



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Búsqueda de marcadores genómicos y lipídicos de *Mycobacterium colombiense*, una micobacteria potencialmente virulenta perteneciente al complejo MAC

John Emerson Leguizamón Guerrero

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2012

Búsqueda de marcadores genómicos y lipídicos de *Mycobacterium colombiense*, una micobacteria potencialmente virulenta perteneciente al complejo MAC

John Emerson Leguizamón Guerrero

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Bioquímica

Director (a):

Carlos Yesid Soto Ospina, Ph.D.,

Línea de Investigación:

Interacción hospedero-patógeno

Grupo de Investigación:

Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2012

A mi primo Gustavo Alexander Castillo.

Q.E.P.D

Agradecimientos

A la universidad Nacional de Colombia, quien fue mi hogar por tantos años, a los profesores que encontré en mi camino y que fueron una guía a lo largo del desarrollo de mi trabajo y de mi formación como profesional, especialmente al Dr Carlos Yesid Soto quien fue mi director en el desarrollo de éste proyecto. A la Dra Martha Isabel Murcia quien me abrió las puertas del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina donde pudo desarrollar una parte del proyecto, pero quien además fue una guía en muchos de los conceptos y principios propios de la micobacteriología. A la profesora Elizabeth López con quien aprendí los primeros conceptos de bioquímica y quien me dio las bases y el apoyo para continuar con el posgrado en esta área.

Agradezco a mi familia por estar siempre conmigo, ayudándome en los buenos momentos pero sobre todo en los difíciles, sin ellos no habría podido culminar este proyecto.

Resumen

En el presente estudio se desarrolló un ensayo para la identificación específica de *Mycobacterium colombiense* mediante PCR. Además se estudió el perfil glicolípido de la envoltura de esta nueva especie con el fin de identificar marcadores lipídicos con potencial utilidad para su diferenciación de las demás especies del complejo *Mycobacterium avium* (MAC). *Mycobacterium colombiense* es un nuevo miembro del complejo MAC, responsable de infecciones diseminadas en pacientes VIH positivos en Colombia, así como también casos de linfadenopatías en niños en Europa.

A través de la técnica de amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN por PCR (RAPD – PCR) se identificaron 5 fragmentos que amplifican exclusivamente en *M. colombiense* pero no en *M. avium*, empleado como control. Los fragmentos diferenciales fueron clonados, secuenciados, y a partir de su análisis bioinformático se identificaron tres secuencias genómicas de *M. colombiense* que no comparten ninguna identidad con las secuencias depositadas en Genbank y Tuberculist. Basados en las secuencias obtenidas se diseñaron primers para desarrollar una PCR especie específica para la identificación de *M. colombiense*. En los diferentes ensayos se logró amplificar específicamente un fragmento de 634 pb presente en todas las cepas de *M. colombiense*, pero no en ninguna de 25 micobacterias diferentes utilizadas como control, que incluyen algunas especies del MAC. El fragmento de 634 pb hace parte de una secuencia que codifica para una proteína hipotética exclusiva de *M. colombiense*; de la que no se encontró evidencias de su funcionalidad. Adicionalmente se identificaron 2 ácidos micólicos diferenciales y un patrón de Glicopéptidolípidos específico para *M. colombiense* de utilidad potencial como marcadores lipídicos útiles en la identificación de *M. colombiense*.

Palabras clave: *Mycobacterium colombiense*, RAPD, PCR, MAC

Abstract

In this study it was developed an assay for specific identification of *Mycobacterium colombiense* by PCR, It was also studied the glycolipid profile of envelope of this new species to identify lipidic markers with potential utility for its differentiation from other members from *Mycobacterium avium* complex (MAC).

Mycobacterium colombiense is a novel MAC member, responsible for disseminated infections in HIV-infected patients in Colombia and lymphadenopathy cases in children from Europe.

Through the Random amplified polymorphic DNA technique by PCR (RAPD - PCR) five genomic fragments that amplified exclusively in *M. colombiense* but not in *M. avium* were amplified. They were cloned and sequenced. From the bioinformatic analysis three genomic *M. colombiense* sequences without known identity in the Genbank database and Tuberculist were identified. Based on this sequences it were designed a species specific *M. colombiense* PCR primers. Through the different trials a 634 bp fragment present in all strains of *M. colombiense*, but not in any of the 25 mycobacteria tested, including some MAC members was amplified. The 634 bp fragment is part of a sequence that encodes a hypothetical protein specific to *M. Colombiense*, however from the bioinformatic analysis no evidence of its functionality was found. Additionally, two different mycolic acids and a specific pattern of *M. colombiense* glycopeptidolipids was identified whose also could be used as lipid markers useful in their identification and differentiation from other MAC members

Key words: *Mycobacterium colombiense*, RAPD, PCR, MAC

Contenido

	Pág.
Resumen	V
Abstract	VI
Lista de figuras	X
Lista de tablas	XII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIII
1. Introducción	1
1.1 Genero <i>Mycobacterium</i>	3
1.1.1 Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTC).....	4
1.1.2 Micobacterias no tuberculosas (MNT)	5
1.1.3 Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	6
1.2 Envoltura de las micobacterias	7
1.2.1 Pared celular.....	11
1.2.2 Envoltura de las micobacterias pertenecientes al complejo MAC	16
1.2.3 Glicopeptidolípidos (GPL)	16
1.2.4 Métodos de detección e identificación de MNT	18
2. Hipótesis experimental	25
3. Objetivos	26
3.1 Objetivo general.....	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. Avances previos	27
5. Estrategia experimental	29
6. Materiales y métodos	31
6.1 Cepas bacterianas, medios, condiciones de cultivo y conservación de cepas31	
6.1.1 Condiciones generales de Cultivo	32
6.1.2 Conservación de cepas.....	32
6.2 Técnicas de biología molecular.....	33
6.2.1 Extracción de ADN genómico de micobacterias	33
6.2.2 Estimación de la concentración de ADN por espectrofotometría UV ...	35

6.2.3	Amplificación por PCR de los fragmentos seleccionados: F1 - F5 con los primers OPA 03, OPA 04 y OPE 01 para el ADN de <i>M. colombiense</i> CECT 3035	35
6.2.4	Purificación de fragmentos F1 - F5	36
6.2.5	Clonación de fragmentos genómicos de <i>M. colombiense</i> F1 - F5	37
6.2.6	Ligación y clonación de los fragmentos de PCR purificados	38
6.2.7	Transformación de células competentes	39
6.2.8	Extracción y purificación de plásmido	39
6.2.9	Secuenciación y análisis bioinformáticos	40
6.2.10	Diseño de primers y desarrollo de PCR especie específica para <i>M. colombiense</i> CECT 3035	41
6.2.11	Estandarización PCR especie específica, etapa 1 con ADN de <i>M. colombiense</i> CECT 3035	42
6.2.12	Estandarización PCR especie específica, etapa 2	43
6.2.13	Análisis de restricción del fragmento amplificado	44
6.3	Técnicas de análisis de lípidos	44
6.3.1	Extracción de lípidos totales	44
6.3.2	Ácidos micólicos	45
6.3.3	Análisis de ácidos micólicos por TLC	46
6.3.4	Extracción de Glicopeptidolípidos	46
6.3.5	Deacilación de GPL	47
6.3.6	Análisis GPL mediante TLC	47
7.	Resultados y discusión	48
7.1	Análisis molecular	48
7.1.1	Amplificación por PCR y purificación de los fragmentos de interés	49
7.1.2	Clonación de fragmentos genómicos F1 – F5 de <i>M. colombiense</i> en <i>E. coli</i> MJ109.....	51
7.1.3	Análisis de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos diferencialmente amplificados en <i>M. colombiense</i>	53
7.1.4	Análisis bioinformático secuencia fragmento F4	56
7.1.5	PCR específica para <i>M. colombiense</i>	60
7.1.6	Análisis de restricción de la secuencia J3	67
7.2	Análisis de lípidos.....	69
7.2.1	Análisis de ácidos micólicos por cromatografía en capa delgada.....	70
7.2.2	Análisis de GPL por cromatografía en capa delgada	73
8.	Conclusiones y recomendaciones	75
8.1	Conclusiones.....	75
8.2	Recomendaciones.....	76
A.	Anexo: Secuencia nucleotídica para el fragmento F1	77
B.	Anexo: Secuencia nucleotídica para el fragmento F2.....	78
C.	Anexo: Secuencia nucleotídica para el fragmento F3.....	79
D.	Anexo: Secuencia nucleotídica fragmento F4	80
E.	Anexo: Secuencia nucleotídica para el fragmento F5.....	81
F	Anexo: Secuencia proteína hipotética <i>M. colombiense</i> EGT88130.1	82

G Anexo: Productos de amplificación para J2	83
Bibliografía	84
Presentaciones en congresos	92
Manuscritos en preparación.....	93
Fuentes de financiación.....	94

Lista de figuras

	Pág
Figura 1-1. Representación esquemática de la pared celular micobacteriana.	9
Figura 1-2. Modelo esquemático de la envoltura celular del género <i>Mycobacterium</i>	10
Figura 1-3. Representación esquemática de A: PG y B: AG.....	11
Figura 1-4. Esquema del PIM.....	14
Figura 1-5. Estructura A: PGL y B: LOS	15
Figura 1-6. Diagrama esquemático de A: TDM y B: SL.	16
Figura 1-7. Estructura de los GPL apolares y polares	17
Figura 4-1. Electroforesis productos de PCR RAPD empleando los primers: A: OPA 03, B. OPA 04, C: OPE 01.	28
Figura 5-1. Estrategia experimental para el desarrollo del presente estudio.....	30
Figura 6-1. Mapa circular del vector pGEM-T Easy Vector	38
Figura 7-1. Electroforesis productos de extracción de ADN de micobacterias empleadas en este estudio.....	48
Figura 7-2. Electroforesis de los productos de amplificación purificados para los primers OPA 03, OPA 04 y OPE 01.....	50
Figura 7-3. Selección de recombinantes positivos para el fragmento F1 empelado medio LB / ampicilina / XGal / IPTG.....	51
Figura 7-4. Electroforesis para los productos de extracción de plásmidos.....	52
Figura 7-5. Diagrama predicción de un péptido señal para la secuencia de la proteína hipotética EGT88130.1 de <i>M. colombiense</i> CECT 3035	58
Figura 7-6. Estructura tridimensional de la proteína hipotética EGT88130.1 de <i>M.</i> <i>colombiense</i> desarrollado con el servidor Modeller.	59
Figura 7-7. Diagrama de Ramachandran señalando la posible estructura secundaria que puede adoptar la secuencia modelada para la proteína hipotética EGT88130.1 de <i>M.</i> <i>colombiense</i>	59
Figura 7-8. Productos de amplificación para <i>M. colombiense</i> con primer J2 a 54°C.....	61
Figura 7-9. Productos de amplificación usando los primers A: J1 y B: J3. M	63
Figura 7-10. Electroforesis para los productos de amplificación con primers J3 entre <i>M.</i> <i>colombiense</i> y micobacterias control a 60°C.....	64
Figura 7-11. Electroforesis para productos de amplificación con primers J3 en <i>M.</i> <i>colombiense</i> y otras micobacterias en las condiciones de amplificación seleccionadas	65
Figura 7-12. Patrón de restricción para el fragmento amplificado con los primers J3 de <i>M.</i> <i>colombiense</i> CECT 3035 con HindIII.	69
Figura 7-13. Perfil de AM para <i>M. colombiense</i>	71

Figura 7-14. Perfil de ácidos micólicos por HPLC para *M. avium* (a) y *M. colombiense* (b)
..... 72

Figura 7-15. Perfil de GPL de *M. colombiense* por cromatografía en capa delgada..... 73

Lista de tablas

	Pág
Tabla 1-1. Estructura de los diferentes tipos de ácidos micólicos.	12
Tabla 1-2. GPL identificados estructuralmente para las serovariedades de MAC.	18
Tabla 1-3. Métodos de detección e identificación de diferentes especies para MNT	19
Tabla 1-4. Elementos IS presentes en MAC.	21
Tabla 4-1. Nombres asignados a los productos de amplificación específica en <i>M. colombiense</i> por PCR RAPD	27
Tabla 6-1. Especies empleadas en el presente estudio	31
Tabla 6-2. Medios de cultivo empleados en el presente trabajo.....	31
Tabla 6-3. ADN micobacteriales empleados en el presente trabajo	34
Tabla 6-4. Temperatura de anillamiento de primers evaluados y concentración de los reactivos empleados en la PCR para los fragmentos seleccionados.....	36
Tabla 6-5. Concentración de los reactivos empleados en la PCR para <i>M. colombiense</i>	43
Tabla 7-1. Cuantificación de ADN extraídos de <i>M. colombiense</i> , <i>M. avium</i> 104 y <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	49
Tabla 7-2. Cuantificación de los fragmentos purificados a partir PCR RAPD	50
Tabla 7-3. Cuantificación plásmidos por fluorescencia usando bromuro de etidio	53
Tabla 7-4. Análisis bioinformático indicando los marcos de lectura abiertos presentes así como la codificación asignada para cada fragmento	55
Tabla 7-5. Principales constantes fisicoquímicas de la proteína hipotética EGT88130.1 de <i>M. colombiense</i> CECT 3035	57
Tabla 7-6. Primers empleados en la estandarización de la PCR especie específica para <i>M. colombiense</i>	60
Tabla 7-7. Concentración de reactivos para la PCR con los primers J1 y J3	63
Tabla 7-8. Concentración de los reactivos empleados en la PCR específica para <i>M. colombiense</i> con el juego de primers J3.	65
Tabla 7-9. Sitios de restricción presentes en el fragmento J3	67
Tabla 7-10. Reactivos empleados en la digestión del fragmento amplificado con los primers J3	68
Tabla 7-11. Masa obtenida para es extracto crudo tanto de AM como de GPL.....	70

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido deoxirribonucleico
AM	Ácidos micólicos
BAAR	bacilos ácido alcohol resistentes
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
DAT	2,3-diaciltrehalosas
ESI-MS	Espectrometría de masas – Ionización por electrospray
GLC	Cromatografía gas - líquido
GPL	Glicopeptidolipido
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
IS	Secuencias de inserción
LAM	Lipoarabinomanano
LM	Lipomanano
LOS	Lipooligosacáridos
MAA	<i>Mycobacterium avium subsp avium</i>
mAGP	micolil-arabinogalactan-peptidoglicano
MAI	<i>Mycobacterium Intracellulare</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium subsp paratuberculosis</i>
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización mundial de la salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PE	Fosfatidiletanolaminas
PG	Peptidoglicano
PGL	Fenolglicolípidos
PIM	Fosfatidilinositolmanósido
PRA	Análisis de restricción por PCR

RAPD	Amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN
RFLP	Análisis de fragmentos de restricción de polimorfismos de longitud
RIO	Reactivos intermediarios de Oxígeno
RM	Receptor de manosa
SL	Sulfolípidos
SNP	Polimorfismo de nucleótido sencillo
TB	Tuberculosis
TDM	Dimicolatos de trehalosa
TLC	Cromatografía en capa delgada
TMM	Monomicolatos de trehalosa
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

1.Introducción

En las últimas décadas, la incidencia de las infecciones producidas por micobacterias ha aumentado de forma espectacular. Este aumento adquiere unos tintes más dramáticos en el caso la tuberculosis (TB), ya que esta enfermedad afecta a un tercio de la población mundial, produce más de ocho millones de nuevos casos y mata a más de dos millones de personas cada año (OMS, 2010), lo que se ve agravado por la coinfección entre TB y VIH. La incidencia mundial de la TB aumenta a una tasa del 1% anual, para el 2003 se presentaron cerca de 8.800.000 nuevos casos en el mundo, de los cuales 674.000 estaban coinfectados por el VIH. Se presentaron 1.700.000 muertes, 229.000 correspondían a pacientes VIH positivos. Se estima que un paciente VIH positivo tiene una probabilidad 10 veces mayor de enfermar que un individuo VIH negativo (Murcia MI, 2007)

Sin embargo y no menos preocupante son las enfermedades producidas por micobacterias no tuberculosas (MNT) las cuales se encuentran asociadas a infecciones posquirúrgicas, la formación de abscesos, las enfermedades asociadas con catéteres, las enfermedades cutáneas diseminadas, la enfermedad pulmonar y la enfermedad del sistema nervioso central que afecta especialmente a los pacientes con VIH.

Entre las MNT el complejo MAC representa una de las causas más común de enfermedades en humanos y animales a nivel global (Shin SJ, 2010). La importancia clínica de estas especies ha adquirido mayor relevancia en los últimos años debido al aumento en la población inmunosuprimida especialmente debido a la pandemia del SIDA (Miguez M, 2006) (Murcia M, 2007). En la actualidad las especies que componen el complejo son: *M. avium*, *M. intracellulare*, (Pfyffer GE, 2007) *M. colombiense*, (Murcia M., 2006), *M. chimaera* (Tortoli E, 2004) *M. marseillense* sp. nov., *M. timonense* sp. nov, *M boucherdurhonense* sp. nov. (Ben Salah I., 2009), *M. vulneris* (Van Ingen J, 2009) y *M. arosiense* (Bang D. H. T., 2008)

M. colombiense se describió a partir de un estudio para evaluar la incidencia de micobacterias del complejo MAC en 45 pacientes VIH positivos en Bogotá-Colombia. Se aislaron 7 cepas de una nueva micobacteria perteneciente al complejo MAC, 6 provenientes de muestras de sangre y una de esputo. De acuerdo con la historia clínica de los pacientes, la micobacteriosis sufrida por los mismos produjo su muerte, lo que sugiere que *M. colombiense* podría tener una virulencia incrementada respecto a los otros miembros del complejo MAC. *M. colombiense* también ha sido responsable de linfadenopatía en pacientes inmunocomprometidos en Francia y en España (Vuorenmaa K, 2009), (Esparcia O, 2008)

Por pertenecer al complejo MAC, todos los aislados de *M. colombiense* presentan un resultado positivo frente a las sondas de identificación específicas para el complejo y negativo frente a las sondas específicas para *M. avium* y *M. intracellulare* (Accuprobe Gen-Probe Inc., San Diego California) La característica fenotípica más importante que permite diferenciar *M. colombiense* de los otros miembros del complejo MAC es la actividad ureasa positiva y el patrón específico de ácidos micólicos por HPLC (Murcia M., 2006). La identificación molecular de los miembros del complejo MAC se realiza a través de la secuenciación del gen rRNA 16S y del gen *rpoB*, para el cual *M. colombiense* posee patrones específicos (Ben Salah II, 2008). Adicionalmente *M. colombiense* presenta una secuencia de transcripción interna (ITS) específica, el cual clasifica a esta especie como un sequevar diferente denominada MAC-X (Murcia M., 2006)

La búsqueda de marcadores genómicos y lipídicos de *M. colombiense* que caractericen esta nueva especie de micobacteria, resulta ser de gran utilidad para su diferenciación de otros miembros del complejo MAC. Además, la información de posibles genes exclusivos y/o lípidos de envoltura relacionada con estos marcadores, se puede correlacionar con estudios que evalúen el grado de virulencia de esta especie en comparación con otros miembros del complejo MAC.

1.1. Genero *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*, en la actualidad comprende 150 especies y 11 subespecies (Euzéby, 2011), repartidas entre patógenos primarios, oportunistas y saprófitas. En general se caracterizan por ser bacilos rectos o ligeramente curvados cuyas dimensiones oscilan entre 0.2 - 0.6 μm de ancho por 1.0 – 10 μm de largo. Son bacterias aerobias y no móviles, se clasifican como ácido alcohol resistente debido a su pared celular única entre los procariontes, que a su vez es uno de los mayores determinantes en la virulencia (Astarie C, 2010). Las micobacterias poseen en su envoltura una serie de lípidos complejos como ácidos micólicos, arabinogalactano, lipoarabinomano y glicolípidos únicos de superficie como los glicopeptidolípidos y derivados de la trehalosa, que representan cerca del 60% en peso seco de la pared celular. Estos compuestos mayoritariamente hidrofóbicos le confieren a las micobacterias una serie de características como resistencia a antibióticos, agentes oxidantes, medios ácidos o básicos, y a la lisis osmótica ofreciéndole resistencia y supervivencia en el interior del macrófago.

Aunque existen diferentes clasificaciones para las micobacterias, basadas en características como la velocidad de crecimiento: rápidas (< 7 días) y lentas crecedoras (>7 días) y presencia de pigmentos: fotocromógenas (producción de pigmentos color amarillo claro), escotocromógenas (producción de pigmentos en ausencia de luz) y no cromógenas. La más importante corresponde a la clasificación clínica, que las divide en patógenos estrictos, con alto riesgo de transmisión por el aire, que incluye los miembros del complejo *M. tuberculosis*, patógenos oportunistas, con riesgo individual moderado, quienes a su vez se dividen en oportunistas mayores y menores de acuerdo con la frecuencia con que ocasionan patologías en el humano. El tercer grupo corresponde las micobacterias que no han sido descritas como causantes de enfermedad, y que suelen llamarse saprófitas.

1.1.1 Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC)

Este complejo está conformado por las especies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. pinnipedi*, *M. caprae* y *M. microti*, organismos altamente relacionados, comparten más del 99% de identidad a nivel de nucleótidos para algunos locus, sin embargo difieren en su morfología, bioquímica, hospederos y patrones de enfermedad en animales (Brosch R, 2002). Las micobacterias del MTC se caracterizan por su capacidad de producir TB, una enfermedad infecciosa crónica responsable de cerca de 2 millones de muertes en 2011 (Sacchetti Jim, 2011) y que debido a las características metabólicas y estructurales del microorganismo le permite permanecer por largos periodos de tiempo en estado de latencia sin producir síntomas de la enfermedad.

Aunque ambos tipos de micobacterias: patógenas y no patógenas pueden ingresar en células eucariotas con la misma facilidad, solo las especies patógenas pueden replicarse y sobrevivir entre las células inmunitarias. La unidad principal de defensa son los macrófagos que irónicamente juegan un doble papel, ya que por un lado actúan como las primeras unidades de defensa celular y por el otro son los primeros sitios de replicación para la bacteria (Herbst S, 2011)

La infección con *M. tuberculosis* puede producir TB pulmonar o extrapulmonar. La primera es la forma más común, así como la más importante en términos epidemiológicos. Se trata de una enfermedad pulmonar infectocontagiosa que afecta a seres humanos de todas las clases. Se estima que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo tuberculoso, según cifras oficiales de la Organización Mundial de la Salud hay aproximadamente 8 millones de casos cada año y dos millones de muertes por dicha enfermedad (OMS, 2010).

La dinámica de la infección en el caso de la tuberculosis pulmonar inicia con el ingreso de la bacteria en pequeñas gotas (0.5 – 5 μm de diámetro) producto de la expectoración de pacientes con TB pulmonar o laríngea, generalmente cuando estos tosen, las pequeñas gotas alcanzan los alveolos pulmonares donde son fagocitados por las células fagocíticas presentadoras de antígenos, que incluye macrófagos alveolares y las células dendríticas.

Entre las 2 y 6 semanas siguientes al ingreso de las bacterias se desarrolla una respuesta de tipo celular que induce un influjo de linfocitos y macrófagos activados al lugar de la lesión resultando en la formación del granuloma, una lesión constituida en

el centro por las bacterias y fragmentos bacteriales, rodeado por macrófagos muertos caseificados, alrededor se disponen macrófagos activados, linfocitos y macrófagos en reposo listos para actuar.

El microambiente que se produce en el interior del macrófago está caracterizado por la producción de efectores antimicrobiales como la generación de reactivos intermediarios de oxígeno (RIO), reactivos intermediarios de nitrógeno y, mecanismos mediados por citoquinas. Otro mecanismo potencial envuelto en la defensa del macrófago contra *M. tuberculosis* es la muerte celular programada o apoptosis. Ante todos estos mecanismos la bacteria ha desarrollado sistemas de defensa que le permiten evadir la respuesta del macrófago, entre los que se incluyen la modulación de la presentación de antígenos para evitar la acción de las células T, producción de proteínas como superóxido dismutasa y catalasa para evitar la acción de los RIO (Ahmad, 2011).

