

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA DE INMUNOLOGÍA

“Estudio de la infección de aislados meníngeos de
Mycobacterium tuberculosis en células endoteliales”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA

P R E S E N T A
Q.B.P MARTHA ROCÍO CAMPOS HERNÁNDEZ

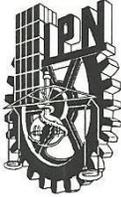
DIRECTORAS:

Dra. JULIETA LUNA HERRERA
Dra. BLANCA ESTELA GARCÍA PÉREZ



MÉXICO, D.F.

Junio 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

SIP-14 BIS

En la Ciudad de México D.F., siendo las 13:00 horas del día 22 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Estudio de la infección de aislados meníngeos de *Mycobacterium tuberculosis* en células endoteliales

Presentada por el alumno:

Campos
Apellido paterno

Hernández
materno

Martha Rocío
nombre (s)

Con registro: A090355

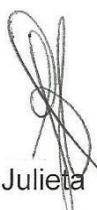
aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INMUNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes:

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dra. Julieta Luna Herrera


Dra. Blanca Estela García Pérez


Dra. María Eugenia Castro Musso


Dra. Ma. Isabel Salazar Sánchez


Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez


Dra. Aída Verónica Rodríguez Tovar

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. MANUEL JESÚS PIÑÓN LÓPEZ





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México D.F., el día 21 del mes de Junio del año 2011, el (la) que suscribe **Q.B.P. Martha Rocío Campos Hernández** alumno(a) del Programa de Maestría en Ciencias en Inmunología con número de registro **A090355**, adscrito(a) a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **Dra. Julieta Luna Herrera** y **Dra. Blanca Estela García Pérez** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Estudio de la infección de aislados meníngeos de *Mycobacterium tuberculosis* en células endoteliales**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones de correo: **julietalunah@hotmail.com** y **abrilestela@hotmail.com** respectivamente. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Dra. Julieta Luna Herrera
Director interno

Dra. Blanca Estela García Pérez
Director interno

Q.B.P. Martha Rocío Campos Hernández
Alumno



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoquímica II del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Julieta Luna Herrera y la Dra. Blanca Estela García Pérez con apoyo financiero de los proyectos SIP-20110440, SIP-20113111, SEP-2004-CO1-47496 y CONACyT SALUD 69808



Agradezco a CONACyT, al Programa Institucional de Formación de Investigadores de la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional así como al Órgano Operativo de Becas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas por el apoyo económico brindado a través de becas que me fueron otorgadas por estas instituciones para poder realizar mis estudios de posgrado.



*El fracaso es una gran oportunidad
Para empezar otra vez con más inteligencia.*

Henry Ford (1863 – 1947)

*La alegría está en la lucha, en el esfuerzo,
En el sufrimiento que supone la lucha y no en la victoria.*

Mahatma Gandhi (1869 – 1948)



AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis:

Dra. Julieta Luna Herrera por su apoyo, por permitirme formar parte de un gran equipo de trabajo, por darme la oportunidad de aprender más, por sus regaños y palabras en mis momentos más impulsivos y difíciles, por tenerme una confianza que yo misma no me tenía, y por mostrarme que si puedo hacer las cosas.

Dra. Blanca Estela García Pérez, por ser ese apoyo alterno a mi trabajo, por sus palabras y su tiempo, porque también confió en que podía hacer las cosas y mostrarme que con dedicación todo se puede.

A mi comité tutorial:

Dra. María Eugenia Castro Mussot, por su disposición para brindarme ayuda en lo técnico y anímico, por todas sus sugerencias y palabras de apoyo en los momentos difíciles.

Dra. Ma. Isabel Salazar Sánchez, por todas sus observaciones objetivas que me ayudaron y me seguirán ayudando a corregir mis errores y ser mejor persona, además de las alternativas y apoyo brindado a mi trabajo.

Dr. Ramón Coral Vázquez, por permitirme invadir su laboratorio y convivir con su equipo de investigadores, por todas sus consideraciones y apoyo para con mi trabajo y mi persona, por todo ese ánimo y sonrisas que me fueron de gran ayuda.

A Jose la cual recuerda con cariño cuando llegue por primera vez a su ventanilla, y ahora me ve hacer mis trámites finales, gracias por el apoyo con las cuestiones burocráticas, por todas tus palabras y cariño que siempre muestras a todos los alumnos, además de esa gran dedicación a tu trabajo.



DEDICATORIAS

A mi mamá la cual nunca dejó que decayera, que siempre estuvo ahí para apoyarme aun en la adversidad, la cual siempre estuvo conmigo buscando soluciones, y que estuvo día a día viviendo la maestría a mi lado, los desvelos, los tropiezos y los logros. Por su amor y apoyo sin los cuales no habría sido posible concluir este proyecto.

A mis hermanos Silvia y Felipe, y mi cuñado David, que sin sus constantes porras, bromas y palabras me habría dejado llevar por el estrés, además de mi recién llegada y muy amada sobrina Rosita, la cual llego a iluminar a mi familia, dándome otra razón para seguir adelante.

A mis tios, mi abuelita Juanita y mis primos, en especial mi tío Jesús que siempre muestra un especial interés por los temas de mi área de estudio, y por las constantes palabras de ánimo, y también a mi más que prima, mi hermana Hany y su panquecito, por toda esa alegría compartida.

A Vicky que fue mi sensei, cuando recién llegue al laboratorio para posteriormente convertirse en una gran amiga y un gran apoyo, por permitirme compartir con ella risas, lágrimas, consejos, música y banana makis.

A Dany mi gran amiga que durante este tiempo fue un torbellino de alegría y color, por su apoyo en mis momentos más tristes y más complicados, por mostrarme sus habilidades de detective secreto que nunca me dejarían perderme, por ser mi balsita, por reírse conmigo y compartir esta gran experiencia que es la maestría.

A Jorgito, Ana, Carlos Rubén y Juan, el honorable colegio de ingenieros, los cuales han sido grandes ejemplos de superación y dedicación, grandes apoyos en lo técnico y sobre todo en lo anímico, por todas esas risas y grandes momentos compartidos.

A Andy, Chivi, Eder y Charly, por ser otro ambiente de trabajo, otra fuente de conocimientos, y de alegrías, por permitirme compartir un fragmento de mi vida con ustedes.

A Oscar, por compartir conmigo un periodo de felicidad, por permitirme recordar y descubrir a fondo ese lado que a veces por las muchas ocupaciones llegamos a olvidar, y que sin embargo nos puede hacer más dulce la vida.

A mis compañeros del departamento de inmunología, tanto compañeros de generación como integrantes del laboratorio, de otros laboratorios y de otras instituciones, Neto, Luigi, Pat, Moni, Wichi, Angy, Tavo, Adriana Gutiérrez, Justine, Moi, Gina, Sonia, Yam, Elba, Fer, Mel, Chio, Liz, Janet, Octavio vicioso, Luis Gendou, Mike, Héctor, Marcela Ibarra, Nallely Torres, Martha Sánchez, Ydalia Hernández, Susana Lara, entre otros, que por cuestiones de espacio y memoria no puse, pero que me acompañaron durante el proceso, y que con sus palabras, convivencias, porras, bromas y fiestas, me hicieron más llevadero todo. Gracias.





ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL	VI
INDICE DE ABREVIATURAS	1
INDICE DE FIGURAS	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1 INTRODUCCIÓN	5
1.1 Generalidades de la tuberculosis meníngea	5
1.2 Patología de la tuberculosis meníngea	8
1.3 Infección de células no fagocíticas por micobacterias	9
1.4 Óxido nítrico (NO)	12
1.5 Producción de óxido nítrico por células no fagocíticas	15
1.6 Complejo de proteínas asociadas a la utrofina (UAPC)	18
2 JUSTIFICACIÓN	22
3 HIPÓTESIS	22
4 OBJETIVO GENERAL	23
5 OBJETIVOS PARTICULARES	23
6 MATERIAL Y MÉTODOS	24
A. Cultivo primario de células endoteliales humanas	24
B. Cepas y aislados micobacterianas	26
I. Ensayo de multiplicación intracelular determinado por UFC	27
II. Ensayo colorimétrico para la cuantificación del óxido nítrico por el método de Griess	28
III. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)	28
IV. Separación de dominios membranales por gradiente de sacarosa	29
V. Determinación del nivel de expresión de proteínas mediante western blot	30



7	RESULTADOS	31
	<i>Replicación intracelular de las diferentes cepas micobacterias en la línea celular</i>	31
	<i>Replicación intracelular de las diferentes cepas micobacterianas en el cultivo primario de células endoteliales</i>	33
	<i>Producción de óxido nítrico (NO) en las células endoteliales provenientes de línea celular y cultivo primario infectadas con micobacterias.</i>	34
	<i>Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células endoteliales provenientes de línea celular y cultivo primario infectadas con micobacterias</i>	36
	<i>Evaluación de la alteración del citoesqueleto inducido por la infección micobacteriana</i>	39
	<i>Evaluación de la movilización de la eNOS inducida por la infección micobacteriana</i>	41
	<i>Distribución y movilización de caveolina 1</i>	41
	<i>Distribución y movilización de eNOS</i>	43
	<i>Distribución y movilización de la utrofina</i>	45
	<i>Distribución y movilización de PTRF</i>	46
	<i>Determinación de la liberación de la eNOS del complejo mediante Western blot</i>	47
8	DISCUSIÓN	52
9	CONCLUSIÓN	58
10	BIBLIOGRAFÍA	59
11	APÉNDICE	67



ABREVIATURAS

AM	Aislado meníngeo
BHE	Barrera hemato-encefálica
Cav-1	Caveolina-1
cNOS	Sintasa del óxido nítrico constitutiva
CSG-SPN	Sarcoglicano-sarcospan
DAPC	Del inglés Distrophin associated protein complex
DMEM	Del inglés Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial
FAD	Flavina adenina dinucleótido
HBSS	Del inglés Hanks buffered salt solution
HUVEC	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
LCR	Líquido cefalo-raquídeo
MAB	<i>Mycobacterium abscessus</i>
MOI	Del inglés Multiplicities of infection
MSM	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NBT	Del inglés Nitroblue tetrazolium
nNOS	Sintasa del óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
OADC	Ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa
-ONOO	Peroxinitrito
PGL	Glicolípido fenólico
PTRF	Del inglés Polymerase I and transcript release factor
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SBF	Suero fetal de bovino
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
TB	Tuberculosis
UAPC	Del inglés Utrophin associated protein complex
UFC	Unidades formadoras de colonias
UTR	Utrofina
VIH	Virus de Inmunodeficiencia humana



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
1	Producción de óxido nítrico por las HUVEC infectadas con las tres cepas micobacterianas a diferentes tiempos de infección (García-Pérez <i>et al</i> , 2011)	11
2	Vía de producción del NO a través de las diferentes sintasas	13
3	Flujo de electrones durante la activación de eNOS (Förstermann, 2010)	14
4	Infección y replicación intracelular micobacteriana en células endoteliales de línea celular	32
5	Infección y replicación intracelular micobacteriana en células endoteliales de cultivo primario	33
6	Producción de NO en células provenientes de línea celular infectadas por <i>micobacterias</i>	35
7	Producción de NO en células provenientes de cultivo primario infectadas por <i>micobacterias</i>	36
8	Producción de ROS en células provenientes de línea celular infectadas por <i>micobacterias</i>	37
9	Producción de ROS en células provenientes de cultivo primario infectadas por <i>micobacterias</i>	38
10	Alteración del citoesqueleto inducido por la infección micobacteriana en células endoteliales de línea celular	39
11	Localización y modificación de caveolina-1 inducido por la infección micobacteriana en células endoteliales de línea celular y de cultivo primario	40
12	Localización y modificación de eNOS inducido por la infección micobacteriana en células endoteliales de línea celular y de cultivo primario	43
13	Localización y modificación de utrofina inducido por la infección micobacteriana en células endoteliales de línea celular y de cultivo primario	47
14	Localización y modificación de PTRF inducido por la infección micobacteriana en células endoteliales de línea celular y de cultivo primario	48
15	Determinación de la liberación de la eNOS del complejo de proteínas por la infección micobacteriana en células endoteliales de línea celular y de cultivo primario mediante Western blot	50
16	Determinación de la liberación de la eNOS del complejo de proteínas por la infección micobacteriana en células endoteliales de línea celular y de cultivo primario mediante Western blot	51



RESUMEN

La tuberculosis meníngea (TBM) es una de las formas más peligrosas de la tuberculosis. Se ha sugerido que las micobacterias causantes de los casos meníngeos presentan mecanismos peculiares de invasión. El sistema nervioso central (SNC), el cual está protegido por una lámina continua de células endoteliales, estrechamente unidas entre sí, que es conocida como barrera hemato-encefálica. Por ser las células endoteliales las primeras en estar en contacto con las micobacterias en su tránsito hacia el SNC, en el presente se trabajó se evaluó en un modelo *in vitro* de cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical de humano (HUVEC), su susceptibilidad a la infección con micobacterias de origen tanto meníngeo como pulmonar. Se encontró que los aislados de pacientes con TBM, presentaron una importante replicación intracelular, similar a la observada durante la infección con *M. abscessus* (MAB). En comparación, los aislados de origen pulmonar (TBP), infectaron a las HUVEC, sin que se diera una franca replicación o eliminación de la bacteria simulando un estado de “latencia”, este comportamiento fue similar al de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, que en el modelo murino desarrolla una patología básicamente pulmonar. El tercer modelo de estudio analizado fue el de *M. smegmatis* (MSM), micobacteria que fue infectiva para las HUVEC, sin embargo las células eliminaron a las bacterias eficientemente a partir de las 24 horas post-infección. Durante la infección con TBM, se observó una elevada producción de NO similar a la observada durante la infección con MAB; la producción de NO inducida por el aislado de TBP fue menor y fue comparable a la alcanzada con H37Rv, mientras que la infección causada por MSM fue la que menor producción de NO indujo. De forma inversa a la producción de NO, se observó la producción de los metabolitos reactivos del oxígeno (ROS); así, los aislados de TBM y MAB indujeron la menor producción de ROS, seguida de los aislados pulmonares y de H37Rv, mientras que MSM disparó la mayor producción de estos metabolitos. Otros aspectos analizados fueron la modificación del citoesqueleto y la modificación de los componentes de la caveola endotelial durante la infección por TBM y TBP. Se encontró que durante la infección con las diferentes micobacterias se presenta un rearrreglo del citoesqueleto principalmente con TBM y MAB, y en menor grado con MSM. Durante la infección con TBM y MAB se encontró una importante liberación de la sintasa endotelial (eNOS) de las caveolas al área perinuclear, y a consecuencia de la infección, la proteína PTRF no fue detectada más en la zona caveolar; las proteínas caveolina-1 y utrofina se mantuvieron asociada a las caveolas. Toda esta evidencia sugiere que los aislados de TBM provocan una importante desregulación de la célula endotelial lo que podría favorecer su tropismo hacia el SNC.



