

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

**Efecto del factor promotor de la resucitación C (*rpfC*) en la
respuesta de *Mycobacterium bovis* BCG a la hipoxia**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

LUZ VIRGINIA REYES GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. MAURICIO CASTAÑÓN ARREOLA

Ciudad de México, octubre de 2017.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México UACM, mi casa de estudios por haberme permitido formarme y apoyarme económicamente mediante una beca, los apoyos brindados para asistir y participar en congresos y su apoyo para la impresión y empastado de la Tesis.

Agradezco al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal ICyT DF (proyecto PI2013-41) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto No. 180990) por haber financiado este proyecto.



AGRADECIMIENTOS

Este apartado lo incluyó para poder tener la oportunidad de expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Mauricio Castañón Arreola, director de esta investigación, muchas gracias por su seguimiento y supervisión constante, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

Agradezco a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga y la Dra. Claudia Selene Zarate Guerra por haber mostrado su gran interés en mi trabajo y por haberme enseñado tantas cosas.

Le doy gracias a la Dra. María Esther Orozco Orozco, por permitirme haber entrado a estudiar la licenciatura en Ciencias Genómicas, ya que sin su decisión yo no hubiera llegado hasta donde estoy en este gran momento de desenlace, mil gracias.

Un especial reconocimiento a la Dra. Olga Nohemí Hernández de la Cruz mi maestra y amiga con la que me encuentro en deuda por el ánimo infundido, la paciencia y la gran oportunidad que me brindo al mostrarme el verdadero valor que hay al hacer ciencia y la confianza en mí depositada.

También quiero agradecer a todos los doctores miembros del posgrado de Ciencias Genómicas, que tuvieron la humildad de compartirme su conocimiento y que me ayudaron a mi formación académica durante estos años. Agradezco a la Dra. Sofía por haberme permitido trabajar en su laboratorio.

Quisiera agradecer enormemente a mis amigos del grupo "TB team" que me dieron grandes momentos gratos.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi gran amiga Ana Mejorada, mi amado esposo y mi querida familia.

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a mi amado esposo, la ayuda que me brindaste ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más tormentosas, sé que siempre estarás al comienzo y final de mi camino. No fue sencillo terminar este gran proyecto de vida y vaya que me ayudaste a que fuera más difícil de que me imaginaba, pero eso me hizo que me esforzara más y me dio fortaleza y temple, a pesar de ello fuiste motivador y me decías que yo lo lograría perfectamente. Me ayudaste hasta donde te era posible, incluso más que eso. Muchas gracias mi amor y recuerda que somos caballitos de mar.

Les dedico a mis maravillosos padres este trabajo, que desde pequeña ya lo querían presenciar. Papá y Mamá gracias por su amor, cuidados y enseñanzas y por su preocupación por mi avance en la tesis, es simplemente único y se refleja en todo mi esfuerzo, me siento muy orgullosa de tenerlos gracias por brindarme las herramientas de la vida para lograr esto los amo.

También quiero dedicarle este trabajo a mi abuelita Consuelo que la amo y que siempre me ha visto como su niña consentida, que me cuidó y confortó durante cada momento importante.

A mis hermanos que los adoro y sé que llegaron a cumplir sus sueños como ahora yo lo estoy cumpliendo. Y por qué no, le dedico este proyecto a mi querida compañera Leyla que siempre me acompañó en mis noches de desvelo.

Estas últimas líneas se las dedico a mi gran amiga Ana, que te quiero decir que fue una gran fortuna tener tu amistad y las tantas cosas que me enseñaste, fue un placer estudiar junto a tí, gracias por entenderme. Siempre seremos Ding Dong y Lumiere.

ÍNDICE GENERAL

Índice general	
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tablas.....	x
Abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xv
Introducción.....	1
Generalidades de la tuberculosis.....	1
Etiología de la tuberculosis.....	2
Factores de riesgo de la tuberculosis.....	3
Epidemiología de la tuberculosis.....	3
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
Latencia.....	10
Concentración de oxígeno en los tejidos.....	15
Modelos de latencia.....	18
Genes implicados en el estado latente de <i>M. tuberculosis</i>	20
Antecedentes particulares.....	26
Factores promotores de la resucitación Rpf's.....	26
Importancia biológica de los factores promotores de los resucitación Rpf's.....	29
Los Rpf's como dianas terapéuticas.....	30
Justificación.....	32
Hipótesis.....	33
Objetivos.....	34

Estrategia experimental.....	35
Materiales y métodos.....	36
Cepas y cultivos.	36
Extracción de ADN de micobacterias (método lisozima-proteinasas K).....	36
Clonación de <i>rpfC</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	37
Extracción de plásmidos.....	39
Preparación de células electrocompetentes y electroporación.....	39
Curvas de crecimiento BCG- <i>rpfC</i>	40
Hipoxia.....	40
Ensayo de viabilidad en respuesta a hipoxia.....	41
Extracción de ARN.....	42
Evaluación de la expresión de genes asociados a latencia por RT-PCR.....	43
Ensayo de tiempo real qRT-PCR.....	44
Obtención de extractos proteicos totales.....	45
Cuantificación de proteínas de extractos totales.....	45
Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	46
Electroforesis bidimensional 2D SDS-PAGE.....	46
Análisis estadístico.....	47
Resultados.....	48
Discusión.....	66
Conclusiones.....	72
Perspectivas.....	73
Bibliografía.....	74
Anexos.....	81
Glosario.....	81
Tabla A1.....	83
Figura A1.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de transmisión de la tuberculosis.....	1
Figura 2. Incidencia mundial de la tuberculosis en el 2015.....	5
Figura 3. Prevalencia de VIH en casos nuevos y recaída de tuberculosis.....	7
Figura 4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
Figura 5. Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	9
Figura 6. Granuloma tuberculoso.....	14
Figura 7. Presiones parciales de oxígeno en el compartimiento alveolar.....	16
Figura 8. Estructura de dominio Rpf	28
Figura 9. Mapa del plásmido pMV261.....	38
Figura 10. Clonación del gen <i>rpfC</i> en <i>M. bovis</i> BCG.....	48
Figura 11. Clonación del gen <i>rpfC</i> en el vector pMV261.....	49
Figura 12. Curva de crecimiento	50
Figura 13. Peso húmedo de <i>M. bovis</i> BCG	51
Figura 14. Crecimiento de <i>M. bovis</i> BCG y <i>M. bovis-rpfC</i> en hipoxia estricta y normoxia.....	52
Figura 15. PCR punto final	52
Figura 16. Expresión de genes asociados a la latencia en <i>M. bovis</i> BCG-pMV261 y <i>M. bovis</i> rBCG- <i>rpfC</i> en hipoxia y Normoxia.....	54
Figura 17. Crecimiento de <i>M. bovis</i> BCG-pMV261 y <i>M. bovis</i> rBCG- <i>rpfC</i> en hipoxia estricta (<1% O ₂).....	55
Figura 18. Gráfica de viabilidad ante condiciones de estrés hipóxico (<1% O ₂).....	56
Figura 19. Extracción de ARN.....	56
Figura 20. Gráfica qRT-PCR en tiempo real en condición de normoxia.....	57
Figura 21. Gráfica qRT-PCR en tiempo real en condición de hipoxia.....	59

Figura 22. Crecimiento de *M. bovis* BCG-pMV261 y
M. bovis rBCG-rpfC en hipoxia (5% O₂).....60

Figura 23. . Grafica de viabilidad ante condiciones de estrés hipóxico (5% O₂).....61

Figura 24. Electroforesis SDS-PAGE de *M. bovis* rBCG-rpfC.....62

Figura 25. Electroforesis 2D SDS-PAGE de *M. bovis* BCG pMV261
(normoxia e hipoxia).....64

Figura 26. Electroforesis 2D SDS-PAGE de *M. bovis* rBCG-rpfC
(normoxia e hipoxia).....65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores normales de PO ₂ en los diferentes tejidos humanos.....	18
Tabla 2. Genes implicados en el estado latente TBL de <i>M. tuberculosis</i>	21
Tabla 3. Organismos que contienen los genes <i>rpf</i>	27
Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos diseñados en PRIMER 3.....	44

ABREVIATURAS

- AcCoA Acetil coenzima A
- ADC Albúmina-dextrosa-catalasa
- OADC Ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa
- ADN Ácido desoxirribonucleico
- BCG Bacillo de Calmette-Guérin
- BSA Albumina de suero bovino
- C Citosina
- ADNc Ácido desoxirribonucleico complementario
- CO₂ Dióxido de carbono
- CuSO₃ Sulfato de cobre
- DNAsa Desoxirribonucleasa
- DO Densidad óptica
- EDTA Ácido etilendiaminotetraacético
- g Gravedad
- G Guanina
- GAPDH Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- HCl Ácido clorhídrico
- HSP Proteína de choque térmico
- ICL Isocitrato liasa
- IEF Isoelectroenfoque
- Kan Kanamicina
- kDa Kilodaltones
- LAM Lipoarabinomanana
- Lys Lisina

- M Molar
- Met Metionina
- MDR-TB Tuberculosis resistente a múltiples fármacos
- mM Milimolar
- MNT Micobacterias no tuberculosas
- NaCl Cloruro de sodio
- NaCO₃ Carbonato de sodio
- NaOH Hidróxido de sodio
- ng Nanogramos
- nm Nanómetros
- O₂ Oxígeno
- OMS Organización Mundial de la Salud
- ORF Marco de lectura abierto
- PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida
- PBS Amortiguador de fosfato salino
- PCR Reacción en cadena de la polimerasa
- PG Peptidoglicano
- pH Potencial de hidrógeno
- pI Punto isoeléctrico
- pM Picomolar
- qPCR Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
- RNA Ácido ribonucleico
- RNAm Ácido ribonucleico mensajero
- RNAr Ácido ribonucleico ribosomal
- RNAsa Ribonucleasa
- RNAt Ácido ribonucleico de transferencia
- rpf's Factores promotores de la resucitación
- rpfC Factor promotor de la resucitación C

- rpm Revoluciones por minuto
- RR-TB Tuberculosis resistente a rifampicina
- RT Retrotranscripción
- SDS Dodecilsulfato de sodio
- SIDA Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
- SINAVE Sistema nacional de vigilancia epidemiológica
- SP Fase estacionaria
- TA Temperatura ambiente
- TB Tuberculosis
- TBL Infección latente
- kV Kilo volts
- TNF Factor de necrosis tumoral
- UFC Unidades formadoras de colonia
- V Voltaje
- VIH Virus de la inmunodeficiencia humana
- µg Microgramos
- µL Microlitro
- µm Micrometros

RESUMEN

En la tuberculosis la persistencia y reactivación del bacilo juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Se estima que más de un tercio de la población mundial está infectada con este microorganismo, sin embargo, solo el 90% no presenta síntomas clínicos, debido a que el bacilo se encuentra en estado de latencia. La búsqueda de factores que le permiten a la bacteria reactivarse y salir del estado de latencia condujo a la identificación de los factores promotores de la resucitación (Rpf's). *M. tuberculosis* tiene cinco factores Rpf (A-E), sin embargo, su papel en la reactivación no ha sido determinado. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la sobreexpresión del factor RpfC en la respuesta de *M. bovis* a la hipoxia, tanto en la expresión de genes asociados a la latencia, como en la expresión de proteínas. El gen *rpfC* se amplificó a partir de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv y se clonó en el vector de expresión pMV261 (pMV261-*rpfC*). El plásmido construido se usó para transformar a *M. bovis* BCG mediante electroporación. En las cepas transformadas se evaluaron las diferencias en el crecimiento cuando éstas sobreexpresan *rpfC*, la expresión de un panel de genes asociados con la latencia y las diferencias en el perfil proteómico en condiciones de cultivo normal y de hipoxia. Los bacilos transformados (*M. bovis* rBCG-*rpfC*) mostraron un mayor crecimiento y mantenimiento que los bacilos transformados con el plásmido vacío (*M. bovis* BCG-pMV26). Los resultados de qRT-PCR mostraron que *M. bovis* en rBCG-*rpfC* aumenta la expresión de los genes *pfkB*, *sigB*, *sigE*, *fdxA*, *nark2*, *rpfC* y *rpoA* en comparación con la expresión observada en *M. bovis* BCG-pMV26 en condiciones de hipoxia. Los resultados del perfil proteómico mostraron que en condiciones de hipoxia en la cepa rBCG-*rpfC* hay una disminución en el número y abundancia de las proteínas. En conclusión, el factor promotor de la resucitación RpfC induce el crecimiento de *M. bovis* BCG y la expresión de genes asociados a latencia, lo que podría promover su reactivación cuando está se encuentra inactiva en estado latente.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una infección causada por una bacteria patógena llamada *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), el bacilo suele alojarse en los pulmones, sin embargo, también puede infectar otros órganos del hospedero ⁶⁴. La TB se trasmite principalmente por vía aérea; cuando una persona tose, estornuda o habla puede contagiar a quien lo rodea (Fig. 1). Si la TB no es tratada de una manera adecuada, la infección puede volverse mortal ⁶⁵.

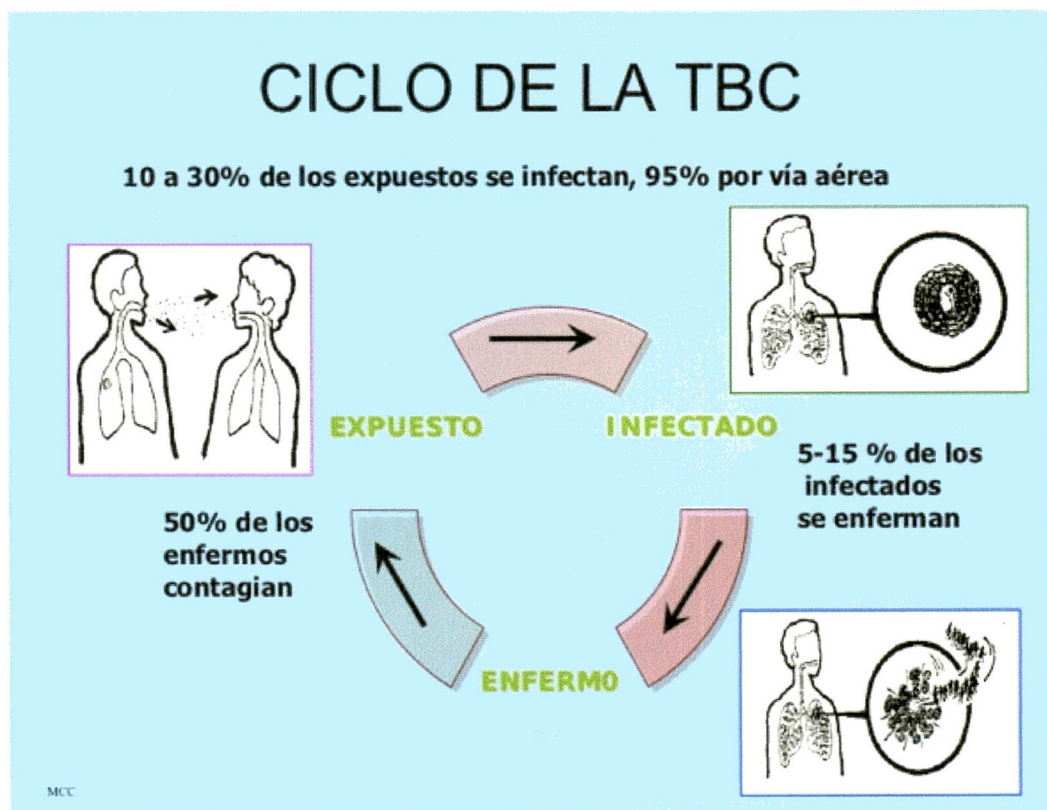


Figura 1. Ciclo de transmisión de la tuberculosis. Se estima que del 10 a 30% de los individuos expuestos al bacilo *M. tuberculosis* se infectan. Un 95% ocurre por vía aérea, y ya infectados solo un 5-15% se enferman. De los individuos enfermos el 50% puede contagiar ⁶⁹.

La TB humana se caracteriza por manifestarse de dos formas: i) tuberculosis activa, donde se presentan signos y síntomas y ii) la infección latente, en la cual no se presentan signos clínicos y la persona esta aparentemente sana, pero infectada por el bacilo ¹.

Los síntomas clínicos de la tuberculosis son:

- Tos intensa que dura 3 semanas o más
- Dolor de pecho
- Tos con sangre (hemoptisis) y/o esputo (flema que sale desde el fondo de los pulmones)
- Debilidad o fatiga
- Pérdida de peso
- Falta de apetito
- Escalofríos
- Fiebre y sudoración nocturnos

Etiología de la Tuberculosis

La tuberculosis (TB), aunque ya no es muy mencionada y hasta se piensa que ya no existe, en realidad aún está presente y es una de las enfermedades más antiguas de la humanidad que sigue afectando grandes poblaciones, en especial en las zonas marginadas donde hay escasos recursos, desnutrición, falta de servicios de salud eficientes y acceso a los mismos, entre otros.

M. tuberculosis pertenece al complejo conocido como *M. tuberculosis*, el cual está integrado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti*. Todas las especies son patógenas de animales y/ o el humano ^{65,66}. Sin embargo, *M. microti* solo es patógena en ratones de campo y *M. canetti* en cabras, a diferencia de *M. bovis* que tiene un amplio espectro de hospederos, tanto silvestres como domésticos.

Factores de riesgo que favorecen la tuberculosis

Cuando las personas se infectan con *M. tuberculosis*, lo más común es que se presenten síntomas como los del catarro, lo que es resultado de la infección, sin embargo, esta se contiene por el sistema inmune y se mantiene como una infección latente en la mayoría de los casos ($\approx 90\%$). Solo en el 2% de los casos de primo infección hay una progresión a la enfermedad; esto ocurre antes de que el sistema inmune pueda combatir a las micobacterias ⁶⁵. Hay otros casos donde las personas desarrollan la enfermedad años después de haber contraído la infección (5%), como consecuencia de que su sistema inmunitario se encuentra debilitado ².

En general, aproximadamente del 5 al 10% de las personas infectadas presentaran la enfermedad en algún momento de su vida. En las personas que están inmunodeprimidas, como por ejemplo, las infectadas con el VIH, el riesgo de padecer tuberculosis es mayor a un 75% en comparación con los individuos que no tienen su sistema inmune comprometido ⁶⁵.

Las personas que tienen mayor riesgo de contraer la tuberculosis son:

- Personas que conviven estrechamente con pacientes con TB activa.
- Personas con afecciones que debilitan el sistema inmune.

Epidemiología de la TB.

M. tuberculosis es un patógeno intracelular que es capaz de causar infección después de haber sido inhalado ³. Este agente infeccioso puede causar una enfermedad progresiva o una infección que es capaz de permanecer durante un largo periodo en el hospedero sin producir ninguna sintomatología en lo que se conoce como infección latente (TBL) ⁴. La TBL es uno de los principales problemas por los que no se ha podido erradicar la TB. De acuerdo a los reportes de la Organización Mundial de la

Salud (OMS), se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* ⁵.

La TB pulmonar ocupa el quinto lugar como causa de muerte en el mundo y ocurren tres millones de muertes cada año, lo que la hace la causa de muerte más frecuente por un agente infeccioso. En el mundo cada hora mueren más de 200 personas a causa de la TB, y más de 5000 todos los días ². Aproximadamente el 80% de los individuos que padecen esta enfermedad viven en África y Asia. Tomando en cuenta toda la población mundial, la India es el país que concentra más casos de tuberculosis, y en promedio un paciente muere de tuberculosis cada minuto en ese país ².

Durante el 2015 se reportaron 10.4 millones de casos nuevos de tuberculosis (Fig. 2), incluyendo 1.2 millones con VIH (Fig. 3), de los cuales, 5.9 millones (56%) fueron hombres, 3.5 millones (34%) mujeres y 1.0 millón (10%) niños. En el mismo año, hubo un estimado de 1.4 millones de muertes por tuberculosis y 0.4 millones de muertes a causa de la TB-VIH. La OMS reportó que en ese mismo año se presentaron 480,000 casos nuevos de TB resistente a múltiples fármacos (MDR-TB) y también estimó que hubo más de 100,000 casos de personas con TB resistente a rifampicina (RR-TB). Aunque entre el 2000 y 2015 se redujo en 22% la tasa de mortalidad, la TB sigue siendo una de las 10 causas principales de muerte en el mundo ⁷⁰.

En el 2016, la OMS reportó que en México se registraron 15,769 casos nuevos de tuberculosis pulmonar y 19,298 de casos nuevos de tuberculosis en todas sus formas. En general hay dos grupos de edad en los que se presenta la mayoría de los casos de TB, el de 20-40 años y los mayores de 60 años ⁶⁶. El primer grupo es el que representa mayores pérdidas económicas, ya que son personas en edad productiva (laboral) ⁷⁰.

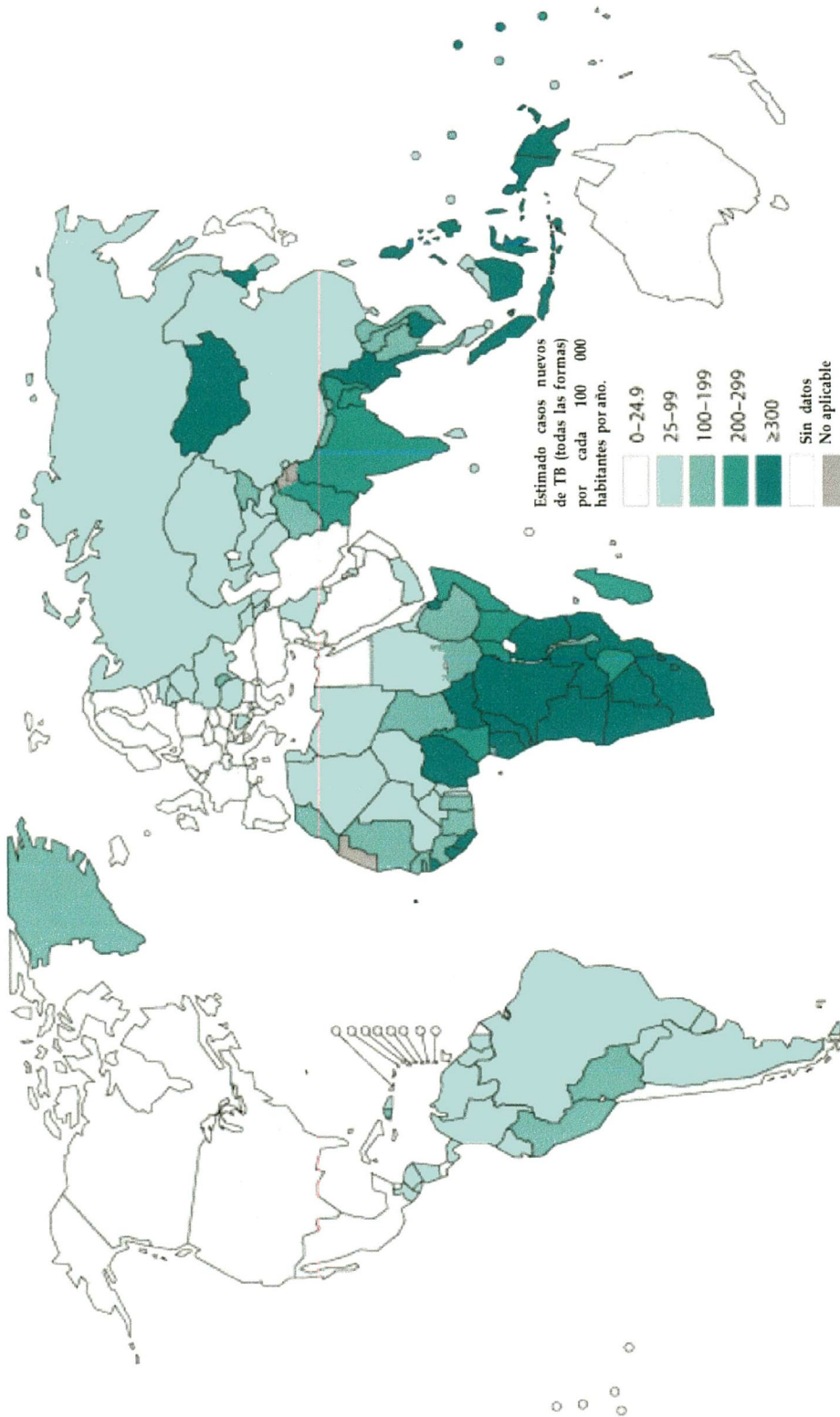


Figura 2. Incidencia mundial de la tuberculosis en el 2015 (OMS, 2016 Global Tuberculosis Report).

Según los estudios epidemiológicos, en México se han presentado tasas de morbilidad de TB cada vez más elevadas en adultos jóvenes mayores de 20 años ². De acuerdo a la información del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de México, se ha identificado un creciente vínculo entre la tuberculosis y la infección con el VIH, así como la comorbilidad en pacientes con diabetes mellitus. Estas son dos poblaciones de riesgo importantes por su impacto en la salud. Al igual que en otros países que tienen una alta prevalencia de tuberculosis, la epidemia de VIH-SIDA, la diabetes mellitus, la desnutrición, adicciones a drogas y la resistencia a los fármacos antituberculosos empeoran el panorama epidemiológico de la tuberculosis ².