Las micobacterias patógenas pueden establecer infecciones por largos periodos de tiempo empleando determinadas estrategias para sobrevivir, favorecido por extensos estados de latencia, el cual podría estar caracterizado por una actividad metabólica disminuida en un estado no replicativo o por un equilibrio dinámico entre la replicación bacterial y la eliminación por parte del hospedero (Ahmad, 2011)

1.1.2 Micobacterias no tuberculosas (MNT)

Las MNT incluyen un importante grupo de agentes etiológicos para diferentes enfermedades, de los que se destacan por su frecuencia y virulencia el complejo *Mycobacterium avium* MAC (65%), *Mycobacterium fortuitum* (19%), *Mycobacterium kansasii* (10%) y en menor proporción *M. gordonae* y *M. chelonae* (Miguez M, 2006). Las enfermedades producidas por estos microorganismos han venido aumentando en los últimos años especialmente en los individuos inmunocomprometidos, involucrando diversos órganos y tejidos, aunque los cuadros patológicos más comunes son la enfermedad pulmonar, linfadenitis e infección de piel y tejidos suaves. Los factores de virulencia de las MNT incluyen componentes de la envoltura celular, enzimas y otras moléculas que actúan como moduladores de la respuesta inmune.

Entre las MNT el complejo *Mycobacterium avium* (MAC) representa una de las causas más común de enfermedades en humanos y animales a nivel global (Shin SJ, 2010). La importancia clínica de estas especies ha adquirido mayor importancia en los últimos años debido al aumento en la población inmunosuprimida especialmente la producida por la pandemia del SIDA (Miguez M, 2006) (Murcia M, 2007).

1.1.3 Complejo *Mycobacterium avium* (MAC)

El complejo MAC, forma parte del grupo de micobacterias no tuberculosas. Sus miembros son de crecimiento lento, se encuentran ubicuos en la naturaleza y son oportunistas capaces de infectar animales y humanos. MAC es la causa más común de enfermedad en humanos dentro del grupo de MNT (Watanabe K, 2003).

Inicialmente el complejo comprendía dos miembros: *M. avium* y *M. intracellulare*, basado en la identificación mediante las sondas comerciales (AccuProbe) cuya diana es la región 16S del rRNA. Sin embargo con el avance en las técnicas moleculares de identificación y con la disponibilidad de la secuencia completa de dos de las subespecies más importantes: *M. avium subsp hominissuis* (*M. avium* 104) y *M. avium subsp paratuberculosis* (*M. avium* K-10), el número de miembros del complejo aumento a nueve: *M. colombiense* (Murcia M., 2006) *M. chimaerae* (Tortoli E, 2004), *M. marseillense sp. nov.*, *M. timonense sp. nov.*, *M. bouchedurhonense sp. nov.* (Ben Salah I., 2009), *M. arosiense* (Bang D., 2008) y *M. vulneris* (Van Ingen J, 2009)

M. avium es la especie clínicamente más importante dentro del complejo. Aproximadamente el 90 % de los aislados de MAC en pacientes con SIDA corresponden a esta especie (Falkinham, 2004). De acuerdo a las características fenotípicas y genotípicas, al tipo de hospedador, a las características de crecimiento, a pruebas bioquímicas y a la patogenicidad, *M. avium* se ha dividido en 4 subespecies: *M. avium subsp. avium*, *M. avium subsp. silvaticum*, *M. avium subsp. paratuberculosis* (Thorel MF, 1990) y *M. avium subsp. hominissuis* (Mijls W, 2002)

Actualmente dentro del complejo MAC se conocen los genomas de *M. avium* 104 cepa aislada a partir de la sangre de un paciente con SIDA, representante de *M. avium subsp hominissuis*; y *M. avium subsp paratuberculosis* cepa K-10, referenciado en literatura como *M. avium* K-10 (Li, 2005) aislada a partir de una vaca con la

enfermedad de Johne, y *M. colombiense* CECT 3035 secuenciado recientemente (Gonzalez M., 2011).

El genoma de *M. avium* K-10 tiene un tamaño de 4.83 Mb, con un contenido de G+C del 69,3% y 4350 marcos de lectura abierta (ORF), mientras que *M. avium* 104 es mayor en 700 kb con un tamaño total de 5.48 Mb, y un contenido de G+C de (69%). La comparación de genes ortólogos entre los dos genomas muestra 98 – 99% De identidad en la secuencia. La anotación actual del genoma de *M. avium* 104 (Numero de acceso GenBank CP000479) incluye 5313 genes, de los cuales 5120 codifican para proteínas

Aproximadamente el 75% del genoma de *M. avium* K-10 tiene homología con el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. *M. avium* K-10 tiene un número alto de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, sin embargo no posee dos de los operones mas importantes en estas micobacterias para la síntesis de ácidos policetónicos y micocerósicos, quienes intervienen en la producción de ptiocerol dimicocerato, un componente de la pared celular. Se han identificado nuevos genes quienes probablemente estarían involucrados en la síntesis del ptiocerol dimicocerato.

El genoma de *M. colombiense* tiene un tamaño de 5,6 Mb, posee un total de 5279 genes de los cuales 5230 corresponden a secuencias codificantes, lo que la hace considerablemente más grande que el de *M. avium* K10. Por alineamiento de sus secuencias se sugiere que el linaje de *M. colombiense* tiene grandes inserciones genómicas específicas. Una expansión en el genoma que podría estar involucrada en la presencia de nuevas rutas metabólicas que contribuyen en la virulencia de éste patógeno emergente (Gonzalez M., 2011).

1.2 Envoltura de las micobacterias

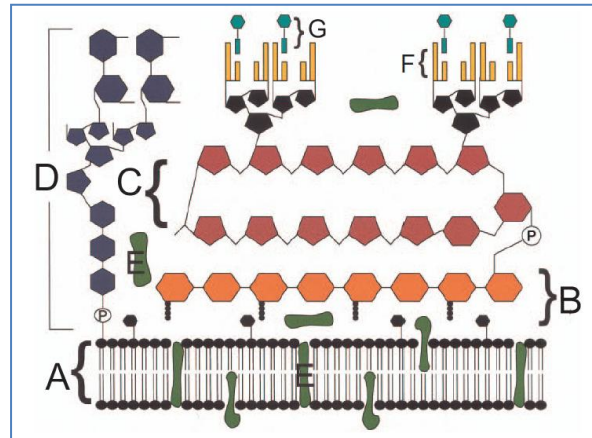
La envoltura micobacteriana es un conjunto muy complejo de moléculas que además de constituir la interface entre la bacteria y la célula huésped, la protege, le da forma y le proporciona los mecanismos necesarios para el tráfico de sustancias entre el interior y exterior celular. El conocimiento de su estructura es indispensable para entender la relación entre las micobacterias patógenas y las células huésped. Se

conocen actividades biológicas importantes de algunos componentes de la envoltura de las micobacterias que contribuyen a su patogenicidad. Estos componentes están implicados en procesos de protección ante la respuesta inmunitaria del huésped y de resistencia a los compuestos antimicrobianos (Banerjee R, 2011)

Aunque las micobacterias son consideradas como Gram positivas, no es posible diferenciarlas mediante la tinción de Gram, debido a sus grandes diferencias a nivel de envoltura celular con las bacterias en general. Se cree que la alta composición en lípidos de la pared de las micobacterias hace muy lento su crecimiento, debido principalmente al alto consumo energético en su biosíntesis y al estricto control en el intercambio de sustancias con el exterior celular.

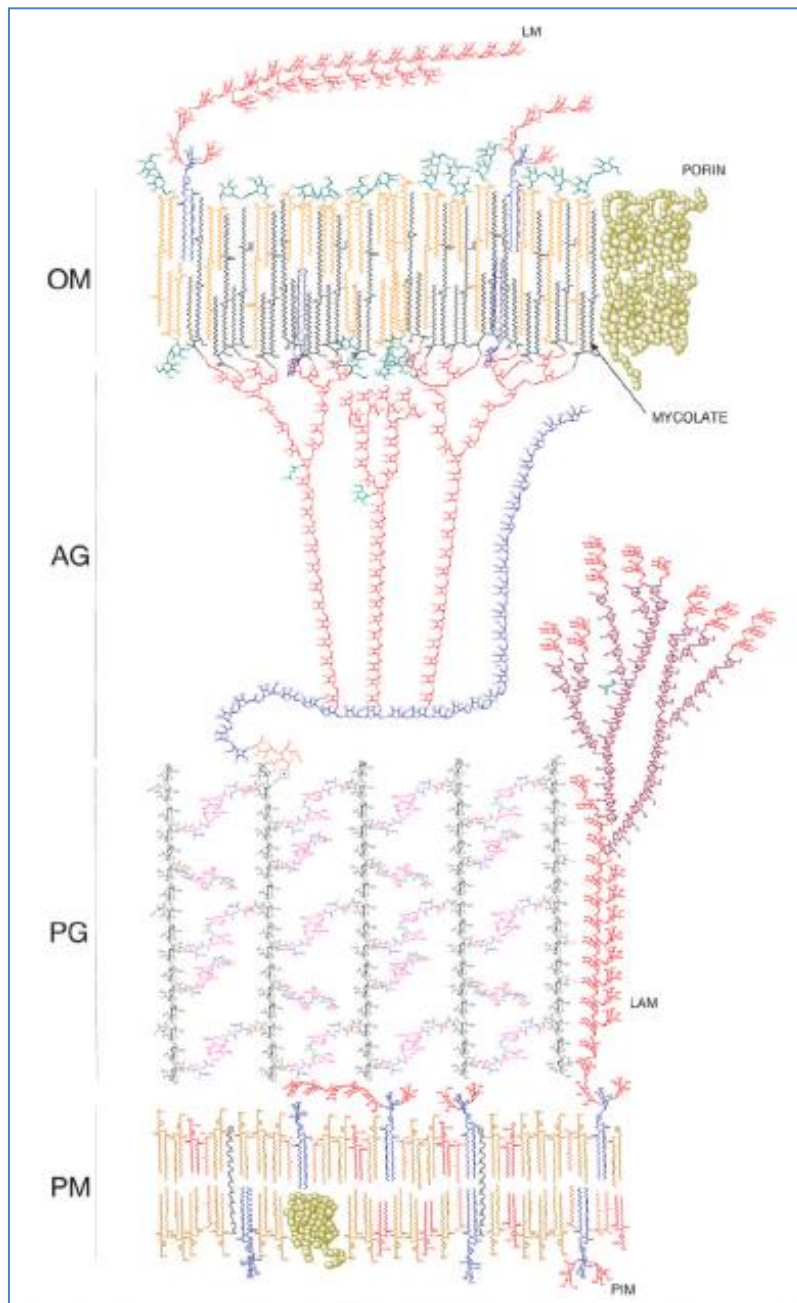
Los principales componentes estructurales de la envoltura en el modelo tradicional de la envoltura celular micobacteriana (Figura 1-1) son: la membrana plasmática, la pared y la cápsula (Brennan, 1995). La estructura general de la pared celular está constituida por una bicapa lipídica a la que están asociadas proteínas y algunos lipopolisacáridos distintivos como lipoarabinomanano (LAM) y lipomanano (LM). También están asociados fosfolípidos como fosfatidilinositolmanósidos (PIM), fosfatidilgliceroles, cardiolipinas y fosfatidiletanolaminas (PE). Algunos de estos lípidos (PIM y PE) han sido también extraídos mecánicamente a partir de las capas más externas de la envoltura de las micobacterias. El LAM es un importante lipopolisacárido de la envoltura que se encuentra presente en todas las especies de micobacterias, atraviesa toda la envoltura celular y está implicado en el proceso de unión e internalización de las micobacterias virulentas al macrófago, a través del receptor de manosa (RM) (Daffé M, 1999)

Figura 1-1. Representación esquemática de la pared celular micobacteriana. Los componentes incluyen la membrana citoplasmática (A), el peptidoglicano (B), arabinogalactano (C), lipoarabinomano (D), Proteínas asociadas a la membrana citoplasmática (E), ácidos micólicos (F) y glicolípidos de superficie (G) (Karakousis P, 2004)



Reportes más recientes representan la envoltura celular micobacteriana similar a la de las bacterias Gram negativas, compuesta de adentro hacia afuera por la membrana citoplasmática, un espacio periplásmico, una capa mucho más gruesa compuesta de PG – AG – AM denominan micolil-arabinogalactan-peptidoglicano (mAGP) y una membrana externa constituida por una bicapa lipídica (Figura 1-2) cuya cara interior estaría conformada por AM unidos a la pared celular de PG y cuya cara externa estaría compuesta por glicolípidos de superficie (los que en el modelo tradicional constituyen la cápsula), como mono y dimicolatos de trehalosa, de fosfolípidos y de lípidos especie específicos como GPL, PIM, sulfolípidos (SL) y fenolglicolípidos (PGL),

Figura 1-2. Modelo esquemático de la envoltura celular del género *Mycobacterium* señalando la membrana externa, como una bicapa donde los lípidos extraíbles se encuentran en la capa externa, la capa interna constituida por los ácidos micólicos unidos al arabino galactano, quien hace de puente con el peptidoglicano. OM: membrana externa, AG: arabinogalactano, PG: peptidoglicano, PM: membrana plasmática, LAM: lipoarabinomanano, PIM: fosfatidilinositolmanosido. (Kaur D, 2009)



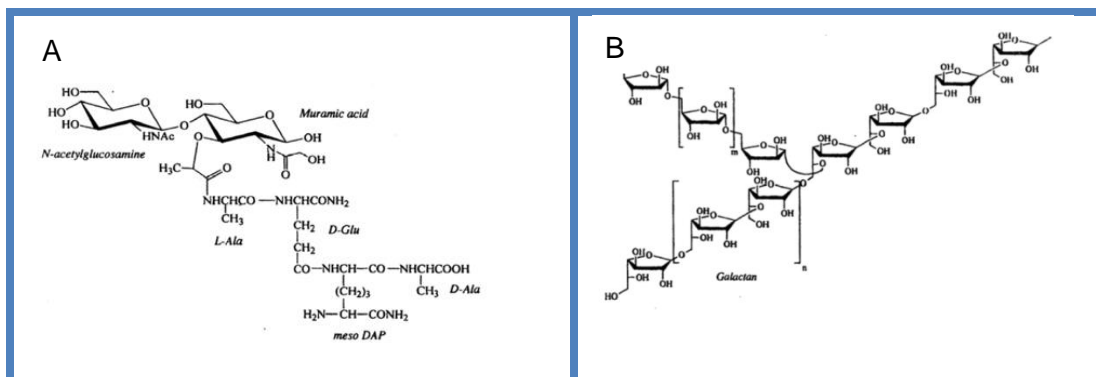
1.2.1 Pared celular

La base estructural de la pared micobacteriana es el esqueleto insoluble formado por la unión covalente entre PG, AG y AM (Figura 1-3) denominado micolil-arabinogalactan-peptidoglicano (mAGP). El mAGP está asociado mayoritariamente a lípidos y glicolípidos de forma no covalente.

El PG consiste básicamente en un polímero constituido por unidades repetitivas de N-acetilglucosamina unidas a ácido murámico por enlaces β 1-4, y a la vez éstas están unidos a tetrapeptidos (L-alanina-D-isoglutamina-ácido mesodiaminopimélico-D-alanina) por el ácido murámico. A diferencia de otras bacterias en el PG de *Mycobacterium* los residuos de ácido murámico están N-glicosilados con ácidos glicólicos en lugar de residuos acetilos.

El AG está compuesto exclusivamente de D-galactofuranosas y D-arabinofuranosas en una organización altamente específica, compuesta por tres cadenas de arabinano (27 D-arabinofuranosas) unidas a un núcleo de homogalactano (32 residuos de D-galactofuranosa).

Figura 1-3. Representación esquemática de A: PG y B: AG de la pared celular de *M. tuberculosis*. Tomado de (Soto, 2002)



✚ Ácidos micólicos (AM)

Los ácidos micólicos son ácidos grasos α -ramificados β -hidroxilados cuyas colas hidrocarbonadas pueden medir de 60 – 90 carbonos. Se distinguen dos tipos específicos: los α -micolatos que no contienen funciones oxigenadas, y los micolatos oxigenados. La α ramificación de los ácidos micólicos se conserva en todas las

familias variando su longitud. Está compuesta por una cadena insaturada cuyo tamaño puede variar entre 20 y 26 átomos de carbono. La β -ramificación puede variar de 40 A 60 átomos de carbono, puede presentar más de un tipo de insaturación como son dobles enlaces o anillos de ciclopropano, y presentar diferentes grupos funcionales como ceto, epoxi, metoxi o carboxilo quienes a su vez definen la principal clasificación de los micolatos. Se han clasificado en 7 tipos basados en el tipo de ramificación así como en la función oxigenada presente, los cuales se presentan en la tabla 1-1

Tabla 1-1: Estructura de los diferentes tipos de ácidos micólicos. Los valores de a, b y c oscilan entre 11 y 19 carbonos, d puede oscilar entre 19 y 23 carbonos. A y B simbolizan un doble enlace o un ciclopropano (Secanella F, 2011)

Tipo	Micolato	Estructura
I	α -Micolato	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_a-\text{A}-(\text{CH}_2)_b-\text{B}-(\text{CH}_2)_c-\overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}^\beta\text{H}}-\overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}^\alpha\text{H}}-(\text{CH}_2)_d-\text{CH}_3$
II	α' -Micolato	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_b-\overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}^\beta\text{H}}-\overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}^\alpha\text{H}}-(\text{CH}_2)_d-\text{CH}_3$
III	Metoximicolato	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_a-\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{OCH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_b-\text{B}-(\text{CH}_2)_c-\overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}^\beta\text{H}}-\overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}^\alpha\text{H}}-(\text{CH}_2)_d-\text{CH}_3$
IV	Cetomicolato	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_a-\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_b-\text{B}-(\text{CH}_2)_c-\overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}^\beta\text{H}}-\overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}^\alpha\text{H}}-(\text{CH}_2)_d-\text{CH}_3$
V	Epoximicolato	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_a-\overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\diagup}{\text{C}}-\overset{\text{O}}{\diagdown}{\text{C}}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_b-\text{B}-(\text{CH}_2)_c-\overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}^\beta\text{H}}-\overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}^\alpha\text{H}}-(\text{CH}_2)_d-\text{CH}_3$
VI	Carboximicolato	$\text{OH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_b-\text{B}-(\text{CH}_2)_c-\overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}^\beta\text{H}}-\overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}^\alpha\text{H}}-(\text{CH}_2)_d-\text{CH}_3$
VII	ω -1-metoximicolato	$\text{CH}_3-\overset{\text{OCH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_a-\text{A}-(\text{CH}_2)_b-\text{B}-(\text{CH}_2)_c-\overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}^\beta\text{H}}-\overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}^\alpha\text{H}}-(\text{CH}_2)_d-\text{CH}_3$
<p>Cis trans cis</p> <p>A \rightarrow $\text{CH}=\text{CH}$ ó $\begin{array}{c} \text{CH}-\text{CH}=\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ ó $\begin{array}{c} \text{CH}-\text{CH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 \end{array}$</p>		
<p>Cis trans cis trans</p> <p>B \rightarrow $\text{CH}=\text{CH}$ ó $\begin{array}{c} \text{CH}=\text{CH}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ ó $\begin{array}{c} \text{CH}-\text{CH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 \end{array}$ ó $\begin{array}{c} \text{CH}-\text{CH}-\text{CH} \\ \diagdown \quad \diagup \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}_3 \end{array}$</p>		

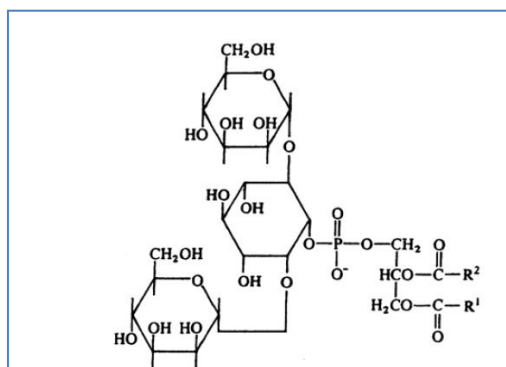
Los ácidos micólicos son elementos claves en la estructura celular de las micobacterias, con pocas excepciones cada especie micobacteriana posee una determinada composición de ácidos micólicos razón por la cual han sido considerados marcadores taxonómicos (Secanella F, 2011). La presencia abundante de ácidos micólicos en la pared celular le confiere a las micobacterias un carácter altamente hidrofóbico, generando así una baja permeabilidad a compuestos hidrófobos y resistencia a la deshidratación, factor crítico para su supervivencia en el interior de las células del huésped.

Los AM son dianas terapéuticas para el uso de compuestos antituberculosos como la izoniacida y la etionamida. (Astarie C, 2010). Se encuentran principalmente esterificando al AG y también de forma fluida esterificando trehalosa para formar dimicolatos de trehalosas (TDM), o monomicolatos de trehalosa (TMM). Las diferentes especies de micobacterias generalmente contienen mezclas complejas de diferentes tipos de micolatos, que pueden ser fraccionadas por cromatografía en columna (CC) o por cromatografía en capa fina (TLC)

Fosfolípidos (PL)

Los PL se encuentran asociados generalmente a la membrana celular de las micobacterias, son compuestos con un alto contenido en manosa que los asocia estrechamente a la estructura de la pared celular de las micobacterias (Brennan PJ, 1979). Los PL de las micobacterias están constituidos casi exclusivamente por fosfodiacylglicerol derivados del ácido fosfatídico, tales como: fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina (PE) y manosidos del fosfatidilinositol (PI). El Fosfatidilinositolmanosido (PIM) (figura 1-4) es el mejor caracterizado entre los PL, los cuales en general se caracterizan por intervenir activamente en la interacción entre la micobacteria y la célula huésped, actuando como adhesinas permitiendo la unión al macrófago por medio del receptor de manosa facilitando su fagocitosis

Figura 1-4: esquema del PIM. R1 y R2 representan una mezcla de palmitoil y grupos tuberculoesteáricos. Tomado de (Soto, 2002)



🌈 Cápsula

La cápsula representa la capa más externa en todas las especies de micobacteria, y constituye la interfase entre la micobacteria y el huésped (Rastogi *et al.*, 1986). La cápsula, entre otras funciones, controla los componentes que pueden alcanzar el interior de la bacteria, protege del ataque por agentes antimicrobianos y modula la respuesta inmune del huésped

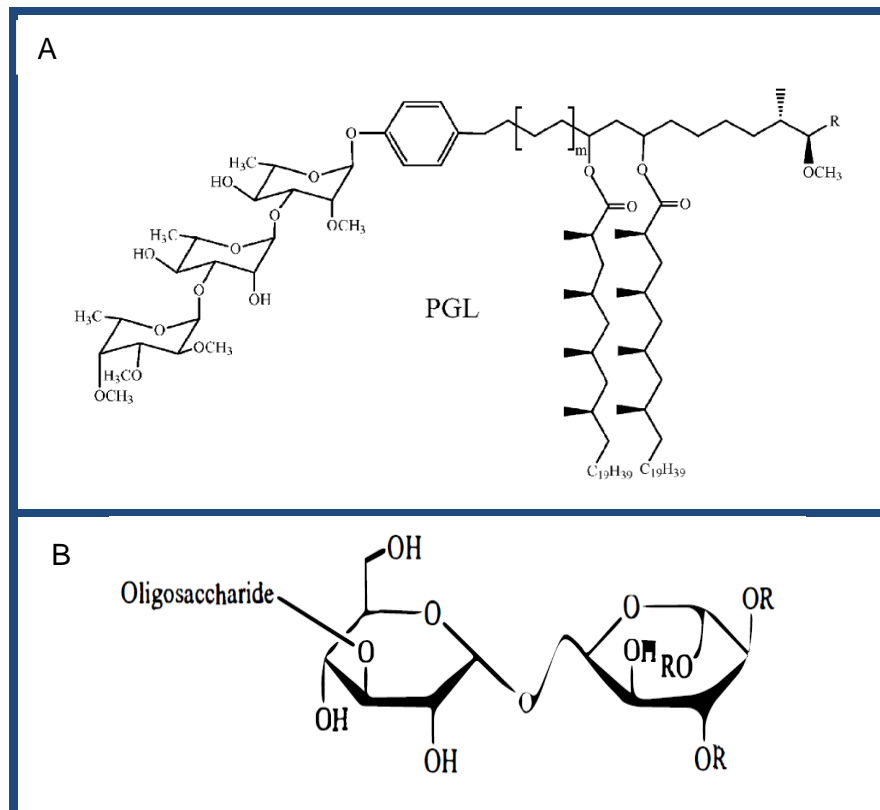
La composición de la cápsula varía cualitativa y cuantitativamente según la especie de micobacteria. Se encuentra constituida principalmente por polisacáridos, proteínas y lípidos, formando una matriz que se enriquece en lípidos a medida que se aproxima a la pared celular (Ortalo-Magné A, 1995). Los componentes de la cápsula no se encuentran unidos de forma covalente al esqueleto mAGP. En su estructura se encuentran presentes mayoritariamente glucano, AM y otros oligo y polisacáridos.