ABSTRACT

Meningeal tuberculosis (TBM) is the most dangerous tuberculosis clinical presentation. It has been suggested that those mycobacteria responsible of TBM express peculiar mechanisms responsible of central nervous system (SNC) invasion. SNC is protected by a cellular sheet strongly bound, known as hemato-encephalic barrier. Since endothelial cells are the first elements to be in contact with the mycobacteria on its way towards SNC, in this study we evaluated in a *in vitro* model of primary cell culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), some features of the infection caused by meningeal and pulmonar mycobacteria. It was found that those TBM clinical isolates were able to replicate intracellularly, similarly to the intracellular replication shown by *M. abscessus* (MAB). In comparison, those pulmonary clinical isolates infected the HUVEC but were not able to replicate or to be fully eliminated resembling a “latency stage”; these features were similar to those demonstrated by the *M. tuberculosis* H37Rv strain. This latter strain in the mouse model causes a predominant pulmonary pathology. The third model analyzed was the infection caused by *M. smegmatis* (MSM), mycobacteria that was effectively infective, but by 24 hours post-infection was also effectively eliminated by the HUVEC. During HUVEC infection with the TBM isolate, a high production of nitric oxide (NO) was observed, similarly to MAB-infection; meanwhile NO production induced by TBP was lower and comparable to those levels achieved by H37Rv infection. MSM-infection induced the lowest NO levels. Contrary to NO production, MSM-infection triggered the highest reactive oxygen species (ROS) levels followed by pulmonar and H37Rv strains, the least ROS producers were the meningeal and MAB infections. Other aspects studied where cytoskeleton and endothelial-caveole modifications during mycobacterial infections. We observed that with the different mycobacterial infections, cytoskeleton rearrangements were induced but, the greatest changes were observed during TBM and MAB infections, and in lesser extend with MSM-infection. During TBM and MAB infections an important release of endothelial nitric oxide syntase (eNOS) from the plasm membrane-caveolae to the perinuclear area was observed; the PTRF-protein was no longer detected on the caveolae zone, but caveoline-1 and utrofine proteins remained associated to the caveolae. All these results suggest that meningeal strains induced a profound de-regulation of the endothelial cell, which could be responsible of their tropism towards SNC.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la tuberculosis meníngea

La tuberculosis es un grave problema de salud pública en el mundo; una tercera parte de la población mundial está infectada por el bacilo de Koch, y se reportan nueve millones de casos nuevos y tres millones de muertes al año. El 95% de los casos y el 98% de las muertes por tuberculosis ocurren en países no industrializados. Se estima que entre el 2000 y el 2020 cerca de mil millones de personas se infectarán, 200 millones enfermarán y 35 millones morirán por esta causa (Raviglione, 2003; Arciniegas y Orjuela, 2006).

En los últimos tiempos, ha habido un resurgimiento de la tuberculosis, tanto en países desarrollados como en países en desarrollo, afectando sobre todo a la población infantil. Varios factores de riesgo han sido observados para este fenómeno. Estos incluyen el aumento de la prevalencia de la infección en pacientes con VIH, el hacinamiento de la población urbana y en comunidades, así como en prisiones, campos de concentración o colonias de refugiados, el mal estado nutricional, la aparición de cepas resistentes de tuberculosis, la ineficacia de los programas de control de la enfermedad, y un aumento en la migración desde otros países donde la tuberculosis es prevalente (Garg, 1999).

La tuberculosis extrapulmonar se produce cuando las actividades de detección, diagnóstico y tratamiento de los casos pulmonares no se realizan oportunamente. Puede afectar cualquier órgano y destruirlo si no se tratan a tiempo y, además, la condición es una gran simuladora que aparece bajo la forma de otras enfermedades; en el 80 % de los casos la presentación de la enfermedad es pulmonar, de manera extrapulmonar las formas más comunes son la pleural, la meníngea y la miliar (Fanning, 1999; Arciniegas y Orjuela, 2006). La infección por VIH ha cambiado la epidemiología, aumentando el riesgo de tuberculosis extrapulmonar y haciendo más difícil el diagnóstico oportuno por la presentación clínica atípica y la presencia de población paucibacilar (Iseman, 2000; Arciniegas y Orjuela, 2006).



La demanda de atención médica por remisión de casos de TB extrapulmonar a instituciones de tercer nivel de atención ocurre en la forma esperada, pero existen grandes deficiencias en el abordaje del diagnóstico, el inicio del tratamiento y el seguimiento (Díaz *et al.*, 2004; Arciniegas y Orjuela, 2006).

El diagnóstico de la tuberculosis del sistema nervioso central, sigue siendo un grave problema clínico. Los signos y síntomas, los resultados de los análisis de rutina del líquido cefalorraquídeo, y la radiología, son a menudo, insuficientes como guía para el inicio de la terapia empírica. En ensayos desarrollados recientemente se han encontrado los antígenos codificados por los genes en la región RD1, dando resultados prometedores para la detección latente de la infección de la tuberculosis y la tuberculosis pulmonar activa. Sin embargo, los datos sobre la utilidad de estos ensayos para el diagnóstico del SNC en la práctica clínica son limitadas, sobre todo en las regiones de alta incidencia ya que no se puede diferenciar la tuberculosis activa de la infección latente (Sung-Han *et al.*, 2008).

La mayoría de las infecciones tuberculosas del SNC son causadas por *Mycobacterium tuberculosis*. Con menor frecuencia, otras micobacterias pueden participar. Se cree que el bacilo alcanza el SNC por vía hematológica, la enfermedad secundaria ataca otras partes del cuerpo (Garg 1999). Ricos y McCordock (1933) basándose en las observaciones de casos clínicos y experimentales, sugiere que la tuberculosis del SNC se desarrolla en dos etapas: una etapa pulmonar y una etapa de diseminación por vía hematológica. Inicialmente en la infección se desarrollan pequeñas lesiones tuberculosas, en el SNC ya sea durante la fase de bacteremia primaria de la infección tuberculosa, o un poco después. Estas lesiones tuberculosas inicialmente pueden ser en las meninges, en la superficie del cerebro o la médula espinal, y pueden permanecer latentes durante años después de la infección inicial. Más tarde, la ruptura o el crecimiento de uno o más de estas pequeñas lesiones tuberculosas producen el desarrollo de diversos tipos de tuberculosis meníngea. El estímulo específico para la ruptura o el crecimiento de los focos no es aun conocido, aunque los mecanismos inmunológicos, desempeñan un papel



importante. El tipo y el alcance de las lesiones que resultan de la detección del bacilo tuberculoso en líquido cefalorraquídeo (LCR), dependerá del número y la virulencia de los bacilos, así como la respuesta inmune del hospedero (Garg, 1999).

El SNC está protegido por la barrera hemato-encefálica (BHE), que es una estructura compleja constituida por células endoteliales de la red capilar del sistema nervioso central. Además, participan funcionalmente los pericitos, la lámina basal abluminal, los astrocitos perivasculares y la microglia. El endotelio de los capilares cerebrales se caracteriza porque cada borde celular está íntimamente unido a la célula adyacente que hace impermeable a la pared interna del capilar. La BHE regula y restringe el acceso al parénquima nervioso de múltiples sustancias y moléculas que circulan en la sangre, para mantener la homeostasis del microambiente químico del SNC (Escobar y Gómez-González, 2008; Rubin y Staddon, 1999; Jane *et al.*, 2006).

El sellado del endotelio se asocia a tres proteínas: claudina, ocludina y moléculas de adhesión de la unión, y a otras proteínas citoplasmáticas accesorias, tales como ZO1, ZO2, ZO3 y cingulina. Otras moléculas importantes son la actina y las claudinas ya que son importantes para la unión estrecha intercelular, en específico las claudinas -1 y -5. (Escobar y Gómez-González, 2008; Tsukita y Furuse, 1999)

Las funciones de la BHE implican: proteger al cerebro de los compuestos y las moléculas circulantes en al corriente sanguínea gracia a las bien consolidadas uniones estrechas del endotelio de los capilares cerebrales, lo cual permite que solo las sustancias esenciales crucen; transporte selectivo desde la red capilar al parénquima cerebral, por medio de cuatro vías diferentes: penetración por caveolas y transcitosis, difusión transmembranal, mecanismos de acarreo y transportadores y transporte por vía retrógrada de flujo axónico que elude la BHE; metabolismo y modificación de elementos de la sangre hacia tejido nervioso y viceversa (Escobar y Gómez-González, 2008; Rissaud W, 1990).

La integridad de la BHE está sujeta a la acción de múltiples sustancias que pueden modificar o destruir la integridad anatómica y funcional de la BHE y llevarla al estado que se denomina apertura de la BHE. Se conocen mediadores químicos que se liberan en



condiciones patológicas y que tienden a aumentar la permeabilidad de la BHE como el TNF- α , MIP-2, IL-1 β , óxido nítrico (NO), ATP, endotelina-1, glutamato, aspartato, taurina, entre otros (Ballabh *et al*, 2004).

Se cree que *Mycobacterium tuberculosis* prolifera en secciones de esta barrera, lo que conduce al desarrollo de tuberculomas en el parénquima meníngeo. La meningitis tuberculosa se desarrolla, cuando las micobacterias se liberan en el espacio subaracnoideo por caseación de estos tuberculomas (Donald *et al.*, 2005; Jane *et al.*, 2006). Es evidente que *M. tuberculosis* invade el SNC, pero los mecanismos del hospedero y del microorganismo que participan en este proceso son poco conocidos. En teoría, *M. tuberculosis* puede cruzar la barrera hemato-encefálica de manera libre (extracelular) o a través de monocitos/neutrófilos infectados (Jane *et al.*, 2006).

Un estudio de los parámetros inmunológicos mostraron una correlación entre el desarrollo de la meningitis tuberculosa en niños y un número significativamente menor de linfocitos T CD4, comparado con los niños que solo cursaron con el complejo pulmonar primario (Garg, 1999). b

1.2 Patología de la Tuberculosis Meníngea

La patología de la meningitis tuberculosa se caracteriza por presentar un exudado denso gelatinoso alrededor de la fisura de Silvio, las cisternas basales, el tronco cerebral y el cerebelo. La hidrocefalia puede ocurrir como consecuencia de la obstrucción de las cisternas basales, la salida del cuarto ventrículo, o la oclusión del conducto cerebral. La hidrocefalia se desarrolla con frecuencia en los niños y se asocia con un mal pronóstico. El tejido cerebral subyacente a la tuberculosis inmediatamente muestra un exudado en distintos grados de edema, hay infiltración perivascular y microglial por un proceso conocido como “Zona fronteriza de reacción”. El exudado basal de la tuberculosis es normalmente más grave cerca del círculo de Willis, y produce un síndrome como la vasculitis. Se pueden observar cambios en la pared del vaso por procesos inflamatorios, y



la luz de los vasos puede ser reducida u ocluida por la formación de trombos. Los vasos en la base del cerebro son los más gravemente afectados, incluyendo la arteria carótida interna, la arteria cerebral media proximal, y los vasos del ganglio basal. Los infartos cerebrales son más comunes en toda la fisura de Silvio y en el ganglio basal. (Garg, 1999)

1.3 Infección de células no fagocíticas por *Micobacterias*

Debido a que las células endoteliales están presentes en la BHE y en los vasos sanguíneos, constituyen una de las primeras líneas de contacto con el flujo sanguíneo y por lo tanto con las micobacterias presentes en dicho flujo, por lo cual fue necesario estudiar su participación en la diseminación de estos microorganismos.

