mL totales de glicerol al 10% (v/v) estéril y frío.
- Centrifugar durante 10 min a 3000 g y 4°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet bacteriano en 12 mL de glicerol al 10% (v/v) estéril y frío.
- Centrifugar durante 10 min a 3000 g y 4°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet bacteriano en 1 mL de glicerol al 10% (v/v) estéril y frío.
- Electroporar inmediatamente o guardar a -80°C en alícuotas de 80 μL dispensadas en nieve carbónica.

Electroporación de *M. smegmatis*

- Descongelar las células electrocompetentes en hielo.
- Añadir 80 μL de glicerol al 10% (v/v) estéril, y el DNA (<5 μL).
- Incubar las células en hielo durante 10 min para permitir la preabsorción del DNA.

Materiales y métodos

- Mantener las cubetas en hielo durante 15 min. Transcurrido este tiempo, secar bien las cubetas.
- Homogeneizar las células y transferirlas a la cubeta de electroporación.
- Someterlas a un pulso de 2,5 kV, 1000 Ω y 25 μ F (las constantes de tiempo acostumbran a ser de 15 ms a 25 ms).
- Añadir rápidamente 1 mL de medio Middlebrook 7H9, resuspender las células con cuidado y transferirlas a un tubo de vidrio estéril.
- Incubar a 37°C con una agitación de 200 rpm durante 3 h-4 h.
- Resuspender bien las células y sembrarlas en placas de medio Middlebrook 7H10 suplementadas con los antibióticos apropiados.
- Incubar a 37°C durante 3 ó 4 días.

Preparación de células electrocompetentes de *M. tuberculosis*

- Inocular una colonia fresca de *M. tuberculosis* o 100 μ L de un cultivo crecido, en 10 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar durante 2 ó 3 semanas a 37°C.
- Hacer una resiembra 1/100 en 100 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar a 37°C durante 1 semana. Antes de recoger el cultivo es importante asegurarse que se encuentra en fase exponencial, momento en el que la OD₆₀₀ prácticamente se tiene que doblar en 24 h.
- Centrifugar el cultivo en tubos estériles durante 10 min a 3000 g y 15°C-20°C.
- Desechar el sobrenadante en condiciones estériles y resuspender las células en 50 mL totales de glicerol al 10% (v/v) estéril.
- Centrifugar durante 10 min a 3000 g y 15°C-20°C. Una vez resuspendidas en el glicerol, las células de *M. tuberculosis* sedimentan con mayor dificultad por lo que se pueden incrementar los tiempos o velocidades de centrifugación, siempre teniendo en cuenta la resistencia de los tubos y sin llenarlos al máximo para evitar fisuras o roturas.
- Desechar el sobrenadante en condiciones estériles y resuspender las células en 25 mL de glicerol al 10%(v/v) estéril.
- Centrifugar durante 10 min a 3000 g y 15°C-20°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet bacteriano en 12 mL de glicerol al 10% (v/v) estéril.
- Centrifugar durante 10 min a 3000 g y 15°C-20°C.

- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet bacteriano en 1 mL de glicerol al 10% (v/v) estéril.
- Hacer alícuotas de 400 μ L y electroporar inmediatamente.

Electroporación de *M. tuberculosis*

- Añadir el DNA (<5 μ L) a las células y homogeneizar.
- Incubar las células con el DNA durante 10 min a temperatura ambiente.
- Homogeneizar las células y transferirlas a la cubeta de electroporación.
- Someterlas a un pulso de 2,5 kV, 1000 Ω y 25 μ F (las constantes de tiempo acostumbran a ser de 15 ms a 25 ms).
- Añadir rápidamente 1 mL de medio Middlebrook 7H9, resuspender las células con cuidado y transferirlas a un tubo de plástico estéril que contenga 2 mL de medio Middlebrook 7H9.
- Incubar a 37°C durante 12 h-24 h.
- Resuspender bien las células y sembrarlas en placas de medio Middlebrook 7H10 suplementadas con los antibióticos adecuados. Para sembrar *M. tuberculosis* a partir de una suspensión líquida se pueden usar asas de Digralsky desechables estériles. O bien se pueden usar bolitas de vidrio de 0,5 cm de diámetro (Sigma) estériles, añadiendo 8-15 bolitas en cada placa (según el volumen sembrado) y extendiendo el líquido por rotación de la placa. Posteriormente, las bolitas se desinfectan en lejía y en la autoclave, y se lavan y se esterilizan en la autoclave para su posterior reutilización.
- Incubar a 37°C durante 3 ó 4 semanas.

3.5. Métodos de manipulación de DNA

La mayoría de técnicas utilizadas en este trabajo están basadas en *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook *et al.*, 1989) con algunas modificaciones.

3.5.1. Miniextracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Esta técnica se basa en el protocolo de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979), utilizando SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*, sal sódica de dodecil sulfato) y NaOH, y neutralizando con acetato potásico. El DNA se purifica con tierra de diatomeas, una resina que secuestra el DNA, y una columna *Wizard*[®] de Promega. Por último, se eliminan las sales mediante un lavado con etanol al 70% y se eluye el DNA con agua desionizada estéril precalentada.

Procedimiento

- Hacer un cultivo de noche en 10 mL de medio TB suplementado con los antibióticos apropiados e incubar a 37°C con una agitación de 180 rpm.
- Centrifugar 1,5 mL de cultivo a 13 000 rpm durante 5 min.
- Desechar el sobrenadante con la ayuda de la bomba de vacío.
- Resuspender el pellet en 100 µL de solución I fría, añadir 1 µL de RNasa e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
- Añadir 200 µL de solución II, mezclar por inversión y mantener durante 5 min en hielo o hasta que se obtenga una solución viscosa debida a la lisis celular.
- Añadir 150 µL de solución III, mezclar por inversión e incubar durante 5 min en hielo o hasta que se observe un precipitado blanco.
- Centrifugar durante 5 min a 13 000 rpm.
- Transferir la fase acuosa a un *ependorf* y añadir 1 mL de tierra de diatomeas.
- Incubar durante 10 min a temperatura ambiente, homogeneizando la muestra por inversión regularmente.
- Transferir la muestra a una jeringa colocada sobre una columna *Wizard*[®] *Minicolumn* (Promega) y pasar la muestra a través del filtro con ayuda del émbolo.
- Extraer la jeringa de la columna, sacar el émbolo y volver a colocar la jeringa en la columna. Añadir 2 mL de etanol al 70% y pasarlo por el filtro con ayuda del émbolo.
- Extraer la jeringa de la columna y colocar la columna en un *ependorf*. Centrifugar durante 20 s a 13 000 rpm para eliminar los restos de etanol. Transferir la columna a un tubo *ependorf* nuevo y dejar secar la columna manteniéndola a temperatura ambiente durante 10 min.
- Añadir al filtro de la columna 20 µL-50 µL de agua desionizada estéril precalentada a 42°C, e incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 1 min a 13 000 rpm para recoger el DNA eluido.

Soluciones

Para preparar las soluciones de extracción y la tierra de diatomeas, se requiere elaborar previamente las siguientes soluciones:

- TrisHCl 1 M pH 7,5: disolver 60,55 g de TrisBase en 300 mL de agua destilada. Añadir ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de 7,5. Ajustar el volumen a 500 mL con agua destilada.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 M pH 8: añadir 46,35 g de EDTA y 5 g de NaOH a 200 mL de agua destilada. Añadir NaOH hasta alcanzar pH 8 y ajustar, con agua destilada, el volumen a 250 mL. Agitar hasta alcanzar una disolución completa. Esterilizar en la autoclave durante 15 min a 121°C.

Solución I

TrisHCl 1 M pH 7,5	0,625 mL
EDTA 0,5 M pH 8	0,5 mL
Glucosa 20% (p/v) estéril	1,135 mL
Agua desionizada	22,74 mL

Se mezclan los componentes y se mantiene a 4°C.

RNasa A

Concentraciones finales:

RNasa A (Roche)	10 mg/mL
TrisHCl	10 mM
NaCl	15 mM

Mezclar 10 µL de TrisHCl 1 M pH 7,5, 3 µL de NaCl 5 M y 987 µL de agua desionizada estéril. Añadir 10 mg de RNasa A y homogeneizar. Incubar durante 15 min a 100°C. Dejar enfriar a temperatura ambiente, hacer alícuotas de 50 µL y congelarlas a -20°C.

Solución II

SDS 10% (p/v)	2,5 mL
NaOH 10 N (40 g/100 mL)	0,5 mL
Agua desionizada	22 mL

Se mezclan los componentes y se mantiene a temperatura ambiente. Es importante que la solución sea reciente.

Solución III

Acetato potásico 5 M (49,075 g/100 mL)	15 mL
--	-------

Materiales y métodos

Ácido acético glacial	2,875 mL
Agua desionizada	7,125 mL

Se mezclan los componentes y se mantiene a temperatura ambiente.

Tierra de diatomeas

Tierra de diatomeas (Sigma)	3.5 g
Hidrocloruro de guanidina	100 g
TrisHCl 1 M pH 7,5	8,75 mL
EDTA 0,5 M pH 8	14 mL

- Diluir la tierra de diatomeas en 50 mL de agua desionizada estéril en un vaso de precipitados estéril. Dejar precipitar un mínimo de 3 h. Proteger de la luz en todo momento.
- Pesar el hidrocloruro de guanidina (tóxico) en un vaso de precipitados estéril, añadir 50 mL de agua desionizada estéril, el TrisHCl y el EDTA. Disolver completamente y ajustar el volumen a 175 mL con agua desionizada.
- Con la ayuda de la bomba de vacío, eliminar la fase acuosa de la tierra de diatomeas y añadir la solución de guanidina.
- Homogeneizar completamente la solución y dispensarla en botellas de 100 mL estériles protegidas de la luz.
- Guardar a temperatura ambiente y homogeneizar antes de utilizar.

3.5.2. Obtención de DNA plasmídico de *Mycobacterium*

La extracción de DNA plasmídico de micobacterias es compleja, y la cantidad y calidad del DNA obtenido requieren propagarlo en *E. coli* para su posterior manipulación. Los principales factores que obstaculizan una óptima obtención de DNA plasmídico de micobacterias son la difícil lisis por la compleja pared celular, el bajo número de copias de la mayoría de los plásmidos de micobacterias [unas 5 copias por equivalente genómico en los plásmidos con el replicón de pAL5000 (Stover *et al.*, 1991)], la degradación del DNA, y la contaminación con lípidos y polisacáridos de la pared.

Tradicionalmente se usaban métodos laboriosos, con largos tratamientos con lisozima y múltiples lavados con fenol y cloroformo, antes de precipitar el DNA con etanol. Actualmente, se han adaptado los métodos de lisis alcalina y resinas utilizados para *E. coli*, incluyendo un paso previo de lisis con lisozima durante 3 h-12 h e

incrementando el número de células procesadas (Plikaytis y King, 1998). Sin embargo, el DNA obtenido sigue siendo de baja concentración y calidad.

Por ello, en nuestro laboratorio, optamos por transformar directamente *E. coli* con lisados de micobacterias, obtenidos por calor o por disrupción mecánica. En el primer caso, se recogían con el asa de Kölle una buena cantidad de células de una placa crecida (de *M. tuberculosis* o de *M. smegmatis*), y se resuspendían en 200 µL de TE. Las células se mantenían a 90°C durante 30 min-60 min y además, en el caso de *M. tuberculosis*, se completaba la lisis congelando las células lentamente en el congelador de la nevera durante 16 h, y descongelándolas posteriormente a temperatura ambiente. A continuación, se transformaban 100 µL de células competentes de *E. coli* directamente con 20 µL del sobrenadante de los lisados, y se sembraba en placas selectivas para la resistencia del plásmido. Estos lisados se utilizaron también para la amplificación de DNA sobre DNA genómico.

La obtención de DNA plasmídico de *M. smegmatis* se realizó también por disrupción mecánica, según el protocolo de Madiraju y colaboradores (2000) con pequeñas modificaciones. Se recogían con el asa de Kölle una buena cantidad de células, y se añadían a un tubo que contenía 200 µL de TE y 100 µL de bolitas de zirconia de 0,1 mm de diámetro (Biospec). Las células se lisaban con el Mini BeadBeater (Biospec) durante 2 min a velocidad máxima. Las bolitas y los restos celulares se separaban por centrifugación y se usaban 20 µL del lisado para transformar 100 µL de células competentes de *E. coli*. Con este método se obtenía un número de transformantes mayor que con el método anterior.

Soluciones

TE

Concentraciones finales:

TrisHCl	10 mM
EDTA	1 mM

3.5.3. Digestión con enzimas de restricción

La digestión de DNA con enzimas de restricción es uno de los métodos más comunes en biología molecular. Se basa en que los enzimas de restricción reconocen determinadas secuencias de DNA (dianas) y cortan el DNA de doble cadena (dsDNA)

en un sitio específico que está cerca o dentro de las dianas de restricción. Algunos de los factores importantes que deben tenerse en cuenta para obtener buenos resultados son la pureza y cantidad de DNA, el tiempo y la temperatura de la reacción, y los tampones específicos para cada enzima de restricción. En este trabajo se han utilizado los enzimas y sus respectivos tampones de Roche y New England BioLabs, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.4. Desalado de DNA con columnas de agarosa

Este método permite eliminar sales de una solución de DNA de un modo rápido y sencillo usando agarosa solidificada (Atrazhev y Elliot, 1996). Se puede aplicar tanto a un producto de PCR que se quiere digerir, como a una reacción de restricción que se pretende digerir con otro enzima, o bien para desalar DNA plasmídico que se pretende electroporar.

Procedimiento

- Disolver 0,5 g de agarosa en 50 mL de glucosa 100 mM estéril, calentando la solución en el microondas a baja potencia.
- Añadir 1 mL-1,5 mL de la solución caliente en un *ependorf*, dejar enfriar e introducir verticalmente una punta de micropipeta de 200 μ L. La agarosa no debe estar sólida para poder introducir la punta, pero debe ser suficientemente consistente como para que la punta se mantenga en posición vertical.
- Cuando la agarosa se ha solidificado se quita la punta, de manera que queda un pocillo cónico de unos 100 μ L de capacidad. Las columnas se pueden guardar a 4°C.
- La solución de DNA que se quiera desalar se introduce en el pocillo y se incuba durante 45 min-60 min en hielo para permitir la difusión de las sales en la agarosa.
- Transcurrido este tiempo se recupera el DNA.

Glucosa 100 mM

Glucosa	0,91 g
Agua desionizada	50 mL

Disolver la glucosa en el agua y esterilizar en la autoclave a 121°C durante 15 min.

3.5.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Esta técnica permite separar, identificar y aislar fragmentos de DNA que migran en una matriz de agarosa gracias a la aplicación de un campo eléctrico. El DNA, de carga negativa a pH neutro, se desplaza por los poros de agarosa hacia el polo positivo; dependiendo el grado de migración de la longitud y conformación del DNA, de la concentración de agarosa y de la corriente aplicada.

En este trabajo se utilizaron geles de un porcentaje de agarosa del 2% para visualizar fragmentos de DNA de 0,1 kb a 1,5 kb; del 1% para fragmentos de 1 kb a 4 kb; y geles al 0,7% para separar fragmentos de 3 kb a 14 kb y para visualizar DNA plasmídico. Se utilizaron dos tipos de agarosa: agarosa de bajo punto de fusión (LM-sieve, Pronadisa) para los geles al 2% y electroforesis preparativas; y agarosa para biología molecular (Roche) para el resto de aplicaciones. La longitud de los fragmentos de DNA linial se determinaba utilizando marcadores de peso molecular diferentes según el tamaño del fragmento de interés:

- λ *Bst*EII: obtenido por digestión del DNA del fago λ con el enzima de restricción *Bst*EII. Contiene fragmentos de 14,1 kb, 8,4 kb, 7,2 kb, 6,4 kb, 5,7 kb, 4,8 kb, 4,3 kb, 3,7 kb, 2,3 kb, 1,9 kb, 1,4 kb, 1,3 kb, y 0,7 kb.
- MWM X (Roche): formado por fragmentos de 12,2 kb, 11,2 kb, 10,2 kb, 9,2 kb, 8,1 kb, 7,1 kb, 6,1 kb, 5,1 kb, 4,1 kb, 3,0 kb, 2,0 kb, 1,6 kb, 1,0 kb, 0,5 kb, y otros de menor tamaño difícilmente visibles.
- MWM XIV (Roche): contiene 15 fragmentos cuyo tamaño difiere en 100 pb y oscila entre 100 pb y 1500 pb; y una banda adicional de 2642 pb.

Los fragmentos de DNA se visualizaban con bromuro de etidio, que se intercala en las bases del DNA y emite fluorescencia al irradiar el gel con radiación ultravioleta.

Procedimiento

- Pesar la cantidad adecuada de agarosa según el gel que se quiera preparar, y añadir 50 mL de tampón de electroforesis (1X TAE preparado a partir de una solución 10X, Roche).
- Calentar hasta fundir la agarosa evitando que queden partículas en suspensión.
- Atemperar la solución a unos 50°C y añadir bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ a partir de una solución *stock* de 625 $\mu\text{g/mL}$ (CLP).

Materiales y métodos

- Verter la solución en el soporte del gel, cuyos extremos se habrán sellado con cinta adhesiva. Colocar uno o dos peines según el número de muestras que se desee cargar y esperar a que se solidifique.
- Quitar el/los peines y la cinta adhesiva. Colocar el gel en la cubeta de electroforesis llena de tampón TAE 1X.
- Cargar las muestras de DNA en los pocillos del gel. Las muestras se preparan utilizando tampón de carga 1X para volúmenes de DNA de hasta 4 μL (5 μL de tampón por 1 μL de DNA), y tampón de carga 6X para volúmenes de DNA superiores a 4 μL en una relación 1:5.
- Aplicar un voltaje constante entre 40 V y 70 V, según el tipo de gel. El tiempo dependerá del tamaño de los fragmentos de DNA que se quieran identificar o separar.
- Visualizar el DNA con un transiluminador de radiación ultravioletas (302 nm de longitud de onda).
- Cuando interesaba, el gel se fotografiaba con un digitalizador de imágenes (Gel Doc 2000, BIO-RAD).

Tampón de carga 6X

Ficoll 400	1,2 g
EDTA 0,5 M pH 8 (46,35 g/250 mL)	1,2 mL
SDS 10% (p/v)	0,6 mL
Azul de bromofenol	15 mg
Xilencianol	15 mg

Disolver el Ficoll 400 en 5 mL de agua destilada calentando la solución. Añadir el SDS y el EDTA. Enrasar a 10 mL y añadir los colorantes. Dispensar en alícuotas de 1 mL.

3.5.6. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Este método se utilizó para recuperar fragmentos de DNA, producto de una PCR o de una restricción, separados adecuadamente por electroforesis en gel de agarosa. El procedimiento que se siguió usa yoduro sódico 6 M para fundir la agarosa y tierra de diatomeas para recuperar el DNA sin contaminantes procedentes de la agarosa.

Procedimiento

- Recuperar la región del gel de agarosa que contiene el fragmento de interés cortándola con un cúter previamente flameado.
- Añadir NaI 6 M de manera que cubra la banda (o 2-3 veces el peso de la banda). Un exceso de NaI podría desnaturalizar el DNA.
- Incubar a 55°C agitando enérgica y regularmente hasta que se haya disuelto totalmente la agarosa.
- Transferir la solución a un tubo de 5 mL y añadir 1 mL de tierra de diatomeas.
- Incubar durante 10 min a temperatura ambiente, homogeneizando la muestra por inversión regularmente.
- Transferir la muestra a una jeringa colocada sobre una columna *Wizard*[®] *Minicolumn* (Promega) y pasar la muestra a través del filtro con ayuda del émbolo.
- Extraer la jeringa de la columna, sacar el émbolo y volver a colocar la jeringa en la columna. Añadir 2 mL de etanol al 70% y pasarlo por el filtro con ayuda del émbolo.
- Extraer la jeringa de la columna y colocar la columna en un *eppendorf*. Centrifugar durante 20 s a 13 000 rpm para eliminar los restos de etanol. Transferir la columna a un tubo *eppendorf* nuevo y dejar secar la columna manteniéndola a temperatura ambiente durante 10 min.
- Añadir al filtro de la columna 15 µL-25 µL de agua desionizada estéril precalentada a 42 °C e incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 1 min a 13 000 rpm para recoger el DNA eluido.

Soluciones

NaI 6 M

NaI (Sigma)	18 g
-------------	------

Disolver con agitación en 12 mL de agua desionizada. Ajustar el volumen a 20 mL con agua desionizada. Proteger de la luz durante todo el proceso ya que es fotosensible; la solución debe ser transparente. Guardar a 4°C.

3.5.7. Clonación en vectores plasmídicos

Para clonar DNA externo en vectores plasmídicos, se preparaban el vector y el inserto teniendo en cuenta las incompatibilidades de los extremos y, posteriormente, se

ligaban. El producto de la ligación se transformaba en células competentes de *E. coli*, seleccionándose los transformantes en medio selectivo. Finalmente, mediante la extracción del DNA y su posterior análisis por restricción, PCR, y/o secuenciación, se comprobaba la construcción producida.

3.5.7.1. Obtención de extremos romos

Este método se utilizó para poder clonar fragmentos con extremos incompatibles con los del vector. Mediante este protocolo se obtienen extremos romos usando la T4 DNA polimerasa, que presenta actividad DNA polimerasa 5'-3' en presencia de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), y actividad DNA exonucleasa 3'-5'.

Procedimiento

- Mezclar en un tubo *ependorf*:
 - 2 µg-3 µg de DNA
 - 5 µL de tampón de T4 DNA polimerasa 10X (Roche)
 - 5 µL de T4 DNA polimerasa (1U/µL) (Roche)
 - 10 µL de una mezcla homogénea de los 4 dNTPs 0,5mM (Roche)
 - agua desionizada hasta 50 µL
- Incubar durante 15 min a 37°C.
- Inactivar por temperatura a 70°C durante 10 min.
- Añadir 200 µL de agua desionizada y 500 µL de tierra de diatomeas.
- Recuperar el DNA de modo análogo al protocolo de miniextracción de DNA plasmídico con la columna *Wizard[®] Minicolumn* (Promega), limpiando el DNA con etanol al 70% y eluyéndolo con agua desionizada precalentada a 42°C.

3.5.7.2. Desfosforilación

Mediante este proceso se eliminaban los grupos fosfato de los extremos 5' del vector para evitar posibles recircularizaciones. Este protocolo se utilizó para desfosforilar fragmentos de restricción recuperados de geles de agarosa en un volumen final de 20 µL. Las cantidades pueden adaptarse para otros volúmenes, manteniendo las proporciones.

- Mezclar en un *ependorf*:
 - 20 µL del DNA plasmídico digerido
 - 25 µL de agua desionizada

- 5 μL de tampón de fosfatasa alcalina 10X(Roche)
- 0,5 μL de fosfatasa alcalina (1 U/ μL) (Roche)
- Incubar durante 1 hora a 37°C.
- Inactivar la fosfatasa alcalina añadiendo EDTA pH 8 a una concentración final 5mM e incubándolo durante 10 min a 70°C.
- Añadir 200 μL de agua desionizada y 500 μL de tierra de diatomeas.
- Recuperar el DNA de modo análogo al protocolo de miniextracción de DNA plasmídico con la columna *Wizard[®] Minicolumn* (Promega), limpiando el DNA con etanol al 70% y eluyéndolo con agua desionizada precalentada a 42°C.

3.5.7.3. Ligación

Para la ligación del vector y el inserto se utilizó la T4 DNA polimerasa (Roche). Este enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato de dsDNA, y permite la ligación tanto de extremos romos como de extremos cohesivos. Las cantidades de vector e inserto se estimaban intentando mantener una relación molar vector:inserto 1:1 para extremos romos, y 2:1 para extremos cohesivos. Para calcular las cantidades de vector y de inserto se puede utilizar la siguiente formula:

$$\text{ng inserto} = [(\text{ng vector} \times \text{kb inserto})/\text{kb vector}] \times \text{relación molar inserto/vector}$$

Procedimiento

- Mezclar en un tubo *ependorf* 1 μL de tampón (10X) de la T4 DNA polimerasa (Roche), 1 μL de T4 DNA polimerasa (1 U/ μL) (Roche), las cantidades apropiadas de vector e inserto, y agua desionizada ajustando el volumen de reacción a 10 μL .
- Incubar durante 16 h a temperatura ambiente para ligar extremos romos y a 4°C en el caso de extremos cohesivos.
- Transformar 100 μL de células competentes de *E. coli*.

Los productos de PCR se ligaban en el pGEM-T[®] *Easy Vector* (Promega). Este vector se suministra ya linealizado, por digestión con el enzima *EcoRV*, y con una timina en cada extremo 3'. Esto impide la recircularización del vector y favorece la ligación de los productos de PCR ya que la *Taq* polimerasa añade una deoxiadenina en los extremos 3' del producto de PCR. Este vector, además de la diana *EcoRV*, contiene otras dianas de restricción en el MCS, que se utilizaron para recuperar insertos generando extremos compatibles con otros vectores. La diana *EcoRV* está situada en la

región codificante α -peptídica del enzima β -galactosidasa que se inactiva al insertarse el fragmento de PCR. Así, los clones recombinantes se identificaban fácilmente por el color de las colonias en placas con X-gal, sustrato de la β -galactosidasa que al ser hidrolizado forma un compuesto de color azul. Además, el MCS está flanqueado por los oligonucleótidos Direct y Reverse que se utilizaron en la secuenciación de los productos de PCR.

3.5.8. Amplificación y secuenciación de DNA

3.5.8.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La PCR, reacción en cadena de la polimerasa, permite la amplificación de fragmentos específicos de DNA entre dos regiones de secuencia conocida. Es una de las técnicas más utilizadas en biología molecular y tiene muchas aplicaciones: clonación, mutagénesis, secuenciación, etc.

Las condiciones de PCR utilizadas en este trabajo se optimizaron para amplificar DNA de *M. tuberculosis*, con un elevado porcentaje de GC. Los mejores resultados se obtuvieron con la *AmpliTaq Gold*[®] DNA polimerasa (Applied Biosystems), una Taq DNA polimerasa modificada que se suministra en un estado inactivo, activándose por calor. La DNA polimerasa puede activarse completamente en el paso de desnaturalización inicial; o bien a medida que avanza la PCR, lo que permite disminuir las amplificaciones inespecíficas ya que el enzima va estando disponible a medida que aumenta la cantidad del producto específico de la reacción. Además, para facilitar la desnaturalización del DNA, se añadía a la reacción dimetilsulfóxido (DMSO) que favorece la separación de las cadenas del DNA alterando el emparejamiento de las bases.

Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>) (Rozen y Skaletsky, 2000).

Procedimiento

- El material que se vaya a utilizar (micropipetas, puntas, *eppendorfs*, etc.), se irradia previamente con radiación, en una cabina independiente donde se realizará la mezcla de la PCR.
- Todas las soluciones se mantienen en hielo y las mezclas también se realizan en hielo.

- Mezclar en un tubo *ependorf* de 0,2 mL de capacidad:
 - 2,5 μ L de GeneAmp 10X PCR Buffer II (Applied Biosystems)
 - 2,5 μ L de DMSO (Sigma)
 - 2,5 μ L de dNTPs 20 mM (Roche)
 - 1,5 μ L de $MgCl_2$ 25 mM (Applied Biosystems)
 - 0,5 μ L de cada oligonucleótido 25 pmol/ μ L (Roche)
 - 0,1 μ L de AmpliTaq Gold 5 U/ μ L (Applied Biosystems)
 - 0,5 μ L de DNA molde (400 ng/ μ L) o 5 μ L de lisado, o agua desionizada en el tubo del control negativo
 - agua desionizada estéril hasta 25 μ L
- Someter las muestras, con el termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD), a los siguientes ciclos:
 - Desnaturalización inicial: 5 min ó 9 min (para activar toda la DNA polimerasa) a 95°C.
 - Amplificación (30 ciclos):
 - desnaturalización: 1 min a 95°C
 - hibridación: 30 s a una temperatura unos grados superior a la del oligonucleótido con temperatura de fusión más baja
 - extensión: 1 min por kb amplificada a 72°C, ó 74°C para productos con elevadas temperaturas de fusión
 - Extensión final: 7 min a la temperatura de extensión de la amplificación.

3.5.8.2. Secuenciación

Para la secuenciación se siguió el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) modificado; utilizando para el marcaje y amplificación el BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). La posterior secuenciación por electroforesis en el ABI 3730x (Applied Biosystems) la realizaba el Servei Veterinari de Genètica Molecular de la UAB.

El BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit contiene una mezcla con la DNA polimerasa, los 4 dNTPs, y una cantidad limitante de los análogos 2',3'-didesoxi de cada uno de los dNTPs marcados con fluorocromos diferentes. La incorporación de los análogos impide el posterior crecimiento de la nueva cadena, produciéndose fragmentos de distinta longitud con el análogo didesoxi en el extremo 3'. Estos

fragmentos se separan en un gel desnaturalizante de alta resolución, y la detección de las marcas fluorescentes permite la visualización de la secuencia utilizando el ABI 3730x que recoge y digitaliza las señales.

Procedimiento

- El material (micropipetas, puntas, *eppendorfs*, etc.) se irradia previamente con radiación ultravioleta; en una cabina independiente donde se realizará la mezcla de reacción.
- Todas las soluciones se mantienen en hielo y las mezclas también se realizan en hielo.
- Se mezcla en un tubo *eppendorf* de 0,2 mL de capacidad:
 - 0,5 μL de pre-mix BigDyeTM (Applied Biosystems)
 - 1,75 μL de tampón 5X (Applied Biosystems)
 - 0,5 μL de DMSO (Sigma) (opcional)
 - 1,0 μL a 2,5 μL de DNA molde (DNA plasmídico)
 - 0,65 μL de oligonucleótido 5 pmol/ μL (Roche)
 - agua desionizada hasta 10 μL
- Programar el termociclador con un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C; y 25 ciclos con una fase de desnaturalización a 96°C durante 30 s, una fase de hibridación a la temperatura óptima del oligonucleótido durante 15 s, y una fase de extensión de 4 min a 60°C.
- Una vez finalizado el marcaje se precipita la reacción:
 - Añadir 1 μL de EDTA 125 mM, 1 μL de acetato sódico 3 M y 25 μL de etanol al 100%.
 - Mezclar e incubar durante 15 min a temperatura ambiente.
 - Centrifugar 15 min a velocidad máxima.
 - Aspirar el sobrenadante y añadir 35 μL de etanol al 70%.
 - Centrifugar 5 min a velocidad máxima.
 - Aspirar el sobrenadante y secar los pellets.
- Las muestras se resuspenden en 10 μL de formamida y se analizan con el ABI 3730x.

3.6. Métodos de manipulación de RNA

Todos los métodos de manipulación de RNA implican una serie de medidas para evitar su degradación por RNasas, contaminantes muy frecuentes en el laboratorio. Así, siempre que sea posible, se utiliza material de plástico de un solo uso, preesterilizado y libre de RNasas; además, se recomienda usar las puntas de micropipeta con filtro para evitar la contaminación por aerosoles. Cuando no es posible usar material de plástico se utiliza material de vidrio previamente esterilizado en la autoclave. Es conveniente mantener el área de trabajo limpia y desinfectada con etanol, y cambiarse frecuentemente los guantes.

Las soluciones se prepararon con agua desionizada estéril. El agua que se utilizaba para resuspender el RNA o para las mezclas de reacción con RNA, era el suministrado con los *kits*, libre de RNasas.

3.6.1. Extracción de RNA total

Este método, recomendado por el Bacterial Microarray Group del St. George's Hospital Medical School (Londres), se utilizó para extraer RNA de *M. tuberculosis* para su posterior análisis con microchips de DNA. Es un protocolo largo y laborioso pero permite obtener una gran cantidad de RNA y de una calidad óptima. Las células se recogen directamente en una solución de guanidina tiocianato (GTC) de elevada molaridad, que contiene además detergentes y β -mercaptoetanol. Estos componentes desnaturalizan las proteínas, deteniendo el metabolismo celular e impidiendo variaciones en las cantidades de los diferentes mRNAs por síntesis *de novo* o por degradación por las RNasas celulares. Este paso es especialmente importante cuando se pretende cuantificar la expresión génica.

Las células recogidas por centrifugación se resuspenden entonces en Trizol[®] (Invitrogen) que contiene fenol y GTC. Este reactivo permite mantener la integridad del RNA durante la homogenización de la muestra y la lisis, a la vez que contribuye a la disrupción celular y a la disolución de los componentes celulares. A continuación, se añade cloroformo que separa la muestra en una fase orgánica y una fase acuosa que contiene exclusivamente el RNA. Se realiza una segunda extracción con cloroformo para limpiar la muestra de lípidos, muy abundantes en la pared celular de las micobacterias y, posteriormente, el RNA se precipita con isopropanol, se lava con etanol y se resuspende en agua. Finalmente, se limpia y concentra el RNA usando el *kit*

RNeasy[®] Mini (Qiagen) y se elimina el DNA contaminante con el *kit* TURBO DNA-free[™] (Ambion).

Extracción con fenol-cloroformo-isopropanol

- Inocular *M. tuberculosis* en 10 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar a 37°C durante 2 ó 3 semanas.
- Medir la OD₆₀₀ de los cultivos y hacer una resiembra en 80 mL de medio Middlebrook 7H9, de manera que la OD₆₀₀ del cultivo sea de 0,01. El medio de cultivo se prepara en un mismo lote y se hacen alícuotas en tantos frascos de cultivo de 75 cm² como cultivos se vayan a hacer para el análisis con microchips. De este modo se pretenden evitar variaciones en la expresión génica debidas a diferencias en los cultivos. Incubar a 37°C durante 1 semana.
- Recoger los cultivos directamente en un frasco de cultivo de 150 cm² que contenga 4 volúmenes (320 mL) de la solución de GTC 5 M. Mezclar moviendo el frasco cuidadosamente para no generar aerosoles.
- Centrifugar alícuotas de 40 mL, a 3000 g durante 15 min, en tubos falcon bien cerrados. Es muy importante no exceder esta cantidad para garantizar la integridad de los tubos.
- Desechar el sobrenadante (nunca mezclar la solución de GTC con lejía) y usar los restos que quedan de la solución de GTC para resuspender las células (a razón de aproximadamente 1 mL de GTC por 40 mL de cultivo original, aunque se debería usar un ratio mayor para cultivos en fase estacionaria, o cultivos con bacterias agregadas). Es importante usar la solución para lavar bien todo el fondo cónico del tubo donde quedan muchas células adheridas. Transferir alícuotas de 1 mL a tubos *eppendorf*.
- Centrifugar durante 1 min a 13 000 rpm y desechar el sobrenadante.
- Usar 200 µL de Trizol (Invitrogen) para resuspender bien las células, adheridas también a toda la pared del tubo, y añadir 800 µL más de Trizol. Transferir a un tubo con 0,5 mL de bolitas de zirconia de 0,1 mm de diámetro (Biospec).
- Lisar las células con el Mini BeadBeater (Biospec) sometiéndolas a dos pulsos de 30 s a velocidad máxima.
- Mantener los tubos a temperatura ambiente durante 10 min para permitir la disolución de los complejos RNA-proteína, y dar un pulso de centrifuga para

separar las bolitas. Transferir el sobrenadante a un *ependorf*. Añadir 200 μ L de cloroformo y mezclar con el vórtex durante 30 s.

- Dejar los tubos a temperatura ambiente durante 10 min para permitir la partición de las fase fenólica y acuosa. Centrifugar a 13 000 rpm durante 15 min para separar las dos fases.
- Transferir la fase acuosa a un tubo *ependorf* (evitar succionar el DNA que se encuentra en la interfase) y reextraer con 1 volumen de cloroformo. Mezclar con el vórtex durante 30 s, mantener a temperatura ambiente 10 min, y centrifugar 15 min a 13 000 rpm.
- Transferir la fase acuosa a un *ependorf* y añadir 0,8 volúmenes de isopropanol. Incubar los tubos durante 16 h a -20°C para precipitar el RNA y centrifugar a 13 000 rpm durante 20 min a 4°C .
- Desechar el sobrenadante, lavar el pellet con etanol y mezclar con el vórtex. Centrifugar a 13 000 rpm durante 15 min a 4°C .
- Eliminar el etanol y secar el pellet dejando el *ependorf* abierto en la cabina de flujo laminar previamente irradiada.
- Resuspender el RNA en agua RNase-free (Qiagen) calentando las muestras durante 10 min a 50°C y agitándolas regularmente con el vórtex. El RNA precipitado es difícil de disolver, además, gran parte queda adherido en las paredes del *ependorf* por lo que es conveniente lavarlas bien con el agua para asegurarnos que lo recuperamos completamente. Juntar los tubos que contengan RNA procedente de un mismo cultivo resuspendiendo los pellets en una única alícuota de agua de 100 μ L (a un ratio de 100 μ L de agua por cada 80 mL de cultivo original) para mantener una concentración de RNA alta.

Purificación con el RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen)

Limpiar y concentrar las muestras de RNA mediante el protocolo RNA clean-up del *kit* RNeasy[®] Mini (Qiagen) [también se puede usar el *kit* RNeasy[®] MiniElute[™] (Qiagen)]. Este sistema se basa en las propiedades de unión selectivas del RNA a una membrana de sílica-gel en un medio tamponado con un alto contenido salino y en presencia de etanol para favorecer la unión. Esto permite la adhesión a la membrana de hasta 100 μ g de RNA que, posteriormente, es lavado para eliminar contaminantes y eluido con 30 μ L de agua. Es muy importante no exceder la capacidad de unión de la membrana ya que esto resultaría en una disminución del rendimiento y de la pureza del

RNA obtenido. Así si se utiliza el *kit* RNeasy[®] MiniElute[™] (Qiagen), debe tenerse en cuenta que como máximo se pueden purificar 45 µg de RNA por columna. El protocolo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tratamiento con el *kit* TURBO DNA-free[™] (Ambion)

Los restos de DNA se eliminaron con el *kit* TURBO DNA-free[™] (Ambion) que contiene una DNasa I modificada con una elevada actividad catalítica. Puesto que las muestras a tratar presentan una concentración de ácidos nucleicos muy elevada (incluyendo DNA) se debe utilizar el protocolo de tratamiento riguroso:

- Diluir la muestra hasta una concentración de ácidos nucleicos de 200 ng/µL con agua RNase-free (Qiagen). Dispensar la muestra en alícuotas, de volumen igual o inferior a 87 µL, en *ependorfs* de 0,5 mL para facilitar la recuperación del sobrenadante tras el tratamiento con el inhibidor de la DNasa.
- Añadir a cada *ependorf* 10 µL de tampón TURBO DNasa 10X, 3 µL de TURBO DNasa y agua RNase-free (Qiagen) hasta un volumen final de 100 µL.
- Incubar durante 30 min a 37°C.
- Añadir 3 µL más de TURBO DNasa e incubar otros 30 min a 37°C.
- Resuspender bien el reactivo inhibidor de la DNasa con el vórtex y añadir 20 µL a la muestra (0,2 volúmenes).
- Incubar durante 2 min-3 min a temperatura ambiente, mezclando bien la muestra 2 ó 3 veces durante el tiempo de incubación.
- Centrifugar a velocidad máxima durante 1,5 min. Transferir el RNA a otro tubo. El inhibidor de la DNasa quela cationes divalentes, como el magnesio o el calcio, por lo que se debe ir con cuidado para no contaminar el RNA con inhibidor, ya que podría impedir reacciones posteriores como la retrotranscripción.
- Juntar todas las muestras procedentes de un mismo cultivo y comprobar por PCR que no quedan restos de DNA (si todavía quedara DNA contaminante se repetiría el tratamiento con TURBO DNasa).
- En caso necesario, reconcentrar las muestras con el protocolo RNA clean-up del *kit* RNeasy[®] Mini (Qiagen) según se ha descrito anteriormente.

Soluciones

Solución GTC 5M

Concentraciones finales:

Guanidina tiocianato	5 M
N-Lauroylsarcosina sódica	0,5% (p/v)
β -Mercaptoetanol	0,1 M
Tween 80	0,5% (v/v)

Pesar 590,8 g de GTC y disolverlos con agitación y calor, añadiéndolos lentamente a 400 mL de agua destilada. La disolución de GTC en agua es una reacción endotérmica, por lo que disminuye mucho la temperatura de la solución y también la solubilidad de la GTC; por eso es importante disolverlo calentando, para mantener la solución a una temperatura de unos 20°C-25°C. Una vez completamente disuelta, se añaden 5 g de N-lauroylsarcosina sódica, 7,5 mL de β -mercaptoetanol y 5 mL de Tween 80. Se disuelve con agitación y se ajusta el volumen a 1 L con agua destilada. Guardar protegido de la luz. Antes de usar, hacer alícuotas de 320 mL en frascos de cultivo de 150 cm².