Las micobacterias sintetizan una gran variedad de glicolípidos de estructura característica. Entre los componentes de la envoltura, los glicolípidos debido a su efecto inhibitorio sobre las actividades antimicrobiales de los macrófagos y sobre la limfoproliferación, se pueden considerar como posibles factores de virulencia (Vergne I, 1998)

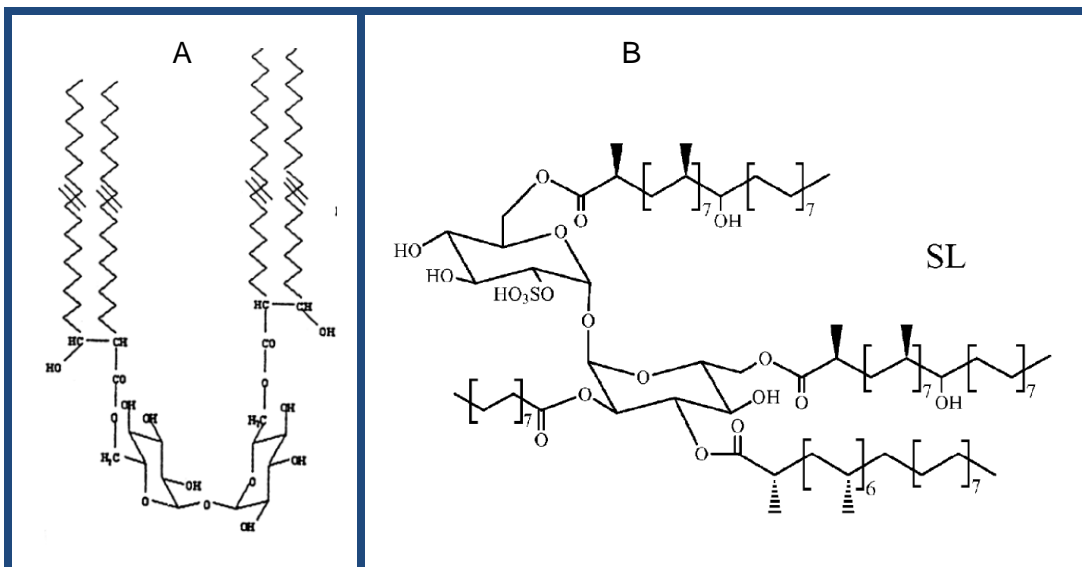
Los PGL (figura 1-5A) se encuentran principalmente en micobacterias patógenas obligadas y oportunistas que incluyen el complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis* y *M. bovis*), *M. leprae*, *M. marinum*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans*, como también en *M.*

kansasii y *M. canetti*. Los lipooligosacáridos (LOS) (Figura 1-5B) son antígenos presentes en algunas especies de micobacterias como *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. canetti*, etc. Algunas características como la inmunogenicidad, la mediación en la unión a micobacteriófagos y la rugosidad de la morfología colonial son asociadas a la presencia de LOS (Asselineau J, 1998)

Figura 1-5: Estructura A: PGL y B: LOS (Brennan, 1995), (Jackson M, 2006)



Otro de los constituyentes importantes son las aciltrehalosas, disacáridos presentes en todas las especies de micobacterias. Al dimicolato de trehalosa (TDM) (Figura 1-6 A) se le atribuye el crecimiento de las micobacterias en cordones. Entre las principales actividades biológicas reconocidas para el TDM se encuentran también su efecto inductor de toxicidad sistémica mediada por citoquinas (Lima V, 2001) y su efecto sinérgico con los sulfolípidos (SL) de *M. tuberculosis*. Los SL (Figura 1-6 B) son componentes exclusivos de la pared de *M. tuberculosis* y han sido relacionados con la tinción de cepas virulentas con rojo neutro.

Figura 1-6. Diagrama esquemático de A: TDM y B: SL. Tomado de (Soto, 2002)

1.2.2 Envoltura de las micobacterias pertenecientes al complejo MAC

Las micobacterias pertenecientes al complejo MAC presentan como lípidos característicos ácidos micólicos del tipo I, IV y VI, y como glicolípidos de superficie dimicolatos de trehalosa (TDM), fosfolípidos (PL) y predominantemente glicopéptidolípidos (GPL), o micosidos C como se conocieron inicialmente, quienes también están presentes en especies como *M. smegmatis*, *M. xenopi* (Besra G, 1993), *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. peregrinum*, *M. senegalense* (Schorey J, 2008). Se ha demostrado como el contenido de GPLs puede influir en la morfología colonial y el grado de virulencia al mediar la interacción de la bacteria con el macrófago y con la capacidad de persistir en este ambiente intracelular. (Torrelles JB, 2002).

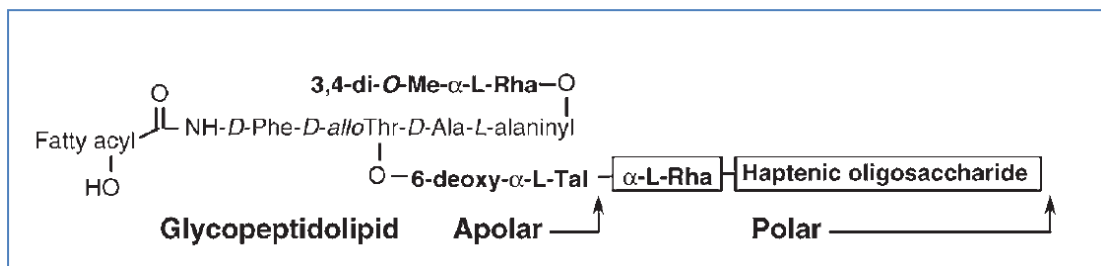
1.2.3 Glicopeptidolípidos (GPL)

Los GPL son los principales glicolípidos presentes en la capa más externa de las micobacterias del grupo MAC aunque también en micobacterias saprófitas como *M. smegmatis*. Pueden llegar a representar más del 70% de los lípidos expuestos en la superficie de las micobacterias del MAC. Se consideran importantes no solo porque exhiben una antigenicidad seroespecífica, sino que además puede presentar diferentes actividades inmunomodulatorias en la respuesta inmune del huésped (Schorey J, 2008)

Los GPL están compuestos de un núcleo lipopeptídico que contiene un grupo acilo de 26 a 33 Carbonos unido mediante un enlace amida al extremo N terminal del tetrapeptido D-fenilalanina – D alloterona – D alanina L- alaninol. Dependiendo los sitios y tipos de glicosilación existen dos tipos de GPL: Polares y no polares. En los no polares una 6-deoxy- α -L- talosa (6-deoxytalosa) se encuentra unida a la allotreonina y una α -L-ramnosa se encuentra unida al alaninol (Figura 1-7). No poseen ningún tipo de seroespecificidad y son propios de especies como *M. smegmatis* y algunos miembros del complejo MAC.

Los GPL polares poseen un número mayor de sustituciones y glicosilaciones sobre la estructura de los GPL no polares, así en los GPL polares el residuo terminal de ramnosa unido al alaninol siempre se encuentra 3,4-dimetoxilado, y a partir de la 6-deoxytalosa se extienden varios azúcares generalmente iniciando con ramnosa, éstos constituyen el oligosacárido hapténico responsables de la seroespecificidad de los GPL polares (Chatterjee D, 2001).

Figura 1-7. Estructura de los GPL apolares y polares (Chatterjee D, 2001)



Los GPL están involucrados en procesos como la capacidad de formación de biopelículas, grado de virulencia posiblemente a través de la inhibición de la activación del macrófago así como en la apariencia lisa y sedosa de las colonias.

Basados en el residuo hapténico, se han identificado 31 GPL seroespecíficos serológica y cromatográficamente (Chatterjee D, 2001), Hasta el momento solo se ha podido identificar la estructura completa de 14 de estos mediante técnicas de cromatografía de gases (GC), espectrometría de masas (MS), resonancia magnética nuclear (RMN), así como pruebas químicas específicas. En la tabla 1-2 Se presenta la descripción de los residuos hapténicos para los GPL caracterizados

Tabla 1-2. GPL identificados estructuralmente para las serovariedades de MAC. (Chatterjee D, 2001)

Serovar	Oligosacarido hapténico extendido a partir de α -L-Rhap-(1→2)-L-dTal
1	α -L-Rhap-(1→2)-L-dTa
Grupo 1: R → α-L-Fucp-(1 → 3)-core	
2	4-O-Ac-2,3-di-O-Me- α -L-Fucp-(1 → 3)-core
4	4-O-Me- α -L-Rhap-(1 → 4)-2-O-Me- α -L-Fucp-(1 → 3)-core
14	4-formamido-4,6-dideoxy-2-O-Me-3-C-Me- α -L-Manp-(1→3)-2-O-Me- α -D-Rhap-(1→3)-core
20	2-O-Me- α -D-Rhap-(1→3)-2-O-Me- α -L-Fucp-(1→3)-core
3	2,3-di-O-Me- α -L-Fucp-(1→4)- β -D-GlcpA-(1→4)-2,3-di-O-Me- α -L-Fucp-(1→3)-core
9	4-O-Ac-2,3-di-O-Me- α -L-Fucp-(1→4)- β -D-GlcpA-(1→4)-2,3-di-O-Me- α -L-Fucp-(1→3)-core
25	2-O-Me- α -D-FucpNac-(1→4)- β -D-GlcpA-(1→4)-2-O-Me- α -L-Fucp-(1→3)-core
26	2,4-di-O-Me- α -L-Fucp-(1→4)- β -D-GlcpA-(1→4)-2-O-Me- α -L-Fucp-(1→3)-core
Grupo 2: R → α-L-Rhap-(1→3)-core	
12	4-(2-OH)propanamido-4,6-dideoxy-3-O-Me- β -D-Glcp-(1→3)-4-O-Me- α -L-Rhap-(1→3)- α -L-Rhap-(1→3)-core
17	3-(3-OH-2-O-Me)butanamido-3,6-dideoxy- β -D-Glcp-(1→3)-4-O-Me- α -L-Rhap-(1→3)- α -L-Rhap-(1→3)-core
19	3,4-di-O-Me- β -D-GlcpA-(1→3)-3-C-Me-2,4-di-O-Me- α -L-Rhap-(1→3)- α -LL-Rhap-(1 → 3)-core
Group 3 : R → α-D-Glcp-(1→3)-core	
8	4,6-O-(1-carboxyethylidene)-3-O-Me- β -D-Glcp-(1→3)-core
21	4,6-O-(1-carboxyethylidene)- β -D-Glcp-(1→3)-core

1.2.4 Métodos de detección e identificación de MNT

En la tabla 1-3 se resumen algunos de los principales métodos tanto moleculares como instrumentales diseñados para identificar MNT, entre ellos a miembros del complejo MAC

Tabla 1-3. Métodos de detección e identificación de diferentes especies para MNT

Método	Fundamento	Especie	Referencia
Baciloscopia			
Cultivo – pruebas Bioquímicas	Características metabólicas	MAC	
PCR-PARA	Amplificación, y restricción del gen <i>rpoB</i>	MAP	(whang J, 2011)
PCR-PRA	Amplificación y restricción del Gen <i>hsp65</i>	MNT	(Telenti A, 1993)
mPCR	Amplificación region 16S – 23S rRNA ITS	MNT	(Ngan GJ, 2011)
RT-qPCR	Amplificación fragmentos IS900, F57	MAP	(Sidoti F, 2011)
Nested PCR	IS 900, ISMAP02	MAP	(Douarre PE, 2010)
mPCR	IS 900	MAP	(Shin SJ, 2010)
	IS 901	MAA	
	DT1	MAA e MAI	
	IS 1311	MAC	
PCR – RFLP	rRNA 16S	MNT	(Aravindhan V, 2007)
	<i>hsp10</i> (<i>groES</i> , Rv3418c)	MAA - MAI	
INNO – LIPA mycobacteria	Región espaciadora 16S – 23S	MTC, MAC. <i>M. kansasii</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. goodnae</i> , <i>M. xenopi</i> .	(Suffys PN, 2001)
Multispacer sequence typing (MST)	Amplificación y secuenciación de 4 espaciadores intergénicos	MAC	(Cayrou C, 2010)
PCR secuenciación	Amplificación y secuenciación gen <i>rpoB</i>	MAC	(Ben Salah I, 2008)
TLC	Perfil de ácidos micólicos	MT y MNT	(Secanella F, 2011)
HPLC	Perfil de ácidos micólicos	MT y MNT	(C.D.C., 1996)
LC –MS	GPL	MAI	(Nishiuchi Y, 2004)
ESI – MS	GPL	MNT	(L. Mederos, 2008)

MAC: todos los miembros del complejo *Mycobacterium avium*

MAP: *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*

MAI: *Mycobacterium Intracelulare*

MAA: *Mycobacterium avium* subsp *avium*

MT: *Mycobacterium tuberculosis*

MNT: Mycobacterias no tuberculosas

Como se ilustra en la tabla 1-3, el espectro de métodos de identificación es bastante amplio, y cada uno de ellos hace uso de alguna característica particular del microorganismo. A nivel clínico se encuentra la baciloscopia, una técnica de bajo costo y rápida ejecución, sin embargo puede presentar el inconveniente de no ser concluyente debido a la baja sensibilidad, ya que se necesitan alrededor de 5000 a 10000 bacilos por mL de muestra para el reconocimiento de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) mediante la tinción de Ziehl –Neelsen. El cultivo, mucho más sensible que la baciloscopia, tiene el inconveniente de producir resultados en un tiempo mayor en el caso de micobacterias lentas crecedoras como son los miembros del complejo MAC. De igual forma se dispone de un gran número de ensayos bioquímicos (prueba de la niacina, la reducción de nitratos, la hidrólisis de tween 80, etc) sin embargo un problema asociado es la baja reproducibilidad producto de diferentes condiciones de cultivo, reactivos y variaciones en el metabolismo de los microorganismos.

Con el uso de las técnicas de biología molecular se ha dado un gran salto en la identificación de microorganismos basado ahora en sus características genotípicas; actualmente se dispone para el caso de la identificación de MAC de diversos métodos basados en diferentes dianas al interior del genoma. Específicamente se cuenta con la secuencia del gen *rRNA 16S*, el cual es considerado como el método de oro para la identificación molecular en *Mycobacterium* (Tortoli E. M., 2003). Sin embargo en el caso de los miembros del complejo MAC estos solo pueden ser clasificados a nivel de especie pero no de subespecie, es así como *M. avium subs avium*, *M. avium subps paratuberculosis* y *M avium subsp hominissuis* poseen secuencias rRNA 16S iguales. Las especies más cercanas a *M. avium* a nivel de rRNA 16S cuya diferencia es apenas de unos pares de bases son: *M. colombiense* (6pb), *M. intracellulare* (9pb) y *M. chimaera* (10pb).

La región intergénica 16S - 23S es una región altamente variable que ha sido empleada para estudiar la variabilidad genética entre los miembros del complejo MAC. A la fecha 35 sequevares han sido identificados: MavA – H, para las especies de *M. avium*; MinA – D para los miembros de *M. intracellulare* y MAC A – X para las variedades que no pueden ser clasificadas en ninguna de las dos especies anteriores. (Mijs W, 2002) (Murcia M., 2006)

Los sequevares pertenecientes a Mav y Min varían en el rango de 1-4 pb mientras que los sequevares MAC presentan una variabilidad mucho mayor tanto que se han postulado como nuevas especies, por ejemplo *M. chimaera* caracterizada por el sequevar MAC-A y *M. colombiense* caracterizada por el sequevar MAC-X.

De igual forma se dispone de las secuencias de inserción (IS), elementos móviles dentro del genoma que en general tienden a ser característicos de uno o varios miembros del complejo y en general del género *Mycobacterium*. Cuando han sido bien caracterizados y usados en el contexto apropiado, los IS especie específicos pueden servir como una herramienta útil para identificar las diferentes subespecies de MAC. Sin embargo, siempre estarán presentes los problemas asociados a la presencia de IS aún no caracterizados presentes en miembros del complejo MAC, por lo que es difícil juzgar que microorganismos poseen estos IS, además como éstos son por naturaleza elementos móviles existe el riesgo de que elementos similares se encuentren en otros tipos de microorganismos no relacionados debido a la movilidad de estos desde o hacia MAC. Por ello, la identificación por IS debe estar acompañada por otro método que asegure que en realidad se trata de un miembro del complejo MAC. En la tabla 1-4 se presentan los principales elemento IS presentes en MAC empleados como marcadores moleculares para la identificación de los miembros del complejo

El gen *hsp65*, que codifica para una proteína de choque térmico, también ha sido empleado como herramienta molecular para la identificación de micobacterias a nivel de especie, a través del uso de un análisis de restricción (PRA), sin embargo el método, que depende de la interpretación del tamaño de las bandas producidas, ha mostrado una baja correlación en pruebas interlaboratorios en la designación del tamaño de las bandas, adicionalmente, debido a mutaciones se pueden presentar polimorfismos a nivel de una base (SNP) en un sitio de restricción, lo que puede resultar en un patrón de restricción diferente (Leao, 1999)

Tabla 1-4. Elementos IS presentes en MAC. (Turenne CY, 2007)

IS	Familia IS	Miembros en los que está presente					
		104	MAH	K-10	MAP	MAA	MI
IS 900	IS110	-	-	+	+	-	-
IS 901	IS110	-	-	-	-	+	-
IS 1245	IS256	+	+	-	-	+	-
IS 1311	IS256	+	+	+	+	+	-
ISMav1	IS21	+	+	+	/	+	/
IS666	IS256	+	+	-	-	-	-
IS1601	IS256	+	+	-	/	/	/
ISMav2	IS481	-	/	/	+	+	-
IS999	IS3	+	+	-	-	-	/
ISMpa1	IS110	-	+	+	+	-	-
IS1110	IS110	-	+	-	/	/	/
IS1141	IS3	-	/	-	/	/	/
IS1626	IS110	-	-	-	/	/	/
IS1613	IS110	-	/	-	/	/	/

+: Presente; - Ausente /Presencia o distribución desconocida en una o más especies

104: *M. avium* 104

MAH: *M. avium* subsp *hominissuis*

K-10: *M. avium* subsp *paratuberculosis* cepa K10

MAP: *M. avium* subsp *paratuberculosis*

MAA: *M. avium* subsp *avium*

MI: *M. intracellulare*

También se han evaluado otros genes “housekeeping” diferentes al *hsp65* para la identificación de micobacterias a nivel de especies, sin embargo generalmente los genes utilizados no incluyen todos los miembros del complejo MAC, omitiendo al menos alguna de las especies más importantes del complejo. Algunos de los genes evaluados son el gen *sod* que codifica para la manganeso superóxido dismutasa (Bull TJ, 1995) el *dnaJ*, *gyrB* (Kasai, 2000), *recA* (Blackwood, 2000), la proteína 32kDa (Soini, 1996) *rpoB* (Kim, 1999) y una combinación de estas en un ensayo multigénico. Actualmente empleando el gen *rpoB* (Ben Salah II, 2008) se han postulado tres nuevas especies pertenecientes al complejo MAC por este método: *M.*

marseillense sp. nov, *M. timonense* sp. nov , *M. bouchedurhonense* sp. nov. (Ben Salah I., 2009).

Por el lado de las técnicas de tipo instrumental, existen varios métodos donde se han seleccionado diferentes componentes celulares como objeto de análisis debido a la especificidad que pueden presentar en determinadas especies, como es el caso de los ácidos micólicos, a partir de los cuales ya existe un procedimiento normalizado internacionalmente para la identificación de micobacterias basados en sus perfiles por HPLC (C D C, 1996). Se encuentra adicionalmente la cromatografía en capa delgada (TLC), mientras el análisis por HPLC puede indicar la proporción relativa de los diferentes AM entre varias especies, TLC permite identificar los diferentes tipos de AM para una especie en particular.

Se han reportado métodos mediante cromatografía de gases (GC), en los que se determina el patrón de fragmentación térmica de los AM (Guerrant G, 1981), también por GC acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) para la identificación de los AM y cromatografía líquida con espectrometría de masas (HPLC –MS) para la identificación estructural de los GPL de los miembros del complejo MAC (Nishiuchi Y, 2004).

Aunque se dispone de todo este conjunto de técnicas tanto moleculares como instrumentales, en el caso de la identificación de *M. colombiense* todavía existen limitaciones. Por una parte, no se conoce mucho acerca de la composición específica de los lípidos de su pared celular en comparación con los del complejo MAC, para poder acceder a las técnicas de tipo instrumental. Por otra parte, las técnicas moleculares como la amplificación y secuenciación del gen *rpoB* y las regiones intergénicas (MST), suponen el desarrollo de varias etapas: extracción de ADN, amplificación con primers específicos (2 para *rpoB* y 8 para MST), extracción y purificación de los productos de amplificación, secuenciación y análisis bioinformático de las secuencias obtenidas, lo que implica tiempo y costos, además que el servicio de secuenciación no es fácilmente accesible para un laboratorio clínico. Estos hechos podrían hacer que la prevalencia real de *M.*

colombiense este subestimada en parte debido a la no disponibilidad de un método simple y confiable para su detección. La disponibilidad de un método como este podría contribuir al entendimiento de la epidemiología de *M. colombiense* y de los miembros de MAC, cuyo tratamiento con los antibióticos necesarios puede variar en tiempo y uso, así como en los costos que esto representa (Guillermo J., 2009).

2. Hipótesis experimental

M. colombiense ha sido descrito recientemente como un nuevo miembro del MAC, caracterizado por un nuevo espaciador de transcripción interna (ITS) 16S-23S, una nueva secuencia 16S rRNA así como por tener actividad ureasa positiva y un patrón específico de AM por HPLC respecto a los otros miembros del MAC. Estas evidencias implican que este microorganismo debe tener regiones genómicas específicas algunas de ellas involucradas en la formación de nuevas rutas metabólicas responsables entre otras de actividades enzimáticas características como lo es la actividad ureasa, o las encargadas de la biosíntesis de lípidos como los AM entre otras. Estas regiones genómicas así como algunas de las características fenotípicas expresadas como el contenido lipídico de la envoltura celular pueden tener una gran utilidad en el diseño de marcadores moleculares o lipídicos útiles en la identificación de esta nueva especie a través de métodos de biología molecular o de tipo instrumental.

A través de métodos como la amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN por PCR (RAPD – PCR), y empleando como control un miembro del MAC debe ser posible identificar una de esas regiones específicas que permita diseñar un marcador molecular propio de *M. colombiense*.