En relación al diagnóstico de la TB, en el mundo se notificaron 6.4 millones de personas inscritas en los programas nacionales de TB en la OMS, de los cuales, más de 6.1 millones de pacientes habían presentado un episodio nuevo de TB o una recaída ². Se reportó que el 30% de los 3.4 millones de nuevos casos de TB, fueron sensibles a los medicamentos, y se detectaron 132,000 casos de TB resistente a múltiples fármacos o de TB resistente a la rifampicina (MDR/RR-TB). En el 55% de los pacientes con TB notificados, se conocía el estatus de la prueba del VIH, teniendo un aumento de 18 veces en el número desde el 2014. La proporción de pacientes seropositivos con TB y en tratamiento antirretroviral fue del 78% ⁷⁰.

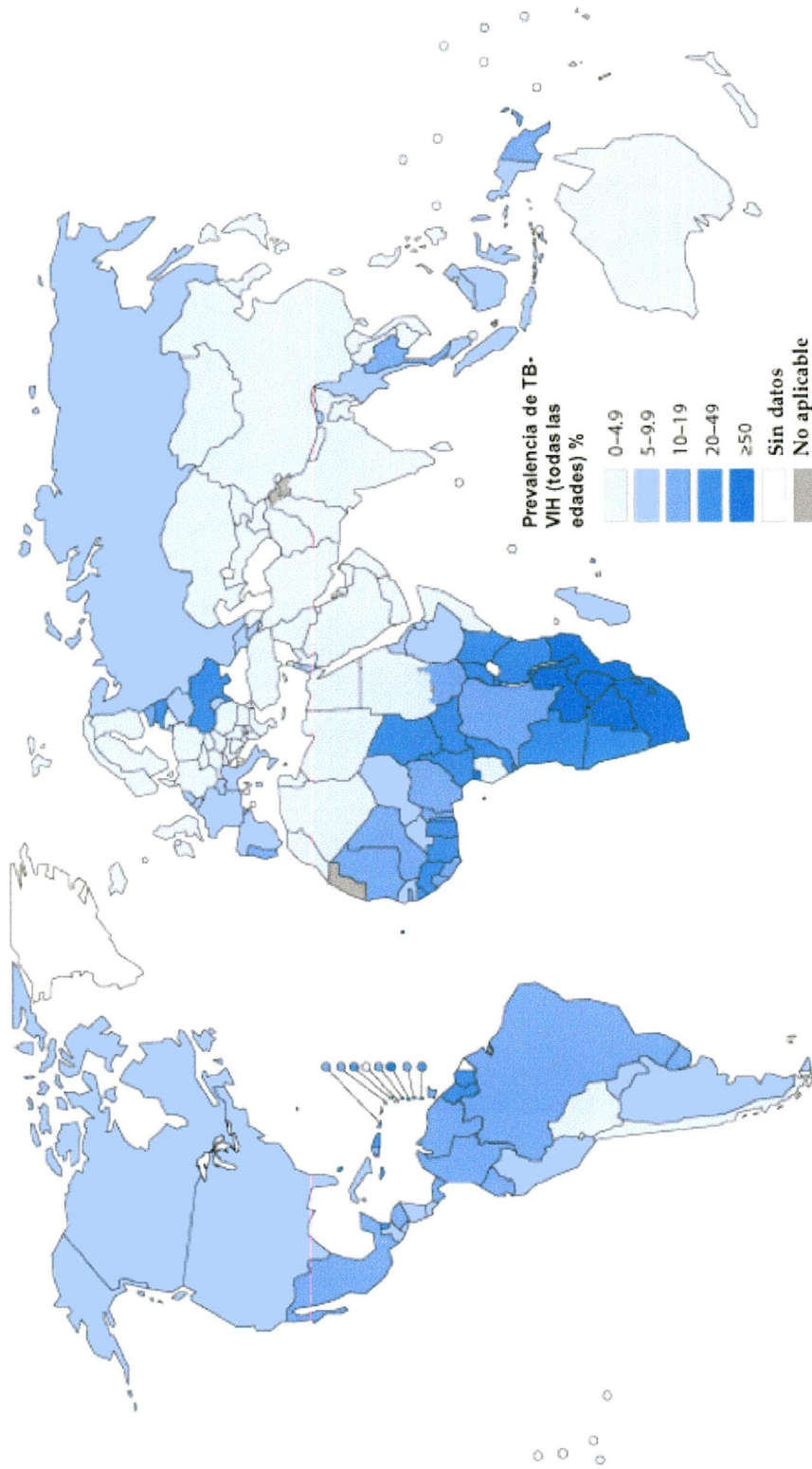


Figura 3. Prevalencia de VIH en casos nuevos y recaídas de tuberculosis en el 2015 (OMS, 2016 Global Tuberculosis Report).

Mycobacterium tuberculosis.

Mycobacterium tuberculosis es una especie del género *Mycobacterium* que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden de *Actinomycetales*. Existen micobacterias saprófitas o no tuberculosas (MNT) que pueden aislarse de la tierra, agua, polvo, leche ⁶⁶. Algunas de ellas se asocian a enfermedad principalmente *M. avium*, *M. kansasii* y *M. marinum* ⁷³.

M. tuberculosis es una bacteria aeróbica estricta, Gram-positiva débil, ácido alcohol resistente, inmóvil y no esporulada ⁶⁷. Los bacilos tienen forma de bastoncillos ligeramente curvos con los extremos redondeados. Las micobacterias varían en su tamaño, ya que de ancho miden de 0.2 a 0.5 μm y de 1 a 4 μm de longitud (Fig. 4-A); son resistentes a la decoloración alcohol-ácida cuando se tiñen con Ziehl-Neelsen (Fig. 4-B). Con esta tinción las micobacterias se ven de un color rojo sobre un fondo azul ⁷³. Otra característica importante es que estos bacilos producen ácidos micólicos como componentes de su pared celular.

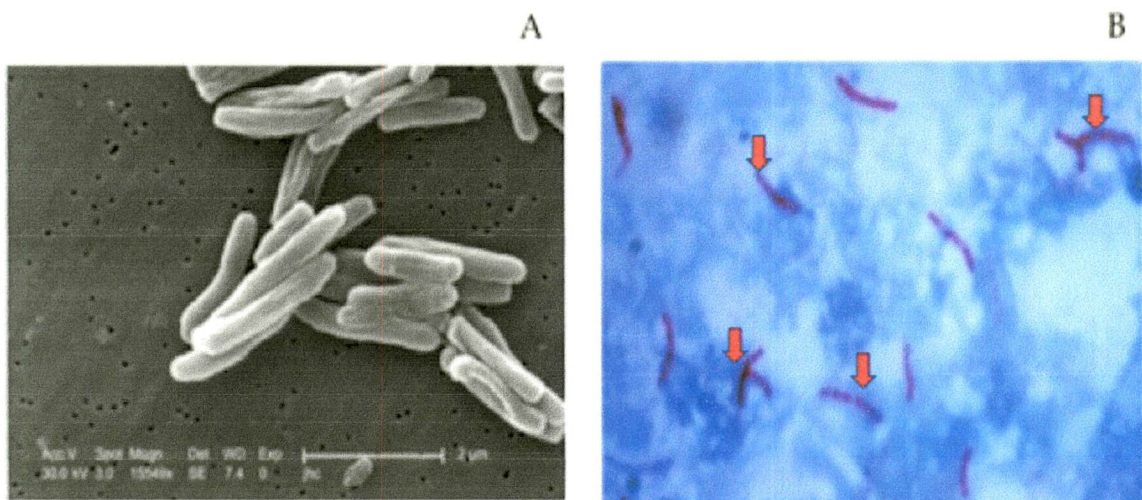


Figura 4. *Mycobacterium tuberculosis*. **A)** Microscopía electrónica de barrido. **B)** Tinción de Ziehl-Neelsen en frote de esputo. Los ácidos micólicos forman complejos con carbohidratos y así forman una apariencia acordonada (panel B flechas rojas) y los sulfolípidos pueden inhibir la fusión fago-lisosomal Tomado de Janice Carr y cols. ⁷¹.

M. tuberculosis obtiene energía gracias a la oxidación de compuestos de carbono. Los bacilos son de crecimiento lento a comparación de otras bacterias, pues tienen un tiempo de replicación de 18 horas y los cultivos tardan de 2-3 semanas ⁷³.

Uno de los componentes más importantes de *M. tuberculosis* y de otras micobacterias patógenas es su pared celular, la cual es rica en complejos lipídicos, entre estos, los ácidos micólicos (ácidos grasos de cadena larga que componen el 60% de la pared celular), glucolípidos y peptidoglucolípidos. Esta conformación de la pared le da una apariencia cerosa a la micobacteria y, además, confiere una alta hidrofobicidad y resistencia a detergentes y a algunos antibióticos (Fig. 5), lo que les confiere una barrera de protección ⁶⁷.

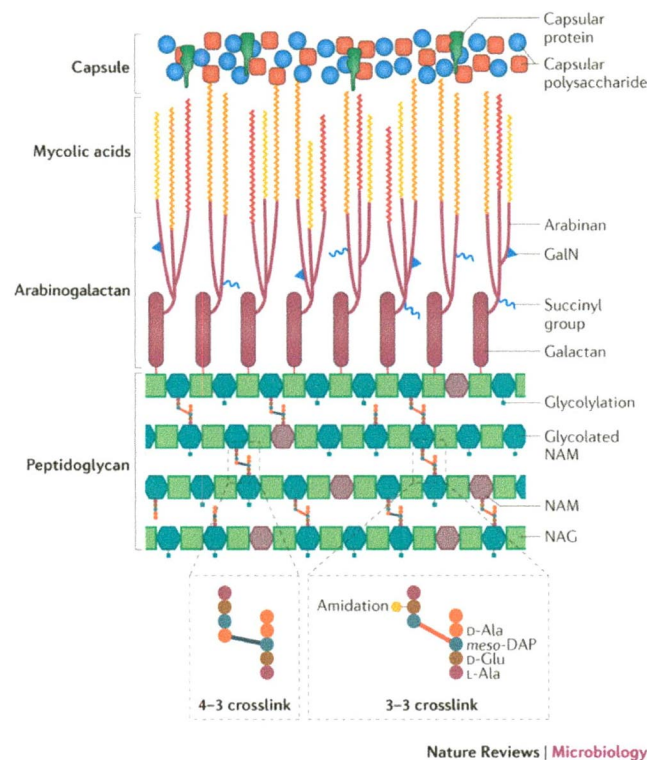


Figura 5. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. La micobacteria está envuelta dentro de una bicapa lipídica típica de membrana citoplasmática que permanece debajo de una capa del peptidoglicano (PG). Algunas proteínas se encuentran asociadas con PG y moléculas como la lipoarabinomana (LAM), N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acilmurámico (NAM), que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis. Tomada de Bonora M y cols. ⁶.

Latencia

Aunque la latencia y la reactivación de *M. tuberculosis* son primordiales para la patogénesis del bacilo, muchos detalles moleculares de cómo se lleva a cabo la reactivación son poco entendidos.

Como se mencionó anteriormente, en la gran mayoría de individuos inmunocompetentes, la infección es contenida por las defensas del hospedero en lo que llamamos tuberculosis latente (TBL). En la TBL, el hospedero previene la enfermedad activa, mientras que la micobacteria evita su eliminación. Cuando se presenta un cambio en la respuesta del sistema inmune en la que el hospedero no es capaz de contener la infección, es entonces cuando se presenta la reactivación de la misma y se desarrolla la enfermedad ². Para tener más claro el contexto, primero definiremos que es la latencia (*dormancy*). *Dormancy* es un término antropomórfico derivado del latín *-dormire-*, que significa "a dormir". Este término ha sido utilizado para designar una variedad de condiciones en las que las bacterias son viables, pero tienen una actividad metabólica reducida ¹. El término de latencia, por otro lado, es comúnmente usado en el contexto de modelos *in vitro* de infección con *M. tuberculosis*, en los cuales se logra apagar el metabolismo y reducir replicación de la bacteria por medio de hipoxia progresiva ⁶. Otro término utilizado en la TB es la "persistencia", que, según la literatura científica consiste en que la micobacteria adquiere la capacidad de persistir o sobrevivir en los tejidos del hospedero bajo diferentes condiciones de estrés principalmente en el uso de antibióticos ⁷. Por lo tanto, para no confundir estos dos términos, en este trabajo se utilizará persistencia en relación a la supervivencia de cepas sensibles a los antibióticos en presencia de ellos, mientras que el término latencia se utilizara para definir el estado en el que las cepas permanecen en una fase estacionaria en el interior de un tejido necrótico, con un metabolismo reducido y una escasa o nula estimulación de la respuesta inmune ⁸.

Algunos autores indican que la latencia es una consecuencia usual del ciclo de vida de *M. tuberculosis*, en la que simplemente puede permanecer en una fase quiescente

por varios años, como se ha demostrado en otras especies de bacterias⁸. Sin embargo, a diferencia de la fase estacionaria de crecimiento, en la latencia las micobacterias tienen menos probabilidades de reactivarse, más aún si llevan varios años en el hospedero y por consecuencia, el riesgo de la reactivación de la tuberculosis disminuye en relación al tiempo de infección⁸. Entonces, de acuerdo con estos hallazgos la posibilidad de reactivación de la TBL está limitada en un cierto periodo de tiempo, a diferencia de una infección crónica.

Se entiende por “primo-infección tuberculosa” al conjunto de reacciones adversas que se producen en el organismo la primera vez que este entra en contacto con *M. tuberculosis*. La gravedad en que se presenta la infección está condicionada por algunos factores como: la carga bacilar, la virulencia y el estado del sistema inmune del hospedero⁹. Por lo tanto, la infección primaria ocurre en personas carentes de inmunidad específica, generalmente niños y adultos jóvenes sanos que nunca habían estado en contacto con *M. tuberculosis*⁹.

La capacidad que tiene *M. tuberculosis* para mantener una infección crónica y producir enfermedad en un subgrupo de individuos infectados dependerá de los productos de la micobacteria, por ejemplo, los factores de virulencia que coadyuvan para que el bacilo entre y sobreviva indefinidamente dentro de las células fagocíticas¹⁰.

Una característica particular de *M. tuberculosis* en su proceso de patogenicidad, es su capacidad para evadir la respuesta inmune y mantenerse viable durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, el proceso de infección ocurre en cuatro etapas en las que cada una de ellas muestra el avance de la infección micobacteriana.

1. *Etapa de establecimiento*: Después de que se inhalan los bacilos, éstos son fagocitados en el tracto respiratorio por macrófagos alveolares, y se inicia la

infección. Sin embargo, menos del 10% de las personas infectadas desarrollan TB activa, mientras que el resto son capaces de contener la infección en lo que se conoce como TBL ¹¹. La contención de la infección es mediada por el sistema inmune, y durante esta se forman granulomas que delimitan el foco de infección, evitando la diseminación de los bacilos. Los granulomas tienen una compleja conformación y se componen de linfocitos, macrófagos infectados de micobacterias, fibroblastos, entre otros (Fig. 6). Dentro de los macrófagos, los sulfátidos de la envoltura bacteriana y el amoniaco producido por la micobacteria impide la fusión de los lisosomas con los fagosomas, por ello, las micobacterias no son atacadas y es de esta forma que logran replicarse dentro de los fagosomas ¹².

2. *Etapa de replicación intracelular:* pasados de 7 a 10 días de la infección, *M. tuberculosis* continua su replicación intracelular y se produce una suerte de simbiosis entre las micobacterias y los fagocitos, hay poco daño a las células fagocíticas y, por lo tanto, casi ninguna micobacteria es eliminada ⁶⁷.
3. *Etapa de diseminación:* un número de macrófagos activados se fusionan entre sí a través de moléculas de adhesión, como ICAM-1 y se forman las células gigantes multinucleadas que representan una efectiva defensa del hospedero. Sin embargo, algunas micobacterias escapan del sitio inicial de infección y migran hacia los ganglios linfáticos regionales, en donde son recapturadas por macrófagos, lo cual vuelve a producir un nuevo foco de infección que produce la ruptura de la célula, y al cabo de un tiempo algunas micobacterias pasan a circulación para luego ser fagocitadas por monocitos. De esta manera, *M. tuberculosis* se disemina hacia diversos sitios donde puede establecer nuevas lesiones ⁶⁷.
4. *Etapa de daño tisular:* de 6 a 8 semanas posteriores a la infección, los granulomas sufren necrosis, se forma un tubérculo blando por la acumulación de detritus

celulares, micobacterias y productos de exudación, formando un contenido de color blanquecino, y posteriormente se produce la necrosis caseosa. La tensión de oxígeno en la zona de necrosis es muy baja y, por lo tanto, el desarrollo de las micobacterias cesa ⁶⁷, lo que da como resultado de que la mayoría de los bacilos mueran y se destruye el tejido circundante del hospedero. Sin embargo, una pequeña proporción de los bacilos sobreviven en un estado fisiológico alterado que da lugar a la TBL ¹³. En estas condiciones, las bacterias adaptan su metabolismo para sobrevivir y reducen su tasa de replicación. Se ha postulado que las micobacterias permanecen en un estado latente dentro de los macrófagos sin ser eliminadas, gracias a la capacidad que tienen de poder alterar la acidificación del fagosoma y evitar la fusión fagosoma-lisosoma ¹⁴. Aunque se han hecho varios estudios, aún no se conoce a detalle cuales son los componentes específicos responsables de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune que utiliza la micobacteria.

Cuando ciertos microorganismos se encuentran en condiciones de escases de nutrientes y otras condiciones que implican un estado de estrés, se mantienen en un estado donde se reduce su tasa de crecimiento y, por lo tanto, se reduce su replicación y la expresión de los ARNr, ARNt y ARNm disminuye ¹⁵. También disminuye la síntesis de proteínas, la función de algunos sistemas de transporte, la actividad de la ARN polimerasa, el metabolismo de los hidratos de carbono y de fosfolípidos, entre otros. Todas estas variaciones y cambios por los que pasa la micobacteria se les conoce como “*respuesta estricta*” ^{1,15,16}.

Estudios actuales demuestran que la infección latente puede persistir en los tejidos sin evidencia histológica de infección ¹⁷. Estudios en biopsias de personas que murieron por causas no asociadas a la TB, han evidenciado la presencia de bacilos y/o ADN de *M. tuberculosis* en tejidos histopatológicamente normales. Estos resultados indican que el bacilo latente se encuentra contenido no solo en los granulomas. Hernández-Pando y cols. 2012, encontraron ADN de *M. tuberculosis* en

diferentes órganos, por ejemplo, en los pulmones, el hígado, el bazo y los riñones de personas que murieron por causas ajenas a la TB ¹⁷. Otro hallazgo importante en este estudio es que algunos de los individuos estaban infectados con más de un genotipo (cepa), lo que indica múltiples infecciones a lo largo de su vida. Además, otros estudios han demostrado la presencia de *M. tuberculosis* en adipocitos, los cuales pueden ser refugio en el que son inadvertidos por el sistema inmune ¹⁸. Cuando *M. tuberculosis* infecta otros órganos se le dice que es una tuberculosis extra pulmonar.

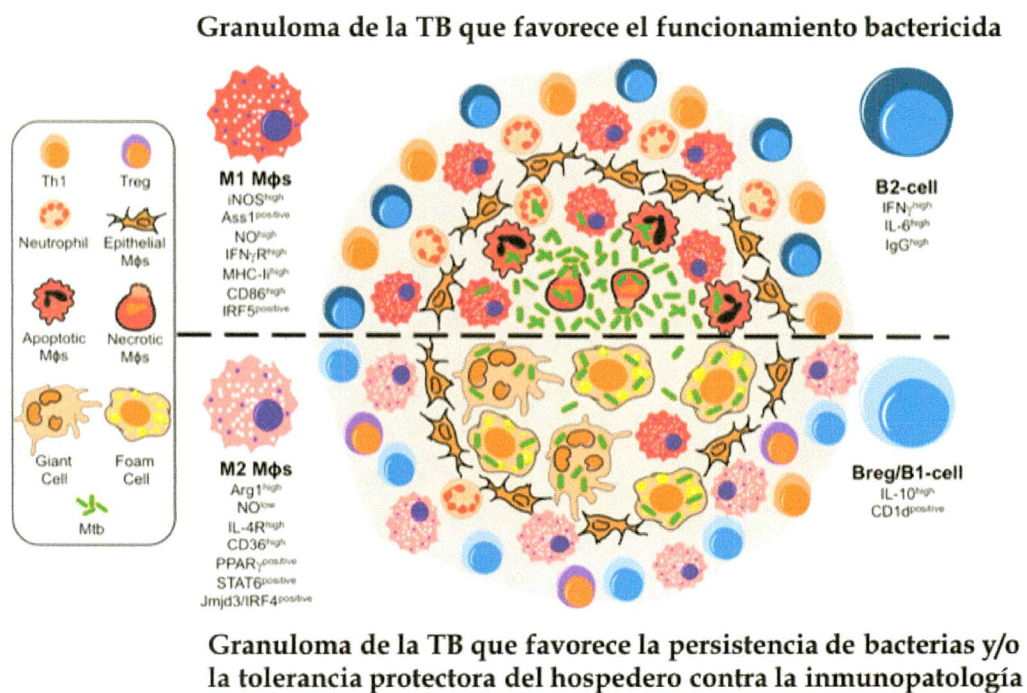


Figura 6. Granuloma tuberculoso. En los humanos y los primates se pueden presentar dos tipos de granulomas que se forman. **a)** *Granuloma tuberculosos clásico*, que se forma durante una enfermedad activa y la infección latente, este granuloma se compone de macrófagos epiteliales, neutrófilos, linfocitos (CD4+, CD8+ y B) y rodeado por fibroblastos. En el centro se encuentran estáticas, es un estado necrótico que se compone de macrófagos y células muertas. Esta zona es hipóxica. **b)** El granuloma no necrotizante generalmente se observa en la enfermedad activa y se conforma de macrófagos y algunos linfocitos, *M. tuberculosis* se encuentra dentro de los macrófagos. **c)** Granuloma fibrótico, esta lesión se encuentra durante la infección latente y a veces en la enfermedad activa y se compone principalmente de fibroblastos y escasos macrófagos. La variedad de estas lesiones proporciona a la micobacteria diferentes microambientes. Tomada de Clifton E. Barry ⁷².

Para entender el estado de latencia se han desarrollado diversos modelos para inducir tanto *in vitro* como *in vivo* la latencia. Los primeros consisten en la aplicación de estrés hipóxico; muchos investigadores reportan buenas respuestas y cambios significativos

en el microorganismo cuando se reducen las concentraciones de oxígeno en los cultivos de *M. tuberculosis* ¹⁹.

Es importante entender que es lo que sucede con *M. tuberculosis* durante la infección latente, cómo el saber: ¿cómo se mantiene viva la micobacteria?, ¿que factores inducen la reactivación de la micobacteria?, ¿qué genes participan mientras la micobacteria se encuentra en un estrés hipóxico?, ¿el factor promotor de la resucitación *rpfC* puede inducir crecimiento en las micobacterias?, ¿RpfC podría promover la reactivación de *M. tuberculosis* mientras se encuentra en estado latente? y ¿qué efecto tiene la sobreexpresión de *rpfC* en la expresión de genes asociados a la latencia? entre otras cosas. Sin embargo, para lograr responder estas preguntas y lograr tener un mayor conocimiento de lo que sucede en la TBL y la reactivación de *M. tuberculosis*, falta realizar más estudios, además de que existen limitantes para llevarse a cabo, como por ejemplo, la dificultad para diagnosticar pacientes con tuberculosis latente y, por otro lado tratar de simular el estrés en el que se encuentra la micobacteria durante la latencia dentro de los granulomas es complicado. Se han tratado de desarrollar varios modelos *in vitro* que simulen las condiciones de un estado latente sometiendo a la bacteria un tipo de estrés similar. Existen diferentes modelos, cómo la reducción de nutrientes, inducir un pH ácido y la hipoxia progresiva ¹.

Concentración de oxígeno en los tejidos.

La concentración de oxígeno es importante para este trabajo, ya que se ha vinculado con una serie de procesos patológicos, y que en conjunto se conocen como estrés oxidativo. A nivel del mar la presión barométrica es de 760 mmHg y la presión parcial de oxígeno (PO₂) de inspiración es de 160 mmHg, considerando que los humanos respiran un 21% de O₂ ²⁰. A su paso por las vías respiratorias, el aire se humedece y por influencia de la presión de vapor a nivel alveolar la PO₂ disminuye a un valor aproximado de 110 mmHg. Durante el transporte de O₂ en la sangre a los

tejidos, la PO_2 disminuye 90 mmHg, en los capilares a 40 mmHg (Fig. 7-A). Se cree la PO_2 intersticial es de 10 a 20 mmHg y a nivel de la membrana celular es de 10 mmHg, mientras que en la mitocondria oscila entre 1 y 5 mmHg ²⁰.

Principalmente el transporte de oxígeno se da por la hemoglobina mediante la internalización del O_2 durante la inspiración y solo una pequeña parte de O_2 se encuentra soluble, ya que es tóxico ²¹. En la figura 7-B se muestra la concentración de PO_2 durante el transporte de O_2 de los pulmones en el compartimiento alveolar hasta el sanguíneo.