Hernández-Pando y col., seleccionaron tres aislados clínicos identificados como *M. tuberculosis* y obtenidos a partir de líquido cefalorraquídeo de pacientes con tuberculosis meníngea. *M. tuberculosis* aisladas del líquido y las usaron para infectar ratones BALB/c intracranealmente. Estas cepas mostraron un patrón distintivo. El curso de la infección en cuanto a virulencia de la cepa (supervivencia de los ratones, carga bacilar en los pulmones), la distribución del bacilo, la infección extrapulmonar (la carga del bacilo en sangre, cerebro, hígado, riñón y bazo), así como la respuesta inmune desarrollada (expresión de citocinas determinada por PCR en tiempo real en cerebro y pulmones) fueron analizados y comparados con la infección inducida por la cepa de referencia H37Rv. Observaron que los aislados clínicos difundieron ampliamente a través de la vía hematológica infectando el cerebro, produciendo inflamación en el parénquima cerebral y meninges, mientras que H37Rv, presentó una eficacia muy limitada para infectar el cerebro. Este trabajo es uno de los pocos en señalar la patología causada por aislados meníngeos en un modelo de ratón (Hernández-Pando *et al.*, 2010).

Varios estudios epidemiológicos han sugerido que ciertos genotipos de bacterias están relacionados con la tuberculosis meníngea, sin embargo, este estudio es el primero que demuestra esta asociación en un modelo animal. Además estas variedades corresponden al linaje Euro-Americano, que recientemente fue informado como causantes de



tuberculosis meníngea/pulmonar, debido a la falta de PKS 15/1 (Caws *et al.*, 2008; Hernández-Pando *et al.*, 2010). El gen PKS participa en la producción de glicolípido fenólico (PGL), que inhibe la respuesta inmune innata y puede ser responsable de la difusión y por lo tanto infección del SNC (Reed *et al.*, 2004; Hernández-Pando *et al.*, 2010). Estos aislados euro-americano son incapaces de expresar PGL, sin embargo, en el cerebro se produce de manera eficaz la infección, lo que sugiere que otras moléculas micobacterianas participan en este proceso. Se considera a la HBHA (adhesina de unión a heparina) como un buen candidato, ya que induce una rápida re-organización de la red de filamentos de actina y aunque no interrumpe las uniones celulares, se ha demostrado que induce un mecanismo de transcitosis el cual puede ser responsable de la diseminación extrapulmonar. (Menozzi *et al.*, 2006; Hernández-Pando *et al.*, 2010).

Recientemente, un modelo in vitro usando células endoteliales del cerebro humano mostró que *M. tuberculosis* H37Rv pueden invadir y atravesar la monocapa de células endoteliales, la invasión provocó reordenamientos del citoesqueleto, y por microensayos se determinó el perfil de expresión genética, en donde se encontró la sobreexpresión de 33 genes relacionados a la invasión de *M. tuberculosis* a esta estirpe celular y mutantes de 4 de estos genes mostraron una disminución en la invasión micobacteriana (Jain *et al.*, 2006).

En estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, se han demostrado los mecanismos de interiorización de micobacterias, patógenas y no patógenas a células epiteliales, así como las modificaciones que sufre el citoesqueleto en estas células al interiorizar a la micobacteria y se ha sugerido a la macropinocitosis como el mecanismo responsable de la endocitosis de la bacteria (García-Pérez *et al.*, 2003; García-Pérez *et al.*, 2008).

Posteriormente, García-Pérez *et al.* (2011), utilizando cultivos primarios de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC), analizaron el proceso de infección por micobacterias de diferente virulencia y la producción de óxido nítrico (NO). Encontraron que tres cepas de micobacterias son capaces de infectar a las HUVEC, pero de manera diferencial, *M. smegmatis* que es una micobacteria no tuberculosa y no patógena fue la



que mostró la menor capacidad infectiva, siendo eliminada eficientemente por las células; *M. abscessus* que es una micobacteria no tuberculosa pero patógena mostró la mayor eficiencia de infección y multiplicación intracelular, mientras que *M. tuberculosis*, cepa de referencia H37Rv bacteria tuberculosa y patógena no se multiplicó intracelularmente pero tampoco fue eliminada, manteniéndose viable durante todo el tiempo del ensayo. Con respecto a la producción de NO por las HUVEC, este metabolito se produjo de manera diferencial durante la infección con las diferentes micobacterias, siendo *M. smegmatis* quien indujo una producción discreta y sostenida de NO durante el tiempo de infección, *M. abscessus* indujo la mayor producción de NO la cual alcanzó un máximo y cesó rápidamente, y *M. tuberculosis*, indujo una producción importante de NO (aunque no tan alta como *M. abscessus*) la cual después de un tiempo fue decayendo (Figura 1).

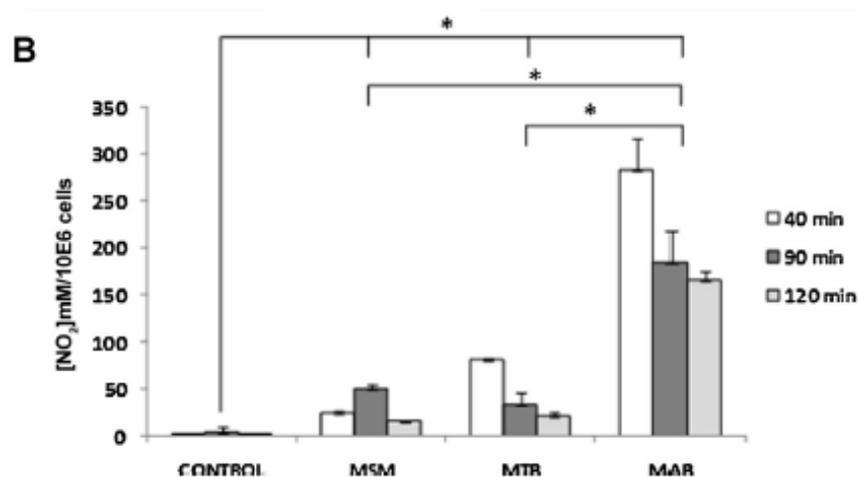


Figura 1. Producción de óxido nítrico por las HUVEC infectadas con las tres cepas micobacterianas a diferentes tiempos de infección (García-Pérez *et al*, 2011)

La inducción temprana de NO y su pronta disminución parece ser una característica distintiva de las micobacterias patógenas. Esta evidencia sugiere que la modulación ejercida por las micobacterias sobre los mecanismos de eliminación exhibidos por las células endoteliales repercute en su sobrevivencia o en su eliminación intracelular.



1.4 Óxido nítrico (NO)

El Óxido nítrico es un radical libre inorgánico gaseoso, de fórmula $N=O$ (abreviado como NO). Se descubrió en 1978-1988 en las células endoteliales vasculares, las cuales tienen la capacidad de sintetizar NO desde L-arginina por medio de una señal transcelular (Knowles y Moncada, 1994).

El óxido nítrico era considerado un destacado mediador fisiológico, cuando se demostró que era idéntico al factor de relajación derivado del endotelio, pero se ha demostrado que ésta es sólo una de sus funciones ya que también participa en los mecanismos de transducción, neurotransmisión, citotoxicidad y de defensa (Barnes, 1993).

El óxido nítrico es producido por una enzima llamada sintasa del óxido nítrico (NOS), la cual es una oxidoreductasa y presenta 3 isoformas, las cuales son codificadas por diferentes genes, dos de ellas son constitutivas la NOS 1 o neuronal, debido a que fue la primera en ser descrita y la NOS 3 o endotelial, estas son reguladas por calmodulina, la NOS 2 es inducible, y su regulación es de manera postraduccional (Majano *et al.*, 1997).

La NOS 1 o nNOS o neuronal, produce NO en tejido nervioso, tanto central como periférico, además del músculo esquelético tipo II, realiza un papel en la comunicación celular y se asocia con la membrana plasmática. La acción de nNOS puede ser inhibida específicamente por 7-nitroindazol.

La NOS 2 o iNOS o inducible, presenta una interacción no covalente con calmodulina, por lo que su activación es dependiente de NF- κ B, de esta manera su transcripción es mediada por inflamación. Es una enzima de alto rendimiento, ya que es mil veces más eficiente que las sintasas constitutivas, por lo que los altos niveles de NO tienen la oportunidad de reaccionar con iones superóxido que conducen a la formación de peroxinitritos y toxicidad celular.

La NOS 3 o eNOS o endotelial, genera óxido nítrico en los vasos sanguíneos y está involucrada con la regulación de la función vascular, es dependiente de calmodulina/ Ca^{2+}



y proporciona una liberación basal de NO (Gusarov *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 1997) (Figura 2).

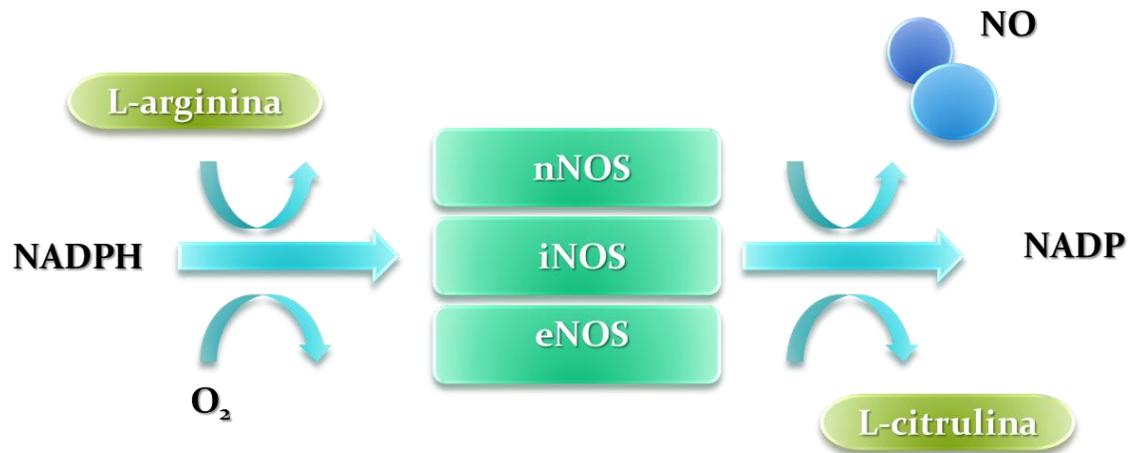


Figura 2. Vía de producción del NO a través de las diferentes sintasas.

Las NOS pueden ser un dímero, calmodulina dependiente ó una hemoproteína tipo citocromo p450 conteniendo calmodulina en combinación con dominios catalíticos reductasa y oxigenasa en un dímero, portando flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleotido (FMN), y lleva a cabo una oxidación 5' de una arginina con la ayuda de tetrahidrobiopterina.

Las tres isoformas funcionan como un homodímero, durante la activación comparten un dominio reductasa carboxilo terminal homólogo a la citocromo p450 reductasa. También comparten un dominio oxigenasa amino terminal, que incluye un grupo prostético hemo, que está vinculado en el centro de la proteína a un dominio de unión a calmodulina. La unión de la calmodulina parece actuar como un interruptor molecular permitiendo el flujo de electrones a través de los grupos prostéticos de flavina, del domino reductasa al hemo. Esto facilita la conversión de O₂ y L-arginina a NO y L-citrulina. El dominio oxigenasa de cada isoforma también contiene un grupo prostético tetrahidrobiopterina (BH₄), que se requiere para la generación eficiente de NO. A diferencia de otras enzimas

donde BH4 se utiliza como fuente de equivalentes de reducción y reciclado por dihidrobiopterina reductasa, BH4 activa el hemo unido al O2 donando un único electrón, que luego se recaptura para permitir la liberación de óxido nítrico. (Försterman, 2010)

La regulación de ésta enzima se ha demostrado que puede darse por el propio NO sobre todo sobre la isoforma endotelial y por consiguiente regular las funciones vasculares en las células endoteliales. Este proceso es mayormente conocido como S-nitrosación, en donde se inhibe de forma reversible la actividad de eNOS, éste proceso es importante ya que está siendo regulado por las condiciones redox de la célula y por tanto, puede proporcionar un mecanismo para la asociación entre el estrés oxidativo y la disfunción endotelial (Figura 3).