Con la publicación reciente del genoma de *M. colombiense* donde se observa como el tamaño de su genoma (5.6Mb) es mayor que el de *M. avium* 104 (5.4Mb) y el de *M. avium* K-10 (4.8Mb) se comprueba que efectivamente existen esas regiones genómicas específicas, por lo que la aproximación mediante RAPD puede resultar exitosa.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar marcadores genómicos y lipídicos útiles para diferenciar *Mycobacterium colombiense* sp. nov., de otros miembros del complejo MAC

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar fragmentos de *M. colombiense* amplificados por PCR-RAPD utilizando *M. avium* 104 como control, para determinar si es posible emplearlos como marcadores moleculares en la identificación de *M. colombiense* por PCR
- Desarrollar una reacción por PCR para identificar *M. colombiense* de manera específica mediante el o los marcadores genómicos seleccionados
- Establecer el perfil de ácidos micólicos (AM) Y GPL de *M. colombiense* mediante TLC
- Comparar los patrones de AM y GPL entre *M. colombiense* y *M. avium* 104 por TLC para evaluar el desarrollo de un marcador lipídico que permita su identificación y diferenciación de los demás miembros del MAC

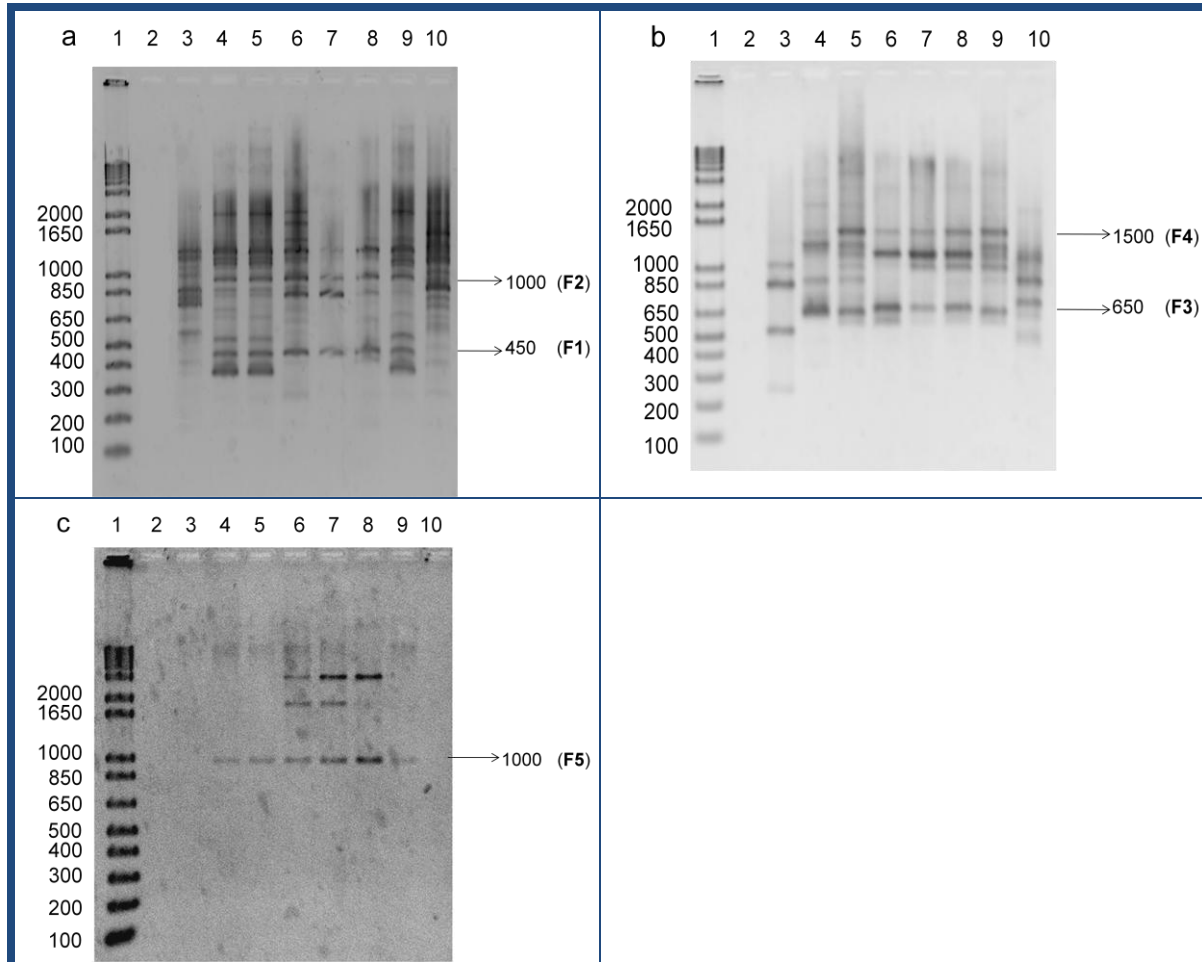
4. Avances previos

A través de la amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN por PCR (RAPD – PCR) y empleando 15 primers de secuencia aleatoria, 9 de los cuales habían sido modificados empleando el programa Gene Runner para obtener decámeros con contenidos de G + C entre 50 y 60%, se identificaron 5 fragmentos (tabla 4-1, figura 4-1) que amplifican diferencialmente en *M. colombiense* pero no en *M. avium* 104, especie utilizada como control. Estos fueron seleccionados como posibles marcadores moleculares para diseñar una PCR especie específica para *M. colombiense*, por lo que el punto de partida para este trabajo se inicia con la amplificación, purificación y secuenciación de estos fragmentos.

Tabla 4-1. Nombres asignados a los productos de amplificación específica en *M. colombiense* por PCR RAPD

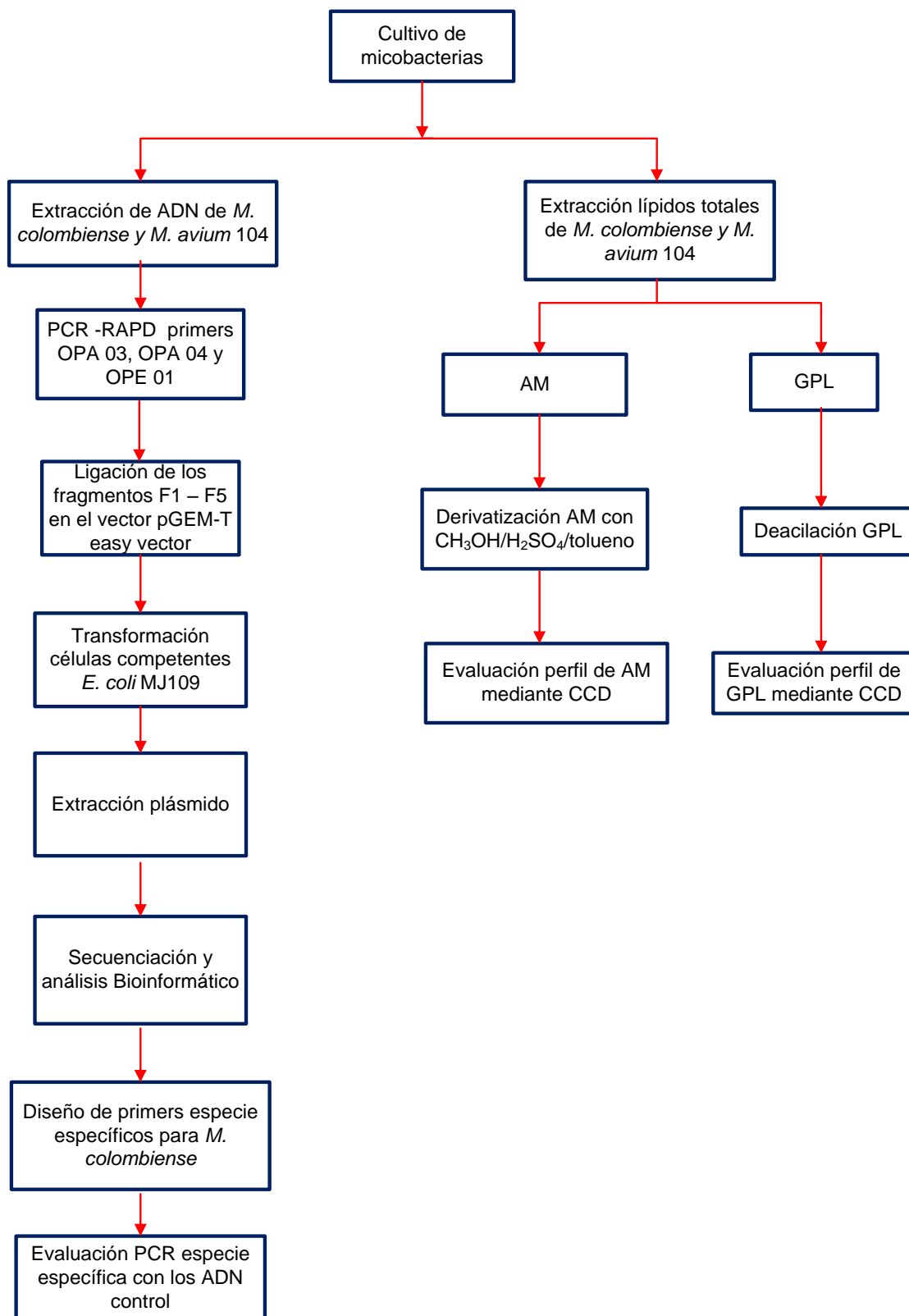
Primer	Tamaño producto de amplificación (pb)	Nombre
OPA 03	450	F1
OPA 03	1000	F2
OPA 04	650	F3
OPA 04	1500	F4
OPE 01	1000	F5

Figura 4-1. Electroforesis productos de PCR RAPD empleando los primers: A: OPA 03, B. OPA 04, C: OPE 01. Línea 1: marcador 1Kb (Invitrogen), 2: Control negativo, 3: *M. avium* 104, 4: *M. colombiense* cepa 6B, 5: cepa 7B, 6: cepa CECT 3035, 7: cepa 16B, 8: cepa 19B, 9: cepa 57B, 10 *M. tuberculosis* H37Rv



5.Estrategia experimental

En la figura 5-1 se presenta la estrategia experimental diseñada para cumplir con los objetivos planteados:

Figura 5-1. Estrategia experimental para el desarrollo del presente estudio

6. Materiales y métodos

6.1 Cepas bacterianas, medios, condiciones de cultivo y conservación de cepas

En la tabla 6-1 se presentan las cepas utilizadas en este trabajo

Tabla 6-1. Especies empleadas en el presente estudio

Cepa	Procedencia
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	ATCC 25177
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	ATCC 27294
<i>M. avium</i> 104	ATCC 25291
<i>M. colombiense</i> cepas 6B, 7B, 9B, 16B, 19B, 57B	Aislados clínicos*
<i>M. colombiense</i>	CECT 3035
<i>E. coli</i> JM109	Promega

*Suministrados por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

En la tabla 6-2 se presentan los medios de cultivo utilizados

Tabla 6-2. Medios de cultivo empleados en el presente trabajo

	<i>Mycobacterium</i>	<i>E. coli</i>
Sólido	Lowestein Jensen LJ (Sigma)	Agar Luria-Bertrani (LB)
Líquido	Middlebrook 7H9 Broth (Sigma) enriquecido con suplemento OADC Medio Sauton Tween Albumina modificado (MSTA)*	Caldo Luria Bertrani (LB) SOC

El medio MSTA se prepara a partir de las sales.

Caldo LB: Triptona 10 g/L (Oxoid), extracto de levadura 5g/L (Oxoid), NaCl 5 g/L, pH 7.6.

El agar contiene adicionalmente 1.5% de agar (KCBiological)

Medio SOC: 20g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura , 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM glucosa, pH 7.0

Medio MSTA modificado: KH₂PO₄ 0.40 g/L, MgSO₄, Acido cítrico (C₆H₅O₇) 1.70 g/L, FeNH₄(SO₄)₂ 12H₂O, Asparagina (C₄H₈N₂O₃), Tween 80 10%, Glicerol (C₃H₈O₃) 50 mL/L, enriquecido con Albumina Sérica Bovina fracción V 5.0 g/L, glucosa (C₆H₁₂O₆) 7.5 g/L disueltos en 100 mL de solución salina (0.85%)

Medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC: ácido oléico 0.05 g/L, albúmina bovina fracción V 5.0 g/L, Dextrosa 2g/L, Catalasa 0.003 g/L

6.1.1 Condiciones generales de Cultivo

Para el análisis de lípidos las micobacterias se incubaron en 200 mL de medio Middlebrook 7H9 OADC a 37 °C en una incubadora (Barnstead labline) con agitación (100 rpm) por un periodo de 5 semanas.

Para la extracción de ADN las micobacterias se incubaron en tubos de agar inclinado con medio LJ a 37° por un periodo de 5 semanas. La manipulación de cepas se realizó en una cabina de bioseguridad tipo II, y los residuos de cultivo se inactivaron con autoclave (121°C, 1.5 atm), o dilución de hipoclorito de sodio 1:25. Las células de *E. coli* MJ109 empleadas en la clonación de los fragmentos de PCR se cultivaron en placas de LB con Ampicilina (100 µg/mL)/IPTG (0.5mM)/X-Gal (80 µg/mL)

6.1.2 Conservación de cepas

Las cepas de trabajo fueron criopreservadas en glicerol al 30% para lo cual se siguió el siguiente procedimiento:

- a. En un eppendorf de 150 mL se adicionar 300 µL de glicerol (100%)
- b. Esterilizar por autoclavado
- c. Adicionar 700 µL de cultivo bacteriano en fase exponencial de crecimiento a cada uno de los eppendorf previamente esterilizado

- d. Agitar con vortex hasta formar una sola fase
- e. Almacenar a -70°C

6.2 Técnicas de biología molecular

6.2.1 Extracción de ADN genómico de micobacterias

Para el aislamiento de ADN micobacteriano se siguió el siguiente procedimiento (Belisle, 1998) a partir de cultivo en medio sólido:

- a. Con un asa bacteriológica tomar una cantidad suficiente y transferirlas a un vial que contenga $400\ \mu\text{L}$ de buffer TE 1X (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.5)
- b. Calentar durante 20 minutos a $80\ ^{\circ}\text{C}$, para inactivar las micobacterias. Enfriar a temperatura ambiente.
- c. Adicionar $50\ \mu\text{L}$ de lisozima (10 mg/mL), mezclar por agitación e incubar a 37°C por 12 horas.
- d. Adicionar $70\ \mu\text{L}$ de una mezcla de SDS 10% / Proteinasa K, mezclar por inversión e incubar 10 min a $65\ ^{\circ}\text{C}$
- e. Adicionar $100\ \mu\text{L}$ de NaCl 5M
- f. Adicionar $100\ \mu\text{L}$ de CTAB /NaCl la cual debe estar previamente precalentada a 65°C durante 10 minutos.
- g. Mezclar manualmente hasta que se observe una suspensión blanca. Incubar 10 minutos a 65°C
- h. Adicionar un volumen (alrededor de $750\ \mu\text{L}$) de cloroformo / alcohol isoamílico (24:1), mezclar por inversión tres o cuatro veces y centrifugar a temperatura ambiente a 12000g / 10 minutos
- i. Transferir la fase acuosa a otro vial
- j. Añadir 0.6 volúmenes ($450\ \mu\text{L}$ aproximadamente) de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Mezclar por inversión.
- k. Incubar 60 minutos a -20°C .
- l. Centrifugar a 4°C a 12000g / 15 minutos.
- m. Eliminar el sobrenadante
- n. Adicionar al pellet obtenido 1.0 mL de Etanol 70% frío y mezclar por inversión.
- o. Centrifugar a 4°C a 12000g / 15 minutos. Eliminar el sobrenadante

- p. Repetir los pasos n y o
- q. Dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
- r. Resuspender el pellet en 400 μ L de buffer TE 0.1X.
- s. AIMACenar a 4°C.

En la tabla 6-3 se presentan los ADN de diferentes especies micobacterianas que fueron amablemente suministrados por la fundación Instituto de inmunología de Colombia (FIDIC) y que también han sido utilizados en este estudio.

Tabla 6-3. ADN micobacteriales empleados en el presente trabajo

Micobacteria	Referencia	Micobacteria	Referencia
<i>M. peregrinum</i>	ATCC 14467	<i>M. non chromogenicum</i>	ATCC 19530
<i>M. africanum</i>	ATCC 25420	<i>M. avium</i>	DIII Br (116)
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950	<i>M. smegmatis</i>	MC ² 155
<i>M. bovis BCG</i>	ATCC 35734	<i>M. chelonae</i>	ATCC 35752
<i>M. marinum</i>	ATCC 927	<i>M. immunogenum</i>	ATCC 700505
<i>M. gastri</i>	ATCC 15754	<i>M. massiliense</i>	CCUG 48898
<i>M. smegmatis</i>	ATCC 14468	<i>M. bolletii</i>	CCUG 50184
<i>M. terrae</i>	ATCC 15755	<i>M. fortuitum</i>	2008 32023
<i>M. vaccae</i>	ATCC 15483	<i>M. mucogenicum</i>	AA002
<i>M. abscessus</i>	ATCC 19977	<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC 19981
<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	ATCC 19698	<i>M. phlei</i>	ATCC 11758
<i>M. avium</i>	104	<i>M. tuberculosis</i>	H37Ra
		<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv

6.2.2 Estimación de la concentración de ADN por espectrofotometría UV

Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de ADN, y aunque cada base tiene su propio espectro de absorción y por lo tanto su propia longitud de onda analítica, es posible calcular la concentración a través de la absorción de radiación a 260 nm, longitud de onda a la cual en promedio los ácidos nucleicos tienen su máxima absorción. El protocolo seguido fue el siguiente:

- a. Programar el espectrofotómetro a 260 nm y 280 nm
- b. Pipetear 100 μ L de TE 1X y medir la absorbancia del blanco a 260 y 280 nm
- c. Diluir la muestra de ADN 1:100 en TE 1X
- d. Medir la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm
- e. Establecer la relación A_{260}/A_{280} , si esta se encuentra entre 1.8 y 2.0 indica un ADN de buena calidad
- f. Calcular la concentración de ADN mediante la siguiente relación:
 - 1 Unidad de Absorbancia = 50 μ g/mL

6.2.3 Amplificación por PCR de los fragmentos F1-F5 con los primers OPA 03, OPA 04 y OPE 01 para el ADN de *M. colombiense* CECT 3035

Para la amplificación de los fragmentos seleccionados se escogió la cepa de *M. colombiense* CECT 3035 por tratarse de la cepa tipo, la cual ya ha sido secuenciada. El protocolo fue:

- a. Programar en el termociclador las siguientes condiciones de amplificación:

Paso 1	95°C/5 min	1 ciclo
Paso 2	94°C/1 min, T_m (tabla 6-4) /1min, 72°C/1min	40 ciclos
Paso 3	72°C/10 min	1 ciclo

- b. Preparar la mezcla de reacción para un volumen final de 25 μ L de acuerdo con las concentraciones que aparecen en la tabla 6-4 utilizando el ADN de *M. colombiense* CECT 1035
- c. Preparar un gel de agarosa al 1.6% p/v en buffer Tris-borato-EDTA (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) pH 8.2, con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) para analizar los productos de amplificación en un transiluminador

Tabla 6-4. Temperatura de anillamiento de primers evaluados y concentración de los reactivos empleados en la PCR para los fragmentos seleccionados

ADN (ng)	Taq polimerasa Tucan Taq (U)	Primers (1.25 μ M)		[MgCl ₂] (mM)	dNTP (μ M)
		Secuencia	T _m (°C)		
10	0.5	OPA 03: 5' -AGGGGTCTTG- 3'	35	3.0	200
		OPA 04: 5' -AATCGGGCTG- 3'	33		
		OPE 01: 5' -GAAGGTTAGG-3'	30		

6.2.4 Purificación de fragmentos F1 - F5

Los fragmentos de *M. colombiense* que se amplificaron diferencialmente fueron purificados con el kit de purificación de banda AxyPrep™ PCR Clean-up kit, brevemente el procedimiento consiste en:

- a. Correr un gel de agarosa (1.5% p/v) de bajo punto de fusión a 50V para obtener bandas bien definidas.
- b. Visualizar los fragmentos ADN en el gel utilizando luz UV (360 nm).
- c. Cortar el fragmento de ADN con un bisturí estéril intentando recuperar el mínimo de agarosa
- d. Pesar el fragmento de agarosa y pasarlo a un tubo *ependorf* estéril. No procesar más de 300 mg del gel de agarosa por reacción de purificación
- e. Añadir “buffer de captura” (NaI 5 M) a razón de 10 μ l / 10 mg de agarosa. Mezclar con *vortex* e incubar a 50°C durante 5-15 min hasta que la agarosa se funda

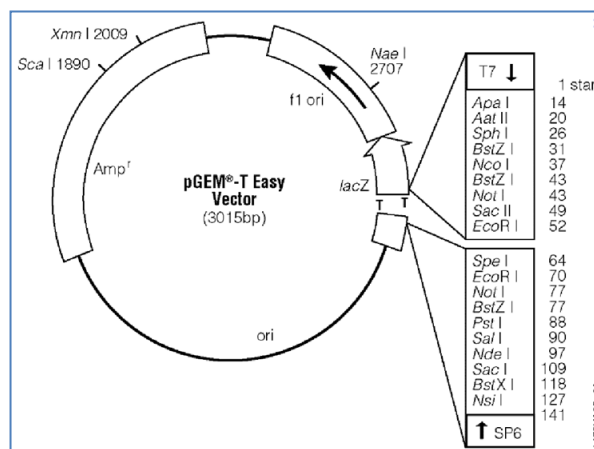
completamente.

- f. Transferir la mezcla a una columna de purificación (silica) acoplada a un tubo *ependorf* de 1,5 ml, e incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
- g. Centrifugar la columna a 12,000 rpm durante 30 seg.
- h. Desechar el filtrado y añadir 500 μ l de buffer de lavado (EtOH al 70%), Centrifugar durante 30 seg a 12,000 rpm.
- i. Pasar la columna a un tubo *ependorf* nuevo, añadir 50 μ l de agua desionizada en el centro de la columna y centrifugar a 12,000 rpm durante 1 min. El ADN se recupera disuelto en el agua.

6.2.5 Clonación de los fragmentos genómicos F1-F5 de *M. colombiense*

El vector de clonación seleccionado fue el plásmido pGEM-T Easy Vector System (Promega) (Figura 6-1) el cual se caracteriza por:

- ✓ Tener una T terminal en los extremos 3' del sitio de clonación para incrementar la eficiencia del proceso de ligación.
- ✓ Contiene un sitio múltiple de clonación flanqueado por los promotores T7 y SP6 de la ARN polimerasa, en el cual se encuentra la región que codifica para el péptido α de la β -galactosidasa, lo cual permite seleccionar los clones recombinantes directamente sobre placa indicadora.
- ✓ Contiene un gen de resistencia a Ampicilina
- ✓ Contiene múltiples sitios de restricción al interior de la región de clonación

Figura 6-1. Mapa circular del vector pGEM-T Easy Vector (Promega, 2010)

6.2.6 Ligación y clonación de los fragmentos de PCR purificados

Como los fragmentos obtenidos por PCR poseen la misma secuencia inicial en ambos lados de la doble hebra de ADN ya que se usa solo un primer en la reacción de amplificación por RAPD, fue necesario clonar los fragmentos para incorporar unos primers específicos en los extremos de las secuencias de interés los cuales corresponden a las secuencias SP6 y T7 propios del vector. Por lo tanto se siguió el protocolo establecido con el vector pGEM-T Easy Vector:

- En un tubo de PCR adicionar 5 μ L de buffer de ligación (Tris HCl pH 7.8, $MgCl_2$ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2mM, polietilenglicol 10%).
- Adicionar 1.0 μ L de vector pGEM-T Easy vector.
- Adicionar 2.0 μ L del producto de purificación de PCR (excepto para el control negativo, el control positivo se le adicionó el control de inserto incluido en el kit)
- Adicionar 1.0 μ L de T4 DNA ligasa. Mezclar por inversión.
- Incubar a 4 °C por 12 horas.