3.6.2. Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA

Una vez obtenido el RNA se debe determinar la integridad y concentración del mismo. Dependiendo de las posteriores aplicaciones y de la concentración estimada de la muestra se puede usar uno de los dos métodos que se describen a continuación. Es recomendable también realizar una RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*) control para comprobar que el RNA es de una calidad suficiente para ser amplificado y que carece de DNA contaminante.

3.6.2.1. Cuantificación espectrofotométrica

La concentración del RNA se establecía midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en el espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf). Se utilizaron las cubetas UVette[®] (Eppendorf) que son estériles y RNase-free, por lo que, en caso necesario, se puede recuperar la muestra después de la lectura de la absorbancia.

Para garantizar la significación de la lectura, la A_{260} debe oscilar entre 0,15 y 1, por lo que se diluía una alícuota de la muestra 50 veces, con agua RNase-free. Una unidad de A_{260} corresponde a 44 μ g de RNA por mL.

La pureza del RNA se puede estimar a partir de los ratios de varios valores de absorbancia. Puesto que las proteínas absorben a 280 nm, el ratio de $A_{260/280}$ nos da una estimación de la contaminación de la muestra por proteínas. Este ratio es ≥ 2 en muestras de RNA puras, disminuyendo en presencia de proteínas. La A_{230} nos da una estimación de la presencia de otras impurezas como carbohidratos, péptidos, fenol o compuestos aromáticos. Así el ratio de $A_{260/230}$ debe ser también ≥ 2 . Hay que tener en cuenta que estos valores de absorbancia se ven afectados por el pH y fuerza iónica de la muestra, siendo válidos a un pH neutro. Por ello, para una determinación exacta, se debe diluir la muestra en TrisHCl 10 mM pH 7-7,5 que se usa también, en este caso, para calibrar el espectrofotómetro.

La integridad del RNA se puede comprobar por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El rRNA debe aparecer en dos bandas bien definidas. En RNAs degradados las bandas de rRNA aparecen difuminadas y se observa un *smear* de RNAs de menor tamaño.

3.6.2.2. Análisis con el Bioanalyzer 2100 (Agilent)

El control de calidad del RNA utilizado en los experimentos con microchips de DNA, se realizó también con el Bioanalyzer 2100 (Agilent) basado en la tecnología de microfluidos Lab-on-a-Chip. Esta tecnología permite el manejo, mezclado, dilución, electroforesis y separación cromatográfica de la muestra, la tinción y detección; en un solo sistema integrado, estandarizado y automatizado. El análisis de 12 muestras se puede realizar en 30 min, y tan sólo se requieren pico- o nanogramos de RNA.

Los resultados se pueden visualizar como una imagen virtual de un gel de electroforesis o como un perfil de picos (electroferograma). El software del Bioanalyzer calcula la concentración de RNA, el ratio del rRNA y el RIN (RNA Integrity Number). Estos 2 últimos valores (y el aspecto de los picos en el electroferograma) son indicadores de la integridad del RNA.

En este trabajo se utilizó el Agilent RNA 6000 Nano Chip Kit de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

3.7. Métodos de manipulación de proteínas

3.7.1. Obtención de extractos proteicos

En este trabajo se obtuvieron extractos proteicos de *M. smegmatis*, para comprobar la producción del regulador Rv0576 clonado en un vector de expresión; y de *M. tuberculosis*, para detectar la proteína Rv0577 por Western-blot. El procedimiento utilizado se adaptó del descrito por Parish y Wheeler (1998) con ligeras modificaciones. Los protocolos que se siguieron para cada microorganismo difieren por razones de bioseguridad. Así, las células de *M. smegmatis* se lisaron por sonicación mientras que, las células de *M. tuberculosis* se lisaron con el Mini BeadBeater (Biospec). Además, en el caso de *M. tuberculosis*, los cultivos se realizaban en medio sólido para conseguir una mayor masa celular, puesto que la proteína Rv0577 se produce en baja cantidad y se encuentra tanto en el citoplasma, como en la pared celular y el sobrenadante de los cultivos (Rosenkrands *et al.*, 2000; Huard *et al.*, 2003). Por contra, los cultivos de *M. smegmatis* se realizaban en medio líquido para evitar los problemas de agregación celular derivados de trabajar con células obtenidas en medio sólido.

3.7.1.1. *M. smegmatis*

- Inocular una colonia fresca de *M. smegmatis* en 10 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar a 37°C y 200 rpm, durante 2 ó 3 días.
- Hacer una resiembra 1/100 en medio Middlebrook 7H9 e incubar en las mismas condiciones hasta alcanzar una OD₆₀₀ de aproximadamente 1.
- Centrifugar 3 mL de cultivo durante 10 min, a 3000 g y 4°C, en un tubo estéril previamente pesado.
- Desechar el sobrenadante y resuspender las células en 1 mL de PBS frío. Centrifugar durante 10 min, a 3000 g y a 4°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender las células en 500 µL de PBS frío. Centrifugar durante 10 min, a 3000 g y a 4°C. Estos lavados con PBS eliminan los restos de medio, lo cual es especialmente importante debido a la gran cantidad de BSA del medio que interferiría luego en la cuantificación de las proteínas celulares y en la electroforesis.
- Desechar el sobrenadante, pesar las células y resuspenderlas en 3 mL de PBS frío por g de células.

Materiales y métodos

- Sonicar con el homogenizador ultrasónico LABSONIC U (B. Braun), con una sonda pequeña de Titanio. Seleccionar la fuente de energía en low y aplicar una potencia máxima de 50 W, en ciclos de 0,5 s. Someter a pulsos de 1 min, con al menos 1 min de reposo entre pulsos, durante el tiempo necesario para conseguir la lisis de las células. Es importante evitar el calentamiento de la muestra manteniéndola en todo momento en hielo.
- Centrifugar a 3000 g durante 5 min para separar las células no lisadas y transferir el extracto proteico a un tubo nuevo.
- Medir la concentración de proteínas y utilizar inmediatamente o congelar a -80°C .

3.7.1.2. *M. tuberculosis*

- Añadir 200 μL de tampón de lisis a un tubo de Mini BeadBeater estéril que contenga 100 μL de bolitas de vidrio *acid-washed* de 0,1 mm de diámetro (Sigma).
- Añadir 2 ó 3 asas de Külle llenas de células (en este caso es muy difícil lavar las células con PBS ya que están agregadas).
- Someter las células a 3 pulsos de 1 min a velocidad máxima en el Mini BeadBeater (Biospec), con al menos 1 min de reposo en hielo entre cada pulso.
- Centrifugar 5 min a 3000 rpm para sedimentar las bolitas y las células no lisadas.
- Transferir el sobrenadante a un *eppendorf* y filtrar los extractos proteicos de *M. tuberculosis* con las unidades de filtrado por centrifugación Ultrafree-MC con membrana de PVDF de 0,22 μm de diámetro de poro (Millipore). De este modo el resto del proceso puede realizarse fuera del laboratorio de bioseguridad.
- Utilizar inmediatamente o congelar a -80°C .

Tampón de lisis

Mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma)	53,8 mg
DMSO	400 μL
SDS 10% (p/v)	120 μL
TrisHCl 1 M pH 7	100 μL

Disolver la mezcla de inhibidores de proteasas en 400 μL de DMSO y 1,6 mL de agua desionizada estéril. Añadir el SDS al 10% y el TrisHCl, y mezclar. Guardar a 4°C .

3.7.2. Determinación de la concentración de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó con el Coomassie[®] Protein Assay Reagent Kit (Pierce) basado en el método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Cuando el colorante Coomassie[®] se une a proteínas en un medio ácido, sufre un cambio de color de marrón a azul, desplazándose su máximo de absorbancia de 465 nm a 595 nm. La concentración de proteínas de la muestra se estima por comparación de la absorbancia obtenida, con la de una serie de estándares de concentración conocida que se procesan junto con la muestra.

Procedimiento

- Agitar bien el reactivo, separar una alícuota de la cantidad que se vaya a usar y atemperar a temperatura ambiente (proteger de la luz).
- Preparar la recta patrón mezclando 1 mL de reactivo y cantidades crecientes de BSA (2 mg/mL) hasta 10 µg/mL (cantidades mayores no siguen una relación lineal con la absorbancia).
- Mezclar 25 µL de muestra con 1 mL del reactivo (la cantidad de muestra dependerá de su concentración proteica, debería usarse una cantidad que esté incluida en la parte lineal de la curva de calibración).
- Incubar durante 10 min y medir la absorbancia a 595 nm.
- Calcular la recta de regresión con los valores de la recta patrón y determinar la concentración de proteínas de la muestra.

3.7.3. Electroforesis de proteínas

Los extractos proteicos se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Las proteínas se desnaturalizan calentándolas a 100°C en presencia de SDS y β-mercaptoetanol que rompe los puentes disulfuro. El SDS se une a las proteínas confiriéndoles una carga superficial negativa de manera que la movilidad electroforética de las proteínas será proporcional a su peso molecular.

Se utilizó el sistema discontinuo de dos geles descrito por Laemmli (1970). El gel superior, o *stacking*, contiene una proporción de acrilamida más baja y se prepara con un tampón de menor fuerza iónica y diferente pH que el gel inferior, o de separación. Esto favorece una migración rápida de las proteínas que se concentran en la

intersección con el gel de separación en el que entrarán sucesivamente incrementándose la resolución.

Las proteínas se visualizaron por tinción con el colorante Coomassie que permite detectar de 1 µg a 10 µg de proteína por banda.

Se prepararon geles al 10% de acrilamida para visualizar la proteína Rv0576, y al 12% para detectar la proteína Rv0577. El aparato de electroforesis que se usó fue el Mini-PROTEAN II (BIO-RAD) y la fuente de electroforesis POWER PAC 300 (BIO-RAD).

Procedimiento

- Limpiar los vidrios, separadores y soportes con etanol, secarlos y montarlos según las instrucciones del fabricante.
- Preparar el gel de separación a la concentración de acrilamida deseada mezclando en un matraz de Kitasato de 25 mL:
 - la cantidad necesaria, según el gel que se quiera preparar, de una solución de acrilamida al 30% y bisacrilamida al 0,8%
 - 1,875 mL de TrisHCl/SDS 4X, pH 8,8
 - agua desionizada estéril hasta 7,5 mL
- Desgasificar la mezcla conectando el matraz de Kitasato, tapado, a una bomba de vacío unos 10 min.
- Añadir 25 µL de persulfato amónico al 10% y 5 µL de TEMED.
- Rápidamente, mezclar con ayuda de la micropipeta e introducir la disolución entre los dos vidrios hasta llenar $\frac{3}{4}$ partes.
- Añadir unas gotas de *n*-butanol y dejar polimerizar.
- Eliminar el *n*-butanol lavando con agua destilada. Secar los vidrios.
- Preparar el gel superior mezclando en un matraz de Kitasato de 25 mL:
 - 0,325 mL de la solución de acrilamida al 30% y bisacrilamida al 0,8%
 - 0,625 mL TrisHCl/SDS 4X pH 6,8
 - 3,05 mL de agua desionizada
- Desgasificar la mezcla conectando el matraz de Kitasato tapado, a una bomba de vacío unos 10 min.
- Añadir 12,5 µL de persulfato amónico al 10% y 2,5 µL de TEMED.

- Rápidamente, mezclar con ayuda de la micropipeta e introducir la disolución entre los dos vidrios, encima del gel separador. Colocar el peine y dejar polimerizar.
- Mezclar las muestras de proteínas con el tampón de carga 5X.
- Calentar las muestras y el marcador de peso molecular [SDS-PAGE Molecular Weight Standard Low Range (BIO-RAD)] a 100°C durante 5 min.
- Centrifugar brevemente y colocar las muestras y el marcador en hielo.
- Sacar el peine del gel superior y colocar el soporte con el gel en la cubeta de electroforesis. Añadir 300 mL de tampón de electroforesis 1X, llenando previamente el depósito interior.
- Aplicar un máximo de 20 µL de muestra ó 8 µL de marcador, por pocillo.
- Conectar la cubeta a la fuente de alimentación y realizar la electroforesis fijando el voltaje a 120 V.
- Una vez finalizada la electroforesis se saca el soporte y, con mucho cuidado, el gel.
- Colocar el gel en una cubeta con la solución de Coomassie y mantenerlo en agitación lenta unos 20 min.
- Descartar el colorante y desteñir el gel con solución decolorante en agitación lenta durante 1 h, o hasta que se visualicen correctamente las bandas de proteínas.
- Detener la decoloración lavando el gel con agua destilada.

Soluciones

Solución de acrilamida 30% bisacrilamida 0,8%

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0,8 g

Disolver en 70 mL de agua desionizada y llevar a un volumen final de 100 mL. Esterilizar por filtración con filtros de 0,45 µm de diámetro de poro. Proteger de la luz y mantener a 4°C. El monómero de acrilamida es neurotóxico por lo que se debe trabajar con guantes y mascarilla.

TrisHCl/SDS 4X pH 8,8

TrisBase	91 g
SDS	2 g

Materiales y métodos

Disolver en 300 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8,8 con HCl 1 N. Añadir agua destilada hasta un volumen final de 500 mL. Filtrar la solución con filtros de 0,45 µm de diámetro de poro y guardar a 4°C.

TrisHCl/SDS 4X pH 6,8

TrisBase	6,05 g
SDS	0,4 g

Disolver en 40 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6,8 con HCl 1 N. Añadir agua destilada hasta un volumen final de 100 mL. Filtrar la solución con filtros de 0,45 µm de diámetro de poro y guardar a 4°C.

Persulfato amónico al 10%

Disolver 1 g de persulfato amónico en 10 mL de agua. Hacer alícuotas de 500 µL y congelar a -20°C. Cuando se vaya a usar descongelar lentamente en hielo y mantener siempre en hielo.

Tampón de carga 5X

Añadir a 3,8 mL de agua desionizada estéril:

TrisHCl 0,5 M pH 6,8	1 mL
Glicerol	0,8 mL
SDS 10% (p/v)	1,6 mL
Azul de bromofenol	0,4 mL
β-mercaptoetanol	0,4 mL

Hacer alícuotas de 500 µL y congelar a -20°C.

Tampón de electroforesis 5X

TrisBase	15,1 g
Glicina	72 g
SDS	5 g

Disolver en agua destilada ajustando el volumen final a 1 L. Diluir 5 veces para la solución de trabajo. Conservar a 4°C.

Solución de Coomassie

Coomassie Brilliant Blue	2,5 g
Metanol	500 mL

Ácido acético glacial	100 mL
-----------------------	--------

Disolver en 400 mL de agua destilada. Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz.

Solución decolorante

Metanol	150 mL
Ácido acético glacial	50 mL

Mezclar con 300 mL de agua. Guardar a temperatura ambiente.

3.7.4. Western-blot

Esta técnica es muy útil para localizar proteínas específicas en muestras complejas, pudiéndose detectar cantidades del orden de nanogramos. Las proteínas se separan en un gel de poliacrilamida y se electrotransfieren a un soporte sólido para hacerlas más accesibles al anticuerpo específico contra la proteína. El complejo antígeno-anticuerpo puede detectarse entonces con un segundo anticuerpo que tiene unido un enzima que produce un compuesto coloreado. En este trabajo esta técnica se aplicó para detectar la proteína Rv0577 en extractos proteicos de diferentes cepas de *M. tuberculosis* recombinantes, usando el anticuerpo monoclonal HBT7 que reconoce específicamente esta proteína (Rosenkrands *et al.*, 2000) y que nos fue proporcionado por el Dr. P. Andersen del Statens Serum Institute, Dinamarca.

Preparación de la muestra

Se utilizaron extractos proteicos obtenidos según se describe en el apartado 3.7.1.2.

SDS-PAGE

Se separaban las diferentes proteínas de la muestra mediante electroforesis tal y como se describe en el apartado 3.7.3. Se realizaban dos geles en paralelo, uno para observar las proteínas teñidas con Coomassie, y el otro para la transferencia. Como marcador de peso molecular se utilizó el SDS-PAGE Molecular Standards Low Range (BIO-RAD) preteñido, para poder visualizarlo en la membrana una vez transferido.

Transferencia

- Preparar el módulo de transferencia Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD). Limpiarlo con agua destilada y secarlo.

Materiales y métodos

- Cortar la membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD) y 6 papeles de filtro del tamaño exacto del gel de separación. Usar guantes siempre que se manipule la membrana.
- Marcar una esquina de la membrana.
- Equilibrar el gel, la membrana, los papeles de filtro y las esponjitas en tampón de transferencia durante 15 min-60 min a temperatura ambiente.
- Preparar el sándwich en una cubeta con tampón de transferencia, en el siguiente orden: cátodo (-), placa negra del casete de transferencia, esponja, 3 papeles de filtro, gel, membrana de nitrocelulosa (prestando atención a la posición de la marca), 3 papeles de filtro, esponja, placa roja del casete de transferencia, ánodo (+). Es muy importante que no queden burbujas entre los filtros y el gel, ni entre el gel y la membrana, ni entre la membrana y los filtros.
- Cerrar el casete de transferencia con cuidado para no mover el gel o la membrana.
- Poner el casete en el módulo de transferencia, y éste en la cubeta.
- Colocar el depósito de hielo en la cubeta y llenarla con tampón de transferencia frío.
- Añadir una mosca magnética y mantenerlo en vigorosa agitación para ayudar a conservar la temperatura y la distribución de iones del tampón de transferencia. Mantener a 4°C durante toda la transferencia.
- Conectar la cubeta a la fuente de alimentación POWER PAC 300 (BIO-RAD) y realizar la transferencia fijando el amperaje a 350 mA durante 90 min. Las proteínas cargadas negativamente por el SDS, migran hacia el ánodo, donde está la membrana de nitrocelulosa.
- Una vez finalizada la transferencia desmontar cuidadosamente el sándwich.
- Teñir el gel con Coomassie para asegurarse de que se han transferido las proteínas.
- Cortar la esquina de la membrana que se había marcado con lápiz.

Bloqueo de la membrana

- Transferir la membrana a una cubeta con 25 mL de tampón TBS y mantenerla con agitación suave durante 5 min.
- Decantar el TBS y añadir 25 mL de la solución de bloqueo TBST. Esta solución contiene leche descremada y Tween que se unen a la membrana evitando así una posterior unión inespecífica del anticuerpo.
- Mantener en agitación suave durante 2 h a temperatura ambiente, o 12 h a 4°C.

Unión del anticuerpo específico

- Desechar la solución de bloqueo.
- Añadir 10 mL de solución de bloqueo con 200 μ L de anticuerpo HBT7 (dil. 1:50).
- Incubar 1 h ó 2 h a temperatura ambiente con agitación suave.
- Realizar 3 lavados, para eliminar los restos de anticuerpo, con tampón de bloqueo TBST durante 5 min con agitación suave.

Detección

- Añadir a la membrana 10 mL de solución de bloqueo con 3,3 μ L de anticuerpos policlonales de conejo anti-IgG de ratón, conjugados con fosfatasa alcalina (dilución 1/3000 según instrucciones del fabricante, Sigma).
- Incubar 1h ó 2 h a temperatura ambiente con agitación suave.
- La detección se realiza usando sustratos del enzima fosfatasa alcalina que emiten luz (detección quimioluminiscente) o bien color (detección colorimétrica). En este trabajo se usó la detección colorimétrica, ya que es más sencilla y se obtuvieron mejores resultados que con la quimioluminiscente. La detección colorimétrica utiliza el sustrato BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) que es desfosforilado por la fosfatasa alcalina dando lugar a un intermediario que dimeriza, en condiciones oxidantes, reduciendo a su vez el NBT (nitroblue tetrazolium) y formándose como resultado los compuestos coloreados.
 - Incubar la membrana con 10 mL de tampón 3 durante 5 min.
 - Desechar el tampón 3 e incubar la membrana con 10 mL de tampón de sustratos de la fosfatasa alcalina.
 - Incubar en la oscuridad, sin agitación, hasta que la aparición de las bandas sea evidente.
 - Detener la reacción con sucesivos lavados con agua destilada.

Soluciones

Tampón de transferencia

Glicina	2,9 g
TrisHCl 1 M pH 7,5	48 mL
SDS 10% (p/v)	3,7 mL
Metanol	200 mL

Materiales y métodos

Disolver en 500 mL de agua destilada y ajustar el volumen final a 1 L. Guardar a 4°C.

TBS

Concentraciones finales:

TrisHCl	10 mM
NaCl	150 mM

Disolver 8,76 g de NaCl en 500 mL de agua destilada, añadir 10 mL de TrisHCl 1 M pH 7,5 y añadir agua destilada hasta un volumen final de 1 L. Guardar a 4°C.

TBST

TBS con leche descremada al 5% (p/v) y Tween 80 al 0,02% (v/v). Disolver bien la leche para que no queden grumos. Preparar al momento y guardar a 4°C no más de una semana.

Tampón 3

NaCl	100 mM
TrisHCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM

Disolver 0,58 g de NaCl y 1,01 g de MgCl₂·6H₂O en 70 mL de agua destilada. Añadir 10 mL de TrisHCl 1 M pH 9,5 y llevar a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

Tampón de sustratos de la fosfatasa alcalina

Tampón 3	10 mL
NBT (75 mg/mL en dimetilformamida al 70%)	45 µL
BCIP (50 mg/mL en dimetilformamida al 100%)	35 µL

3.8. Análisis de la expresión génica

3.8.1. RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*)

Esta técnica permite analizar la expresión génica mediante la detección de los transcritos de RNA por transcripción inversa y amplificación, con cebadores específicos de los genes que se pretenden estudiar. Es un método cualitativo, nos permite determinar si un gen se está expresando o no, y puede ser semicuantitativo, podemos estimar el grado de expresión cuantificando la cantidad de producto amplificado mediante la intensidad de fluorescencia en un gel de agarosa. Sin embargo, esta última

aplicación ha sido desplazada por otros métodos cuantitativos mucho más precisos y reproducibles, como la RT-PCR en tiempo real. En este trabajo se usó como control de la calidad del RNA que posteriormente se utilizaría para el análisis con microchips.

Para la síntesis del cDNA se utilizó la AMV Reverse Transcriptase (AMV-RT) de Promega. El producto de esta reacción se utilizó posteriormente como DNA molde para la amplificación por PCR con la *AmpliTaq Gold*[®] DNA polimerasa (Applied Biosystems) según se describe en el apartado 3.5.8.1.

El protocolo habitual utilizado para una reacción de RT de volumen final 20 μ L es el siguiente:

- El material utilizado (micropipetas, puntas, *eppendorfs*, etc.) se irradia previamente con radiación ultravioleta, en una cabina independiente donde se realizará la mezcla de reacción.
- Todas las soluciones se mantienen en hielo y las mezclas también se realizan en hielo.
- Mezclar en un *eppendorf* de 0,2 mL: 1 μ g de RNA, 4 μ L de tampón de reacción 5X de la AMV-RT (Promega), 2 μ L de dNTPs 20 mM (Roche), 1 μ L del oligonucleótido reverso, y agua RNase-*free* (Qiagen) hasta completar un volumen de 19 μ L.
- Calentar las muestras en el termociclador durante 10 min a 65°C para desnaturalizar el RNA.
- Mantener a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la hibridación del cebador.
- Añadir a todos los tubos (excepto al control negativo de la RT): 0,1 μ L de inhibidor de RNasa 40 U/ μ L (Roche) y 1,0 μ L de AMV-RT 10 U/ μ L (Promega).
- Mantener en el termociclador durante 1 h a 42°C para que se produzca la síntesis de cDNA, y 5 min a 95°C para inactivar la AMV-RT.
- Usar 2 μ L de la reacción anterior como DNA molde para la PCR, usando el mismo oligonucleótido reverso que en la RT y un oligonucleótido directo. En el control negativo de la RT no debe haber amplificación, puesto que al no añadirle AMV-RT no se sintetiza cDNA; si se detecta amplificación significa que el RNA estaba contaminado con DNA. Debería hacerse un control negativo de RT por cada muestra de RNA.

3.8.2. Ensayo de la actividad β -galactosidasa

En este caso la expresión génica no se analiza por detección del transcrito si no mediante la cuantificación de la actividad del enzima β -galactosidasa expresado bajo el control del promotor del gen de interés. Es un método cuantitativo que, de un modo indirecto, nos permite estudiar la expresión de un gen bajo diferentes condiciones. Si bien no es tan preciso como la RT-PCR en tiempo real, es más fácil de realizar ya que no se requiere extraer RNA.

Este ensayo, basado en el método descrito por Miller (1972), consiste en la hidrólisis del compuesto incoloro *o*-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG), por parte del enzima β -galactosidasa (producto del gen *lacZ*) a 28°C y pH 7, dando lugar al producto coloreado *o*-nitrofenol que puede ser valorado espectrofotométricamente.

En *E. coli* el ensayo se realiza en muestras de cultivo tratadas con tolueno, que aumenta la permeabilidad de la pared celular permitiendo el paso de moléculas de bajo peso molecular. Sin embargo, la compleja pared celular de las micobacterias dificulta la solubilización del enzima obteniéndose actividades muy bajas. Por lo tanto, para medir la actividad β -galactosidasa en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* se utilizaron extractos proteicos.

Crecimiento y preparación de los extractos proteicos

- Inocular una colonia fresca de *M. tuberculosis* o *M. smegmatis* en 10 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar a 37°C durante 2 ó 3 semanas o días, respectivamente.
- Hacer una resiembra 1/100 en medio Middlebrook 7H9 de manera que la OD₆₀₀ del cultivo sea de 0,04, e incubar a 37°C. En el caso de que se quiera estudiar la expresión en presencia o ausencia de un inductor (o cualquier tratamiento o condición de cultivo), se harán 2 cultivos, siendo uno de ellos el control sin inducción. El volumen de cultivo dependerá del número de muestras que queramos procesar, teniendo en cuenta que se requieren 4 mL de cultivo por ensayo.
- Incubar 1 semana, en el caso de *M. tuberculosis*, o 12 h, en el caso de *M. smegmatis* (mitad de fase exponencial). Medir la OD₆₀₀ y centrifugar 4 mL de cultivo en tubos estériles durante 10 min, a 3000 g y 4°C.

- Resuspender las células en 1 mL de PBS frío y centrifugar durante 10 min, a 3000 g y a 4°C.
- Resuspender las células en 500 µL de PBS frío y centrifugar durante 10 min, a 3000 g y a 4°C.
- Resuspender las células en 500 µL de PBS frío y transferir a un tubo estéril con 200 µL de bolitas de vidrio *acid-washed* de 0,1 mm de diámetro (Sigma).
- Someter las células a 6 pulsos de 30 s a velocidad máxima en el Mini BeadBeater (Biospec), con al menos 1 min de reposo en hielo entre cada pulso.
- Centrifugar 3 min a 13 000 rpm para sedimentar las bolitas y las células no lisadas.
- Transferir el sobrenadante a un *ependorf* y filtrar los extractos proteicos de *M. tuberculosis* con las unidades de filtrado por centrifugación Ultrafree-MC con membrana de PVDF de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore). De este modo el resto del proceso puede realizarse fuera del laboratorio de bioseguridad. Usar 200 µL para realizar el ensayo y los otros 200 µL para medir la concentración de proteínas por Bradford según se describe en el apartado 3.7.2.

Ensayo de la β -galactosidasa

- Mezclar en un tubo de ensayo 200 µL de muestra y 800 µL de tampón Z. Añadir a un tubo 200 µL de PBS en lugar de la muestra; este tubo, que se procesa como los otros, se usa posteriormente para calibrar el espectrofotómetro.
- Incubar en un baño a 28°C durante 5 min para atemperar las muestras.
- Añadir 200 µL de ONPG a cada tubo y agitarlos. Cronometrar el tiempo desde que se añade el ONPG hasta que se para la reacción.
- Detener la reacción añadiendo 500 µL de Na₂CO₃ 1 M en el momento en que se observe una coloración amarillenta en la muestra; agitar y preservar los tubos de la luz hasta la lectura. Finalmente añadir también 500 µL de Na₂CO₃ 1 M al blanco.
- Medir la OD de cada muestra a 420 nm (absorbancia debida al *o*-nitrofenol y a la dispersión de los restos celulares) y a 550 nm (debida únicamente a la dispersión y utilizada como factor corrector de la dispersión a 420 nm).

Cálculo de la actividad β -galactosidasa

La actividad enzimática se expresa en unidades Miller, un tipo de unidad arbitraria que representa la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 nmol de ONPG en 1 min a 28°C y pH 7. Normalmente la actividad se expresa en función de la OD del cultivo y el volumen procesado. Como en este trabajo el ensayo se realizó con extractos proteicos, la actividad se corrigió por la cantidad de proteína presente en los 200 μ L de muestra según la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Miller/mg de proteína} = 1000 \left[\frac{(\text{OD}_{420} - 1,73 \times \text{OD}_{550})}{(T \times \text{mg prot})} \right]$$

T = tiempo de ensayo en min

Se calcularon las medias y desviaciones estándar para cada valor, y se compararon mediante la prueba t de Student para muestras apareadas, cuando se comparaba una misma cepa en condiciones inducidas y no inducidas, o para muestras no apareadas cuando se comparaban entre sí cepas o clones diferentes. Las diferencias se consideraron significativas para valores de $p < 0,05$.

Soluciones

Tampón Z

Na ₂ HPO ₄ (60 mM)	4,26 g
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O (40 mM)	2,76 g
KCl (10 mM)	0,373 g
MgSO ₄ x7H ₂ O (1 mM)	0,123 g
β -mercaptoetanol (50 mM)	1,75 mL

Disolver en 450 mL de agua desionizada, ajustar a pH 7 y enrasar a 500 mL. Guardar a 4°C.

Tampón fosfato 0,1 M pH 7

Na ₂ HPO ₄ (0,1 M)	1,38 g
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O (0,1 M)	1,42 g

Disolver en 90 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7 y enrasar a 100 mL. Se puede esterilizar en la autoclave a 121°C durante 15 min. Mantener a 4°C.

ONPG

ONPG	4 mg/mL
------	---------

Disolver en tampón fosfato 0,1 M pH 7. Proteger de la luz. Preparar en el momento de usarlo.

Na₂CO₃ 1 M

Na₂CO₃ 5,25 g

Disolver en 50 mL de agua destilada. Utilizar inmediatamente.

3.8.3. Microchips de DNA

Esta incipiente tecnología permite el análisis simultáneo de múltiples genes, ya sea a nivel de DNA como de mRNA, presentando pues múltiples aplicaciones. En este trabajo se ha utilizado para determinar los genes regulados por el regulador transcripcional Rv0576, comparando el transcriptoma de una cepa mutante con el de la cepa salvaje y una cepa complementada. También se ha aplicado en la comparación de cepas con diferentes fenotipos en cuanto a la síntesis de PDIM y a la tinción con rojo neutro.

El primer estudio se llevó a cabo durante una estancia en el Bacterial Microarray Group del St. George's Hospital Medical School (Londres). Mientras que, el segundo experimento fue realizado por la Unidad de microarrays del Centre de Regulació Genòmica (CRG, Barcelona).

Se utilizaron microchips de productos de PCR sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina, producidos por el Bacterial Microarray Group. Cada microchip contenía todos los genes de *M. tuberculosis* por duplicado, controles negativos (con sólo la solución de impresión o con DNA de genes humanos), controles de contaminación durante la impresión (espacios vacíos situados a continuación del DNA ribosomal), marcadores de orientación (los fluorocromos Cy3 y Cy5), y controles positivos (diluciones seriadas del DNA de los rRNA 16S y 23S).

Los experimentos con microchips comprenden tres fases: (1) amplificación y marcaje de las muestras, (2) hibridación con el microchip, y (3) adquisición y análisis de los datos. El protocolo que se siguió fue el de cohibridación del cDNA con DNA genómico el cual se utiliza como control en la normalización y comparación de los microchips. Para cada cepa se utilizaron 3 muestras de RNA procedentes de cultivos independientes, y cada muestra de RNA se hibridó por duplicado. En el experimento realizado en el CRG los duplicados de cada muestra se marcaron invirtiendo los

fluorocromos para corregir los errores derivados de la diferente incorporación de cada colorante (marcaje recíproco o *dye-swap*).

Marcaje de las muestras

1) Preparar una muestra de DNA marcado con Cy3 (o Cy5 en los experimentos de marcaje recíproco), para cada microchip:

- Mezclar en un *ependorf* opaco 1 µg de DNA genómico (Tuberculosis Vaccine Testing and Research Materials, Colorado State University), 1 µL de cebadores aleatorios a una concentración de 3 µg/µL (Invitrogen) y agua hasta 41,5 µL.
- Calentar durante 5 min a 95°C para desnaturalizar el DNA. Enfriar rápidamente en hielo, para mantener el DNA desnaturalizado, y centrifugar brevemente.
- Mantener las muestras en hielo y añadir a cada tubo 5 µL del tampón de la polimerasa Klenow REact 2 10X (Invitrogen), 1 µL de dNTPs (dATP, dTTP y dGTP 5 mM, y dCTP 2 mM) (Invitrogen), 1,5 µL de Cy3 dCTP (o Cy5 dCTP en los experimentos de marcaje recíproco) (Amersham), y 1 µL de polimerasa Klenow (3-9 U/µL) (Invitrogen). En el experimento realizado en el CRG se usó la polimerasa Exo-Klenow del kit Bioprime CGH.
- Incubar en la oscuridad a 37°C durante 90 min para que tenga lugar la amplificación.

2) Preparar una muestra de cDNA marcado con Cy5 (o Cy3 en los experimentos de marcaje recíproco) para cada microchip:

- Mezclar en un *ependorf* opaco 5 µg de RNA, 1 µL de cebadores aleatorios a una concentración de 3 µg/µL (Invitrogen) y agua hasta 11 µL.
- Calentar durante 5 min a 95°C para deshacer las estructuras secundarias del RNA. Enfriar rápidamente en hielo para mantener el RNA desnaturalizado, y centrifugar brevemente.
- Mantener las muestras en hielo y añadir a cada tubo 5 µL del tampón de la transcriptasa inversa First Strand Buffer 5X (Invitrogen), 2,3 µL de dNTPs (dATP, dTTP y dGTP 5 mM, y dCTP 2 mM) (Invitrogen), 2,5 µL de DTT 100 mM (Invitrogen), 1,7 µL de Cy5 dCTP (o Cy3 dCTP en los experimentos de marcaje recíproco) (Amersham) y 2,5 µL de transcriptasa inversa SuperScript II (200 U/µL) (Invitrogen).

- Incubar en la oscuridad durante 10 min a 25°C para permitir la hibridación de los cebadores. Y, a continuación, 90 min a 42°C para que tenga lugar la extensión.
- 3) Purificar las muestras marcadas, con el *kit* de purificación de productos de PCR MinElute (Qiagen):
- Mezclar en un tubo las muestras de cDNA y DNA marcados con Cy3/Cy5, y añadir 375 µL de tampón PB (Qiagen).
 - Agregar la mezcla a una columna MinElute (Qiagen) montada sobre un tubo colector y centrifugar a 13 000 rpm durante 1 min.
 - Descartar el líquido del tubo colector y volver a montar la columna sobre el mismo tubo.
 - Añadir a la columna 500 µL de tampón PE (Qiagen) y centrifugar durante 1 min a 13 000 rpm.
 - Desechar el líquido del tubo colector y volver a montar la columna sobre el mismo tubo.
 - Añadir a la columna 250 µL de tampón PE (Qiagen) y centrifugar durante 1 min a 13 000 rpm.
 - Desechar el líquido del tubo colector y volver a montar la columna sobre el mismo tubo.
 - Centrifugar de nuevo durante 1 min a 13 000 rpm para eliminar los restos de etanol.
 - Colocar la columna sobre un tubo colector nuevo y añadir 30,2 µL de agua desionizada en el centro de la membrana.
 - Incubar durante 1 min y centrifugar 1 min a 13 000 rpm.

Hibridación

1) Prehibridación:

- Preparar la solución de prehibridación en una jarra Coplin mezclando 8,75 mL de SSC 20X (concentración final 3,5X), 250 µL de SDS al 20% (p/v) (concentración final 0,1%), 5 mL de BSA fracción V a 100 mg/mL (Sigma) (concentración final 10 mg/mL), y agua hasta un volumen de 50 mL.
- Calentar la solución a 65°C durante 90 min.
- Incubar los microchips en la solución de prehibridación a 65°C durante 20 min.

Materiales y métodos

- Situar los microchips en una rejilla para portaobjetos y lavar en una cubeta de tinción con 400 mL de agua destilada durante 1 min y, seguidamente, con isopropanol.
- Colocar cada microchip en un tubo falcon de 50 mL y centrifugar a 1500 rpm durante 5 min para secar los microchips.
- Usar inmediatamente o guardar los microchips en una caja protegidos del polvo y de la luz (<1 h).

2) Hibridación:

- Colocar cada microchip en un casete de hibridación y añadir 2 alícuotas de 15 μ L de agua en los pocillos del casete para mantener una atmósfera húmeda durante la hibridación.
- Mezclar 29,2 μ L de cada muestra de cDNA/DNA Cy3/Cy5 con la solución de hibridación:
 - 9 μ L de SSC 20X esterilizado por filtración (concentración final 4X)
 - 6,8 μ L de SDS al 2% esterilizado por filtración (concentración final 0,3%)
- Calentar durante 2 min a 95°C y mantener a temperatura ambiente para enfriar ligeramente las muestras. Centrifugar brevemente.
- Disponer cuidadosamente un cubreobjetos *LifterSlip* de 22x50 mm (VWR Internacional) sobre el microchip, asegurándose de que las bandas del *LifterSlip* están hacia abajo y de que no se raya la superficie del microchip.
- Pipetear lentamente la solución de hibridación bajo una esquina del *LifterSlip*, permitiendo que difunda completamente por capilaridad. Pipetear el exceso de solución de hibridación bajo la esquina opuesta del *LifterSlip*.
- Sellar el casete de hibridación y sumergirlo en un baño de agua a 65°C, protegido de la luz, durante 16 h-20 h.

3) Lavados:

- Añadir solución de lavado A, precalentada a 65°C, a una cubeta de tinción también precalentada a 65°C.
- Sacar cada microchip de su casete de hibridación y lavarlo cuidadosamente en la cubeta para separar el *LifterSlip*.
- Poner los microchips en una rejilla para portaobjetos y lavar por agitación en la solución de lavado A durante 2 min.

- Transferir los microchips a una rejilla limpia y agitar en una cubeta con solución de lavado B durante 2 min.
- Lavar en una segunda cubeta con solución de lavado B nueva, durante 2 min más.
- Colocar cada microchip en el interior de un tubo de 50 mL y centrifugar 5 min a 1500 rpm para secarlos.
- Escanear inmediatamente o guardar en una caja, protegidos de la luz, el menor tiempo posible.

Soluciones

SSC 20X

NaCl	175 g
Citrato tri-sodio dihidrato	88,2 g

Disolver completamente en 700 mL de agua destilada y llevar a un volumen final de 1 L con agua destilada. Esterilizar en la autoclave (15 min a 121°C).

Solución de lavado A

Concentraciones finales:

SSC	1X
SDS	0,05%

Mezclar en una botella de 500 mL, 20 mL de SSC 20X, 1 mL de SDS al 20% (p/v) y 379 mL de agua. Guardar a 65°C junto con una cubeta de tinción.

Solución de lavado B

Añadir agua destilada a 2,4 mL de SSC 20X hasta alcanzar un volumen de 800 mL (concentración final de SSC 0,6X).

Adquisición y análisis de los datos

1) Captación de la imagen:

La detección de la fluorescencia se realizó con escáneres de fluorescencia. Estos escáneres, basados en la microscopía confocal, utilizan la excitación del láser en una pequeña región del microchip, de manera que el movimiento de la muestra y/o las lentes permite obtener la totalidad de la imagen. La luz emitida por las muestras fluorescentes se separa y filtra a través de una serie de lentes, filtros y espejos y, finalmente, es convertida en señal eléctrica a través de un fotomultiplicador. La imagen capturada es

de un único plano confocal lo que permite disminuir el ruido de fondo. Estos escáneres están dotados de 2 láseres, cada uno de los cuales emite a una longitud de onda diferente, permitiendo la excitación de los fluorocromos Cy3 y Cy5 (y otros compatibles).

En el experimento de Londres las imágenes fluorescentes se tomaron con el escáner Affymetrix Array Scanner 428 utilizando 3 valores del fotomultiplicador para cada canal. Se partía de aquel valor en el que el número de puntos saturados era mínimo (sin incluir los controles de rRNA) y se aumentaba la potencia 10 y 20 veces. Las 3 imágenes obtenidas para cada canal se integraban con el software MAVI (MWG) lo que permitía obtener valores tanto para aquellos puntos de menor intensidad como para aquéllos saturados. En el CRG las imágenes se obtuvieron con el escáner Agilent G2565BA usando aquellos valores de potencia en que las intensidades de los dos canales estaban más balanceadas.

2) Análisis de la imagen:

Una vez obtenidas las imágenes se cuantificaron y analizaron con el software ImaGene (BioDiscovery) en Londres, y usando el software GenePix 6.0 (Axon, Molecular Devices) en el CRG.