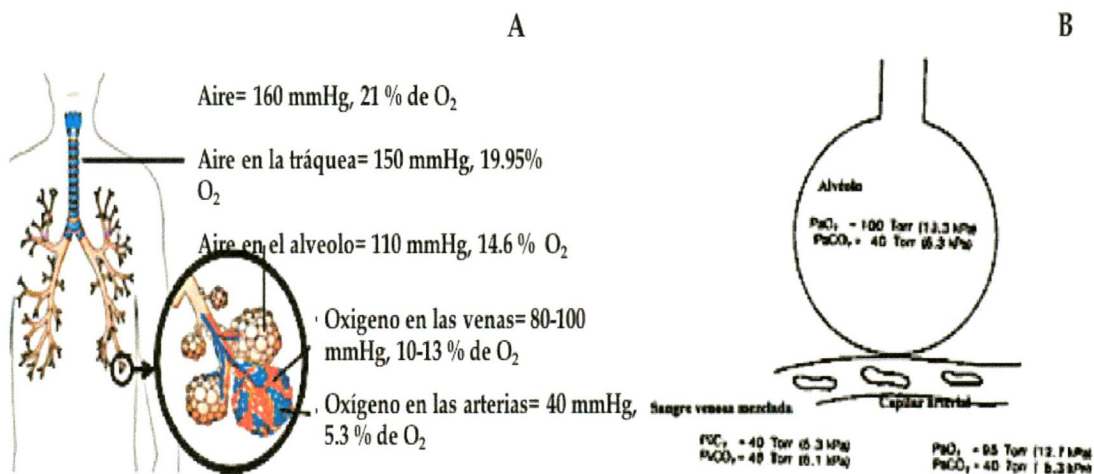


Figura 7. A) Entrega de oxígeno de la atmósfera a la sangre. B) Presiones parciales de los gases en el compartimiento alveolar y sanguíneo. Los valores de los gases se expresan en unidades Torr (mmHg) o en Kilopascales (Kpa) ²², para convertir los milímetros de mercurio en Kpa se debe multiplicar por 0.1333. Tomado de Carreau, A y cols ²².

El suministro y difusión del O_2 son necesarios en las células para su supervivencia. La presión parcial de oxígeno (PO_2) es un componente importante para el estado fisiológico de un órgano, ya que brinda un equilibrio entre el suministro y consumo del O_2 ²¹. Por ejemplo, en condiciones fisiológicas normales, los órganos y tejidos se

caracterizan por su “normoxia”. Sin embargo, este equilibrio puede verse perturbado durante condiciones asociadas a la disminución de la PO_2 , a lo que se le dice que es una condición de “hipoxia”²¹. La demanda de O_2 es la cantidad de O_2 requerida por los tejidos para mantener el metabolismo aeróbico, esta demanda de O_2 clínicamente es difícil de medir porque está determinada a nivel tisular y, cuando esta demanda de O_2 excede su consumo se desarrolla un metabolismo anaerobio²², se sabe también, que la disminución de O_2 conlleva a una generación de óxido nítrico o la producción de (NO) conlleva una disminución en el O_2 ²⁰.

En el caso de los cultivos celulares *in vitro*, se necesita crear un microambiente óptimo para que las células mantengan su actividad, se utiliza un 79% de nitrógeno, 21% de oxígeno y se complementa con un 5% de dióxido de carbono, de esta manera se obtiene como total un 19.95% de O_2 . Por lo tanto, en condiciones de cultivo, la concentración de oxígeno es de 150 mmHg, lo que equivale a una atmósfera con 20% de O_2 . En la sangre la PO_2 oscila entre 75 y 100 mmHg, lo que equivale de 10 a 13 % de O_2 ²³, por lo que en los cultivos *in vitro*, las células se someten a una mayor saturación de O_2 y sin considerar que la PO_2 en los tejidos tiene niveles inferiores al de la sangre²³.

La sangre oxigenada se distribuye en cada tejido según su función y sus necesidades, estos difieren de un tejido a otro (Tabla 1). Por consiguiente, se establece un equilibrio entre el suministro, consumo, pérdida y la recuperación del O_2 . Por esta razón los diferentes tipos de células su estado normóxico es heterogéneo²¹.

Tabla 1. Valores normales de PO₂ en los diferentes tejidos humanos, expresados en mmHg y en porcentaje de oxígeno en el microrambiente.

	mmHg	% de Oxígeno /PO ₂
Aire	160	21.1
Aire inspirado (tráquea)	150	19.95
Aire en el alveolo	110	14.5
Sangre arterial	100	13.2
Sangre venosa	40	5.3
Célula	9.9-19	1.3-2.5
Mitocondria	<9.9	<1.3
Cerebro	33.8 +/- 2.6	4.4 +/- 0.3
Pulmón	42.8	5.6
Piel (papilas dérmicas)	24 +/- 6.4	3.8 +/- 0.8
Piel (región superficial)	8 +/- 3.2	1.1 +/- 0.4
Tejido intestinal	57.6 +/- 2.3	7.6 +/- 0.3
Hígado	40.6 +/- 5.4	5.4 +/- 0.7
Riñón	72 +/- 20	9.5 +/- 2.6
Músculo	29.2 +/- 1.8	3.8 +/- 0.2
Médula ósea	48.9 +/- 4.5	6.4 +/- 0.6

Modificada de Carreau, A y Cols ²².

Modelos de latencia.

Los modelos *in vitro* de latencia difieren de la célula *in vivo*, sin embargo, se trata de modelos que puedan acercarse a lo que sucede en la interacción hospedero-patógeno, entender lo que sucede durante latencia. Existen varios modelos reconocidos que se utilizan en las investigaciones para inducir un estado latente en la micobacteria. Estos modelos tienen características que los hacen particulares, por ejemplo, la restricción del crecimiento bacilar y la reducción del metabolismo, por mencionar algunos ¹.

Modelo de inanición de nutrientes

Realizado por Hobby y Lenert, consiste en eliminar la fuente de carbono durante la fase de crecimiento logarítmica y como resultado, los bacilos muestran una disminución en el mecanismo de transcripción, en el metabolismo energético, en la biosíntesis de lípidos y la división celular ²⁴.

Modelo de hipoxia progresiva

Es uno de los modelos más usados para inducir en la bacteria un estado latente. Este modelo consiste en exponer a los bacilos a una hipoxia progresiva *in vitro*, además, este modelo trata de mimetizar las condiciones que la micobacteria encontraría en el granuloma, aproximándose más al estado latente *in vivo*. Este modelo también es conocido como modelo de Wayne, el cual consiste en mantener los cultivos con una agitación moderada en una atmósfera con una relación del 5% de oxígeno que posteriormente se disminuye hasta llegar a un 0.06% de O₂. Bajo estas condiciones las micobacterias presentan ciertas características que comprueban que se encuentran bajo estrés, por ejemplo, se reduce su metabolismo, así como su replicación y transcripción ¹.

Modelo de múltiple de estrés

Como se mencionó anteriormente, un solo modelo de latencia *in vitro* no puede representar como tal lo que ocurre dentro de la célula, por lo que se complementan unos a otros. Un modelo más reciente que intenta aproximarse más a la realidad consiste en combinar diferentes tipos de estrés, en este, se incluye hipoxia (5% O₂ y 10% de CO₂), la disminución de nutrientes y el mantener un pH ácido (5.0) en medio de cultivo ²⁵. En este modelo, los bacilos detienen su crecimiento y a causa de esto las bacterias almacenan lípidos, pierden sus propiedades de tinción ácido-alcohol resistentes y se vuelven tolerantes a ciertos antibióticos. Estudios de la expresión global génica de *M. tuberculosis* en estas condiciones de estrés han demostrado que hay una regulación negativa de las rutas biosintéticas, al igual que en los mecanismos de replicación y traducción ²⁵.

Genes implicados en la latencia de *M. tuberculosis*.

En esta sección se tratará de resumir los estudios moleculares más recientes sobre el estudio de genes implicados en la latencia de *M. tuberculosis*, así mismo, sus funciones principales y las razones por las cuales son importantes en este mecanismo (Tabla 2). Desde hace tiempo se cree que el metabolismo de los lípidos tiene un papel importante en la patogénesis de la tuberculosis, dado que *M. tuberculosis* utiliza los ácidos grasos como fuente de carbono y así obtiene energía que le sirve para sobrevivir por un largo tiempo dentro del hospedero²⁶. El genoma de *M. tuberculosis* contiene un gran número de genes que codifican para enzimas que participan en la β -oxidación de ácidos grasos de cadenas par e impar que se degradan y forman acetil coenzima A o propionil coenzima A²⁷.

En un estudio en ratones se mostró que la persistencia de *M. tuberculosis* se ve facilitada por una enzima esencial del metabolismo de ácidos grasos (isocitrato liasa). La interrupción del gen que codifica esta enzima IclL atenúa la persistencia bacteriana y la virulencia en ratones inmunocompetentes, pero no afecta el crecimiento bacteriano durante la fase aguda de la infección. La activación de macrófagos infectados por *M. tuberculosis* aumenta la expresión de IclL, sin embargo, esto no sucede cuando los macrófagos se encuentran en reposo, estos datos sugieren que el metabolismo de *M. tuberculosis in vivo* está influenciado por la respuesta inmune del hospedero como sucede durante el estado latente de *M. tuberculosis*³⁰.

Tabla 2. Genes implicados en la latencia de *M. tuberculosis*

Rv. Num.	Gen	Función
Rv0126	<i>tresS</i>	Trehalosa sintetasa. Implicada en la biosíntesis de trehalosa. Convierte la maltosa en trehalosa.
Rv0350	<i>hsp70</i>	Proteína de choque térmico 70. La sobreexpresión de esta proteína reduce la supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> en la fase crónica de la infección.
Rv0353	<i>hspR</i>	Proteína de choque térmico R. Las cepas de <i>M. tuberculosis</i> que sobreexpresan <i>hspR</i> son virulentas en la primo-infección, sin embargo, al llegar a la fase crónica de la infección se reduce significativamente la persistencia de <i>M. tuberculosis</i> .
Rv0467	<i>icl</i>	Isocitrato liasa. Participa en el metabolismo de los ácidos grasos. Su delección reduce la supervivencia del bacilo en ratones inmunocompetentes.
Rv0470c	<i>pacA</i>	Ciclopropano sintasa. Participa en la síntesis del anillo ciclopropano de ácido micólico en la pared celular de <i>M. bovis</i> BCG y <i>M. tuberculosis</i> .
Rv0820, Rv0930	<i>phoT</i> , <i>pstA</i>	Proteína de transporte de fosfato. La subexpresión del gen <i>phoT</i> causa una disminución en la concentración de fosfato en la micobacteria durante la infección pulmonar en mamíferos, así como la disminución del crecimiento en <i>M. tuberculosis</i> .
Rv0981, Rv0982	<i>mprA</i> , <i>mprB</i>	Regulador de dos componentes cuya expresión es necesaria para la entrada y mantenimiento de la infección persistente de <i>M. tuberculosis</i> . La supresión del gen afecta negativamente el crecimiento de las micobacterias.
Rv1221	<i>sigE</i>	Factor sigma extra citoplasmático E, aumenta su expresión en respuesta a estrés oxidativo y dentro del fagosoma de los macrófagos.
Rv1736	<i>narX</i>	Nitrato reductasa, aumenta su expresión durante la hipoxia y en granulomas humanos.
Rv1737c	<i>nark2</i>	Promotor de la proteína nitrato Nark2, induce la latencia tras el agotamiento de O ₂ en <i>M. bovis</i> .
Rv2031	<i>hspX</i>	Proteína alfa cristalina, es un antígeno inmunodominante y actúa como chaperona molecular. La proteína se localiza en la pared celular de <i>M. tuberculosis</i> en la fase estacionaria tardía.
Rv.1908c	<i>katG</i>	Catalasa peroxidasa. Factor de virulencia. Su sobreexpresión aumenta la supervivencia de las micobacterias.
Rv2710	<i>sigB</i>	Factor sigma B, se expresa durante la adaptación del bacilo a la fase estacionaria de crecimiento y en ambientes pobres de nutrientes.
Rv3132c	<i>dosR</i>	Regulador DosR, forma parte de un sistema de dos componentes de respuesta a la hipoxia y se cree que puede mediar la transición de <i>M. tuberculosis</i> a la latencia.
Rv3223c	<i>sigH</i>	Factor sigma H, se expresa en respuesta a estrés, regula la expresión de proteínas estructurales, proteínas de reparación del ADN y mantiene la persistencia en <i>M. tuberculosis</i> .
Rv3286c	<i>sigF</i>	Factor sigma F, participa en la regulación de la expresión de genes en la fase estacionaria temprana y tardía. Tiene un papel en la supervivencia micobacteriana en condiciones de estrés.
Rv3416	<i>whiB3</i>	Involucrado en la regulación transcripcional (dependiente de la fase de crecimiento).

Modificado de Petros C. Karakousis ¹.

Se ha sugerido que la acumulación de lípidos está ampliamente relacionada con la supervivencia de *M. tuberculosis* en el hospedero y con cierta resistencia a los antibióticos. En un estudio donde hicieron una mutante de *M. tuberculosis* deficiente de triacilglicerol sintetasa 1 (codificada por *tgs1*) esta mostró una limitada capacidad para acumular triacilglicerol y una menor resistencia a los antibióticos ²⁵.

Además del metabolismo de lípidos, se han relacionado otras vías metabólicas con la supervivencia a largo plazo de *M. tuberculosis* en el hospedero, por ejemplo, *menA* que está relacionado con la biosíntesis de la menaquinona requerida para la síntesis de ATP, y *cydC* que codifica para un transportador de citocromo bd, necesario para producir energía durante la hipoxia en la infección latente ^{1,28,29}.

En un análisis de expresión en un modelo *in vitro* de persistencia de *M. tuberculosis* se demostró que los bacilos necesitan componentes de la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP para su supervivencia. Además, se sugirió que estos componentes son blanco de los derivados de aminoalcoxi difenilmetano, los cuales inhiben la síntesis de menaquinona y estos resultados podrían prometer el desarrollo de nuevos fármacos para combatir los bacilos persistentes y la infección latente ²⁹.

M. tuberculosis utiliza ácidos grasos y el catabolismo del colesterol para llevar a cabo el metabolismo de la derivación del glioxilato y la gluconeogénesis. En un estudio con ratones infectados crónicamente se demostró que durante la infección se sobreexpresan los genes *pckA* y *glpx* ³⁰. Estos son dos de los genes principales en la gluconeogénesis; *pckA* codifica para fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, mientras que el gen *glpx* codifica para una fructosa 1,6-bisfosfatasa en la cepa BCG ³¹. Estos resultados demuestran que el uso de ácidos grasos como fuentes de carbono ayudan a mantener la infección crónica y la supervivencia en bacilos persistentes en una infección latente de *M. tuberculosis* ¹.

Gracias a los estudios recientes, se ha sugerido que las adaptaciones metabólicas de *M. tuberculosis* durante la infección *in vivo* refleja una respuesta adaptativa en lugar de una respuesta a la disponibilidad de los nutrientes modificados ¹.

Sensores redox intracelulares

El gen *whiB* es un sensor que reacciona en respuesta de la presencia de oxígeno y nitrato, entre otras señales metabólicas, y es importante para mantener estable el equilibrio redox ^{32,33}. Sin embargo, se tienen estudios que demuestran que *whiB* participa como regulador fisiológico del anabolismo de lípidos y la vía de señalización DosR-DosT. Esta vía participa en la respuesta a la hipoxia progresiva y la latencia en *M. tuberculosis*. Se sugiere que *whiB* mantiene la homeostasis redox intracelular después de la infección, esta vía se mantiene encendida durante la quiescencia de *M. tuberculosis*, así como en el modelo *in vitro* de hipoxia progresiva ³². En este modelo, también se identificaron 58 genes que son dependientes de la expresión de *whiB*, entre los que destacan los sistemas de secreción *Esx-2* y *Esx-4*, y el gen *sigM* que codifica para el factor sigma alternativo que promueve la unión de la ARN polimerasa en sitios de iniciación específicos y posteriormente se libera ³².

Factores transcripcionales

Los factores sigma son factores transcripcionales que regulan la expresión de muchos de los genes bacterianos. Es común que las bacterias contengan este tipo de genes que, además de desempeñar un papel en la regulación transcripcional, también cumplen una función importante en la regulación de genes involucrados con algunos tipos de estrés. En *M. tuberculosis* existen 13 factores sigma, lo que indica la capacidad que tienen las micobacterias para adaptarse a diferentes condiciones ambientales ³⁴. Los más importantes son: *sigB*, *sigE* y *sigH*. Estos factores son componentes de la ARN polimerasa, que se unen a las subunidades principales de la enzima y le brindan especificidad al promotor ³⁵.

El factor *sigB* es el más estudiado en *M. tuberculosis* y, al parecer, desempeña un papel importante en la respuesta al daño de la pared celular ³⁴, además de que también se expresa en condiciones de hipoxia ³⁶. El factor *sigE* (factor sigma extra citoplasmático) se expresa durante la fase exponencial de crecimiento en la micobacteria, en condiciones de estrés térmico y al inicio de la fase estacionaria ⁶. La supresión de *sigE* produce una disminución de genes que codifican para factores transcripcionales, enzimas del metabolismo de ácidos grasos y proteínas de choque térmico, y reduce la viabilidad de *M. tuberculosis* tanto en macrófagos activados como en los no activados ³⁷. El factor *sigH*, regula genes estructurales, por ejemplo, la tiorredoxina que actúa como antioxidante, implicada en la en el mantenimiento de la reducción de otras proteínas. Estos resultados demuestran que *sigH* es prescindible para el crecimiento bacteriano y la supervivencia en el hospedero ³⁸.

Respuesta a estrés hipóxico

Se sabe que en *M. tuberculosis* la respuesta a la hipoxia está controlada por el sistema de dos componentes *dosRS* ³⁶. DosRS induce la transcripción de aproximadamente 50 genes, entre los cuales, los más representativos son la nitrato reductasa *narX* y los de protección contra el estrés de nitrógeno como la nitrito reductasa *acg* ¹⁹. Durante la hipoxia *dosR* se expresa aproximadamente 80 veces más y, por lo tanto, se induce la transcripción de *hspX*, que codifica para la proteína de 16 kDa también conocida como alfa-cristalina. Esta proteína es un antígeno inmunodominante que es reconocido por la mayoría de los pacientes que tienen TB activa ¹⁹. La alfa cristalina es miembro de la familia de proteínas de choque térmico alfa-cristalina (alfa-Hsp) que, además, actúa como una chaperona molecular que previene la agregación de otras proteínas inducidas por choque térmico ³⁹. También se ha reportado que esta proteína se encuentra presente en la pared celular engrosada, cuando la micobacteria se encuentra en la fase de crecimiento estacionaria tardía ⁴⁰. Al suprimir la expresión de *dosR* (gen que controla *hspX*), se produce un fenotipo de hipervirulencia en el modelo murino y en macrófagos activados ⁴¹.

Sistema *dosR-dosS-dosT*

Estudios posteriores mostraron que junto con el sistema DosRS participa la proteína DosT, conformando un sistema de tres componentes *dosR-dosS-dosT* (también conocido como *devR*). Este sistema es importante, ya que en un estudio en el que desarrollaron un nuevo modelo *in vivo* de TBL utilizando granulomas artificiales en ratones (estas lesiones son un importante reservorio de micobacterias persistentes durante una TBL), demostraron que las micobacterias presentaron una reducción en su actividad metabólica, característica del estado latente. Posteriormente, al realizar ensayos de expresión, demostraron la inducción del gen *dosR* (Rv3133c), entre otros 20 genes que son regulados por el sistema *devR* que, en conjunto, podrían mediar la transición de *M. tuberculosis* a la latencia ⁴². Por lo tanto, pueden jugar un papel importante en la adaptación de la micobacteria al estrés hipóxico. En este sistema, *DosT* y *DosS* se fosforilan y posteriormente activan a *DosR* ^{43,44}. La proteína DosR (regulón *DosR*) se activa durante la latencia y actúa sobre diversos genes cuando se somete a *M. tuberculosis* a una hipoxia progresiva. Entre estos genes se encuentran: *hspX*, *narX*, *nark2* y *fdxA* (que participan en la acumulación de nitratos y el transporte de electrones), *nrdZ* (que sintetiza trifosfato de desoxinucleosido en condiciones microaeróbicas) y *tgsl* (triglicerido sintetasa, que participa en la resistencia a daño en el ADN) ¹. Como se mencionó anteriormente, algunos de los genes regulados por DosR están relacionados con la obtención de energía a partir de fuentes alternativas de carbono, tales como el metabolismo de ácidos grasos y activación de genes que codifican enzimas involucradas en la reducción de nitrato ⁴⁵.

Diversos estudios han demostrado la expresión de DosR en condiciones de hipoxia. Teneja y cols ⁴⁶ reprodujeron un ambiente hipóxico utilizando ácido ascórbico para eliminar el oxígeno del medio y la creación de un ambiente hipóxico ^{46,47}. Honaker y cols. utilizaron un sistema de transportes de electrones que reacciona con el oxígeno y demostraron que se induce específicamente la expresión del gen *dosS* ⁴⁷; y por último, está el modelo de hipoxia perdurable, que consiste en dejar los cultivos en hipoxia por un largo tiempo, en el que se expresan los genes *sigE*, *sigH* y *dosR*. Al hacer

mutaciones en *dosR* se encontró que este gen es uno de los principales componentes que media la señal de respuesta a la hipoxia en *M. tuberculosis*^{1,45}.

Antecedentes particulares

Factores promotores de la resucitación

Los factores promotores de la resucitación (rpf's) codifican proteínas de secreción que se reportaron por primera vez en *Micrococcus luteus*. En *M. luteus* solo existe una proteína Rpf⁴⁸. Gracias a estudios de secuencia y de estructura de dominios se encontró que esta proteína tiene un segmento de 70 aminoácidos al que se denominó "dominio Rpf", y se demostró que este dominio es indispensable para *M. luteus*⁴⁸.

La proteína Rpf de *M. luteus* posee actividad muralítica, además de tener similitud con la lisozima de tipo C, y de tener actividad de transglicosilasa lítica soluble (Fig. 8)⁴⁹. Todas las Rpf's comparten un dominio conservado de 70 aminoácidos que tiene la capacidad actuar de forma similar a la lisozima².

Hay otros microorganismos que también poseen este tipo de factores. Estos organismos comparten características como el ser Gram-positivos y tener un alto contenido de G+C. Entre los más importantes se encuentran *M. smegmatis* y *M. bovis* (BCG), entre otros que pertenecen a géneros diferentes (Tabla 3). En el genoma de *M. tuberculosis* se encontraron cinco genes homólogos a Rpf (*rpfA-E*). Sin embargo, aunque ya se conoce de la estructura y su función de estimulación en el crecimiento de *M. luteus*, aún falta entender más sobre su función y mecanismo de acción en *M. tuberculosis* durante el proceso de reactivación de la micobacteria y la inducción al crecimiento.

Los estudios estructurales de los dominios Rpf's de *M. tuberculosis* tienen varias características particulares como: un dominio lisozima C y un glutamato conservado en el sitio activo de los cinco rpf's que posee *M. tuberculosis*⁵⁰, además, también tienen sitios de fijación al peptidoglucano (dominios LysM), secuencias señal para su secreción y alfa hélices transmembranales (RpfB).

Tabla 3. Organismos que contienen los genes *rpf's*

Organismo	Tamaño del genoma (Mb)	No. De Rpf's
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	2.5	3
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	3.3	2
<i>Corynebacterium efficiens</i>	3.1	2
<i>Micrococcus luteus</i>	2.3	1
<i>Mycobacterium avium</i>	4.7	4
<i>Mycobacterium bovis</i>	4.3	5
<i>Mycobacterium leprae</i>	3.3	3
<i>Mycobacterium marinum</i>	6.5	4
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	7	4
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	4.4	5
<i>Streptomyces coelicolor</i>	8.7	5

Tomada de Ravagnani, C. y cols².

Estudios recientes proponen que los Rpf's participan induciendo la resucitación de la micobacteria haciéndola pasar de un estado latente a uno normal. Sin embargo, a pesar de que hay pruebas circunstanciales que sugieren que los microorganismos persistentes pueden encontrarse en estados fisiológicos que se caracterizan por una alteración en su cultivabilidad (la capacidad de formar colonias), no se sabe lo que

sucede exactamente para que la micobacteria logre reactivarse. Se sabe que las formas recombinantes de los *rpfA-E* de *M. tuberculosis* tienen una función biológica similar a la observada en *M. luteus*⁴⁹. Además los *rpf*'s son prescindibles para el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *M. tuberculosis*⁴⁹.

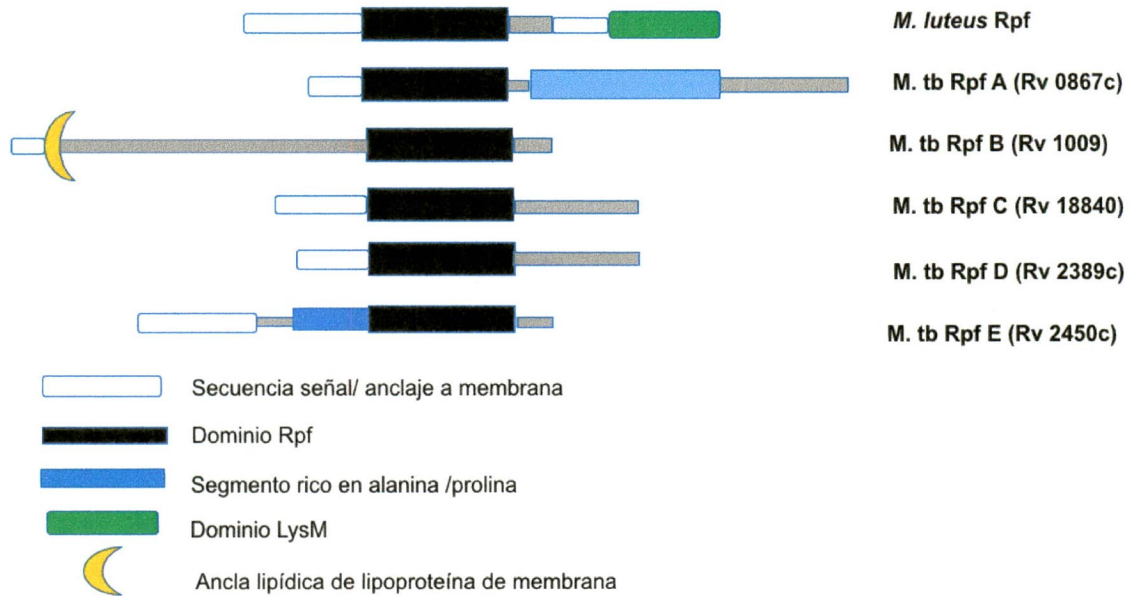


Figura 8. Estructura del dominio *rpf*. En la figura se presenta la estructura del dominio Rpf de *M. luteus* y además se presentan las cinco estructuras de las proteínas (RpfA-E) de *M. tuberculosis* (modificado a partir de Mukamolova²).