6.2.7 Transformación de células competentes

Las células competentes fueron transformadas por choque térmico, donde son enfriadas en presencia de iones Ca^{2+} , el cual prepara las membranas celulares para ser permeables al ADN plasmidial (vector), un breve calentamiento y después un enfriamiento permite que el ADN ingrese a la célula. El protocolo usado fue el siguiente:

- a. Por cada reacción de ligación preparar dos placas de LB /Ampicilina/X-Gal/IPTG
- b. Centrifugar los tubos que contienen las reacciones de ligación para recolectar el contenido en el fondo del vial.
- c. Descongelar las células competentes JM109 y mantenerlas en un baño de hielo hasta el momento en que se van a utilizar.
- d. En un tubo *ependorf* de 1.5 mL mezclar 50 μL de células competentes y 2 μL de reacción de ligación.
- e. Mantener en baño de hielo por 20 min.
- f. Llevar los tubos a un baño maría a 42 °C por un periodo de 45 -50 segundos para transformar por choque térmico.
- g. Inmediatamente devolver los tubos al baño de hielo por 2 min.
- h. Adicionar 950 μL de medio SOC.
- i. Incubar durante 1.5 horas a 37 °C con agitación constante.
- j. Inocular los medios de LB ampicilina con 100 μL del cultivo transformado a 37 °C por 12 – 16 horas.
- k. Seleccionar las colonias blancas (células transformadas).
- l. Hacer un repique en caldo LB ampicilina
- m. Proceder a la extracción y purificación de plásmido.

6.2.8 Extracción y purificación de plásmido

La extracción y purificación del plásmido se llevo a cabo mediante lisis alcalina, debido a su simplicidad, bajo coste y reproducibilidad, donde el NaOH puede llegar a degradar el ADN genómico pero no el plasmídico. El protocolo empleado fue el siguiente:

- a. Tomar 1.5 mL de cultivo y centrifugar a 12000 x g por 1 minuto. Eliminar el sobrenadante
- b. Con ayuda de un vortex resuspender el pellet bacterial en 100 µL de buffer I (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris – HCl pH 8.0)
- c. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente
- d. Adicionar 200 µL de solución II (0.2 M NaOH, 1% SDS) recién preparada, mezclar por inversión e incubar en baño de hielo por 5 min.
- e. Adicionar 150 µL de solución III (5M acetato de potasio, 11.5 % (v/v) ácido acético glacial), mezclar vigorosamente e incubar en hielo por 5 min
- f. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C.
- g. Recuperar el sobrenadante, adicionar un volumen de una solución de fenol:Cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1) y mezclar vigorosamente.
- h. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C.
- i. Recuperar el sobrenadante
- j. Adicionar 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 4.8, y 0.6 volúmenes de isopropanol e incubar en hielo por 5 min.
- k. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C.
- l. Recuperar el precipitado de ADN
- m. Adicionar 1.0 mL de etanol al 70 %.
- n. Mezclar por inversión suavemente.
- o. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C.
- p. Secar el precipitado de DNA
- q. Resuspender en 50 µL de agua desionizada.
- r. Adicionar 1 µL de RNAsa (10 mg/mL) e incubar a 37 °C / 15 min
- s. Almacenar a 4°C
- t. Cuantificar la cantidad de plásmido obtenido.

6.2.9 Secuenciación y análisis bioinformáticos

Para la secuencia de ADN se contrato el servicio de secuenciación ofrecido por la empresa BioMol Ltda externo a la Universidad Nacional.

El análisis bioinformático comprendió:

- a. Alineamiento de las secuencias mediante Blastn (Altschul, 1997) contra las bases de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) y tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>).
- b. Identificación de marcos de lectura abiertos (ORF) presentes en las secuencias de interés, a través del servidor ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) y posterior alineamiento mediante Blastp contra las bases de datos del NCBI y Tuberculist

Para el análisis de la proteína hipotética de *M. colombiense* se emplearon:

- c. El servidor ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger E H. C., 2005) para definir algunas de las características fisicoquímicas de la proteína hipotética
- d. El servidor SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para evaluar la presencia de un péptido señal para la proteína hipotética (Petersen TN, 2011)
- e. El servidor Modeller (<http://salilab.org/modeller/>) (Eswar N, 2006) para definir la posible estructura tridimensional
- f. El servidor Ramachandran Plot 2.0 (<http://dicsoft1.physics.iisc.ernet.in/rp/>) para evaluar la conformación de la proteína hipotética
- g. La base de datos de Prosite (<http://prosite.expasy.org/>) (Sigrist CJA, 2010) para determinar la presencia de sitios activos o dominios funcionales en la secuencia de la proteína hipotética de *M. colombiense*.

6.2.10 Diseño de primers y desarrollo de PCR especie específica para *M. colombiense* CECT 3035

Basados en las secuencias nucleotídicas obtenidas para los fragmentos F1 – F5 (anexo A –E), en el análisis bioinformático y utilizando el programa GeneRunner (Hastings Software Inc) se diseñaron 3 juegos de primers para desarrollar la PCR especie específica para *M. colombiense*. Los criterios para el diseño de los primers fueron:

✓ Longitud	Entre 18 y 20 pb, tamaño adecuado para una especificidad y para unirse fácilmente al ADN templado a la temperatura de anillamiento
✓ Contenido de GC	Entre 60 y 70% similar al contenido del genoma de <i>M. avium</i> 104
✓ Tm	Entre 55 – 65°C
✓ Secuencia	Evitar la formación de estructuras secundarias como hairpins, Autodimeros, dimeros cruzados y loops

El desarrollo de la PCR especie específica se llevó a cabo en dos etapas:

- a. Estandarización de las condiciones de reacción para evaluar cada uno de los juegos de primers diseñados frente al ADN de las 6 cepas de *M. colombiense* incluyendo la cepa tipo y selección de los primers
- b. Evaluación de las condiciones de reacción y de los juegos de primers seleccionados frente a un conjunto de ADNs de micobacterias entre ellas *M. avium*, empleadas como control evaluando la especificidad de la PCR desarrollada.

6.2.11 Estandarización PCR especie específica de *M. colombiense* CECT 3035, etapa 1

- a. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo con los valores establecidos en la tabla 6-5
- b. Programar en el termociclador las siguientes condiciones de amplificación:

Paso 1	95°C/5 min	1 ciclo
Paso 2	94°C/1 min, Tm (tabla 6-5) /1min, 72°C/1min	35 ciclos
Paso 3	72°C/10 min	1 ciclo

- c. Separar los productos de amplificación en un gel de agarosa al 1.6% p/v en buffer Tris-borato-EDTA (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) pH 8.2, con bromuro de etidio (0.5 µg/mL)
- d. Con base en los productos de amplificación obtenidos, comenzar a variar condiciones tanto del ciclo de amplificación como de la concentración de los reactivos para obtener el producto de amplificación esperado en todas las cepas de *M. colombiense*, comenzando por el T_m y concentración de Primers por considerarse dos de los parámetros más importantes.

Tabla 6-5. Concentración de los reactivos empleados en la PCR para *M. colombiense*

Reactivo	Cantidad / Concentración
ADN	10 ng
Taq polimerasa	1.0 U
Primers	1.5 µM
MgCl ₂	3.0 mM
dNTP	200 µM
Buffer	1X
H ₂ O	Para completar 25 µL

6.2.12 Estandarización PCR especie específica, etapa 2

Con los resultados obtenidos en la etapa 1 se evaluó la PCR frente a los ADN de las micobacterias control. Se emplearon un total de 25 ADN: 21 de MNT (13 rápidas crecedoras y 8 lentas crecedoras) y 4 de MT. Al igual que en la etapa 1 se optimizaron las condiciones de reacción buscando obtener los productos de amplificación solamente para *M. colombiense*.

6.2.13 Análisis de restricción del fragmento amplificado

Se planteó adicionalmente hacer un análisis de restricción sobre el fragmento seleccionado, procurando de esta forma complementar la técnica de identificación de *M. colombiense*, haciéndola más específica, ya que el patrón de digestión generado sería específico para esta nueva especie. El protocolo desarrollado fue:

- a. Mezclar por pipeteo el ADN a cortar en una cantidad de 0.2-1.0 μg por reacción con el buffer de la enzima (50 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl), adicionar la cantidad de agua necesaria para alcanzar el volumen final de 20 μL y la enzima de restricción (BamHI) (1 unidad)
- b. Aplicar un spin para colectar el líquido en el fondo del tubo.
- c. Incubar 4 horas a 37°C, (temperatura optima de la enzima).
- d. Al finalizar el procedimiento inactivar las enzimas calentando a 65 ° C durante 20 minutos.

6.3 Técnicas de análisis de lípidos

6.3.1 Extracción de lípidos totales

Los extractos lipídicos totales se obtuvieron mediante una doble extracción con metanol (CH_3OH) y cloroformo (CHCl_3) (Muñoz *et al.*, 1997), a partir de micobacterias crecida en medio Middlebrook 7H9 OADC siguiendo el siguiente protocolo:

- a. Resuspender las micobacterias en una solución de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2, v/v) con agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 48 h. De esta forma se facilita la extracción de los lípidos libres de mayor polaridad.
- b. Dejar decantar la suspensión y filtrar el extracto obtenido. Los lípidos libres se recuperan disueltos en la fase líquida.
- c. Resuspender nuevamente la fase sólida en $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1, v/v) e incubar durante 48 h a temperatura ambiente con agitación. De esta forma se favorece la extracción de los lípidos libres de menor polaridad.
- d. Dejar decantar la suspensión y filtrar el extracto obtenido. Los lípidos libres se recuperan disueltos en la fase líquida.

- e. Guardar el filtrado obtenido el cual corresponde a los detritos celulares, a partir del cual se obtendrán los ácidos micólicos.
- f. Mezclar los extractos orgánicos obtenidos en un matraz, concentrar y someter a partición con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (8:4:2, v/v/v). Como producto de la partición se forman dos fases inmiscibles, la inferior (orgánica) que contiene el extracto glicolípido y la fase acuosa superior.
- g. Recuperar la fase orgánica y concentrar a sequedad en un rotavapor.
- h. Cuantificar el extracto obtenido por gravimetría, este corresponde a los glicolípidos de superficie, entre estos los glicopéptidolípidos (GPL)

6.3.2 Ácidos micólicos

Para evaluar el perfil de AM por cromatografía en capa delgada (TLC) es necesario liberarlos de su unión con los residuos de AG presentes después de la extracción, haciendo una transesterificación con metanol para lo cual se siguió el siguiente protocolo:

- a. Tomar una muestra de 10.0 mg de detritos obtenidos en el proceso de extracción de lípidos totales.
- b. Depositar en un tubo de vidrio de tapa rosca de (14 x x120 mm) y adicionar 1.0 mL de una mezcla compuesta por 30.0 mL de metanol, 15.0 mL de tolueno y 1.0 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- c. Calentar la mezcla a 80 °C por 16 horas
- d. Enfriar a temperatura ambiente
- e. Hacer una doble extracción líquido-líquido con 2.0 mL de n-hexano y combinar los extractos.
- f. Mezclar los extractos con 3.0 mL de una solución buffer de fosfato 0.3 M (42.57g de Na_2HPO_4 y 12.0 g de NaOH por 1.0 L de agua destilada pH 11 – 12)
- g. Recuperar la fase orgánica superior en otro tubo y evaporar a sequedad a 40°C en corriente de nitrógeno.
- h. Cuantificar por gravimetría.
- i. Disolver el residuo en n-hexano para lograr una concentración de 10 mg/mL

6.3.3 Análisis de ácidos micólicos por TLC

Se basa en la migración diferencial de los AM a través de un soporte sólido que actúa como fase estacionaria, donde la migración de los compuestos está dada por la naturaleza de las funciones químicas presenten en la molécula y de su interacción con la fase estacionaria y la fase móvil. El protocolo empleado fue el siguiente:

- a. Para la elución se empleara como fase móvil la mezcla n-hexano: éter etílico (9:1)
- b. Aplicar 10 μ l de cada uno de los extractos de los esteres metílicos (20 mg/mL) sobre una placa de Sílica-gel 60 de soporte de vidrio (20x20 cm de tamaño y 0,25 mm de grosor, *Merck*).
- c. Desarrollar la cromatografía hasta que el solvente ascienda por capilaridad a 2 cm aproximadamente del borde superior de la placa.
- d. Sacar la placa de la cámara y dejarlas secar a temperatura ambiente.
- e. Revelar mediante rociado, empleando una mezcla de ácido fosfomolibdico /metanol 10% en una cámara de spray para TLC.
- f. Calentar 5 min aprox a 120 °C para visualizar los ácidos micólicos separados.

6.3.4 Extracción de Glicopeptidolípidos

A partir de los extractos orgánicos obtenidos de la extracción de los lípidos totales (CHCl_3 : MeOH (1:2, v/v)) se empleo el siguiente procedimiento:

- a. Mezclar los extractos orgánicos obtenidos en un matraz. concentrar y someter a partición con CHCl_3 :MeOH:H₂O (8:4:2, v/v/v). Como producto de la partición se forman dos fases inmiscibles, la inferior (orgánica) que contiene el extracto glicolipídico y la fase acuosa superior.
- b. Recuperar la fase orgánica y concentrar a sequedad en un rotavapor.
- c. Resuspender en 20mL de acetona, los compuestos solubilizados corresponden a los glicolípidos de interés.
- d. Cuantificar el extracto obtenido por gravimetría, este corresponde a los glicolípidos de superficie, entre estos los glicopéptidolípidos (GPL)

6.3.5 Deacilación de GPL

Con este procedimiento (Fujiwara N, 2007) se obtiene la eliminación de los glicolípidos no específicos y la deacilación de los GPL polares, eliminando de esta forma el residuo acilo unido al GPL por el extremo N terminal del tetrapeptido.

- a. Tomar 1.0 mg de extracto lipídico seco
- b. Suspender en $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) en una proporción de 1 mg / mL
- c. Tratarlo con una solución de NaOH 0.2N / CH_3OH (1 mg / mL)
- d. Mantener a 37 °C por 60 minutos. Neutralizar con CH_3COOH glacial y evaporar
- e. Resuspender en $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:2:1)
- f. Recuperar la fase orgánica y evaporar
- g. Los lípidos resultantes corresponden a los GPL deacilados

6.3.6 Análisis GPL mediante TLC

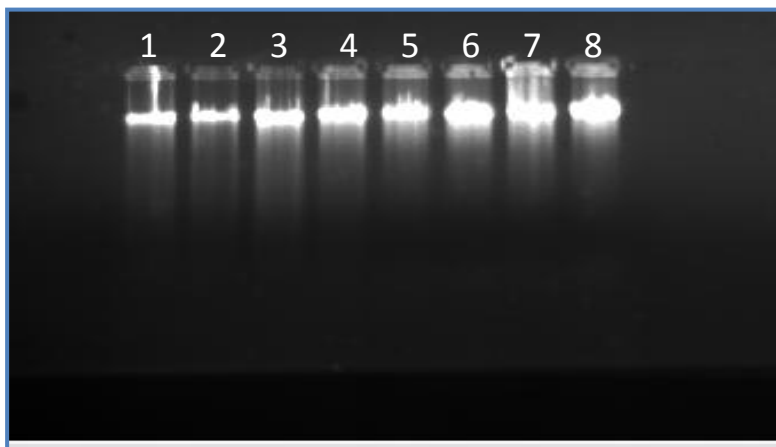
- a. Aplicar 10 μl de cada uno de los extractos (20 mg/mL) sobre una placa de Sílica-gel 60 de soporte de vidrio (20x20 cm de tamaño y 0,25 mm de grosor, *Merck*).
- b. Eluir con una mezcla de $\text{CHCl}_3:\text{MetOH}:\text{H}_2\text{O}$ (100:40:7 v/v/v)
- c. Desarrollar la cromatografía hasta que el solvente ascienda por capilaridad a 2 cm aproximadamente del borde superior de la placa.
- d. Preparar una solución de antrona al 1% en H_2SO_4 concentrado (p/v), aplicarla sobre la placa en una cámara de aspersion para CCD.
- e. Calentar 1-2 min a 115°C, para visualizar los compuestos carbohidratados especialmente los glipeptidolípidos que presentarán coloración azul

7.Resultados y discusión

7.1 Análisis molecular

La figura 7-1 presenta el análisis mediante electroforesis del ADN genómico de *M. colombiense*, no se observan colas de difusión, indicando que los procesos de lisis celular así como la degradación de la fracción proteica asociada al ADN fueron de buena calidad.

Figura 7- 1. Electroforesis productos de extracción de ADN de micobacterias empleadas en este estudio: Carril 1: *M. avium* 104, 2: *M. colombiense* 6B, 3: *M. colombiense* 7B, 4: *M. colombiense* CECT 3035 5: *M. colombiense* 16B, 6: *M. colombiense* 19B, 7: *M. colombiense* 57B, 8: *M. tuberculosis* H37Rv



La cuantificación de los ADN obtenidos se realizó por espectrofotometría UV a 260 nm,, la pureza de los ADNs obtenidos se evaluó mediante la relación de absorbancias 260 / 280 tomando como criterios de aceptabilidad una relación entre 1.8 – 2.0. Las

concentraciones obtenidas, así como los valores de referencia se presentan en la tabla 7-1. Se observa que el ADN obtenido es de buena calidad, en general no hay contaminación con proteínas que puedan interferir en los procedimientos posteriores.

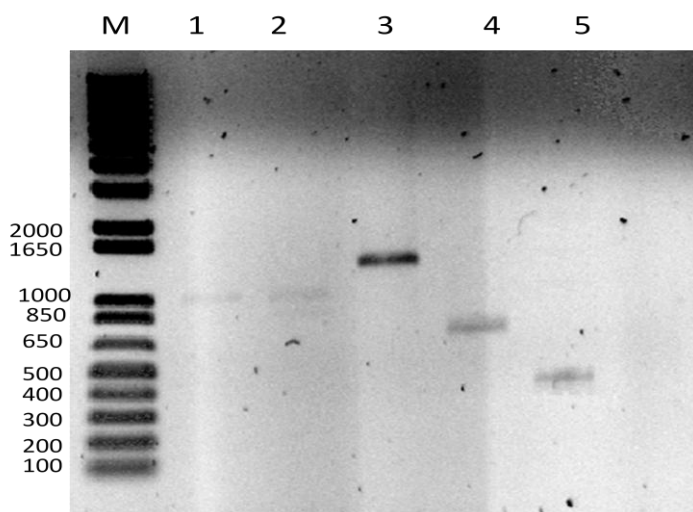
Tabla 7-1. Cuantificación de ADN extraídos de *M. colombiense*, *M. avium* 104 y *M. tuberculosis* H37Rv, las lecturas corresponden a la dilución 1/ 50 de los productos de extracción.

Muestra	Abs 260	Abs 280	Concentración (ng/μL)
1	0.027	0.015	68
2	0.026	0.013	65
3	0.031	0.017	78
4	0.032	0.019	79
5	0.032	0.017	80
6	0.032	0.018	81
7	0.034	0.019	85
8	0.034	0.017	86

7.1.1 Amplificación por PCR y purificación de los fragmentos de interés

Los fragmentos de interés (F1 – F5) fueron amplificados de acuerdo con las condiciones establecidas en la tabla 6-4. La figura 7-2 presenta la imagen del gel de electroforesis para los productos de amplificación una vez purificados. Se observa como la purificación fue mucho más eficiente para los fragmentos F1, F3 y F4, Aunque la cantidad de F5 es menor comparativamente con la de las demás fragmentos, fue suficiente para llevar a cabo la reacción de ligación posterior.

Figura 7-2. Electroforesis de los productos de amplificación purificados para los primers OPA 03, OPA 04 y OPE 01. M: Marcador de peso molecular 1kb, 1: F5, 2: F2, 3: F4, 4: F3 5: F1



La concentración de cada uno de los productos se determinó mediante fluorescencia (Tabla 7-2) a través de un documentador de geles, utilizando la fluorescencia de la banda de 1650 pb del marcador de peso molecular (1kb plus DNA ladder, Invitrogen) como estándar interno, que de acuerdo con el proveedor contiene aproximadamente el 8% de la masa aplicada al gel (Invitrogen) empleando como agente de tinción bromuro de etidio en una concentración de 1 mg/mL. Tanto de marcador como de muestra se aplicaron 5,00 μ L, la concentración del marcador aplicado fue 100 ng/ μ L.

Tabla 7-2. Cuantificación de los fragmentos purificados a partir PCR RAPD

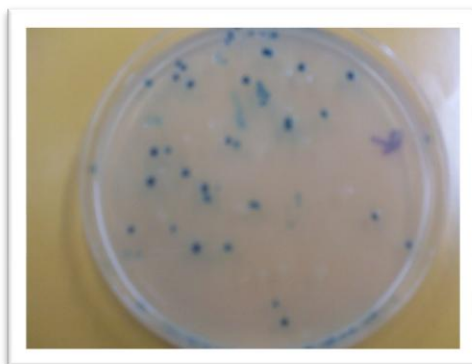
Muestra	Cantidad (ng)
Marcado banda 1650 pb	40
F1	10
F2	11
F3	35
F4	19
F5	20

7.1.2 Clonación de fragmentos genómicos F1 – F5 de *M. colombiense* en *E. coli* JM109

Con los fragmentos F1 – F5 previamente purificados se procedió a hacer la reacción de ligación en el vector pGEM-T easy vector para su posterior clonación en células de *E. coli* MJ109 de acuerdo con los procedimientos establecidos. (6.2.7)

La figura 7-3 presenta la selección de las transformantes positivas para el fragmento F1, de acuerdo a la selección blanco/azul mediada por la fusión con β -galactosidasa. Las colonias azules son aquellas que no incorporaron el plásmido y que por lo tanto tienen el gen de la β -galactosidasa presente en el operon LacZ intacto por lo que pueden hidrolizar el X-Gal con ayuda del inductor IPTG; mientras que las colonias en blanco corresponden a los transformantes positivos, aquellos que incorporaron el inserto y que por lo tanto no pueden hidrolizar el X-Gal, sin embargo pueden crecer en el medio porque también poseen el gen de resistencia a la ampicilina.

Figura 7-3. Selección de recombinantes positivos para el fragmento F1 empelado medio LB / ampicilina / XGal / IPTG

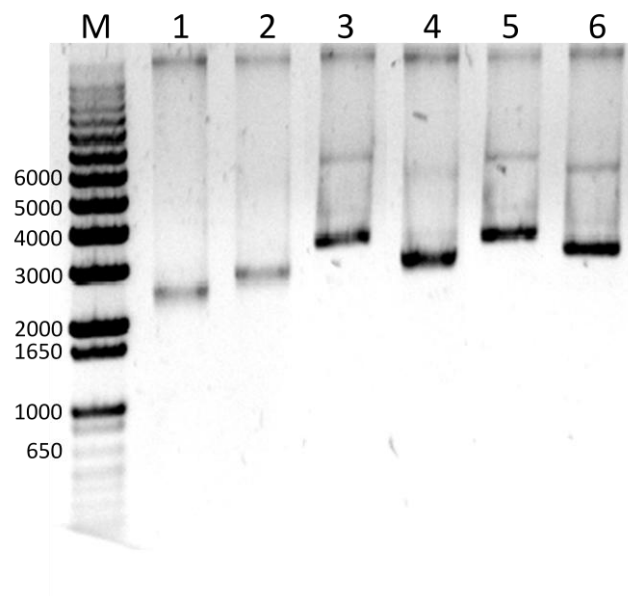


Posteriormente las células se inocularon en caldo LB-Ampicilina, se incubaron por 24 horas para la extracción de plásmidos.