Este proceso conlleva varios pasos, la mayoría realizados de forma automática por los programas con una mínima intervención y supervisión del usuario. En primer lugar se deben localizar cada uno de los puntos del microchip, ajustando la forma y el tamaño, y asignándoles el gen correspondiente. Una vez se han detectado los puntos, se lleva a cabo la segmentación de la imagen, es decir, la separación entre los píxeles señal, los que corresponden al ruido de fondo y aquellos que provienen de artefactos de la muestra y que por lo tanto deben ser eliminados. Seguidamente se cuantifican las intensidades de cada gen extrayendo el ruido de fondo del valor señal y calculando la relación entre los dos canales. Por último, se debe analizar también la calidad de las señales obtenidas. Para ello normalmente se tienen en cuenta las siguientes medidas: relación entre el área señal y el área total, la regularidad de la forma del punto señal, el desplazamiento del punto (la distancia entre la localización esperada y la localización real) y la uniformidad de la señal. Cada una de estas medidas se ajusta y normaliza asignando un valor total a cada punto según la calidad. De este modo los puntos de baja calidad, o aquellos en los que el valor señal es indistinguible del ruido de fondo (puntos

vacíos o ausentes), se pueden eliminar durante los subsiguientes pasos de análisis de los datos.

Todos estos datos generados durante el análisis de la imagen pueden ser exportados y analizados en una hoja Excel.

3) Preprocesado de los datos:

Este paso implica filtrar las señales de baja calidad, transformar logarítmicamente los ratios de intensidad, normalizar los datos y combinar las réplicas.

El preprocesado se realizó con el programa GeneSpring (Agilent) que, de forma automática, sustrae los valores de ruido de fondo de los valores señal y calcula el logaritmo de las intensidades al importar los datos. La transformación logarítmica permite que la distribución de los datos sea normal y que los valores estén dentro de una misma escala siendo más fácilmente comparables e interpretables. A continuación se filtraron las señales de baja calidad eliminando los valores marcados como ausentes para que no interfirieran en cálculos posteriores, y las señales con un valor menor a 0,01 se fijaron como 0,01.

La finalidad de la normalización es eliminar los errores sistemáticos. Las fuentes de esta variación son muchas y diversas (efecto del fluorocromo utilizado, errores durante la fabricación del microchip, diferencias en la eficiencia de hibridación, etc.) y sin normalización se traduciría en diferencias en la intensidad de la señal que podrían influir erróneamente en los resultados. Así pues la normalización consiste en desplazar las distribuciones de las intensidades de manera que se centren sobre la media esperada asumiendo que la mayoría de los genes no variarán entre las diferentes condiciones o cepas analizadas.

En este trabajo se realizó en primer lugar una normalización por punto señal, que permite corregir las diferencias de detección, dividiendo la intensidad obtenida para cada gen por su valor en el canal control; si el valor del canal control era muy bajo se usaba 10 en su lugar, si ambos valores eran muy bajos no se realizaba el cálculo. A continuación se realizó la normalización por chip, que compensa la variabilidad experimental introducida en cada chip, dividiendo cada medida por el percentil 50 de todas las medidas del microchip; el percentil se calculó usando todos los genes no marcados como ausentes.

El último paso del preprocesado de los datos consiste en combinar las réplicas (técnicas y biológicas) de cada cepa o parámetro, calculando así el valor medio para cada gen y la desviación estándar asociada. En algunos casos, se filtraron además aquellos datos sin interés, es decir, aquellos genes que no variaban entre las condiciones analizadas, de manera que se obtenía una nueva lista de genes con una variación inferior a 0,5 o superior a 1,5 entre las 2 condiciones de interés.

4) Análisis estadístico:

El último paso en el análisis de los datos consiste en aplicar métodos estadísticos para detectar aquellos genes expresados diferencialmente de un modo significativo. En este trabajo se utilizó el test de Welch (una modificación de la prueba paramétrica t de Student para varianzas no asumidas iguales) para comparar las medias y las varianzas de los genes entre las diferentes condiciones. Además, se aplicó la corrección para múltiples pruebas *False Discovery Rate* de Benjamini y Hochberg, con un valor de $p < 0,05$. Se escogió esta corrección porque es la que presenta una menor tasa de falsos negativos manteniendo una tasa de falsos positivos aceptable. Con este análisis se predice que un 5% de los genes desregulados sean falsos positivos.

3.9. Análisis de los lípidos de la envuelta de *M. tuberculosis*

3.9.1. Extracción de los lípidos de la envuelta de *M. tuberculosis*

El trabajo con lípidos implica una serie de consideraciones en cuanto al material utilizado para evitar contaminantes que podrían interferir en posteriores análisis. Así, es imprescindible que todo el material sea de vidrio, ya que los solventes utilizados pueden extraer componentes del plástico. El material se debe limpiar con cloroformo para eliminar restos de lípidos, a continuación con agua y jabón (preferiblemente en el lavavajillas con calor) y, finalmente, con agua destilada. Además, es importante que todo el material esté perfectamente seco ya que la presencia de agua podría alterar la polaridad de los solventes afectando al proceso de extracción. Los solventes utilizados deben ser de calidad máxima, sin impurezas que puedan afectar posteriores análisis.

A continuación se describen los protocolos generales que se siguieron, modificándose las cantidades de solventes y los tiempos de extracción en función de la cantidad de células a procesar y la finalidad de la extracción. En este trabajo los extractos lipídicos se obtuvieron para su posterior análisis por cromatografía de capa fina (CCF).

3.9.1.1. Lípidos libres totales

Los extractos de lípidos libres totales de *M. tuberculosis* se obtuvieron por el método de Folch (Folch *et al.*, 1957) con ligeras modificaciones. En este extracto también se hallan lípidos y fosfolípidos de la membrana celular.

- Con ayuda del asa de Kölle, recuperar las bacterias crecidas en 5 ó 6 placas de Middlebrook 7H10. También se puede realizar a partir de cultivos líquidos, pero la cantidad de masa celular que se obtiene es mucho menor.
- Resuspender las células en 45 mL de una solución de cloroformo:metanol ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) 1:2 (v/v). Mantener a temperatura ambiente con agitación regular durante 48 h, para extraer los lípidos de mayor polaridad.
- Dejar sedimentar las células y recoger por decantación la solución de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, en un balón de 250 mL con un embudo con papel de filtro.
- Resuspender las células en 45 mL de una solución de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 (v/v). Mantener a temperatura ambiente con agitación regular durante 48 h, para extraer los lípidos de menor polaridad.
- Dejar sedimentar las células y recoger por decantación y filtración la solución de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 juntándola con la solución de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 1:2. El sedimento obtenido, que contiene células delipidadas con restos de solventes, puede secarse y utilizarse para la extracción de ácidos micólicos (ver apartado 3.9.1.3)
- Evaporar los solventes con el rotavapor (Rotavapor R, BÜCHI).
- Resuspender el extracto obtenido, en una mezcla de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CaCl}_2$ 0,02% 4:2:1. Añadir en primer lugar el cloroformo (40 mL) para resuspender bien los lípidos y, a continuación, el metanol (20 mL). Transferir la mezcla a un embudo de decantación y añadir 10 mL de una solución acuosa de CaCl_2 al 0,02% (p/v). Agitar suavemente para que se mezclen las fases sin emulsionar la mezcla. Mantener en reposo el tiempo necesario para que se separen las fases. También se podría realizar la partición en un tubo de vidrio y separar las fases por centrifugación.
La finalidad de esta partición es separar las sustancias no lipídicas (glúcidos y proteínas) que quedan en la fase acuosa superior, de los lípidos y glicolípidos presentes en la fase orgánica inferior.
- Recuperar la fase orgánica en un balón de 100 mL y evaporar con el rotavapor.

- Recuperar el extracto lipídico con cloroformo y transferirlo a un tubo previamente pesado.
- Evaporar el cloroformo bajo una atmósfera de N₂ y cuantificar el extracto de lípidos libres totales. Guardar a 4°C.

3.9.1.2. Lípidos libres no polares

Este procedimiento permite obtener los lípidos libres no polares (PDIM, MK y TAG) de un modo más rápido y sencillo que con la extracción de lípidos libres totales. El protocolo que se siguió fue el descrito por Dobson y colaboradores (1985).

- Con ayuda del asa de Kölle, recuperar las bacterias crecidas en 2 ó 3 placas de Middlebrook 7H10.
- Añadir 20 mL de CH₃OH:NaCl 0,3 % (p/v) 100:10 (v/v) y 10 mL de éter de petróleo (60-80° bp) o *n*-hexano.
- Agitar regularmente durante 15 min y dejar separar las dos fases, o separar por centrifugación.
- Transferir la fase superior a un balón de 100 mL.
- Reextraer la fase inferior con 10 mL de éter de petróleo (60-80° bp) durante 15 min con agitación regular.
- Recuperar la fase superior juntándola con la obtenida anteriormente y evaporar en el rotavapor.
- Recuperar el extracto lipídico con cloroformo y transferirlo a un tubo previamente pesado.
- Evaporar el cloroformo bajo una atmósfera de N₂ y cuantificar el extracto de lípidos libres no polares. Guardar a 4°C.

3.9.1.3. Ácidos micólicos

El procedimiento que se siguió para la extracción de ácidos micólicos es el de metanólisis ácida (Minnikin *et al.*, 1980).

- Se pueden usar células recuperadas de cultivo como en los protocolos anteriores. O bien se pueden usar los restos celulares obtenidos tras la extracción de los lípidos libres totales, en cuyo caso es muy importante evaporar totalmente los restos de cloroformo y metanol ya que interfieren en la reacción.
- Recoger las células en tubos de vidrio que se habrá comprobado que cierran perfectamente añadiéndoles 2 ó 3 mL de etanol y manteniéndolos 12 h a 80°C.

- Añadir a cada tubo 3 mL de una mezcla de metanol:tolueno:ácido sulfúrico 30:15:1 (v/v/v) preparada al momento.
- Mantener a 80°C durante 12 h.
- Dejar enfriar la muestra y añadir 3 mL de *n*-hexano. Agitar con el vórtex y dejar separar las fases.
- Transferir la fase superior a un tubo previamente pesado y repetir la extracción con otros 3 mL de *n*-hexano.
- Juntar las dos fases de *n*-hexano, evaporar bajo una atmósfera de N₂ y cuantificar el extracto. Guardar a 4°C.

3.9.2. Cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizaron CCF unidimensionales y bidimensionales (2D-CCF) con diferentes eluyentes para cubrir todo el rango de polaridad de los lípidos de *M. tuberculosis*. A continuación se indican los sistemas de solventes utilizados para visualizar los diferentes lípidos:

- Ácidos micólicos: *n*-hexano:éter dietílico 85:15 (v/v), 3 veces.
- Lípidos no polares (PDIM, MK y TAG): éter de petróleo (60-80° bp):éter dietílico 9:1 (v/v). Estos lípidos también se analizaron por 2D-CCF: 1ª dimensión, éter de petróleo (60-80° bp):acetato de etilo 98:2 (v/v), 3 veces; 2ª dimensión, éter de petróleo (60-80° bp):acetona 98:2 (v/v).
- PAT: CHCl₃:CH₃OH 99:1 (v/v). Estos glicolípidos también se detectaron por 2D-CCF: 1ª dimensión, éter de petróleo (60-80°C bp):acetona 92:8, 3 veces; 2ª dimensión, tolueno:acetona 95:5.
- TDM, SL-I y DAT: CHCl₃:CH₃OH 85:15 (v/v) y CHCl₃:CH₃OH:H₂O 30:8:1 (v/v/v). Así mismo, el TDM y el SL-I se analizaron por 2D-CCF: 1ª dimensión, CHCl₃:CH₃OH:H₂O 60:12:1 (v/v/v); 2ª dimensión, CHCl₃:CH₃OH:H₂O 30:8:1 (v/v/v) 75:11:1.
- PIM: CHCl₃:CH₃OH:H₂O 60:35:8 (v/v/v).

Procedimiento

- Limpiar la cubeta de cromatografía con etanol y secarla. Cortar 2 papeles de filtro del tamaño de la cubeta y colocarlos apoyados en las paredes de la cubeta.
- Llenar la cubeta con 100 mL del eluyente mojando el papel de filtro. Tapar la cubeta sellándola con vaselina pero sin que ésta quede nunca en la parte interior

de la cubeta. Mantenerla cerrada unos 20 min para que se sature la atmósfera interior con los solventes.

- Cortar una placa de sílica-gel G 60 (20x20 cm, Merck) del tamaño apropiado según el número de muestras y dimensiones. Para 2D-CCF se pueden usar placas de 10x10 cm. Usar guantes siempre que se manipule la placa.
- Marcar los puntos de aplicación de las muestras con lápiz a 1,5 cm del margen inferior y dejando un espacio de 1,5 cm entre muestras y entre éstas con los bordes laterales de la placa. Se puede hacer una marca horizontal rasgando la sílica a 2 cm del margen superior para detener la cromatografía en ese punto.
- Aplicar 10 μ L de muestra a una concentración de 20 mg/mL-40 mg/mL en cloroformo. Dejar secar.
- Introducir la placa de cromatografía en la cubeta saturada apoyándola en una de las paredes.
- Cuando el eluyente haya llegado a unos 2 cm del margen superior, sacar la placa de cromatografía y dejarla secar.
- Si se trata de una 2D-CCF se saturará la cubeta con la mezcla de solventes de la segunda dirección y se introducirá la placa de cromatografía girándola 90° en el sentido de las agujas del reloj respecto a la primera dimensión.
- Para la detección se usaron dos sistemas diferentes en función de los lípidos a analizar:
 - Antrona (Merck) al 1% (p/v) en ácido sulfúrico (Sigma, de pureza máxima). Calentar a 110°C durante unos 5 min. Este sistema es especialmente útil en la identificación de glicolípidos a los que confiere un color característico azul-violáceo, mientras que los ácidos grasos aparecen amarillos-marrones.
 - Ácido fosfomolibdico al 10% (p/v) en etanol. Calentar a 130°C durante unos 5 min. Este sistema revela cualquier compuesto orgánico de color negro sobre un fondo amarillo. Se utilizó para visualizar los lípidos no polares y los ácidos micólicos.

La placa de cromatografía se pulverizaba con la ayuda de un atomizador y N₂ en una campana de extracción de gases. Y, a continuación, se calentaba hasta que la aparición de las manchas fuera evidente.

- Los lípidos se identificaron por comparación con otras cromatografías en las que se habían usado lípidos purificados como patrones, y en base a la bibliografía (Dobson *et al.*, 1985; Besra, G. S., 1998; Slayden and Barry, 2001).

3.10. Análisis de la virulencia de *M. tuberculosis*

Los experimentos para el análisis de la virulencia fueron realizados por el grupo del Dr. Pere Joan Cardona de la Unitat de Tuberculosi Experimental (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol) que dispone de un Estabulario de Alta Seguridad en un laboratorio de seguridad biológica de nivel 3.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, y supervisados por el Departament de Ramaderia, Agricultura i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

3.10.1. Cepas murinas y condiciones de estabulación

Se utilizaron ratones hembra de 7 semanas de edad, libres de patógenos (spf), de las cepas C57BL/6 y CB17-SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*, inmunodeficiencia combinada severa) suministrados con el correspondiente *Health Report*, transportados en las condiciones adecuadas y certificados por un veterinario. Su estabulación estuvo precedida por una semana de cuarentena pasiva en dependencias aisladas.

Se estabularon en jaulas tipo S2, con pienso y agua estéril *ad libitum*; en condiciones controladas de temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad ($50\% \pm 10\%$), y ciclos de luz y oscuridad adecuados. Se utilizaron además 4 animales centinela para comprobar la condición libre de patógenos de la instalación.

Como parte de un protocolo de punto final para evitar el sufrimiento innecesario del animal, los animales se pesaban una vez por semana para monitorizar su crecimiento y buen estado de salud, y su aspecto y comportamiento eran supervisados diariamente por una misma persona,.

3.10.2. Modelo de infección

Se siguió el modelo de infección por aerosol ya que es el que reproduce mejor el curso natural de la tuberculosis. Este modelo se fundamenta en el uso de la máquina de

Materiales y métodos

Middlebrook capaz de crear aerosoles constantes y reproducibles (Middlebrook G., 1952).

Las cepas de *M. tuberculosis*, crecidas inicialmente en medio Löwenstein-Jensen (Biomedics), se inoculaban en el medio mínimo Proskauer-Beck con un 0,05% de Tween 80 y se incubaban hasta mitad de fase exponencial. Estos cultivos se congelaban a -70°C y se utilizaban posteriormente para preparar la suspensión para la infección. Las bacterias viables de estos cultivos se cuantificaban sembrando diluciones seriadas en medio Middlebrook 7H11, antes y después de la congelación (en el momento previo a la inoculación).

La infección por aerosol se realizó en el *Inhalation Exposure System* (IES) (Glas-col). El compartimiento de nebulización se llenaba con 10 mL de una suspensión de *M. tuberculosis* a una concentración de aproximadamente 10^6 cfu/mL, para conseguir inocular en pulmón 10-50 bacilos viables durante una exposición de 80 minutos.

Se sacrificaban grupos de 4 a 6 ratones C57BL/6 a las semanas 0, 3, 9, 18 y 22 tras la infección. Se realizaba un recuento de bacilos viables en lavados broncoalveolares y homogeneizados de pulmón y bazo, sembrando diluciones seriadas en placas de Middlebrook 7H11 que se incubaban durante 6 semanas a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 .

En el caso de los ratones SCID se realizaba un análisis de supervivencia en grupos de 10 ó 11 animales. Los animales se sacrificaban de acuerdo con el protocolo de punto final en el que el parámetro más decisivo era la pérdida de un 35% de su peso máximo.

3.10.3. Histología e histometría

Se fijaron con formalina (formol 30% en PBS) 2 lóbulos del pulmón derecho de cada ratón C57BL/6 sacrificado, y se incluyeron en parafina. Cada muestra se tiñó con hematoxilina-eosina para visualizar el tejido pulmonar y las lesiones. Para la determinación histométrica, con un binocular Eclipse E400 y una cámara digital Nikon Coolpix 990 (Nikon) se fotografiaban, a 50 aumentos, secciones de los lóbulos de $5\ \mu\text{m}$ de grosor teñidas con hematoxilina-eosina. Posteriormente, se cuantificaban los granulomas y se medía el área total del lóbulo y el área de cada granuloma con el software Sigma Scan Pro (SPSS Software).

3.10.4. Monitorización de la respuesta inmune

Para realizar un seguimiento de la respuesta inmune en los ratones C57BL/6 se cuantificó el mRNA de IFN- γ , TNF- α , RANTES e iNOS en pulmón mediante PCR a tiempo real (*Real Time PCR*). Se utilizó el método SYBR Green con el sistema LightCycler (Roche). Este método utiliza el fluorocromo SYBR Green que no emite fluorescencia en solución, pero sí cuando se intercala en el dsDNA. Así, el fluorocromo se incorpora a las moléculas de dsDNA que se van sintetizando; de manera que se observa un aumento en la fluorescencia emitida durante la elongación (proporcional a la cantidad de DNA sintetizado), y una caída de la fluorescencia durante la desnaturalización. Este método presenta la ventaja de que no requiere sondas específicas, pero como contrapartida cualquier molécula de dsDNA emitirá fluorescencia. Por ello, se requiere verificar la especificidad del producto, mediante curvas de fusión que representan la fluorescencia en función de la temperatura, de manera que podemos identificar la señal del amplicón de acuerdo con su temperatura de fusión.

El mRNA se extrajo a partir del lóbulo medio del pulmón derecho congelado en nitrógeno líquido. El tejido pulmonar se homogeneizaba con el FastPrep (Bio101) y los tubos Lysing Matrix B (Qbiogene), que contienen bolitas de silica-zirconia para romper la pared bacteriana y a los que se había añadido Trizol. A continuación se extraía el mRNA con cloroformo e isopropanol, de un modo análogo al descrito en el apartado 3.6.2, y se eliminaban los restos de DNA con el *kit DNA-free*TM (Ambion). La integridad del mRNA se verificaba mediante electroforesis en gel de agarosa, y se cuantificaba la concentración por espectrofotometría (Ultrospec 1100pro, Amersham Biosciences).

El mRNA se retrotranscribía entonces, con la transcriptasa inversa del virus Moloney de la leucemia murina (Gibco) utilizando como oligonucleótido *oligo dT*. El cDNA así obtenido se amplificaba por PCR a tiempo real (LightCycler, Roche), usando los oligonucleótidos específicos para los genes objeto de estudio y oligonucleótidos para el gen de la Hipoxantina Fosforibosil Transferasa (HPRT), diseñados con el programa LightCycler Probe Design (Roche) y Primer Premiere (Premier Biosoft International). El número de copias de cada mRNA se calculaba con ayuda de estándares externos de concentración conocida. Se preparaban diluciones seriadas de cada estándar (el mismo fragmento que se pretende amplificar en la muestra) y se amplificaban en paralelo, en

un capilar independiente, para crear una curva estándar con la que extrapolar el número de copias de cada mRNA con ayuda del programa LightCycler Software 3.5 (Roche). Por último el número de copias de cada mRNA se dividía por el número de copias del mRNA del gen HPRT, que es uno de los genes constitutivos más estable (Vandesompele *et al.*, 2002), lo que permite normalizar las muestras y usarlo como control interno de la amplificación.

3.10.5. Análisis estadístico

Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de cada valor; y las diferencias entre las medias se determinaron mediante la prueba t de Student, considerándose significativas para valores de $p < 0,05$. El análisis de supervivencia se realizó con el programa SPSS utilizando el método de Kaplan-Meier para representar las curvas de supervivencia y las pruebas Log Rank, Breslow y Taron-Ware para comparar las curvas entre sí.

4. Resultados

4.1. Construcción y caracterización de los mutantes Rv0576 y Rv0577 en *M. tuberculosis*

4.1.1 Obtención de las cepas mutantes

En la obtención de los mutantes se siguió un sistema en dos pasos que permite producir mutantes por delección sin genes marcadores (Parish y Stoker, 2000). Para ello se construye la delección en el vector p1NIL (Km^R), no replicativo en micobacterias, y se clonan los genes marcadores *sacB* (cuya expresión es letal en presencia de sacarosa), *lacZ* y de resistencia a higromicina. El plásmido resultante se electropora en *M. tuberculosis* y se seleccionan aquellos clones en los que se haya producido la integración del plásmido en el cromosoma por recombinación simple (Km^R, Hyg^R, LacZ⁺). Estos clones se amplifican en medio de cultivo sin antibióticos, para favorecer que tenga lugar la doble recombinación y, posteriormente, se seleccionan los clones que hayan perdido el plásmido (Km^S, Hyg^S, LacZ⁻ y Sacarosa^R). Finalmente, la presencia de la delección en estos clones se analiza por PCR.

Para la construcción de la delección del gen *Rv0577* se amplificaron por PCR dos fragmentos, omitiéndose 400 pb internos del gen *Rv0577* (Fig. 4.1A). El primer fragmento, de 1,3 kb, se obtuvo con los oligonucleótidos 77Up1 y Hin77Lw1, y se clonó en el vector pGEM-T[®]. El inserto se liberó digiriendo con los enzimas *PstI* y *HindIII*, y se clonó en el vector p1NIL digerido con los mismos enzimas, obteniéndose el vector p1NIL+77.1. El segundo fragmento, de 1,1 kb, amplificado con los oligonucleótidos Kpn77Up2 y 77Lw2, se clonó en pGEM-T[®], se liberó con *KpnI* y *NotI*, se hicieron extremos romos y se clonó en p1NIL+77.1 digerido con *KpnI* y tratado con la T4 DNA polimerasa. La orientación del segundo inserto respecto al primero y la presencia de la delección se comprobaron por PCR con los oligonucleótidos 577Up y 577Lw (Fig. 4.1A). En el plásmido final, denominado p1NILΔ77, el gen *Rv0577* presenta una delección de unas 400 pb con un fragmento de 100 pb del MCS del vector p1NIL en su lugar. Finalmente, el plásmido p1NILΔ77 se digirió con *PacI* (un enzima que no presenta ninguna diana en el cromosoma de *M. tuberculosis*), y se clonó el casete de genes marcadores procedentes del vector pGOAL19 digerido con el mismo enzima, resultando el plásmido p1NILΔ77gm.

Resultados

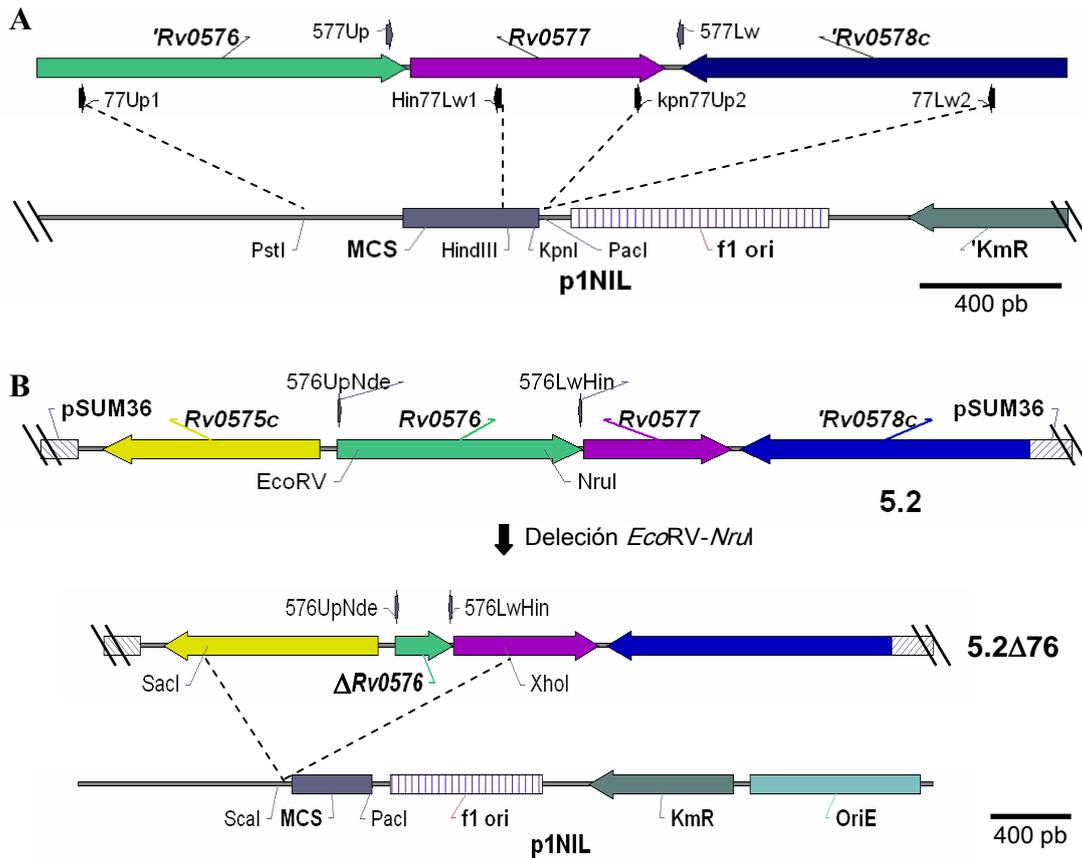


Figura 4.1. Construcción y comprobación de las deleciones de los genes *Rv0577* (A) y *Rv0576* (B) en el vector p1NIL.

En el caso del gen *Rv0576*, se deletionó 1 kb interna por digestión del plásmido 5.2 (Andreu *et al.*, 2004b) con *EcoRV* y *NruI* (Fig. 4.1B). La construcción obtenida (5.2Δ76) se digirió con *SacI* y *XhoI*, liberándose un fragmento de 1,9 kb que se trató para obtener extremos romos y se clonó en p1NIL digerido con *SacI* (Fig. 4.1B). El plásmido resultante, denominado p1NILΔ76, se comprobó por restricción y por PCR con los oligonucleótidos 576UpNde y 576LwHin (Fig. 4.1B). Finalmente, se clonó el casete de genes marcadores del vector pGOAL19 en *PacI* obteniéndose el plásmido p1NILΔ76gm.

Los plásmidos p1NILΔ77gm y p1NILΔ76gm se electroporaron en la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (Pasteur), seleccionándose los transformantes en placas con kanamicina, higromicina y X-gal. Se obtuvo un único transformante con cada construcción (H37Rv::p1NILΔ77gm y H37Rv::p1NILΔ76gm), que se sembró en placas sin antibiótico y se incubó hasta obtener un crecimiento abundante. Entonces se resuspendió un asa de células de cada transformante en medio líquido, y se hizo un banco de diluciones que se sembró en placas con sacarosa y X-gal. Aproximadamente la

mitad de las colonias que crecieron en este medio eran blancas, y por lo tanto $LacZ^-$ $SacB^-$. Se replicaron 30 colonias blancas de cada construcción en placas con y sin kanamicina y, finalmente, aquellos clones que no crecieron en presencia de kanamicina, y que por consiguiente habían perdido el plásmido, se analizaron por PCR. En el caso de los posibles mutantes del gen *Rv0577* se utilizaron los oligonucleótidos 577Up y 577Lw (Fig. 4.1A) que amplifican un fragmento de 900 pb en la cepa salvaje, y uno de 600 pb en el caso de la cepa mutante (Fig. 4.2A carriles 1 y 2). Se analizaron 7 clones de los cuales 3 fueron mutantes, escogiéndose uno para los subsiguientes estudios y que se denominó $\Delta 77$. Para identificar los mutantes del gen *Rv0576* se utilizaron los oligonucleótidos 576UpNde y 576LwHin (Fig. 4.1B), amplificándose un fragmento de 1,3 kb en la cepa salvaje, y de 0,3 kb en la cepa mutante (Fig. 4.2A carriles 3 y 4). En este caso, de 6 clones analizados sólo 1 presentaba la delección, y se nombró $\Delta 76$. En ambos mutantes ($\Delta 77$ y $\Delta 76$) se amplificó y secuenció el operón completo, comprobándose que se habían introducido las delecciones sin detectarse otras mutaciones en el resto del operón.

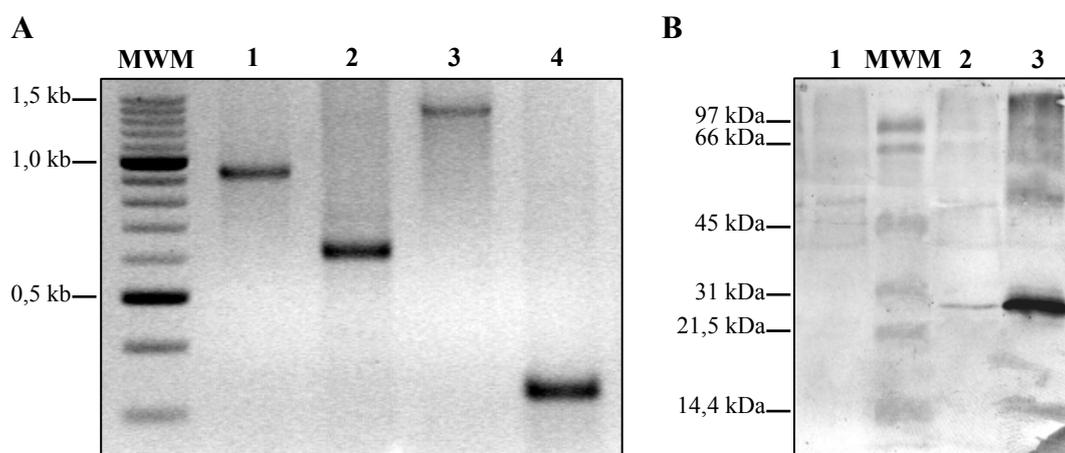


Figura 4.2. Comprobación de las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$. A) Electroforesis en agarosa al 2% de la amplificación por PCR del gen *Rv0577* de *M. tuberculosis* H37Rv (carril 1) y $\Delta 77$ (carril 2); y del gen *Rv0576* de las cepas H37Rv (carril 3) y $\Delta 76$ (carril 4). El marcador utilizado es el MWM XIV (Roche). B) Western-blot de los extractos proteicos de las cepas $\Delta 77$ (1), H37Rv (2) y $\Delta 76$ (3), con el anticuerpo monoclonal HBT7 que reconoce la proteína Rv0577.

La expresión de la proteína Rv0577 se analizó por Western-blot en las cepas mutantes y salvaje, no detectándose en la cepa $\Delta 77$ (Fig. 4.2B carril 1). La cepa $\Delta 76$ sí sintetizaba la proteína Rv0577, confirmando que la delección realizada en el gen *Rv0576* no tenía un efecto polar sobre la expresión del gen *Rv0577*. A pesar de que el análisis que se realizó no era cuantitativo, se observó que la cantidad de proteína Rv0577

Resultados

detectada en la cepa $\Delta 76$ era muy superior a la de la cepa salvaje *M. tuberculosis* H37Rv (Fig. 4.2B, carriles 3 y 2, respectivamente).

4.1.2. Análisis fenotípico

4.1.2.1. Tinción con rojo neutro

Se realizó la tinción con rojo neutro de las cepas mutantes usando como control positivo la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), y como control negativo la cepa *M. tuberculosis* H37Ra. Las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ (de la que se tiñeron los 3 clones aislados inicialmente) fueron RN⁻, igual que la cepa avirulenta H37Ra, mientras que la cepa H37Rv sí se tiñó de rojo (Fig. 4.3).

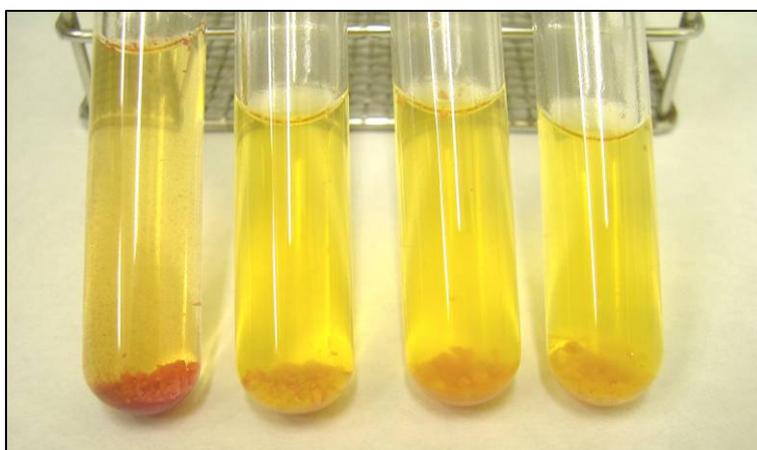


Figura 4.3. Tinción con rojo neutro. De izquierda a derecha, *M. tuberculosis* H37Rv, H37Ra, $\Delta 76$ y $\Delta 77$.

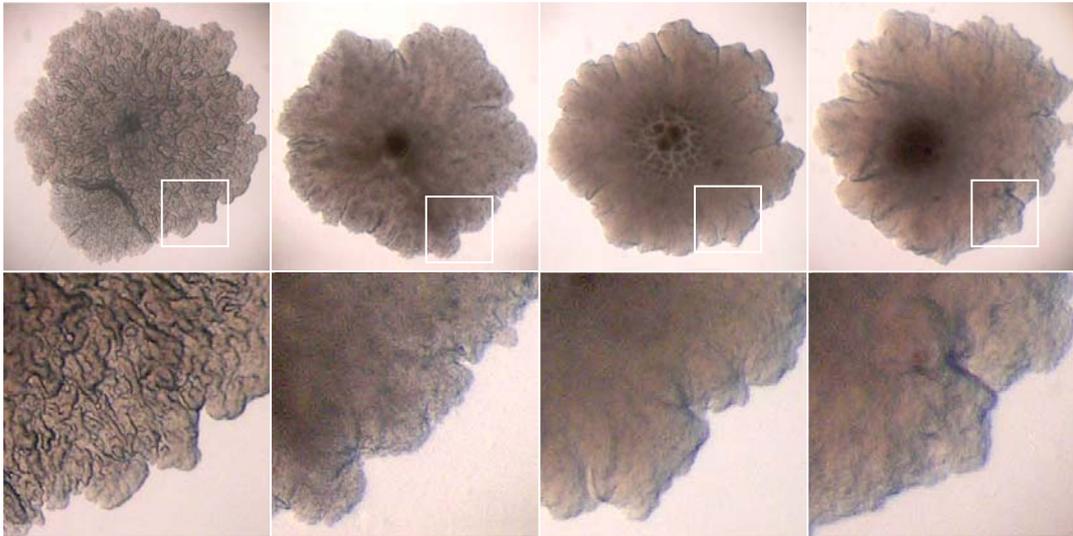
4.1.2.2. Crecimiento y morfología colonial

Las cepas $\Delta 77$ y $\Delta 76$ presentaban un crecimiento eugónico en medio sólido, formando colonias más planas y lisas que las de la cepa H37Rv (ATCC 27294) (Fig. 4.4A). La disposición característica de las células en paralelo formando cuerdas o serpentinadas no se observó en las cepas mutantes ni en la cepa avirulenta H37Ra, ni a nivel macroscópico (Fig. 4.4A) ni microscópico (Fig. 4.4B).

El análisis del crecimiento en medio líquido mediante el seguimiento de la densidad óptica no mostró diferencias entre las cepas H37Rv, H37Ra, $\Delta 77$ y $\Delta 76$ (Fig. 4.5). Los cultivos, que se inocularon con cultivos frescos en fase exponencial, presentaron una fase de latencia de apenas 24 h. El tiempo de duplicación durante la fase exponencial fue de 24 h, disminuyendo la tasa de crecimiento a partir del 5º día

hasta quedar estancada a los 10 días de cultivo. Durante los 14 días que duró el experimento no se detectó la fase de muerte.

A



B

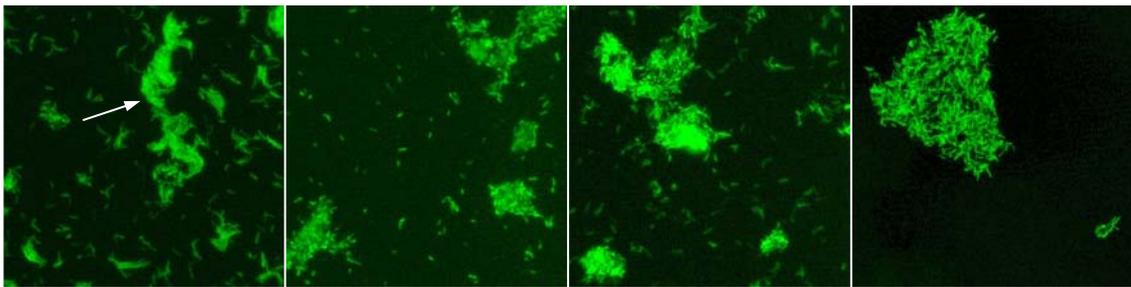


Figura 4.4. Morfología colonial (A) y celular (B) de las cepas, de izquierda a derecha, *M. tuberculosis* H37Rv, H37Ra, $\Delta 76$ y $\Delta 77$. A) Fotografías de colonias observadas con una lupa Wild Heerbrugg a 10x; el recuadro indica la zona ampliada en las imágenes inferiores. B) Microfotografías de células teñidas con auramina (1000x); nótese la disposición en forma de cuerdas o sogas de las células de la cepa H37Rv, y la disposición más desordenada y dispersa en el resto de cepas.

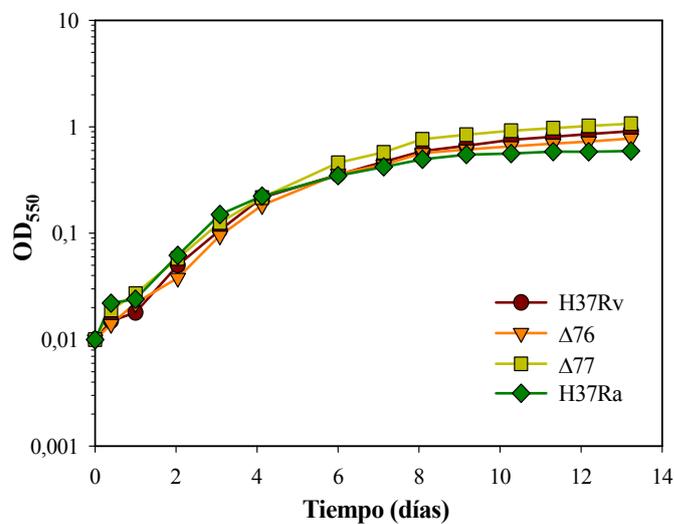


Figura 4.5. Crecimiento en medio líquido de las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv, H37Ra, $\Delta 76$ y $\Delta 77$.

4.1.2.3. Composición lipídica de la envuelta celular

Puesto que las alteraciones en la morfología colonial normalmente están asociadas a cambios en la envuelta celular, analizamos la composición lipídica de las cepas mutantes en comparación con las cepas H37Rv (ATCC 27294) y H37Ra.

Los ácidos micólicos, extraídos por metanólisis ácida, presentaban un patrón cromatográfico similar en las cuatro cepas, en cuanto a cantidad y tipo producidos (Fig. 4.6A).