Actualmente el objetivo de muchas investigaciones es detectar y lograr prevenir la reactivación de la TBL, y contar con marcadores diagnósticos y pronósticos de utilidad en los individuos que tienen un mayor riesgo de desarrollar TB por reactivación de la TBL, entre los que se incluyen aquellos individuos con VIH/SIDA, con enfermedades sistémicas crónicas, enfermedades renales, tratamiento con inmunosupresores, trasplantes, cáncer, quimioterapias y diabetes¹. Es por ello que los científicos se han interesado en estudiar a fondo a los factores promotores de la

resucitación (*rpf's*), su función biológica y el papel que juegan en relación con la infección latente y su reactivación.

Importancia biológica de los factores promotores de la resucitación

A partir de los análisis *in silico* y los experimentos realizados en *M. luteus* para caracterizar a las proteínas Rpf's, se han buscado genes homólogos en otros microorganismos para encontrar cual es la importancia biológica de los genes *rpf*. Los primeros ensayos se hicieron mediante la incorporación de Rpf's en los medios de cultivo de *M. luteus* y *M. smegmatis*, y se demostró que cuando se inoculan en baja densidad celular, su fase de latencia se reduce visiblemente en respuesta a la incorporación de los Rpf's ⁵¹, mientras que en *M. tuberculosis* las proteínas RpfA, RpfC, RpfD y RpfE también reducen la fase de latencia ⁵². En estos estudios también se descubrió que se deben utilizar inmediatamente las proteínas Rpf ya que cuando se almacenan pierden su actividad biológica ².

Mediante ensayos de coprecipitación se demostró que algunos de los Rpf's interactúan con otras proteínas, lo que ayuda a formar complejos proteicos que facilitan la adhesión al peptidoglucano, y es por ello que se hace más complicado el estudio de la función y regulación de los Rpf's ⁵³. Los primeros experimentos acerca de los *rpf's* se realizaron utilizando cultivos con ayuno de nutrientes suplementados con un ácido débil y las proteínas RpfA-E recombinantes, observándose que los cultivos tenían mayor viabilidad y, que a pesar de tener un tiempo largo de incubación, los bacilos mostraban un mejor crecimiento ⁵².

Los factores promotores de la resucitación de *M. tuberculosis* son las primeras proteínas que se han encontrado con la función de inducir la reactivación a la TBL ⁵⁴, además de que promueven la supervivencia de los bacilos en ratones infectados ¹. Estudios recientes demostraron que al estimular cultivos de muestras clínicas con los Rpf's, se mejoró su cultivabilidad de las micobacterias en > 80% las muestras de

esputo, y también mejoró la recuperación de unidades formadoras de colonias (UFC)
55.

Estudios de mutagénesis dirigida a los sitios activos de los Rpf's revelaron que la función enzimática de estas proteínas es indispensable en el proceso de resucitación y persistencia de *M. tuberculosis* ⁵⁶. Los cinco genes *rpf* (A-E) se localizan de forma dispersa en el genoma de *M. tuberculosis*. Los genes *rpfA* y *rpfE* se encuentran en operones monocistrónicos, mientras que en los restantes *rpf*'s en operones policistrónicos ³⁶. En estudios *in silico* se encontró que en el extremo 3' del gen *rpfB* hay un solapamiento de aproximadamente 25pb con el gen *KsgA* (codifica para una transferasa dimetiladenosina), mientras que *rpfD* se encuentra río abajo de un gen con función desconocida y *rpfC* es el tercer gen de un operón de siete genes entre los que se encuentra una micoliltransferasa (*fbpB*) y en río abajo se encuentran genes que codifican para una deshidrogenasa, una lipoproteína y un citocromo P450 ⁶. De acuerdo a lo expuesto anteriormente se concluye que no hay una clara función biológica que determine que participen en conjunto, por lo tanto, se sugiere que estas cinco proteínas RpfA-E se activan y actúan mediante mecanismos o vías diferentes y por separado en *M. tuberculosis* ⁵¹.

Los Rpf's como dianas farmacológicas.

Las proteínas Rpf tienen gran importancia, ya que estudios con *knock-out* de los *rpf*'s confirmaron que tienen una estrecha relación con las micobacterias no cultivables, y que estas proteínas presumiblemente vuelven a las células cultivables ^{49,57}. Aun no se sabe con claridad la manera de como los bacilos se mantienen en un estado latente y como logran reactivarse, sin embargo, se sospecha que estos factores son de suma importancia en estas fases del ciclo biológico de las micobacterias. Además, a partir de haberse comprobado su función en la reactivación en células no cultivables, se han comenzado a desarrollar nuevos fármacos o dianas terapéuticas que impidan la reanimación por *M. tuberculosis* ⁵⁸. Se sabe que tales fármacos tendrán un gran

potencial para la profilaxis de la reactivación de TBL, causada por el uso de anticuerpos anti-TNF⁵⁸.

El papel de las cinco proteínas Rpf's en la resucitación y reactivación de la enfermedad solo se ha demostrado experimentalmente, sin embargo, es necesario realizar estudios aplicados y clínicos para confirmar su importancia biológica. La reactivación de *M. tuberculosis* es un evento muy importante ya que a causa de este proceso las micobacterias se mantienen en el hospedero y, en el momento en el que el sistema inmune de éste se encuentra comprometido, se tiene el riesgo de que se reactive la TB. Es por esta razón, se ha puesto atención a estas proteínas, además de empezar a desarrollar fármacos dirigidos para inhibirlas, pues podrían contribuir para bloquear el proceso de reactivación⁶. Proyectos más ambiciosos como desarrollar vacunas, tomando como base estas proteínas, así como medicamentos que actúen en todas las formas en que se presenta la infección (latente y activa), podrían contribuir a la erradicación de la TB.

JUSTIFICACION

Mycobacterium tuberculosis es capaz de permanecer durante un largo período de tiempo dentro del hospedero en lo que se conoce como tuberculosis latente (TBL), lo que ha dificultado la erradicación de la TB. Una de las principales interrogantes para lograr entender la TBL es el saber que genes expresan *M. tuberculosis* durante la latencia, lo cual ha sido una de las preguntas más interesantes y más difíciles de responder hasta la fecha. El poder entender los mecanismos moleculares relacionados con la supervivencia de la micobacteria en el estado latente, así como determinar las señales específicas que inducen la reactivación de los bacilos, son componentes muy importantes para desarrollar estrategias de control y erradicación de la TB. La búsqueda de los factores que permiten al bacilo reactivarse *in vitro* condujo a la identificación de los factores promotores de la resucitación Rpf, los cuales se ha visto que están involucrados en la reactivación de los bacilos y mantienen la infección sin que se presente sintomatología aparente, debido a que la micobacteria adapta su metabolismo para sobrevivir con una baja o nula replicación, siendo el RpfC uno de los factores más importantes, que además es reconocido por el suero de algunos sujetos sanos, lo que es un indicativo de que se expresa durante la infección latente. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de la sobreexpresión de RpfC en la respuesta de *M. bovis* a la hipoxia.

HIPÓTESIS

La sobreexpresión del factor promotor de la resucitación C en *M. bovis* BCG, induce su crecimiento y regula positivamente la expresión de genes asociados a la latencia cuando se somete a condiciones de hipoxia.

OBJETIVOS

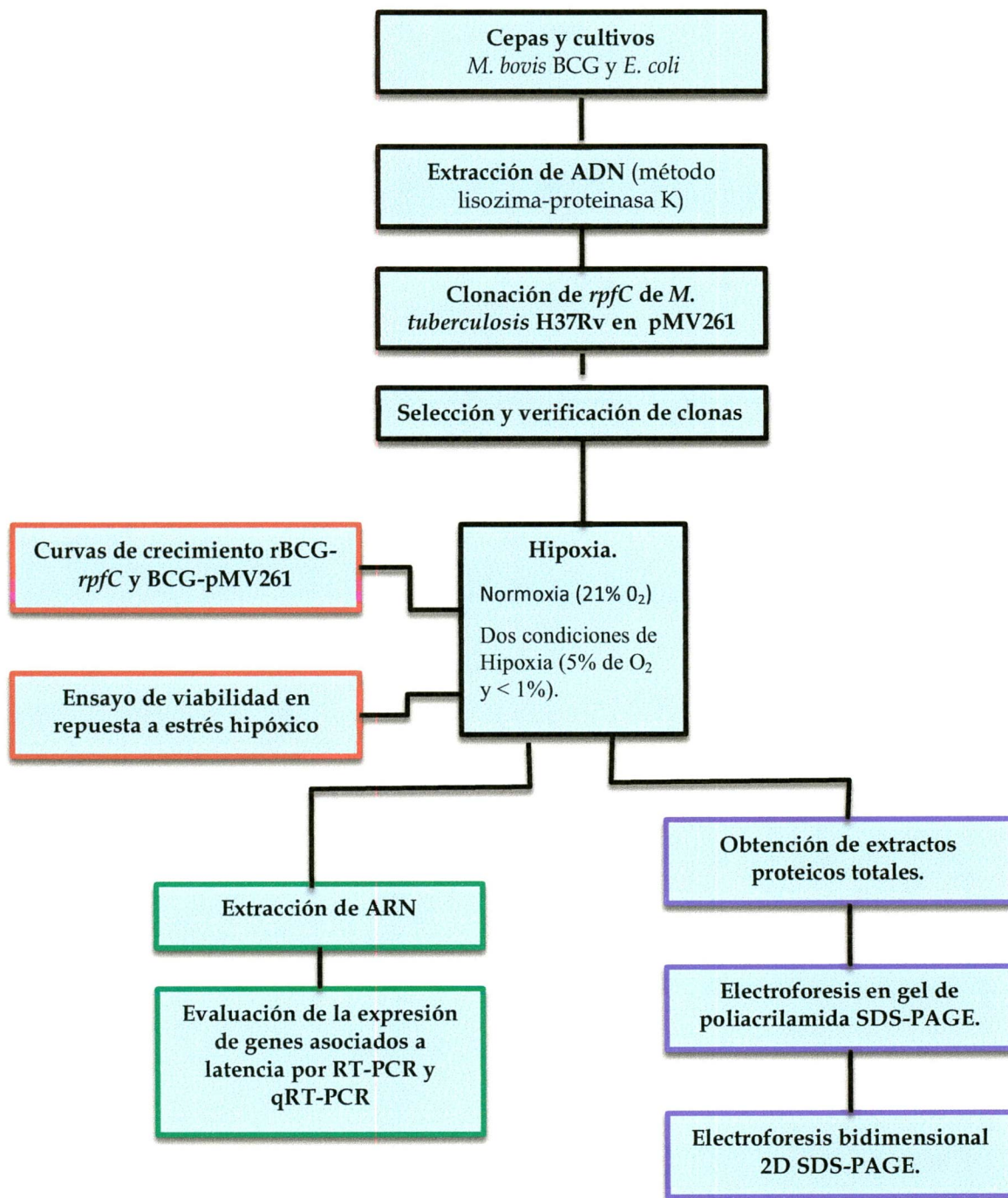
Objetivo general.

Evaluar el efecto de la sobreexpresión del factor promotor de la resucitación C en la respuesta de *Mycobacterium bovis* BCG a la hipoxia.

Objetivos particulares.

- 1) Obtener una cepa recombinante de *M. bovis* BCG que sobreexpresa el factor promotor de la resucitación C.
- 2) Determinar el efecto que tiene la sobreexpresión de RpfC en el crecimiento de *M. bovis* BCG.
- 3) Evaluar el efecto que tiene la sobreexpresión del RpfC en *M. bovis* BCG sobre la expresión de genes asociados a la latencia.
- 4) Evaluar el efecto de la sobreexpresión del RpfC en el proteoma de *M. bovis* BCG en respuesta a la hipoxia.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y METODOS

Cepas y cultivos

En este estudio se utilizó la cepa *M. bovis* BCG Pasteur. Las bacterias se cultivaron hasta su fase media logarítmica de crecimiento en medio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado con ADC (dextrosa-catalasa-albúmina) y 0.05% de Tween-80. Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación constante. Cuando las cepas llegaron a la fase media logarítmica de crecimiento se cosecharon mediante centrifugación a 5000 x g, para así poder eliminar los componentes del medio y la pastilla de bacterias se lavó tres veces con PBS y después se hicieron alícuotas para guardarlas a -70 °C hasta su uso.

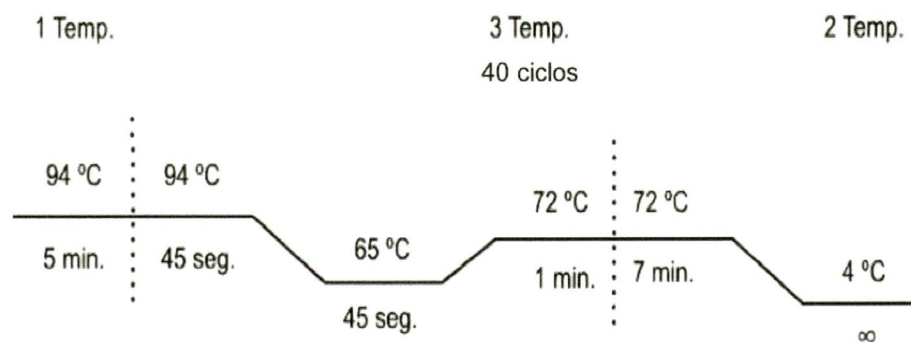
Extracción de ADN de micobacterias (método lizozima-proteínasa K)

Se utilizó 1ml de cultivo saturado de *M. tuberculosis* H37Rv. Se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1ml de buffer TE y después se incubó en baño maría durante una hora a 80 °C. Nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 550µl de amortiguador de lisis [40mM Tris-acetato pH 7.8, 20mM acetato de sodio, 1mM EDTA y 0.5% de Tritón x 100] que contiene lizozima (0.5 mg/ml) y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente se agregaron 100µl de una solución que contenía SDS al 10% y proteínasa K, y de nuevo se incubó en baño maría a 65 °C durante 1 hora; pasada la hora se le agregaron 118µl de NaCl 5M, se mezcló y se incubó a 68 °C por 10 min. Después de haber hecho todos los pasos de incubación se añadieron 500µl de fenol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14,000 rpm por 10min. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó 500µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión durante 5 min y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. Se recuperó la fase acuosa, se le añadieron 500µl

de isopropanol y se dejó incubando a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche. Al día siguiente, para recolectar los ácidos nucleicos se hizo una centrifugación de 15 min a 14,000 rpm, después se descartó el sobrenadante, se añadieron $500\mu\text{l}$ de etanol frío al 70% y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla para después resuspenderla en $50\mu\text{l}$ de agua libre de nucleasas. Se cuantificó el ADN en el espectrofotómetro (NanoDrop 2000) y posteriormente se verificó la integridad del ADN en un gel de agarosa al 1%. Los ácidos nucleicos se visualizaron por tinción con Red-Gel.

Clonación de *rpfC* de *M. tuberculosis* H37Rv

Para amplificar el gen *rpfC* se utilizó ADN de *M. tuberculosis* H37Rv. Se diseñaron los oligonucleótidos a partir de la secuencia del gen *rpfC* reportada en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y adicionando en los extremos las secuencias para las endonucleasas de restricción *HindIII* y *BamHI*. Las condiciones de amplificación del producto *rpfC* fueron:



Posteriormente, para clonar el producto este se purificó a partir de geles de agarosa al 2%. Para realizar la clonación del gen *rpfC* se usó el plásmido pMV261 (Fig. 9). La restricción del plásmido y del pPCR se hizo de forma secuencial mediante el uso de las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*. Para la ligación del producto con el vector pMV261 se usó una relación inserto:vector 3:1 (50ng de vector y 150ng del inserto purificado), $1\mu\text{l}$ de enzima T4 ligasa, $4\mu\text{l}$ del Buffer 5x y la ligación se llevó a cabo durante toda la noche a $16\text{ }^{\circ}\text{C}$.

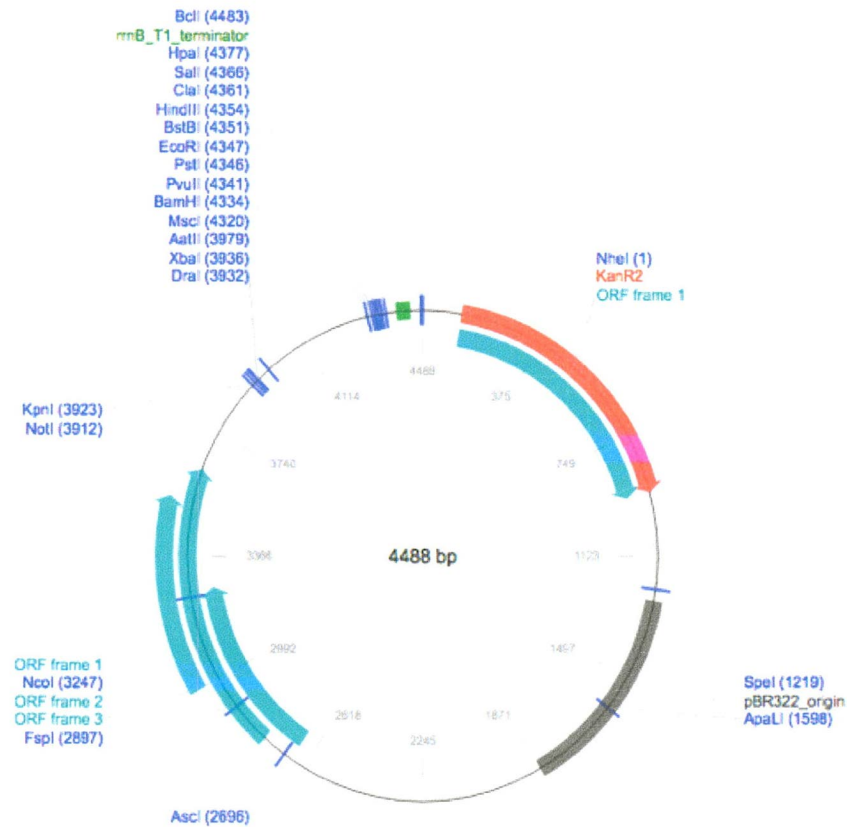


Figura 9. Mapa del plásmido pMV261.

Para obtener las clonas primero se hizo la transformación con células competentes de *E. coli* DH5- \square . Se tomaron y se mezclaron 50 μ l de bacterias competentes más 1 μ l de plásmido pMV261 (100 ng), se incubó durante 20 min en hielo, después se incubó a 42 °C durante 45 seg para provocar un choque térmico. Posteriormente, se incubó en hielo 5 min y después se le adicionaron 500 μ l de medio LB con glucosa y se incubó en agitación a 37 °C durante 45 min en 200 rpm. Por último, se espátula la mezcla en placas de medio LB con 30 μ g/ml de kanamicina (kan³⁰) y se dejaron toda la noche a 37 °C. Se seleccionaron las colonias que presentaron resistencia a kanamicina, y de estas se hizo extracción de plásmidos por el método de lisis alcalina. Para confirmar que se insertó el gen *rpfC* en el plásmido se hizo una PCR.

Extracción de plásmidos

Las clonas seleccionadas se dejaron creciendo toda la noche en 200 rpm a 37 °C. Del medio saturado se tomaron 1.5 ml, se cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 5,000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 100µl de una solución fría que contiene glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM y EDTA 10 mM, y después se dejó incubando durante 5 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se le adicionaron 200 µl de NaOH 0.2N / SDS 1% y se dejó 5 min en hielo; se le añadieron 150 µl de acetato de potasio 5M, se mezcló por inversión y se dejó incubando en hielo durante 5 min. Se centrifugó por 10 min a 8,500 rpm, se recuperó el sobrenadante, se le adicionaron 0.8 ml de etanol al 95% y se incubó por 3 min a TA para que se precipitara el ADN plasmídico. Se realizó un tratamiento con RNAsa (1U) y posteriormente se centrifugó 10 min a 8.500 rpm, se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con etanol al 75% y después se centrifugó bajo las mismas condiciones para finalmente dejar secar la pastilla. La pastilla se resuspendió en 300µl de agua libre de nucleasas, se cuantificó por espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000 y se verificó la presencia del plásmido por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Red-Gel. Ya purificados los plásmidos se usaron para realizar la electroporación en *M. bovis* BCG

Preparación de células electrocompetentes y electroporación

La cepa *M. bovis* BCG se utilizó como vehículo de expresión de la proteína RpfC. Las bacterias se cultivaron por 8 días en agitación a 37 °C medio Middlebrook 7H9 suplementado con ADC y 0.05% de Tween-80. Posterior a los 8 días de cultivo las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 5000 x g. La pastilla se resuspendió en un volumen igual al original con una solución que al 10% de glicerol, después se redujo el volumen a la mitad hasta concentrar las bacterias 50X. La suspensión resultante se dividió en alícuotas de 200 µl y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Para la electroporación de las células electrocompetentes se aplicaron 2 pulsos de 2.5 kV. Inmediatamente después de haberle aplicado los pulsos a las bacterias se les añadió medio de cultivo fresco, se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Posteriormente se seleccionaron las bacterias clonadas por plaqueo en medio Middlebrook 7H10 suplementado con OADC (ácido oleico, Albúmina y Dextrosa-Catalasa) y kan³⁰. Las placas se incubaron durante un periodo de 2 semanas y las colonias que crecieron se analizaron por PCR para comprobar la presencia del plásmido con el inserto. Por último, se confirmó la integridad del inserto mediante secuenciación. Esto se hizo primero en *E. coli* antes de electroporar a *M. bovis* BCG.

Curvas de crecimiento rBCG-rpfC

Para la obtención de las curvas de crecimiento se utilizó la cepa recombinante rBCG-rpfC y la cepa control que contiene el plásmido vacío (BCG-pMV261). A partir de un cultivo en placa se preparó un inóculo en medio Middlebrook 7H9 suplementado con ADC, para lo que se tomaron algunas colonias, poniéndolas en un criotubo con perlas de vidrio de 0.3mm, el cual fue agitado por 3 min en vortex y posteriormente sonicado en baño maría por 10 min. Se usaron 3 ml de la suspensión con una DO_{600nm}=0.2, de tal forma que todas las cepas tuvieran la misma densidad para poderles adicionar las bacterias y los matraces que contenían cada uno 150 ml de medio Middlebrook 7H9 suplementado con 0.05% de Tween-80 y kan³⁰, el cual se incubó a 37 °C en agitación constante (200rpm) durante 21 días. El ensayo se hizo por duplicado y los matraces se dejaron incubando durante 3 días en agitación a 37°C. Posteriormente se realizaron las lecturas a una longitud de 600nm tomando 1ml del cultivo. Las lecturas se hicieron cada segundo día hasta completar los 21 días.

Hipoxia.

En este trabajo los cultivos de *M. bovis* BCG se sometieron a tres condiciones de concentración de O₂. La primera fue normóxica, utilizada normalmente en los cultivos celulares y bacterianos (150 mmHg, 19.95% de O₂ o 20.3 Kpa), la segunda condición fue de hipoxia (37.6 mmHg, 5% de O₂ ó 5 Kpa) y la tercera condición fue de

hipoxia estricta (≈ 7.5 mmHg, $< 1\%$ de O_2 o ≈ 1 Kpa), sin llegar a una ausencia total de O_2 o "anoxia". Se utilizaron estas condiciones de PO_2 ya que, en un estudio donde hicieron mediciones de la concentración de O_2 en los granulomas de ratones infectados por *M. tuberculosis*, se encontró que dentro de los granulomas el ambiente era hipóxico con una PO_2 menor o igual a 10mmHg, sin llegar a condiciones de anoxia⁵⁹.

Para analizar si había diferencias en el crecimiento de *M. bovis* rBCG-rpfC y *M. bovis* BCG-pMV261 en condiciones de hipoxia, las cepas se descongelaron e inmediatamente se sembraron en placas de agar Middlebrook 7H10 + OADC + Kan³⁰ y se incubaron por 7 días a 37 °C en atmósfera con 5% de CO_2 y 90% de humedad. Posteriormente se colocaron las placas en una jarra de anaerobiosis a la cual se le colocó un sobre Gaspak EZ campy container system BD para reducir la concentración de Oxígeno a $< 1\%$ y así obtener una atmósfera hipóxica. Las placas se incubaron a 37 °C en condiciones estáticas durante 5 días y posteriormente se recolectaron las colonias crecidas para hacer la extracción de ARN y la obtención de proteínas de extractos totales.