La figura 7-4 presenta el gel de electroforesis para los plásmidos recombinantes (PR) obtenidos. Se observa como el plásmido sin inserto (control negativo para la incorporación de plásmidos), que tiene un tamaño de 3015 pb aparece por debajo de la banda de 3000 pb del marcador, lo cual puede ser consecuencia de un enrollamiento de

la estructura que le permite avanzar un poco más que el marcador del mismo tamaño a través del gel de agarosa (0.6% p/v) bajo las condiciones de la electroforesis. Teniendo en cuenta esto y asumiendo que los demás plásmidos presentan un comportamiento similar en cuanto al enrollamiento de la estructura, se observa como todos están por encima del control indicando que efectivamente han incorporado los diferentes insertos (fragmentos F1 – F5)

Figura 7-4. Electroforesis para los productos de extracción de plásmidos recombinantes (PR): M: Marcador 1kb (invitrogen), 1: Control negativo plásmido sin ligación, 2: PR-F1, 3: PR-F2, 4: PR-F3, 5: PR-F4, 6: PR-F5



Los plásmidos obtenidos fueron cuantificados por fluorescencia mediante tinción con bromuro de etidio, usando como marcador la fluorescencia de la banda de 1650 pb del marcador de peso molecular quien posee cerca del 8% de la masa del marcador (100ng/ μ L) aplicada al gel. Tanto del marcador como de los plásmidos obtenidos se aplicaron 5.00 μ L. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7-3

Tabla 7-3. Cuantificación plásmidos por fluorescencia usando bromuro de etidio

Muestra	Cantidad aplicada al gel (ng)
Banda 1650 pb	
Marcador	40
PR-F1	20
PR-F2	20
PR-F3	38
PR-F4	36
PR-F5	40

7.1.3 Análisis de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos diferencialmente amplificados en *M. colombiense*

En el momento de hacer el análisis de las secuencias reportadas por el servicio de BioMol aún no se había publicado el genoma de *M. colombiense*, por lo que se presentan los análisis efectuados en ese momento, ya que, con base en ellos se seleccionaron las secuencias con las cuales se continuó el estudio. Posteriormente se describe el análisis de las secuencias frente al genoma de la cepa de *M. colombiense* CECT 3035

En los anexos A – E se presenta la secuencia reportada por el servicio de BioMol para los fragmentos F1, F2, F3, F4 y F5 de *M. colombiense* CECT 3035. El análisis bioinformático comprendió como primer paso el alineamiento de las secuencias obtenidas mediante Blastn (Altschul, 1997) contra las bases de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) y Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>) con el fin de verificar si las secuencias de interés se encuentran presentes en otro tipo de microorganismo especialmente del género *Mycobacterium* diferente a *M. colombiense*

Los resultados comparando tan solo las secuencias de nucleótidos en el modo básico de Blast por nucleótidos mostraron que el fragmento F2 comparte un 91% de identidad con el rRNA 23S de *M. avium* K-10, motivo por el cual esta secuencia fue descartada para

continuar con el estudio. Los fragmentos restantes: F1, F3, F4 y F5 no mostraron ningún tipo de homología a nivel de secuencia de nucleótidos.

Mediante el servidor ORF finder del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) se identificaron los marcos de lectura abierta presentes en las secuencias restantes, con estos se hizo un alineamiento a nivel de aminoácidos contra la base de datos del GenBank en busca de homología con proteínas ya reportadas o hipotéticas a partir de estudios bioinformáticos.

El análisis mostró que el fragmento F5 de 1000 pb presenta 5 marcos de lectura abierta, uno de los cuales, con un tamaño de 333 pb (110 aminoácidos) posee un 64% de identidad con una Acil Coa sintasa de *M. avium* 104, una proteína multifuncional envuelta en la activación de ácidos grasos a través de la unión de la Coenzima A (NCBI, 2010) compuesta por 508 aminoácidos, Por lo anterior el fragmento F5 también fue descartado al ser probable encontrarlo en otras micobacterias.

Para las secuencias de los fragmentos restantes (F1, F3 y F4), el servidor ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) mostró que al interior de cada secuencia existen diferentes marcos de lectura abierto, los alineamientos de las secuencias respectivas mostraron que aunque hay homología con algunas proteínas hipotéticas o ya descritas en la base de datos del GenBank, los scores del alineamiento en general no superan el 30%, no hay homología con dominios conservados, además éstas pertenecen a organismos eucariotas. Por lo anterior las secuencias se mantuvieron dentro del grupo de fragmentos de interés para continuar con el estudio.

La tabla 7-4 resume los resultados del análisis bioinformático de las secuencias de interés.

Tabla 7-4. Análisis bioinformático indicando los marcos de lectura abiertos presentes así como la codificación asignada para cada fragmento

Fragmento	Marcos de lectura abierto	Codificación
F1	(+1) ^a 118-336 ^b (249) ^c	Proteína hipotética en <i>loa loa</i> (Score 33.1) Proteína Leucina-Zipper asociada a JNK en <i>brugia malati</i> (Score 32.3) Proteína de inetracción con JNK en <i>Ascaris suum</i> (Score 32.3)
	(-1) 33-152 (120)	No
	(-2) 2-118 (117)	No
F2		rRNA 23S <i>M. avium</i> 10-K (score 1064)
F3	(-1) 414-545 (132)	Proteína hipotética en <i>Legionella pneumophila</i> . (Score 31.2) Subunidad gamma de tiocianato hidrolasa en <i>Rhodococcus josti</i> RHA1 (Score 30.4) Proteína hipotética en <i>Neurospora crassa</i> OR74A (Score 30.0)
	(-2) 2-106 (105)	No
	(-2) 392-550 (159)	No
F4	(+2)11 – 121 (111)	No
	(+2)671-778 (108)	No
	(+3)114-509 (396)	tRNA pseudouridina mitochondrial de <i>rattus norvegicus</i> . (score 36.2); Proteína hipotética en <i>bacteroides sp</i> (score 34.7); Proteína de superficie tipo S S-layer de <i>thermosinus carboxydivorans</i> Nor 1 (score 33.9)
	(-2)83-259 (177)	No
	(-2)338 – 348 (111)	No
	(-2)689 – 776(108)	No
	(-3) 400-507 (108)	No
(-3)796-915 (120)	No	
F5	(+1)115-447 (333)	AcylCoAsintetasa de <i>M. avium</i> 104
	(+1)490-648 (159)	No
	(+2)548-665 (108)	No
	(-1)231-380 (150)	No
	(-3)337-549 (213)	No

^a. Marco de lectura

^b. Posición en la que inicia y finaliza el marco de lectura

^c. Tamaño en bases del marco de lectura

¿Porque hay fragmentos como F2 y F5 que no son selectivos para *M. colombiense* y por el contrario están presentes en otras micobacterias cuando el criterio para seleccionarlos por RAPD fue que amplificaron específicamente en *M. colombiense* pero no lo hicieron en el control *M. avium* 104?

Entre las posibles causas se encuentra precisamente el hecho que solo se usó un control en el desarrollo del RAPD, *M. avium* 104, el hecho que no hubiese amplificado en este no implica que no pueda estar presentes en otras especies del mismo género, además es necesario tener en cuenta que en la actualidad hay reportadas más de 150 especies de micobacterias (Euzéby, 2011), por lo que situaciones como estas estaban previstas desde el comienzo del estudio.

7.1.4 Análisis bioinformático secuencia fragmento F4

En Octubre de 2011 se publicó la secuencia del genoma de *M. colombiense* CECT 3035 (Gonzalez M., 2011), depositada en el Genbank con el número de acceso AFVW00000000. Los análisis de las secuencias de los fragmentos F1, F3 y F4 frente a ésta mostraron que las secuencias F1 y F3 presentan 99% de identidad frente a ese genoma, sin embargo no hay relación con ningún tipo de proteína.

El alineamiento de la secuencia del fragmento F4 frente al genoma de *M. colombiense* CECT 3035, mostró que ésta posee una identidad del 96% frente a la región comprendida entre 475776 y 476485 perteneciente al locus AFVW01000001, al interior de la cual se encuentra un marco de lectura abierto de 450 pb que codifica para una proteína hipotética de 149 aminoácidos (anexo F), identificada en GenBank como EGT88130.1 y que de acuerdo con la base de datos del NCBI es específica para *M. colombiense*.

A partir de la secuencia y empleando las herramientas disponibles en el servidor expasy (Gasteiger E, 2003) como ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) se definieron algunas de las características fisicoquímicas de la proteína las cuales se presentan en la tabla 7-5

Tabla 7-5. Principales constantes fisicoquímicas de la proteína hipotética EGT88130.1 de *M. colombiense* CECT 3035

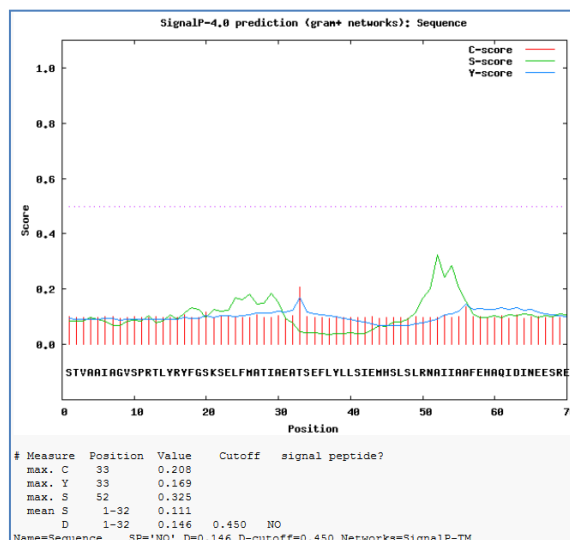
Constante	Magnitud
Masa molecular	16122 Da
Punto isoeléctrico teórico	4.98
Coeficiente de extinción ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	16960 a 280 nm
Índice de inestabilidad	47.82 ^a :
Índice alifático	95.23 ^b
Promedio Grand de hidrofobicidad (GRAVY)*	0.135: Clasifica la proteína como hidrofóbica

- Un índice de inestabilidad superior a 40 predice que la proteína sería inestable en un tubo de ensayo
- El índice alifático se define en términos del número de los residuos alifáticos (V, A, I, L) sobre el total de residuos en la proteína, representa un factor de estabilidad para proteínas globulares
- GRAVY determina el grado de hidrofobicidad de la proteína, está basado en una escala de hidrofobicidad para cada aminoácido, se calcula como la suma de los valores de hidrofobicidad para cada aminoácido dividido sobre el total de aminoácidos. Un valor positivo clasifica a la proteína como hidrofóbica y uno negativo como no hidrofóbica

En la evaluación de la presencia de un péptido señal para definir el posible destino de la proteína en la célula micobacteriana se utilizó el servidor signalP (Petersen TN, 2011) a partir de la secuencia tomando para ello 75 bases corriente arriba del inicio de la secuencia (desde 475739 hasta 476267) para tener al menos 25 aminoácidos con los cuales poder hacer la predicción (Anexo G)

La figura 7-5 presenta los resultados arrojados por el servidor:

Figura 7-5. Diagrama predicción de un péptido señal para la secuencia de la proteína hipotética EGT88130.1 de *M. colombiense* CECT 3035



Como se observa tanto la puntuación de C como de Y quienes predicen el sitio de clivaje por parte de una peptidasa son bajos (0,208 y 0.169), además junto con la puntuación S quien predice uno de los aminoácidos del péptido señal (0.325), se encuentran por debajo del punto de corte (0.450). De acuerdo con éstos resultados la proteína hipotética de interés no posee péptido señal, luego es difícil establecer el destino y por lo tanto la posible función de esta.

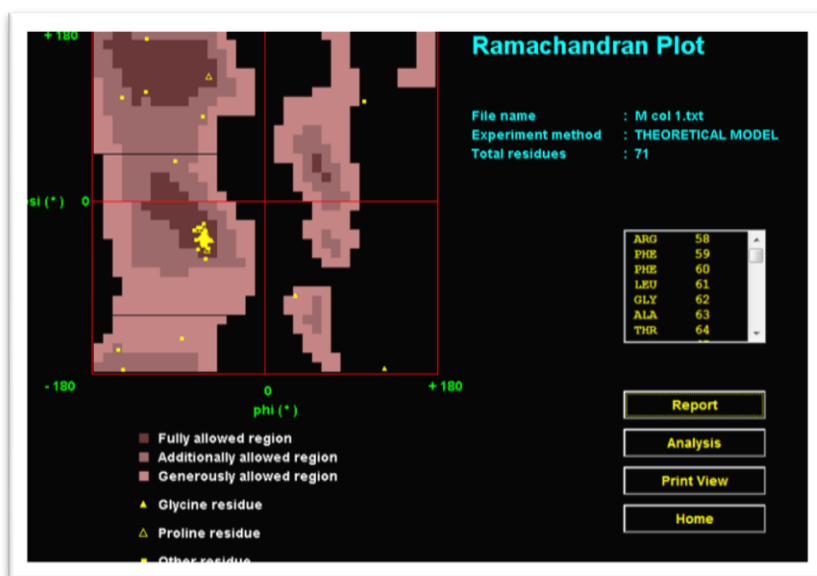
A través del servidor Modeller (Eswar N, 2006) se definió la estructura tridimensional de la proteína hipotética de *M. colombiense* (Figura 7-6) tomando como templatado una proteína con código PDB 2peo: cadena A, correspondiente a una chaperona de *Anabaena CA* (una cianobacteria) encargada del ensamblaje para la Rubisco. Sin embargo la región comprendida para el alineamiento se encuentra entre el aminoácido 58 y 128 de la proteína hipotética contra la región comprendida entre 24 y 93 de la proteína templatado, logrando tan solo un 32% de identidad a nivel de secuencia en las regiones evaluadas, el cual es bastante bajo, por lo que el modelado desarrollado puede estar sujeto a correcciones. Al emplear el servidor Swiss model (Arnold K, 2006) para intentar predecir una estructura de la proteína, no se encontró una proteína templatado con la cual desarrollar el modelo, precisamente debido a la baja homología entre la secuencia de interés y las presentes en las bases de datos.

Figura 7-6. Estructura tridimensional de la proteína hipotética EGT88130.1 de *M. colombiense* desarrollado con el servidor Modeller. La región en azul corresponde a la secuencia modelada.



La región modelada está constituida por únicamente por 5 hélices alfa, que de acuerdo con el diagrama de Ramachandran (Figura 7-7) para esta secuencia corresponderían a hélices alfa dextrógiras, aunque hay aminoácidos con tendencia a formar láminas beta, estos no se ven reflejados en la estructura, debido a la baja proporción de los mismos.

Figura 7-7. Diagrama de Ramachandran señalando la posible estructura secundaria que puede adoptar la secuencia modelada para la proteína hipotética EGT88130.1 de *M. colombiense*.



Con base en la secuencia y empleando el servidor Prosite (Sigrist CJA, 2010), se determino que la proteína hipotética de *M. colombiense* no posee sitios activos o dominios funcionales que permitan identificar la naturaleza de la proteína, su función o clasificarla en algún grupo.

Esto puede indicar que la secuencia del fragmento F4 posee una alta especificidad en relación con el genoma de *M. colombiense* al no estar relacionada con el genoma de ninguna otra especie a nivel de nucleótidos ni de aminoácidos.

7.1.5 PCR específica para *M. colombiense*

Con el objetivo de desarrollar un ensayo de PCR específico para *M. colombiense*, se diseñaron parejas de primers para amplificar fragmentos de las secuencias obtenidas para F1, F3 Y F4 (tabla 7-6) utilizando el programa Gene runner (Hastings Software Inc). Los criterios pre-establecidos para el diseño de los primers fueron:

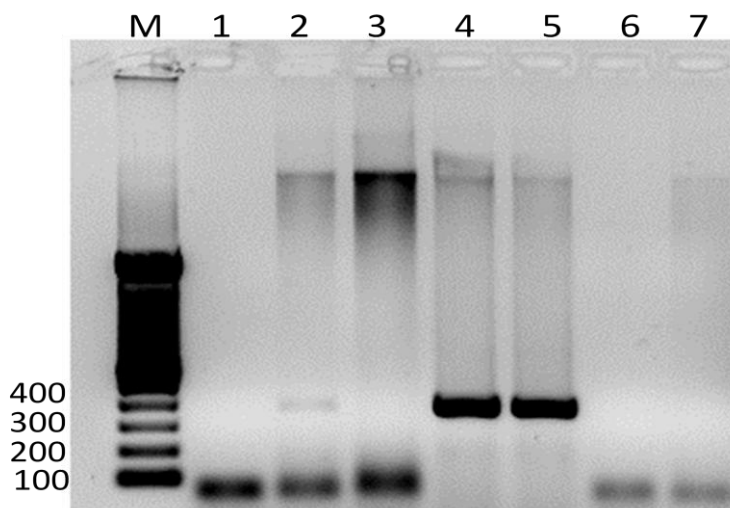
- ✓ Un tamaño de 18 – 20 pb,
- ✓ Un Tm entre 55 – 65 °C, donde no se presentara complementariedad de bases, para evitar la formación de dimeros, hairpins, loops,
- ✓ Generar un segmento entre 300 y 600 pb

Tabla 7-6. Primers empleados en la estandarización de la PCR especie específica para *M. colombiense*

Fragmento	Primers	Secuencia 5' – 3'	Temperatura de anillamiento (°C)	Tamaño fragmento amplificado (pb)
F1	J1 dir	GTCTCGTCAACAGCTCAAAC	60	333
	J1 rev	AGTGATTAGTCAGCCACACG	60	
F3	J2dir	ATCCCCGCTGCTGTTGTGCT	60	382
	J2Rev	AACCGTCAACCGAACGCCCC	60	
F4	J3dir	TTGGCAGCAAAAGCGAAC	54	634
	J3Rev	AAAGCGTCGCTTGGTAGC	56	

La primera etapa del proceso de estandarización de la PCR específica para *M. colombiense* consistió en la evaluación del juego de primers J1, J2 y J3 frente a los ADN de las 6 cepas de *M. colombiense* bajo las condiciones de reacción establecidas (materiales y métodos 2.2.11-12). Se observó como el juego de primers J2 solo amplificaba en las cepa *M. colombiense* CECT 3035 y 16B, por lo que se decidió disminuir la temperatura de anillamiento en 2°C secuencialmente para determinar si amplificaba en las restantes. En 54°C se observó amplificación para *M. colombiense* 6B (Figura 7-8 y Anexo G) aunque con una banda bastante tenue. Los ensayos se continuaron hasta 50°C, sin embargo al disminuir demasiado la temperatura respecto a la temperatura de anillamiento se presenta productos de amplificación inespecíficos, lo cual invalida el uso de este juego de primers en la siguiente etapa del ensayo.

Figura 7-8. Productos de amplificación para *M. colombiense* con primer J2 a 54°C. M: marcador de peso molecular 1: Control negativo, 2. *M. colombiense* 6B, 3. *M. colombiense* 7B, 4. *M. colombiense* CECT 3035, 5: *M. colombiense* 16B, 6: *M. colombiense* 19B, 7: *M. colombiense* 57B



En la figura 4-1b se observa como la banda de 650 pb (a partir de la cual se originó el fragmento F3 y por lo tanto el juego de primer J2) está presente en todas las cepas de *M. colombiense*. ¿Porque ahora el juego de primers J2 no amplifica en todas las cepas sino tan solo en *M. colombiense* 6, CECT 3035 y 16B?

En la reacción de PCR-RAPD la temperatura de anillamiento fue de 33 °C, que correspondía al T_m de los primers empleados. Con los primers específicos (J2) la temperatura de anillamiento aumento a 60°C, lo cual hace mucho más astringente la PCR impidiendo que los primers anillen en sitios no específicos. Una posibilidad entonces es que probablemente los productos de amplificación obtenidos en el RAPD podrían corresponder a anillamientos inespecíficos debido a la corta longitud de los primers empleados y por consiguiente a sus bajas temperaturas de anillamiento. El hecho que estén presentes en solo unas cepas indica que al interior de la especie también existe un grado de polimorfismo.

En el caso de los juegos primers J1 y J3, estos presentaron los patrones de amplificación esperados (figura 7-9) con fragmentos de 333 y 634 pb respectivamente para todas las cepas de *M. colombiense*. En cada caso se utilizó ADN de *M. avium*, 104 como control

La reacción de amplificación empleada comprendió un ciclo inicial de denaturación a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, anillamiento a 62°C para el juego de primers J1 y 58°C para J3, extensión a 72°C por 1 minuto, y un ciclo final de extensión a 72°C por 10 minutos para luego llevar la reacción finalmente a 4°C. Las concentraciones de los reactivos empleados se presentan en la tabla 7-7

Figura 7-9. Productos de amplificación usando los primers A: J1 y B: J3. M: marcador 1Kb (Invitrogen), 1: Control negativo, 2: *M. colombiense* cepa 6B, 3: cepa 7B, 4: cepa CECT 3035, 5: cepa 16B, 6: cepa 19B, 7: cepa 57B, 8: *M. avium* 104

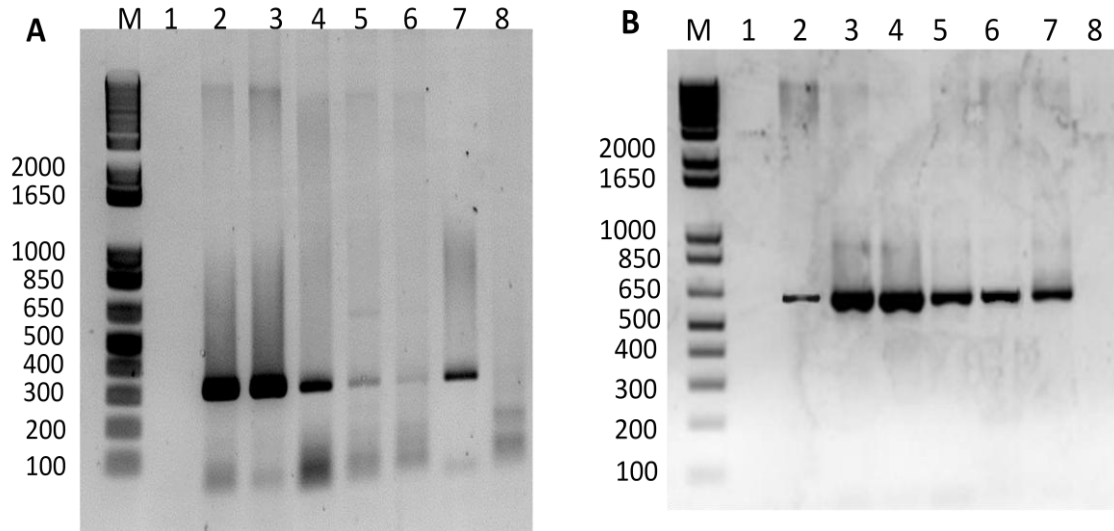


Tabla 7-7 Concentración de reactivos para la PCR con los primers J1 y J3

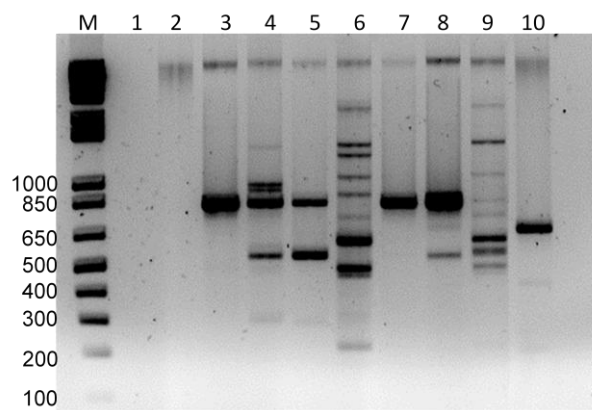
Parámetro	Concentración
ADN	10ng
Taq polimerasa Fermentas	1.0 U
Dntp	200 μ M
Primers	1.0 μ M
MgCl ₂	2.4 mM
Volumen	25 μ L

Para la siguiente etapa, que consistió en la evaluación de los primers y las condiciones de reacción frente a los ADN control de un grupo de micobacterias tuberculosas y no tuberculosas (Tabla 6-3), se empleó el ADN de *M. colombiense* CECT 3035 como cepa de referencia, por ser ésta la cepa tipo, el juego de primers J1 que había amplificado para todas las cepas de *M. colombiense* presentó amplificación también en *M. terrae* ATCC 15755 y *M. immunogenum* ATCC 700505. Esto hace suponer que aunque la amplificación funciona respecto a algunas especies, el hecho que amplifique en especies diferentes a

M. colombiense invalida la secuencia correspondiente al producto de amplificación con los primers J2 como un posible marcador molecular.