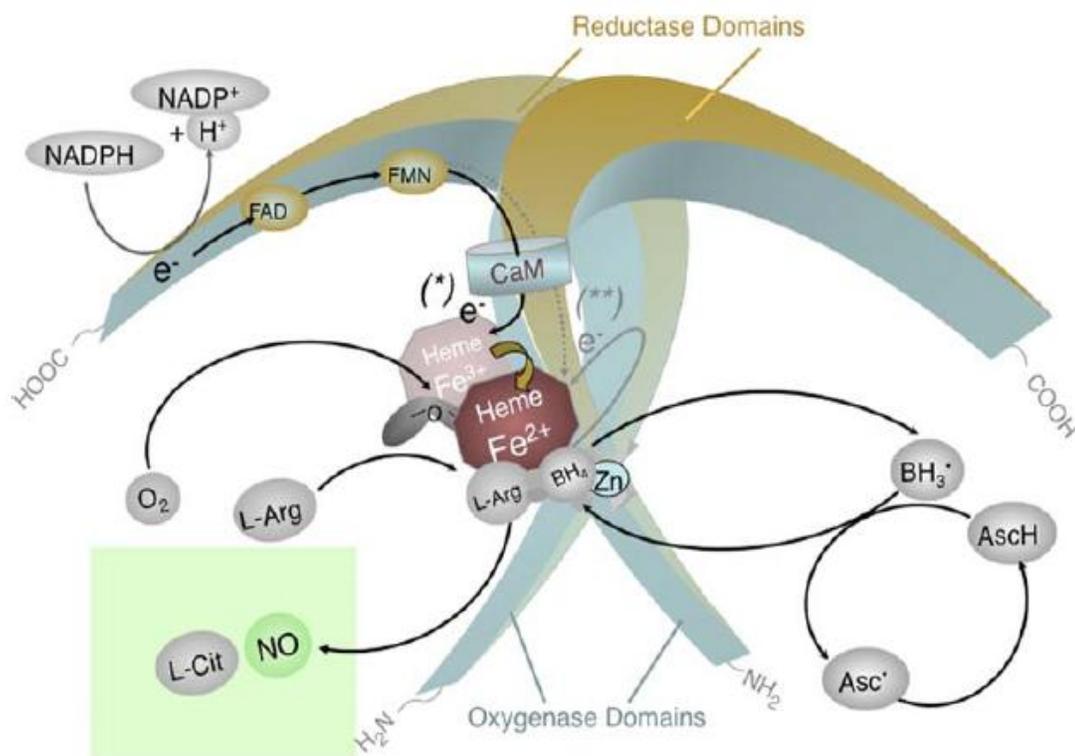


Figura 3. Flujo de electrones durante la activación de eNOS (Förstermann, 2010)

Las diversas funciones del óxido nítrico son de relevante importancia, sin embargo la presencia de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), dentro de la mayoría de las células, sobre todo en macrófagos y neutrófilos humanos genera un papel de vital importancia



como un poderoso sistema antimicrobiano. La iNOS se expresa después de la exposición a ciertas citocinas y endotoxinas, esta forma no requiere de la calmodulina ya que se expresa conjuntamente y su regulación es a nivel transcripcional, por lo tanto no es modulada por ésta (Kwan, 1997).

La actividad antimicrobiana no se puede dar contra microorganismos que invaden el citosol; por lo tanto, no sorprende que la mayoría de las células fagocíticas que son infectadas estén dotadas de iNOS. Esta enzima se asemeja a la NADPH oxidasa en su estructura y puede ser inhibida por el análogo de arginina *N*-monometil- L-arginina (L-NMMA). La combinación de NO con anión superóxido produce el muy tóxico radical peroxinitrito (ONOO), que se escinde al aceptar un protón y forma moléculas reactivas como el radical hidroxilo (OH) y NO₂ (Figuras 2 y 3). El NO puede formar complejos mononucleares ditioldinitrosos, lo que trae como consecuencia el agotamiento de los depósitos de hierro y la inhibición de varias enzimas de los microorganismos (Roitt, 2001).

También el NO puede asociarse a daño de membranas y esta acción se ha demostrado con el peroxinitrito. Este compuesto media la peroxidación lípidica de las preparaciones liposomales a través de un mecanismo que no requiere hierro. Un estudio mostró que el NO ejerce efectos inmunomoduladores sobre la adherencia y función celular, la proliferación celular y la producción de citocinas (Wei *et al.*, 1995).

1.5 Producción de óxido nítrico por células no fagocíticas

Debido a su bajo peso molecular (30 Da) y a su naturaleza hidrofóbica, el óxido nítrico (NO) difunde rápidamente a través de las membranas y las paredes celulares de bacterias y hongos, en donde desempeña diversas funciones fisiológicas, dentro de las que sobresale la regulación del tono vascular, la neurotransmisión, la citotoxicidad celular y la actividad antimicrobiana (Kirsch, 2003). La formación de NO en células del endotelio vascular regula el tono vasodilatador que es esencial para la regulación del flujo y la



presión sanguínea. El NO producido por el endotelio y las plaquetas inhibe la agregación plaquetaria y modula la proliferación del músculo liso (Michel *et al.*, 1993), además la producción alterada de NO está involucrada en diversas situaciones como la inflamación aguda y crónica, la aterosclerosis, la glomerulonefritis y el daño renal (Ignarro, 1999). Las acciones tisulares del NO pueden ser directas a través de la oxidación de grupos tiol en residuos de cisteína, transnitrosilación de grupos funcionales, etc., o pueden estar mediadas por segundos mensajeros como el AMPc. El NO interacciona con el centro Fe-S de la aconitasa o de algunas enzimas de la cadena mitocondrial de transporte de electrones como la NADH-oxidoreductasa o succinato-oxidoreductasa, alterando el metabolismo energético y la respiración celular (Castro, 1994). También actúa sobre la ribonucleótido reductasa inhibiendo la replicación celular.

El NO es un compuesto altamente bactericida para lo cual reacciona con el anión superóxido y forman el anión peroxinitrito (Beckman, 1991). El peroxinitrito produce la oxidación de tioles, la nitración de aminoácidos aromáticos de péptidos y proteínas y contribuye al daño oxidativo del DNA y lípidos (Radi, 1991). En el caso de la tuberculosis el NO puede eliminar de manera indirecta a la micobacteria, induciendo la apoptosis de macrófagos infectados y la muerte micobacteriana (Chan, 2001). De esta manera el NO constituye un factor fisiológico o patológico dependiendo de la magnitud y duración de su síntesis. Las acciones fisiológicas son mediadas por ligeros incrementos (generalmente por activación de las óxido nítrico sintasas constitutivas, mientras que las actividades patológicas son el resultado de la producción continua de altos niveles de NO, generalmente mediante la activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Esta actividad se encuentra principalmente en macrófagos estando implicada en la destrucción de parásitos y bacterias (Lowestein, 1994).

La síntesis de NO es catalizada por las óxido nítrico sintasas, una familia de tres isoformas con variantes de splicing alternativo. La NOS neuronal (nNOS) y la NOS endotelial (eNOS) son consideradas constitutivas y su actividad es regulada principalmente post-transduccionalmente. Las isoformas de las NOSs catalizan la conversión dependiente de



NADPH y oxígeno molecular de la L-arginina a L-citrulina y NO (Nathan y Hibbs, 1994). La isoforma NOS inducible (iNOS) es expresada en varios tipos celulares, que incluyen macrófagos y células del músculo liso vascular en respuesta a ciertos estímulos por citocinas o productos bacterianos (Jansen, 1994). De las tres isoformas de las NOS, la iNOS es expresada con calmodulina estrechamente unida (Paine, 2000) y la regulación de su actividad es a nivel transcripcional por endotoxinas y citocinas (interferon gamma, TNFalfa e IL-1beta) en macrófagos, hepatocitos y células de músculo liso vascular; las actividades de la eNOS y la nNOS son reguladas por la unión de calmodulina, la cual a su vez es controlada por los niveles de calcio intracelular inducidos por agonistas (Garthwaite 1998). Las enzimas constitutivas son sensibles a quelantes de Ca y a inhibidores de la calmodulina y son sintetizadas en forma continua. Los productos finales del metabolismo del NO son los nitritos y nitratos. Estas moléculas son poco reactivas, estables, tienden a acumularse en los sistemas biológicos que generan NO y son utilizadas como índice cuantitativo de la síntesis del NO (Granger, 1995). El NO regula la captura del oxígeno y promueve la liberación de H₂O₂ por la mitocondria (Koivisto, 1997). Sin embargo, en conjunto con especies reactivas del oxígeno (ROS), el NO puede ser transformado en una entidad citotóxica de significancia pato-fisiológica, el peroxinitrito.

En un estudio reciente se demostró que las células endoteliales a causa de estrés fisiológico producen H₂O₂ (Coyle y Kader, 2007).

Tres hechos recientemente reconocidos añaden complejidad a las interacciones mitocondriales entre las ROS y el NO: el primero, el NO inhibe la actividad de la succinato-citocromo C reductasa e incrementa la producción de anión superóxido en mitocondrias aisladas (Koivisto, 1997). Segundo, la óxido nítrico mitocondrial (mNOS) unida a la membrana genera NO a velocidades de producción del anión superóxido (Giulivi, 1998). Tercero, al igual que la nNOS, en ausencia de L-arginina, la mNOS genera anión superóxido y peróxido de hidrógeno; el H₂O₂ puede provenir de la dismutación del anión superóxido o de la formación directa por la mNOS (Tatoyan, 1998).



1.6 Complejo de Proteínas Asociadas a la Utrofina (UAPC)

Además de que la oxido nítrico sintasa puede estar en forma inducible (iNOS o NOS2), también puede estar presente de manera constitutiva (cNOS). La forma constitutiva se expresa principalmente en células endoteliales (eNOS o NOS3) y en células neuronales (nNOS) y depende de Ca^{2+} -calmodulina. En el caso de la eNOS, la enzima contiene sitios de unión para el grupo hemo y la calmodulina, que son elementos indispensables para la actividad enzimática, además contiene un motivo de unión del Zinc. Cada dímero de eNOS contiene un ión Zinc que contribuye con la estabilización de la molécula dimérica (Govers y Rabelink, 2001).

Recientemente Ramírez-Sánchez *et al.* (2005) demostraron por análisis de co-inmunoprecipitación que en células endoteliales obtenidas de cordón umbilical humanos (HUVEC) la eNOS forma parte de un complejo de proteínas asociadas a la utrofina (UAPC). El complejo de proteínas asociadas a la distrofina/utrofina (DAPC/UAPC) es un grupo de proteínas periféricas e integrales de la membrana celular de músculo estriado. Si bien no se conoce la función específica de estas proteínas, se cree que son versátiles y que entre otras funciones protegen al sarcolema del daño inducido por contracción. El DAPC/UAPC consta de otros sub-grupos de proteínas con características particulares, dentro de los cuales está el subcomplejo sarcoglicano-sarcospan (CSG-SPN) (Rando, 2001). Este subcomplejo está constituido de proteínas transmembranales del sarcolema llamadas SG's α , β , γ , δ , ϵ y ζ , y SPN. El DAPC está compuesto de proteínas de membrana y de citoesqueleto que unen la matriz extracelular con el citoesqueleto (Estrada, 2006). El DAPC se conforma de distrofina, sintrofinas, distroglicanos (DG), CSG-SPN (Blake *et al.*, 1998; Blake *et al.*, 2002; Estrada *et al.*, 2006).

Bajo ciertas condiciones, la distrofina es sustituida en el complejo de proteínas por la utrofina, la proteína homóloga autosómica de la distrofina; en este caso el complejo de proteínas puede ser llamado complejo de proteínas asociadas a utrofina (UAPC). La utrofina tiene una distribución más ubicua y se expresa en tejidos musculares, así como en



tejidos no musculares tales como sistema nervioso y células endoteliales (Rando, 2001; Blake *et al.*, 2002; Ramírez- Sánchez *et al.*, 2005).

A pesar de la importancia del DAPC en el desarrollo de la cardiomiopatía, el estudio de este complejo de proteínas se ha enfocado principalmente en los cardiomiocitos y en el músculo liso vascular. Existe poco conocimiento sobre la expresión y función de estas proteínas en células endoteliales, las cuales tienen un papel fundamental en la función vascular. En un estudio reciente realizado en vasos de cordón umbilical humanos por el grupo de trabajo de Ramírez-Sánchez y Vázquez-Coral, propusieron la presencia en células endoteliales de un UAPC, constituido por ϵ -SG, β -dystroglicano (DG) y utrofina (UTR) (Ramírez-Sánchez *et al.*, 2005). Así mismo, postularon que este complejo puede estar localizado en los dominios de transducción conocidos como caveolas, debido a su posible asociación con la proteína caveolina-1 (cav-1) (Ramírez-Sánchez, 2005). Recientemente estos investigadores han generado resultados que confirman la asociación de utrofina con ϵ -SG, β -DG y cav-1, así como también su asociación con la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS).

Adicionalmente, observaron que bajo el estímulo de estiramiento equibiaxial, que trata de imitar fuerzas del movimiento mecánicas fisiológicas, el UAPC modifica su patrón de expresión en las HUVEC. De manera interesante, el estímulo mecánico también induce la activación y la liberación de la eNOS del complejo, sugiriendo con esto que el UAPC desempeña un papel activo en la mecanorecepción endotelial.

Además de la activación por estiramiento, la eNOS se activa en respuesta a una gran variedad de estímulos, como son la estimulación agonista de los receptores de las células endoteliales, la cual activa a una o más isoformas de la Fosfolipasa C, con lo cual se incrementa la formación del inositol-1,4,5-trifosfato. La elevación de este inositol incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular y en consecuencia la activación de la eNOS a través de interacción con Ca^{2+} - Calmodulina. Sin embargo las interacciones moleculares que regulan esta actividad son más complejas que una simple unión reversible del Ca^{2+} a la calmodulina, ya que por ejemplo, la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) también



parece ser un efector alostérico positivo de la eNOS. Otros factores que contribuyen a la regulación de la actividad enzimática de la eNOS son los efectores alostéricos negativos como la caveolina-1, la cual interactúa con la eNOS e inhibe su actividad catalítica (Govers *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente, el NO es una molécula gaseosa que participa en diferentes fenómenos biológicos, incluyendo la relajación del músculo liso, la neurotransmisión, la homeostasis de los tejidos, los procesos de aprendizaje y memoria y la inhibición de la agregación plaquetaria. Además, ya es bien conocido que durante infecciones microbianas producidas por casi todos los patógenos, incluyendo bacterias, virus, parásitos y hongos, se producen grandes cantidades de NO como una medida de defensa (Nathan *et al.*, 1991; Umezawa *et al.*, 1997; James, 1995).