El análisis por CCF del extracto de lípidos libres totales mostró que las 4 cepas sintetizaban TDM, DAT y PIM en cantidades comparables (Fig. 4.6B y C); ninguna producía cantidades detectables de PGL; y sólo la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) sintetizaba PAT (nótese que los mutantes derivan de la cepa H37Rv Pasteur, deficiente en la síntesis de este glicolípido al igual que la cepa H37Ra) (Fig. 4.6B). El SL-I sólo se detectó en la cepa H37Rv y en las cepas $\Delta 77$ y $\Delta 76$ (Fig. 4.6B).

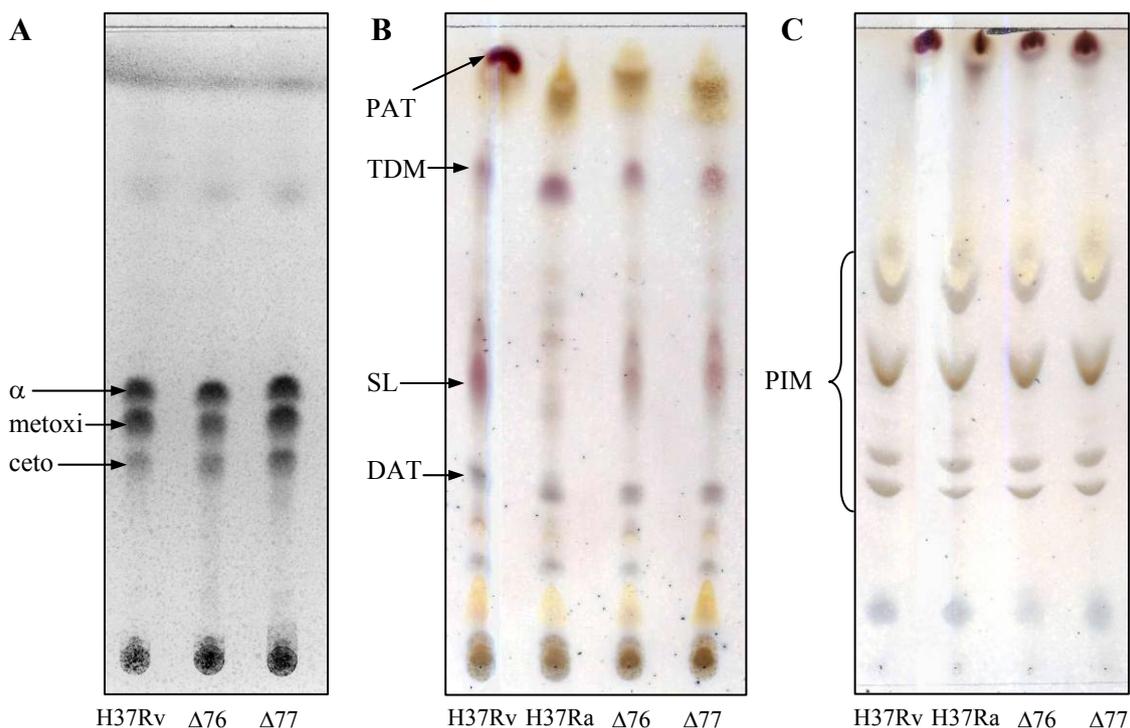


Figura 4.6. Composición lipídica de la envuelta celular de *M. tuberculosis* H37Rv, H37Ra, $\Delta 76$ y $\Delta 77$. A) CCF de ácidos micólicos, 0,2 mg. B) CCF $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 30:8:1; 0,2 mg de lípidos libres totales. C) CCF de los PIM; 0,2 mg de lípidos libres totales.

En cuanto a los lípidos libres no polares, mientras las 4 cepas producían MK y TAG, los PDIM sólo se detectaron en las cepas H37Rv y H37Ra (Fig. 4.7).

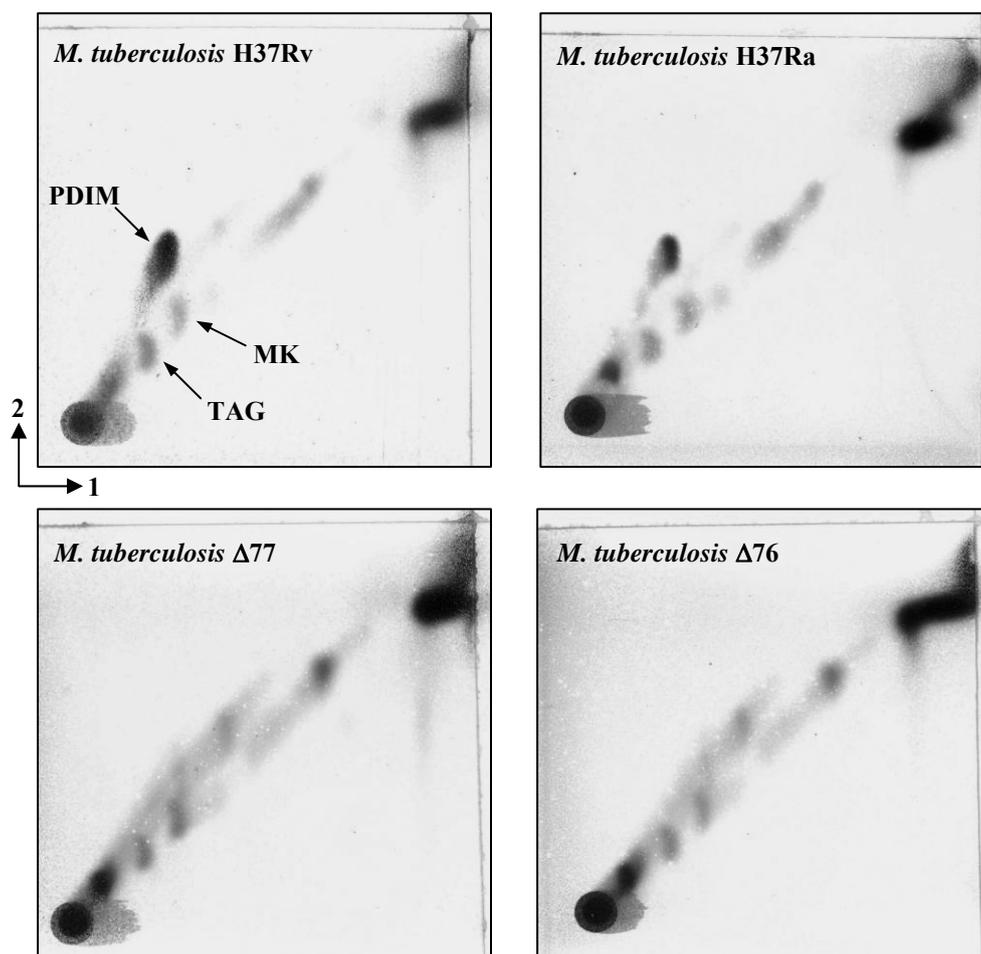


Figura 4.7. 2D-CCF de lípidos libres no polares de *M. tuberculosis* H37Rv, H37Ra, $\Delta 77$ y $\Delta 76$. En cada caso se aplicaron 0,4 mg del extracto de lípidos libres totales. Nótese la ausencia de PDIM en las cepas mutantes $\Delta 77$ y $\Delta 76$.

4.1.3. Estudio de la virulencia

4.1.3.1. Análisis de la supervivencia de ratones inmunodeprimidos

Para estudiar la virulencia en ausencia de inmunidad específica, se realizó un seguimiento de la supervivencia de ratones SCID, deficientes en linfocitos y altamente susceptibles a la infección por *M. tuberculosis*, infectados con la cepa salvaje H37Rv (Pasteur) y con las cepas mutantes. Los ratones infectados con las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ sobrevivieron significativamente más, 87 ± 2 días y 94 ± 3 días respectivamente ($p < 0,001$), que los infectados con la cepa salvaje, que sólo lo hicieron una media de 30 ± 0 días (Fig. 4.8). No se detectaron diferencias significativas entre las dos cepas mutantes (Fig. 4.8).

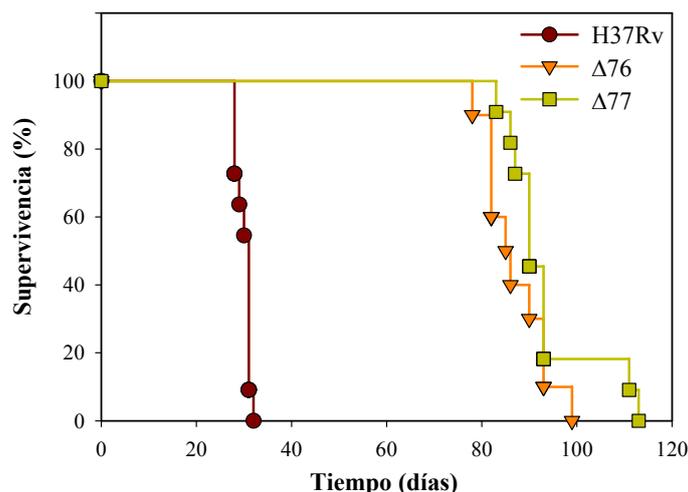


Figura 4.8. Curvas de supervivencia de los ratones SCID (10 por grupo) infectados por aerosol con la cepa salvaje *M. tuberculosis* H37Rv y con las cepas mutantes Δ76 y Δ77.

4.1.3.2. Multiplicación y persistencia en ratones inmunocompetentes

El análisis de la virulencia se realizó también en ratones inmunocompetentes C57BL/6, mediante el seguimiento de la carga bacteriana en pulmones, bazo y lavados broncoalveolares. En los tres casos, el número de bacterias recuperadas de los ratones infectados con las cepas mutantes fue menor que el correspondiente a los infectados con la cepa salvaje, siendo esta disminución significativa desde el inicio del experimento y no detectándose, en general, diferencias entre las dos cepas mutantes. (Fig. 4.9).

En los pulmones y el bazo de los ratones infectados con la cepa H37Rv (Pasteur) el número de bacterias aumentó logarítmicamente hasta la tercera semana,

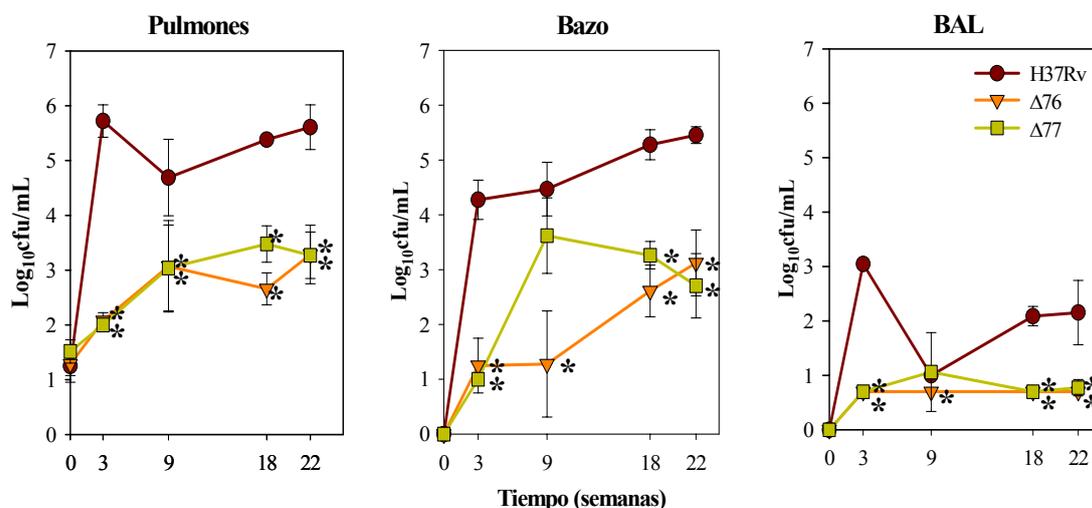


Figura 4.9. Recuento de las bacterias viables en pulmones, bazo y lavados broncoalveolares (BAL), de ratones C57BL/6 infectados con las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv, Δ76 y Δ77. Con un asterisco se indican aquellos valores significativamente diferentes respecto a la cepa salvaje ($p < 0,05$).

produciéndose entonces un estancamiento en el nivel de infección (Fig. 4.9). Mientras que en los pulmones de los ratones infectados con la cepa $\Delta 76$ y en los pulmones y bazo de los ratones infectados con la cepa $\Delta 77$, la fase de crecimiento logarítmico, aunque con una tasa de crecimiento menor, se extendió hasta la semana 9, estableciéndose entonces la fase estacionaria (Fig. 4.9). En el caso de la cepa $\Delta 76$ en bazo, el número de bacterias no aumentó en la semana 9 respecto a la 3, y sí lo hizo logarítmicamente a partir de la semana 9 hasta el final del experimento (Fig. 4.9).

El nivel de bacilos recuperados en los lavados broncoalveolares de los ratones infectados con las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ se mantuvo prácticamente constante durante todo el ensayo; mientras que disminuyó en los infectados con la cepa salvaje en la semana 9, siendo superior al de las cepas mutantes el resto del experimento (Fig. 4.9).

4.1.3.3. Respuesta inmune

El análisis de la respuesta inmune se realizó mediante el seguimiento de los niveles de mRNA de las citocinas IFN- γ y TNF- α , y la quimiocina RANTES, moléculas relacionadas con la producción de una respuesta inmune Th1, y con la proliferación y activación de linfocitos y macrófagos. Así mismo se monitorizó la expresión del enzima iNOS, producido por los macrófagos activados. En la figura 4.10 se representa el ratio del mRNA de los diferentes factores estudiados, respecto a los niveles de mRNA del gen *HPRT* utilizado como factor normalizador.

La producción de IFN- γ e iNOS fue similar en los ratones infectados con las cepas mutantes y menor que en los infectados con la cepa salvaje.

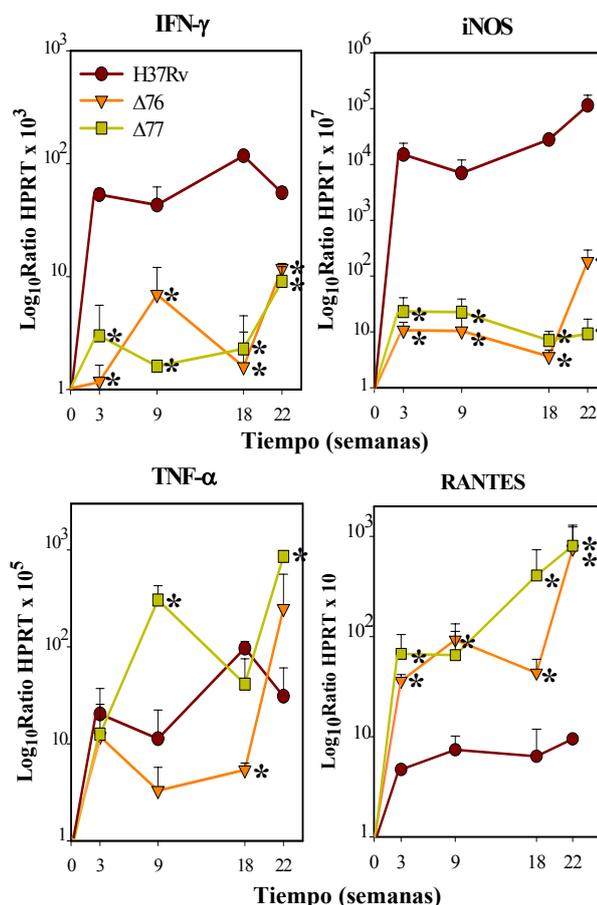


Figura 4.10. Evolución de la respuesta inmune en los ratones C57BL/6. Se indican con un asterisco los valores significativamente diferentes respecto a la cepa salvaje ($p < 0,05$).

Resultados

En cuanto a la expresión del TNF- α , los niveles en los ratones infectados con la cepa $\Delta 76$ fueron algo menores que en los infectados con la cepa salvaje, aunque esta diferencia sólo fue significativa en la semana 18 posinfección. Por el contrario, los niveles fueron estadísticamente superiores en los ratones infectados con la cepa $\Delta 77$ respecto a la cepa salvaje, en las semanas 9 y 22. Así mismo, la cantidad de mRNA de TNF- α detectada en los ratones infectados con la cepa $\Delta 77$ fue significativamente mayor que en los infectados con la cepa $\Delta 76$, en las semanas 9 y 22.

La producción de RANTES fue superior, durante todo el experimento, en los ratones infectados con las cepas mutantes en relación a los infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. Y no hubo diferencias significativas entre las dos cepas mutantes.

4.1.3.4. Histología e histometría

El examen histológico de los pulmones de los ratones mostró importantes diferencias entre la cepa salvaje y las cepas mutantes. En los ratones infectados con la cepa salvaje se observó la formación de estructuras granulomatosas desde la tercera semana posinfección; aumentando el número y la extensión de las lesiones a medida que avanzaba la infección; y produciéndose una intensa y difusa respuesta inflamatoria

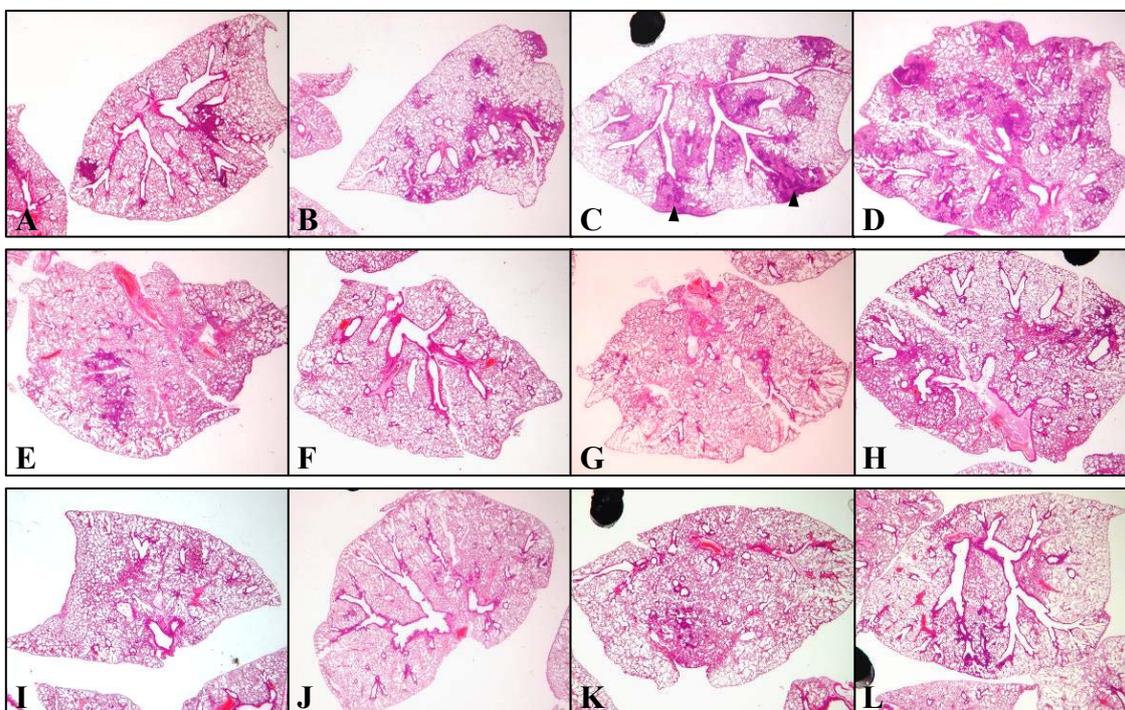


Figura 4.11. Evolución de la infiltración granulomatosa en los pulmones de los ratones C57BL/6 infectados con las cepas *M. tuberculosis* H37Rv (A-D), $\Delta 76$ (E-H) y $\Delta 77$ (I-L), en las semanas 3 (A, E, I), 9 (B, F, J), 18 (C, G, K) y 22 (D, H, L) posinfección. Las imágenes se tomaron a 10x. Las puntas de flecha en el panel C muestran algunos de los infiltrados lobulares con efusión pleural.

que se extendía a los alvéolos y a la membrana pleural (Fig. 4.11A-D). En cambio, los ratones infectados con las cepas mutantes mantuvieron una arquitectura pulmonar prácticamente normal, con muy pocos y localizados granulomas (Fig. 4.11E-L).

De acuerdo con el análisis histológico, el área ocupada por las estructuras granulomatosas en los pulmones de los ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv fue aumentando, siguiendo una progresión lineal y alcanzando un máximo del 25% al 30% de ocupación en las semanas 18 y 22 posinfección (Fig. 4.12). Mientras que, en los ratones infectados con las cepas mutantes, el área de infiltración se mantuvo prácticamente constante a lo largo del experimento, ocupando apenas el 5% del parénquima pulmonar (Fig. 4.12).

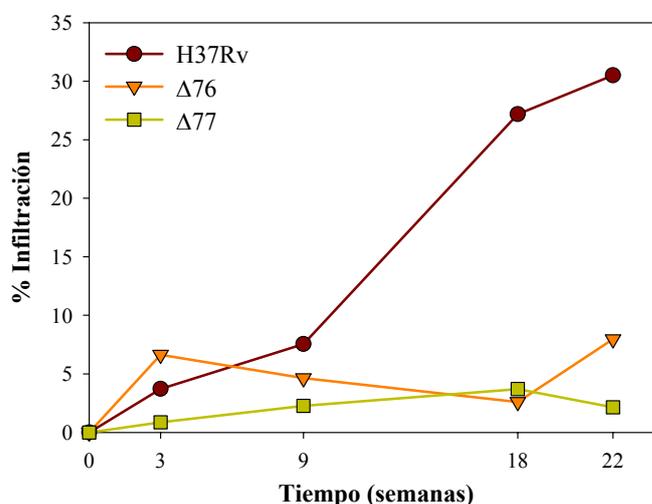


Figura 4.12. Evolución de la infiltración granulomatosa en los ratones infectados con las cepas *M. tuberculosis* H37Rv, Δ76 y Δ77.

4.2. Estudio de la posible función reguladora de la proteína Rv0576

4.2.1. Efecto sobre la expresión del operón Rv0576-Rv0577

4.2.1.1. Análisis de la regulación

La organización de los genes *Rv0576-Rv0577* en un operón (Andreu *et al.*, 2004b) y la mayor cantidad de proteína Rv0577 producida por la cepa Δ76 (Fig. 4.2) sugerían que, de acuerdo con las predicciones bioinformáticas, la proteína Rv0576 podría ser, en efecto, un regulador transcripcional, funcionando como un represor del propio operón.

Para analizar la posible función autorreguladora del producto del gen *Rv0576* se construyó una fusión del promotor del operón y la región codificante del gen *lacZ*, y se

Resultados

cuantificó la actividad β -galactosidasa en presencia y ausencia de la proteína Rv0576 en *M. smegmatis*. Para ello, en primer lugar se obtuvo la fusión y, a continuación, se clonó el gen *Rv0576* en un vector de expresión.

La fusión se construyó en el vector integrativo pSM128 (Sm^{R}), replicativo en *E. coli* y con un único lugar de clonación *ScaI* flanqueado por el terminador transcripcional del bacteriófago T4 y por la región codificante del gen *lacZ* (Dussurget *et al.*, 1999). Se amplificó por PCR, con los oligonucleótidos 576UpSca y 576LwSca, un fragmento de 350 pb que incluía 240 pb de la región promotora del operón *Rv0576-Rv0577*; se clonó en el vector pGEM-T[®] y se secuenció para comprobar que no se habían introducido mutaciones. Este fragmento se liberó digiriendo con *ScaI*, cuyas dianas se habían incorporado en los cebadores, y se clonó en el vector pSM128 linealizado con el mismo enzima. La orientación del promotor *Rv0576-Rv0577* en el vector se determinó por PCR con los oligonucleótidos T4t (que hibrida en el terminador transcripcional del vector) y, alternativamente, 576UpSca y 576LwSca. Las construcciones obtenidas se denominaron pSM128+Fus1, con el promotor orientado hacia el gen *lacZ*, y pSM128+Fus9, con el promotor en el sentido contrario. Estos plásmidos y el vector pSM128, se electroporaron en *M. smegmatis* mc²155, y la presencia del plásmido integrado en los transformantes Sm^{R} se comprobó por PCR.

La región codificante del gen *Rv0576*, sin el codón de parada de traducción, se amplificó con los oligonucleótidos 576UpNde y 576LwHin. El producto resultante se secuenció, se digirió con *NdeI* y *HindIII* (cuyas secuencias diana habían sido introducidas en los cebadores), se trató para obtener extremos romos y se clonó en el vector de expresión inducible por acetamida pJAM2 (Km^{R}), linealizado con *BamHI* y tratado con T4 DNA polimerasa. La orientación del inserto respecto al promotor del vector se comprobó amplificando con los oligonucleótidos amiC (que hibrida en el promotor del vector), y 576UpNde o 576LwHin. En la construcción resultante pJAM2+76, el gen *Rv0576* entra en fase con el codón de inicio de la traducción del vector pJAM2, pero la fase se pierde en 3' formándose un codón de parada, por lo que la proteína Rv0576 se traduce sin la cola de histidinas del vector.

El plásmido pJAM2+76 se electroporó en las cepas *M. smegmatis* pSM128, pSM128+Fus1 y pSM128+Fus9, obteniéndose las cepas *M. smegmatis* FusC, Fus1 y Fus9, respectivamente [los transformantes (Sm^{R} , Km^{R}) se comprobaron recuperando los plásmidos en *E. coli*]. La producción de la proteína Rv0576 en estas cepas, en

condiciones inducidas y no inducidas, se determinó por SDS-PAGE. Únicamente en los extractos de los cultivos con acetamida se detectó una proteína sobreexpresada del tamaño predicho para la proteína Rv0576, unos 46 kDa. Así mismo, se comprobó que la producción de la proteína no afectaba a la tasa de crecimiento, mediante el seguimiento de la densidad óptica de cultivos inducidos y no inducidos.

Para analizar el efecto de la proteína Rv0576 sobre la expresión del promotor *Rv0576-Rv0577*, las cepas FusC, Fus1 y Fus9 se cultivaron en medio líquido hasta la fase exponencial. Estos cultivos se utilizaron para inocular 2 nuevos cultivos por cepa, con y sin acetamida, que se incubaron durante 12 h antes de realizar el ensayo de la β -galactosidasa. Se analizaron 2 clones independientes de cada cepa y los experimentos se realizaron por triplicado, no detectándose diferencias significativas entre clones de una misma cepa. La actividad β -galactosidasa en los extractos de la cepa Fus1 se redujo más de 4 veces cuando se indujo la expresión de la proteína Rv0576 ($p < 0,001$) (Fig. 4.13A). En cambio, en la cepa Fus9 la actividad no variaba entre las dos condiciones y era similar a la obtenida en la cepa Fus1 en condiciones inducidas (Fig. 4.13A). En la cepa Fus9 el promotor del operón *Rv0576-Rv0577* está orientado en sentido contrario al *lacZ*, quedando por lo tanto la expresión de la β -galactosidasa bajo el control del promotor del gen *Rv0575c*. La actividad β -galactosidasa fue prácticamente nula en los extractos de la cepa FusC tanto en condiciones inducidas como no inducidas (Fig. 4.13A).

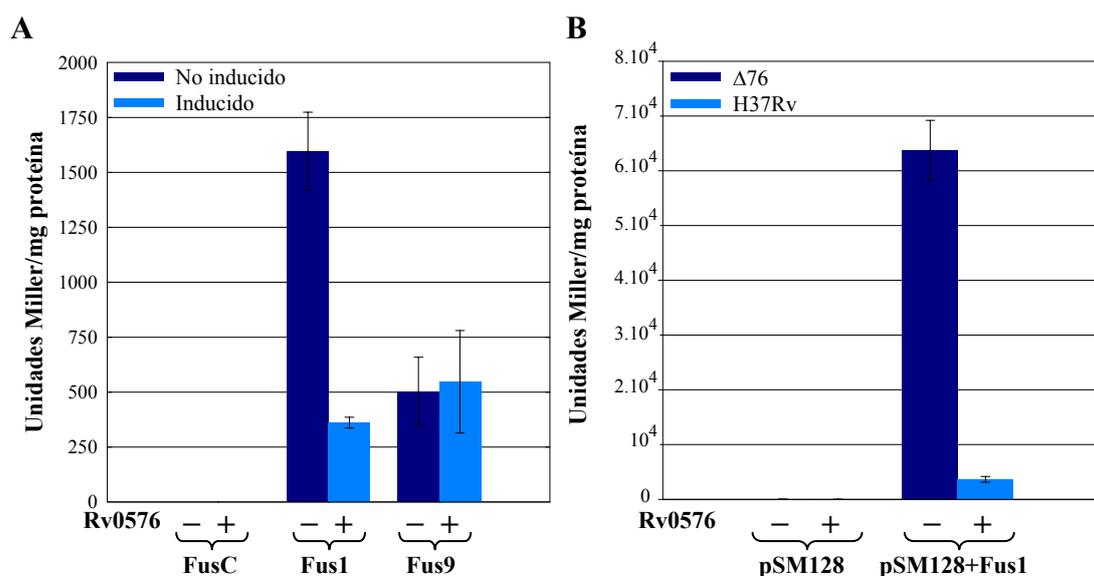


Figura 4.13. Actividad β -galactosidasa en función de la expresión de la proteína Rv0576. A) *M. smegmatis* FusC, Fus1 y Fus9, en ausencia y presencia de acetamida. B) *M. tuberculosis* H37Rv y $\Delta 76$, transformadas con el vector pSM128 y con la fusión pSM128+Fus1. En cada caso se muestran los resultados de un clon representativo.

El estudio de la función autorreguladora de la proteína Rv0576 se realizó también en *M. tuberculosis*, comparando las unidades β -galactosidasa en la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) y en la cepa $\Delta 76$, transformadas con la fusión pSM128+Fus1. La actividad β -galactosidasa fue 17 veces superior en la cepa mutante respecto a la salvaje ($p < 0,01$) (Fig. 4.13B) y, en ambos casos, la expresión fue mayor que en *M. smegmatis*. Como control se cuantificó la actividad en las mismas cepas transformadas con el vector pSM128, la cual fue prácticamente nula (Fig. 4.13B).

Estos resultados, por tanto, apoyaban la idea de que la proteína Rv0576 es un regulador transcripcional que reprime específicamente la expresión del operón Rv0576-Rv0577.

4.2.1.2. Delimitación del promotor del operón

A continuación, decidimos acotar el promotor del operón Rv0576-Rv0577 e intentar así identificar la posible secuencia de unión del regulador Rv0576. Para ello se obtuvieron 3 nuevas fusiones acortando sucesivamente el extremo 5' de la región promotora (Fig. 4.14A). La construcción de estas fusiones fue análoga a la de la fusión pSM128+Fus1, amplificándose los insertos con los oligonucleótidos directos FusUp2, FusUp3 o FusUp4, según el caso, y con el oligonucleótido reverso 576LwSca (Fig. 4.14A). Los productos de PCR se clonaron en pSM128 por ScaI, se comprobó la orientación de los insertos y se verificaron por secuenciación. Los plásmidos resultantes, denominados pSM128+Fus2, pSM128+Fus3, y pSM128+Fus4, se electroporaron en *M. smegmatis* mc²155. Los transformantes Sm^R se comprobaron por PCR y se electroporaron con el plásmido pJAM2+76, obteniéndose las cepas Fus2, Fus3 y Fus4 (Sm^R, Km^R).

Se realizaron entonces 4 ensayos β -galactosidasa independientes, de 2 clones diferentes de cada cepa, en presencia y ausencia de acetamida, no detectándose diferencias significativas entre los clones de una misma cepa. La actividad β -galactosidasa fue menor en condiciones inducidas que en condiciones no inducidas en las 3 cepas ($p < 0,05$) (Fig. 4.14B), obteniéndose un factor de represión similar al de la cepa Fus1 (Fig 4.14C). La expresión y la represión en Fus2 fueron algo superiores que en Fus1, aunque estos resultados sólo fueron significativos para uno de los clones analizados; mientras que, las unidades β -galactosidasa en la cepa Fus3 fueron menores

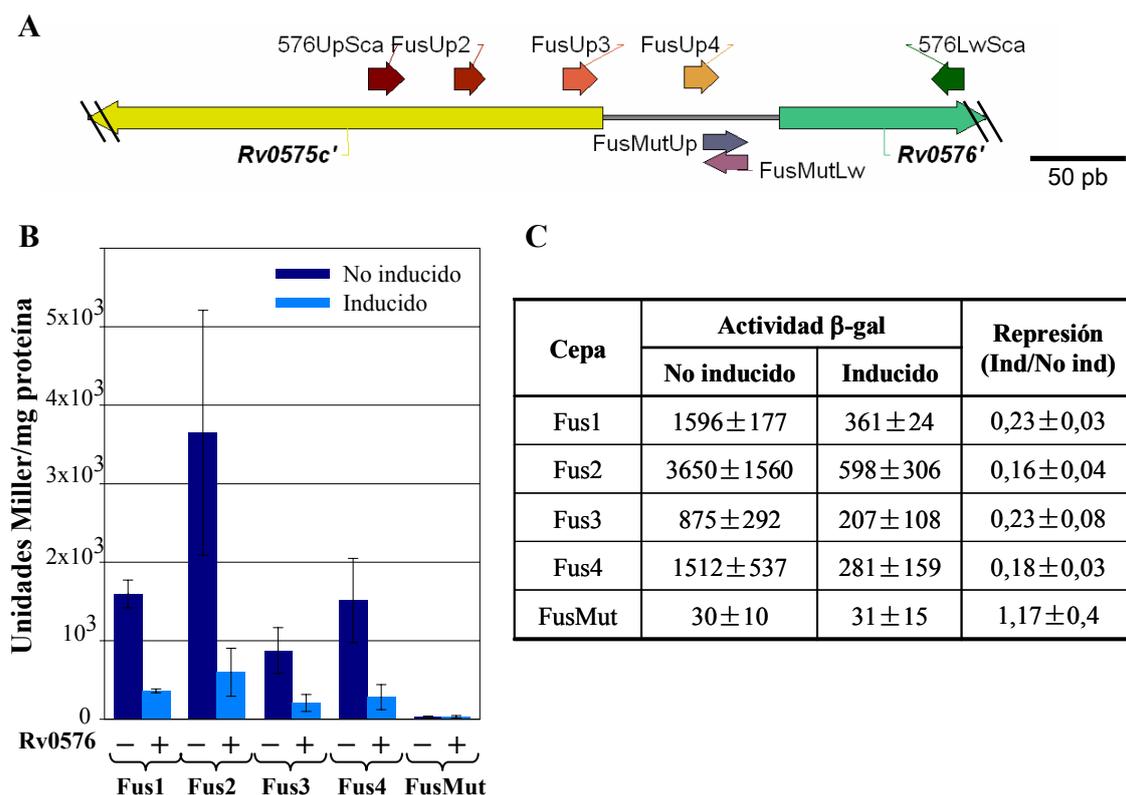


Figura 4.14. Delimitación del promotor del operón *Rv0576-Rv0577*. A) Localización en el cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv de los oligonucleótidos utilizados en la construcción de las fusiones. B) Actividad β -galactosidasa en las distintas cepas de *M. smegmatis* en función de la presencia de la proteína Rv0576. C) Promedio y desviación estándar de los resultados de 3 ó 4 ensayos y del factor de represión, para cada cepa. Se muestran los resultados de un clon representativo de cada fusión.

que en las cepas Fus1 y Fus2, sin que esto afectara significativamente al factor de represión, y recuperándose los niveles en la cepa Fus4 (Fig. 4.14B y C).

Estos resultados indicaban que en la cepa Fus4 todavía se hallaba el promotor del operón, incluyendo el operador del regulador Rv0576. El análisis de la región en 5' del ATG del gen *Rv0576* incluida en Fus4, de tan sólo 55 pb, reveló una repetición invertida entre los nucleótidos -14 y -41 (Fig. 4.15A).

Para estudiar la posible implicación de esta secuencia en la regulación se construyó una nueva fusión mutando algunos de los nucleótidos de la repetición invertida (Fig. 4.15B). Se diseñaron los oligonucleótidos FusMutUp y FusMutLw que incluían las mutaciones y eran complementarios entre sí (Fig. 4.14A), y se utilizaron con los cebadores 576LwSca y 576UpSca, respectivamente, para amplificar por PCR dos fragmentos (de 200 pb y 150 pb cada uno) utilizando el plásmido pSM128+Fus1 como DNA molde. Los productos de estas amplificaciones se usaron a su vez como molde para amplificar la región completa de 350 pb con los oligonucleótidos 576UpSca

Resultados

y 576LwSca. El fragmento resultante se secuenció, comprobándose que se habían incorporado las mutaciones en la repetición invertida, y se clonó en pSM128 por *ScaI*. El plásmido con la fusión mutada y el plásmido pJAM2+76 se electroporaron secuencialmente en *M. smegmatis* obteniéndose la cepa FusMut.

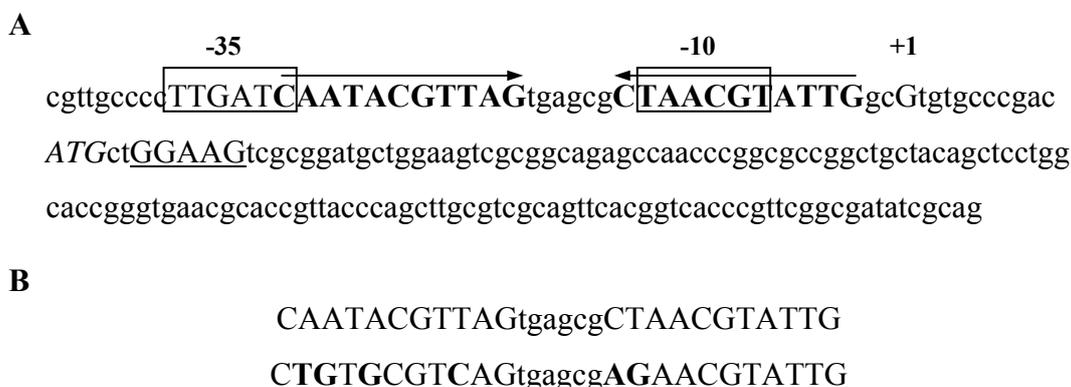


Figura 4.15. Región promotora del operón *Rv0576-Rv0577*. A) Secuencia del inserto de pSM128+Fus4. En mayúsculas se muestran las secuencias de interés: en recuadros, las posibles cajas -35 y -10; en negrita, la repetición invertida; en cursiva, el codón de inicio de la traducción de la proteína Rv0576; y subrayada, la posible secuencia Shine-Dalgarno. B) Repetición invertida salvaje y mutada; en negrita se resaltan los nucleótidos cambiados.

En comparación con la cepa Fus1, la actividad β -galactosidasa en la cepa FusMut se redujo drásticamente (Fig. 4.14B y C), lo que indicaría que se había mutado algún elemento importante del promotor. El análisis de la región promotora por comparación con las secuencias consenso para *M. tuberculosis* [T₈₁T₇₂G₇₈A₅₀C₆₁(A/T)₆₄₋₁₇ pb-T₈₀A₉₀T₃₉A₄₃(A/C)₇₁T₈₆₋₇ pb-G (Smith *et al.*, 2005)], permitió identificar una posible caja -35 cuyo último nucleótido se solaparía con el primero de la repetición invertida, y una posible caja -10 que estaría situada en la segunda parte de la repetición (Fig. 4.15A). En la fusión pSM128+FusMut se habría mutado el primer nucleótido de la caja -10, muy conservada en los promotores de *M. tuberculosis* con una secuencia -10 parecida a la de σ^{70} de *E. coli* (Smith *et al.*, 2005). La situación de las cajas -35 y -10 explicaría la represión de la expresión ejercida por la posible unión de la proteína Rv0576 a la repetición invertida. El hecho de que la actividad β -galactosidasa de la cepa FusMut sea similar en condiciones inducidas y no inducidas (Fig. 4.14C) sugiere que los nucleótidos mutados son importantes para la acción reguladora de la proteína Rv0576. Sin embargo, la baja expresión de esta fusión indica que las mutaciones no sólo afectaron a la regulación, sino que dañaron gravemente la actividad promotora.

4.2.2. Análisis de la expresión global de *M. tuberculosis* H37Rv, $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$

Una vez confirmada la función reguladora de la proteína Rv0576 nos planteamos si, además de la expresión del operón *Rv0576-Rv0577*, regulaba la expresión de otros genes. Para responder a esta cuestión realizamos un análisis comparativo del transcriptoma de la cepa salvaje *M. tuberculosis* H37Rv, de la cepa mutante en el regulador y de una cepa complementada.

En primer lugar se obtuvo la cepa complementada del mutante *Rv0576*. La región codificante del gen *Rv0576* se amplificó por PCR con los cebadores 576UpNde y 576LwHin. El fragmento resultante se digirió con *NdeI* y *HindIII*, se trató para obtener extremos romos, y se clonó en el vector de expresión integrativo pMV361 (Km^R), digerido con *EcoRI* y tratado con T4 DNA polimerasa. La correcta orientación del inserto en el vector se comprobó amplificando con los oligonucleótidos Phsp60 (que hibrida en el promotor del vector) y, alternativamente, 576UpNde y 576LwHin. La construcción obtenida, denominada pMV361+76, se verificó por secuenciación y se electroporó en *M. tuberculosis* $\Delta 76$. Los transformantes que crecieron en placas con kanamicina, se comprobaron por PCR con los oligonucleótidos Phsp60 y 576LwHin, y la cepa resultante se denominó $\Delta 76::Rv0576$.