Para el juego de primers J3, bajo las condiciones de reacción ajustadas en la primera etapa, algunos de los ADN control presentaban productos de amplificación, sin embargo a diferencia del juego de primers J1, estos tenían tamaños diferentes al producto de amplificación esperado de 634pb (Figura 7-10), lo que motivó a la estandarización de la PCR para conseguir una amplificación exclusiva en *M. colombiense*. En principio el juego de primers J3 aún funcionaba con los ADN control, por lo que el siguiente paso consistió en ajustar las condiciones de reacción para evitar la amplificación de dichos productos en los ADN control pero que se mantuviera en *M. colombiense*

Figura 7-10. Electroforesis para los productos de amplificación con primers J3 entre *M. colombiense* y micobacterias control a 60°C. M: Marcador de peso molecular 1kb, 1: Control negativo, 2: *M. avium* ATCC 25291 3: *M. peregrinum*, 4: *M. africanum*, 5: *M. Intracellulare* 6: *M. Bovis* BCG, 7: *M. marinum*, 8: *M. gastri*, 9: *M. tuberculosis* H37Rv, 10: *M. colombiense* CECT 3035



Las condiciones evaluadas comprendieron desde disminución de la concentración de primers, disminución en el tiempo de anillamiento y extensión para evitar la formación de fragmentos más grandes que el esperado, hasta el aumento en la temperatura de anillamiento buscando hacer cada vez mas astringente las condiciones de reacción, favoreciendo la amplificación del fragmento de 634 pb sobre fragmentos más pequeños. La especificad del fragmento permitió utilizar condiciones muy astringentes para la

amplificación exclusiva del fragmento en el genoma de las cepas de *M. colombiense*. La concentración de los reactivos bajo las cuales se consiguieron la amplificación específica del fragmento solamente en los ADN de *M. colombiense* se resumen en la tabla 7-8

Tabla 7-8. Concentración de los reactivos empleados en la PCR específica para *M. colombiense* con el juego de primers J3.

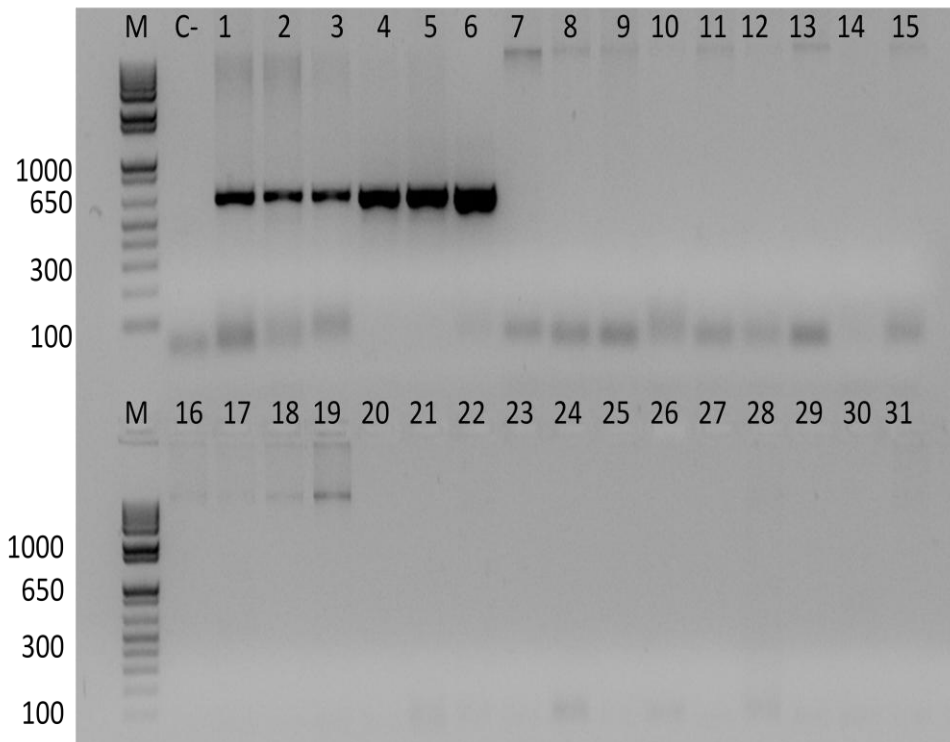
Parámetro	Cantidad / concentración
ADN	10ng
Taq polimerasa	1.0U
dNTP	200 μ M
Primers	0,8 μ M
MgCl ₂	2.4 mM

El ciclo de amplificación comprendió: Una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, anillamiento a 69°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos, con una extensión final a 72°C por 10 minutos para garantizar que no queden piezas de ADN sin extender completamente.

Como se puede observar las condiciones de reacción, especialmente respecto a la temperatura de anillamiento, se hicieron bastante astringente, lo que evitaría el anillamiento inespecífico de los primers sobre el genoma micobacteriano. Además los tiempos tanto de anillamiento como de extensión evitan la formación de productos inespecíficos, haciendo de esta forma altamente selectiva la PCR desarrollada con el juego de primers J3 amplificando exclusivamente en el genoma de *M. colombiense*. En la Figura 7-11 se presenta el producto de amplificación por electroforesis para *M. colombiense* comparado con los controles.

Figura 7-11. Electroforesis para productos de amplificación con primers J3 en *M. colombiense* y otras micobacterias en las condiciones de amplificación seleccionadas M: marcador 1kb (Invitrogen), C-: control negativo, 1: *M. colombiense* 6B, 2: *M. colombiense* 7B, 3: *M. colombiense* CECT 3035, 4: *M. colombiense* 16B, 5: *M. colombiense* 19B, 6: *M.*

colombiense 57B, 7: *M. peregrinum*, 8: *M. africanum*, 9: *M. Intracellulare*, 10: *M. bovis* BCG, 11: *M. marinum*, 12: *M. gastri*, 13: *M. smegmatis*, 14: *M. terrae*, 15: *M. vaccae*, 16: *M. abscessus*, 17: *M. avium* ATCC 25291, 18: *M. avium* 104, 19: *M. non chromogenicum*, 20: *M. avium* DIII Br, 21: *M. smegmatis* MC²155, 22: *M. chelonae* ATCC 35752, 23: *M. immunogenum*. 24: *M. massiliense*, 25: *M. boletti*, 26: *M. fortuitum*, 27: *M. mucogenicum*, 28: *M. scrofulaceum*, 29: *M. phlei*, 30: *M. tuberculosis* H37Rv, 31: *M. tuberculosis* H37Ra



Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el análisis bioinformático de la secuencia del fragmento F4, los de la proteína hipotética de *M. colombiense*, así como con los obtenidos por la amplificación del fragmento de 634 pb con el juego de primers J3, se puede decir que dicho fragmento podría actuar como un marcador molecular para la diferenciación e incluso de la mano con otras pruebas diagnósticas para la identificación de *M. colombiense* frente a los otros miembros del complejo MAC y de otras micobacterias. Sin embargo es necesario comprobar esto frente a un número mayor de controles teniendo en cuenta que a la fecha el número de especies micobacterianas supera las 150

7.1.6 Análisis de restricción de la secuencia J3

Se propone un análisis por restricción del fragmento amplificado con la pareja de primers J3, como un complemento en el método de identificación de *M. colombiense* por amplificación del fragmento J3, análogo a lo que se hace en el método PARA del gen *hsp65*. Con ayuda del genoma de *M. colombiense* se sabe que la secuencia del fragmento amplificado por el juego de primers J3 hace parte de una secuencia relacionada con una proteína hipotética exclusiva de *M. colombiense*, por lo que el patrón de restricción obtenido también sería específico, éste sería útil en el caso de amplificación de bandas de tamaño similar con los primers J3 en otras especies micobacterianas, pues en el presente estudio tan solo se utilizaron 25.

En la tabla 7-9 se presenta los sitios de restricción presentes en el fragmento de amplificación con los primers J3. Como se puede observar existen varios sitios de reconocimiento para diferentes endonucleasas. A partir de esa lista se seleccionó Hind III por presentar un solo sitio de corte produciendo solo dos bandas a partir del fragmento inicial de tamaños lo suficientemente diferentes para resolverlas en el gel y lo suficientemente cercanas para no generar fragmentos demasiado pequeños y /o grandes que puedan hacer confundirlas con dímeros de primers o con el propio producto de amplificación.

Tabla 7-9. Sitios de restricción presentes en el fragmento J3

Enzima	Ubicación
Bsp106	134
Eco RV	138
XmaIII	176, 284
Hind III	232
SmaI	264
Sac II	458, 572

Se seleccionó el producto de amplificación de la cepa de *M. colombiense* CECT 3035, Las condiciones de digestión se presentan en la tabla 7-10

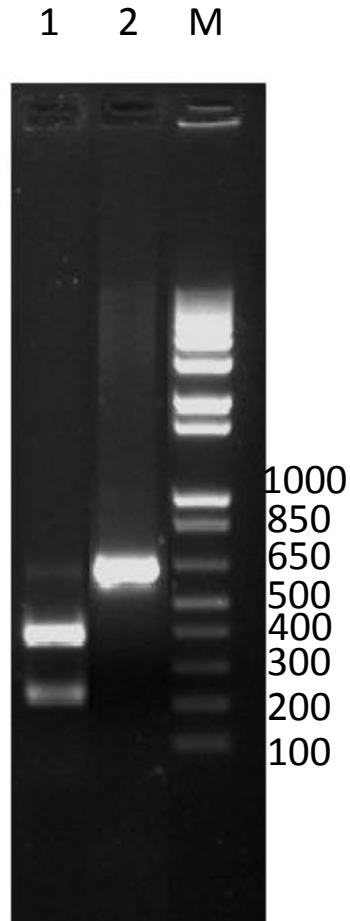
Tabla 7-10. Reactivos empleados en la digestión del fragmento amplificado con los primers J3

Reactivo	Cantidad
ADN (100 ng/uL)	10 μ L
Buffer 1X NE	5 μ L
Hind III (10U/uL)	10 μ L
H ₂ O	5 μ L

La mezcla se mantuvo en digestión a 37°C por 2 horas, posteriormente se inactivo por adición de buffer carga, para verificar los productos de digestión por electroforesis.

En la figura 7-12 se presenta el gel de electroforesis donde se observa los productos de digestión del fragmento J3 (634 pb), correspondientes a un fragmento de 232 pb y otro de 402 pb, por lo que este proceso se podría emplear como una forma de verificar si la especie en cuestión es *M. colombiense*.

Figura 7-12. Patrón de restricción para el fragmento amplificado con los primers J3 de *M. colombiense* CECT 3035 con HindIII. M: Marcador 1kb (Invitrogen), 1: Patrón de digestión fragmento J3, 2: fragmento J3



7.2 Análisis de lípidos

Para la extracción de lípidos totales se partió de un cultivo de 250 mL en caldo Middlebrook 7H9 OADC, que produjo aproximadamente 2.00 g de biomasa, el cual se había mantenido a 37°C por 4 semanas hasta obtener un crecimiento adecuado para hacer la extracción. En la tabla 7-11 se presentan los resultados obtenidos para la extracción de lípidos totales de *M. colombiense*. Los detritos celulares corresponden a los restos de células especialmente pared celular que resisten la extracción con las mezclas

de CHCl_3 y CH_3OH 1:2 y 2:1, por lo que es allí donde se encuentran los AM. Dentro de los glicolípidos que se extraen como un extracto crudo se encuentran los GPL

Tabla 7-11. Masa obtenida para es extracto crudo tanto de AM como de GPL

Cepa <i>M. colombiense</i>	Detritos celulares (mg)	Glicolípidos (mg)
6B	332	125
7B	245	115
CECT 3035	521	217
16B	345	135
19B	267	93
57B	452	161
<i>M. avium</i> 104	245	126

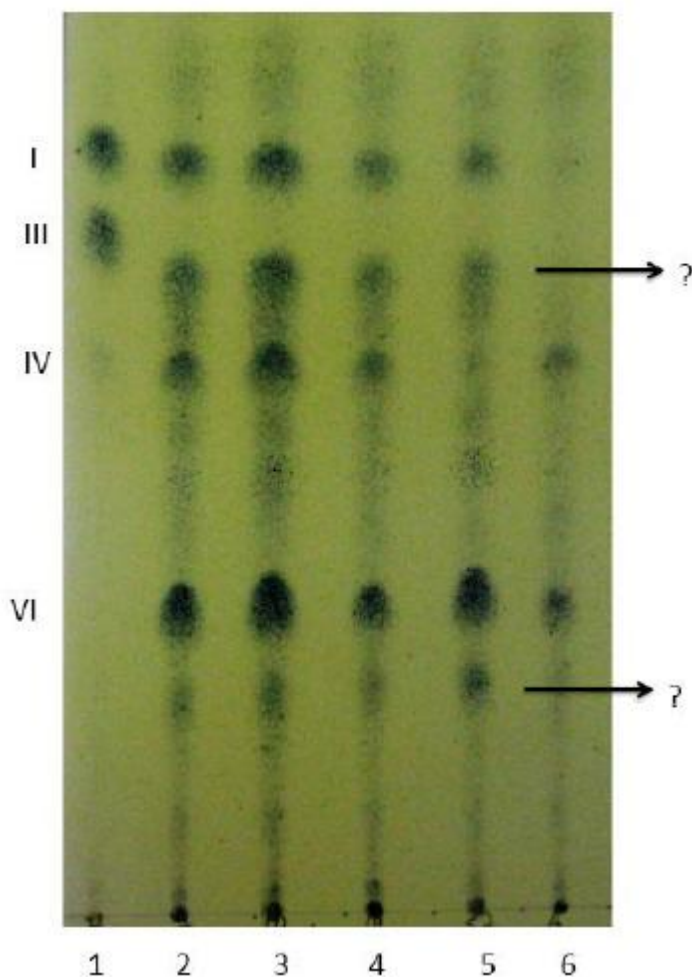
Se observa como los rendimientos en general son bajos, entre un 10 y 15% para la extracción de detritos celulares, cuando el contenido normal de lípidos de membrana especialmente ácidos micólicos puede llegar a representar hasta un 40% en base seca (Alcaide F, 2006) del peso celular micobacteriano.

7.2.1 Análisis de ácidos micólicos por cromatografía en capa delgada

El análisis de AM por TLC acompañada de diferentes técnicas moleculares, aun constituye una técnica eficiente como uno de los primeros pasos en la identificación de aislados micobacterianos a nivel clínico y ambiental (Luquin MA, 1991) (Jordao J, 2009).

En el presente estudio se evaluó el perfil de AM de *M. colombiense* por esta técnica como primer paso en su caracterización. El perfil de AM en TLC para *M. colombiense* se presenta en la figura 7-13, comparado frente al de *M. avium* 104 quien posee ácidos micólicos tipo I (α -micolatos), IV (cetmicolatos) y VI (carboximicolatos) y *M. tuberculosis* H37Rv quien posee ácidos micólicos tipo I, III (metoximicolatos) y IV

Figura 7-13. Perfil de AM para *M. colombiense*: 1: *M. tuberculosis* H37Rv, 2: *M. colombiense* 6B, 3: *M. colombiense* CECT 3035, 4: *M. colombiense* 19B, 5: *M. colombiense* 57B, 6: *M. avium* 104

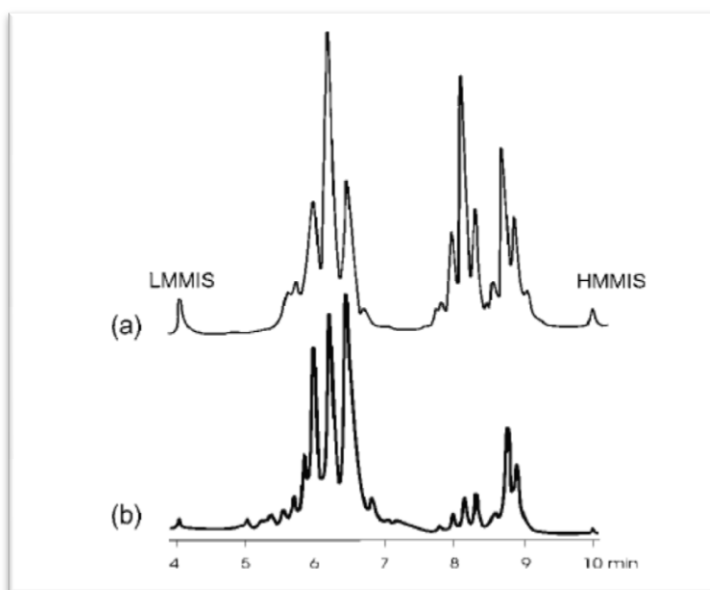


Se observa como *M. colombiense* posee los ácidos micólicos característicos del complejo MAC, (I, IV, y VI) pero además presenta dos ácidos micólicos adicionales el primero (a quien se nombrara como III') y menos polar, con una polaridad intermedia entre los AM tipo III y IV, y el segundo aún mas polar que el carboximicolato, (quien se nombrará como VI'), ambos corresponderían a AM oxigenados teniendo en cuenta que están por debajo del AM III que es el primer AM oxigenado.

Aunque hasta el momento respecto a los ácidos micólicos de *M. colombiense* solo se conocía que diferían en el perfil por HPLC (figura 7-14) respecto al de *M. avium*, donde de acuerdo al cromatograma se observa que lo que está cambiando es la altura de los

picos, pero los tiempos de retención se mantienen, por lo que se podría decir que lo que cambia es la proporción de ácidos micólicos en las dos especies, sin embargo no se identifican nuevos compuestos, los cuales podrían estar por fuera del intervalo de tiempo seleccionado en el método por HPLC.

Figura 7-14. Perfil de ácidos micólicos por HPLC para *M. avium* (a) y *M. colombiense* (b). LMMIS: estandar interno menor de masa molecular. HMMIS: Estandar interno mayor de masa molecular. (Murcia M., 2006)



A parte de los AM convencionales, también ha sido reportado un ω -metoxymicolato (Luquin ML, 1991) caracterizado por tener un grupo metoxi en la posición ω -1 (en lugar de ω -17 o 18 como en los AM metoximicolatos (tipo III), quien en un sistema compuesto por sílica como fase estacionaria y hexano : éter (85:15) (como el empleado en este estudio) como fase móvil presenta un desplazamiento cromatográfico mayor a los AM tipo VI y menor que el tipo V. Por lo que bajo las condiciones del ensayo no podría ser ni el tipo III' ni VI' presentes en *M. colombiense*.

Por lo tanto de acuerdo con el perfil obtenido es probable que éstos AM III' y VI' sean específicos para esta nueva especie, es decir que estos AM podrían tener utilidad

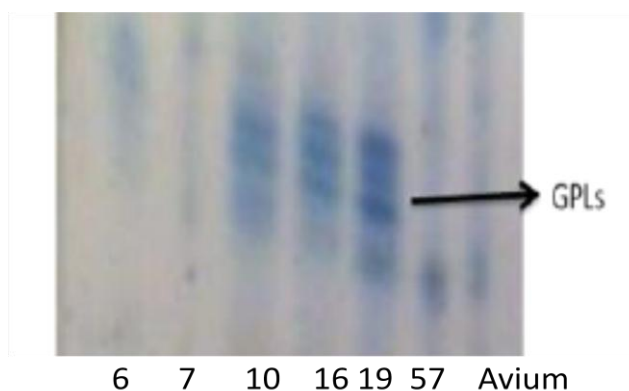
potencial en la identificación específica a *M. colombiense* entre otras micobacterias, a través de TLC.

Para definir esto hace falta hacer la caracterización estructural de estos AM para determinar tanto el tamaño como las funciones químicas presentes.

7.2.2 Análisis de GPL por cromatografía en capa delgada

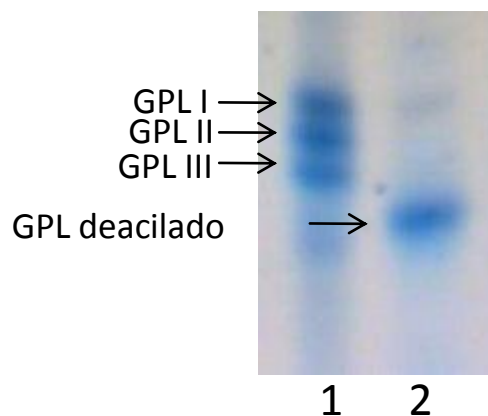
El análisis de GPL por cromatografía en capa delgada mostró como no todas las cepas de *M. colombiense* presentan el mismo perfil de GPLs. Se observa la presencia de un nuevo grupo de GPL presentes en las cepas 6, CECT 3035, 16 y 19B de *M. colombiense*, presentando factores de retención de 0.70 y 0.73 y 0.76 respecto a *M. avium* 104 ausentes en las cepas 7 y 57B, (figura 7-15),

Figura 7-15. Perfil de GPL de *M. colombiense* por cromatografía en capa delgada. Cepas 6, 7, 10, 16, 19 y 57 pertenecen a *M. colombiense*



Posteriormente se procedió hacer una deacilación tomando como cepa de trabajo *M. colombiense* 19 B por poseer los 3 GPL, para eliminar el ácido graso esterificado por el extremo N terminal del tetrapéptido. La figura 7-16 presenta el perfil de GPL para *M. colombiense* nativo y deacilado.

Figura 7-16. GPL nativo y deacilado para *M. colombiense* 19B. Línea 1 GPL sin deacilar, Línea 2 GPL deacilados



Aunque existen 3 GPL nuevos para *M. colombiense*, cuando se hace la deacilación tan solo se observa una sola banda, lo cual quiere decir que el producto de deacilación de los 3 GPL es el mismo, luego la diferencia entre los tres podría radicar principalmente en el tamaño del grupo acilo unido al tetrapéptido y que sería el responsable de la diferente movilidad cromatográfica de los tres GPL. El resto de la molécula específicamente el polisacárido hapténico quien es el que le confiere antigenicidad al GPL podría ser el mismo en los tres casos.

El hecho que exista una expresión diferencial de GPL en *M. colombiense* respecto a los miembros del complejo MAC podría ser una herramienta adicional en la diferenciación e identificación de esta especie, sin embargo es necesario adelantar más estudios para comprobar esta hipótesis.

Teniendo en cuenta que el contenido de GPL pueden actuar como un factor de virulencia (Torrelles JB, 2002), se puede decir que existe una variación en el carácter virulento dentro de la misma especie. Para demostrarlo en el futuro se deben realizar estudios comparativos de virulencia en modelo animal y celular con mutantes de *M. colombiense* en la biosíntesis de estos glicolípidos.

8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusiones

- De los 5 marcadores genómicos previamente identificados por PCR-RAPD identificados como F1, F2, F3, F4 Y F5, se seleccionó F4 por demostrar ser específico para *M. colombiense* en las 6 cepas de estudio.
- A partir del fragmento F4 se desarrolló el juego de primers J3, quienes amplifican de manera específica un fragmento de 634 pb en el genoma de las 6 cepas de *M. colombiense* pero no en el de las 25 micobacterias empleadas como control, por lo que la secuencia del fragmento amplificado podría servir como un posible marcador molecular útil en la identificación de esta especie dentro del MAC
- La secuencia del fragmento amplificado por los primers J3 hace parte de una proteína hipotética para *M. colombiense* identificada como EGT88130.1, sin embargo de acuerdo con el análisis bioinformático esta proteína carece de sitios activos, dominios funcionales o una estructura que revele realmente su naturaleza o identidad, lo que la hace muy interesante para conocer su verdadero papel en la biología de *M. colombiense*.
- Se determinó el perfil de ácidos micólicos para *M. colombiense* respecto al de *M. avium* 104, observándose que *M. colombiense* presenta 2 ácidos micólicos nuevos denominados como III' y VI' en función del ácido micólico que los precede, quienes a través de cromatografía en capa delgada podrían ser empleados como marcadores lipídicos útiles en la identificación de *M. colombiense*.

- Se comparó el perfil de GPL entre *M. colombiense* y *M. avium* 104 empleado como control, observándose que *M. colombiense* presenta un patrón variante entre las cepas de GPL, donde *M. colombiense* CECT 3035, 6, 16 y 19B presentan 2 y 3 GPL nuevos respecto a los de *M. avium*, mientras que *M. colombiense* 7 y 57B carecen de los mismos. La presencia de estos GPL podrían ser importantes en la biología de *M. colombiense*, así como de potencial utilidad en el diseño de un método diagnóstico para la identificación de esta especie

8.2 Recomendaciones

- Es indispensable aumentar el número de controles empleados en la evaluación del marcador genómico desarrollado, ya que aunque se emplearon 25 especies diferentes, actualmente el número de especies micobacterianas supera los 150, por lo que un número mayor de controles permitiría evaluar de un modo más seguro la selectividad y reproducibilidad del método.
- Es necesario determinar las características estructurales tanto de los AM como de los GPL nuevos presentes en esta especie, lo cual incluye determinar específicamente la composición de los sustituyentes presentes en los ácidos micólicos, así como su posición dentro de la molécula. En el caso de los GPL es necesario determinar la identidad de los monosacáridos que componen el oligosacárido hapténico, la secuencia en la cual se hayan unidos, así como su estereoisomería, para lo cual son necesarios ensayos de caracterización tanto cromatográfica como de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.
- Es necesario evaluar la antigenicidad de los GPL presentes en *M. colombiense* y su relación con la virulencia de esta nueva especie.