En el caso de las infecciones ocasionadas por *Mycobacterium*, diferentes especies de *Mycobacterium* han mostrado variaciones en cuanto a su susceptibilidad al NO y a los intermediarios reactivos del nitrógeno. Se encontró que la relativa resistencia *in vitro* de varias cepas de *M. tuberculosis* al nitrito de sodio correlacionó con la virulencia de las cepas en los cobayos (O'Brien *et al.*, 1994). También se demostró que el NO puede matar al bacilo de la tuberculosis en una manera dependiente del tiempo y la concentración, observándose una reducción de dos logaritmos en las UFC después de la exposición de *M. tuberculosis* a 90 ppm de NO durante 48 h en donde la máxima concentración de NO que se alcanza en la fase acuosa es aproximadamente de 150 nM (Long *et al.*, 1999). El NO es la única molécula que puede matar *in vitro* al bacilo tuberculoso con una potencia molar comparable a la de los quimioterapéuticos. De aquí su importancia en la respuesta de las células endoteliales.

El óxido nítrico ha sido señalado como una de las moléculas clave para contener la proliferación micobacteriana en el modelo de tuberculosis de ratón, aunque de manera controversial ya que en humanos el papel del NO ha sido cuestionado, aunque cada vez más las evidencias apuntan a señalar que en los humanos el NO es determinante para la eliminación de la micobacteria (Chan, 2001), ya que las evidencias sugieren que durante la



infección exitosamente contenida se expresa iNOS de manera importante (Kauffman, 2000).

Por estas razones, resulta importante reconocer la participación de este metabolito en la eliminación de la micobacteria por las células no fagocíticas, ya que como se mencionó anteriormente, las mNOS y eNOS de manera constitutiva están produciendo este metabolito. Por otro lado, se ha reportado que las células epiteliales de pulmón producen cantidades considerables de NO por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); el TNF-alfa y la IL-1beta favorecen la expresión de la enzima y la producción de NO (Robbins, 1994; Kwon, 1998). Además recientemente, Choi y col., mediante inmunohistoquímica, demostraron la expresión de las isoformas de NOS inducible y endotelial en las regiones inflamatorias de granulomas tuberculosos de pulmón, y ponen en discusión la participación de la eNOS, en la patología de la tuberculosis (Choi, 2002).



2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que es poca la información disponible acerca de los mecanismos que favorecen la infección y sobrevivencia de las micobacterias en células endoteliales y su relación con la invasión al tejido nervioso central, en el presente trabajo se estudiaron algunos de los procesos celulares y metabólicos involucrados con la infección micobacteriana como son el rearrreglo del citoesqueleto, la producción del óxido nítrico y la participación de proteínas asociadas a Utrofina (eNOS, PRTF, caveolina y utrofina), para tratar de elucidar su participación en el proceso de infección micobacteriana.

3. HIPÓTESIS

- En las células endoteliales, los aislados meníngeos de *M. tuberculosis* inducen cambios en la organización del citoesqueleto de actina y favorecen el desprendimiento y la activación de la eNOS, mientras que los aislados pulmonares no exhiben estas propiedades.



4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los eventos involucrados en la infección de HUVEC por micobacterias de origen meníngeo y pulmonar, determinando su sobrevivencia y multiplicación intracelular, la modificación del citoesqueleto, la producción de óxido nítrico y el desprendimiento de la eNOS del complejo UAPC.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la infección y sobrevivencia de aislados meníngeos y pulmonares de *M. tuberculosis* en células endoteliales mediante la cuantificación de UFC.
- Determinar la producción de NO por las HUVEC infectadas con los aislados meníngeos y pulmonares, mediante observación *in situ* con el reactivo DAF y la cuantificación con reactivo de Griess.
- Determinar la producción de ROS inducida en las células endoteliales por los aislados meníngeos y pulmonares.
- Analizar las modificaciones en el citoesqueleto de actina inducidas durante la infección por los aislados meníngeos y pulmonares de las células endoteliales.
- Determinar la liberación de la eNOS del complejo UAPC, inducida por los aislados meníngeos en comparación con los pulmonares.



6. MATERIAL Y MÉTODOS

Anticuerpos utilizados

Para los diversos ensayos se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- ✓ IgG que reconoce al factor VIII de Von Willebrand humano hecho en conejo marca Invitrogen 18-0018.
- ✓ IgG que reconoce eNOS humana NOS3 (N-20) hecho en conejo marca Santa Cruz Biotecology SC-653.
- ✓ IgG que reconoce a Caveolina-1 humana hecho en ratón marca BD Transduction Laboratories 610406.
- ✓ IgG que reconoce utrofina humana (H-300) hecho en conejo marca Santa Cruz Biotecology SC-15377.
- ✓ IgG que reconoce Cavina-1 (PTRF) humana hecho en ratón marca Santa Cruz Biotecology
- ✓ IgG conjugada con FITC hecha en ratón que reconoce a la IgG de conejo marca Santa Cruz Biotecology SC-2359
- ✓ IgG conjugada con Rodamina hecha en cabra que reconoce a la IgG de ratón marca Santa Cruz Biotecology SC-2092
- ✓ IgG conjugada con Peroxidasa que reconoce IgG de ratón marca Cell signal (7076).
- ✓ IgG conjugada con Peroxidasa que reconoce IgG de conejo marca Invitrogen (606120).

Cepas micobacterianas

Para todos los ensayos se utilizaron tres cepas de micobacterias: La cepa de referencia H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) como modelo de bacteria virulenta, la cual fue cultivada hasta alcanzar la fase logarítmica en medio Middlebrook 7H9 suplementado al 10% con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y Tween 80. La cepa de *Mycobacterium smegmatis* como modelo de micobacteria no tuberculosa no virulenta, la cual fue cultivada hasta alcanzar la fase logarítmica en medio Middlebrook 7H9 adicionado de tween 80 y un aislado clínico obtenido de un caso de endoftalmitis e identificado por PCR como *Mycobacterium abscessus* (MAB), el cual se cultivó en medio



Midlebrook 7H9 adicionado con tween 80, hasta alcanzar la fase logarítmica. Se utilizaron también tres aislados clínicos de líquido cefalo-raquídeo (LCR), identificados por PCR como *M. tuberculosis*, de pacientes que presentaban el cuadro clínico de tuberculosis meníngea, estos aislados fueron donados por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Además, se incluyó un aislado clínico pulmonar identificado por PCR como *M. tuberculosis*, donado por el Hospital General de México.

Para todos los ensayos experimentales las micobacterias se centrifugaron a 10 000 rpm durante 5 min y se lavaron 3 veces con HBSS. Finalmente, la turbidez de las suspensiones bacterianas se ajustó al tubo N° 1 del nefelómetro de Mc Farland. De esta suspensión bacteriana se realizaron las diluciones correspondientes para alcanzar una MOI de 10.

Cultivo primario de células endoteliales humanas

Los cultivos primarios de células endoteliales humanas se obtuvieron a partir de cordones umbilicales desechados de partos normales o cesáreas, provenientes del área de tococirugía del Hospital Regional Adolfo López Mateos y del Hospital General Xoco, los cuales se colectaron al momento del alumbramiento. Una vez colectados los cordones, se transportaron en condiciones asépticas y en frío al laboratorio de Medicina Genómica de la Unidad de Enseñanza e Investigación del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, en donde se sometieron al siguiente procedimiento: Cada cordón se pinzó por ambos extremos, se le adicionó una solución de tripsina al 0.125% en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) (Sigma Chem Co, St Louis Missouri, MO, USA) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo el contenido del cordón se colectó en un volumen de 0.3 ml de suero fetal bovino (SFB, Biowest). Las células se cosecharon y se centrifugaron a 2700 rpm durante 10 min. Posteriormente el botón celular se resuspendió en medio M-199 suplementado con 10% de SFB y se transfirió a cajas de cultivo, las cuales se incubaron a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂.



La línea celular HUVEC EA.hy926 (células endoteliales de cordón umbilical humano) se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC), las células se mantuvieron en medio de crecimiento DMEM suplementado con 10% de SFB y una mezcla de antibióticos (50 µg/ml de gentamicina y 100 U/ml de penicilina). Esta línea celular se creció en condiciones controladas de 37° C de temperatura y una atmósfera con 5% de CO₂.

Fenotipificación de las células endoteliales provenientes de un cultivo primario

Para caracterizar fenotípicamente los cultivos primarios de células endoteliales, se realizó un ensayo de fluorescencia en donde se determinó la presencia del factor Von Willebrand, reportado como un marcador de células endoteliales (Takahashi et al., 1994). Para ello, se prepararon monocapas de los cultivos primarios a una confluencia del 60%, se fijaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) al 4 % durante 10 minutos. Las células fijadas se permeabilizaron utilizando triton X-100 al 0.2% por 5 min y SDS al 0.1 % también por 5 minutos, el exceso de agentes permeabilizantes se eliminó realizando 3 lavados con HBSS-albúmina 1 % y se adicionó albúmina sérica bovina al 3 % para bloquear por media hora a 37 ° C en una atmósfera parcial de CO₂ del 5 %. Posteriormente, las preparaciones se incubaron por 3 h con el anticuerpo primario anti-Von Willebrand a una dilución de 1:200, se realizaron 4 lavados a las monocapas con HBSS-albúmina 1% y a continuación se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario acoplado a FITC a una dilución de 1:300. El exceso de anticuerpo se eliminó realizando 4 lavados con HBSS-albúmina 1%, finalmente las preparaciones se montaron en portaobjetos con 10 µL de Vectashield-DAPI y se analizaron bajo el modo confocal acoplado a un microscopio invertido (LSM 5 Pascal, ZEISS).

Preparación de monocapas

Las monocapas se prepararon a partir de botellas con cultivos celulares con una confluencia del 100% aproximadamente, para lo cual las células se desprendieron de las botellas de cultivo mediante una corta incubación (2 a 3 min) con tripsina-EDTA (5%),



posteriormente se centrifugaron por 5 min a 1500 rpm para remover la tripsina y se re-suspendieron en una cantidad conocida de medio de cultivo fresco. La suspensión celular se cuantificó en una cámara de Neubauer haciendo una dilución 1:20 con azul tripano al 0.4% y dependiendo del ensayo se realizaron las diluciones necesarias para alcanzar el número de células deseadas.

I. Ensayo de multiplicación intracelular determinado por UFC.

Las monocapas de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) preparadas en placas de 24 pozos con una confluencia del 90 al 100%, se lavaron tres veces con HBSS para eliminar las células no adheridas. Las monocapas se infectaron con las cepas micobacterianas ajustadas y diluidas en medio DMEM para alcanzar una MOI de 10. Las monocapas infectadas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Se siguió una cinética de 3 y 6 h de infección, continuando con tiempos de post-infección de 24, 48, 72 y 96 h. Transcurridos los tiempos de infección, las monocapas se lavaron tres veces con HBSS para eliminar las bacterias extracelulares y se les adicionó DMEM suplementado de 1% de SFB con amikacina a una concentración de 40 µg/mL incubándose durante 2h; posteriormente se retiró el medio y las monocapas se lavaron una vez mas adicionando 1 ml de medio DMEM suplementado de 1% de SFB con amikacina a una concentración de 5 µg/mL, incubándose nuevamente hasta que concluyó el tiempo de post-infección establecido. Al irse cumpliendo cada uno de los tiempos post-infección, las células se lavaron una vez con HBSS, posteriormente se lisaron con solución de SDS al 0.25% por 5 min, misma que se neutralizó con albúmina sérica bovina estéril al 5%, los lisados se congelaron a -70°C hasta su siembra. Para determinar las unidades formadoras de colonia, se realizaron diluciones seriadas con factor 10 y 10 µl de cada una de las diluciones se sembraron en cajas de petri conteniendo agar Middlebrook 7H11 con enriquecimiento OADC. Finalmente, las cajas se incubaron a 37°C por tiempo suficiente para obtener las unidades formadoras de colonias (UFC).