Los cambios en la expresión génica global en las cepas *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$, se analizaron entonces, comparando las muestras de RNA total de cada cepa por hibridación con microchips de DNA. En el Anexo se presentan los datos de expresión normalizados de los genes con una expresión diferencial en las distintas comparaciones realizadas.

Cuando se contrastaron las cepas $\Delta 76$ y H37Rv, la expresión del gen *Rv0576* fue menor en la cepa mutante pero esta diferencia no fue significativa, probablemente como consecuencia del ruido de fondo inherente a la técnica (ver apartado 8.3 en Anexo); por lo que estas dos cepas se compararon de nuevo en un experimento independiente, detectándose el gen *Rv0576* reprimido en un factor de 0,4 ($p=0,0105$) (Tabla 8.2 en Anexo). En comparación con la cepa H37Rv, el gen *Rv0577* se mostró fuertemente inducido en la cepa $\Delta 76$ (en ambos experimentos), mientras que en la cepa $\Delta 76::Rv0576$ dicho gen estaba reprimido y el gen *Rv0576* estaba inducido (Tabla 4.1). Estos dos genes fueron los únicos desregulados cuando se contrastaron las cepas $\Delta 76::Rv0576$ y

Resultados

$\Delta 76$ (Tabla 4.1) y, por lo tanto, los únicos detectados bajo el control de la proteína Rv0576.

Tanto en la cepa mutante como en la complementada, se detectaron reprimidos los genes *Rv1181* (significativamente sólo en la cepa mutante), *Rv1182* y *Rv1183*, del operón de síntesis de PAT; e inducidos los genes *Rv0097* y *Rv0098*, que codifican respectivamente una probable oxidorreductasa y una proteína hipotética conservada (Tabla 4.1). El gen *Rv1182* y los genes *Rv0097* y *Rv0098*, además del siguiente gen en el operón, el *Rv0099*, presentaron también una expresión significativamente diferente en el segundo experimento en que se compararon las cepas $\Delta 76$ y H37Rv (Tabla 8.2 en Anexo).

Tabla 4.1. Genes diferencialmente expresados en las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$ entre ellas, y en comparación con la cepa H37Rv. En paréntesis se indica el cociente de la expresión de cada gen en las dos cepas comparadas. Los genes están en orden ascendente según el valor de dicho cociente excepto aquellos genes que constituyen un operón y que se muestran agrupados.

$\Delta 76$ / H37Rv	$\Delta 76::Rv0576$ / H37Rv	$\Delta 76::Rv0576$ / $\Delta 76$
<i>Rv1181</i> (0,2) p=0,0041		
<i>Rv1182</i> (0,06) p=0,0002	<i>Rv1182</i> (0,05) p=0,0093	
<i>Rv1183</i> (0,27) p=0,0063	<i>Rv1183</i> (0,32) p=0,0093	
	<i>Rv0577</i> (0,47) p= 0,0367	<i>Rv0577</i> (0,04) p=2,4.10 ⁻⁵
	<i>Rv2336</i> (0,48) p=0,0367	
	<i>Rv2660c</i> (1,9) p=0,0245	
	<i>Rv1801</i> (2) p=0,0367	
	<i>Rv2011c</i> (2) p=0,0294	
	<i>Rv2913c</i> (3) p=0,0133	
	<i>Rv3252c</i> (3,2) p=0,0135	
<i>Rv0097</i> (7) p=0,0006	<i>Rv0097</i> (4,5) p=0,0001	
<i>Rv0098</i> (4,7) p=0,0002	<i>Rv0098</i> (3,7) p=0,009	
	<i>Rv1129c</i> (3,7) p=0,009	
	<i>Rv1130</i> (10,4) p=0,0002	
	<i>Rv1131</i> (9) p=0,0001	
	<i>Rv0576</i> (11) p=0,0001	<i>Rv0576</i> (11) p=2,5.10 ⁻⁵
<i>Rv0577</i> (11) p=5,8.10 ⁻⁷		

El resto de genes desregulados, cuyas características más relevantes se describen en la tabla 4.2, lo estuvieron sólo cuando se compararon las cepas $\Delta 76::Rv0576$ y H37Rv, si bien los niveles de expresión en la cepa $\Delta 76$ eran similares a los de la cepa

$\Delta 76::Rv0576$ (Tabla 8.3 en Anexo). Por lo tanto la expresión diferencial de estos genes y de los genes *Rv1182-Rv1183* y *Rv0097-Rv0098*, no estaría relacionada con el regulador *Rv0576*.

Tabla 4.2. Descripción de los genes que presentaron una expresión diferencial únicamente cuando se compararon las cepas $\Delta 76::Rv0576$ y *M. tuberculosis* H37Rv.

Gen	Descripción
<i>Rv2336</i>	- Proteína de función desconocida
<i>Rv1129c</i>	- Probable regulador transcripcional
<i>Rv1130</i>	- Probable PrpD, metilcitrateo deshidratasa (Muñoz-Elías <i>et al.</i> , 2006)
<i>Rv1131 (gltA1)</i>	- Probable PrpC, metilcitrateo sintasa (Muñoz-Elías <i>et al.</i> , 2006)
<i>Rv1801 (PPE29)</i>	- Miembro de la familia de proteínas ricas en glicina PPE
<i>Rv2011c</i>	- Proteína conservada, con cierta similitud a reguladores transcripcionales MarR
<i>Rv2660c</i>	- Proteína hipotética de función desconocida
<i>Rv2913c</i>	- Probable D-aminoácido aminohidrolasa
<i>Rv3252c (alkB)</i>	- Probable alcanol-1-monooxigenasa

4.3. Complementación de las cepas mutantes *Rv0576* y *Rv0577*

4.3.1. Complementación y tinción con rojo neutro

Para determinar si, efectivamente, los genes *Rv0576* y *Rv0577* estaban implicados en la tinción con rojo neutro, decidimos complementar las cepas mutantes y analizar el fenotipo rojo neutro de las cepas obtenidas.

En primer lugar se tiñó la cepa $\Delta 76::Rv0576$, construida para el análisis por microchips, resultando RN⁻. Este resultado no fue del todo sorprendente, ya que el análisis del transcriptoma de esta cepa había mostrado la existencia de varios genes desregulados (en comparación con la cepa H37Rv) entre los que se encontraban el gen *Rv0576*, inducido, y el gen *Rv0577* reprimido (Tabla 4.1). Por ello decidimos complementar la mutación de la cepa $\Delta 76$ con una construcción en la que el gen *Rv0576* se expresara bajo el control de su propio promotor, de tal forma que la expresión pudiera así autorregularse. El gen *Rv0576* se amplificó, con la región promotora, a partir del plásmido pSUM36+76+77 (Andreu *et al.*, 2004b), con los oligonucleótidos 576Lw y pSUMLw (que hibrida en el vector de clonación pSUM36). El fragmento obtenido se digirió con *Pst*I por las dianas del cebador 576Lw y del fragmento de pSUM36 amplificado, y se clonó en el vector replicativo pSUM36 (Km^R) linealizado con *Pst*I. La construcción resultante se comprobó por restricción y se electroporó en *M. tuberculosis*

Resultados

$\Delta 76$. Los clones Km^R obtenidos se verificaron recuperando el plásmido en *E. coli* y digiriéndolo con varias enzimas de restricción. Sin embargo, cuando se realizó la tinción de la cepa $\Delta 76$ (pSUM36+76) el resultado fue también RN^- .

Finalmente, la cepa $\Delta 76$ se complementó con el plásmido pSUM36+76+77 (Andreu *et al.*, 2004b), que contiene el operón *Rv0576-Rv0577* completo, incluyendo la región promotora. Los clones Km^R resultantes se comprobaron transformando *E. coli* y digiriendo los plásmidos recuperados. Además, se analizó por Western-blot la producción de *Rv0577*, detectándose una cantidad menor que en la cepa $\Delta 76$ y comparable a la de la cepa H37Rv (resultados no cuantitativos). La tinción de la cepa $\Delta 76$ (pSUM36+76+77) sí fue positiva. Sin embargo, el análisis de los lípidos no polares de esta cepa mostró que seguía siendo deficiente en la síntesis de PDIM. Este resultado indicaba que el fenotipo rojo neutro no estaba directamente determinado por la presencia o ausencia de PDIM.

De modo análogo, con el fin de complementar la mutación de la cepa $\Delta 77$, clonamos la región codificante del gen *Rv0577*, amplificada por PCR con los oligonucleótidos 577UpNde y 577LwHin, en el vector de expresión integrativo pMV361 digerido con *EcoRI* y tratado con T4 DNA polimerasa. La correcta orientación del inserto en el vector se determinó mediante PCR con los oligonucleótidos Phsp60 y, alternativamente, 577UpNde y 577LwHin; y se secuenció la construcción resultante, confirmándose que no se habían introducido mutaciones y que el gen entraba en fase. El plásmido pMV361+77 se electroporó entonces en *M. tuberculosis* $\Delta 77$ y los transformantes Km^R se comprobaron por PCR con los oligonucleótidos Phsp60 y 577LwHin. Además, por Western-blot se comprobó que en esta cepa, denominada $\Delta 77::Rv0577$, se había restablecido la síntesis de la proteína *Rv0577*. Sin embargo, la tinción con rojo neutro mostró que esta cepa continuaba siendo RN^- .

También se complementó la cepa $\Delta 77$ con el plásmido pSUM36+77 (Andreu *et al.*, 2004b), que contiene el gen *Rv0577* y el promotor del operón, y con el plásmido pSUM36+76+77. En ambos casos los transformantes Km^R se comprobaron recuperando los plásmidos en *E. coli* y digiriéndolos con varias enzimas de restricción. Así mismo, el plásmido pSUM36+76+77 recuperado de *M. tuberculosis*, se electroporó en *M. smegmatis* obteniéndose clones RN^+ en las placas de medio 7H10 con rojo neutro. También confirmamos la producción de la proteína *Rv0577* en la cepa $\Delta 77$

(pSUM36+76+77) mediante Western-blot. Aún así, tanto esta cepa, como la cepa $\Delta 77$ (pSUM36+77) seguían presentando el fenotipo RN⁻.

4.3.2. Estudio del efecto de la sobreproducción de la proteína Rv0576 y de la posible dominancia de la mutación Rv0577

Existía la posibilidad de que la sobreproducción de la proteína Rv0576 en las cepas $\Delta 76::Rv0576$ y $\Delta 76$ (pSUM36+76) fuera responsable de su fenotipo RN⁻. Para intentar aclarar este punto, decidimos introducir el plásmido pMV361+76 (que sobreexpresa la proteína Rv0576) en *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294). La presencia del plásmido integrado en los transformantes Km^R se verificó por PCR con los oligonucleótidos Phsp60 y 576LwHin, y la cepa obtenida se denominó H37Rv::*Rv0576*. Se realizó entonces la tinción con rojo neutro de 6 clones independientes, siendo los 6 RN⁺ y descartando cualquier efecto de la sobreproducción de la proteína Rv0576 sobre la tinción.

Así mismo, como no se había logrado complementar el fenotipo RN⁻ de la cepa $\Delta 77$, decidimos estudiar si la delección del gen *Rv0577*, que deja intactas las primeras 276 pb, era de algún modo dominante sobre la copia salvaje. Para ello se amplificó el gen *Rv0577* con la delección, usando los oligonucleótidos 577UpBam y 577LwPst y como molde el plásmido p1NIL $\Delta 77$ gm (utilizado en la construcción del mutante $\Delta 77$). El fragmento resultante se digirió con *Bam*HI y *Pst*I, y se clonó en fase en el vector de expresión replicativo pMV261, digerido con los mismos enzimas, obteniéndose el plásmido pMV261 $\Delta 77$ que se comprobó por restricción. Este plásmido y, como control, el plásmido pMV261 sin inserto, se electroporaron en *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), y los clones Km^R se comprobaron transformando *E. coli* y digiriendo con diversos enzimas los plásmidos recuperados. La tinción con rojo neutro de 5 clones de la cepa H37Rv (pMV261 $\Delta 77$) resultó en 2 RN⁺ y 3 RN⁻. Por último, se tiñeron también 6 clones H37Rv (pMV261) siendo 5 RN⁺ y 1 RN⁻. Estas observaciones ponían en seria duda la estabilidad del fenotipo rojo neutro, así como la relación entre las delecciones de los genes *Rv0576* y *Rv0577* y el fenotipo RN⁻ de las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$.

4.3.3. Construcción de nuevos mutantes Rv0576 y Rv0577

Considerando los resultados obtenidos hasta el momento parecía que, durante el proceso de construcción de las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$, se habría producido una segunda mutación que sería responsable del fenotipo RN⁻. Para estudiar esta posibilidad,

Resultados

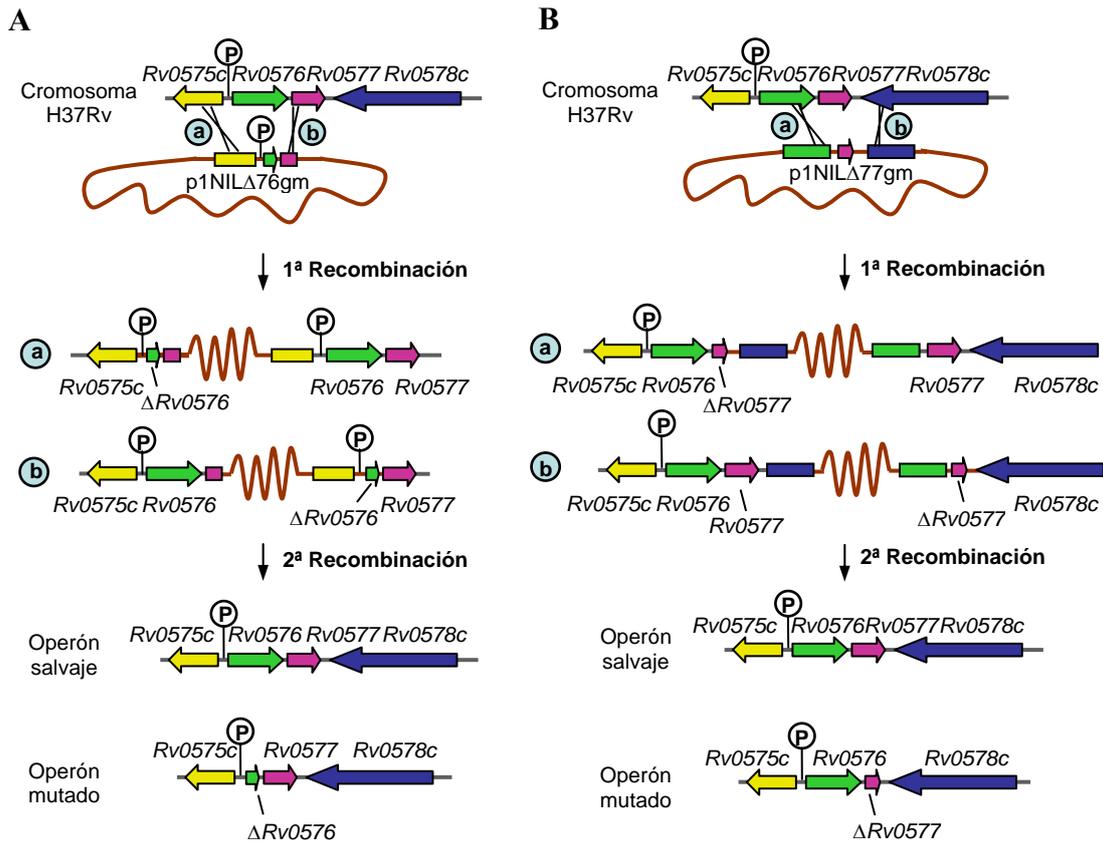


Figura 4.16. Genotipos posibles en los recombinantes simples y en los dobles recombinantes generados durante la construcción de los mutantes *Rv0576* (A) y *Rv0577* (B). (a) y (b) indican los dos posibles lugares del primer sobrecruzamiento [en 5' de la deleción (a) o en 3' (b)], generando los recombinantes simples (a) o (b) respectivamente. La segunda recombinación en los recombinantes simples puede dar lugar a dobles recombinantes con el operón salvaje o a dobles recombinantes con el operón mutado. P indica el promotor del operón.

recuperamos y analizamos los recombinantes simples a partir de los cuales habíamos obtenido las cepas $\Delta76$ y $\Delta77$. En el caso de la cepa H37Rv::p1NIL $\Delta77gm$ no detectamos la proteína *Rv0577* por Western-blot, lo que sugería que la integración no había resultado en ninguna copia salvaje de este gen. Es decir, el sobrecruzamiento se había producido probablemente en la región situada en 5' respecto a la deleción (Fig. 4.16B). Sin embargo, en la cepa H37Rv::p1NIL $\Delta76gm$ sí se detectó la proteína y en una cantidad comparable a la de la cepa salvaje H37Rv, lo que indicaría que en esta cepa existía una copia salvaje de ambos genes. Esto hubiera sido así en cualquiera de los dos posibles sobrecruzamientos (Fig. 4.16A). Aún así las dos cepas eran RN⁻. Además, el análisis de los lípidos libres no polares de estas dos cepas reveló que sintetizaban PDIM, reafirmando una vez más que los fenotipos PDIM y rojo neutro no estaban directamente relacionados. Estas observaciones sugerían pues que durante la obtención de los recombinantes simples se habría producido la mutación responsable del fenotipo RN⁻, y

que más tarde en el proceso de obtención de los mutantes habría tenido lugar la mutación PDIM⁻.

Teniendo en cuenta estos resultados decidimos repetir la construcción de los mutantes, analizando esta vez también el fenotipo rojo neutro de los recombinantes simples y de los dobles recombinantes en los que la integración se resolviese dejando la copia intacta del operón (Fig. 4.16). En esta ocasión se utilizó también la cepa *M. tuberculosis* H37Rv Pasteur, pero se partió de una única colonia aislada, recuperada de cobayas infectados, y se comprobó que era RN⁺.

Se aislaron 4 recombinantes simples (Km^R, Hyg^R, LacZ⁺) de la electroporación del plásmido p1NILΔ77gm (H37Rv::p1NILΔ77gm clones 1-4), y 12 de la transformación de p1NILΔ76gm (H37Rv::p1NILΔ76gm clones 1-12). En la mayoría de estos clones, utilizando oligonucleótidos que hibridaban con el fragmento deletado y con regiones no incluidas en los vectores p1NILΔ77gm y p1NILΔ76gm, se comprobó que la integración de los plásmidos había resultado en una copia mutada y una copia salvaje del operón completo (con las únicas excepciones de los clones H37Rv::p1NILΔ77gm-4 y H37Rv::p1NILΔ76gm-4). Aún así, sólo fueron RN⁺ los clones H37Rv::p1NILΔ77gm-3 y -4, y los clones H37Rv::p1NILΔ76gm-2, -5, -9, -10 y -12. Es decir, no existía ninguna relación aparente entre el genotipo del operón *Rv0576-Rv0577* y el fenotipo rojo neutro.

Los 4 clones H37Rv::p1NILΔ77gm y 6 clones H37Rv::p1NILΔ76gm (3 RN⁺ y 3 RN⁻), se sembraron en placas sin antibiótico para permitir la doble recombinación, y se seleccionaron los dobles recombinantes en placas con sacarosa y X-gal. A continuación, se resembraron 16 colonias LacZ⁻ Sacarosa^R de cada recombinante simple, en placas con y sin kanamicina, y se analizó por PCR la presencia de las deleciones en las colonias Km^S. La tinción con rojo neutro mostró que todos los clones derivados de recombinantes simples RN⁻ eran también RN⁻, independientemente de que presentaran o no la deleción (Tabla 4.3). Y todos los clones que derivaban de recombinantes simples RN⁺ fueron RN⁺ (incluso aquéllos mutantes para los genes *Rv0576* o *Rv0577*), con la excepción de los clones (mutantes o no) procedentes de H37Rv::p1NILΔ76gm-10, que fueron RN⁻ (Tabla 4.3). Estas observaciones reafirmaban, una vez más, que el resultado de la tinción con rojo neutro era independiente del genotipo de los genes *Rv0576* y *Rv0577*.

Resultados

Tabla 4.3. Análisis del genotipo *Rv0576-Rv0577* y del fenotipo rojo neutro en los diferentes clones aislados durante la construcción de las cepas mutantes *Rv0576* y *Rv0577*.

Recombinante simple	Fenotipo RN	Dobles recomb. Km ^s LacZ ⁺ sacarosa ^R	Mutantes	Fenotipo RN	Salvajes	Fenotipo RN
H37Rv::p1NILΔ77gm-1	–	15	5	–	10	–
H37Rv::p1NILΔ77gm-2	–	15	8	–	7	–
H37Rv::p1NILΔ77gm-3	+	16	7	+	8	+
H37Rv::p1NILΔ77gm-4	+	11	2	+	9	+
H37Rv::p1NILΔ76gm-2	+	12	4	+	8	+
H37Rv::p1NILΔ76gm-5	+	5	3	+	2	+
H37Rv::p1NILΔ76gm-6	–	13	4	–	9	–
H37Rv::p1NILΔ76gm-7	–	16	7	–	9	–
H37Rv::p1NILΔ76gm-8	–	16	7	–	9	–
H37Rv::p1NILΔ76gm-10	+	5	1	–	4	–

4.3.4. Análisis de la virulencia de los mutantes complementados

Los resultados anteriores sugerían, por lo tanto, que el fenotipo RN[–] de las cepas mutantes Δ76 y Δ77 se debería a una o varias mutaciones espontáneas adicionales, y no a las deleciones de los genes *Rv0576* y *Rv0577*. Con el fin de analizar si la misma explicación podía aplicarse al fenotipo atenuado de los mutantes Δ76 y Δ77, decidimos estudiar la virulencia de los mutantes complementados.

Puesto que lo único que queríamos estudiar era la implicación de los genes *Rv0576* y *Rv0577* en la virulencia, para este análisis se escogieron las cepas Δ76::*Rv0576* y Δ77::*Rv0577* ya que son RN[–] PDIM[–] como las cepas Δ76 y Δ77 y, por lo tanto, probablemente tienen las mismas mutaciones adicionales. Una razón añadida para elegir estas cepas fue que, en ellas, la complementación de las deleciones se había realizado con un plásmido integrativo, que es mucho más estable en ausencia de antibióticos en comparación con las cepas complementadas con plásmidos replicativos.

El análisis de la virulencia se llevó a cabo estudiando la supervivencia de ratones SCID, y realizando un seguimiento de los bacilos viables en pulmón, bazo y lavados broncoalveolares de ratones C57BL/6 en las semanas 0, 3, 9 y 18 posinfección. La presencia del plásmido en las bacterias recuperadas de los ratones C57BL/6 se comprobó replicando en placas con y sin kanamicina, unas 30 colonias de cada tiempo del experimento.

Inesperadamente, los ratones SCID infectados con la cepa $\Delta 77::Rv0577$ sobrevivieron las 18 semanas que duró el experimento (Fig. 4.17); y no se recuperaron bacilos de los ratones C57BL/6 infectados con la misma cepa, ni siquiera en pulmón en el tiempo 0. Puesto que la titulación que se hizo del inóculo fue correcta, pensamos que pudo haber un problema al infectar los animales, por lo que no se considerarán estos resultados.

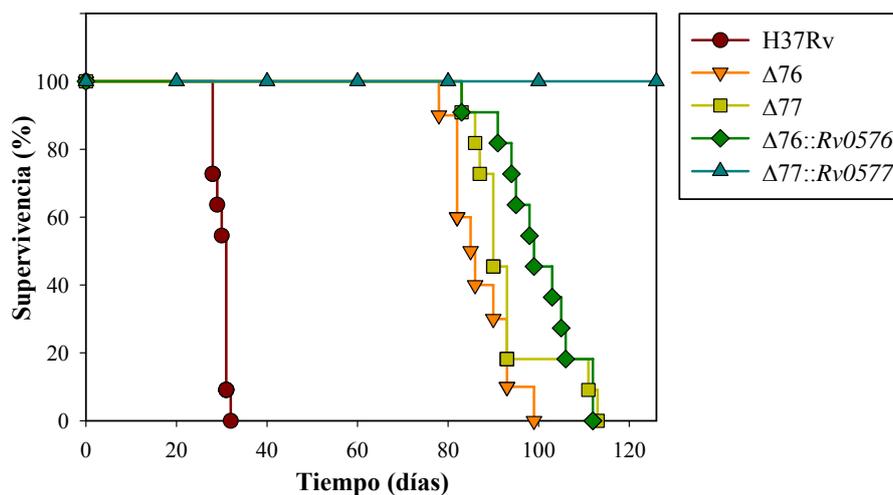


Figura 4.17. Curvas de supervivencia de los ratones SCID infectados por aerosol con las cepas $\Delta 76::Rv0576$ y $\Delta 77::Rv0577$. Se muestran también los resultados anteriores de las cepas H37Rv, $\Delta 76$ y $\Delta 77$ como referencia.

En el caso de la cepa $\Delta 76::Rv0576$, los ratones SCID sobrevivieron una media de 100 ± 3 días, un resultado significativamente superior al de la cepa $\Delta 76$ ($p=0,001$) y, por lo tanto, muy superior al de la cepa salvaje H37Rv (Fig. 4.17). No se detectaron diferencias en el número de bacterias recuperadas de pulmón, bazo o lavados broncoalveolares de los ratones C57BL/6 infectados con la cepa $\Delta 76::Rv0576$ en comparación con la cepa $\Delta 76$ (Fig. 4.18). El número de bacilos fue significativamente inferior en los ratones infectados con la cepa complementada respecto a la salvaje, en todo el experimento excepto en la semana 9 en lavados broncoalveolares (Fig. 4.18). Todas las colonias que se testaron fueron resistentes a kanamicina.

Por lo tanto, la complementación de la delección del gen *Rv0576* no restablecía en ningún grado la virulencia de *M. tuberculosis*.

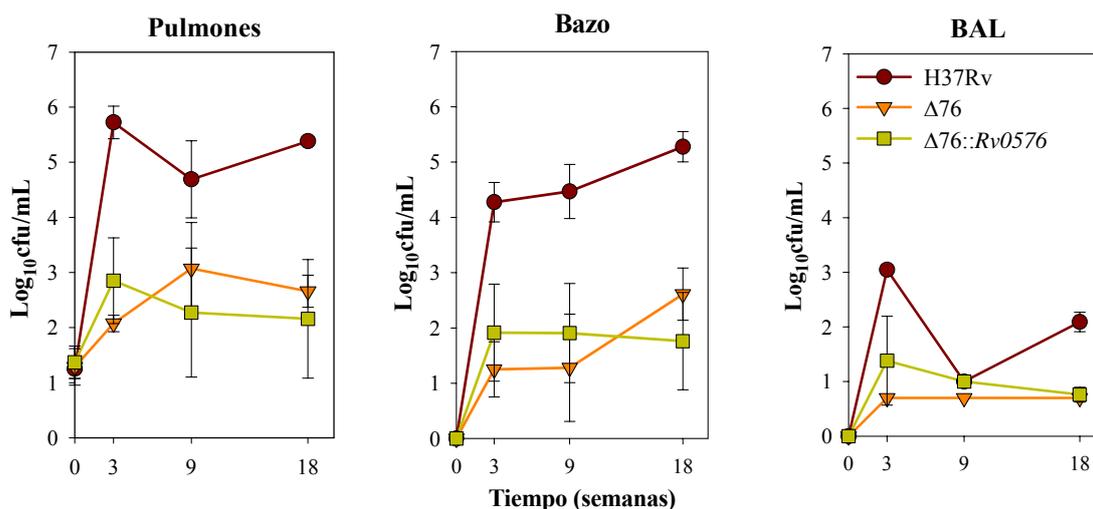


Figura 4.18. Recuento de las bacterias viables en pulmones, bazo y lavados broncoalveolares (BAL), de ratones C57BL/6 infectados con la cepa $\Delta 76::Rv0576$. Se muestran los resultados obtenidos en el experimento anterior con las cepas $\Delta 76$ y H37Rv como referencia.

4.4. Estudio de la variabilidad de los fenotipos rojo neutro y PDIM

Los resultados de la transformación de *M. tuberculosis* H37Rv con los plásmidos pMV261 $\Delta 77$ y pMV261, y de las construcciones de los mutantes, indicaban que, a partir de un cultivo de la cepa H37Rv (RN⁺) se aislaban colonias RN⁻ con una frecuencia inesperadamente elevada, independientemente del plásmido usado e incluso con un plásmido sin inserto. Puesto que anteriormente no se había observado la aparición de mutantes RN⁻ en la cepa H37Rv, nos planteamos dos hipótesis: (1) el proceso de electroporación inducía mutaciones responsables del fenotipo RN⁻; o (2) se trataba de mutantes espontáneos que se habían ido acumulando en los sucesivos cultivos de la cepa H37Rv, la cual consistiría en una población heterogénea, mayoritariamente RN⁺ pero con un pequeño porcentaje de células RN⁻.

Este planteamiento era, en cierto modo, también válido para la síntesis de PDIM, ya que los resultados obtenidos indicaban que los genes *Rv0576* y *Rv0577* no están relacionados con la síntesis de estos lípidos y, sin embargo, las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ son deficientes en PDIM.

Para estudiar la variabilidad de estos caracteres se diseñó el experimento descrito en la figura 4.19.

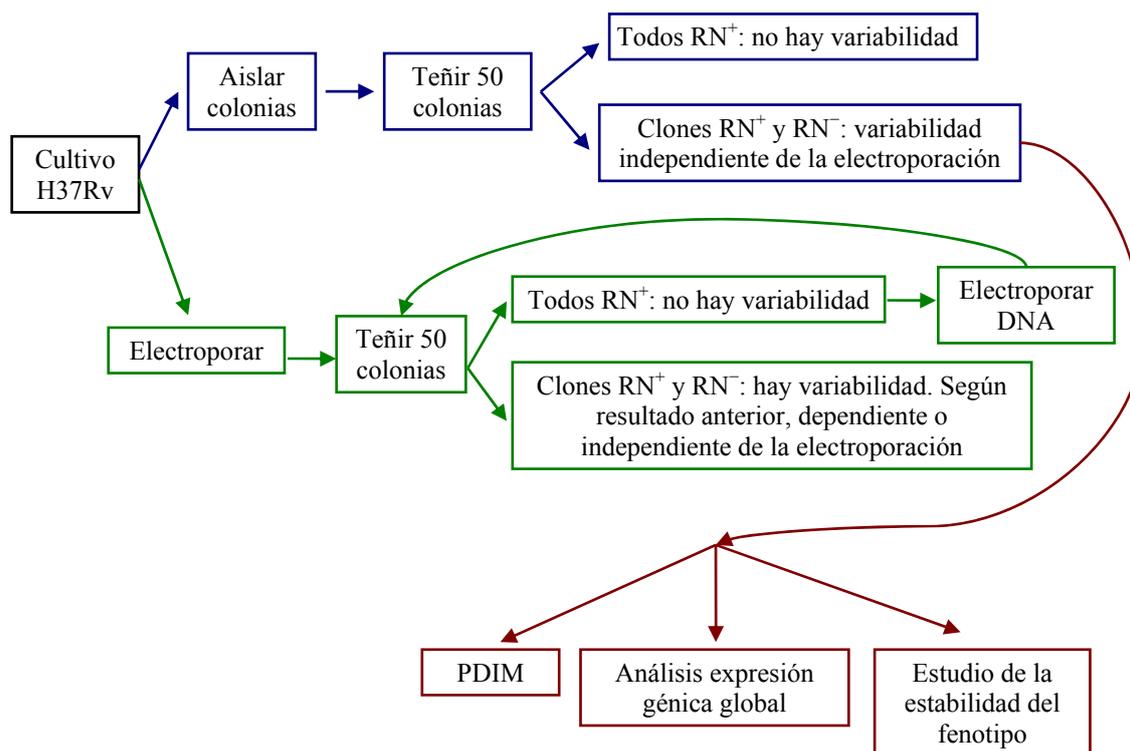


Figura 4.19. Esquema seguido en el estudio de la variabilidad de los fenotipos rojo neutro y PDIM.

4.4.1. Análisis de la heterogeneidad poblacional

Se inoculó un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) con un precultivo en fase exponencial, y se incubó durante 7 días. Transcurrido este tiempo se sembró un banco de diluciones en placas de medio 7H10, y con el resto del cultivo se prepararon células electrocompetentes que se sometieron a un pulso de electroporación (sin DNA), sembrándose un banco de diluciones en medio 7H10, tras una incubación previa de 24 h.

De cada experimento se escogieron 60 colonias aisladas, y se resembraron para tener una buena cantidad de células para los posteriores análisis. La tinción con rojo neutro de 50 de los clones aislados directamente del cultivo resultó en 8 RN⁻ y 42 RN⁺. Y, del mismo modo, de 50 clones procedentes de la electroporación, 8 fueron RN⁻ y el resto RN⁺.

Para analizar si la electroporación de DNA afectaba a la frecuencia de clones RN⁻, se repitió el experimento pero electroporando el plásmido pMV261. Se resembraron 98 transformantes Km^R y se analizó la presencia del plásmido en 80 de ellos, transformando *E. coli* con lisados de las colonias. En total se comprobó que 61 clones eran transformantes, de los cuales 60 fueron RN⁺ y 1 RN⁻.

Resultados

Estos resultados mostraban, por tanto, que la variabilidad del fenotipo rojo neutro es independiente del proceso de electroporación.

A continuación, se estudió el contenido lipídico de los 8 clones RN⁻ (denominados C4, C19, C21, C28, C32, C41, C44, C50) y de 8 clones RN⁺ (C3, C20, C22, C27, C31, C42, C43, C49) aislados directamente del cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, utilizando la cepa parental y la cepa H37Ra como controles. Todas las cepas sintetizaban TDM, DAT y PIM (Fig. 4.20B y C); y todas, excepto *M. tuberculosis* H37Ra, producían PAT y SL (Fig. 4.20A y B-C). Así mismo, se analizó el patrón de ácidos micólicos de 5 clones RN⁻ (C21, C28, C32, C44, C50) y de 3 clones RN⁺ (C22, C31, C42), no detectándose diferencias respecto a las cepas H37Rv y H37Ra (Fig. 4.20D). En cambio, cuando se determinó la producción de PDIM, se halló que sólo 3 de los 16 clones analizados los sintetizaban: el C42 (RN⁺), el C44 (RN⁻) y el C49 (RN⁺)

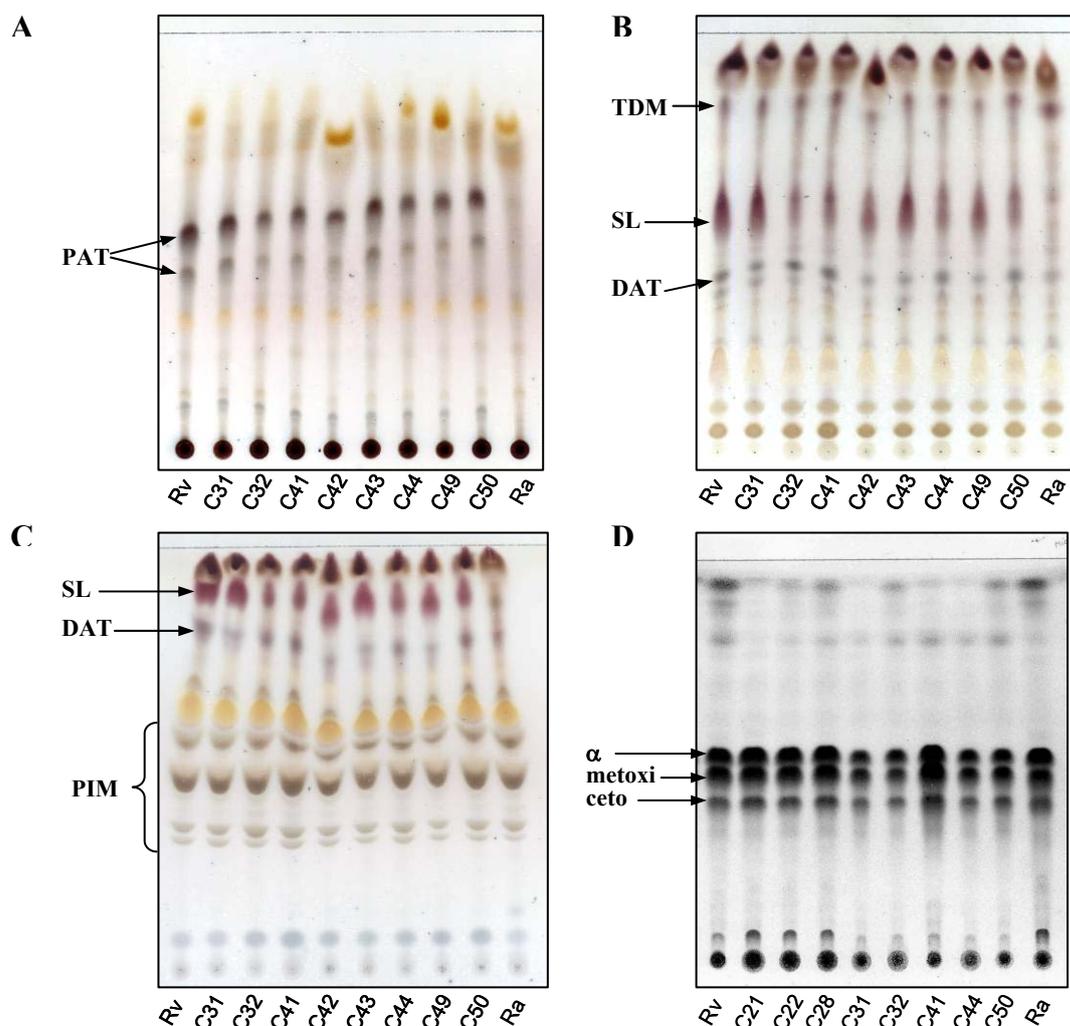


Figura 4.20. Análisis de la composición lipídica de los clones RN⁺ y RN⁻. CCF de los lípidos libres totales (0,4 mg): A) PAT; B) TDM, SL y DAT; CHCl₃:CH₃OH:H₂O 30:8:1; y C) PIM. D) CCF de los ácidos micólicos (0,2 mg-0,4 mg). Los resultados fueron similares en el resto de cepas analizadas.

(Fig 4.21A y B). Además, en comparación con las cepas H37Rv y H37Ra, los clones C42 y C49 producían una cantidad mayor de estos lípidos (Fig 4.21B).

La síntesis de PDIM también se analizó en 4 clones RN⁺ (E7, E11, E18, E36) y 4 clones RN⁻ (E8, E12, E17, E35) procedentes de la electroporación sin DNA, detectándose sólo en los clones RN⁺ E7, E18 y E36 (Fig. 4.21C). Estos tres clones producían también una cantidad mayor de PDIM que la cepa salvaje H37Rv.

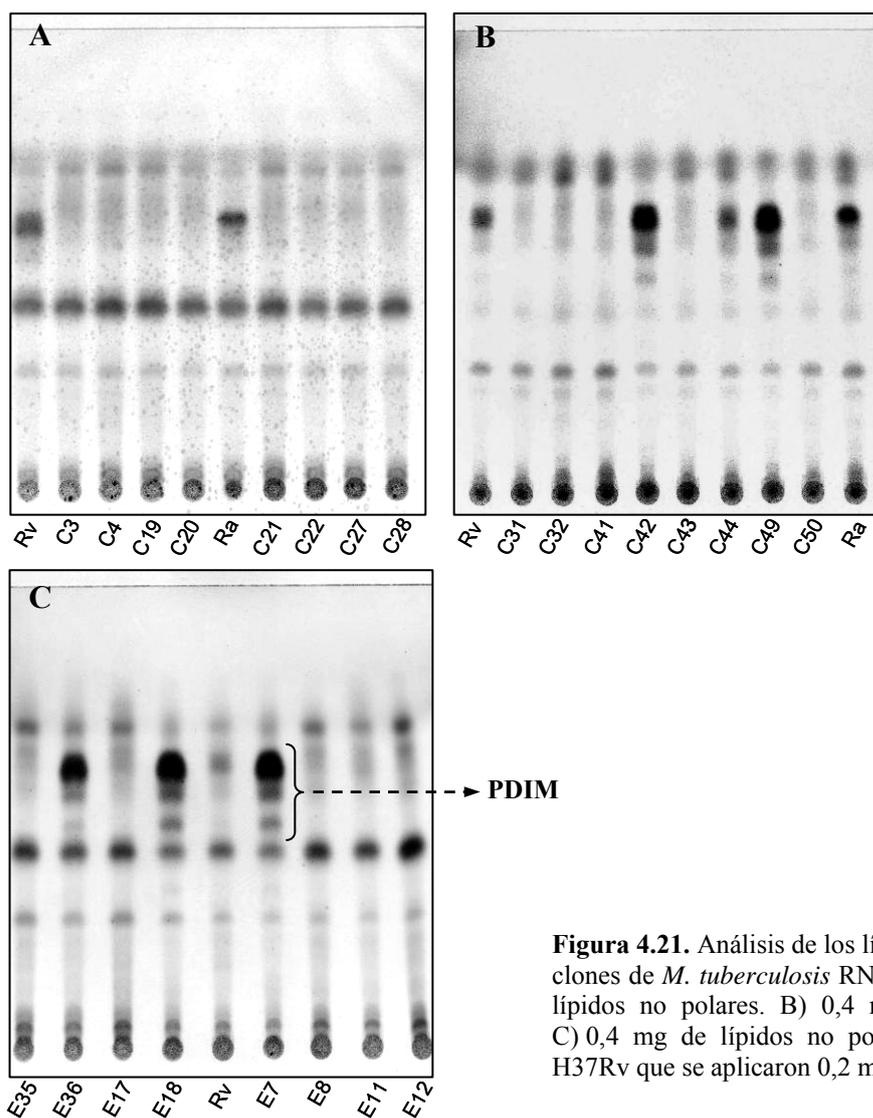


Figura 4.21. Análisis de los lípidos no polares de los clones de *M. tuberculosis* RN⁺ y RN⁻. A) 0,4 mg de lípidos no polares. B) 0,4 mg de lípidos totales. C) 0,4 mg de lípidos no polares, excepto para la H37Rv que se aplicaron 0,2 mg.