A. Anexo: Secuencia nucleotídica para el fragmento F1

CTGATGCCATTTGGGTGCCAGTNCTCGCACGGCTACACGCCGCGACGTGCCAACGT
AGCGGATGCTGTCGTGACCGCATN GGCCAACGTCTGGTGATGTGAAAACCGTTGGG
ATTCAATGCCTTTGCGGCCGGCGGCCGCGTCTCCGGTCATCTCGGGACAACGCCG
GCAATCGAACCACGCGGGGGCGTGCGCACGTTTTCGGGCCGTGCGCACGCTCTACG
CGAATTGTNCTGACCGTCGCGGTGGTTGGCGGTAAGCTAATCGCCTCACTGCGGCA
ATGCTGCAAAGTGGTTGACCCTGATACCTCGACGGTTCGGGTGGGGAATTCGTGCG
TTTTGAATCCGGCCGCTANACCTCGCCGATGACCCCGGTTGTCACTGTGACANATCG
TCTTAAGCCA

B. Anexo: Secuencia nucleotídica para el fragmento F2

CCTTTACCACACACCCTATGGGCCCTGAGACACACTCGGTCTGAACCGTGTGGAGTC
CCTCCATCTTGGTGGTGGGGTGTGGTGTGGTATTGAGTATTGGATAGTGGTTGCGAGCATC
TAGATGAACGCGTGGTCTTCATGGCCGGCGTGTTCATCGGAATGTGTAATTTCTTCT
TTGGTTTTTGTGTGCAAGTAAGTGTTTAAGGGCGCATGGTGGATGCCTTGGCATCGA
GAGCCGATGAAGGACGTGGGAGGCTGCGATATGCCTCGGGGAGCTGTCAACCGAG
CATTGATCCGAGGATTTCCGAATGGGGAAACCCAGCACGAGTGATGTCGTGTTACC
CGTATCTGAATATATAGGGTGCGGGAGGTAACGCGGGGAAGTGAAACATCCCAGTA
CCCGTAGGAGAAGAAAACAATTGTGATTCCGTGAGTAGTGGCGAGCGAACGCGGAA
CAGGCTAAACCGCGCGCATGTATAACCGGGTAGGGGTTGTGTGCGCGGTGTTGTGG
GATTGATATGTCTCAGCTCTACACTGGCTGAGGGGTAGTCAGAAAGTGTCGTGGTTA
GCAGAAGTGCCCTGGGATGGCCTGCCGTAACGGTGAGAGCCCGGTACGCGAAACC
CGTNAACTACCTTGTATCACTCCGAGTAGCAGCGGGCCCGTGGGAAAATCTGGCTG
TGAATCTGGCCGGGACCAACCGGGTAAGCCCTAAAATCANTTCTCGCATGGACCGA
TAACAGGATTCATTAACGGAAAGGAAATGGGGNAAAAGTAACCCGGGAAAGGGACG
TNAATAACTGAAACACGGNCACCAACAACGAGACAAGACACTTAGAGGGAGNAGC
GGNANACTAGAAAAGAACCAGACAGCGGNAAGCGAGGANCCAGAGGTCACAAAACA
TATCAAGGAACTGAGGAGAGGAAAAAAGAGGCGAGANCANAAGAAACAGTAGNTT
CCNTTCTGATNTNNCTCTCACCTCAGCACGCGTCNTTCAAAGAAAA

C. Anexo: Secuencia nucleotídica para el fragmento F3

GAAAATGATCCCCGCTGCTGTTGTGCTCACTAGAACCTCTCCGGGAACAGCAGGGC
GCCCCGAGGTAGAGCGCGATGACGATGGAAAGCGCCAAGCCGACCGCATTCTGG
TAGTTCACAACCGCTCGACCAACTTCTGAGCCAGGCCGAGCACGGCGAACACCGCC
ACGGTCAGCACGAGATACACCACCACGCCATCATTCTCCGTCCCGCGCCAATCA
CAGTGCATCCGAAAGGGGCCTCGGTGAGCCGGCCACAGGACGTGGTGATCGCGAG
CGCGGCCGCAGCCGGGCGCAGCGGGTCACCACCATCAAGCGACGGTCTCGCCAG
CCAAGGTCAGCTCGAAATTATCGGGACGCCATCCGCCGGGGCGTTTCGGTTGACGGT
TTCCTAACGCGCGCACGGTGCACATTTACGGTTTCTTAACACCCCCGTGCGACGGC
GTCCGGGCGGCGCCGCCCGCCCCGCCCCCGTGGCCGGCCAGGCCGAGAGATCCACCGC
GTCCGCCGATCACCTTCTGTGACAACGACTTCCACGTCTGGCGGCATCGCCGC

D. Anexo: Secuencia nucleotídica fragmento F4

CCTTTTAGGGATGACGCCGCTACGCTTTATCGATA**TTGGCAGCAAAAGCGAAC**TATT
CATGGCCACTATTGCAGAGGCCACGTCAGAATTTCTTTATCTGGCTATCCATCGAAAT
GCATAGCTTATCGCTACGTAATGCCATTATTGCGGCCTTTGAACACGCGCAAATCGA
TATCAACGAGGAAAGCCGCGAAATGATGCGCCTGGCCTCGGCCGACGAGAAGATCT
GGCGGTTTTTCTCGGCGCTACCGGGCGCATTCAACCCAAGCTTGCAGTGACTCTG
CGGTCCGCGACACCCGGGCAACAAGGCGAAGGTTTCGGCCGACGAGATGTTCTTCTA
CGGCATCGCGGCGAGCGCCCTAACAGGCGCGATTGCTACCGCATAACCGCCGGTGG
GCAGTCACGCCCGGCTCGGAATTGCCCGAACTCGTCGCGGCAGCGATTGACATCGT
TTTACCCGTACTIONTCCGACGCACGCGCCACCGAGATACCCCGCGGGCAGCTCGTCAT
AAGCAGTGAATAAATCTAACTGATTTTGCTCACGCTTCACATTTGCAGGTCATACCGT
TACTCGCCCAGCCAGACGGCAAACGCCCTAAGCCGTCCCGCGGCGATGCCACG
TATTCCGGGCGGACAACNTTGTTGGTGATTG**GCTACCAAGCGACGCTT**AATGTATA
TCCCCTTCTTCTACCTTCTGCGGGTGGTGCCCGAAAGGGGGTTCGGACCCAGCT
GCGCTCCTGGTGATTTGCGCCGCACCGGCGGGCGGGAGAATTTAACATCNCGACG
GCGGGCATACCCGTGCGACCGGGGGTGGACACTCTCACATAAATTCGGCGCCCN
CGGTGNCACCTTNGAGCACACCTGTGCTTTGGTTTTTCCAGGTGAGAGTCTGGGANG
TTACCACACACTNTGTNG

La región en amarillo corresponde a los sitios de anillamiento de los primers J3.

E. Anexo: Secuencia nucleotídica para el fragmento F5

CATTAGCGGAATAACGGGCATGTATTACGCCTTCATCAATACACATCTGACC
GCGGCGGAGGCGCTTACATCGTCGAGAACAGCAACGCCGAGGCATTGATCG
GATCGCGAGCCATGGCGTCGGTTTGCGCGGATCTGCAGACCTGGGTCAGCG
GTGGTCTTCCCGATGTGCGGTTGATCGCCGACGAGGATCTTCAGGGCTGGC
AGCGCTACCCGGATTGTGTTGCAGATCAGGCAGTCAGTGCGGTTCGCGG
AGCGTGAGGGTGAGTTGCTGCAGTACTCCCCTGGCACCAACCGGACGTCCGA
AGGGGATCAAGCGCGCACTGCAGCACACATCACCAGATCGCGCAGTCGACA
TATTGGCACCGCTGTTGGCCATCGTGGGGATCACCGGTGACTGCGTCTACC
TCAGTCCGGCTCCCCTTTATCACACCCGCACCCTCGTAGTGGTCGAGCTCGGT
GCAACGCTAGGGCGGAACGANTGTCGTGATGGAAAAGTTCGACCCGATCCA
GGCGCTGGTGTGCATCGAACGCTACCAAGTCTTCCATGCGCAATTCGTGCC
GGCGAAGTTCGTACAGAATACTCAACGTATCGGCCAACGCAGCACCTTTCAA
TACCGATATCCTCGTGCCTGCCAGCCCGATTAATCACTAGTTGAAATTCCGC
GGCCGCTTGCAGGTCGACCTATGGGAAAGTCCCCAGCGTGGGATNCNTTNG
ANTATCAAAGGCACCA

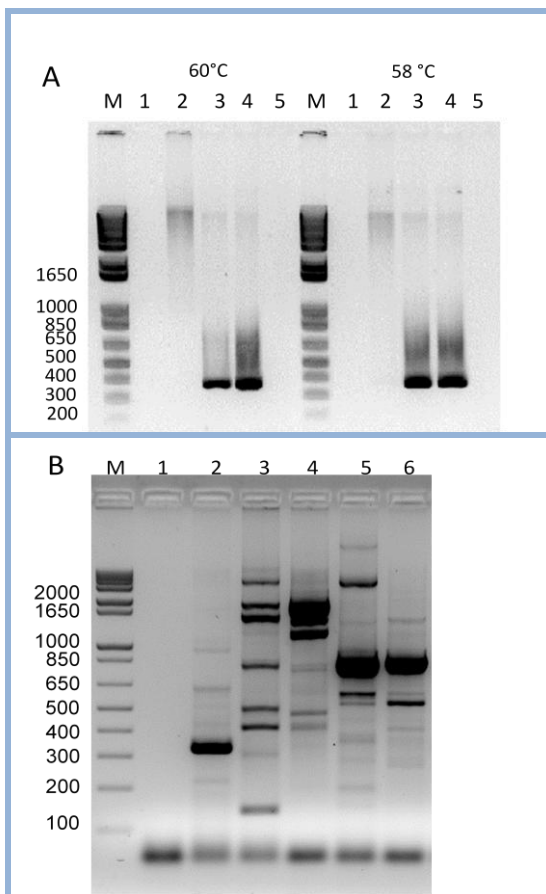
F Anexo: Secuencia proteína hipotética *M. colombiense* EGT88130.1

STVAAIAGVSPRTLRYRFGSKSELFMATIAEATSEFLYLLSIEMHSLSLRNAIIAAFEHAQIDI
NEESREMMRLASADEKIWRFFLGATGRIQPKLAVTLRSATPGQQGEGSADEMFFYDIAA
SALTGAIATAYRRWAVTPGSELPELVAAAIDIVLPILPTHAPPRYPAGSSS

La región en rojo corresponde a la seleccionada para hacer la predicción del péptido señal

G Anexo: Productos de amplificación para J2

Anexo F. Productos de amplificación para *M. colombiense* con Primer J1. A: Amplificación a 60 y 58°C. B: ampliación inespecífica a 50°C. M: Marcador de peso molecular 1kb, 1: Control negativo, 2. *M. colombiense* 6B, 3. *M. colombiense* 10B, 4. *M. colombiense* 16B, 5: *M. colombiense* 19B. 6. *M. colombiense* 57B



Al disminuir demasiado la temperatura como en B los productos de amplificación son inespecíficos, aun así no se obtiene el producto esperado para *M. colombiense* 19 y 57B

Bibliografía

Ahmad, S. (2011). Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol.* 2011, 1-17.

Alcaide F, F. (2006). Nuevos métodos de identificación de micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24,1:53 - 57.

Altschul, S. F. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3389 - 3402.

Aravindhavan V, S. S. (2007). Identification & differentiation of *Mycobacterium avium* & *M. intracellulare* by PCR- RFLP assay using the groES gene. *Indian J Med Res.* 126(6), 575 - 579.

Arnold K, B. L. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. . *Bioinformatics*, 15(22),195-201.

Asselineau J, L. G. (1998). Mycobacterial lipids: a historical perspective. *Front Biosci*,1(3) 164-74.

Astarie C, D. N. (2010). The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* , 33-41.

Banerjee R, V. P. (2011). Comparative genomics of cell envelope components in mycobacteria. *PLoS One.* 6;6(5)

Bang D, H. T. (2008). *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,58, 2398 - 2402.

Belisle, S. (1998). Isolation of genomic DNA from Mycobacteria. *Mycobacteria protocols*. En T. & Parish, *Methods in Molecular Biology* (págs. 31 - 44). London: Humana Press.

Ben Salah I, A. T. (2008). rpoB sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. *Microbiology*. 154, 3715 - 3723.

Ben Salah I., C. C. (2009). *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium boucherdurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2803 - 2808.

Benoît Zuber, M. C. (2008). Direct Visualization of the Outer Membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in Their Native State. *J. Bacteriol*, 190, 5672 - 5680.

Besra G, M. R.-H. (1993). Further Structural Definition of a New Family of Glycopeptidolipids from *Mycobacterium xenopi*. *Biochemistry*, 12(32) 347 - 355.

Blackwood, K. S. (2000). Evaluation of recA sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol*, 38(8), 2846 - 2852.

Bono M, J. T. (1995). Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Appl Environ Microbiol* , 61(1):371-3.

Brennan PJ, G. M. (1979). Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the *Mycobacterium avium*. *Mycobacterium intracellulare*. *Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex. *Mycobacterium intracellulare* serotype 9. *J Biol Chem*, (10):4205-11.

Brennan, P. y. (1995). The envelope of Mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, 15, 29 - 63.

Brosch R, G. S. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 38,3684 - 3689.

Bull TJ, S. D. (1995). Rapid identification of mycobacteria from AIDS patients by capillary electrophoretic profiling of amplified SOD gene. *Clin. Mol. Pathol*, 48(3) 124 - 132.

C D C, C. f. (1996). *Standardized Method for HPLC Identification of Mycobacteria*. Washington.

Cayrou C, T. C. (2010). Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. *Microbiology*,156(3) 687 - 694.

Chatterjee D, K. K. (2001). The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: Structures and biological properties. *Cell. Mol. Life. Sci*58(14), 2018 - 2042.

Chatterjee D, G. O. (1986). The presence of novel glucuronic Acid-containing, Type-specific Glycolipid Antigen within *Mycobacterium spp.* *J. Biol.Chem*,262(8) 3528 - 3533.

Christian Hoffmann, A. L. (2008). Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *PNAS* ,105(10) 3963 - 3967.

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

Douarre PE, C. W. (2010). Isolation and detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. *Gut Pathog.*,2(1) 2 - 9.

Esparcia O, N. F. (2008). Lymphadenopathy caused by *Mycobacterium colombiense*. *J Clin Microbiol.* 46(5), 1885 - 1887.

Eswar N, M.-R. M. (2006). Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics* , John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30.

Euzéby, J. (07 de Diciembre de 2011). *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. Recuperado el 07 de Junio de 2011, de <http://www.bacterio.cict.fr/>

Falkinham, J. O. (2004). Environmental sources of *Mycobacterium avium* linked to routes of exposure. En W. H. Organization, *Pathogenic Mycobacteria in water: A guide to public health Consequences, Monitoring and Management* (págs. 26 - 38). London: IWA publishing.

Fujiwara N, N. N. (2007). Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel N-acyl-deoxy sugar from *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway. *J Bacteriol.* **189(3)**, 1099 - 1108.

Gasteiger E, G. A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*,31(13) 3784-3788.

Gonzalez M., M. M. (2011). Genome Sequence of the *Mycobacterium colombiense* Type Strain, CECT 3035. *Journal of Bacteriology*,193(20) 5866–5867.

Guerrant G, L. M. (1981). Gas-Chromatographic Analysis of Mycolic Acid Cleavage Products in Mycobacteria. *J.Clin.Microbiol.* 13(5), 899 - 907.

Guillermo J., M. K. (2009). Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Infections: Antibiotic Treatment and Associated Costs. *Respir Med.* 103(10), 1488 - 1455.

Hastings Software Inc. (s.f.). Gene Runner. *Version 3.01* . Copyright 1994 Hastings Software Inc.

Herbst S, S. U. (2011). Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS One.* 6(5), 1 - 8.

Invitrogen. (s.f.). 1 kb plus DNA ladder. *Cat No 10787-018* .

Jackson M, G. S. (2006). Long-chain multiple methyl-branched fatty acid-containing lipids of *Mycobacterium tuberculosis*: Biosynthesis, transport, regulation and biological activities. *Tuberculosis*, 87(2) 78 - 86.

Jordao J, L. F. (2009). *Food Microbiol.* 26(6), 658 - 661.

Kaneda K, N. S. (1986). Determination of Molecular Species Composition of C80 or Longer-Chain α -Mycolic Acids in *Mycobacterium spp.* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Mass Chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*,24(6) 1060 - 1070.

Karakousis P, B. W. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiology*,6(2) 105 - 116.

- Kasai, H. T. (2000). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences. *J. Clin. Microbiol*, 38(1) 301 - 308.
- Kaur D, G. M. (2009). Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Appl Microbiol*. 69, 23 - 78.
- Khare S, F. T. (2004). Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J Clin Microbiol* , 42(3):1075-81.
- Kim, B. J. (1999). Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). *J. Clin Microbiol*,39(6) 1714 - 1720.
- L. Mederos, J. V.-G. (2008). New variants of polar glycopeptidolipids detected in *Mycobacterium simiae*, including 'habana' strains, as evidenced by electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology*,105 (2) 602 - 614.
- Leao, S. C. (1999). Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants in pig and human isolates from Brazil by PCR-restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol*, 37(8) 2592 - 2597.
- Li L., B. J. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*. *PNAS* , 102(35) 12344 - 12349.
- Lin J, W. X. (2011). Development of a novel and efficient strategy for practical identification of *Pyrus spp* (Rosaceae) cultivars using RAPD fingerprints. *Genet Mol Res*. 10(2), 932 - 942.
- Luquin MA, A. V. (1991). Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *J Clin Microbiol* . , 120 - 130.
- Luquin ML, L. A. (1991). Distribution of a Novel Mycolic Acid in Species of the Genus *Mycobacterium*. *Int.J.syst. evol.Bacteriol*. 41(3), 390 - 394.
- Miguez M, F. M. (2006). Non-tuberculous mycobacteria disease as a cause of hospitalization in HIV-infected subjects. *Int J Infect Dis*. 10(1), 47 - 55.
- Mijs W, d. H. (2002). Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium subsp. avium* for bird type isolates and "*M. avium subsp.*

hominissuis" for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. syst. Evol. Microbiol*,52(15) 1505 - 1518.

Murcia M., T. E. (2006). *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol*.56(9), 2049 - 2054.

Murcia MI, L. C. (2007). Mycobacteria HIV/AIDS association in patients attending a teaching hospital in Bogotá, Colombia. *Rev. salud pública*. 9(1), 97 - 105.

NCBI. (05 de 10 de 2010). *NCBI Protein clusters*. Recuperado el 25 de 05 de 2011, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/proteinclusters/858870>

Ngan GJ, N. L. (2011). Development of multiplex PCR assays based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria. *Lett Appl Microbiol*. 52(5), 546 - 564.

Nishiuchi Y, K. S. (2004). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of small-scale glycopeptidolipid preparations to identify serovars of *Mycobacterium avium–intracellulare* complex. *Journal of Applied Microbiology*,97(4) 738 - 748.

OMS. (2010). *Global tuberculosis control 2010*. Switzerland: WHO/HTM/TB2010.7.

Ortalo-Magné A, D. M. (1995). Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology*,141(7) 1609-20.

Pabst MJ, G. J. (1988). Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 140(2), 634-40.

Petersen TN, B. S. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* , 8:785-786.

Rodríguez J. G., F. J. (1999). Amplification of a 500 base – pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium Bovis*. *J. Clin Microbiol*,37(7), 2330 . 32332.

Sacchettini Jim, T. A. (15 de Diciembre de 2011). *web TB*. Recuperado el 17 de Enero de 2012, de <http://www.webtb.org/>

Schorey J, S. L. (2008). The Mycobacterial glycopeptidolipids: Structure,function and their role in pathogenesis. *Glicobiology*,18(11) 832 - 841.

Secanella F, L. M.-T. (2011). Revisited mycolic acid pattern of *Mycobacterium* confluens using thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography B*, 879(26), 2821 - 2826.

Shin SJ, L. B. (2010). Efficient differentiation of *Mycobacterium avium* complex species and subspecies by use of five-target multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 48(11), 4057 - 4062.

Sidoti F, B. G. (2011). Validation and standardization of IS 900 and F57 real time quantitative PCR assay for the specific detection and quatification of *Mycobacterium avium* subp *paratuberculosis*. *Can.J.Microbiol*,57(5), 347 - 354.

Sigrist CJA, C. L.-G. (2010). PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res* , 38:161-6 .

Soini, H. E. (1996). Genetic diversity among *Mycobacterium avium* complex AccuProbe-positive isolates. *J. Clin. Microbiol*,34(1) 55 - 57.

Soto, C. (2002). *Caracterización de la reacción citoquímica de Mycobacterium tuberculosis con rojo neutro. correlación con el contenido de sulfolípidos*. Barcelona.

Suffys PN, d. S. (2001). Rapid identification of Mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *J Clin Microbiol*. 39(12), 4477 - 4782.

Telenti A, M. F. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. 31(2), 175 - 178.

Thorel MF, K. M.-F. (1990). Numerical taxonomy of micobactin-dependent mycobacteria, attended description of *Mycobacterium avium*, and description of *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 40(3) 3021 - 3024.

Torrelles J., E. D. (2002). Characterization of virulence, colony morphotype and the glycopeptidolipid of *Mycobacterium avium* strain 104. *Tuberculosis* , 82(6) 293 - 300.

- Tortoli E, R. L. (2004). Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(4) , 1277 - 1285.
- Tortoli, E. M. (2003). Evaluation of INNOLiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol*, 41(9) 4418 - 4420.
- Tortoli, E. (2006). The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 48(2) 159 - 178.
- Turenne CY, W. R. (2007). *Mycobacterium avium* in the Postgenomic Era. *Clin. Microbiol rev*, 20(2), 205 - 229.
- Vergne I, D. M. (1998). Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells. *Front Biosci*. 3, 865-76.
- Vuorenmaa K, B. S. (2009). *Mycobacterium colombiense* and Pseudotuberculous Lymphadenopathy. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4) 618 - 619.
- Watanabe K, F. M. (2003). Characteristics of pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) infection in comparison with those of tuberculosis. *Respir Med*, 97(6) 654-659.
- WF., L. (1994). Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. *PCR Methods Appl*. 41(1), 31 - 37.
- whang J, L. B. (2011). Polimerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism of the rpoB gene for identification of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 70(1) 65 - 71.
- William JG, K. A. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18(22) 6531 - 6535.

Presentaciones en congresos

- ✚ First international congress Mycobacteria: A challenge for the 21st Century “Identification of genomic and lipidic markers for *Mycobacterium colombiense* differentiation from other MAC strains” Bogotá, Septiembre 24 – 27 de 2008, poster.
- ✚ XIX congreso latinoamericano y VI ecuatoriano de microbiología “Discrimination of *Mycobacterium colombiense* strains from AIDS patients by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis” Quito –Ecuador, Octubre 14 – 18 de 2008, poster

Manuscritos en preparación

Identification of a species-specific genomic fragment of
Mycobacterium colombiense and development of a simple assay for
its detection by PCR

John Leguizamón^a, Johanna Hernández^b, Martha-Isabel Murcia^b, Carlos-Yesid Soto^{a*}

Fuentes de financiación

División de Investigación Bogotá (DIB) Vicerrectoría de Investigación, Universidad Nacional de Colombia. Proyecto 6055 y 11111.