Ensayo de viabilidad en repuesta a estrés hipóxico.

La cepa recombinante rBCG-rpfC y la cepa control BCG-pMV261 se sonicaron durante 10 min para obtener una suspensión homogénea de bacterias, se centrifugaron por 1 min a 1000 rpm, se hicieron 5 diluciones seriadas (1:10) y se sembraron en placas de medio Middlebrook 7H10 suplementado (OADC) con kan³⁰. Se sembraron 15 μ l de bacterias de las 4 últimas diluciones de cada una de las cepas por duplicado y se cultivaran en condiciones de hipoxia (5% O_2), otras en condiciones de hipoxia estricta ($< 1\%$ O_2) y el otras (para el control) se incubaron en condiciones de normoxia. Para los cultivos en hipoxia estricta primero se incubó a las bacterias durante 3 días a 37 °C con 5% de CO_2 . Pasando los 3 días se metieron las placas en la jarra de anaerobiosis con un sobre AnaeroGen® (Anaerobic atmosphere generation bags, Thermo Scientific) para reducir la concentración de oxígeno a $< 1\%$, y se incubaron las placas a

37 °C durante 72 horas para posteriormente incubar las placas en condiciones normóxicas y contar las UFC. Para las cepas en condiciones de hipoxia primero se dejaron incubando las placas durante 7 días a 37 °C en condiciones estáticas con 5% de CO₂, pasando este periodo de incubación se introducen las placas a la jarra de anaerobiosis con un sobre Gaspak EZ campy container system (BD) para generar una atmósfera con un 5% de oxígeno y se dejan en condiciones de estrés hipóxico durante 3 días. Se hizo el conteo de colonias con el equipo Reichert Quebec darkfield colony counter.

Extracción de ARN.

Para la extracción de ARN, las cepas cultivadas en condiciones de normoxia e hipoxia se resuspendieron en 1 ml de TRIZOL (Gibco BRL, GRAND Island, NY, USA), y se trasvasaron a un criotubo que contenía 500µl de perlas de vidrio de 0.1 mm. El criotubo se colocó en el equipo Mini-bead Beater blender (Daigger, USA) para lisar a las bacterias aplicando 5 ciclos de agitación de 30 seg a velocidad 6, intercalados con incubaciones en hielo de por lo menos 1 min entre cada ciclo. Una vez terminada la lisis se recuperó el sobrenadante, se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min, se recuperó el sobrenadante al que se le adicionaron 200 µl de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y se mezcló por inversión periódicamente cada 15 seg durante 2 min. Posteriormente se centrifugó a 16,000 x g por 10 min a 4 °C, se recuperó la fase acuosa y se le adicionaron 500µl de isopropanol y 270µl de HSS (0.8 M citrato de sodio y 1.2 M NaCl), se mezcló por inversión y se centrifugó a 16,000 x g por 10 min a 4°C. Enseguida se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1ml de etanol frío al 75%. Después del lavado se centrifugó a 16,000 x g por 5 min, se dejó secar la pastilla, se resuspendió en 100µl de agua libre de nucleasas y por último se calentó a 60°C durante 10 min.

Para la purificación final del ARN se utilizó el kit Direct-zol TM Miniprep (MOBIO) y se realizó el procedimiento como lo indica el fabricante. Adicionalmente se trató el

ARN con DNAsa (DNase, Promega). Se cuantificó y para ver la integridad del ARN se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con Red-Gel.

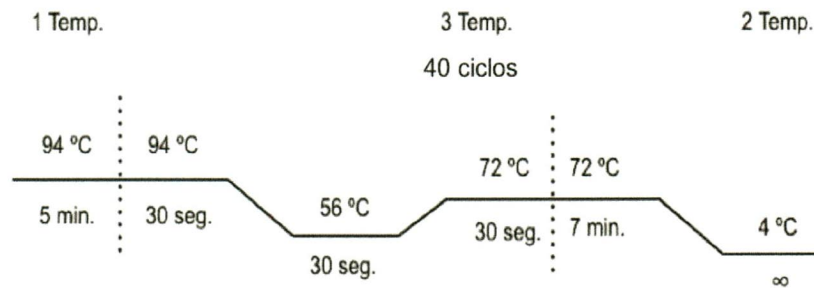
Evaluación de la expresión de genes asociados a latencia por RT-PCR.

Con el ARNm purificado se realizó la retrotranscripción para obtener el ADN complementario (ADNc) usando la SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen), utilizando como templado 400ng de ARNm purificado, random primers, dNTP's y H₂O para PCR; esta reacción se incubó a 65 °C durante 5 min después se le adicionó un buffer (incluido en el kit) y MDTT (Mercaptoetanol-Ditiotreitol), se incubó durante 2 min a 25 °C, posteriormente se incubó a 42 °C por 50 min. Terminando la incubación se le adicionó 1µl de RNAsa out y, por último, para inactivar la RNAsa se incubó por 15 min a 70 °C. Los ADNc se montaron en una PCR utilizando los oligonucleótidos de un grupo de 12 genes seleccionados por que tienen una relación con el estado latente de *M. tuberculosis*, los cuales participan en la regulación transcripcional, estrés hipóxico, anaerobia y aerobia, resucitación (Anexos, Tabla 1). Para la normalización de los datos se utilizó el gen house-keeping GAPDH como control. Se utilizaron las secuencias reportadas de *M. tuberculosis* en su genoma para el diseño de los oligonucleótidos y se usó el programa PRIMER 3 con los siguientes parámetros: tamaño de 20 pb, T_m de 52-59 °C, 55% de C+G y el tamaño del amplicón entre 140-150 pb (Tabla 4). Se verificó la amplificación de los genes por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, y se tiñó con Red-Gel.

Gen	Oligonucleótidos	Tamaño del amplicón
<i>rpfC</i>	(F) 5'-GGG AAC AAC AAA TCG CAG TT-3' (R) 5'-GCC CAA ATG ATC TCG TTG AT-3'	140 pb
<i>rpoA</i>	(F) 5'-ATC GAC GAC CTG GAT CTG AC-3' (R) 5'-CAC CTC GTC GAT GGA CTT CT-3'	141 pb
<i>DosT</i>	(F) 5'-CCA TCT TGG CGA TCA CAT C-3' (R) 5'-CGA TCC CCT CGT AGA CGA AT-3'	150 pb
<i>DevR</i>	(F) 5'-CAT CAA GGG AAT GGA GTT GG-3' (R) 5'-CTG GTC GGT AAG GCC TGA TA-3'	145 pb
<i>SigB</i>	(F) 5'-TCG ACA AGA TCA ACG ACC TG-3' (R) 5'-TGT AAC AGT TCG GCG ATG AC-3'	151 pb
<i>SigE</i>	(F) 5'-ACC TGA CCC AGG AGA CCT TT-3' (R) 5'-GTC GTA GTC CTC GGG TAA CG-3'	161 pb
<i>FdxA</i>	(F) 5'-CTA CAT CAA CCC CGA CGA GT-3' (R) 5'-GCA GGA CTT GGT GGA AAA AG-3'	143 pb
<i>nark2</i>	(F) 5'-GCT TGC TGA TGC ACC CTA CT-3' (R) 5'-TAG GTG GGC AGG TAG TTG CT-3'	140 pb
<i>pfkB</i>	(F) 5'-GTC GCT CAT CAA GTC CGT TC-3' (R) 5'-TAT TGA TCC TGC CCG ACT TC-3'	140 pb
<i>ahpC</i>	(F) 5'-TTT TGG CCG AAA GAC TTC AC-3' (R) 5'-TTT TGA GGT CGT TGT GCT GT-3'	144 pb
<i>katG</i>	(F) 5'-GCC GGT CAA GAA GAA GTA CG-3' (R) 5'-TTG CCC CAA TAG ACC TCA TC-3'	160 pb
<i>narX</i>	(F) 5'-GTG CCG TAT GTG ACG ATG AC-3' (R) 5'-GGA TGC CGA AAT GAA ACA TC-3'	153 pb
<i>gapdh</i>	(F) 5'-ACC TTA CGG TCG ACT TAT CC-3' (R) 5'-GAG TCG AAA ATC GAA CTG TG-3'	145 pb

Ensayo de tiempo real qRT-PCR.

Los ADNc obtenidos se utilizaron como templado para el ensayo de tiempo real. La reacción de PCR se elaboró con 5µl de buffer de reacción Luminaris HiGreen Hight ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific), 0.4µl de oligonucleótidos a una concentración de 7.4 pM, 1.5µl (10ng/ µl) de ADNc de *M. bovis* BCG (condiciones normoxia e hipoxia) y agua para PCR para llegar a un volumen final de 10µl. Para realizar el ensayo en tiempo real, se utilizaron placas de 96 pozos para uso del equipo tiempo real (Real Time PCR system 7300). Las condiciones de la PCR de tiempo real fueron:



La captura de los amplificadores se realizó en el paso de extensión. La expresión relativa de los genes se determinó por el método de $\Delta\Delta C_t$. El ensayo de tiempo real qRT-PCR se realizó por duplicado, con triplicados técnicos.

Obtención de extractos proteínicos totales.

Para obtener las proteínas de *M. bovis* rBCG-rpfC, *M. bovis* BCG-pMV261 y en condiciones de normoxia e hipoxia, los viales se descongelaron e inmediatamente se centrifugaron a 14,00 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 800 μ l de agua estéril con 16 μ l de coctel inhibidor de proteasas (Roche Mannheim, Germany). Se resuspendió y se transfirió a un criotubo con 500 μ l de perlas de vidrio de 0.1 mm. El criotubo se colocó en el equipo Mini-bead Beater blender (Daigger, USA) aplicando 4 ciclos de 30 seg a velocidad 6, manteniendo el tubo en hielo entre cada ciclo. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, nuevamente se recuperó el sobrenadante y se centrifugó en las mismas condiciones. El sobrenadante se esterilizó por filtración con membranas de 0.22 μ m.

Cuantificación de proteínas de extractos totales.

Para la obtención de proteínas de extractos totales de *M. bovis* rBCG-rpfC y *M. bovis* BCG-pMV261 en condiciones de cultivo normoxia e hipoxia. Se hizo por el método de Lowry, ya que uno de los componentes de los extractos proteínicos interfería con el reactivo de Bradford y se formaban precipitaciones. Para la cuantificación mediante el ensayo de Lowry, las muestras y la curva estándar deben estar en una solución de 0.5

N de NaOH. Ya que están preparadas las muestras, se adicionaron 30µl de muestra en el pozo y se realizaron por triplicado las cuantificaciones, al instante se mezcló la solución A y B (1:3) que contienen (A= 0.05% CuSO₄ en Tartrato de sódico-potásico al 2% y 0.02% de azida de sodio. B= 0.2 N NaOH, 2% NaCO₃ y 0.4% g de SDS). Ya que se mezclaron la solución A y B se le adicionaron 100µl de la mezcla a cada muestra y se dejó en agitación durante 60 min. Pasando el tiempo de incubación se adicionaron 150µl de la solución C (reactivo Folin-Ciocalteu, diluido 1:20). Se incubó por 60 min en agitación y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de 750 nm usando el software (KC junior software-biotek, USA). Se sacó promedio de las absorbancias y se les restó el valor del blanco. Con base a los estándares y se obtuvo la cuantificación mediante el uso de la fórmula de regresión lineal.

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

La integridad de las proteínas se verificó por electroforesis en una dimensión. Se prepararon geles de poliacrilamida al 12.5 % con un grosor de 0.75 mm, se cargaron 20µg de proteínas. Antes de cargarse las muestras, se calentaron a 95 °C durante 10 min. La electroforesis se corrió a 120 Volts hasta que el frente de corrida alcanzara el borde del gel. Las proteínas se visualizaron por tinción con azul de Commassie R250.

Electroforesis bidimensional 2D SDS-PAGE.

Para hacer el análisis de expresión diferencial de las proteínas de los cultivos *M. bovis* rBCG-rpfC y *M. bovis* BCG-pMV261 en condiciones de hipoxia, se obtuvieron los proteomas respectivos con sus controles (normoxia) utilizando tiras de gradiente de pH inmóvil de 4 a 7 de 11 cm. (GE Healthcare Immobiline TM DryStrip), para separar las proteínas de acuerdo su punto isoeléctrico (pI), que después se separaron por PM en geles SDS-PAGE al 12.5%.

Para rehidratar las tiras IPG se usaron 150µg de extractos proteínicos que se prepararon en un buffer de rehidratación (Urea 9 M, CHAPS 4%, DTT 70 mM y 0.5µl de azul de bromofenol en un volumen total de 500µl), después se tomaron 200µl de la

mezcla y se le adicionaron 4µl de anfolinas de pH 4-7 para posteriormente rehidratar la tira IPG. Después de 16 horas de rehidratación pasiva se realizó el isoelectroenfoque (IEF) en cinco pasos: 1) 500 V durante 30 min, 2) 1000 V durante 30 min, 3) 1500 V durante 30 min, 4) 2000 V durante 30 min, 5) 5000 V hasta llegar a 50000 volts/hora. Al terminar el IEF las tiras se equilibraron con buffer de equilibrio (Urea 6 M, Glicerol 30%, Tris pH 8.8 50 mM, SDS 2% y azul de bromofenol 0.002%) adicionando para realizar los lavados DTT y luego IAA. Posteriormente, ya que las proteínas están separadas por su punto isoeléctrico (pI), se realizó la separación en segunda dimensión en geles SDS-PAGE al 12.5% de 18 x 16 cm; se corrió el gel a 65 volts durante 14 horas y por último los geles se visualizaron mediante la tinción con Sypro Ruby siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se usó el software Prism V.7 (GraphPad). Como prueba estadística se hizo un ANOVA para múltiples comparaciones, utilizando la prueba de Bonferroni con un intervalo de confianza de 95% como post-prueba. Los datos con un valor de $p < 0.01$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

Para clonar el gen *rpfC*, primero se realizó una amplificación del gen por PCR (Fig. 10-A), utilizando como molde ADN de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG Pasteur. Posteriormente se hizo la extracción de plásmidos para seleccionar los que tuvieran mayor pureza (Fig. 10-B). Con los oligonucleótidos específicos mencionados en materiales y métodos se amplificó el gen *rpfC* mediante PCR, obteniendo un producto de 531 pb (Fig. 11). El gen fue clonado en el vector pMV261 como se describe en materiales y métodos.

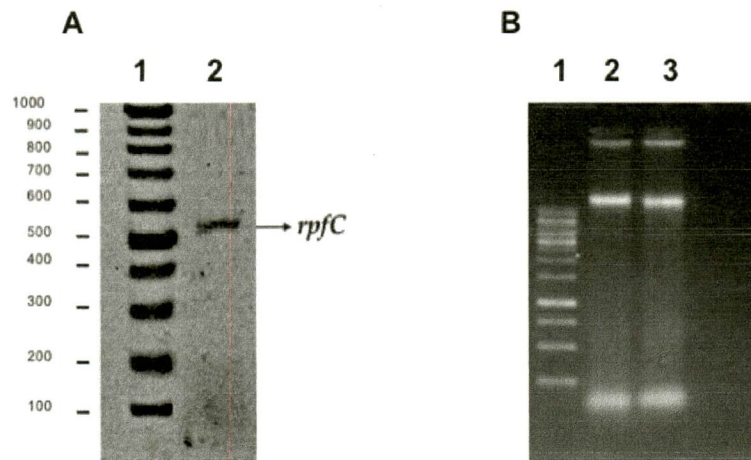


Figura 10. Clonación del gen *rpfC* en *M. bovis* BCG. En el panel **A)** se muestra el producto de amplificación del gen *rpfC*, en el carril 1: El marcador de 1kb. Y en carril 2: el producto amplificado del gen *rpfC*. En el panel **B)** se muestra la extracción de ADN. En el carril 1: el marcador de 1kb, en el carril 2: ADN con *rpfC* y el carril 3: ADN con el plásmido vacío pMV261.

En aquellas colonias que lograron crecer en el medio con kanamicina se verificó la presencia del plásmido y se comprobó por PCR que el gen *rpfC* estaba clonado en el

vector (Fig. 11). La secuencia del gen se cotejó por secuenciación con la secuencia reportada en el GeneBank para el gen Rv1884c de *M. tuberculosis* (Anexo A1), encontrando el 100% de identidad entre ambas secuencias.

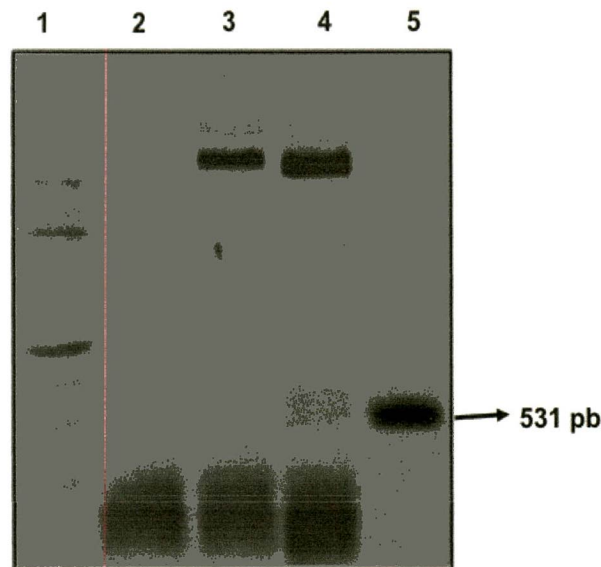


Figura 11. Clonación del gen *rpfC* en el vector pMV261. En el carril 1: Marcador de 1 kb, en el carril 3: Vector pMV261-*rpfC*, carril 4: Doble digestión usando *BamH I* y *Hind III* y en el carril 5: Amplificación por PCR del gen *rpfC*.

Con el plásmido clonado se electroporó la cepa *M. bovis* BCG. De las clonas obtenidas, se seleccionó una para los análisis posteriores. Al realizar las curvas de crecimiento se encontró que las bacterias transformadas con la construcción pMV261-*rpfC* presentan más crecimiento en los primeros días de cultivo (7 al 17), sin embargo, esta diferencia no es significativa ya que como se observa en la gráfica, las absorbancias de los cultivos tanto de la cepa recombinante rBCG-*rpfC* como la cepa control BCG-pMV261 son similares (Fig. 12) para los días 19 y 21. En los cultivos se observó que entre los días 7 al 11 la cepa *M. bovis* rBCG-*rpfC* formó grumos, lo cual es un indicativo de una mayor saturación del cultivo posiblemente inducida por la sobreexpresión de RpfC y, debido a la formación de los grumos es que la absorbancia disminuye y se obtienen

valores similares a los del cultivo de la cepa control. Es posiblemente por esto que al final de las curvas de crecimiento no son claras las diferencias entre ambos cultivos.

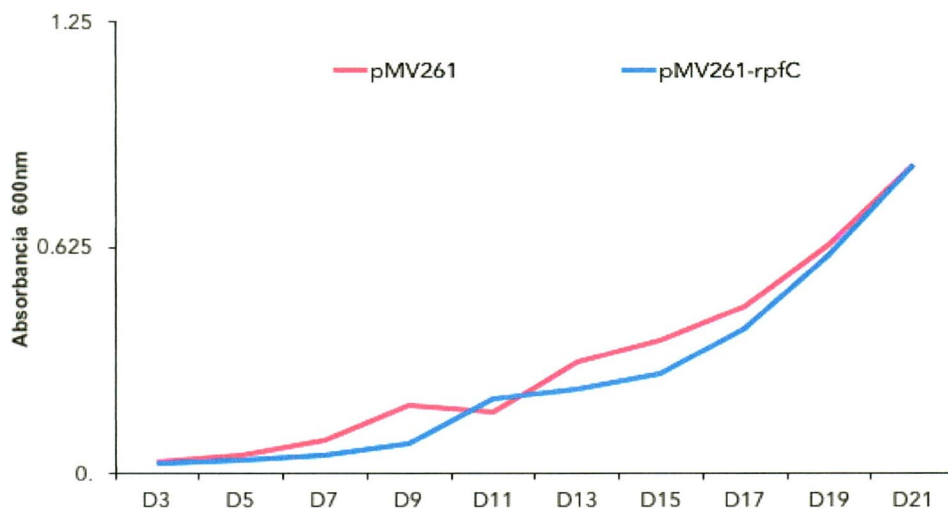


Figura 12. Curva de crecimiento rBCG-rpfC. En la figura se muestra un gráfico representativo de las diferencias del crecimiento en *M. bovis* rBCG-rpfC y *M. bovis* BCG-pMV261. En el eje de las "x" se gráfica los días de crecimiento y en eje de las "y" se gráfica el valor de la $DO_{\lambda 600nm}$. La línea rosa representa la cepa control (BCG-pMV261) y la línea azul representa la cepa que sobreexpresa la proteína RpfC (rBCG-rpfC). La curva de crecimiento se realizó por triplicado.

Al término de los 21 días de cultivo de *M. bovis* rBCG-rpfC y *M. bovis* BCG-pMV261, se cosechó 1 ml de cultivo y se midió el peso húmedo de cada una de las cepas para ver si había diferencia en el peso húmedo (Fig. 13). Este ensayo se realizó por duplicado en cultivos independientes. En la cepa control *M. bovis* BCG-pMV261 el peso fue de $24 \pm 1.755 \mu\text{g/ml}$, mientras que la cepa recombinante *M. bovis* rBCG-rpfC el peso fue de $27 \pm 0.715 \mu\text{g/ml}$. En la gráfica de la figura 13 se muestran las diferencias en el peso húmedo de ambos cultivos, en donde se muestra de forma indirecta que *M. bovis* rBCG-rpfC presenta mayor crecimiento que *M. bovis* BCG-pMV261, sin embargo, la esta diferencia no es estadísticamente significativa.

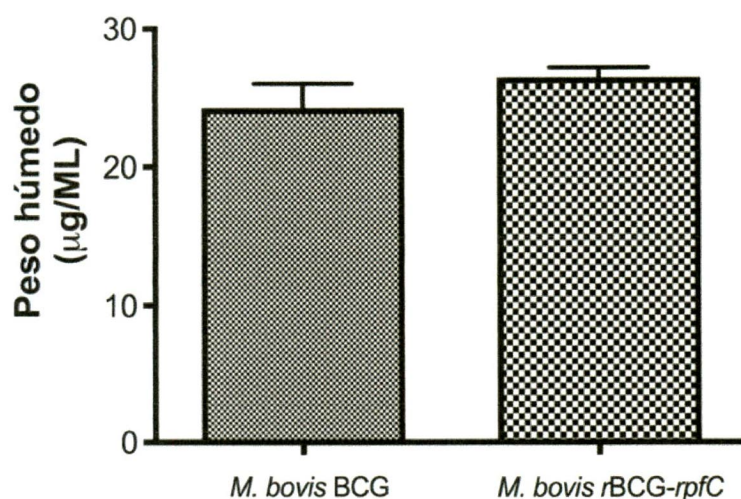


Figura 13. **Peso húmedo de *M. bovis* BCG.** En la gráfica se muestran los pesos húmedos de la cepa control (*M. bovis* BCG-pMV261) y de la cepa recombinante (*M. bovis* rBCG-rpfC) $p > 0.01$.

En la figura 14 se muestran fotografías del crecimiento diferencial entre *M. bovis* rBCG-rpfC y *M. bovis* BCG-pMV261. Se observa que en condiciones de normoxia el crecimiento de *M. bovis* rBCG-rpfC es ligeramente mayor en comparación con *M. bovis* BCG-pMV261, mientras que en condiciones de hipoxia estricta hay mayor desarrollo de colonias y se mantiene el crecimiento en *M. bovis* rBCG-rpfC en comparación con *M. bovis* BCG-pMV261.

Para analizar el efecto de RpfC sobre la expresión de genes relacionados a la hipoxia se seleccionaron 12 genes, los cuales participan en la regulación transcripcional, la respuesta al estrés hipóxico, la respuesta anaerobia y aerobia, y resucitación. La especificidad de los oligonucleótidos diseñados se comprobó mediante un análisis *in silico* con el algoritmo BLASTn. Previo a realizar la PCR en tiempo real se hicieron PCR's en punto final para comprobar la amplificación de los genes seleccionados, los cuales se muestran en la figura 15.

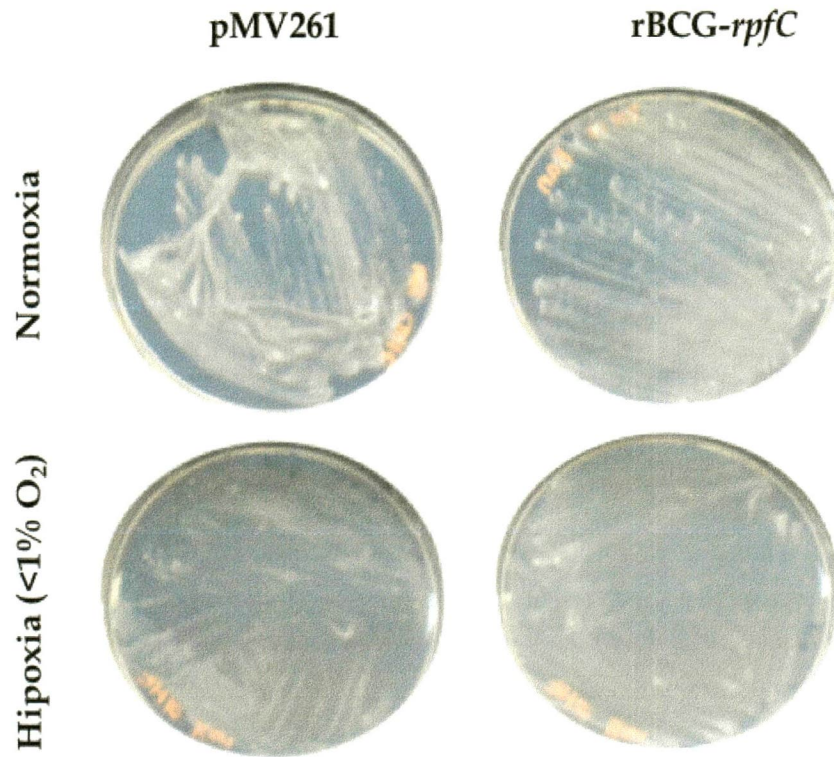


Figura 14. Crecimiento de *M. bovis* BCG y *M. bovis* rBCG-rpfC en hipoxia estricta y normoxia. Las imágenes muestran las diferencias en el crecimiento de las cepas *M. bovis* BCG y *M. bovis* rBCG-rpfC durante 5 días en una atmósfera hipóxica (<1% O₂).