Estas observaciones indicaban que, si bien un cultivo de *M. tuberculosis* era homogéneo en cuanto a la síntesis de la mayoría de los lípidos de la envuelta celular, era heterogéneo en cuanto a la producción de PDIM. Es decir, a partir de una cepa PDIM⁺ se aislaban clones PDIM⁻, en un proceso independiente de la electroporación. Estos mutantes PDIM⁻ constituían la población mayoritaria de la cepa H37Rv mantenida en el laboratorio, lo que explicaría la baja cantidad de PDIM extraídos de esta cepa.

4.4.2. Análisis de la estabilidad clonal

Para estudiar si el fenotipo de los clones aislados en el experimento anterior era estable, se eligieron 6 cepas RN⁻ (C19, C21, C28, C32, C44, C50) y 4 cepas RN⁺ (C20, C22, C27, C49), las cuales se incubaron en medio líquido durante 7 días para sembrar, posteriormente, un banco de diluciones en medio sólido. Las colonias así obtenidas se resembraron para tener masa celular suficiente para realizar la tinción. El número de clones analizados en cada caso y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Tinción con rojo neutro de clones derivados de 6 cepas RN⁻ y 4 cepas RN⁺.

Fenotipo inicial	Cepa	Nº de clones analizados	Nº de clones RN ⁻	Nº de clones RN ⁺
RN ⁻	C19	50	50	0
	C21	50	50	0
	C28	50	50	0
	C32*	50	49	1
		66	66	0
	C44*	154	112	42
		66	59	7
C50	72	72	0	
RN ⁺	C20	56	0	56
	C22	58	0	58
	C27*	60	0	60
		66	0	66
	C49*	168	0	168
		66	0	66

*Se muestran los resultados de 2 experimentos independientes.

Todos los clones analizados procedentes de las cepas RN⁺ mantuvieron el fenotipo RN⁺. Este resultado sugería que las frecuencias de clones RN⁻ observadas en el anterior experimento serían el resultado de la acumulación de estos mutantes y no las tasas de mutación reales. En cambio, los resultados con las cepas RN⁻ fueron diversos. Los clones aislados de las cepas C19, C21, C28 y C50 fueron todos RN⁻, mientras que un clon procedente de la cepa C32 reversionó a RN⁺. El fenotipo de los clones aislados de la cepa C44 (RN⁻) fue el más variable, con la aparición de un 27% y un 10% de clones RN⁺ en 2 experimentos independientes. Así pues, el fenotipo RN⁻ no era tan estable como el fenotipo RN⁺, observándose con una cierta frecuencia la reversión al fenotipo salvaje.

Así mismo, para analizar la estabilidad del fenotipo PDIM se obtuvieron los lípidos no polares de 25 clones procedentes de la cepa C27 (RN⁺, PDIM⁻), 25 clones procedentes de la cepa C32 (RN⁻, PDIM⁻), 25 clones procedentes de la cepa C49 (RN⁺, PDIM⁺), y 25 clones procedentes de la cepa C50 (RN⁻, PDIM⁻). En todos los casos se mantuvo el fenotipo PDIM de la cepa original. Esto indicaría que la elevadísima frecuencia de mutantes PDIM⁻ observada en el primer experimento sería, efectivamente, consecuencia de su acumulación con los sucesivos cultivos de la cepa en el laboratorio.

4.4.3. Análisis comparativo del transcriptoma de las cepas H37Rv, C27, C32 y C49

Para intentar dilucidar la base genética de las variaciones observadas en los fenotipos rojo neutro y PDIM, se comparó la expresión génica global de una cepa RN⁻ (C32) con la de tres cepas RN⁺ [C27, C49 y H37Rv (ATCC 27294)], y de dos cepas PDIM⁻ (C32 y C27) con la de dos cepas PDIM⁺ [C49 y H37Rv (ATCC 27294)]. En el Anexo se muestran los valores de expresión normalizados de los genes con una expresión significativamente diferente en las distintas comparaciones realizadas.

La comparación del transcriptoma de la cepa C32 (RN⁻) con los de las cepas C27 y H37Rv (RN⁺), no permitió detectar ningún gen con una expresión significativamente diferente. Sin embargo, cuando la misma cepa C32 se contrastó con la cepa C49 (RN⁺) se detectaron 5 genes con una expresión diferencial: el gen *Rv1576c* que codificaría la proteína de la cápside del profago phiRv1 (inducido 3,9 veces, p=0,039); el operón formado por los genes *Rv3160c-Rv3161c* que codifican un posible regulador transcripcional y una dioxigenasa (inducidos 3,7 y 4,9 veces respectivamente, p=0,039); el gen *Rv3312A* cuyo producto es un antígeno secretado que formaría los recién descritos pilis de *M. tuberculosis* (Alteri *et al.*, 2007) (reprimido en un factor de 0,5 p=0,0375); y el gen *Rv3706c* que codifica una proteína conservada rica en prolina, de función desconocida (reprimido en un factor de 0,4 p=0,0198).

Si se agrupaban las tres cepas RN⁺ (C27, C49 y H37Rv), y se comparaban con la cepa C32 (RN⁻) aparecían 4 genes con una expresión diferencial significativa (Fig. 4.22 y Tabla 8.6 en Anexo): el gen *Rv2452c* que codifica una pequeña proteína hipotética de función desconocida (inducido 2,8 veces en la cepa RN⁻, p=0,0481); los genes *Rv3160c-Rv3161c* (inducidos 3,2 y 4,1 veces en la cepa RN⁻, p=0,0365 y p=0,0402); y el gen *Rv3706c* con una expresión 2 veces inferior en la cepa RN⁻ (p=0,0365). Estos

Resultados

tres últimos genes también habían presentado una expresión diferencial al comparar la cepa C32 con la cepa C49. Por lo tanto estos genes, o alguno/s de ellos, podrían estar relacionados con el fenotipo RN^- de la cepa C32.

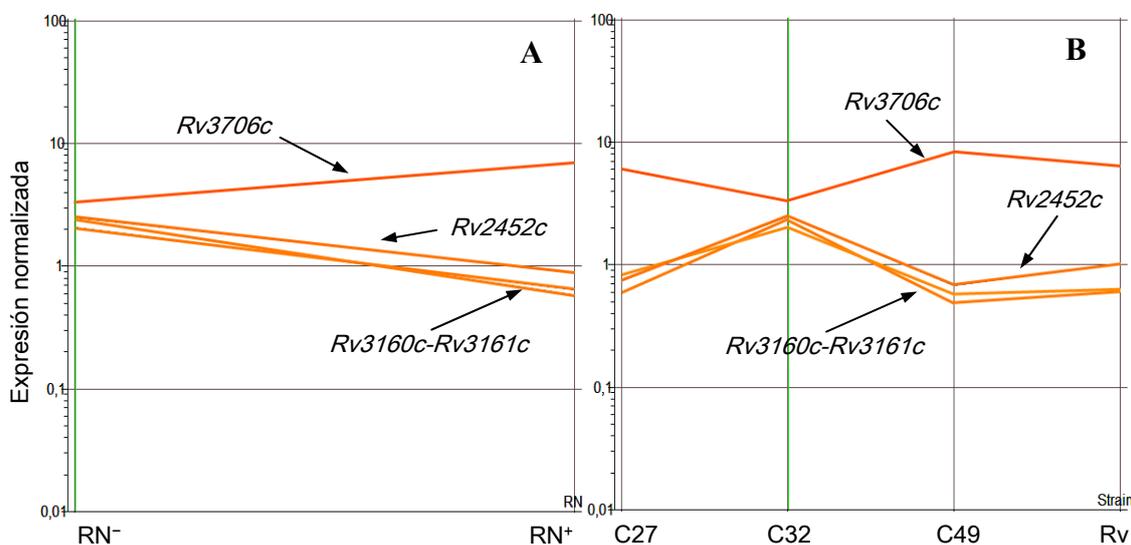


Figura 4.22. Genes diferencialmente expresados en la cepa C32 (RN^-) respecto a las cepas RN^+ . Valor de la expresión de cada gen A) según el fenotipo rojo neutro, y B) en cada cepa analizada. Los genes están coloreados según el nivel de expresión en la cepa C32. Gráficas generadas por el programa GeneSpring.

En cuanto al fenotipo PDIM, cuando se comparó la cepa C27 ($PDIM^-$) con la cepa H37Rv ($PDIM^+$) se detectaron 2 genes con una expresión disminuida: el gen *Rv2940c* o *mas* ($0,4$ $p=0,0164$) que codifica la sintasa de ácidos micocerósicos de los PDIM; y el gen *Rv3562* o *fadE31* ($0,6$ $p=0,042$), una posible acil-CoA deshidrogenasa (Tabla 8.7 en Anexo). El gen *mas* de síntesis de PDIM se encontraba también reprimido en la cepa C27 ($PDIM^-$) en comparación con la cepa C49 ($PDIM^+$), si bien en este caso el número de genes con una expresión diferencial ascendió hasta 22 (Tabla 4.5, y Tabla 8.8 en Anexo). Así mismo, si se agrupaban las dos cepas $PDIM^-$ (C27 y C32) y se comparaban con las dos cepas $PDIM^+$ (C49 y H37Rv), el único gen que presentaba una expresión significativamente diferente era el gen *mas* (Fig. 4.23), que se encontraba reprimido en un factor de 0,4 en las cepas $PDIM^-$ ($p=7,8 \times 10^{-5}$). Por lo tanto, la menor expresión de este gen en las cepas C27 y C32 explicaría, muy probablemente, la ausencia de PDIM en estas cepas.

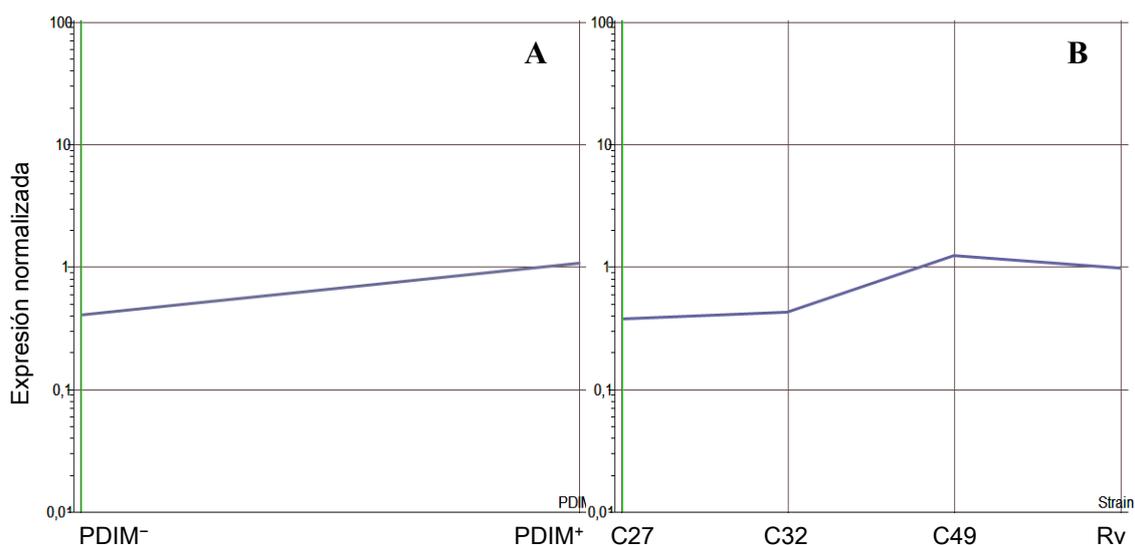


Figura 4.23. Expresión del gen *mas* en las cepas PDIM⁻ y en las cepas PDIM⁺. A) Expresión según el fenotipo PDIM. B) Expresión en cada cepa. El color corresponde a la expresión en las cepas PDIM⁻ y en la cepa C27, respectivamente. Gráficas generadas por el programa GeneSpring.

Tabla 4.5. Genes diferencialmente expresados en la cepa C27 respecto a la C49.

Gen	Factor de represión ¹	Valor de p	Descripción
<i>Rv0244c (fadE5)</i>	0,5	0,0178	- Probable acil-CoA deshidrogenasa
<i>Rv0284</i>	0,5	0,0432	- Proteína de membrana conservada
<i>Rv0286(PPE4)</i>	0,6	0,036	- Miembro de la familia de proteínas PPE
<i>Rv0288 (cfp7 o TB10.4)</i>	0,4	0,0376	- Antígeno rico en alanina de la familia ESAT-6
<i>Rv0314c</i>	0,7	0,0178	- Proteína de membrana conservada
<i>Rv0469(umaA)</i>	0,6	0,0471	- Síntesis/modificación de los ácidos micólicos
<i>Rv0634B (rpmG2)</i>	0,6	0,0178	- Posible proteína ribosómica L33
<i>Rv0909</i>	0,6	0,0336	- Proteína hipotética conservada
<i>Rv0965c</i>	0,6	0,0471	- Proteína hipotética conservada
<i>Rv1169c (PE11)</i>	0,5	0,0315	- Miembro de la familia de proteínas PE
<i>Rv1172c (PE12)</i>	0,7	0,0463	- Miembro de la familia de proteínas PE
<i>Rv1460</i>	0,6	0,0442	- Probable regulador transcripcional
<i>Rv1899c(lppD)</i>	0,6	0,0178	- Probable lipoproteína
<i>Rv1980c (mpt64)</i>	0,6	0,0178	- Proteína inmunogénica exportada
<i>Rv2428 (ahpC)</i>	0,5	0,0463	- Alquil hidroxiperóxido reductasa. Respuesta al estrés oxidativo y resistencia a la isoniazida
<i>Rv2472</i>	0,6	0,0471	- Proteína hipotética conservada
<i>Rv2816c</i>	0,6	0,0178	- Proteína hipotética conservada
<i>Rv2940c (mas)</i>	0,3	0,025	- Ácido micocerósico sintasa

Resultados

Gen	Factor de represión ¹	Valor de p	Descripción
<i>Rv2949c</i>	0,5	0,0432	- Corismato-piruvato liasa implicada en la síntesis de derivados del ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico y PGL
<i>Rv2956</i>	0,6	0,0463	- Proteína hipotética conservada
<i>Rv3019c</i>	0,5	0,025	- Proteína de la familia ESAT-6
<i>Rv3269</i>	0,4	0,0471	- Proteína hipotética similar a chaperonas

¹Cociente entre la expresión en la cepa C27 y la expresión en la cepa C49.

5. Discusión

5.1. Los genes Rv0576-Rv0577 y la tinción con rojo neutro

Desde la década de 1950 se sabe que las cepas virulentas de *M. tuberculosis* pueden distinguirse de las cepas avirulentas y de las micobacterias saprófitas por su capacidad de adsorber el colorante rojo neutro en su forma catiónica roja. Aunque inicialmente se atribuyó esta reacción al SL, trabajos posteriores refutaron esta relación (Soto, C. Y., 2002; Andreu *et al.*, 2004a) y, por lo tanto, reabrieron la pregunta de cuál era la molécula responsable de este comportamiento en las cepas virulentas de *M. tuberculosis*.

En nuestro laboratorio, en colaboración con los laboratorios de la Dra. Marina Luquin (UAB) y del Dr. Carlos Martín (Universidad de Zaragoza), se inició un estudio para intentar establecer las bases moleculares de la tinción con rojo neutro. Se construyó una cosmidoteca de *M. tuberculosis* H37Rv en *M. smegmatis* y se seleccionaron los clones recombinantes RN⁺ (Soto, C. Y., 2002). Esta estrategia permitió demostrar que la expresión heteróloga del gen Rv0577 en *M. smegmatis* era suficiente para conferir a este microorganismo la capacidad de fijar el rojo neutro en su forma acídica (Andreu *et al.*, 2004b). Así mismo, se estableció que este gen formaba un operón con el gen Rv0576, el cual codificaba un posible regulador transcripcional (Andreu *et al.*, 2004b). El siguiente paso, y objetivo principal de esta tesis, era estudiar la implicación de los genes Rv0576-Rv0577 en la tinción con rojo neutro en *M. tuberculosis*.

5.1.1. Obtención de los mutantes Rv0576 y Rv0577 y estudio de la función de la proteína Rv0576

En primer lugar, se construyeron los mutantes por delección de cada uno de los dos genes Rv0576 y Rv0577, generándose las cepas *M. tuberculosis* $\Delta 76$ y $\Delta 77$ (apartado 4.1). El hecho de que ambas cepas resultaran ser RN⁻ apoyaba la implicación de ambos genes en dicho fenotipo. Además, el análisis mediante Western-blot indicaba que la cepa $\Delta 76$ sobreexpresaba la proteína Rv0577, lo que estaría de acuerdo con la función reguladora propuesta para Rv0576.

Inicialmente, estos resultados podían explicarse en base a dos hipótesis:

1.- La tinción con rojo neutro dependería directamente de la presencia de la proteína Rv0577 en una concentración crítica. El fenotipo RN⁻ de los dos mutantes sería

Discusión

debido a una concentración inadecuada de la proteína Rv0577, la cual se encontraba ausente en la cepa $\Delta 77$ y sobreproducida en la cepa $\Delta 76$. La función del gen *Rv0576* sería controlar la expresión del gen *Rv0577*.

2.- Además del gen *Rv0577* (que sería esencial para la tinción), existirían otros genes adicionales implicados en el fenotipo RN⁺ en *M. tuberculosis*. La proteína Rv0576 regularía no sólo la expresión del gen *Rv0577* sino también la de estos otros genes hipotéticos.

Para esclarecer cuál de estas dos hipótesis era correcta, se estudió la función de la proteína Rv0576 mediante fusiones transcripcionales y el análisis de la expresión global con microchips de DNA. Los resultados de las fusiones con el promotor del operón *Rv0576-Rv0577* nos permitieron confirmar que la proteína Rv0576 era, efectivamente, un regulador transcripcional que reprimía la expresión del operón. Este resultado se corroboró con el análisis por microchips que mostró, además, que la proteína Rv0576 regulaba únicamente la expresión del operón *Rv0576-Rv0577* (apartado 4.2.2).

Aún así, no se puede descartar la posibilidad de que, en presencia de algún estímulo desconocido o condición ambiental diferentes de las utilizadas en los ensayos, la proteína Rv0576 pueda regular la expresión de otros genes. En este sentido cabe destacar que los genes *Rv0576-Rv0577* no aparecen desregulados en ninguno de los múltiples trabajos en que se ha analizado la expresión global de *M. tuberculosis* en respuesta a diversas condiciones ambientales (estrés térmico, anaerobiosis, privación de nutrientes, etc.) y durante la infección *in vivo* (Stewart *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2002; Betts *et al.*, 2002; Schnappinger *et al.*, 2003; Dahl *et al.*, 2003; Bacon *et al.*, 2004; Talaat *et al.*, 2004, entre otros). Por lo que no parece que la expresión de los genes *Rv0576-Rv0577* responda a ninguno de estos estímulos. Esto podría sugerir que la función de la proteína Rv0576 sería únicamente mantener un bajo nivel de expresión del operón *Rv0576-Rv0577*, en las condiciones examinadas hasta el momento.

En realidad, los reguladores de la familia SmtB/ArsR, a la que pertenece Rv0576, acostumbran a funcionar como represores en ausencia de un inductor, generalmente un metal. La unión del inductor a la proteína reguladora inhibe la unión de ésta al operador, con lo que se activa la expresión de los genes regulados (Busenlehner *et al.*, 2003). En el caso de que la proteína Rv0576 se comportara de forma similar,

podemos imaginar que dicho inductor hipotético no se hallaba presente a la concentración adecuada en ninguna de las condiciones ensayadas ya que se detectó la represión de un gen y, por lo tanto, no hay ningún indicio que nos haga presuponer que no reprimiría también los otros posibles genes regulados.

También cabría la posibilidad de que la variabilidad inherente a la tecnología de los microchips de DNA, especialmente en el análisis de la expresión, nos haya impedido detectar otros genes regulados (ver apartado 8.3 en Anexo). Si esto fuera así, la posible secuencia de unión del regulador, identificada en la región promotora del operón *Rv0576-Rv0577* (Fig. 4.15), podría encontrarse en otros promotores del genoma de *M. tuberculosis*. Sin embargo, cuando realizamos un análisis bioinformático de dicho genoma, buscando secuencias similares, no pudimos encontrar ninguna, ni siquiera permitiendo 3 mutaciones en cada una de las repeticiones (búsqueda de patrón en el genoma de *M. tuberculosis*, en regiones de 200 pb anteriores al codón de inicio de traducción, realizada en el TubercuList <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Es decir, parece que en el genoma no existen otras secuencias diana para el regulador *Rv0576*, aparte de la existente en su propio promotor.

Conjuntamente, estas observaciones desmentirían la hipótesis de que el fenotipo RN^- de la cepa $\Delta 76$ fuera debido a la existencia de otros genes implicados en la tinción, desregulados en ausencia de la proteína *Rv0576*. Por lo tanto, con los resultados analizados hasta el momento, parecería que la explicación más plausible del fenotipo RN^- de las dos cepas mutantes, $\Delta 76$ y $\Delta 77$, sería que la tinción con rojo neutro dependiera de unos niveles críticos de la proteína *Rv0577*.

Una tercera hipótesis que podría explicar el fenotipo RN^- de la cepa $\Delta 76$, sería que la proteína *Rv0576*, además de ser un regulador transcripcional, realizara alguna otra función que interviniera en la reacción con rojo neutro. En realidad, esta proteína es bastante más larga que la mayoría de reguladores SmtB/ArsR. Así, mientras que el extremo N-terminal de *Rv0576* es similar a los reguladores de esta familia, el extremo C-terminal es similar a proteínas hipotéticas y contiene el dominio conservado DUF704 (Pfam05146.6), de función desconocida pero presente en muchas proteínas bacterianas y eucariotas¹. Dentro del género *Mycobacterium*, los genes *Rv0576-Rv0577* parecen

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam05146>

estar restringidos al complejo *M. tuberculosis* (Huard *et al.*, 2003; y BLAST con genomas finalizados y en progreso de otras micobacterias²). Sin embargo, la reciente secuenciación del genoma de *Rhodococcus sp.* RHA1 (McLeod *et al.*, 2006) ha mostrado que un operón similar se halla también en este microorganismo, pero el gen equivalente a *Rv0576* aparece dividido en 2 ORFs que codificarían el regulador transcripcional (78% de similitud con la región N-terminal de *Rv0576*) y la proteína con el dominio DUF704 (75% de similitud con la región C-terminal de *Rv0576*), respectivamente. Esto respaldaría la hipótesis de que la proteína *Rv0576* sea el resultado de la fusión de un regulador transcripcional y de otra proteína de función desconocida. Aún así, el gen *Rv0576*, ausente en el genoma de *M. smegmatis*, no es necesario para la complementación heteróloga de *M. smegmatis* (Andreu *et al.*, 2004b), ni confiere el fenotipo RN⁺ por sí mismo (resultados no presentados). Por lo tanto, aunque esta proteína tuviera otra función, además de la de regulador transcripcional, no parece que ésta estuviera implicada la tinción.

5.1.2. Comprobación de las cepas mutantes *Rv0576* y *Rv0577*

Sea como fuera que ambas cepas mutantes eran RN⁻, el siguiente paso para demostrar la relación de una determinada mutación con un fenotipo es reintroducir una copia salvaje del gen y analizar si se restablece el fenotipo salvaje. Inicialmente, se intentó sin éxito complementar las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ con la copia salvaje del respectivo gen, utilizando un vector de expresión integrativo (apartado 4.3.1). Puesto que, en ocasiones, la complementación se puede ver afectada por los niveles de expresión de la copia salvaje introducida y, en efecto, el análisis por microchips demostró que en la cepa $\Delta 76::Rv0576$ el gen *Rv0576* estaba inducido y el gen *Rv0577* reprimido (Tabla 4.1), intentamos entonces restablecer el fenotipo RN⁺ en las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ expresando cada gen desde el promotor natural del operón, para que se pudiera regular la expresión. Sin embargo, con esta estrategia tampoco conseguimos complementar el fenotipo RN⁻ de ninguna de las dos cepas mutantes. Por último, transformamos las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ con el operón completo, incluyendo la región promotora. En esta ocasión sí que se recuperó el fenotipo RN⁺ en la cepa $\Delta 76$, pero no en la cepa $\Delta 77$.

² http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial_taxtree.html

Estos resultados podrían ser debidos a que los niveles de expresión de los genes *Rv0576-Rv0577* fueran críticos para conseguir el fenotipo RN^+ , explicación que también habíamos atribuido al fenotipo RN^- de las dos cepas mutantes. Sin embargo, esta hipótesis quedó descartada al sobreexpresar el regulador *Rv0576* en la cepa salvaje H37Rv, sin que esto afectara a la tinción positiva de la cepa resultante (apartado 4.3.2). Así mismo, la posibilidad de que la mutación del gen *Rv0577* fuera de algún modo dominante sobre la copia salvaje, y ello nos hubiera impedido complementar el fenotipo rojo neutro de la cepa $\Delta 77$, se puede rechazar también al haber aislado al menos 2 clones que eran RN^+ y poseían una copia mutada y una salvaje del gen *Rv0577* [cepa H37Rv (pMV261 $\Delta 77$)] (apartado 4.3.2).

Conjuntamente, estos resultados apuntarían a que (1) durante el aislamiento de las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ se habría producido una segunda mutación responsable del fenotipo RN^- ; y (2) que durante la obtención de la cepa $\Delta 76$ (pSUM36+76+77), que resultó ser RN^+ , esta mutación habría revertido o se habría producido una tercera mutación compensatoria. La confirmación definitiva de que no existe ninguna relación directa entre los genes *Rv0576-Rv0577* y la tinción con rojo neutro en *M. tuberculosis*, se obtuvo al repetir la construcción de los mutantes en estos genes y conseguir aislar varios mutantes independientes RN^+ (apartado 4.3.3). Así mismo, el análisis de los recombinantes simples y de los dobles recombinantes obtenidos durante el proceso de construcción de los mutantes, demostró que los fenotipos RN^+ y RN^- son totalmente independientes del genotipo *Rv0576-Rv0577*, reafirmando la existencia de mutaciones adicionales.

5.1.3. Estudio del fenotipo RN^- y PDIM $^-$ de las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$

Habiéndose demostrado que los genes *Rv0576* y *Rv0577* no están implicados en la tinción con rojo neutro ni en la síntesis de PDIM, ¿cuál o cuáles serían las causas de los fenotipos RN^- y PDIM $^-$ de las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$? En primer lugar, recalcar de nuevo que estos dos fenotipos no están relacionados entre sí, ya que los recombinantes simples H37Rv::p1NIL $\Delta 76$ gm y H37Rv::p1NIL $\Delta 77$ gm, de los que derivaron los mutantes, eran RN^- pero sintetizaban PDIM (apartado 4.3.3). Por lo tanto, primero se habría producido la mutación responsable del fenotipo RN^- y, más tarde en el proceso de obtención de los mutantes, se habría producido alguna otra mutación, causando la deficiencia en PDIM.

Discusión

La independencia de estos dos fenotipos se ve confirmada en la cepa $\Delta 76$ (pSUM36+76+77), que revierte a RN^+ pero sigue siendo $PDIM^-$

Con el objetivo de identificar las mutaciones responsables de estos fenotipos, analizamos y comparamos los resultados de expresión global de la cepa salvaje H37Rv (ATCC 27294) y las cepas $\Delta 76$ (RN^- y $PDIM^-$) y $\Delta 76::Rv0576$ (RN^-). La expresión de los genes del locus PDIM fue similar en las tres cepas (Tabla 8.4 en el Anexo). Y los únicos genes con una expresión significativamente diferente en las dos cepas RN^- respecto a la cepa RN^+ fueron los genes *Rv1182-Rv1183*, reprimidos, y los genes *Rv0097-Rv0098*, inducidos.

Como ya se ha comentado, en *M. tuberculosis* H37Rv Pasteur (utilizada en la obtención de la cepa $\Delta 76$), el gen que codifica la policétido sintasa Msl3 presenta una mutación sin sentido que lo divide en 2 ORFs (*Rv1180* y *Rv1181*), y es la causa de la deficiencia de PAT en esta cepa (Dubey *et al.*, 2002). La parada en la traducción del ORF *Rv1180* podría afectar a la unión de los ribosomas al mRNA del operón, disminuyendo su vida media. Esto podría explicar los bajos niveles de expresión de los siguientes ORFs del operón (*Rv1182-Rv1183*) detectados en las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$, en comparación con la cepa H37Rv ATCC 27294 que no presenta esta mutación. Por lo tanto, la represión de estos genes en las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$ probablemente no estaría relacionada con su fenotipo RN^- (ni con el fenotipo $PDIM^-$ de la cepa $\Delta 76$).

Por otra lado, los genes *Rv0097-Rv0098* que forman parte del operón *Rv0096-Rv0101* (Parish *et al.*, 2003; Hotter *et al.*, 2005), se han relacionado recientemente con la síntesis de PDIM y PGL (Hotter *et al.*, 2005). Estos autores aislaron de 2 librerías de mutantes por transposición de *M. bovis*, sendos mutantes avirulentos que presentaban el transposón insertado en el gen correspondiente al *Rv0097* de *M. tuberculosis*. Estos mutantes no sintetizaban PDIM ni PGL, por lo que los autores concluyeron que estos genes estaban implicados en la síntesis de dichos lípidos, quizá participando en la producción de los precursores de las cadenas ftiocerol y de los ácidos micocerósicos. Además probaron que, si bien la inserción del transposón afectaba negativamente a la expresión de los genes situados en 3', el gen *Rv0096* estaba inducido, lo que sugería la existencia de algún tipo de mecanismo de retroregulación (Hotter *et al.*, 2005). De forma similar, podríamos especular que las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$ podrían tener

alguna mutación en estos genes que afectara a la función de alguna de las proteínas Rv0096-Rv00101; y que ésta sería la causa de la deficiencia de PDIM y de la inducción de los genes *Rv0097-Rv0098* por retroregulación.

Sin embargo, la implicación de estos genes en la síntesis de PDIM y PGL no queda suficientemente clara en el trabajo de Hotter y colaboradores, ya que no demuestran que no haya otros transposones insertados en los mutantes, ni añaden pruebas adicionales que apoyen las posibles funciones de las proteínas codificadas o que relacionen las mutaciones con el fenotipo PDIM⁻ PGL⁻. Recientemente, un estudio ha mostrado que el factor sigma SigM de *M. tuberculosis* regula positivamente el operón *Rv0096-Rv0101*, mientras que reprime el operón de síntesis de PDIM-PGL (Raman *et al.*, 2006). Estos autores sugieren una explicación alternativa a la ausencia de PDIM-PGL en los mutantes de *M. bovis* del trabajo anterior. Proponen que el operón *Rv0096-Rv0101* sería responsable de la biosíntesis de un producto hipotético, que nada tendría que ver con los PDIM-PGL, el cual reprimiría la expresión de *sigM*. Así, en los mutantes de *M. bovis* la expresión de *sigM* estaría desreprimida, con lo que el factor sigma SigM reprimiría los genes de síntesis de PDIM-PGL, a la vez que induciría el gen *Rv0096* (Raman *et al.*, 2006). No obstante, en las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$ los niveles de expresión de *sigM* y de los genes del locus PDIM son similares a los de la cepa H37Rv (Tabla 8.4 en Anexo), por lo que la regulación de *sigM* por el producto de los genes *Rv0096-Rv0101* parece poco probable.

Aparte de la posible relación de estos genes con la síntesis de PDIM, no podemos descartar, como sugieren Raman y colaboradores, que estas proteínas sintetizen algún otro producto, y que éste pudiera estar implicado en la tinción con rojo neutro. En este caso, la ausencia de este compuesto hipotético en las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$ causaría el fenotipo RN⁻ y la inducción de los genes *Rv0097-Rv0098*. Pero tampoco podemos excluir que la diferente expresión de estos genes responda simplemente a diferencias entre las cepas H37Rv Pasteur y ATCC 27294, como sucede con los genes *Rv1182-Rv1183*. Esta última explicación probablemente sea también válida para los otros genes desregulados en la cepa $\Delta 76::Rv0576$ respecto a la cepa H37Rv ATCC 27294.

Por último hay que resaltar también la posibilidad de que no se hayan detectado los genes implicados en la tinción o en el fenotipo PDIM⁻ por problemas inherentes al análisis de la expresión global con microchips (ver apartado 8.3 en Anexo), o porque

este tipo de análisis no permite detectar mutaciones que no afecten a la expresión pero sí a la función proteica (como, por ejemplo, mutaciones puntuales). En cualquier caso, los resultados obtenidos no nos permiten extraer ninguna conclusión clara sobre la causa de los fenotipos RN⁻ y PDIM⁻ de las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$.

5.1.4. Reinterpretación de los resultados previos obtenidos en *M. smegmatis*

Otro aspecto que debemos tratar aquí es cómo reinterpretar la obtención, previa a este trabajo, de clones recombinantes de *M. smegmatis* Rv0577⁺ y RN⁺ (apartado 1.10.2.2 de la Introducción). En primer lugar, hay que resaltar el hecho de que la tinción con rojo neutro no parece ser una reacción específica, en el sentido de que no existe un único componente celular capaz de reducir y fijar el rojo neutro. Esta observación resulta evidente de los diferentes trabajos en que se intentó establecer el mecanismo de la tinción; ya que en todos los casos consiguieron aislar algún compuesto que unía el rojo neutro en su forma ácida: el peptidoglicano (Asselineau y Lederer, 1950), ácidos grasos (Kölbel, H., 1957), proteínas (Hirsch y Cattaneo, 1958) y, finalmente, el SL y fosfolípidos (Middlebrook *et al.*, 1959). Así mismo, el trabajo de Soto demostró que los diferentes lípidos purificados de *M. tuberculosis* H37Rv y H37Ra y de *M. smegmatis* retenían una cantidad comparable de rojo neutro y, por lo tanto, el resultado no era extrapolable a lo que sucedía en la célula completa (Soto, C. Y., 2002). Así pues, no todo compuesto capaz de fijar el rojo neutro en su forma ácida conferirá a la micobacteria el fenotipo RN⁺; es necesario también que esté adecuadamente situado y accesible, lo que depende a su vez de la arquitectura y composición de la envuelta celular, y determina, finalmente, la especificidad de la tinción de las células.

Con la experiencia acumulada a lo largo del presente trabajo, podemos pensar ahora que quizás *M. smegmatis* no era un buen huésped heterólogo para aislar los genes implicados en la tinción, puesto que la parte más externa de su envuelta celular difiere considerablemente de la de *M. tuberculosis*. Así, *M. smegmatis* no sintetiza SL, PAT, DAT ni PDIM; y produce, en cambio, grandes cantidades de glicopeptidolípidos, ausentes en la envuelta de *M. tuberculosis* (Ortalo-Magné *et al.*, 1996; Etienne *et al.*, 2005). En ambos microorganismos, los lípidos característicos de la especie se encuentran en la parte más externa de la pared celular junto con los más ubicuos fosfolípidos y PIM; mientras que el TDM se encuentra en capas más profundas (Ortalo-Magné *et al.*, 1996). En cambio, los TAG y TMM situados internamente en *M. tuberculosis*, se hallan más expuestos en *M. smegmatis* (Ortalo-Magné *et al.*, 1996).

Así mismo, la cápsula de *M. smegmatis* está formada principalmente por proteínas, mientras que en *M. tuberculosis* el componente mayoritario son polisacáridos. Además *M. tuberculosis* libera durante el crecimiento grandes cantidades de este material capsular al medio de cultivo, mientras que la cantidad liberada por *M. smegmatis* es mínima (Lemassu *et al.*, 1996; Ortalo-Magné *et al.*, 1995). Recientemente, un estudio ha comparado la envuelta celular de la cepa altamente transformable *M. smegmatis* mc²155 con la de la cepa parental ATCC 607, detectando ciertas diferencias (ausencia de lipooligosacáridos y de los glicopeptidolípidos más polares en mc²155, y algunas diferencias en la localización de varios glicolípidos y fosfolípidos), que se traducen en importantes cambios en las propiedades de la superficie celular (Etienne *et al.*, 2005). Este trabajo demuestra que pequeños cambios en la composición y estructura de la envuelta celular pueden tener importantes implicaciones a nivel celular. Por lo tanto, la envuelta celular de *M. smegmatis* difícilmente puede servir como modelo para estudiar la tinción de *M. tuberculosis*, y cualquier gen cuyo producto fuera capaz de localizarse apropiadamente en la envuelta y reducir el rojo neutro, conferiría el fenotipo RN⁺ a *M. smegmatis*.

Así pues, una posible explicación del fenotipo RN⁺ de los clones de *M. smegmatis* Rv0577⁺ sería que la proteína Rv0577 se acumulara en la parte externa de la envuelta celular de *M. smegmatis* y que tuviera algún tipo de actividad capaz de reducir el rojo neutro. La proteína Rv0577 presenta dos dominios conservados de enzimas relacionados con la lactoilglutación liasa (Blastp scores E-value=1x10⁻²¹ y 3x10⁻¹²). Estos enzimas pertenecen a una superfamilia de proteínas de funciones diversas, pero con un motivo común βαβββ que contiene 2 ó 3 sitios de coordinación de metales; estos iones metálicos participan directamente en la catálisis, actuando como electrófilos (Armstrong, R. N., 2000). Algunas de estas proteínas catalizan una reacción que implica la protonación de sus sustratos, por lo que se podría pensar que la proteína Rv0577 podría realizar de forma semejante la protonación del rojo neutro. En *M. tuberculosis* la proteína Rv0577 no sería la principal responsable de la tinción, ya que se halla en baja concentración y se localiza principalmente en el citoplasma y el sobrenadante de cultivos líquidos (Huard *et al.*, 2003). En cambio, en los clones recombinantes de *M. smegmatis* la proteína tal vez quedara retenida en la pared o la cápsula, de diferente composición y por lo tanto con unas características físico-químicas

distintas, quedando adecuadamente situada para interactuar con el colorante rojo neutro.

Dicho esto, no quisiera restarle importancia a *M. smegmatis* como huésped heterólogo para estudiar determinados aspectos de la biología de *M. tuberculosis*. Las ventajas son evidentes: presenta un crecimiento 6 veces más rápido (3 h-5 h de tiempo de duplicación frente a las 24 h de *M. tuberculosis*); se puede trabajar en un laboratorio de nivel de seguridad 2, incluso con clones recombinantes transformados con fragmentos del genoma de *M. tuberculosis* de hasta 40 kb (Bange *et al.*, 1999); es fácil y eficientemente transformable (Snapper *et al.*, 1990); y expresa eficazmente genes de otras micobacterias (Bashyam *et al.*, 1996). Los ejemplos en los que *M. smegmatis* ha sido un modelo útil son muchos y variados; así, se ha utilizado en diversos trabajos, incluyendo el presente, para analizar la expresión y regulación de genes (Santangelo *et al.*, 2002; Bagchi *et al.*, 2005; entre otros); ha permitido estudiar aspectos comunes de la fisiología de las micobacterias, como la síntesis de aminoácidos (Jackson *et al.*, 1996), la síntesis de LAM (Kaur *et al.*, 2006) o la captación de hierro (Fiss *et al.*, 1994); identificar nuevas dianas de fármacos (Banerjee *et al.*, 1994; Zimhony *et al.*, 2000); e incluso aislar un nuevo y prometedor fármaco antituberculoso, la diarilquinolona R207910 (TMC207 o J) (Andries *et al.*, 2005). Sin embargo, existen también diferencias entre *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, que se deben tener en consideración al escoger esta micobacteria saprófita como huésped heterólogo, y que no permiten extrapolar ciertas conclusiones (Barry, C. E. III, 2001b).