II. Ensayo colorimétrico para la cuantificación del óxido nítrico por el método de Greiss.

Monocapas de células endoteliales de cordón umbilical humano preparadas en placas de 24 pozos con una confluencia del 70 al 80 %, se lavaron tres veces con HBSS para eliminar las células no adheridas, posteriormente se refrigeraron durante 30 minutos para sincronizar el metabolismo celular. Cumplido este tiempo, las células se infectaron con las cepas micobacterianas ajustadas y diluidas en HBSS para alcanzar una MOI de 10. Para este ensayo se realizó una cinética de infección de 40, 90 y 240 min, al irse cumpliendo cada uno de los tiempos de infección se colectaron los sobrenadantes y se conservaron a -70°C hasta su ensayo. Para la cuantificación de óxido nítrico se tomaron 250 μL de los sobrenadantes y se colocaron en microtubos de 1.5 ml, a cada uno se les adicionó 50 μL de sulfanilamida y 50 μL de N-naftil etilendiamina para determinar los nitritos presentes, los microtubos se agitaron durante 1 min y se colocaron en celdas para leer su absorbancia a 554 nm, contra un blanco de reactivos. Simultáneamente se realizó la curva de calibración utilizando una solución de nitrito de sodio a las concentraciones de 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 y 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la absorbancia de cada una de estas soluciones se obtuvo a 554 nm. Posteriormente, las absorbancias de los sobrenadantes se interpolaron en la curva de calibración para determinar la concentración de nitritos en cada tiempo de infección y los resultados se expresaron en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

III. Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Para evidenciar la generación de ROS se utilizó el NBT, el cual reacciona con el anión superóxido para formar un precipitado de nitroazul de formazán. Este compuesto se disuelve y la lectura de absorbancia a 600 nm es directamente proporcional al ROI generado por la célula. Para ello se prepararon monocapas en placas de 24 pozos con una confluencia del 90% aproximadamente, se retiró el medio de cultivo y se realizaron un par de lavados con HSBB. Posteriormente se infectó la monocapa con una MOI 10:1 con las



diferentes micobacterias, monitoreando la infección a 1, 3 y 6 horas, 45 minutos antes de que terminara el tiempo de interacción, se le adicionó el NBT (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) a una concentración de 1.6 mg/mL y se continuó la incubación. Concluido el tiempo de interacción, se retiró el sobrenadante y se centrifugó para recuperar el precipitado extracelular formado. Para recuperar el precipitado intracelular, se lisaron las monocapas con agua destilada durante 20 minutos aproximadamente, dicho lisado se centrifugó y se recuperó el precipitado. Ambos precipitados se disolvieron con una mezcla de 56 μ L de una solución de KOH y 96 μ L de DMSO, la absorbancia se determinó en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan Plus, Type 314, Serial 314) a 600 nm.

IV. Separación de dominios membranales por gradiente de Sacarosa

Se prepararon monocapas de cultivos primarios de células endoteliales a una confluencia del 90-100% y se infectaron durante 3 h con MAB y el aislado meníngeo a una MOI de 10. Después de la infección, las monocapas se lavaron y se les adicionó 500 μ L de una mezcla de 3 detergentes, posteriormente las células se separaron del plástico de manera mecánica y el lisado celular se transfirió a tubos de 2 mL. Paralelamente, se recuperó de la misma forma un lisado celular de células sin infectar. La separación de dominios membranales se llevó a cabo por medio de un gradiente de sacarosa. Antes de la separación, se cuantificó la concentración proteica de los extractos derivados de las células sin infectar y los provenientes de células infectadas. En tubos de ultracentrifuga de 10 mL se colocaron 40 mg/mL de cada extracto, se les adicionó 1 mL de una solución de sacarosa al 80% en solución amortiguadora de Tritón-TNE. Se homogeneizó perfectamente y se agregaron cuidadosamente 2 mL de solución de sacarosa al 40 % y después 1 mL de sacarosa al 5% cuidando que las fases no se mezclaran. El gradiente de sacarosa se centrifugó a 100,000 g durante 16 h a 4 °C en una micro-ultracentrifuga Beckman Coulter TL-100 con un rotor TLS-55. Se recuperaron 12 fracciones de 400 μ L



cada una. El ensayo se repitió 3 veces y las fracciones de cada uno de los ensayos se mezclaron para a partir de éstos realizar el ensayo de Western Blot.

V. *Determinación del nivel de expresión de proteínas mediante western blot*

Para determinar las posibles variaciones en el nivel de expresión de las proteínas utrofina, caveolina-1, PTRF y eNOS en las HUVEC sin infectar e infectadas se realizó un ensayo Western Blot con las fracciones separadas en el gradiente de sacarosa. Las 12 fracciones se separaron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 13% con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se tomó el volumen equivalente a 30 µg de proteína el cuál fue mezclado con una solución amortiguadora de carga (2X SDS gel-loading buffer: Tris-HCl 100 mM, SDS al 4%, azul de bromofenol al 0.2%, β-mercaptoetanol 200 mM, glicerol al 20%). La mezcla se calentó a 95 °C durante cinco minutos y se colocó en hielo para inmediatamente después cargarse en los pozos del gel concentrador. Se utilizaron 3 µL de marcador de peso molecular preteñido (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas). Las muestras se corrieron a 90 voltios por 100 min en el sistema Mini Protean (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en solución reguladora de carga (10X: 0.25 M Tris-HCl, 2 M Glicina, 1% SDS).

Las proteínas separadas en el gel se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL RPN 3032D; Amersham Pharmacia Biotech) a través del sistema de electrotransferencia húmedo de Bio-Rad, con amperaje constante de 350 mA por 150 minutos a 4 °C en solución reguladora de transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina, 20% metanol pH [8.3])

Las membranas fueron incubadas con una solución de leche descremada (Svelty) al 5% para bloquear durante una hora. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés. Finalmente, se incubaron con el anticuerpo especie-específico acoplado a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente. La reacción de revelado se desarrolló con el reactivo super signal west pico (Pierce) de acuerdo a las instrucciones del proveedor para visualizar la aparición de las bandas.



1. RESULTADOS

Replicación intracelular de las diferentes cepas micobacterias en la línea celular.

Para evidenciar el comportamiento intracelular de las diferentes micobacterias en las células de línea celular y cultivo primario, se realizaron ensayos para determinar las unidades formadoras de colonias en una cinética de infección.

En la Figura 4 se aprecia que las micobacterias son interiorizadas por la línea celular, aunque el comportamiento intracelular a través del tiempo es diferente. La cepa H37Rv de *MTB*, es interiorizada por las HUVEC sin mostrar diferencias importantes en los tiempos de infección, las UFC recuperadas a lo largo del tiempo post-infección se mantuvieron constantes, no se observó ni una replicación bacteriana evidente ni una eliminación de la carga bacteriana.

MAB es interiorizada por las HUVEC, a diferencia de *MTB*, las UFC recuperadas se incrementaron conforme aumentó el tiempo de infección. En los tiempos post-infección se observó la replicación logarítmica de esta bacteria, sin que la célula pudiera controlar la infección, la gran replicación micobacteriana causó la muerte de las células a las 48 h post-infección.

M. smegmatis también fue interiorizada por las HUVEC, sin embargo, contrario a lo observado con la infección por *MAB*, la carga bacteriana de *MSM* fue eliminada en el transcurso del tiempo, llegando a su eliminación a las 24 h post-infección.

Las UFC recuperadas en los tiempos de infección para el aislado meníngeo mostraron un incremento así como una replicación logarítmica durante los tiempos post-infección, siguiendo la misma tendencia que la infección por *MAB*, aunque sin alcanzar la misma replicación.

Para el caso del aislado pulmonar que también fue interiorizado por las HUVEC, se observó un comportamiento intracelular similar a la cepa de referencia de *MTB*, no hubo



replicación evidente y tampoco una eliminación, manteniéndose de manera sostenida durante el tiempo de post-infección.

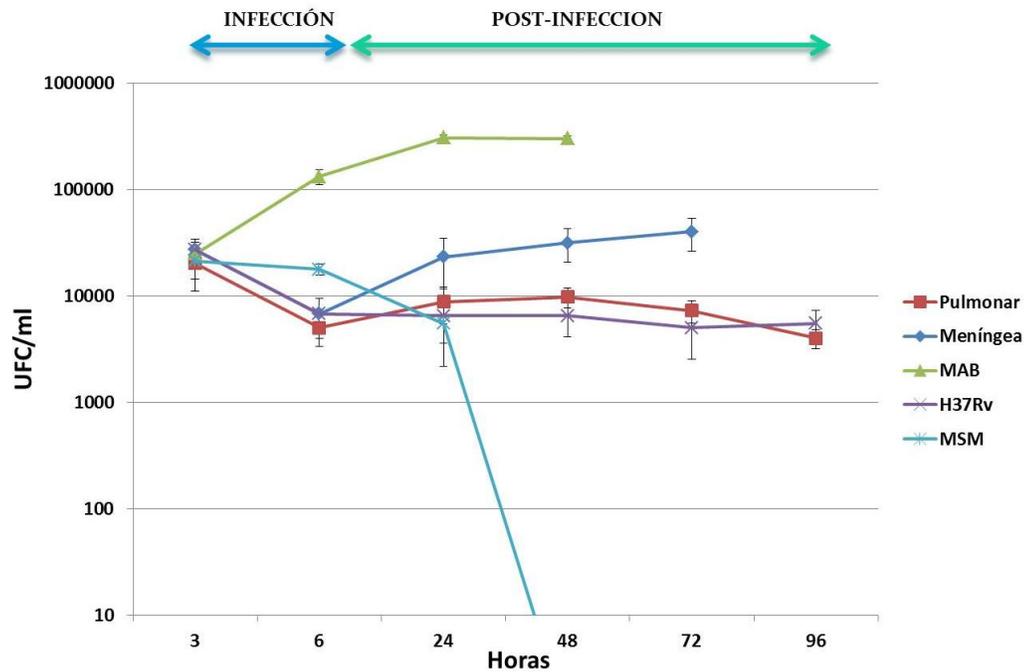


Figura 4. **Infección y replicación intracelular micobacteriana en HUVEC EA.hy926.** Se infectaron células de línea celular con una MOI de 10, a los tiempos de infección 3h y 6h, y a los tiempos post-infección 24h, 48h, 72h y 96h. Posteriormente se recuperaron las micobacterias interiorizadas y se sembraron en agar middlebrook 7H9 con enriquecimiento de OADC y se mantuvieron a 37 °C hasta su crecimiento. Finalmente se contaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)



Replicación intracelular de las diferentes cepas micobacterianas en el cultivo primario de células endoteliales

En la Figura 5 podemos observar que las micobacterias también son interiorizadas por las células de cultivo primario y que la tendencia en el comportamiento intracelular de cada una de las micobacterias es similar al observado en la línea celular. El comportamiento intracelular del aislado pulmonar es semejante al de la cepa de referencia H37Rv, no hay replicación intracelular pero tampoco eliminación de la carga bacteriana. La multiplicación intracelular observada durante la infección por MAB, también se observó durante la infección por el aislado meníngeo, aunque la infección por MAB llevó a la muerte celular a las 48 h post-infección y para el caso del aislado meníngeo las células sobrevivieron hasta las 72 h. Finalmente la infección por *M. smegmatis* culminó con su eliminación, aunque a diferencia de la línea celular, en estos cultivos la eliminación total de la carga bacteriana se observó hasta las 48 h post-infección.

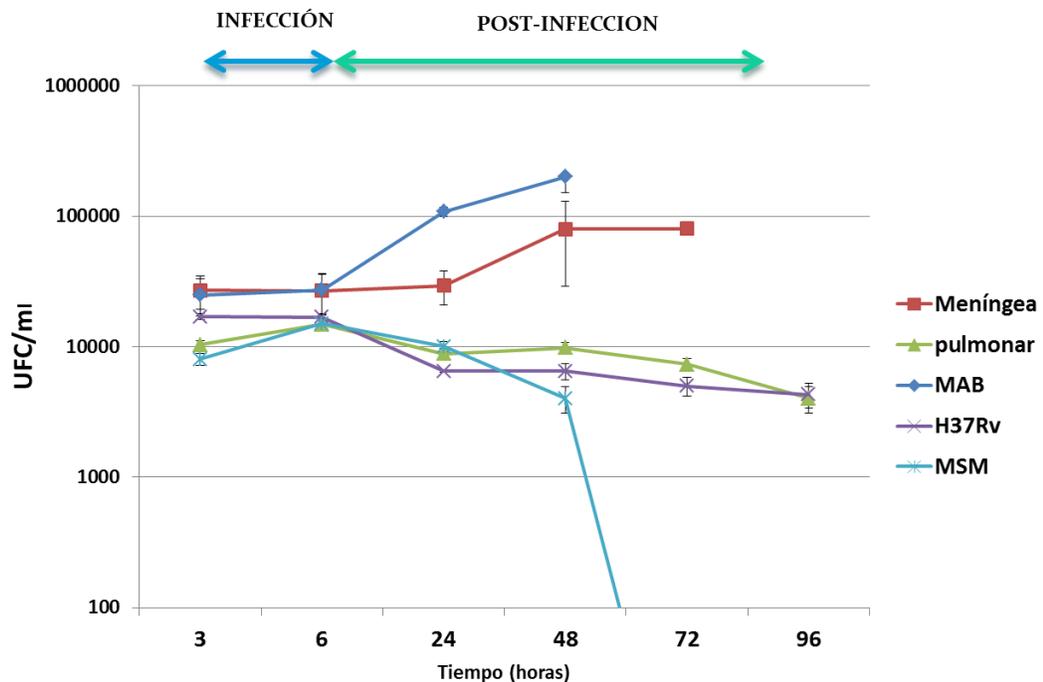




Figura 5. **Infección y replicación intracelular micobacteriana en HUVEC de cultivo primario.** Se infectaron células de cultivo primario con una MOI de 10, a los tiempos de infección 3h y 6h, y a los tiempos post-infección 24h, 48h, 72h y 96h. Posteriormente se recuperaron las micobacterias interiorizadas y se sembraron en agar middlebrook 7H9 con enriquecimiento de OADC y se mantuvieron a 37 °C hasta su crecimiento. Finalmente se contaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Producción de Óxido Nítrico (NO) en las células endoteliales provenientes de línea celular y cultivo primario infectadas.