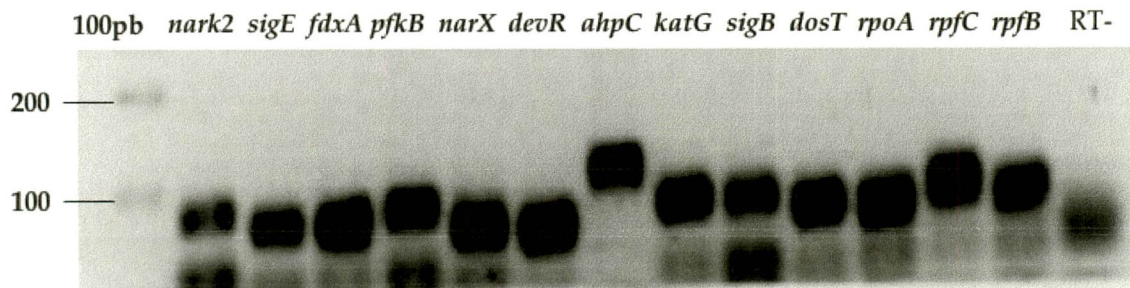


Figura 15. PCR punto final con ADN BCG. Gel de agarosa al 2% teñido con Red-Gel, en el primer carril se observa el marcador de 100 pb, los restantes carriles son los productos de PCR de cada uno de los genes implicados en la latencia y en el último carril se muestra el control negativo de la reacción de PCR.

Los ADNc obtenidos de la retrotranscripción de los ARNm de *M. bovis* rBCG-rpfC y *M. bovis* BCG-pMV261 en condiciones de normoxia e hipoxia se utilizaron como templado para el ensayo de RT-PCR en punto final. En condiciones de normoxia, tanto *M. bovis* BCG-pMV261 como *M. bovis* rBCG-rpfC expresan los mismos genes, sin embargo, en *M. bovis* rBCG-rpfC hay una mayor expresión de los genes *nark2*, *fdxA*, *pfkB*, *narX*, *katG*, *sigB* y *rpoA*. En condiciones de hipoxia estricta (<1% O₂), se observó que en *M. bovis* rBCG-rpfC expresan más los genes en comparación con *M. bovis* BCG-pMV261 (Fig. 16). Los genes que muestran una mayor expresión son: *nark2*, *sigE*, *fdxA*, *pfkB*, *narX*, mientras que en la cepa control están más expresados los factores sigma (*sigE* y *sigB*).

En estos ensayos no se obtuvo una buena calidad de ARN y se observó mucha variación en los duplicados, por lo que antes de realizar la determinación cuantitativa de la expresión de genes asociados la latencia en *M. bovis* rBCG-rpfC y *M. bovis* BCG-pMV261, se verificó la viabilidad de los cultivos bajo estas condiciones de hipoxia estricta. Tras realizar los ensayos de viabilidad se decidió modificar las condiciones, ya que los primeros cultivos se dejaban los cultivos 5 días en hipoxia estricta, lo que disminuía casi en su totalidad la viabilidad de los bacilos, por lo que se cambiaron las condiciones y las evaluaciones posteriores se hicieron tras 3 días de incubación en hipoxia estricta.

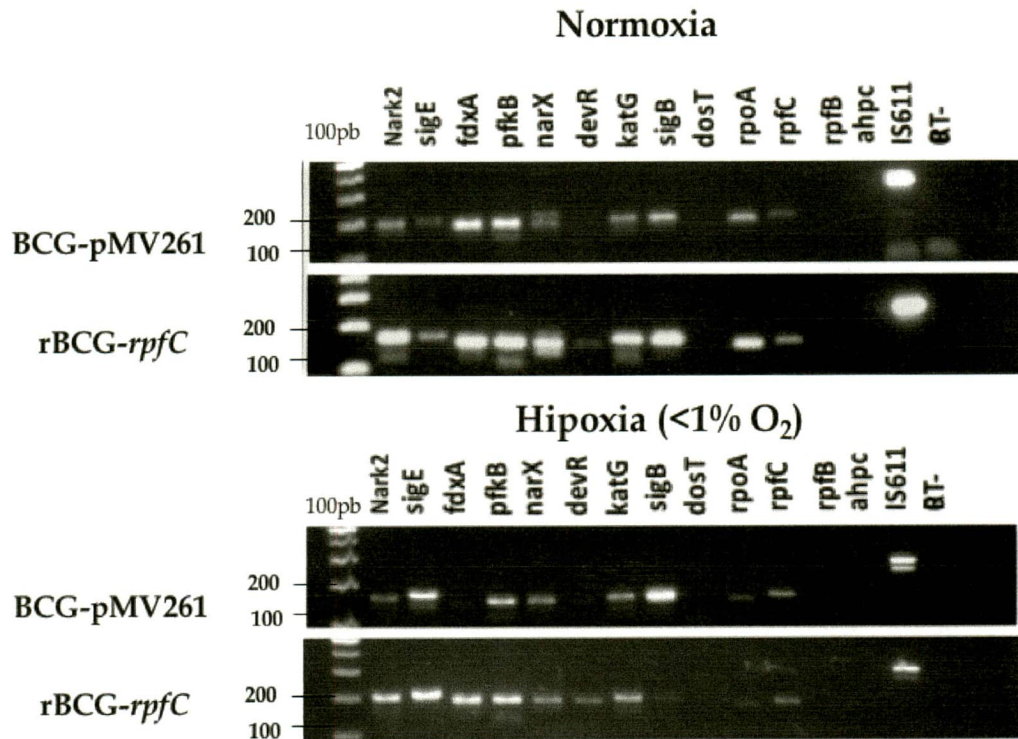


Figura 16. Expresión de genes asociados a latencia en *M. bovis* rBCG-*rpfC* y *M. bovis* BCG-pMV261 en condiciones de normoxia e hipoxia. Geles de agarosa al 2% teñidos con Red-Gel, en el primer carril se muestra el marcador de 100pb, en los consecutivos carriles las RT-PCR de los genes implicados en la latencia, como control positivo el gen is6110 y en el penúltimo carril el control negativo del ensayo.

Para determinar si hay diferencias en el crecimiento de rBCG-*rpfC* en condiciones de normoxia y en condiciones de hipoxia estricta, un juego de placas se sometió a una atmósfera hipóxica (<1% O₂) por 3 días y posteriormente se incubó por 11 días en condiciones de cultivo normóxicas. En la figura 17 se muestran las fotografías del crecimiento de *M. bovis* rBCG-*rpfC* y *M. bovis* BCG-pMV261 bajo estas condiciones de cultivo. Se observa que hay un poco más crecimiento en los cultivos que sobreexpresan el RpfC, tanto en condiciones normóxicas como en hipoxia estricta, en comparación con lo observado en los cultivos de *M. bovis* BCG-pMV261. Además de demostrar que bajo condiciones de estrés hipóxico la micobacteria sobrevive, aunque

disminuye su tasa de replicación (porque se observan menos colonias), éstas persisten como lo que podría suceder cuando se encuentra en estado latente la micobacteria. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios que también se muestra que el factor promotor de la resucitación C induce el crecimiento en *M. bovis* BCG.

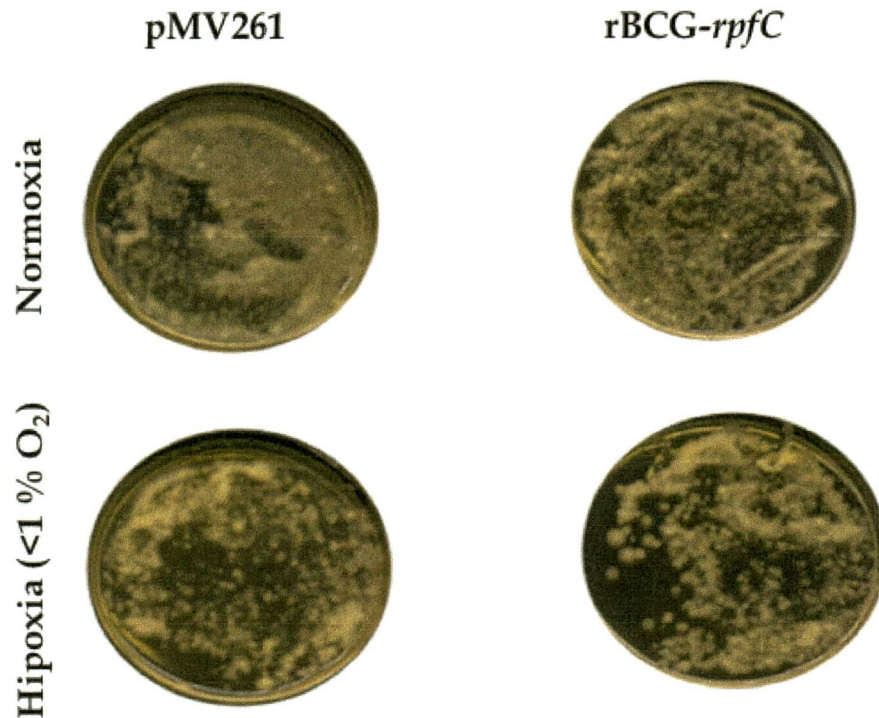


Figura 17. Crecimiento de *M. bovis* BCG y *M. bovis* rBCG-rpfC en hipoxia y normoxia. Las imágenes muestran las diferencias en el crecimiento de las cepas *M. bovis* BCG-pMV261 y *M. bovis* rBCG-rpfC durante 3 días en una atmósfera hipóxica.

En la figura 18 se muestra la gráfica de UFC tanto de *M. bovis* rBCG-rpfC, así como de *M. bovis* BCG-pMV261 en las condiciones de normoxia e hipoxia estricta (<1% de oxígeno). Se observó una notable disminución en el número de UFC recuperadas tras la incubación de los cultivos en hipoxia. Sin embargo, las diferencias entre ambas cepas no son significativas.

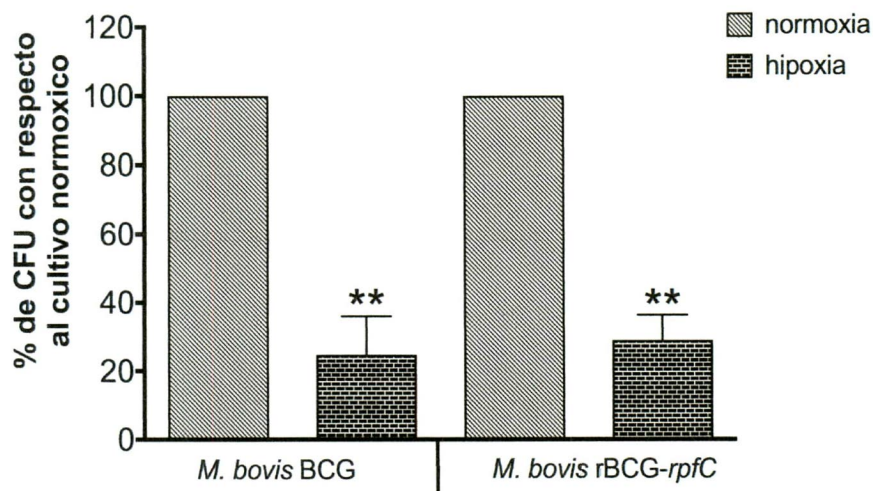


Figura 18. Gráfica de viabilidad ante condiciones de estrés hipóxico estricto. En la gráfica se presentan las diferencias del % de UFC de *M. bovis* BCG y *M. bovis* rBCG-rpfC en condiciones de hipoxia estricta durante 3 días, en comparación con condiciones normales de cultivo. $p < 0.01$

Bajo estas condiciones, para los ensayos de expresión se incubaron las cepas primero 5 días en una atmósfera normóxica con 5% de CO₂ y posteriormente se incubaron en condiciones de hipoxia estricta (<1% O₂) durante 3 días. Posteriormente se extrajo ARN (Fig. 19), obteniendo una mejor calidad y cantidad del mismo que el recuperado en los primeros ensayos.

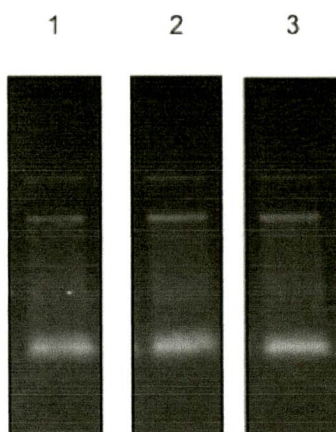


Figura 19. Extracción de ARN total. El carril 1: ARN de la cepa control BCG-pMV261 (200ng), carril 2: ARN de la cepa recombinante rBCG-rpfC (200ng) y el carril 3: ARN de la cepa rBCG-rpfC en condiciones de cultivo de hipoxia estricta (200ng).

La evaluación de la expresión de los genes asociados a latencia se realizó por qRT-PCR en tiempo real, ya que en los ensayos de punto final solo se hicieron análisis cualitativos. En la figura 20 se representa la expresión relativa de 12 genes (asociados a la latencia en *M. tuberculosis*) en *M. bovis* rBCG-*rpfC* respecto a *M. bovis* BCG-pMV261, en condiciones normales de cultivo. En la gráfica se observa que los genes *sigE* y *rpoA* que participan en la regulación transcripcional, presentan una expresión ligeramente mayor en *M. bovis* rBCG-*rpfC* (1.3 y 1.1 veces respectivamente). El gen *fdxA* que participa en la transferencia de electrones, es el que mostró una mayor diferencia, al encontrarse 1.6 veces más expresado.

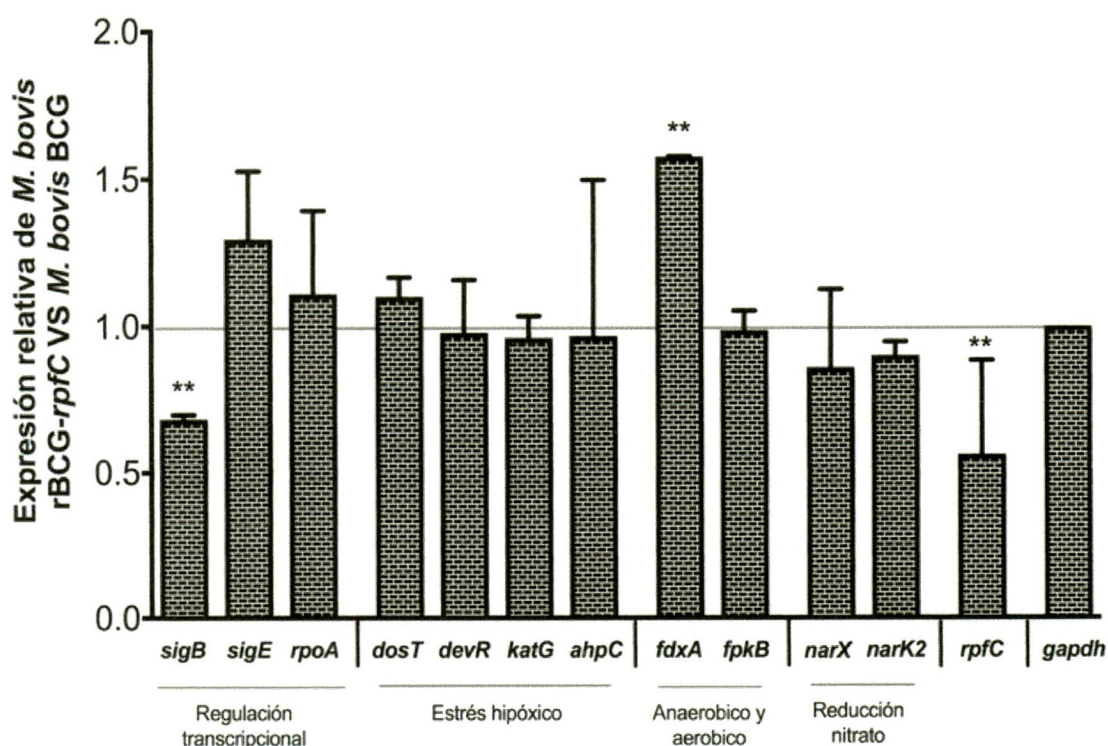


Figura 20. Gráfica qRT-PCR en tiempo real en condición de normoxia. Representación de la expresión relativa de *M. bovis* rBCG-*rpfC* en condiciones aerobias normalizado con GAPDH. Cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. $p < 0.01$

Un resultado interesante fue que se esperaba que el gen *rpfC* estuviera sobreexpresado en *M. bovis* rBCG-*rpfC* en condiciones de cultivo normóxicas, sin embargo, esto no fue así, y el gen *rpfC* estaba subexpresado (0.56 veces) en comparación con su expresión en *M. bovis* BCG-pMV261. Esto podría indicar que el factor promotor de la resucitación C regula su expresión e induce su represión al no necesitarse en un ambiente normóxico.

En la figura 21 se muestra la expresión relativa de los genes en condiciones de hipoxia estricta, observándose que los genes que participan en la regulación transcripcional, entre ellos los factores sigma, se encuentran sobreexpresados en *M. bovis* rBCG-*rpfC*, encontrando que *sigB* tiene una expresión 2.16 veces mayor y *sigE* 1.4 veces mayor, mientras que en *M. bovis* BCG-pMV261 estos genes se observan subexpresados. En el caso de los genes que participan en el estrés hipóxico, en *dosT*, *katG* y *ahpC* se observa una subexpresión y no se mostraron diferencias importantes en *M. bovis* rBCG-*rpfC* en comparación con *M. bovis* BCG-pMV261. En *M. bovis* rBCG-*rpfC* el gen *rpfC* se encuentra sobreexpresado (1.7 veces) en condiciones de hipoxia. Por el contrario, en condiciones de hipoxia estricta (<1% O₂) observamos que los genes *fdxA*, *fpkB* y *narX* están subexpresados en ambas cepas. Con lo que respecta a los otros genes que juegan un papel en la reducción de nitrato, no se encontraron diferencias de expresión entre las dos cepas, y también están subexpresados en condiciones de hipoxia.

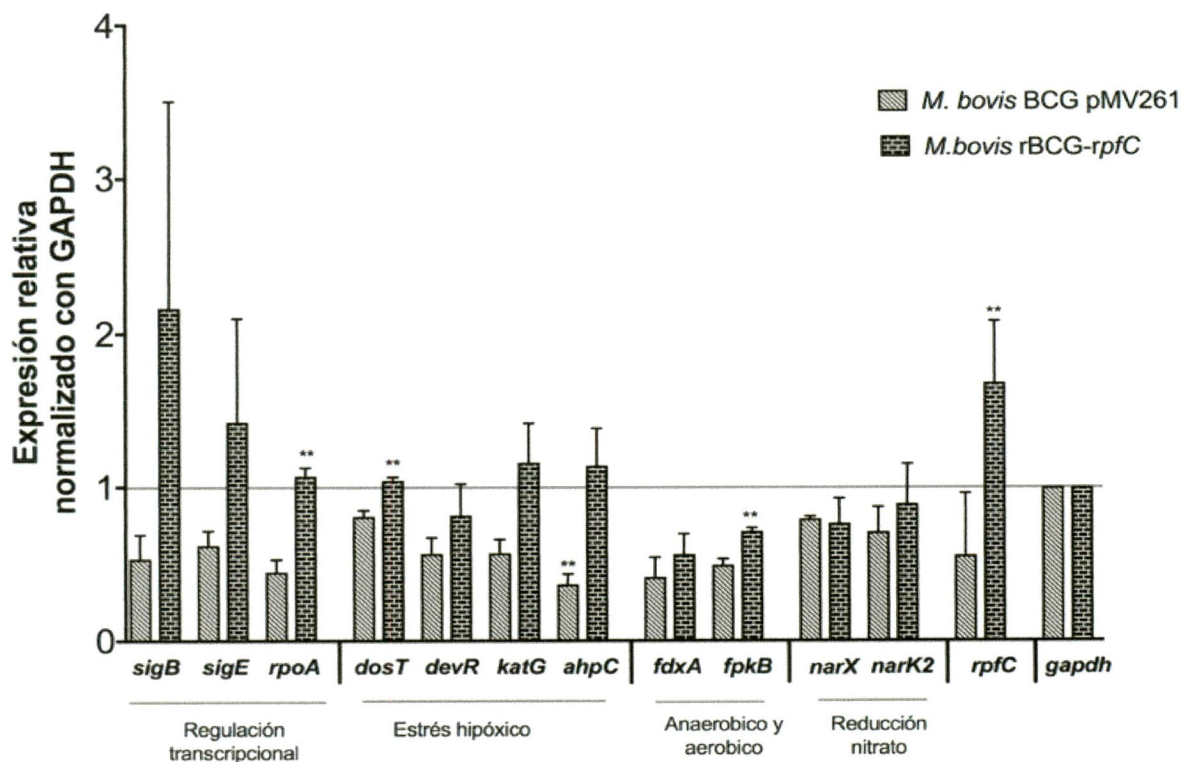


Figura 21. Gráfica qRT-PCR en tiempo real en condición de hipoxia. Representación de la expresión relativa de *M. bovis* rBCG-rpfC en condiciones anaerobias normalizado con GAPDH. Cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. $p < 0.01$

En la figura 22, se observa que bajo una hipoxia de 5% de O_2 , *M. bovis* rBCG-rpfC presenta mayor crecimiento que *M. bovis* BCG-pMV261, sin embargo, este no difiere en condiciones de normoxia.

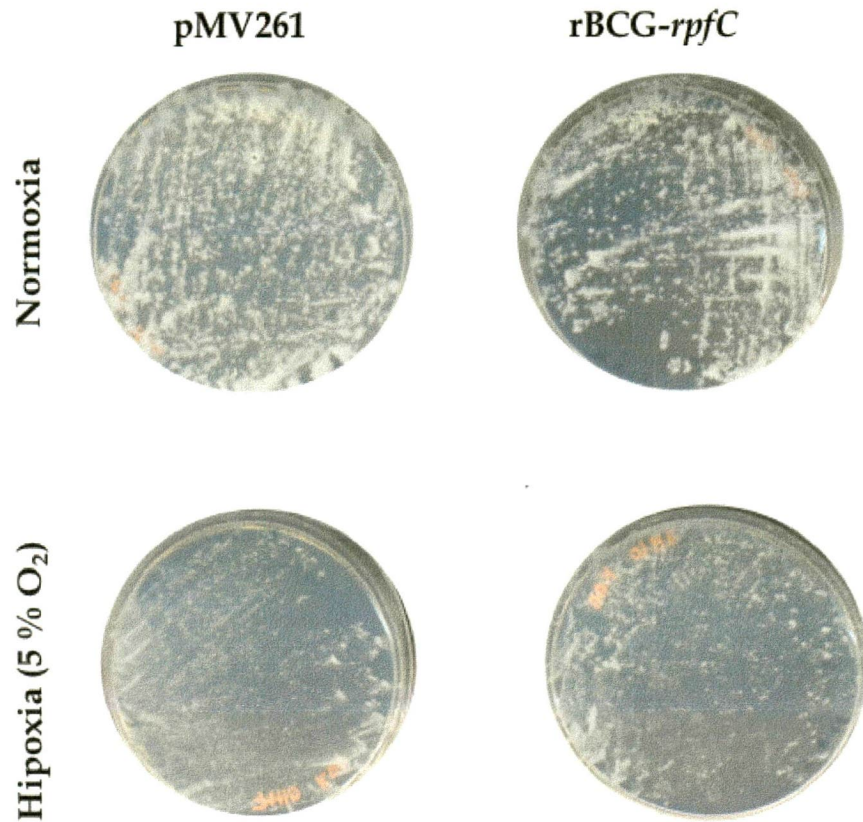


Figura 22. Crecimiento de *M. bovis* rBCG-rpfC y *M. bovis* BCG-pMV261 en normoxia e hipoxia. Las imágenes de las placas de cultivo se muestran las diferencias de crecimiento en *M. bovis* BCG en respuesta a la hipoxia.

Al evaluar la viabilidad de los cultivos en condiciones de hipoxia, encontramos diferencias importantes. *M. bovis* rBCG-rpfC presenta mayor viabilidad (97%) que *M. bovis* BCG-pMV261 en la que se observa un 70% de viabilidad, lo que indica que las cepas rBCG-rpfC responde mejor al ambiente hipóxico que las cepas control (Fig. 23).