5.2. Los genes Rv0576-Rv0577 y la virulencia de *M. tuberculosis*

Los ensayos de virulencia en el modelo murino de infección por aerosol muestran que las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ son altamente atenuadas, tanto en los ratones inmunodeficientes SCID como en los ratones inmunocompetentes C57BL/6 (apartado 4.1.3).

La patogénesis de la tuberculosis es un proceso complejo, que depende tanto de componentes del huésped como de la bacteria. En este sentido, si bien es necesaria una respuesta inmune para controlar la infección, una respuesta excesiva provoca inmunopatogenicidad, favoreciendo el avance de la enfermedad. Así mismo, el crecimiento bacteriano en ausencia de respuesta inmune puede causar importantes daños tisulares, y una rápida y fatal progresión de la tuberculosis. Esto último sucedería en los

ratones SCID, que carecen de las células efectoras de la respuesta inmune específica. Los resultados obtenidos en este modelo indicarían que las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ presentan un defecto en el crecimiento *in vivo* y/o son eficientemente controladas por la respuesta inmune innata, durante las primeras 8 semanas posinfección; mientras que los ratones infectados con la cepa salvaje sucumben rápidamente a la infección a partir de la tercera semana, acusando claramente la ausencia de inmunidad específica.

Estas observaciones se ven respaldadas por los resultados en los ratones C57BL/6. La infección por aerosol de ratones inmunocompetentes con *M. tuberculosis* resulta en un progresivo aumento del número de bacterias en los pulmones, alcanzando un máximo a las 3 ó 4 semanas coincidiendo con el desarrollo de la inmunidad específica (Flynn, J. L., 2006). La infección también se disemina a otros órganos como el bazo, a partir de las 2 semanas. Tras el periodo inicial de infección aguda, el número de bacterias permanece estable durante meses gracias al desarrollo de la respuesta inmune específica, pero se produce una lenta y progresiva respuesta patológica que, finalmente, resultará en la muerte del animal (Flynn, J. L., 2006). Este patrón se observó perfectamente en los ratones infectados con la cepa salvaje (Fig. 4.9). Mientras que, en los ratones infectados con las cepas mutantes, el número de bacterias en pulmón a las 3 semanas posinfección fue mucho menor, reflejando de nuevo un defecto en la multiplicación de estas cepas *in vivo* y/o un más efectivo control por parte de la respuesta inmune innata. Así mismo, el número de bacterias de las cepas mutantes aumentó en la semana 9 para luego estabilizarse, manteniéndose en todo momento una carga bacilar inferior que en los ratones infectados con la cepa salvaje. Estos resultados indican un cierto retraso en el desarrollo de la respuesta inmune específica pero un más efectivo control y/o un defecto en el crecimiento *in vivo* de las cepas mutantes también durante la fase de persistencia.

En este sentido, el análisis de la respuesta inmune específica mostró unos niveles inferiores de IFN- γ y de iNOS en los ratones infectados con las cepas mutantes (Fig. 4.10), lo que denota una débil respuesta inmune pero se traduce a su vez en una menor infiltración y, por lo tanto, en una menor histopatología (Fig. 4.11 y 4.12). En realidad, varios estudios sugieren que la respuesta inmune en ratones, en condiciones normales, es más fuerte de lo necesaria (Flynn, J. L., 2006). La menor inducción de la respuesta inmune específica en los ratones infectados con las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ podría ser consecuencia del menor número de bacilos y, por lo tanto, de una menor

estimulación inmune, o bien de algún tipo de efecto inmunosupresor. Igualmente son de destacar los elevados niveles de TNF- α en los ratones infectados con la cepa $\Delta 77$, y de la quimioquina RANTES en los infectados con ambas cepas mutantes (Fig. 4.10). Estas dos moléculas son importantes en la formación y el mantenimiento de los granulomas, y su mayor expresión probablemente explique la estructura compacta y localizada de los pocos granulomas hallados en los pulmones de los ratones infectados con las cepas mutantes (Fig. 4.11). Esta contención bacilar en los pulmones resultaría también en una menor diseminación broncogena y, por lo tanto, en el bajo número de bacterias recuperadas en los lavados broncoalveolares (Fig. 4.9). Por otra parte, no parece que estas cepas presenten un defecto en la diseminación ya que el menor número de bacilos en bazo en la semana 3 es proporcional al descenso en el número de bacterias en pulmón; aunque el defecto en el crecimiento se produce también en este órgano, ya que la carga bacilar es menor que en los ratones infectados con la cepa salvaje, durante todo el experimento (Fig. 4.9).

Varios trabajos indican que la proteína Rv0577 estimula la producción de IL-10 y que activa las células de la respuesta inmune innata vía TLR-2 (Huard *et al.*, 2003; Ho, J. L., 2005). La IL-10, producida por los macrófagos y las células T durante la infección, inhibe la producción de IL-12 y, en consecuencia, la de IFN- γ . Así mismo inhibe la activación de los macrófagos en respuesta al IFN- γ , incluyendo la producción de iNOS (Flynn y Chan, 2001). Por lo tanto, la inducción de la producción de IL-10 podría ser responsable de la menor expresión de IFN- γ e iNOS en los ratones infectados con la cepa $\Delta 76$, en la que la producción de Rv0577 está inducida; pero no explicarían la respuesta de los ratones infectados con la cepa $\Delta 77$, deficiente en esta proteína.

Por lo tanto, ¿la atenuación de las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ es debida a las mutaciones en los genes *Rv0576-Rv0577* o es causada por las mutaciones RN^- y/o $PDIM^-$? El fenotipo prácticamente idéntico de las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ abogarían más por lo segundo, es decir, respondería a unas mutaciones comunes, las responsables de los fenotipos RN^- y $PDIM^-$. Esta conclusión estaría respaldada también por los ensayos de virulencia con la cepa $\Delta 76::Rv0576$, en la que se restablece la síntesis del regulador plenamente funcional (como prueba la represión del gen *Rv0577* detectada con el análisis por microchips) y, sin embargo, no se recupera en ninguna medida la virulencia, ni en los ratones inmunocompetentes ni en los inmunodeprimidos (Fig. 4.17 y 4.18). De nuevo se podría

pensar que la menor expresión del gen *Rv0577* en la cepa $\Delta 76::Rv0576$ resultaría en un fenotipo similar al del mutante $\Delta 77$, por lo que habría sido interesante disponer de los resultados de virulencia de la cepa $\Delta 77::Rv0577$. Lo que está claro es que la deficiencia de PDIM en estas cepas debe contribuir, al menos en parte, a su atenuación, ya que varios trabajos han mostrado que los mutantes en estos lípidos son atenuados (Camacho *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 1999; Rousseau *et al.*, 2004; Cardona *et al.*, 2006). Sin embargo, los mutantes PDIM son menos atenuados que las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$, y el defecto en el crecimiento se produce especialmente durante la fase de infección aguda y en pulmón. Por tanto, las otras mutaciones presentes en las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ (RN^- y/o las deleciones de los genes *Rv0576-Rv0577*, sumado a la ausencia de PAT) estarían contribuyendo también a su atenuación.

5.3. Variación fenotípica de la tinción con rojo neutro y de la síntesis de PDIM

5.3.1. Tinción con rojo neutro

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que, a partir de un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, se podían aislar con cierta frecuencia mutantes espontáneos RN^- . Puesto que anteriormente no se había observado este fenómeno en la cepa cultivada en el laboratorio, existía la posibilidad de que estos mutantes se produjeran como consecuencia de la electroporación, la cual podría inducir un cierto estrés celular con el consiguiente aumento en la tasa de mutación. Para explorar esta hipótesis, se compararon el número de mutantes RN^- aislados directamente de un cultivo y tras la electroporación, con o sin DNA (apartado 4.4.1). En las 3 condiciones estudiadas se aislaron clones RN^- con una frecuencia similar (del 2 al 16%), lo que sugería que se trataba de un proceso independiente de la electroporación. Aún así, resulta sorprendente que en la obtención de las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$, los 2 únicos transformantes recombinantes simples aislados fueran RN^- , y que en la reconstrucción de estas cepas, en que se partió de una única colonia aislada RN^+ , 9 de 16 transformantes fueran RN^- ; es decir, la aparición de clones RN^- se produjo con unas tasas mayores que las observadas en el experimento anterior.

El estudio de la estabilidad de los fenotipos rojo neutro a partir de colonias aisladas del cultivo de *M. tuberculosis* mostró que la frecuencia de aparición de mutantes RN^- era muy baja, de hecho, no detectamos ningún mutante RN^- en el análisis de casi 500 clones procedentes de 4 colonias RN^+ (Tabla 4.4). Por tanto, la frecuencia

Discusión

de clones RN⁻ observada en el experimento anterior (del 2 al 16%) era probablemente el resultado de una lenta acumulación de mutantes en las sucesivas resiembras que ha sufrido la cepa en el laboratorio. En cambio, sí se detectaron clones RN⁺ procedentes de clones RN⁻, lo que demuestra que el proceso es reversible. Esto respalda la hipótesis de que el carácter RN⁺ de la cepa $\Delta 76$ (pSUM36+76+77) se debía a una reversión de la mutación (o a una mutación compensatoria), más que a la complementación con los genes *Rv0576-Rv0577*.

Estos resultados explicarían por qué existe la idea de que la tinción es estable durante años en *M. tuberculosis* H37Rv (Soto *et al.*, 2002; Cardona *et al.*, 2006). A pesar de producirse mutantes RN⁻ (como demuestra nuestro trabajo), la población mayoritaria en un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv sigue siendo RN⁺. Los mutantes RN⁻ pasan desapercibidos, ya que la tinción se realiza sobre gran cantidad de células no procedentes de colonias aisladas. De hecho, en otras cepas de *M. tuberculosis* se ha observado una disminución en la intensidad de la tinción (Soto *et al.*, 2002). Y un caso extremo es la cepa MT103, la cual pierde completamente la capacidad de teñirse con 5 ó 6 resiembras, y cuyo fenotipo RN⁻ se ha asociado con la ausencia simultánea de SL y PDIM (Cardona *et al.*, 2006).

Pero ¿cuál o cuáles son las mutaciones responsables del fenotipo RN⁻? Para intentar responder a esta pregunta, comparamos la expresión global de una cepa RN⁻ (C32) con la de 3 cepas RN⁺ (C27, C49 y H37Rv) (apartado 4.4.3). Observamos que había 4 genes desregulados: el gen *Rv3706c*, reprimido 2,5 veces en la cepa RN⁻ y que codifica una proteína de función desconocida; el gen *Rv2452c* inducido 2,8 veces y que codifica también una proteína de función desconocida; y los genes *Rv3160c-Rv3161c*, inducidos 3,7 y 4,9 veces.

El gen *Rv3161c* codifica una posible dioxigenasa, un tipo de enzima que puede hidrolizar compuestos aromáticos por hidroxilación. Varios trabajos han mostrado que la expresión de este gen se induce en respuesta a determinados fármacos bencénicos, lo que respalda la probable actividad dioxigenasa de la proteína *Rv3161c* y sugiere que podría constituir un nuevo sistema de detoxificación de *M. tuberculosis* (Betts *et al.*, 2003; Waddell *et al.*, 2004; Boshoff *et al.*, 2004). Este gen muy probablemente forme un operón con el gen *Rv3160c*, ya que la distancia intergénica es de tan sólo 11 pb y ambos genes están coinducidos en presencia de los fármacos bencénicos (Betts *et al.*, 2003; Waddell *et al.*, 2004). El gen *Rv3160c* codifica un posible regulador

transcripcional de la familia TetR, familia que en muchos casos se ha asociado con la regulación de sistemas de resistencia a antibióticos y de detoxificación (Ramos *et al.*, 2005) por lo que podría controlar la expresión de la dioxigenasa en respuesta a compuestos tóxicos. La secuenciación del gen *Rv3160c* en la cepa C32 reveló una mutación de G a A en el nucleótido 337, que resultaba en el cambio del aminoácido 113 aspártico por asparagina (resultados no mostrados). Este cambio tal vez afecte a la funcionalidad del regulador *Rv3160c*, resultando en la desrepresión del operón *Rv3160c-Rv3161c*. Teniendo en cuenta la probable actividad dioxigenasa de la proteína *Rv3161c*, podría ser que esta proteína, sobreproducida en la cepa C32, modificara químicamente el colorante rojo neutro retenido por la célula, resultando en el fenotipo RN^- de esta cepa.

Sin embargo, la expresión de los genes *Rv3160c-Rv3161c* en las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$ era similar a la de la cepa H37Rv (resultados no mostrados) por lo que, al menos en estas cepas, no estarían relacionados con el fenotipo RN^- . Considerando la “inespecificidad” de la tinción y los diferentes factores que pueden afectar a la reacción, cabe la posibilidad de que diferentes mutaciones resulten en un mismo fenotipo RN^- ; así como que los casos de reversión a RN^+ sean también debidos a diferentes cambios.

5.3.2. Síntesis de PDIM

El hecho que las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ fueran deficientes en PDIM, habiéndose demostrado que nada tiene que ver con el fenotipo RN^- ni con las mutaciones en los genes *Rv0576-Rv0577*, revelaba que también se podían producir mutantes espontáneos $PDIM^-$. Las cepas $\Delta 76$ y $\Delta 77$ derivaban de sendos clones $PDIM^+$ ($H37Rv::p1NIL\Delta 76gm$ y $H37Rv::p1NIL\Delta 77gm$) tras 2 resiembras en medio sólido, por lo que en este caso no se planteaba la posibilidad de que fuera consecuencia de la electroporación. Así, de 16 clones aislados directamente del cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv 13 fueron mutantes en la síntesis de PDIM, y se aislaron 5 clones $PDIM^-$ de 8 procedentes de la electroporación. Estos resultados indicaban que la mayoría de las células del cultivo de *M. tuberculosis* eran deficientes en PDIM. Esto explicaría la baja cantidad de PDIM extraída de la cepa H37Rv mantenida en el laboratorio, en comparación con los extractos de la mayoría de los clones recién aislados (Fig 4.21). Así mismo, estos resultados reafirmaban una vez más la ausencia de relación entre la

síntesis de estos lípidos y la tinción con rojo neutro, ya que se aislaron clones RN⁺ sin y con PDIM, y clones RN⁻ sin y con PDIM.

El posterior análisis de 25 clones procedentes de 1 clon PDIM⁺ y 75 clones procedentes de 3 clones PDIM⁻, no permitió detectar ningún nuevo mutante PDIM⁻ ni ninguna reversión a PDIM⁺. Esto sugiere que la elevada frecuencia de mutantes PDIM⁻ en el cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv sería el resultado de su lenta acumulación al mantener la cepa en el laboratorio.

Como ya se ha comentado, en la cepa Δ 76 la expresión de los genes del operón de síntesis de PDIM era comparable a la de la cepa H37Rv, y los únicos genes desregulados que se han relacionado en cierto modo con la síntesis de PDIM eran los genes *Rv0097-Rv0098*. En cambio cuando se comparó el transcriptoma de las cepas PDIM⁻ C27 y C32 con las cepas PDIM⁺ C49 y H37Rv, se observó que la expresión del gen *mas* era significativamente menor (apartado 4.4.3). Por lo tanto, la deficiencia en la síntesis de PDIM de las cepas C27 y C32 muy probablemente sea debida a la menor expresión del gen *mas*.

Otros autores han observado también la aparición espontánea y frecuente de mutantes en la síntesis de PDIM durante la obtención o el aislamiento de mutantes en otros genes no relacionados (Domenech *et al.*, 2004; Manjunatha *et al.*, 2006). En uno de estos trabajos, en que aislaban mutantes resistentes al fármaco PA-824, secuenciaron el genoma de 5 mutantes (por secuenciación comparativa con microchips de oligonucleótidos) y 3 de ellos presentaban mutaciones en el locus PDIM (2 con delecciones diferentes y el tercero con una mutación puntual en *fadD26*) que nada tenían que ver con la resistencia al PA-284 (Manjunatha *et al.*, 2006). Estos autores sugieren que la elevada frecuencia de mutantes PDIM⁻ podría ser debida a la gran capacidad codificante requerida para la síntesis de estos lípidos.

El locus PDIM parece contener todos los genes necesarios para la síntesis de estos lípidos excepto, tal vez, para la de los precursores del ftiocerol y de los ácidos micocerósicos (revisado en Onwueme *et al.*, 2005). Resulta por tanto sospechoso, el elevado número de mutantes en otras poliketido sintasas (Pks15/1, Pks10, Pks12, Pks7 y Pks11) cuyo fenotipo PDIM⁻ se ha relacionado con la implicación de estas proteínas en la síntesis de PDIM, sin mayores comprobaciones ni complementaciones (revisado en Onwueme *et al.*, 2005). Así, en el caso de la Pks15/1, se ha demostrado que interviene

únicamente en la síntesis de la cadena fenolftiocerol de los PGL (Constant *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2004), por lo que el mutante Pks15/1 deficiente en PDIM probablemente tuviera otra mutación causante del fenotipo PDIM⁻. También se ha cuestionado la relación de la Pks12 con la síntesis de PDIM ya que otro grupo obtuvo (y complementó) un mutante en este gen y sintetizaba normalmente PDIM, mientras que era deficiente en manosil-β-1-fosfomicótidos (Matsunaga *et al.*, 2005).

Estas observaciones y los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que los mutantes PDIM⁻ aparecen espontáneamente y pueden acumularse en la población hasta representar incluso el fenotipo mayoritario. Por lo tanto, antes de realizar estudios de virulencia de cualquier nuevo mutante de *M. tuberculosis*, es aconsejable analizar la síntesis de PDIM, ya que la deficiencia en estos lípidos resulta en la atenuación de *M. tuberculosis*.

5.4. La tinción con rojo neutro y la envuelta celular

De la bibliografía así como del presente trabajo se deduce que, si bien los diferentes lípidos de la envuelta de *M. tuberculosis* no estarían directamente relacionados con la tinción con rojo neutro, la composición y la estructura de la envuelta celular son importantes para que se produzca la tinción. En este sentido, recientemente se ha publicado un trabajo (con la participación de esta doctoranda) en el que se analiza el fenotipo rojo neutro de varios mutantes deficientes en uno o más de los lípidos libres de la pared (Cardona *et al.*, 2006). Así, se estudiaron varios mutantes en la síntesis o el transporte de PDIM de la cepa MT103 y una cepa complementada en la que se restituye el transporte de PDIM, sendos mutantes de la cepa H37Rv deficiente uno en la síntesis de PDIM y en la síntesis de SL el otro, y las cepas salvajes H37Rv y MT103 (SL⁻). Los diferentes mutantes PDIM⁻ de la cepa MT103, y por lo tanto PDIM⁻ SL⁻, fueron todos RN⁻, restableciéndose el fenotipo RN⁺ en la cepa complementada; mientras que aquellas cepas deficientes en uno solo de estos lípidos (MT103, H37Rv SL⁻, H37Rv PDIM⁻) eran RN⁺ (Cardona *et al.*, 2006). Por lo tanto, sólo aquellas cepas deficientes tanto en PDIM como en SL eran RN⁻. Esta conclusión estaría de acuerdo con el hecho de que la cepa MT103 pierde simultáneamente la capacidad de sintetizar PDIM y de teñirse (Cardona *et al.*, 2006).

Un trabajo publicado recientemente aportaría una explicación interesante a los resultados observados en el estudio de Cardona y colaboradores (Jain *et al.*, 2007). En

Discusión

este trabajo concluyen que la síntesis de PDIM y SL está controlada por la disponibilidad de un precursor común, el metilmanolil-CoA (Jain *et al.*, 2007). Así demuestran que los mutantes en la síntesis de PDIM (en los que se acumularía metilmalonil-CoA) producen SL de mayor longitud y en mayor cantidad (2 ó 3 veces superior) que la cepa salvaje. Mientras que, la abolición de la síntesis de SL no afecta a la síntesis de PDIM, probablemente porque los SL son mucho menos abundantes y su ausencia no afectaría significativamente al *pool* de metilmalonil-CoA celular (Jain *et al.*, 2007). En este contexto y en relación con la tinción con rojo neutro podríamos especular que en los mutantes SL^- la tinción no se vería afectada porque se trata de un lípido poco abundante, por lo que su deficiencia no alteraría suficientemente la estructura la envuelta celular. En el caso de los mutantes $PDIM^-$ serían RN^+ porque el mecanismo compensatorio en la síntesis de SL conseguiría mantener una correcta arquitectura de la envuelta celular y, por lo tanto, la tinción no se vería afectada. En cambio, en los mutantes $PDIM^- SL^-$ no existiría este mecanismo compensatorio, lo que resultaría en una envuelta celular considerablemente alterada y en la tinción RN^- de estas cepas.

Además, en el trabajo de Cardona y colaboradores también se sugiere que la cepa avirulenta H37Ra, que sí sintetiza PDIM, sería RN^- por la ausencia simultánea de SL y PAT en su envuelta celular (Cardona *et al.*, 2006). Otros trabajos apoyan también el papel estructural de las PAT y el SL en la tinción. Así, los mutantes *phoP* y *phoPR*, deficientes en la síntesis de estos glicolípidos y de DAT, son RN^- , restableciéndose el fenotipo RN^+ en las cepas complementadas (Gonzalo Asensio *et al.*, 2006). Esto también explicaría que un mutante en el gen *mmpL8*, deficiente en SL, fuera RN^- (Domenech *et al.*, 2004) a diferencia del mutante *pks2* analizado por nosotros (Andreu *et al.*, 2004a). El mutante *mmpL8* se construyó sobre la cepa H37Rv Pasteur y sería por lo tanto deficiente también en la síntesis de PAT.

Estas observaciones indican que los lípidos libres PDIM, SL y PAT estarían implicados en la tinción con rojo neutro de *M. tuberculosis*. Sin embargo, esta relación sería meramente estructural, en vista de los resultados del presente trabajo en que se ha demostrado que el fenotipo rojo neutro es independiente de la síntesis de estos lípidos.

6. Conclusiones

1. El gen *Rv0576* codifica un regulador transcripcional que reprime la expresión del operón *Rv0576-Rv0577*, no habiéndose detectado otros genes regulados.
2. Los genes *Rv0576* y *Rv0577* no están implicados en la tinción con rojo neutro de *M. tuberculosis*.
3. El gen *Rv0576* no parece ser necesario para la virulencia de *M. tuberculosis* en el modelo de infección murino.
4. La utilización de *M. smegmatis* como huésped heterólogo de *M. tuberculosis* debería limitarse a procesos fisiológicos comunes, comprobándose siempre los resultados en el microorganismo original.
5. *M. tuberculosis* H37Rv forma poblaciones celulares heterogéneas en cuanto al fenotipo rojo neutro y a la síntesis de PDIM.
6. Los mutantes espontáneos RN^- reversionan al fenotipo RN^+ original, manteniendo una población de células mayoritariamente RN^+ .
7. La aparición de mutantes en la síntesis de PDIM es un proceso frecuente en *M. tuberculosis*, no habiéndose detectado el proceso contrario. Estos mutantes se acumulan en sucesivas resiembras, hasta convertirse en la población mayoritaria.
8. Teniendo en cuenta la relación de la tinción con rojo neutro y de los PDIM con la virulencia de *M. tuberculosis*, y la elevada frecuencia con que se aíslan mutantes en estos caracteres, sería importante comprobar los fenotipos rojo neutro y PDIM antes de estudiar la virulencia de una determinada cepa o mutante de *M. tuberculosis*.
9. La tinción con rojo neutro de *M. tuberculosis* es un proceso complejo que depende de diversos factores, incluyendo una adecuada composición y estructura de la envuelta celular.

7. Bibliografía

Agger, E. M., and Andersen, P. 2002. A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine* **21**:7-14.

Aínsa, J.A., Martín, C., Cabeza, M., De la Cruz, F. and Mendiola, M. V. 1996. Construction of a family of *Mycobacterium/Escherichia coli* shuttle vectors derive from pAL5000 and pACYC184: their use for cloning an antibiotic-resistance gene from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene* **176**:23-26.

Alteri, C. J., Xicohténcatl-Cortes, J., Hess, S., Caballero-Olín, G., Girón, J. A., and Friedman, R. L. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:5145-5150.

Andersen, P., and T. M. Doherty. 2005. The success and failure of BCG-implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:656-662.

Andreu, N., Gibert, I., Luquin, M., Kolattukudy, P. E., and Sirakova, T. 2004a. Neutral red cell staining of sulfolipid-deficient *Mycobacterium tuberculosis pks2* mutant proves that sulfolipids are not responsible for this cytochemical reaction. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1379-1380.

Andreu, N., Soto, C. Y., Roca, I., Martin, C., and Gibert, I. 2004b. *Mycobacterium smegmatis* displays the *Mycobacterium tuberculosis* virulence-related neutral red character when expressing the *Rv0577* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**:283-289.

Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Gohlmann, H. W., Neefs, J. M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N., and Jarlier, V. 2005. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **307**:223-227.

Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., and Domínguez, L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1785-1789.

Armstrong, R. N. 2000. Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry* **39**:13625-13632.

Bibliografía

Asselineau, J., et Lederer, E. 1950. Sur des différences chimiques entre des souches virulentes et non virulentes de *Mycobacterium tuberculosis*. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **230**:142-144.

Atrazhev, A. M., and Elliot, J. F. 1996. Simplified desalting of ligation reactions immediately prior to electroporation into *E. coli*. *BioTechniques* **21**:1024.

Aufderheide, A. C., and Rodríguez-Martín, C. 1998. Tuberculosis. In: *The Cambridge encyclopedia of human paleopathology*, pp. 118-140. Cambridge: Cambridge University Press.

Bacon, J., James, B. W., Wernisch, L., Williams, A., Morley, K. A., Hatch, G. J., Mangan, J. A., Hinds, J., Stoker, N. G., Butcher, P. D., and Marsh, P. D. 2004. The influence of reduced oxygen availability on pathogenicity and gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **84**:205-217.

Bagchi, G., Chauhan, S., Sharma, D., and Tyagi, J. S. 2005. Transcription and autoregulation of the *Rv3134c-devR-devS* operon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **151**:4045-4053.

Banerjee, A., Dubnau, E., Quenard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., and Jacobs, W. R. Jr. 1994. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**:227-230.

Bange, F-C, Collins, F. M., and Jacobs, W. R. Jr. 1999. Survival of mice infected with *Mycobacterium smegmatis* containing large DNA fragments from *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber. Lung Dis.* **79**:171-180.

Barry, C. E. III. 2001a. Interpreting cell wall “virulence factors” of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* **9**:237-241.

Barry, C.E. III. 2001b. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? Response from Barry III. *Trends Microbiol.* **9**:473-474.

Bashyam, M. D., Kaushal, D., Dasgupta, S. K., and Tyagi, A. K. 1996. A study of the mycobacterial transcriptional apparatus: identification of novel features in promoter elements. *J. Bacteriol.* **178**:4847-4853.

Behr, M. 2002. BCG-different strains, different vaccines? *Lancet Infect. Dis.* **2**:86-92.

- Benabdesselem, C., Fathallah, D. M., Huard, R. C., Zhu, H., Jarboui, M. A., Dellagi, K., Ho, J. L., and Barbouche, R. M.** 2006. Enhanced patient serum immunoreactivity to recombinant *Mycobacterium tuberculosis* CFP32 produced in the yeast *Pichia pastoris* compared to *Escherichia coli* and its potential for serodiagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3086-3093.
- Besra, G. S.** 1998. Preparation of Cell-Wall Fractions from Mycobacteria. In *Mycobacteria Protocols*, pp. 91-107. Edited by T. Parish and N. G. Stoker. *Humana Press, Totowa*.
- Betts, J. C., Lukey, P. T., Robb, L. C., McAdam, R. A., and Duncan, K.** 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol. Microbiol.* **43**:717-371.
- Betts, J. C., McLaren, A., Lennon, M. G., Kelly, F. M., Lukey, P. T., Blakemore, S. J., and Duncan, K.** 2003. Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thiolactomycin-, and triclosan-treated *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2903-2913.
- Bhatt, K., Gurcha, S. S., Bhatt, A., Besra, G. S., and Jacobs, W. R. Jr.** 2007. Two poliketide-synthase-associated acyltransferases are required for sulfolipid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **153**:513-520.
- Birboim, H. C., and Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
- Bloch, H.** 1950. Enzymatic characteristics of suspensions of different *Mycobacteria*. *Am Rev Tuberc* **61**:270-271.
- Bloom, B. R., and Murray, C. J. L.** 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* **257**:1055-1064.
- Blumberg, H. M., Leonard, M. K., and Jasmer, R. M.** 2005. Update on the treatment of tuberculosis and latent tuberculosis infection. *JAMA* **293**:2776-2784.
- Bocchino, M. D., Sanduzzi, G. A., Colizzi, V., Brunetti, E. and Mancino, G.** 2005. Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **9**:375-383.
- Boshoff, H. I., Myers, T. G., Copp, B. R., McNeil, M. R., Wilson, M. A., and Barry, C. E. III.** 2004. The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to

inhibitors of metabolism. Novel insights into drug mechanisms of action. *J. Biol. Chem.* **279**:40174-40184.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

Brennan, P. J. and Nikaido, H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:29-63.

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

Brisse, S., Supply, P., Brosch, R., Vincent, V., and Gutierrez, M. C. 2006. "A re-evaluation of *M. prototuberculosis*": continuing the debate. *PLoS Pathog.* **2**:e95.

Brodin, P., Demangel, C., and Cole, S. T. 2005. Introduction to Functional Genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 143-153. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington.*

Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D., and Cole, S. T. 2002 A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:3684-3689.

Brosch, R., Gordon, S. V., Garnier, T., Eiglmeier, K., Frigui, W., Valenti, P., Dos Santos, S., Duthoy, S., Lacroix, C., Garcia-Pelayo, C., Inwald, J. K., Golby, P., Nuñez Garcia, J., Hewinson, R. G., Behr, M. A., Quail, M. A., Churcher, C., Barrell, B. G., Parkhill, J., and Cole, S. T. 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:5596-5601.

Busenlehner, L. S., Penella, M. A., and Giedroc, D. P. 2003. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:131-143.

- Camacho, L. R., Ensergueix, D., Pérez, E., Gicquel, B., and Guilhot, C.** 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **34**:257-267.
- Camus, J-C., Pryor, M. J., Médigue, C., and Cole, S. T.** 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* **148**:2967-2973.
- Canci, A., Minozzi, S., and Tarli, S. M. B.** 1996. New evidence of tuberculosis spondylitis from Neolithic Liguria (Italy). *Int. J. Osteoarcheol.* **6**:497-501.
- Cardona, P-J.** 2006. RUTI: A new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis* **86**:273–289.
- Cardona, P-J, Soto, C. Y., Martín, C., Gicquel, B., Agustí, G., Andreu, N., Guirado, E., Sirakova, T., Kolattukudy, P., Julián, E., and Luquin, M.** 2006. Neutral-red reaction is related to virulence and cell wall methyl-branched lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* **8**:183-190.
- Cole, S. T.** 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* **148**:2919–2928.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E. III, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., and Barrell, B. G.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**:537-544.
- Constant, P., Pérez, E., Malaga, W., Laneelle, M-A., Saurel, O., Daffé, M., and Guilhot, C.** 2002. Role of the *pks15/1* gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbour a frameshift mutation in the *pks15/1* gene. *J. Biol. Chem.* **277**:38148-38158.
- Cosma, C. L., Sherman, D. R., and Ramakrishnan, L.** 2003. The secret lives of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:641-676.

Cousins, D. V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D. M., Butler, W. R., Dawson, D., Rodriguez, D., Loureiro, J., Romano, M. I., Alito, A., Zumarraga, M., and Bernardelli, A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1305-1314.

Cox, J. S., Chen, B., McNeil, M., and Jacobs Jr, W. R. 1999. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* **402**:79-83.

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

Daffé, M., and Ettienne, G. 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber. Lung Dis.* **79**:153-169.

Dahl, J.L., Kraus, C.N., Boshoff, H.I.M., Doan, B., Foley, K., Avarbock, D., Kaplan, G., Mizrahi, V., Rubin, H., and Barry, C.E. III. 2003. The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**:10026-10031.

Daniel, T. M. 2000. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **4**:395–400.

Daniel, T. M. 2005. Selman Abraham Waksman and the discovery of streptomycin. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **9**:120-122.

Deretic, V. 2006. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr. Opin. Microbiol.* **18**:375-382.

Deretic, V., Singh, S., Master, S., Harris, J., Roberts, E., Kyei, G., Davis, A., de Haro, S., Naylor, J., Lee, H-H, and Vergne, I. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell. Microbiol.* **8**:719-727.

Desbordes, J. 1953. Mise en évidence *in vitro* de la “non virulence“ de germens A. A. R. par une réaction au bleu de nil. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **83**:809-810.

- Desbordes, J., et Fournier, E.** 1950. Contribution a l'étude de la physiologie des bacilles acido-alcoolo-résistants. II.- L'équipement enzymatique. La virulence et les indicateurs colorés de rH. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **79**:210-212.
- Desbordes, J., et Fournier, E.** 1954. Action des substances colorantes sur les mycobactéries. I.- Colorants basiques. Étude de la cinétique de la réaction. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **86**:657-660.
- Desbordes, J., Fournier, E., et Alix, D.** 1955a. Action des substances colorantes sur les Mycobactéries. III. Colorants basiques (suite). Influence du lavage préalable avec différents solvants des lipides. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **88**:240-243.
- Desbordes, J., Fournier, E., et Alix, D.** 1955b. Action des substances colorantes sur les Mycobactéries. II- Colorants basiques (suite). Influence du pH. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **88**:120-124.
- Dobson, G., Minnikin, C. E., Minnikin, S. M., Parlett, J. H., and Goodfellow, M.** 1985. Systematic Analysis of Complex Mycobacterial Lipids. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, vol. 1, pp. 237-265. Edited by M. Goodfellow and D. E. Minnikin. *Academic Press, London, United Kingdom*.
- Domenech, P., Reed, M. B., Dowd, C. S., Manca, C., Kaplan, G., and Barry, C. E III.** 2004. The role of MmpL8 in sulfatide biogenesis and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **279**:21257-21262.
- Draghici, S., Khatri, P., Eklund, A. C., and Szallasi, Z.** 2006. Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet.* **22**:101-109.
- Draper, P.** 1998. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front. Biosci.* **3**:1253-1261.
- Draper, P., and Daffé, M.** 2005. The Cell Envelope of *Mycobacterium tuberculosis* with Special Reference to the Capsule and Outer Permeability Barrier. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 261-273. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington*.
- Dubey, V. S., Sirakova, T. D., and Kolattukudy, P. E.** 2002. Disruption of *msl3* abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation. *Mol. Microbiol.* **45**:1451-1459.

Dubos, R. J., and Middlebrook, G. 1948. Cytochemical reaction of virulent tubercle bacillus. *Am Rev Tuberc* **58**:698-699.

Duncan, K. 2003. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis* **83**:201-207.

Dussurget, O., Timm, J., Gomez, M., Gold, B., Yu, S., Sabol, S. Z., Holmes, R. K., Jacobs Jr., W. R. and Smith, I. 1999. Transcriptional control of the iron-responsive *fxbA* gene by the mycobacterial regulator IdeR. *J. Bacteriol.* **181**:3402-3408.

Eddine, A. N., Baumann, S., and Kaufmann, S. H. E. 2006. New tuberculosis vaccines approaching clinical trial - An overview. *Drug Discov. Today Therap. Strat.* **3**:113-119.

Espinal, M. A. 2003. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis* **83**:44-51.

Etienne, G., Laval, F., Villeneuve, C., Dinadayala, P., Abouwarda, A., Zerbib, D., Galamba, A., and Daffé, M. 2005. The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc²155: is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiology* **151**:2075-2086.

Eutzéby, P. J. 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:590-592. (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Actualizado en Marzo de 2007. <http://www.bacterio.net>).

Fenton, M. J., Riley, L. W., and Schlesinger, L. 2005. Receptor-Mediated Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by Host Cells. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 405-426. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington*.

Fernando, S. L., and Britton, W. J. 2006. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunol. Cell Biol.* **84**: 125–137.

Fisher, M. A., Plikaytis, B. B., and Shinnick, T. M. 2002 Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J. Bacteriol.* **184**:4025-4032.

Fiss, E. H., Yu, S., and Jacobs, W. R. Jr. 1994. Identification of genes involved in the sequestration of iron in mycobacteria: the ferric exochelin biosynthetic and uptake pathways. *Mol. Microbiol.* **14**:557-569.

- Flynn, J. L.** 2004. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis* **84**:93-101.
- Flynn, J. L.** 2006. Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbes Infect.* **8**:1179-1188.
- Flynn, J. L., and Chan, J.** 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:93-129.
- Flynn, J. L., and Chan, J.** 2005. What's good for the host is good for de bug. *Trends Microbiol.* **13**:98-102.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**:497-509.
- Forbes, B. A., Pfyffer, G., and Eisenach, K. D.** 2005. Molecular Diagnosis of Mycobacterial Infections. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 85-98. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington.*
- Formicola, V., Milanesi, Q., and Scarsini, C.** 1987. Evidence of spinal tuberculosis at the beginning of the fourth millennium BC from Arene Candide cave (Liguria, Italy). *Am. J. Phys. Anthropol.* **72**:1-6.
- Gangadharam, P. R. J., Cohn, M. L., and Middlebrook, G.** 1963. Infectivity, pathogenicity and sulpholipid fraction of some Indian and british strains of tubercle bacilli. *Tubercle* **44**:452-455.
- Godfrey-Faussett, P., and Ayles, H.** 2003. Can we control tuberculosis in high HIV prevalence settings? *Tuberculosis* **83**:68-76.
- Gómez i Prat, J., and Mendonça de Souza, S. M. F.** 2003. Prehistoric tuberculosis in America: adding comments to a literature review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**:151-159.
- Gonzalo Asensio, J., Maia, C., Ferrer, N. L., Barilone, N., Laval, F., Soto, C. Y., Winter, N., Daffe, M., Gicquel, B., Martin, C., and Jackson, M.** 2006. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **281**:1313-1316.

Gordon, S. V., and Supply, P. 2005. Repetitive DNA in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 191-202. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington*.

Goren, M. B. 1970a. Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H₃₇Rv. I. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* **210**:116-126.

Goren, M. B. 1970b. Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H₃₇Rv. II. Structural studies. *Biochim. Biophys. Acta* **210**:127-138.

Goren, M. B., Brokl, O., and 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.

Grange, J. M., Aber, V. R., Allen, B. W., Mitchison, D. A., and Goren, M. B. 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.

Gu, S., Chen, J., Dobos, K. M., Bradbury, E. M., Belisle, J. T., and Chen, X. 2003. Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Mol. Cell. Proteomics* **2**:1284-1296.

Gutierrez, M. C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., Supply, P., and Vincent, V. 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* **1**:e5.

Harries, A. D., Chimzizi, R., and Zachariah, R. 2006. Safety, effectiveness, and outcomes of concomitant use of highly active antiretroviral therapy with drugs for tuberculosis in resource-poor settings. *Lancet* **367**:944-945.

Hartmans, S., de Bont, J. A. M., and Stackebrandt, E. 2005. The Genus *Mycobacterium*-Nonmedical. In: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. 3rd edition, release 3.20, December 31, 2005. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K-H. Schleifer, and E. Stackebrandt. *Springer-Verlag, New York*.

Hauduroy, M. P., et Posternak, M. Y. 1949. Sur une réaction cytochimique en rapport avec la virulence des mycobactéries. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **77**:91-93.

- Heifets, L., and Desmond, E.** 2005. Clinical Mycobacteriology (Tuberculosis) Laboratory Services and Methods. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 49-69. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington*.
- Hestvik, A. L. K., Hmama, Z., and Av-Gay, Y.** 2005. Mycobacterial manipulation of host cell. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:1041-1050.
- Hirsch, A., und Cattaneo, C.** 1958. [The mycobacteria: Chemical composition and virulence I. The problem of the “virulence tests” of Middlebrook (neutral red) and of Desbordes (Nile blue)]. *Zentralbl Bakteriol [Orig]* **171**:470-485.
- Ho, J. L.** 2005. Compositions and methods for treatment of infectious and inflammatory diseases. *US Pat. Appl.* US 20050267025A1.
- Hopewell, P. C., and Jasmer, R. M.** 2005. Overview of Clinical Tuberculosis. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 15-32. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington*.
- Hotter, G. S., Wards, B. J., Mouat, P., Besra, G. S., Gomes, J., Singh, M., Bassett, S., Kawakami, P., Wheeler, P. R., de Lisle, G. W., and Collins D. M.** 2005. Transposon mutagenesis of Mb0100 at the *ppe1-nrp* locus in *Mycobacterium bovis* disrupts phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and glycosylphenol-PDIM biosynthesis, producing an avirulent strain with vaccine properties at least equal to those of *M. bovis* BCG. *J. Bacteriol.* **187**:2267-2277.
- Huard, R. C., Chitale, S., Leung, M., Lazzarini, L. C., Zhu, H., Shashkina, E., Laal, S., Conde, M. B., Kritski, A. L., Belisle, J. T., Kreiswirth, B. N., Lapa e Silva, J. R., and Ho, J. L.** 2003. The *Mycobacterium tuberculosis* complex-restricted gene *cfp32* encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary interleukin-10. *Infect. Immun.* **71**:6871-6883.
- Huard, R. C., Fabre, M., de Haas, P., de Oliveira Lazzarini, L. C., van Sooligen, D., Cousins, D., and Ho, J. L.** 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Bacteriol.* **188**:4271-4287.