En la figura 6 se observa que las HUVEC de línea celular infectadas por *MAB*, tuvieron una producción mayor de NO en todos los tiempos analizados, con un máximo a los 45 minutos de infección. De manera similar, la infección por el aislado meníngeo indujo la producción de NO, a partir de los 45 minutos de infección se observó un incremento notable en la producción de este metabolito, la cual fue disminuyendo en pequeña proporción al paso del tiempo, pero manteniéndose por encima de la producción de NO inducida por *MAB* y por la cepa *H37Rv*. La infección por *MTB H37Rv* no incrementó de manera considerable la producción de estos metabolitos, únicamente a los 45 minutos de infección tuvo un pequeño incremento comparado con el control.

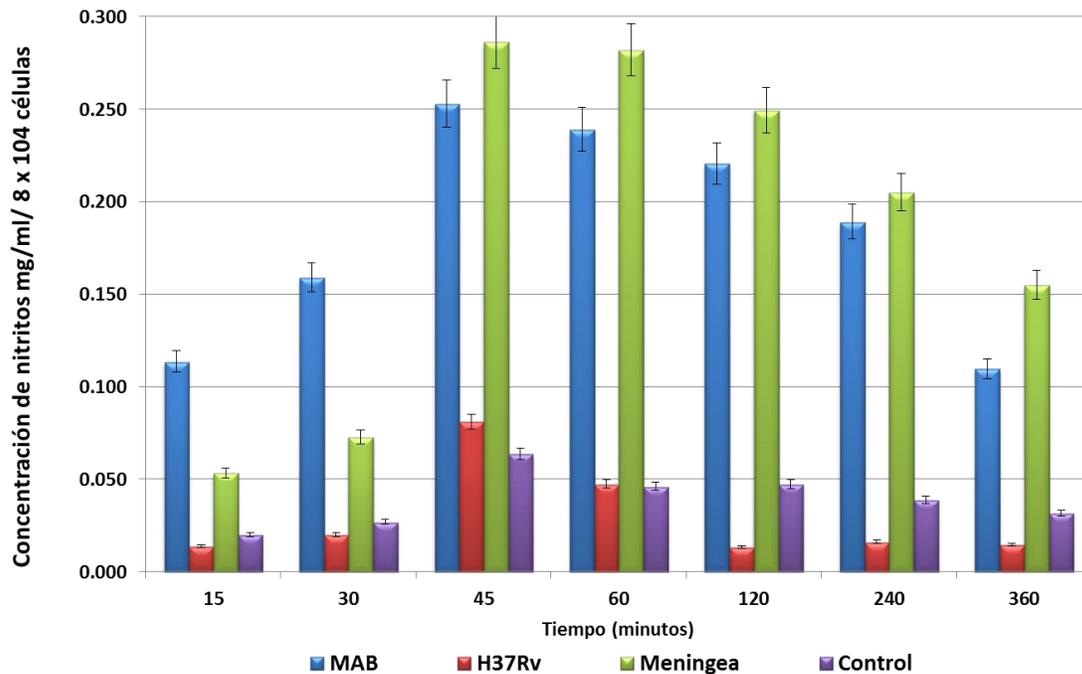


Figura 6. **Producción de NO en HUVEC EA.hy926 infectadas por *micobacterias*.** La producción de NO fue mayor cuando las células se infectaron por *M.abscessus*, así como también por el aislado meníngeo comparado con las células sin infectar (control), con el aislado pulmonar y con la cepa de referencia H37Rv.

En los cultivos primarios de HUVEC, se encontró que MAB y el aislado clínico meníngeo son las cepas micobacterias que inducen en mayor medida la producción de NO. A diferencia de lo observado en la línea celular, la producción de NO en estas células fue mayor durante la infección por MAB y el incremento en la producción de este metabolito se observó desde los 15 min de infección con un máximo a las 6 h. La producción de NO inducida por el aislado meníngeo siguió la misma tendencia, aunque con valores menores. La infección por la cepa H37Rv indujo bajos niveles en la producción de NO con un máximo a los 60 min (Figura 7).

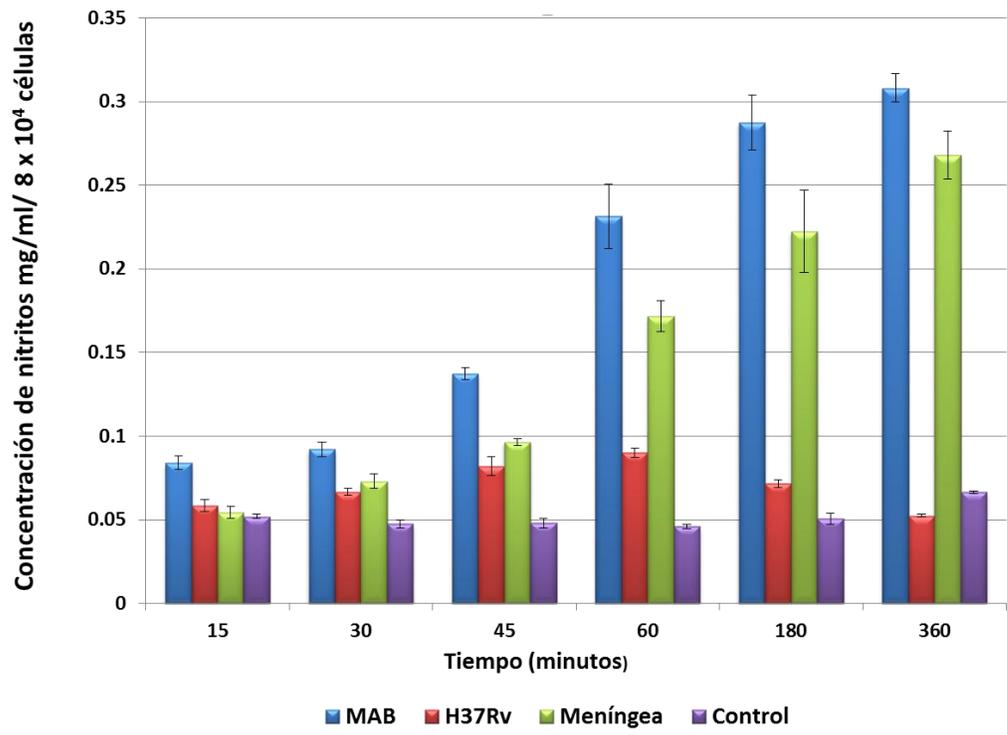


Figura 7. Producción de NO en HUVEC de cultivo primario infectadas por *micobacterias*. La producción de NO fue mayor cuando las células se infectaron por *M.abscessus*, así como también por el aislado meníngeo comparado con las células sin infectar (control), con el aislado pulmonar y con la cepa de referencia H37Rv.

Producción de Especies reactivas del Oxígeno (ROS) en las células endoteliales provenientes de línea celular y cultivo primario infectadas.

La producción de ROS por la línea celular infectada se evidenció mediante la reducción del NBT (Figura 8), en donde se observa que las células infectadas por *MSM*, tuvieron una producción mayor de ROS en todos los tiempos analizados, con un máximo a las 6 horas de infección. La infección por el aislado pulmonar indujo una mayor producción de ROS a las 3 horas de infección. La infección por la cepa H37Rv también tuvo un máximo de producción a las 6 h de infección. La infección por *MAB* no incrementó de manera significativa la producción de ROS, los niveles de producción fueron similares a la producción de ROS basal. Similar a lo observado durante la infección por *MAB*, los aislados meníngeos no indujeron una gran producción de ROS, para los tres aislados hubo un máximo a las 6 horas. La producción de ROS inducida por *MAB*, la cepa de referencia



H37Rv, el asilado pulmonar y los tres aislados meníngeos no alcanzaron los niveles inducidos por *MSM*.

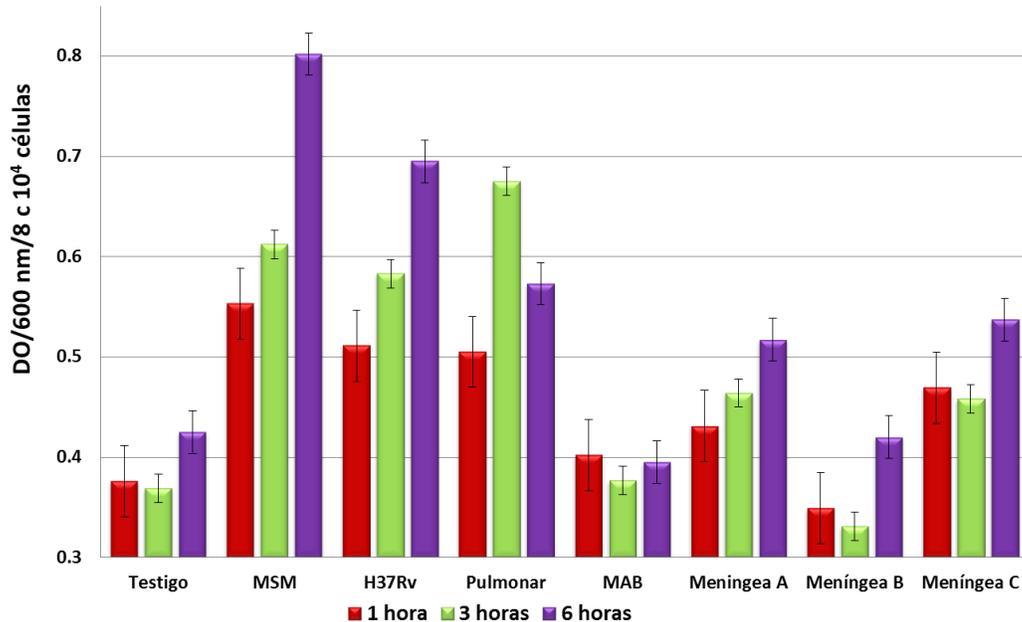


Figura 8. **Producción de ROS en HUVEC EA.hy926 infectadas por *micobacterias*.** La producción de ROS fue mayor cuando las células se infectaron por *M.smegmatis*, así como también por *MTB* y el aislado pulmonar comparado con las células sin infectar y con las demás micobacterias.

La producción de ROS inducida en las células HUVEC de cultivo primario durante la infección por las diferentes micobacterias se evidenció mediante la reducción del NBT. En la figura 9 se observa una tendencia similar a la observada en la línea celular. MSM fue la micobacteria que aumento de manera gradual y en mayor medida los niveles de ROS, alcanzando un máximo a las 6 horas de infección. El aislado pulmonar y la cepa de referencia H37Rv indujeron niveles análogos ROS, presentando un máximo a las 6 horas de infección, pero sin alcanzar los niveles inducidos por MSM. MAB y los aislados meníngeos A y B incrementaron ligeramente la producción de ROS comparada con la producción en estado basal, sin embargo estos niveles de ROS fueron inferiores a los inducidos durante la infección por las otras micobacterias. Solo el aislado meníngeo C



alcanzó un máximo a las 6 h de infección comparable con la producción de ROS inducida a 1 h de infección por MSM.

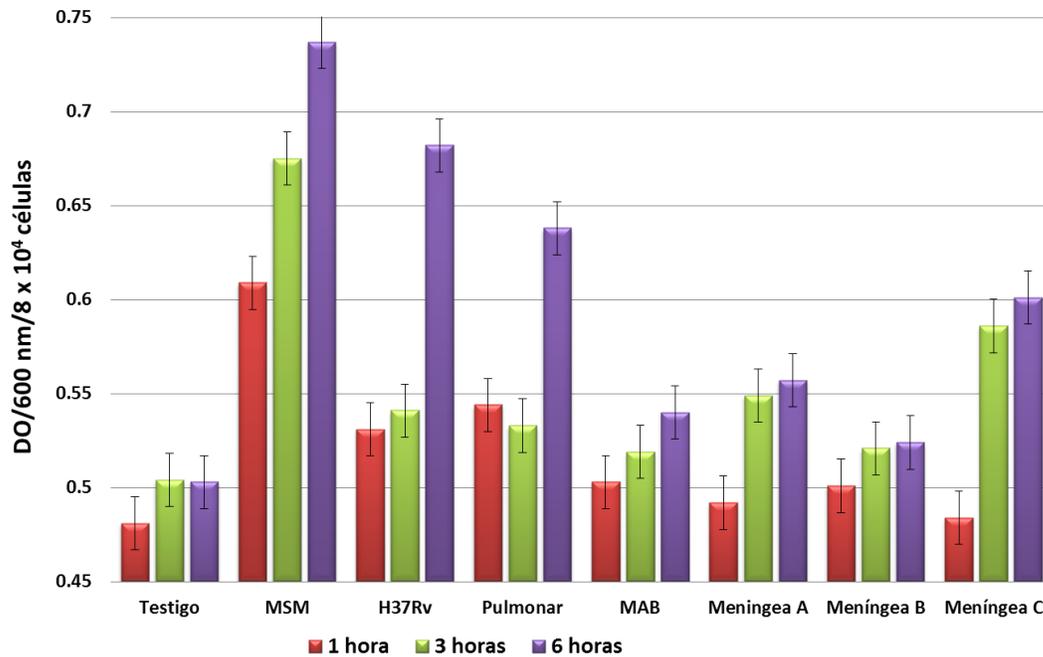


Figura 9. **Producción de ROS en HUVEC de cultivo primario infectadas por micobacterias.** La producción de ROS fue mayor cuando las células se infectaron por *M. smegmatis*, así como también por *MTB* y el aislado pulmonar comparado con las células sin infectar y con las demás micobacterias.