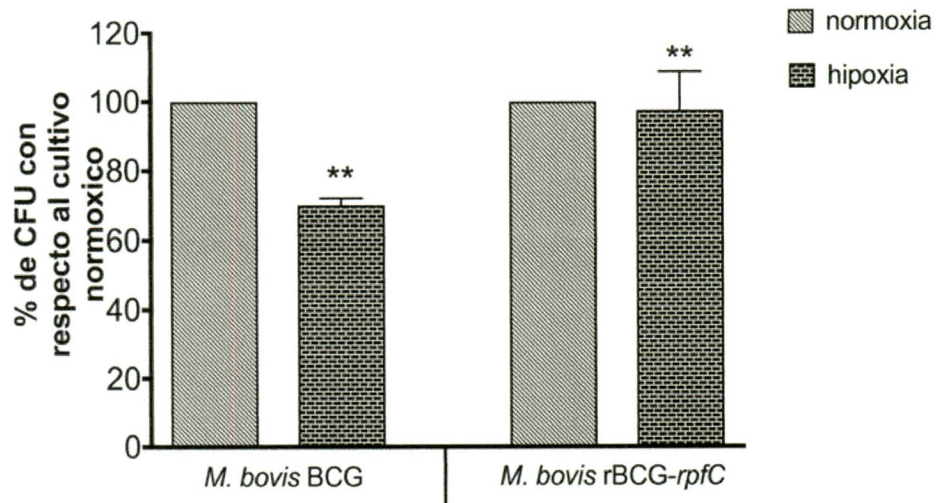


Figura 23. Gráfica de viabilidad de *M. bovis* rBCG-rpfC y *M. bovis* BCG-pMV261 en condiciones de estrés hipóxico. En la gráfica de la parte superior se presentan las diferencias del % de UFC de *M. bovis* BCG-pMV261 y *M. bovis* rBCG-rpfC en condiciones de hipoxia (5%O₂) en comparación con condiciones normales de cultivo. $p < 0.01$

A partir de cultivos en hipoxia se obtuvieron extractos proteínicos de *M. bovis* rBCG-rpfC y *M. bovis* BCG-pMV261, y antes de analizarlos por geles en dos dimensiones se analizó la integridad de las proteínas por electroforesis en gel SDS-PAGE de una dimensión (Fig. 24). En los geles se observó un patrón diferente de bandas en la condición de hipoxia comparado con la condición normal. Encontramos que en condiciones de hipoxia las bacterias sobreexpresan una proteína de bajo peso molecular que posiblemente es la alfa cristalina, ya que en diversas publicaciones se ha demostrado que esta proteína se expresa en condiciones de hipoxia en *M. tuberculosis* (Fig. 24).

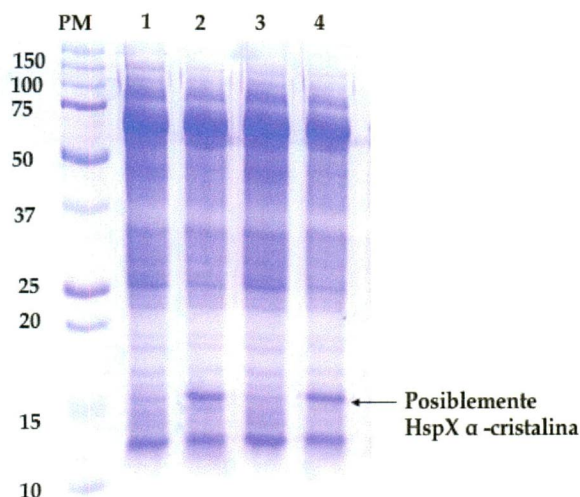


Figura 24. Electroforesis SDS-PAGE de *M. bovis* rBCG-rpfC. En el primer carril: Marcador de peso (DualColor), carril 1: *M. bovis* BCG normoxia, carril 2: *M. bovis* BCG hipoxia, carril 3: *M. bovis* rBCG-rpfC normoxia y en el carril 4: *M. bovis* rBCG-rpfC hipoxia. Se cargaron 20 μ g de extractos proteicos a 120 Volts teñido con azul de comassie R250.

Para analizar las diferencias entre el proteoma de *M. bovis* rBCG-rpfC y el de *M. bovis* BCG-pMV261, se hicieron geles en 2D de extractos proteínicos totales. En la figura 25 se muestra el proteoma de *M. bovis* BCG-pMV261 en condiciones de normoxia e hipoxia. El análisis de los geles se realizó con el software PDQuest (Biorad 8.0), utilizando como método de normalización (*total quantity in valid spots*), un valor de corte de >1.5 y un nivel de significancia de 90%. Las flechas señalan algunas de las proteínas expresadas diferencialmente entre ambas condiciones.

En condiciones de normoxia se resolvió un promedio de 197 manchas y en condiciones de hipoxia de 194 manchas, de los cuales uno promedio de 110 manchas se encontraban en ambas condiciones de cultivo.

En la figura 26 se muestran imágenes representativas de los proteomas de *M. bovis* rBCG-*rpfC* en condiciones de normoxia e hipoxia, en los cuales se detectó un promedio de 153 manchas en condiciones de normoxia, mientras que en hipoxia se detectó un promedio de 127 manchas. En estos proteomas se encontró que 116 manchas se encontraron en las dos condiciones de cultivo. En conjunto se observó que en las dos cepas hay una diferencia importante en la expresión de las proteínas en condiciones de hipoxia. Observamos que la mayoría de las proteínas que se expresan diferencialmente en abundancia como en cantidad, tanto en *M. bovis* rBCG-*rpfC* como *M. bovis* BCG-pMV261 se encuentran en un pH ácido y son de bajo peso molecular. De acuerdo a los resultados de electroforesis de una dimensión, es posible que los cambios que se observan en los geles 2D-SDS-PAGE correspondan a la proteína alfa-cristalina que se en respuesta a un estrés hipóxico.

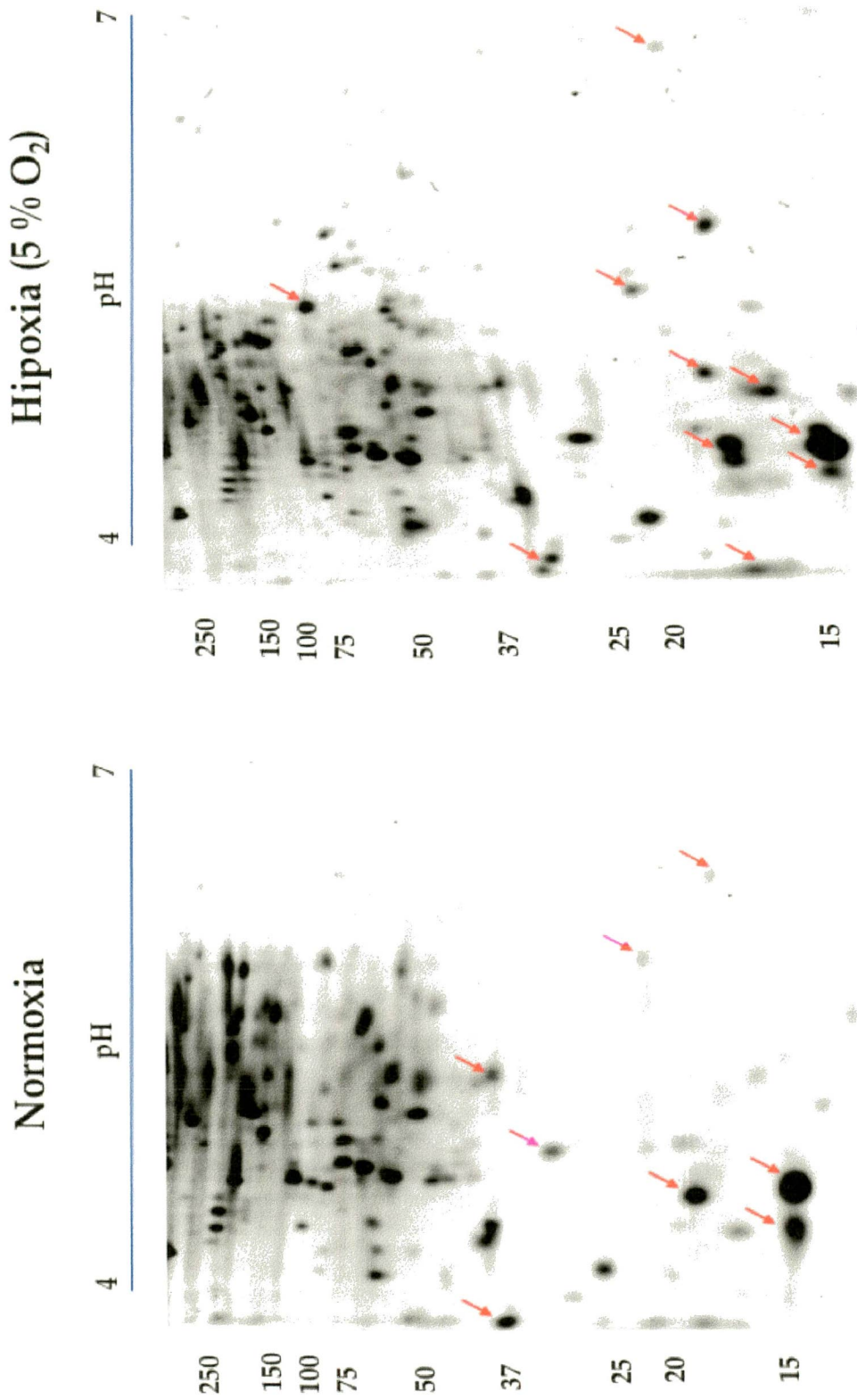


Figura 25. Electroforesis 2D SDS-PAGE de *M. bovis* BCG pMV261 (Normoxia e hipoxia)

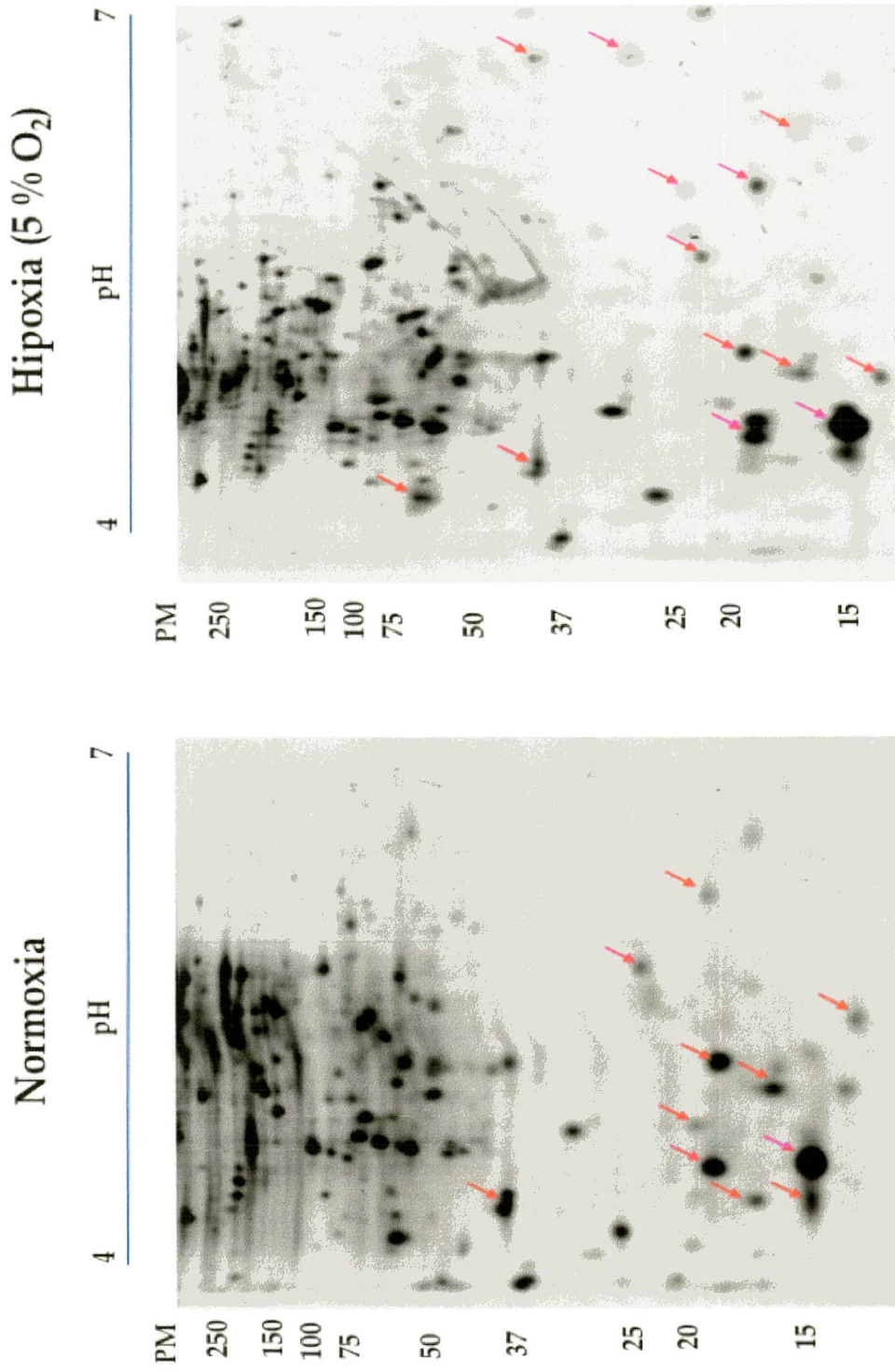


Figura 26. Electroforesis 2D SDS-PAGE de *M. bovis* rBCG-rpfC (Normoxia e hipoxia)

DISCUSION

La tuberculosis latente ha tomado mucha atención en los últimos años debido a que la micobacteria puede permanecer durante un largo periodo dentro del hospedero sin causar sintomatología, pero con el potencial de reactivarse en algún momento y causar enfermedad. Aunque existe una vacuna para prevenir la TB, la inmunidad conferida por esta no es esterilizante y es uno de los problemas principales por los cuales no se ha podido erradicar la TB. Estudios en individuos que murieron por causas distintas a la tuberculosis han demostrado que estaban infectados con *M. tuberculosis*¹⁷. Se sabe que la reactivación se favorece cuando el sistema inmune se encuentra comprometido, y esto puede ser causado por múltiples factores como la infección por VIH, la diabetes mellitus, la desnutrición, el uso de drogas y la resistencia de las cepas a fármacos antituberculosos².

Las condiciones a las que se enfrenta la micobacteria durante la latencia están mediadas por el sistema inmune del hospedero, la disponibilidad de nutrientes y la tensión de O₂ en los tejidos (150 mmHg, 19.95% de O₂ o 20.3 Kpa). Nuestro estudio se enfocó al efecto que tiene el RpfC, que es miembro de la familia de los promotores de resucitación, que se han descrito participan en la reactivación de TBL⁵⁴. Decidimos trabajar con el *rpfC* porque es reconocido por el suero de sujetos sanos (datos no publicados de nuestro grupo de investigación), lo que parece ser un indicativo de que participa durante el estado latente y reactivación en *M. tuberculosis*. En este trabajo utilizamos un modelo de hipoxia diferente, en el que se sometió a los bacilos a una hipoxia estricta, disminuyendo la concentración de oxígeno casi espontáneamente a <1 % de O₂.

Para trabajar con este factor, hicimos una cepa recombinante mediante la clonación del gen *rpfC* de *M. tuberculosis* H37Rv en el vector de expresión pMV261, utilizando como vehículo de expresión la cepa *M. bovis* BCG y así obtener una cepa no patógena que sobreexpresa el *rpfC*.

Similar a lo reportado en *M. luteus*, en quien se sabe que Rpf, induce el crecimiento y restablece las UFC, en las curvas de crecimiento *M. bovis* rBCG-*rpfC* se observó que en los primeros días esta cepa crece más, sin embargo, esta diferencia se pierde posiblemente por la saturación del cultivo y la formación de grumos. Por otro lado, de acuerdo a los resultados de crecimiento en respuesta a la hipoxia (véase Fig. 15 y Fig. 18), observamos que en condiciones de hipoxia estricta no se observan diferencias en la viabilidad de ambas cepas, sin embargo, bajo condiciones de hipoxia con 5% de O₂ se observaron diferencias en el crecimiento de *M. bovis* rBCG-*rpfC*. A pesar de haber inducido un estrés más estricto, alrededor del 30% de las micobacterias resistieron y son bacilos viables cultivables. Nuestros resultados señalan que el RpfC es importante para el crecimiento de *M. bovis*, y son consistentes con estudios *in vitro* que demostraron que al adicionar los 5 *rpf*s de *M. tuberculosis* al medio de cultivo se estimula el crecimiento de las células no replicantes⁵¹, y se promueve la supervivencia de la micobacteria en ratones infectados¹. De forma similar, en estudios recientes donde evaluó la presencia o ausencia de las proteínas Rpf's en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis, se encontró que en las muestras en las que se encontraron los Rpf's, las micobacterias tenían una mejor cultivabilidad (>80%), y aumentaba el número de UFC recuperadas, por lo tanto, estas proteínas son relevantes para la infección⁵⁵.

Con respecto a los resultados de viabilidad, observamos que *M. bovis* rBCG-*rpfC* respondió mejor al estrés hipóxico. Estos resultados nos indican que posiblemente la proteína RpfC es muy importante durante la respuesta de *M. tuberculosis* al estrés hipóxico. En estudios previos del grupo de investigación se encontró que la proteína RpfC es reconocida por el suero de sujetos sanos (datos sin publicar), lo que sugiere

que la proteína RpfC se expresa durante la infección latente y, posiblemente, puede jugar un papel importante en la reactivación y persistencia de la micobacteria. Según los estudios proteómicos y de estructura proteica, se sabe que las proteínas Rpf's son parecidas a la lisozima, y podrían participar en la supervivencia de *M. tuberculosis* tanto en la infección activa como en la infección latente, ya que se sabe *M. tuberculosis* obtiene energía de su misma pared celular que es una rica fuente de carbono. Si se logran hacer más estudios funcionales, es posible que se pueda demostrar que las Rpf's participan en el equilibrio de la degradación de la pared celular para mantener viva a la micobacteria. De acuerdo a nuestros resultados, la proteína RpfC induce y mantiene el crecimiento de *M. bovis* BCG. Sin embargo, a pesar de que se mantuvo el crecimiento de las micobacterias, es probable que para tener una inducción más notoria de crecimiento se necesite la expresión de otras proteínas Rpf's. Se han reportado resultados similares que apoyan nuestros resultados utilizando otras Rpf's y en otras condiciones de estrés. En un estudio se reportó que al adicionar las proteínas RpfD y RpfE al medio de cultivo se inducen el crecimiento de *M. tuberculosis* ⁴⁹. Nosotros obtuvimos resultados similares al de dicho estudio al expresar el gen *rpfC* en la micobacteria.

En el caso del efecto que tiene la sobreexpresión de *rpfC* en la expresión de genes asociados a la latencia en cultivos sometidos a condiciones de hipoxia estricta (<1% de O₂), encontramos que en *M. bovis* rBCG-*rpfC* se sobreexpresan los genes *sigB*, *sigE* y *rpoA* que participan en la regulación transcripcional, y por lo tanto, estos factores podrían estar contribuyendo a una regulación positiva de otros genes que participen en la supervivencia del bacilo durante la quiescencia en la infección latente, o cuando son sometidos a algún otro tipo de estrés. Estudios previos encontraron que los factores sigma de la micobacteria participan durante la latencia, principalmente el factor *sigB* que promueve la unión de la ARN polimerasa a los sitios de iniciación específicos, además de que puede regular la fase estacionaria y la resistencia al estrés general ³⁴. De acuerdo a lo que se sabe, *sigB* es regulado por *sigE* y luego regula *katG*, lo que concuerda con nuestros resultados, ya que también observamos que estos dos

genes se sobreexpresan en condiciones de hipoxia. Se sabe que la enzima KatG es vital para la persistencia del bacilo. Por otro lado, la presencia de 13 factores sigma en *M. tuberculosis* refleja la capacidad que tiene este microorganismo para adaptarse a diversas condiciones de estrés y posiblemente se encuentra estrechamente relacionado con el éxito del patógeno a permanecer un largo periodo de tiempo dentro del hospedero como sucede en la TBL.

En condiciones de hipoxia estricta (<1% de O₂) también encontramos que los genes *dosT*, *katG* y *ahpC* están sobreexpresados en *M. bovis* rBCG-*rpfC*. En el caso *dosT*, este gen es parte del sistema de 3 componentes *devR* que juega un papel importante durante el estado latente de *M. tuberculosis*. En nuestro estudio, el complejo *devR* se encontró subexpresado en condiciones de hipoxia. De acuerdo a los estudios realizados en éste sistema de tres componentes (*dosR-dosS-dosT*), *dosT* se inactiva cuando se une al oxígeno ⁴², por lo tanto, al inducir a la micobacteria a un estrés hipóxico hay poco a nada de moléculas de oxígeno y por dicha razón se encuentra activado. Este sistema de tres componentes en *M. tuberculosis* regula la respuesta en la hipoxia y otras condiciones de estrés *in vitro*, y puede ser importante para la supervivencia bacteriana dentro de las lesiones granulomatosas causadas por la tuberculosis ⁶⁰. En un estudio donde se evaluó el papel de la catalasa peroxidasa como factor de virulencia de *M. tuberculosis*, en el cual realizaron mutaciones no sinónimas en el gen *katG*, se demostró que la disminución de la actividad de la enzima provocó que las micobacterias tuvieran un fallo en la persistencia en ratones BALB/C infectados ⁶¹; nuestros resultados de expresión en condiciones de hipoxia estricta y los resultados de este estudio indican que *katG* posiblemente contribuye a mantener el crecimiento y supervivencia de *M. tuberculosis* dentro de los tejidos del huésped infectados ⁶¹. La expresión del gen *ahpC* también es importante en condiciones de hipoxia, ya que se ha visto que este gen está involucrado en respuesta al estrés oxidativo ⁶⁸.

genes se sobreexpresan en condiciones de hipoxia. Se sabe que la enzima KatG es vital para la persistencia del bacilo. Por otro lado, la presencia de 13 factores sigma en *M. tuberculosis* refleja la capacidad que tiene este microorganismo para adaptarse a diversas condiciones de estrés y posiblemente se encuentra estrechamente relacionado con el éxito del patógeno a permanecer un largo periodo de tiempo dentro del hospedero como sucede en la TBL.

En condiciones de hipoxia estricta (<1% de O₂) también encontramos que los genes *dosT*, *katG* y *ahpC* están sobreexpresados en *M. bovis* rBCG-rpfC. En el caso *dosT*, este gen es parte del sistema de 3 componentes *devR* que juega un papel importante durante el estado latente de *M. tuberculosis*. En nuestro estudio, el complejo *devR* se encontró subexpresado en condiciones de hipoxia. De acuerdo a los estudios realizados en éste sistema de tres componentes (*dosR-dosS-dosT*), *dosT* se inactiva cuando se une al oxígeno ⁴², por lo tanto, al inducir a la micobacteria a un estrés hipóxico hay poco a nada de moléculas de oxígeno y por dicha razón se encuentra activado. Este sistema de tres componentes en *M. tuberculosis* regula la respuesta en la hipoxia y otras condiciones de estrés *in vitro*, y puede ser importante para la supervivencia bacteriana dentro de las lesiones granulomatosas causadas por la tuberculosis ⁶⁰. En un estudio donde se evaluó el papel de la catalasa peroxidasa como factor de virulencia de *M. tuberculosis*, en el cual realizaron mutaciones no sinónimas en el gen *katG*, se demostró que la disminución de la actividad de la enzima provocó que las micobacterias tuvieran un fallo en la persistencia en ratones BALB/C infectados ⁶¹; nuestros resultados de expresión en condiciones de hipoxia estricta y los resultados de este estudio indican que *katG* posiblemente contribuye a mantener el crecimiento y supervivencia de *M. tuberculosis* dentro de los tejidos del huésped infectados ⁶¹. La expresión del gen *ahpC* también es importante en condiciones de hipoxia, ya que se ha visto que este gen está involucrado en respuesta al estrés oxidativo ⁶⁸.

Por otro lado, podría suceder que el gen *fdxA* este relacionado con la regulación de *rpfC*, pues *fdxA* se sobreexpresa en condiciones normales de cultivo y, por lo tanto, cabe la posibilidad de que exista una co-expresión que regule negativamente a *rpfC*. En *M. bovis* rBCG-*rpfC*, la expresión de el gen *rpfC* se indujo en condiciones de hipoxia, sin embargo, en condiciones normales de cultivo se encuentra subexpresado. Es posible que el factor promotor de la resucitación C solamente sea necesaria su transcripción mientras la micobacteria se encuentre en condiciones de estrés.

Con estos resultados, podemos decir que la sobreexpresión de RpfC induce la expresión de *sigB*, *sigE*, *rpoA*, *dosT*, *katG* y *ahpC* en condiciones de hipoxia estricta (<1% O₂). La expresión de los factores sigma, *sigE* y *sigB* es muy importante, ya que estos factores participan cuando la micobacteria se encuentra en diferentes tipos de estrés, como es el caso de nuestro trabajo ³⁷

Nuestros resultados sugieren que las micobacterias utilizan al RpfC cuando se encuentra en hipoxia, mientras que cuando se encuentren en condiciones normales de cultivo, no necesitaran de la expresión de esta proteína. Por lo tanto, se puede sugerir que estas proteínas son importantes durante la infección latente, y es posible que su expresión induzca la regulación de otros genes que participan en la latencia y reactivación del bacilo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis proteómico, encontramos que en condiciones normales de cultivo hay más proteínas y en mayor cantidad en *M. bovis* BCG-pMV261. En el caso de *M. bovis* BCG-*rpfC* resultó que en condiciones de hipoxia se expresan más proteínas que en condiciones normales de cultivo con mayor diferencia en la expresión de las proteínas que se localizan en un rango de pH ácido y con un bajo peso molecular. Sería muy interesante identificar las proteínas expresadas diferenciales en el proteoma de *M. bovis* rBCG-*rpfC* para lograr esclarecer mejor cuales son los factores que se encuentran implicados en el estado latente de la micobacteria,

además poder saber cuales podrían estar involucrados en la reactivación de la micobacteria.