Bibliografía

- Hughes, D. E., Moss, E. S., Hood, M., and Henson, M.** 1954. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Evaluation of a test, using neutral red indicator. *Am. J. Clin. Pathol.* **24**:621-625.
- Ingrao, F., and Vetere, C.** 1952 [Reaction of mycobacteria to neutral red.] *Ann Inst Carlo Forlanini.* **13**:333-345.
- Ito, F., Coleman, C. M., and Middlebrook, G.** 1961. Purification of sulfolipid of virulent tubercle bacilli. *Kekkaku* **36**:764-769.
- Jackson, M., Berthet, F. X., Ota, I., Rauzier, J., Martin, C., Gicquel, B., and Guilhot, C.** 1996. The *Mycobacterium tuberculosis* purine biosynthetic pathway: isolation and characterization of the *purC* and *purL* genes. *Microbiology* **142**:2439-2447.
- Jackson, M., Stadthagen, G., and Gicquel, B.** 2007. Long-chain multiple methyl-branched fatty acid-containing lipids of *Mycobacterium tuberculosis*: biosynthesis, transport, regulation and biological activities. *Tuberculosis.* **87**:78-86.
- Jain, M., Petzold, C. J., Schelle, M. W., Leavell, M. D., Mougous, J. D., Bertozzi, C. R., Leary, J. A., and Cox, J. S.** 2007. Lipidomics reveals control of *Mycobacterium tuberculosis* virulence lipids via metabolic coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:5133-5138.
- Kalantri, S., Pai, M., Pascopella, L., Riley, L., and Reingold, A.** 2005. Bacteriophage- based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* **5**:59-72.
- Kaufmann, S. H. E.** 2003. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis* **83**:86-90.
- Kaur, D., Berg, S., Dinadayala, P., Gicquel, B., Chatterjee, D., McNeil, M. R., Vissa, V. D., Crick, D. C., Jackson, M., and Brennan, P. J.** 2006. Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan: role of a branching mannosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:13664-13669.
- Kaur, H., and Chitkara, N. L.** 1964. A study of mycobacteria including atypical acid fast bacilli. *Ind. J. Tub.* **12**:16-18.
- Koch, M. L., and Kroll, A. W.** 1960 An investigation of the reliability of the niacin

test, the neutral red test, and the test for cord formation for differentiation of group III ("Battev" strains) of atypical mycobacteria from human tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.* **81**:108-10.

Kölbel, H. 1957 [The value and the reaction mechanism of the neutral red test.] *Z Hyg Infektionskr.* **143**:387-96.

Krasnow, I., Wayne, L. G., and Salkin, D. 1955. A microcolonial test for the recognition of virulent mycobacteria. *Am Rev Tuberc* **71**:361-370.

Kremer, L., and Besra, G. S. 2005. A Waxy Tale, by *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 287-305. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington*.

Kremer, L., Baulard, A. R., and Besra, G. S. 2000. Genetics of Mycolic Acid Biosynthesis. In: *Molecular Genetics of Mycobacteria*, pp. 173-190. Edited by G. F. Hatfull and W. R. Jacobs, Jr. *ASM Press, Washington*.

Laal, S., and Skeiky, A. W. 2005. Immune-Based Methods. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 71-83. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington*.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Lal, M. M., Khan, A. M., Mehrotra, R. M. L., Saxena, H., and Sarkari, N. B. S. 1972. Role of anonymous mycobacteria in pathogenesis of human tuberculosis. *Ind. J. Tub.* **19**:101-107.

Lemassu, A., Ortaño-Magné, A., Bardou, F., Silve, G., Lanéelle, M-A, and Daffé, M. 1996. Extracellular and surface-exposed polysaccharides of non-tuberculous mycobacteria. *Microbiology* **142**:1513-1520.

Lillie, R. D. 1977. Quinone-imines dyes, azines. In: *H. J. Conn's Biological Stains*, pp. 376-392, 9th edn. Edited by R. D. Lillie. *The Williams and Wilkins Company, Baltimore*.

Madiraju, M: V. V. S., Qin, M.-H., and Rajagopalan, M. 2000. Development of simple and efficient protocol for isolation of plasmids from mycobacteria using zirconia beads. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**:38-41.

Mahapatra, S., Basu, J., Brennan, P. J., and Crick, D. C. 2005. Structure, Biosynthesis, and Genetics of the Mycolic Acid-Arabinogalactan-Peptidoglycan Complex. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 275-285. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington*.

Makinoshima, H., and Glickman, M. S. 2005. Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis. *Nature* **436**:406-409.

Manjunatha, U. H., Boshoff, H., Dowd, C. S., Zhang, L., Albert, T. J., Norton, J. E., Daniels, L., Dick, T., Pang, S. S., and Barry, C. E. III. 2006. Identification of a nitroimidazo-oxazine-specific protein involved in PA-824 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:431-436.

Martín, C., Williams, A., Hernandez-Pando, R., Cardona, P-J, Gormley, E., Bordat, Y., Soto, C. Y., Clark, S. O., Hatch, G. J., Aguilar, D., Ausina, V., and Gicquel, B. 2006. The live *Mycobacterium tuberculosis phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine*. **24**:3408-3419.

Matsunaga, I., Bhatt, A., Young, D. C., Cheng T-Y, Eyles, S. T., Besra, G. S., Briken, V., Porcelli, S. A., Costello, C. E., Jacobs Jr., W. R., and Moody, D. B. 2005. *Mycobacterium tuberculosis pks12* produces a novel polyketide presented by CD1c to T cells. *J. Exp. Med.* **200**:1559-1569.

Mawuenyega, K. G., Forst, C. V., Dobos, K. M., Belisle, J. T., Chen, J., Bradbury, E. M., Bradbury, A. R. M., and Chen, X. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Mol. Biol. Cell* **16**:396-404.

McLeod, M., Warren, R. L., Hsiao, W. W. L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A. L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R. D., Yang, G., Stott, J. M., Schein, J. E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A. S., Marra, M. A., Jones, S. J. M., Holt, R., Brinkman, F. S. L., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J. E., Mohn, W. W., and Eltis, L. D. 2006. The complete genome of *Rhodococcus sp.* RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:15582-15587.

- Mendelson, M., Hanekom, W., and Kaplan, G.** 2005. Dendritic Cells in Host Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 451-461. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. ASM Press, Washington.
- Middlebrook, G.** 1952. An apparatus for airborne infection in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**:105-110.
- Middlebrook, G., Coleman, C. M., and Schaefer W. B.** 1959. Sulfolipid from virulent tubercle bacilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **45**:1801-1804.
- Middlebrook, G., Dubos, R. J., and Pierce, C.** 1947. Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* **86**:175-184.
- Miller, J.** 1972. Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.*
- Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.*
- Minnikin, D. E., Hutchinson, I. G., Caldicott, A. B., and Goodfellow, M.** 1980. Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria. *J. Chromatogr.* **188**:221-233.
- Minnikin, D. E., Kremer, L., Dover, L. G., and Besra, G. S.** 2002 The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol.* **9**:545-553.
- Molle, V., Brown, A. K., Besra, G. S., Cozzone, A. J., and Kremer L.** 2006. The condensing activities of the *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase are differentially regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**:30094-30103.
- Morse, W. C., Dall, M. C., and Olitzky, I.** 1953. A study of the neutral red reaction for determining the virulence of *Mycobacterium*. *Am. J. Public Health* **48**:36-39.
- Mostowy, S., Cousins, D., Brinkman, J., Aranaz, A., and Behr, M. A.** 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Infect. Dis.* **186**:74-80.
- Muftic, M. K., and Tuncman, S. Z.** 1964. Quantitative analysis of neutral red test in mycobacteria. *Br J Dis Chest* **58 (2)**: 85-89.
- Muñoz-Elías, E. J., and McKinney, J. D.** 2005. Carbon metabolism of intracellular

Bibliografía

bacteria. *Cell. Microbiol.* **8**:10-22.

Muñoz-Elías, E. J., Upton, A. M., Cherian, J., and McKinney, J. D. 2006. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Mol. Microbiol.* **60**:1109-1122.

Murray, J. F. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* and the cause of consumption. From discovery to fact. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**:1086-1088.

Nahid, P., Pai, M., and Hopewell, P. C. 2006. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **3**:103-110.

Oettinger, T., Jorgensen, M., Ladefoged, A., Haslov, K., and Andersen, P. 1999. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber. Lung Dis.* **79**:243-250.

Ohno, H., Zhu, G., Mohan, V. P., Chu, D., Kohno, S., Jacobs, W. R. Jr., and Chan, J. 2003. The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* **5**:637-648.

Onwueme, K. C., Vos, C. J., Zurita, J., Ferreras, J. A., and Quadri, L. E. N. 2005. The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. *Prog. Lipid Res.* **44**:259-302.

Onyebujoh, P., Zumla, A., Ribeiro, I., Rustomjee, R., Mwaba, P., Gomems, M., and Grange, J. M. 2005. Treatment of tuberculosis: present status and future prospects. *Bull. World Health Organ.* **83**:857-865.

Orme, I. 2001. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one). *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **5**:589-593.

Ortalo-Magné, A., Dupont, M-A, Lemassu, A., Andersen, A. B., Gounon, P., and Daffé, M. 1995. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* **141**:1609-1620.

Ortalo-Magné, A., Lemassu, A., Lanéelle, M-A, Bardou, F., Silve, G., Gounon, P., Marchal, G., and 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.

Pai, M., Kalantri, S., and Dheda, K. 2006a. New tools and emerging technologies for

the diagnosis of tuberculosis: Part I. Latent tuberculosis. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **6**:413-422.

Pai, M., Kalantri, S., and Dheda, K. 2006b. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part I. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **6**:423-432.

Paraf, J., Desbordes, J., et Fournier, E. 1952. Contribution a l'étude de la physiologie des bacilles acido-alcool-résistants. IV. Adsorption et réduction des colorants vitaux par les mycobactéries. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **82**:370-372.

Parish, T., and Stoker, N. 1998. Electroporation of Mycobacteria. In *Mycobacteria Protocols*, pp. 129-144. Edited by T. Parish and N. G. Stoker. *Humana Press, Totowa*.

Parish, T., and Stoker, N. 2000. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC* mutant by gene replacement. *Microbiology* **146**:1969-1975.

Parish, T., and Wheeler, P. R. 1998. Preparation of Cell-Free Extracts from Mycobacteria. In *Mycobacteria Protocols*, pp. 129-144. Edited by T. Parish and N. G. Stoker. *Humana Press, Totowa*.

Parish, T., Smith, D. A., Roberts, G., Betts, J., and Stoker, N. G. 2003. The *senX3-regX3* two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence. *Microbiology* **149**:1423-1435.

Plikaytis, B. B., and King, C. H. 1998. Nucleic-Acid Extraction: Plasmid/Cosmid DNA. In *Mycobacteria Protocols*, pp. 129-144. Edited by T. Parish and N. G. Stoker. *Humana Press, Totowa*.

Raman, S., Puyang, X., Cheng, T-Y, Young, D. C., Moody, D. B., and Husson, R. N. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* SigM positively regulates Esx secreted protein and non-ribosomal 1 peptide synthesis genes and down regulates virulence-associated surface lipid synthesis. *J. Bacteriol.* **188**:8460-8468.

Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., and Tobes, R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:326-356.

Rastogi, N., Legrand, E., and Sola, C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* **20**:21-54.

- Raviglione, M. C.** 2003. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis* **83**:4-14.
- Reed, M. B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A. K., Kreiswirth, B. N., Kaplan, G., and Barry, C. E. III.** 2004. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* **431**:84-87.
- Richmond, L., and Cummings, M. M.** 1950. An evaluation of methods of testing the virulence of acid-fast bacilli. *Am Rev Tuberc* **62**: 632-637.
- Riley, L. W.** 2006. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J. Clin. Invest.* **116**:1475-1478.
- Rivera-Marrero, C. A., Ritzenthaler, J. D., Newburn, S. A., Roman, J., and Cummings, R. D.** 2002. Molecular cloning and expression of a novel glycolipid sulfotransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* **148**:783-792.
- Rosenkrands, I., Weldingh, K., Jacobsen, S., Hansen, C. V., Florio, W., Glanetri, I. and Andersen. P.** 2000. Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis* **21**:935-948.
- Rothschild, B. M., Martin, L. D, Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G. K., Greenblatt, G., Donoghue, H., Spigelman, M., and Brittain, D.** 2001. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin. Infect. Dis.* **33**:305-311.
- Rousseau, C., Winter, N., Pivert, E., Bordat, Y., Neyrolles, O., Avé, P., Huerre, M., Gicquel, B., and Jackson, M.** 2004. Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell. Microbiol.* **6**:277-287.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. J.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, pp 365-386. Edited by S. Krawetz and S. Misener. *Humana Press, Totowa.*
- Ruggiero, D.** 2000. A glimpse at the colourful history of TB: its toll and its effect on the U.S. and the world. In: *TB Notes*, pp 1-7. Edited by Centers for Diseases Control and Prevention.

- Russell, D. G.** 2005. *Mycobacterium tuberculosis*: the Indigestible Microbe. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 427-435. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington*.
- Sambandamurthy, V. K., Derrick, S. C., Hsu, T., Chen, B., Larsen, M. H., Jalapathy, K. V., Chen, M., Kim, J., Porcelli, S. A., Chan, J., Morris, S. L., and Williams, R. J. Jr.** 2006. *Mycobacterium tuberculosis* $\Delta RD1 \Delta panCD$: a safe and limited replicating mutant strain that protects immunocompetent and immunocompromised mice against experimental tuberculosis. *Vaccine*. **24**:6309-6320.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. *Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY*.
- Sanger, J., Nicklen, S., and Coulson, S.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**:5463-5467.
- Santangelo, M. P., Goldstein, J., Alito, A., Gioffre, A., Caimi, K., Zabal, O., Zumarraga, M., Romano, M. I., Cataldi, A. A., and Bigi, F.** 2002. Negative transcriptional regulation of the *mce3* operon in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **148**:2997-3006.
- Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M. I., Liu, Y., Mangan, J. A., Monahan, I. M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P. D., Nathan, C., and Schoolnik, G. K.** 2003. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J Exp Med.* **198**:693-704.
- Schnappinger, D., Schoolnik, G. K., and Ehrt, S.** 2006. Expression profiling of host pathogen interactions: how *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage adapt to one another. *Microbes Infect.* **8**:1132-1140.
- Segal, W.** 1965. Comparative study of *M. tuberculosis* grown *in vivo* and *in vitro*. V. Differences in staining properties. *Am. Rev. Respir. Dis.* **91**:285-287.
- Sharma, S. K.** 2005. Miliary tuberculosis: new insights into an old disease. *Lancet Infect. Dis.* **5**:415-430.
- Sharma, S. K., and Liu, J. L.** 2006. Progress of DOTS in global tuberculosis control. *Lancet* **367**:951-952.

Bibliografía

Sharma, K., Gupta, M., Krupa, A., Srinivasan, N., and Singh, Y. 2006. EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Journal* **273**:2711-2721.

Singleton, L., Ross, G. W., and Chanter, K. V. 1970. A comparative intradermal test with peptidoglycolipids (PMK₀) from *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium johnei*. *J. Comp. Pathol.* **80**:31-35.

Sirakova, T. D., Thirumala, A. K., Dubey, V. S., Sprecher, H. and Kolattukudy, P. E. 2001. The *Mycobacterium tuberculosis pks2* gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. *J. Biol. Chem.* **276**:16833-16839.

Slayden, R. A., and Barry, C. E. III. 2001. Analysis of the Lipids of *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Mycobacterium tuberculosis Protocols*, pp. 229-245. Edited by T. Parish and N. G. Stoker. *Humana Press, Totowa*.

Smith, I., Bishai, W. R., and Nagaraja, V. 2005. Control of Mycobacteria Transcription. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 219-231. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington*.

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

Soto, C. Y. 2002. Caracterización de la reacción citoquímica de *Mycobacterium tuberculosis* con rojo neutro. Correlación con el contenido de sulfolípido. *Tesis. Universitat Autònoma de Barcelona*.

Soto, C. Y., Andreu, N., Gibert, I., and 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.

Spigelman, M., and Gillespie, S. 2006. Tuberculosis drug development pipeline: progress and hope. *Lancet* **367**:945-946.

Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S., and Musser, J. M. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global

dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:9869–9874.

Steenken, W. Jr., Oatway, W. H. Jr., and Petroff, S. A. 1934. Biological studies of the tubercle bacillus III. Dissociation and pathogenicity of the R and S variants of the human tubercle bacillus (H₃₇). *J. Exp. Med.* **60**:515-540.

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

Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, J. F., Lee, M. H., Hatull, G. F., Snapper, S. B., Barletta, R. G., Jacobs Jr, W. R., and Bloom, B. R. 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**:456-460.

Talaat, A. M., Lyons, R., Howard, S. T., and Johnston, S. A. 2004. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:4602-4607.

Tarshis, M. S. 1961. Some useful procedures for group differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, unclassified mycobacteria, and saprophytic acid-fast bacilli. *J Lab Clin Med* **57**:480-489.

Tarshis, M. S. 1963. Media for distinguishing human and bovine tubercle bacilli from other mycobacteria. Comparative study of the monophasic and diphasic differential growth media. *J Lab Clin Med* **61**:308-316.

Tartof, K. D., and Hobbs, C. A. 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* **9**:12.

Taylor, G. M., Young, D., and Mays, S. 2005. Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2236-2240.

Triccas, J. A., Parish, T., Britton, W. J. and Gicquel, B. 1998. An inducible expression system permitting the efficient purification of a recombinant antigen from *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**:151-156.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data

by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**:RESEARCH0034.

van Soolingen, D., van der Zanden, A. G. M., de Haas, P. E. W., Noordhoek, G. T., Kiers, A., Foudraïne, N. A., Portaels, F., Kolk, A. H., Kremer, K., and van Embden, J. D. 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1840-1845.

Vergne, I., and Daffé, M. 1998. Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells. *Front. Biosci.* **3**:d865-876.

Viallier, J., et Tigaud, J. 1952a. Coloration de *Mycobacterium tuberculosis* par le rouge neutre et virulence du bacille pour le cobaye. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **146**:281-283.

Viallier, J., et Tigaud J. 1952b. Étude spectroscopique de la coloration prise par les mycobactéries sous l'influence du rouge neutre. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **83**:402-404.

Viallier, J., et Tigaud, J. 1953. La réaction de Dubos et Middlebrook, test cytochimique de la virulence des mycobactéries. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **85**:746-756.

Viallier, J., Kalb, J. C., et Tigaud, J. 1950. Sur la coloration par le rouge neutre du bacille tuberculeux. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **144**:1513-1514.

Waddell, S. G., Stabler, R. A., Laing, K., Kremer, L., Reynolds, R. C., and Besra, G. S. 2004. The use of microarray analysis to determine the gene expression profiles of *Mycobacterium tuberculosis* in response to anti-bacterial compounds. *Tuberculosis* **84**:263-274.

Walters, S. B., Dubnau, E., Kolesnikova, I., Laval, F., Daffe, M., and Smith, I. 2006. The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **60**:312-330.

Wards, B. J., and Collins, D. M. 1996. Electroporation at elevated temperatures substantially improves transformation efficiency of slow-growing mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**:101-105.

Wayne, L. G. 1959. Quantitative aspects of neutral red reactions of typical and "atypical" Mycobacteria. *Am Rev Tuberc* **79**:526-530.

- Wayne, L. G.** 2000. A slow ramble in the acid-fast lane. The coming of age of mycobacterial taxonomy. In: *Applied Microbial Systematics*, pp. 389-419. Edited by F. G. Priest and M. Goodfellow. *Kluwer Academic Publishers*.
- Wayne, L. G., Krasnow, I., and Huppert, M.** 1957. Characterization of atypical mycobacteria and of nocardia species isolated from clinical specimens .1. characterization of atypical mycobacteria by means of the microcolonial test. *Am Rev Tuberc* **76**:451-467.
- Whalen, C. C.** 2005. Diagnosis of latent tuberculosis infection. Measure for measure. *JAMA* **293**:2785-2787.
- WHO.** 2004. BCG vaccine. *Weekly epidemiological record* **79**:27-38.
- WHO.** 2006a (Revised). Fact sheet n° 104. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/print.html> Con acceso en Marzo de 2007.
- WHO.** 2006b. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. WHO/HTM/TB/2006.361.
- Wilson, F. J., Kalish, C., and Fish, C. H.** 1952. Use of oxidation-reduction dyes in the determination of virulence of mycobacteria *in vitro*. *Am Rev Tuberc* **65**:187-193.
- Wilson, J. V. K.** 1996. Diseases of Babylon: an examination of selected texts. *J. R. Soc. Med.* **89**:135-140.
- Zahrt, T. C.** 2003. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect.* **5**:159-167.
- Zhang, Y., Vilchèze, C., and Jacobs Jr, W. R.** 2005. Mechanism of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 115-140. Edited by S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr. *ASM Press, Washington*.
- Zimhony, O., Cox, J. S., Welch, J. T., Vilcheze, C., and Jacobs, W. R. Jr.** 2000. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* **6**:1043-1047.

Bibliografía

Zink, A. R., Grabner, W., Reischl, U., Wolf, H., and Nerlich, A. G. 2003. Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. *Epidemiol. Infect.* **130**:239-249.

8. Anexo

8.1. Análisis comparativo de las cepas H37Rv, $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$ con microchips de DNA

Tabla 8.1. Genes diferencialmente expresados en la cepa $\Delta 76$ respecto a la cepa H37Rv en el primer experimento. Se muestran los niveles de expresión normalizados (EN) y la desviación estándar (\pm SD) para cada gen, en las 3 cepas analizadas. La línea doble separa los genes inducidos de los reprimidos.

ORF	Gen	H37Rv		$\Delta 76$		$\Delta 76::Rv0576$	
		EN	\pm SD	EN	\pm SD	EN	\pm SD
<i>Rv0097</i>		0,3925	0,0656	2,7232	0,8021	1,7682	0,3427
<i>Rv0098</i>		0,4042	0,0845	1,9317	0,3790	1,5254	0,4869
<i>Rv0577</i>	<i>TB27.3</i>	0,8388	0,1281	9,2476	1,5021	0,3983	0,0928
<i>Rv1181</i>	<i>pks4</i>	1,3816	0,4582	0,2738	0,0872	0,3136	0,2431
<i>Rv1182</i>	<i>papA3</i>	8,2474	1,4572	0,5589	0,1911	0,4601	0,2739
<i>Rv1183</i>	<i>mmpL10</i>	0,7908	0,2040	0,2196	0,0629	0,2582	0,0670

Tabla 8.2. Genes diferencialmente expresados en la cepa $\Delta 76$ respecto a la cepa H37Rv en el segundo experimento. Se muestran los niveles de expresión normalizados (EN) junto con la desviación estándar asociada (\pm SD) para cada gen. La línea doble separa los genes inducidos de los reprimidos.

ORF	Gen	H37Rv		$\Delta 76$	
		EN	\pm SD	EN	\pm SD
<i>Rv0097</i>		0,9929	0,0095	3,4659	1,1694
<i>Rv0098</i>		0,9751	0,0243	2,9675	0,5236
<i>Rv0099</i>	<i>fadD10</i>	0,9931	0,0099	2,0691	0,4104
<i>Rv0577</i>	<i>TB27.3</i>	0,9943	0,0064	9,2594	2,8498
<i>Rv0576</i>		0,9977	0,0031	0,4197	0,0363
<i>Rv1182</i>	<i>papA3</i>	0,9911	0,0045	0,2216	0,0321
<i>Rv2154c</i>	<i>ftsW</i>	0,9940	0,0067	0,5896	0,0346
<i>Rv3486</i>		0,9983	0,0012	0,7408	0,0265

Tabla 8.3. Genes diferencialmente expresados en la cepa $\Delta 76::Rv0576$ en relación a la cepa H37Rv. Se muestran los niveles de expresión normalizados (EN) y la desviación estándar (\pm SD) para cada gen, en las 3 cepas analizadas. La línea doble separa los genes inducidos de los reprimidos.

ORF	Gen	H37Rv		$\Delta 76$		$\Delta 76::Rv0576$	
		EN	\pm SD	EN	\pm SD	EN	\pm SD
<i>Rv0097</i>		0,3925	0,0657	2,7232	0,8021	1,7682	0,3428
<i>Rv0098</i>		0,4042	0,0846	1,9317	0,3791	1,5254	0,4869
<i>Rv0576</i>		0,4362	0,1197	0,3355	0,0805	4,9121	1,4489
<i>Rv1129c</i>		0,1532	0,0452	0,4006	0,2876	0,5716	0,1772

ORF	Gen	H37Rv		$\Delta 76$		$\Delta 76::Rv0576$	
		EN	$\pm SD$	EN	$\pm SD$	EN	$\pm SD$
<i>Rv1130</i>		0,6003	0,1355	3,6284	4,1845	6,2501	2,0041
<i>Rv1131</i>	<i>gltA1</i>	0,2657	0,0823	2,0576	2,5513	2,4336	0,8024
<i>Rv1801</i>	<i>PPE29</i>	0,8658	0,2042	0,9937	0,3832	1,8144	0,3128
<i>Rv2011c</i>		0,5438	0,1746	0,9862	0,3914	1,0950	0,1861
<i>Rv2660c</i>		5,0381	0,9123	5,0879	1,661	9,5186	1,4339
<i>Rv2913c</i>		0,3287	0,0789	0,5538	0,4474	1,0045	0,2933
<i>Rv3252c</i>	<i>alkB</i>	0,4066	0,1220	0,8749	0,4611	1,2944	0,2165
<i>Rv0577</i>	<i>TB27.3</i>	0,8389	0,1282	9,2477	1,5022	0,3983	0,0928
<i>Rv0950c</i>		1,1501	0,1550	1,0894	0,1016	0,7559	0,1052
<i>Rv1182</i>	<i>papA3</i>	8,2475	1,4572	0,5589	0,1912	0,4602	0,2740
<i>Rv1183</i>	<i>mmpL10</i>	0,7908	0,2040	0,2197	0,0629	0,2583	0,0670
<i>Rv2336</i>		3,4555	0,6450	2,3113	0,5808	1,6629	0,3780

Tabla 8.4. Expresión de SigM y de los genes del locus PDIM en las cepas H37Rv, $\Delta 76$ y $\Delta 76::Rv0576$. Se muestran los niveles de expresión normalizados (EN) para cada gen junto con la desviación estándar asociada ($\pm SD$).

ORF	Gen	H37Rv		$\Delta 76$		$\Delta 76::Rv0576$	
		EN	$\pm SD$	EN	$\pm SD$	EN	$\pm SD$
<i>Rv3911</i>	<i>sigM</i>	1,1931	0,2065	1,1943	0,2603	0,9308	0,4285
<i>Rv2928</i>	<i>tesA</i>	1,8319	0,2487	2,1052	0,4488	1,3431	0,2857
<i>Rv2929</i>		1,3716	0,1943	1,7457	0,2966	1,4570	0,3163
<i>Rv2930</i>	<i>fadD26</i>	0,7445	0,1372	1,5528	0,7855	1,3180	0,2898
<i>Rv2931</i>	<i>ppsA</i>	0,4206	0,0783	0,7346	0,2547	0,7805	0,3757
<i>Rv2932</i>	<i>ppsB</i>	0,3978	0,0811	0,6495	0,2165	0,5944	0,2212
<i>Rv2933</i>	<i>ppsC</i>	0,5814	0,1378	0,8680	0,2946	0,8006	0,4377
<i>Rv2934</i>	<i>ppsD</i>	0,4104	0,0910	0,5538	0,2410	0,8287	0,8969
<i>Rv2935</i>	<i>ppsE</i>	0,6527	0,1643	0,9753	0,3340	0,9713	0,2466
<i>Rv2936</i>	<i>drrA</i>	1,3494	0,1476	2,1300	0,9981	1,7617	0,3405
<i>Rv2937</i>	<i>drrB</i>	0,5667	0,0922	0,7783	0,2726	0,7738	0,1468
<i>Rv2938</i>	<i>drrC</i>	0,6250	0,1878	0,8772	0,3840	0,7515	0,1277
<i>Rv2939</i>	<i>papA5</i>	0,6362	0,1518	0,8656	0,2724	0,6695	0,1618
<i>Rv2940c</i>	<i>mas</i>	0,7632	0,2562	1,0561	0,2743	0,8771	0,2301
<i>Rv2941</i>	<i>fadD28</i>	5,0114	1,2280	5,5391	1,9171	4,3970	1,4898
<i>Rv2942</i>	<i>mmpL7</i>	0,7034	0,1604	0,6724	0,1464	0,6782	0,2661
<i>Rv2943</i>		0,5363	0,1123	0,5580	0,1510	0,5276	0,2693
<i>Rv2944</i>		0,6956	0,2119	0,8220	0,3479	0,7109	0,3216
<i>Rv2945c</i>	<i>lppX</i>	1,3188	0,3899	1,4259	0,3106	1,1173	0,3623

8.2. Análisis comparativo de las cepas H37Rv, C27, C32 y C49 con microchips de DNA

Tabla 8.5. Genes diferencialmente expresados en la cepa C32 respecto a la cepa C49. Se muestran los niveles de expresión normalizados (EN) para cada gen junto con la desviación estándar (\pm SD) asociada, en las 4 cepas analizadas. La línea doble separa los genes inducidos de los reprimidos.

ORF	Gen	H37Rv		C27		C32		C49	
		EN	\pm SD	EN	\pm SD	EN	\pm SD	EN	\pm SD
<i>Rv1576c</i>		0,7211	0,1387	0,6737	0,2334	0,9892	0,4185	0,2516	0,0494
<i>Rv3160c</i>		0,6248	0,1136	0,8038	0,5360	2,0577	0,7467	0,5610	0,0722
<i>Rv3161c</i>		0,6032	0,1216	0,6111	0,2098	2,4070	1,0423	0,4899	0,0403
<i>Rv3312A</i>		11,7407	1,4819	11,9700	1,6751	8,9246	1,7498	17,8458	2,6447
<i>Rv3706c</i>		6,3306	1,3152	5,9921	1,3652	3,3035	0,7236	8,3546	1,6710

Tabla 8.6. Genes diferencialmente expresados en la cepa RN⁻ C32 en relación con las cepas RN⁺. Se muestran los niveles de expresión normalizados (EN) para cada gen junto con la desviación estándar (\pm SD) asociada, en las 4 cepas analizadas y el valor promedio de las 3 cepas RN⁺ (H37Rv, C27 y C49). La línea doble separa los genes inducidos de los reprimidos.

ORF	H37Rv		C27		C49		RN ⁺		C32	
	EN	\pm SD	EN	\pm SD	EN	\pm SD	EN	\pm SD	EN	\pm SD
<i>Rv2452c</i>	1,030	0,985	0,766	0,330	0,681	sin réplicas	0,891	0,623	2,481	1,173
<i>Rv3161c</i>	0,603	0,122	0,611	0,210	0,490	0,040	0,585	0,140	2,407	1,042
<i>Rv3160c</i>	0,625	0,114	0,804	0,536	0,561	0,072	0,639	0,219	2,058	0,747
<i>Rv3706c</i>	6,331	1,315	5,992	1,365	8,355	1,671	6,929	1,726	3,304	0,724

Tabla 8.7. Genes diferencialmente expresados en la cepa C27 respecto a la cepa H37Rv. Se muestran los niveles de expresión normalizados (EN) para cada gen junto con la desviación estándar (\pm SD) asociada, en las 4 cepas analizadas.

ORF	Gen	H37Rv		C27		C32		C49	
		EN	\pm SD						
<i>Rv2940c</i>	<i>mas</i>	0,9867	0,2442	0,3765	0,0815	0,4273	0,1508	1,2389	0,3110
<i>Rv3562</i>	<i>fadE31</i>	0,4165	0,0701	0,2544	0,0325	0,2943	0,1131	0,3009	0,0539

Tabla 8.8. Genes diferencialmente expresados en la cepa C27 en relación a la cepa C49. Se muestran los niveles de expresión normalizados (EN) para cada gen junto con la desviación estándar (\pm SD) asociada, en las 4 cepas analizadas.

ORF	Gen	H37Rv		C27		C32		C49	
		EN	\pm SD						
<i>Rv0244c</i>	<i>fadE5</i>	1,2006	0,2686	0,8177	0,1125	1,3184	0,4484	1,5739	0,2768
<i>Rv0257c</i>		1,4637	0,1529	1,4138	0,1745	1,5642	0,2302	2,1543	0,2093
<i>Rv0284</i>		1,6967	0,1097	1,6595	0,2083	2,4108	1,2766	3,0651	0,8288

ORF	Gen	H37Rv		C27		C32		C49	
		EN	±SD	EN	±SD	EN	±SD	EN	±SD
<i>Rv0286</i>	<i>PPE4</i>	1,0871	0,1301	0,9929	0,1300	1,3860	0,5816	1,6121	0,2496
<i>Rv0288</i>	<i>cfp7</i>	7,5374	2,4841	6,9487	1,5308	9,5985	3,6825	15,8964	2,7245
<i>Rv0314c</i>		0,7242	0,1042	0,6661	0,0466	0,9216	0,2344	1,0037	0,0747
<i>Rv0469</i>	<i>umaA</i>	1,8312	0,2188	2,0569	0,3050	2,6183	0,8376	3,2265	0,4675
<i>Rv0634B</i>	<i>rpmG2</i>	8,2628	1,2314	8,2896	0,6922	10,6045	3,9818	14,5259	2,5071
<i>Rv0909</i>		2,5271	0,3789	2,3148	0,3346	2,9566	0,7410	4,0361	0,5697
<i>Rv0965c</i>		0,7482	0,1473	0,7660	0,0961	0,8896	0,1650	1,1912	0,2355
<i>Rv1169c</i>	<i>PE11</i>	1,8508	0,2141	1,5827	0,1557	2,1784	2,1801	3,1653	0,8280
<i>Rv1172c</i>	<i>PE12</i>	2,5798	0,3563	2,7114	0,3210	3,1773	0,9195	4,1376	0,7375
<i>Rv1460</i>		1,1912	0,1100	0,9347	0,1348	1,2447	0,2968	1,5177	0,1935
<i>Rv1899c</i>	<i>lppD</i>	4,4949	0,7132	4,1346	0,4046	4,9233	1,8616	7,0515	1,1913
<i>Rv1980c</i>	<i>mpt64</i>	3,5499	0,6623	3,4309	0,2918	3,6673	1,4759	6,0660	1,0994
<i>Rv2428</i>	<i>ahpC</i>	1,1410	0,1931	1,0079	0,1722	1,3113	0,7209	1,8982	0,1688
<i>Rv2472</i>		1,2721	0,2073	1,2515	0,1307	2,0020	1,3145	1,9289	0,3314
<i>Rv2816c</i>		4,2202	0,3922	4,4427	0,4577	6,5073	1,7539	7,2712	1,0164
<i>Rv2940c</i>	<i>mas</i>	0,9867	0,2442	0,3765	0,0815	0,4273	0,1508	1,2389	0,3110
<i>Rv2949c</i>		2,7156	0,3656	2,3355	0,4627	3,1771	1,4507	4,5389	0,9111
<i>Rv2956</i>		0,7604	0,0937	0,7629	0,1051	0,7949	0,1668	1,1790	0,1697
<i>Rv3019c</i>		2,9456	0,7395	2,5326	0,4188	3,3138	1,3358	5,2162	0,7874

8.3. Variabilidad asociada a la tecnología de los microchips de DNA

Sin duda el desarrollo de la tecnología de los microchips de DNA ha sido uno de los hitos más importantes y que han generado un mayor optimismo en los últimos años. Las aplicaciones y los beneficios de poder analizar simultáneamente miles de genes son múltiples. Sin embargo, como toda técnica, presenta también sus limitaciones, las cuales se deben tener en consideración a la hora de interpretar los resultados obtenidos.

En primer lugar hay que tener en cuenta la variabilidad asociada al estudio de la expresión génica. Ésta viene dada tanto por la rapidez con que la célula responde a las condiciones ambientales (con ello me refiero, por ejemplo, simplemente a mantener las células en hielo o centrifugarlas a bajas temperaturas antes de procesarlas), como por el rápido metabolismo del RNA, con algunos transcritos con una vida media de tan sólo unos pocos segundos (Draghici *et al.*, 2006). Estas fuentes de variabilidad son conocidas y se han optimizado los protocolos para minimizarlas al máximo, pero es prácticamente imposible eliminarlas por completo.

Además de estas fuentes de variación “biológica”, el proceso de marcaje e hibridación, así como las propias características de los microchips pueden afectar profundamente a los resultados obtenidos. Así, la retrotranscripción y el marcaje del cDNA dependen de la secuencia y estructura de cada mRNA. Así mismo, la secuencia de las sondas utilizadas y la impresión de las mismas en el microchip afectarán también a la hibridación, a la hibridación cruzada y, finalmente, a la señal obtenida para cada gen. Por último, la sensibilidad de la técnica conlleva también una importante interferencia por el ruido de fondo y los artefactos generados durante todo el proceso. A todo ello hay que añadirle el límite de detección que afecta, sobre todo, a los transcritos poco abundantes (Draghici *et al.* 2006).

Si bien se han desarrollado múltiples controles y análisis estadísticos para poder extraer el máximo de información fiable de cada experimento, las fuentes de variabilidad pueden afectar a la calidad de la señal de los genes (datos que serán eliminados en los subsiguientes procesados de los datos) y, en cualquier caso, los análisis estadísticos predicen que un porcentaje de genes no serán detectados como diferencialmente expresados (falsos negativos), así como que algunos de los detectados serán falsos positivos (un 5% de los genes en el caso del análisis utilizado en este trabajo).

Agradecimientos

Después de todos estos años son muchas las personas que han contribuido a hacer posible este momento. Sería difícil no olvidar a alguien, por lo que quisiera hacer, en primer lugar, un agradecimiento generalizado a todas estas personas por prestarme su apoyo y su amistad, por enseñarme otras maneras de entender y afrontar las situaciones, por compartir conmigo su experiencia y sus conocimientos, y por que de todo se aprende y todo nos ayuda a crecer y a formarnos como personas.

De manera especial quisiera dar las gracias a mi grupo. Al Dr. Isidre Gibert porque desde un primer momento creyó y apostó por mí, por enseñarme y aprender conmigo, porque han sido muchos los obstáculos y arduo el camino pero siempre me dio su apoyo, y por ser más que un jefe un amigo. A Ignasi, que me enseñó casi todo lo que sé de genética molecular bacteriana, le tengo que agradecer además múltiples discusiones científicas, el echarme siempre una mano con el inglés y ayudarme en la corrección de la tesis y, sobre todo, su paciencia, su comprensión, su amistad y que siempre tuviera alguna broma para hacernos sonreír. A Anaïs quisiera darle las gracias por escucharme y entenderme, por muchas risas y buenos ratos, y por ayudarme en un momento especialmente difícil de mi vida. Y a Elena agradecerle que, en el año y medio que ha estado con nosotros, nos haya aportado la ilusión y alegría que tanto necesitábamos.

Agradecer, por supuesto, su aportación a los diferentes grupos que han colaborado activamente en esta tesis: al grupo del Dr. Carlos Martín, al grupo del Dr. Pere-Joan Cardona, al Bacterial Microarray Group, a la Unitat de Microarrays del CRG y al Servei Veterinari de Genètica Molecular. Al Dr. Carlos Yesid que me introdujo en el mundo de las micobacterias. Y a Lúdia, no sólo por su inestimable ayuda en el laboratorio, si no por ser una gran amiga y por que nunca le podré agradecer suficientemente todo lo que hizo por mí.

También quisiera dar las gracias a toda la gente del IBB por el buen ambiente, por los buenos momentos que han hecho el trabajo más llevadero y por estar siempre dispuestos a echar una mano. En particular quisiera dar las gracias a la gente de Enzimo por su buen humor y por haber aguantado amablemente tantas horas de rotavapor. A Mario por muchas y reconfortantes charlas, por sus consejos proteínicos y por

Agradecimientos

escanearme las cromatografías. Y a Óscar por solucionarme innumerables problemas informáticos.

Por último, no podría acabar estos agradecimientos sin incluir a las personas más importantes en mi vida: a mis padres y a César. A mis padres, por supuesto, se lo debo todo y sería imposible agradecerse en unas pocas líneas, porque sin ellos nada habría sido posible, por su apoyo incondicional, su paciencia, su comprensión y su cariño. Y a César por su valiosa ayuda en esta tesis y, sobre todo, por haber hecho que estos dos años y medio hayan sido los mejores.