De acuerdo a nuestros resultados de viabilidad, crecimiento, perfil trascricional y perfil proteómico, es posible que el factor RpfC induzca el crecimiento en *M. bovis* BCG tal y como se ha reportado en los estudios con *M. luteus* ⁴⁸. Este es un hallazgo importante acerca de la reactivación en *M. tuberculosis* durante el estado latente. Por último, en lo que respecta a nuestro modelo de hipoxia, resultó ser confiable y reproducible para poder ser usado en posteriores estudios.

CONCLUSIONES

En condiciones de hipoxia *M. bovis* rBCG-rpfC presenta un mayor crecimiento que *M. bovis* BCG-pMV261.

Los resultados de viabilidad muestran que *M. bovis* rBCG-rpfC es más resistente a la hipoxia que *M. bovis* BCG-pMV261.

En *M. bovis* BCG-rpfC se incrementa la expresión de los genes *sigB*, *sigE*, *rpoA*, *katG*, *dosT*, *ahpC* y *rpfC* en condiciones de hipoxia (<1% O₂), mientras que en condiciones de normoxia (21% O₂) *rpfC* se encuentra subexpresado.

Tanto *M. bovis* rBCG-rpfC como *M. bovis* BCG-pMV261 se observa un menor número de proteínas en condiciones de hipoxia. Sin embargo, en *M. bovis* BCG-rpfC se mantiene la expresión de un mayor número de proteínas.

En condiciones de hipoxia se observó una mayor abundancia de proteínas de bajo peso molecular.

El factor RpfC induce y mantiene el crecimiento de *M. bovis* BCG favoreciendo la expresión de genes asociados a la latencia, lo que podría promover la reactivación de la micobacteria cuando ésta se encuentra inactiva.

PERSPECTIVAS

Los avances de nuestros resultados contribuyen a la comprensión de algunos factores que posiblemente estén implicados en el estado latente de *M. tuberculosis*, así como en la reactivación de la micobacteria. Nosotros estudiamos al factor promotor RpfC, sin embargo, en *M. tuberculosis* existen otros cuatro factores promotores de la resucitación de las cuales solo se han hecho estudios con mutantes.

En nuestro estudio se usó *M. bovis* BCG, por lo que sería interesante que se realizaran los mismos ensayos en *M. tuberculosis* H37Rv para comparar si los resultados son similares.

También sería muy interesante realizar ensayos de expresión con microarreglos en condiciones de hipoxia para determinar las vías metabólicas que utiliza la micobacteria para salir de la latencia.

La identificación de las proteínas que se expresaron diferencialmente en respuesta a la hipoxia, es un estudio importante para contribuir en el conocimiento de las proteínas que participan en la latencia y reactivación de la tuberculosis.

Por último, sería muy interesante trabajar con *M. bovis* BCG-rpfC, realizando infecciones en un modelo murino y dado que nuestros resultados indican que el factor promotor de la resucitación C induce y mantiene el crecimiento en *M. bovis* BCG, existe la posibilidad de que se pueda hacer una vacuna, ya que para que tenga éxito es necesario que la cepa se mantenga activa replicándose y permaneciendo más tiempo en el hospedero sin que ésta sea virulenta.

REFERENCIAS

Artículos

1. Dutta NK, Karakousis PC. Latent tuberculosis infection: myths, models, and molecular mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014; **78**(3): 343-71.
2. Gupta RK, Srivastava R. Resuscitation promoting factors: a family of microbial proteins in survival and resuscitation of dormant mycobacteria. *Indian J Microbiol* 2012; **52**(2): 114-21.
3. Chaparas SD. [Immunity in tuberculosis]. *Bull World Health Organ* 1982; **60**(6): 827-44.
4. Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998; **6**(3): 107-12.
5. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. 1991. *Bull World Health Organ* 2001; **79**(1): 71-5.
6. Wayne LG, Hayes LG. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun* 1996; **64**(6): 2062-9.
7. Mc DW. Microbial persistence. *Yale J Biol Med* 1958; **30**(4): 257-91.
8. Cardona PJ. New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007; **6**(1): 27-39.
9. MORENO GB. PRIMOINFECCION TUBERCULOSA. PATOGENIA Y CLÍNICA. *elvisiever* 1983.; **19**(6): 30-45.
10. Figueroa MCEGa-S. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 2001; **14**(2): 114-28.

11. Robertson HE. The Persistence of Tuberculous Infections. *Am J Pathol* 1933; **9**(Suppl): 711-8 1.
12. Kaplan G, Post FA, Moreira AL, et al. Mycobacterium tuberculosis growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect Immun* 2003; **71**(12): 7099-108.
13. Mc DW. Inapparent infection: relation of latent and dormant infections to microbial persistence. *Public Health Rep* 1959; **74**(6): 485-99.
14. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, et al. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994; **263**(5147): 678-81.
15. Primm TP, Andersen SJ, Mizrahi V, Avarbock D, Rubin H, Barry CE, 3rd. The stringent response of Mycobacterium tuberculosis is required for long-term survival. *J Bacteriol* 2000; **182**(17): 4889-98.
16. Manganelli R. Polyphosphate and stress response in mycobacteria. *Mol Microbiol* 2007; **65**(2): 258-60.
17. Barrios-Payan J, Saqui-Salces M, Jeyanathan M, et al. Extrapulmonary locations of mycobacterium tuberculosis DNA during latent infection. *J Infect Dis* 2012; **206**(8): 1194-205.
18. Neyrolles O, Hernandez-Pando R, Pietri-Rouxel F, et al. Is adipose tissue a place for Mycobacterium tuberculosis persistence? *PLoS One* 2006; **1**: e43.
19. Hu Y, Movahedzadeh F, Stoker NG, Coates AR. Deletion of the Mycobacterium tuberculosis alpha-crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo. *Infect Immun* 2006; **74**(2): 861-8.
20. MENDEZ J. EZS, Fernando S .; ZAMORA L., José F. y Cortés V., Asdrúba. Un acercamiento a la cinética del oxígeno. (Parte I). *costarric Cardiol* 2004; **6**: 27-32.
21. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 2011; **15**(6): 1239-53.
22. Lovesio C. El oxígeno en el organismo. *libro virtual intramed* 2001.

23. Sullivan M, Galea P, Latif S. What is the appropriate oxygen tension for in vitro culture? *Mol Hum Reprod* 2006; **12**(11): 653.
24. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* 2002; **43**(3): 717-31.
25. Deb C, Lee CM, Dubey VS, et al. A novel in vitro multiple-stress dormancy model for Mycobacterium tuberculosis generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. *PLoS One* 2009; **4**(6): e6077.
26. Bloch H, Segal W. Biochemical differentiation of Mycobacterium tuberculosis grown in vivo and in vitro. *J Bacteriol* 1956; **72**(2): 132-41.
27. Shi L, Sohaskey CD, Pfeiffer C, et al. Carbon flux rerouting during Mycobacterium tuberculosis growth arrest. *Mol Microbiol* 2010; **78**(5): 1199-215.
28. Bryk R, Gold B, Venugopal A, et al. Selective killing of nonreplicating mycobacteria. *Cell Host Microbe* 2008; **3**(3): 137-45.
29. Dhiman RK, Mahapatra S, Slayden RA, et al. Menaquinone synthesis is critical for maintaining mycobacterial viability during exponential growth and recovery from non-replicating persistence. *Mol Microbiol* 2009; **72**(1): 85-97.
30. Liu K, Yu J, Russell DG. pckA-deficient Mycobacterium bovis BCG shows attenuated virulence in mice and in macrophages. *Microbiology* 2003; **149**(Pt 7): 1829-35.
31. Movahedzadeh F, Rison SC, Wheeler PR, Kendall SL, Larson TJ, Stoker NG. The Mycobacterium tuberculosis Rv1099c gene encodes a GlpX-like class II fructose 1,6-bisphosphatase. *Microbiology* 2004; **150**(Pt 10): 3499-505.
32. Singh A, Crossman DK, Mai D, et al. Mycobacterium tuberculosis WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. *PLoS Pathog* 2009; **5**(8): e1000545.
33. Singh A, Guidry L, Narasimhulu KV, et al. Mycobacterium tuberculosis WhiB3 responds to O₂ and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(28): 11562-7.

34. Lee JH, Karakousis PC, Bishai WR. Roles of SigB and SigF in the Mycobacterium tuberculosis sigma factor network. *J Bacteriol* 2008; **190**(2): 699-707.
35. Manganelli R, Provvedi R, Rodrigue S, Beaucher J, Gaudreau L, Smith I. Sigma factors and global gene regulation in Mycobacterium tuberculosis. *J Bacteriol* 2004; **186**(4): 895-902.
36. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 1998; **393**(6685): 537-44.
37. Ando M, Yoshimatsu T, Ko C, Converse PJ, Bishai WR. Deletion of Mycobacterium tuberculosis sigma factor E results in delayed time to death with bacterial persistence in the lungs of aerosol-infected mice. *Infect Immun* 2003; **71**(12): 7170-2.
38. Kaushal D, Schroeder BG, Tyagi S, et al. Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a Mycobacterium tuberculosis mutant lacking alternative sigma factor, SigH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(12): 8330-5.
39. Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, et al. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of Mycobacterium tuberculosis is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**(16): 9578-83.
40. Cunningham AF, Spreadbury CL. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* 1998; **180**(4): 801-8.
41. Parish T, Smith DA, Kendall S, Casali N, Bancroft GJ, Stoker NG. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 2003; **71**(3): 1134-40.
42. Karakousis PC, Yoshimatsu T, Lamichhane G, et al. Dormancy phenotype displayed by extracellular Mycobacterium tuberculosis within artificial granulomas in mice. *J Exp Med* 2004; **200**(5): 647-57.
43. Park HD, Guinn KM, Harrell MI, et al. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* 2003; **48**(3): 833-43.

44. Rustad TR, Sherrid AM, Minch KJ, Sherman DR. Hypoxia: a window into Mycobacterium tuberculosis latency. *Cell Microbiol* 2009; **11**(8): 1151-9.
45. Rustad TR, Harrell MI, Liao R, Sherman DR. The enduring hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One* 2008; **3**(1): e1502.
46. Taneja NK, Dhingra S, Mittal A, Naresh M, Tyagi JS. Mycobacterium tuberculosis transcriptional adaptation, growth arrest and dormancy phenotype development is triggered by vitamin C. *PLoS One* 2010; **5**(5): e10860.
47. Honaker RW, Dhiman RK, Narayanasamy P, Crick DC, Voskuil MI. DosS responds to a reduced electron transport system to induce the Mycobacterium tuberculosis DosR regulon. *J Bacteriol* 2010; **192**(24): 6447-55.
48. Mukamolova GV, Turapov OA, Kazarian K, et al. The rpf gene of Micrococcus luteus encodes an essential secreted growth factor. *Mol Microbiol* 2002; **46**(3): 611-21.
49. Kana BD, Gordhan BG, Downing KJ, et al. The resuscitation-promoting factors of Mycobacterium tuberculosis are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Mol Microbiol* 2008; **67**(3): 672-84.
50. Cohen-Gonsaud M, Keep NH, Davies AP, Ward J, Henderson B, Labesse G. Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain. *Trends Biochem Sci* 2004; **29**(1): 7-10.
51. Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, Kaprelyants AS, Kell DB, Young M. A family of autocrine growth factors in Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* 2002; **46**(3): 623-35.
52. Sun Z, Zhang Y. Spent culture supernatant of Mycobacterium tuberculosis H37Ra improves viability of aged cultures of this strain and allows small inocula to initiate growth. *J Bacteriol* 1999; **181**(24): 7626-8.
53. Hett EC, Chao MC, Steyn AJ, Fortune SM, Deng LL, Rubin EJ. A partner for the resuscitation-promoting factors of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* 2007; **66**(3): 658-68.
54. Russell-Goldman E, Xu J, Wang X, Chan J, Tufariello JM. A Mycobacterium tuberculosis Rpf double-knockout strain exhibits profound defects in reactivation

from chronic tuberculosis and innate immunity phenotypes. *Infect Immun* 2008; **76**(9): 4269-81.

55. Mukamolova GV, Turapov O, Malkin J, Woltmann G, Barer MR. Resuscitation-promoting factors reveal an occult population of tubercle Bacilli in Sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; **181**(2): 174-80.

56. Mukamolova GV, Murzin AG, Salina EG, et al. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Mol Microbiol* 2006; **59**(1): 84-98.

57. Downing KJ, Mischenko VV, Shleeva MO, et al. Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five rpf-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro. *Infect Immun* 2005; **73**(5): 3038-43.

58. Mohan VP, Scanga CA, Yu K, et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun* 2001; **69**(3): 1847-55.

59. Aly S, Wagner K, Keller C, et al. Oxygen status of lung granulomas in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *J Pathol* 2006; **210**(3): 298-305.

60. Converse PJ, Karakousis PC, Klinkenberg LG, et al. Role of the dosR-dosS two-component regulatory system in *Mycobacterium tuberculosis* virulence in three animal models. *Infect Immun* 2009; **77**(3): 1230-7.

61. Li Z, Kelley C, Collins F, Rouse D, Morris S. Expression of katG in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *J Infect Dis* 1998; **177**(4): 1030-5.

Páginas web.

64. Allen, M., Garrett, P., Backus, J. & Bruske, C.F. (agosto 23, 2016). *Tuberculosis*. agosto 23, 2016, de MedlinePlus Magazine Sitio web: <https://medlineplus.gov/spanish/nihadvisory.html>

-
65. Fitzgerald, B. (julio 01, 2015). *Enfermedad de tuberculosis (TB): Síntomas y factores de riesgo*. enero 23, 2017, de CDC Sitio web: <https://www.cdc.gov/Spanish/especialesCDC/SintomasTuberculosis/>
66. López, J., Morales, K., Pier, E., González, M. & Matus, C. (diciembre, 2014). *Manual de SINAVE*. diciembre, 2014, de SINAVE Sitio web: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/manual/manual_not.pdf
67. Berrueta, T, U. (octubre 07, 2016). *TUBERCULOSIS*. octubre 07, 2016, de Depto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM Sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tuberculosis.htm>
68. Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM & Cole ST. . (marzo 27, 2013). *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. marzo 27, 2013, de Tuberculist Sitio web: <http://tuberculist.epfl.ch/>
69. Cerqueiro M.C. (2010). *Tuberculosis: diagnóstico y epidemiología, las claves del desafío*. 2016, de Tisiología Sitio web: https://es.slideshare.net/Biologia_Comercial/tuberculosis-14309447
70. Asamblea mundial de la salud. (2016). *Global tuberculosis report*. 2016, de WHO Sitio web: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/m/abstract/Js23098en/>
71. Janice Carr Content Providers. (2007). *Bacteria*. 2016, de Lippincott`s illustrated reviews:Microbiology Sitio web: <https://es.scribd.com/document/337774923/Bacteria>
72. Clifton E. Barry, Helena I. Boshoff, Véronique Dartois, Thomas Dick, Sabine Ehrh, JoAnne Flynn, Dirk Schnappinger, Robert J. Wilkinson & Douglas Young.. (diciembre, 2009). *Tuberculous granulomas*. diciembre, 2016, de nature reviews microbiology Sitio web: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n12/fig_tab/nrmicro2236_F3.ht

Libros

73. Rodríguez Díaz R, C. (2003). *Mycobacterium tuberculosis y su implicación en el control de la tuberculosis en cuba*. (tesis de doctorado). Instituto de medicina tropical -Pedro Kouri-, La Habana, Cuba.

ANEXOS

GLOSARIO

Anoxia: La anoxia es la falta casi total de oxígeno en un tejido. Es un estado en que la necesidad de oxígeno de las células del organismo no es satisfecha.

Caseum: En el centro del tubérculo o granuloma, se acumulan detritus celulares, micobacterias y productos de exudación, formando un contenido de color blanquecino, con apariencia de queso blando. De allí el nombre de caseum que se da al material del tubérculo y de necrosis caseosa al proceso por el cual tal material se forma.

Enfermedad: El término enfermedad proviene del latín *infirmitas*, que significa literalmente “falta de firmeza”. La definición de enfermedad según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es la de “Alteración o desviación del estado fisiológico en una o varias partes del cuerpo, por causas en general conocidas, manifestada por síntomas y unos signos característicos, y cuya evolución es más o menos previsible”

Granuloma: El granuloma es un tumor benigno de naturaleza inflamatoria que puede aparecer en ciertas zonas del organismo (piel, órganos o mucosas). Los granulomas tienen una compleja conformación dado que se componen de linfocitos, macrófagos infectados de micobacterias, fibroblastos, entre otros.

Hipoxia: Es un estado de deficiencia de oxígeno en la sangre, células y tejidos del organismo, con compromiso de la función de los mismos.

Infección aguda: Es aquella que se presenta bruscamente y se resuelve a corto plazo.

Infeción crónica: Son afecciones de larga duración y de progresión lenta, toda enfermedad que tenga una duración mayor a seis meses puede considerarse como crónica.

Infeción latente: Se mantiene oculta, no se presentan signos ni síntomas, pero esta en el cuerpo.

Infeción primaria: La infección primaria ocurre en personas sin inmunidad específica, generalmente niños sanos y adultos jóvenes quienes no habían estado anteriormente expuestos al patógeno.

Infeción: Invasión o multiplicación de agentes patógenos en los tejidos de un organismo.

Latencia: Dormancy es un término antropomórfico derivado del latín- *dormire-*, que significa "a dormir", y este término ha sido utilizado para designar una variedad de condiciones en las que las bacterias son viables, pero tienen una actividad metabólica reducida o que permanecen en la fase estacionaria de crecimiento.

Persistencia: La bacteria adquiere la capacidad de persistir o sobrevivir en los tejidos del hospedero bajo diferentes condiciones de estrés. Por lo tanto, la persistencia es la capacidad que tienen los microorganismos de sobrevivir ante un ataque que subiste en el hospedero.

Primo-infección: Se entiende por "primo-infección" al conjunto de reacciones adversas que se producen en el organismo humano, la primera vez que este se pone en contacto con el patógeno.

Quiescencia: Una célula quiescente es aquella que no está en división celular y por lo tanto, se encuentra fuera del ciclo celular, en la fase G0.

Tabla A1. Genes asociados a la latencia en *M. tuberculosis*.

Gen	Función biológica
<i>rpfC</i>	Pensado para promover la reanimación y el crecimiento de las células en estado latente, también podría estimular el crecimiento.
<i>rpoA</i>	DNA polimerasa dependiente de RNA, cataliza la transcripción de ADN a RNA utilizando los cuatro fosfatos de ribonucleósido como sustrato.
<i>dosT</i>	Es un sensor, parte del sistema regulador <i>devR/dosT</i> , promueve la supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> durante la persistencia, <i>dosT</i> se inactiva cuando se une al oxígeno.
<i>devR</i>	Es parte del sistema regulador de dos componentes <i>devR/dosT</i> y controla <i>hspX/Rv2031</i> y la expresión de <i>acR</i> .
<i>sigB</i>	Es un factor sigma de iniciación que promueve la unión de la RNA polimerasa a los sitios de iniciación específicos y luego se libera. Puede regular la fase estacionaria y la resistencia al estrés en general. Parece ser que está regulado por <i>Rv3223c</i> y <i>sigE</i> . Posible regulador de <i>katG</i> y la respuesta al choque térmico.
<i>sigE</i>	Es un factor de iniciación que promueve la unión de la RNA polimerasa a los sitios de iniciación específicos y luego se libera. Parece ser que se encuentra regulado por (<i>Rv3223c</i>).
<i>fdxA</i>	Involucrado en la transferencia de electrones.
<i>nark2</i>	Participa en la excreción de nitrito, producido por la reducción de nitrato, a través de la membrana. Responsable de la translocación del sustrato a través de la membrana.
<i>pfkB</i>	Involucrado en el glucólisis: convierte el azúcar -1-P en azúcar-1,6-P [actividad catalítica: $ATP + D\text{-fructosa } 6\text{-fosfato} = ADP + D\text{-fructosa } 1,6\text{-bisfosfato}$].
<i>ahpC</i>	Involucrado en respuesta al estrés oxidativo, codifica una peroxidasa dependiente de NADH reductasa y peroxinitrito que proporciona protección contra estrés oxidativo.
<i>katG</i>	Enzima multifuncional, con función de catalasa, peroxidasa de amplio espectro, y con una actividad de peroxinitrasa. Puede desempeñar un papel en la supervivencia intracelular de las micobacterias dentro de los macrófagos; protección contra intermediarios de O_2 y N producidos por las células fagocíticas. Parece estar regulado por <i>sigB</i> .
<i>narX</i>	Involucrados en la reducción de nitrato y en la persistencia en el huésped.

Genes analizados en el ensayo de qRT-PCR tiempo real.

>plasmidPMV261RPFC-Clone2

GCGAGGACAACCTTGAGCCGTCCGTGCGGGGCACTGCGCCGGCCAGCGTAAGTAGCGGGGTTG
 CCGTCACCCGGTGACCCCCGGTTTCATCCCCGATCCGGAGGAATCACTTCGCAATGGCCAAGAC
 AATTGCGGATCCGTGCATCCTTTGCCGGCCGACCACGGCCGGTCGCGGTGCAATAGACACCCGA
 TCTCACCCTCTCTAATCGGTAACGCTTCGGCCACTTCGGCGATATGTCGAGCATGACAAGA
 ATCGCCAAGCCGCTCATCAAGTCCGCCATGGCCGAGGACTCGTCACGGCATCCATGTCGCTCT
 CCACCGCCGTTGCCACGCCGGTCCCAGCCCGAACTGGGACGCCGTGCGGCAGTGCGAATCCG
 GGGGCAACTGGGCGGCAACACCGGAAACGGCAAATACGGCGGACTGCAGTTCAAGCCGGCCA
 CCTGGGCCGCATTCGGCGGTGTGCGCAACCCAGCAGCTGCCTCTCGGGAACAACAAATCGCAGT
 TGCCAATCGGGTTCTCGCCGAACAGGGATTGGACGCGTGGCCGACGTGCGGCGCCGCTCTGG
 CCTCCGATCGCACTGTGGTCGAAACCCGCGCAGGGCATCAAGCAAATCATCAACGAGATCATT
 GGGCAGGCATTAGGCAAGTATTCGCGCTGAAAGCTTATCGATGTGACGCTAGTTAACTAGCGT
 ACGATCGACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTA
 T

Sitio de restricción *Bam*HI

pMV261: 4488 pb

Sitio de restricción *Hind* IIIGen *rpfC**rpfC*: 531 pb

Secuencia de inicio de la traducción

Plásmido pMV261

Secuencia de aminoácidos (143 aa)

MSSMTRIAKPLIKSAMAAGLVTASMSLSTAVAHAGPSPNWD
 AVAQCESGGNWAANTGNGKYGGLQFKPATWAAFVGGVGNPA
 AASREQQIAVANRVLAEQGLDAWPTCGAASGLPIALWSKPA
 QGIKQIINEIIWAGIQASIPR|Stop

Resultado de BLASTp

[Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#)

resuscitation-promoting factor *rpfC* [Mycobacterium tuberculosis CDC1551A]
 Sequence ID: [EGB28749.1](#) Length: 143 Number of Matches: 1
[▶ See 2172 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 143 [GenPept](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
283 bits(724)	1e-96	Compositional matrix adjust.	143/143(100%)	143/143(100%)	0/143(0%)
Query 1	MSSMTRIAKPLIKSAMAAGLVTASMSLSTAVAHAGPSPNWD				60
Sbjct 1	MSSMTRIAKPLIKSAMAAGLVTASMSLSTAVAHAGPSPNWD				60
Query 61	YGGLQFKPATWAAFVGGVGNPAAASREQQIAVANRVLAEQGLDAWPTCGAASGLPIALWSK				120
Sbjct 61	YGGLQFKPATWAAFVGGVGNPAAASREQQIAVANRVLAEQGLDAWPTCGAASGLPIALWSK				120
Query 121	PAQGIKQIINEIIWAGIQASIPR	143			
Sbjct 121	PAQGIKQIINEIIWAGIQASIPR	143			

Figura A1. Resultados de secuenciación de la clonación del gen *rpfC*. En la parte superior se muestra la secuencia obtenida del plásmido clonado pMV261-*rpfC*. Posteriormente se muestra la secuencia de la proteína y en la parte inferior el alineamiento de la secuencia de la proteína obtenida con la reportada en el NCBI en la cepa *M. tuberculosis* CDC1551A.

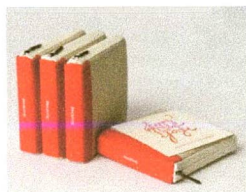
Coordinación de Certificación y Registro

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno

Pedro Ahumada



TESIS URGENTES

REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTORICO MEXICO, D.F.

Tel. 55-12-84-69

Part. 26-19-07-42

Celular 0445559911551

PRESUPUESTOS DE 9:30 A 7:00 P.M.

SÁBADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.

impresosahumada@hotmail.com