Modificaciones del citoesqueleto inducidas por la infección micobacteriana

Para observar el efecto que la infección micobacteriana tiene sobre el citoesqueleto de actina de las células endoteliales, se realizó una cinética de infección en tres tiempos 1, 2 y 4 h en donde se evaluó el rearrreglo de los filamentos de actina debidas a la infección.

En las figuras 10 A, B y C, podemos observar las diferencias a través del tiempo, en las células sin infectar se observó la red de filamentos de actina con una distribución espacial homogénea, con bordes celulares lisos y sin prolongaciones celulares abundantes, las uniones celulares se observaron íntegras y completas. En las células infectadas se observaron diversos cambios en la distribución de los filamentos de actina, podemos observar que los cambios mayores están dados por el aislado meníngeo, ya que desde los primeros tiempos se observaron rearrreglos en la distribución de los filamentos de actina que culminaron con la pérdida de la morfología celular, en los primeros tiempos se observó la formación de estructuras semejantes a fibras de estrés a lo largo del citoplasma celular, las uniones celulares se afectaron de tal manera que a partir de las 2 h de infección se perdió la integridad de la monocapa celular. En las células que fueron infectadas por MAB se observaron cambios similares desde el primer tiempo de infección y perduraron hasta las 4 horas, MAB indujo rompimiento de las uniones celulares por lo que al igual que en el aislado meníngeo, la integridad de la monocapa se vio afectada. La infección por la cepa de referencia H37Rv indujo cambios solo a las 1 y 2 h de infección, se observaron prolongaciones citoplasmáticas en la periferia de las células y las células presentaron puntos de actina focalizada distribuidos en el citoplasma celular. A las 4 h de infección, la distribución de actina y la morfología celular retornaron a la forma basal.

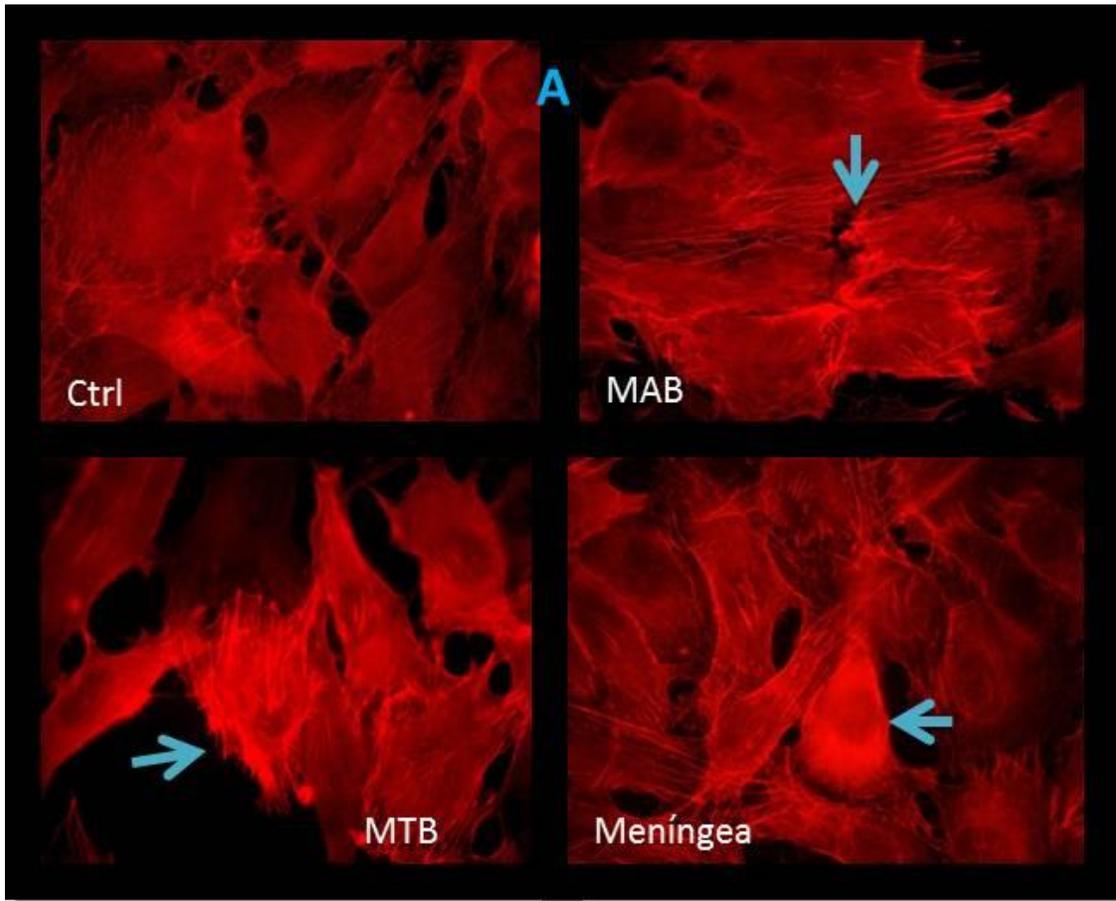


Figura 10. Evaluación de la alteración del citoesqueleto inducido por la infección micobacteriana en HUVEC EA.hy926. A. 1 h de infección, B. 2 h de infección y C. 4 h de infección. Los mayores cambios observados en el citoesqueleto son producidos con el aislado meníngeo. Las células fueron teñidas con faloidina-TRITC para marcar los filamentos de actina, las imágenes fueron tomadas a 400x.

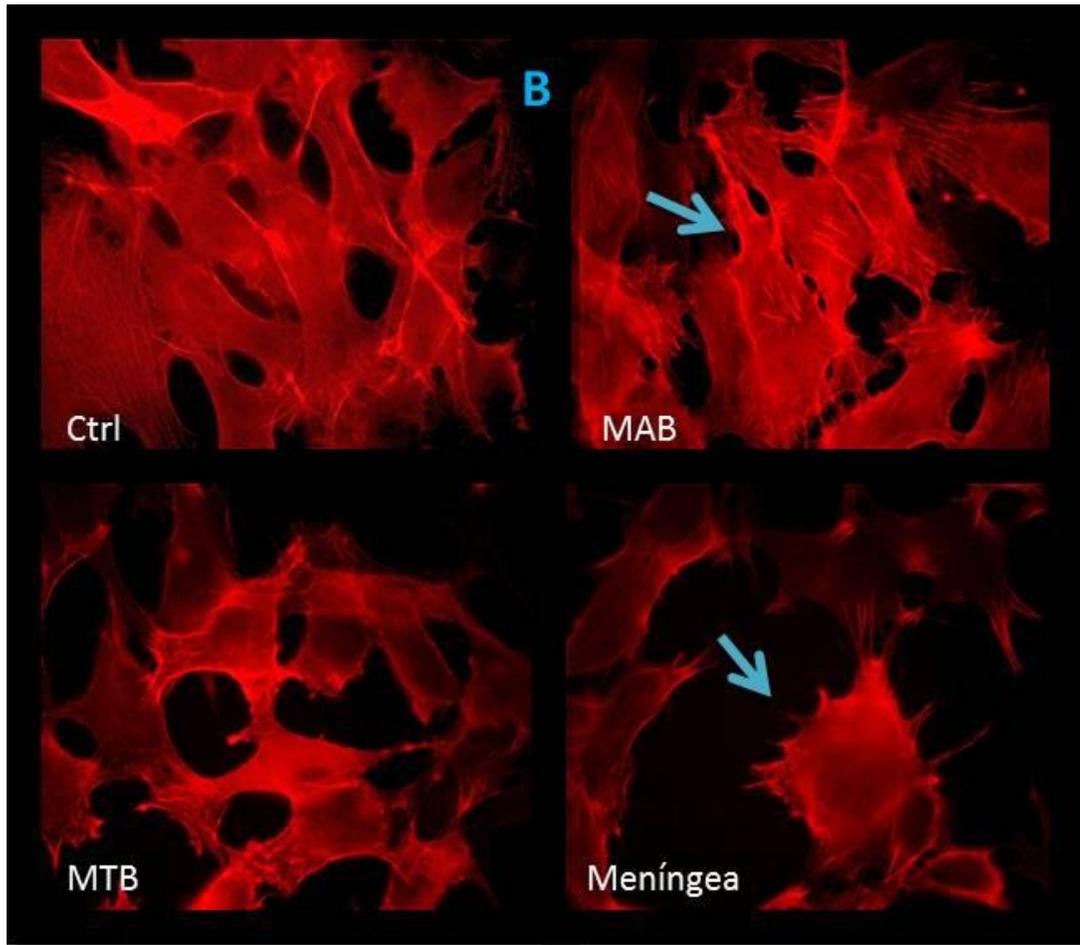


Figura 10. Evaluación de la alteración del citoesqueleto inducido por la infección micobacteriana en HUVEC EA.hy926. A. 1 h de infección, B. 2 h de infección y C. 4 h de infección. Los mayores cambios observados en el citoesqueleto son producidos con el aislado meníngeo. Las células fueron teñidas con faloidina-TRITC para marcar los filamentos de actina, las imágenes fueron tomadas a 400x.

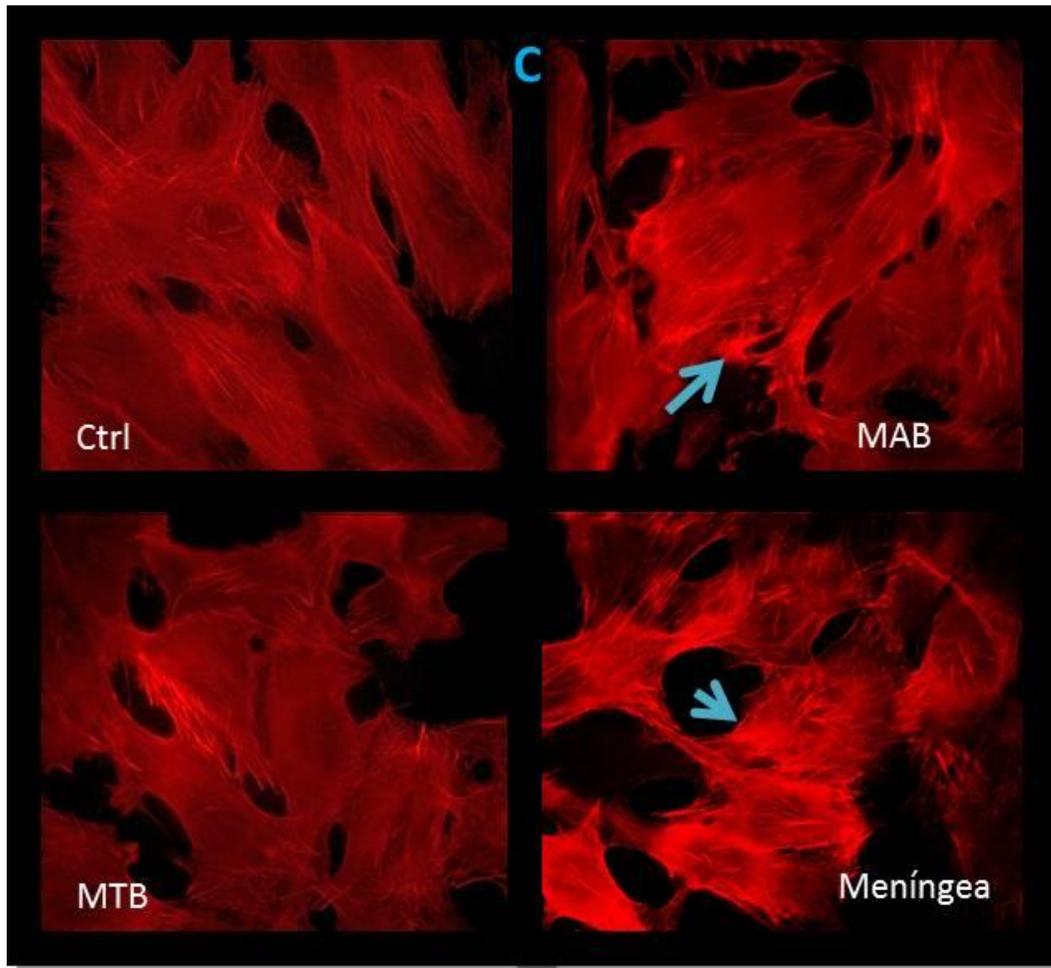


Figura 10. **Evaluación de la alteración del citoesqueleto inducido por la infección micobacteriana en HUVEC EA.hy926.** A. 1 h de infección, B. 2 h de infección y C. 4 h de infección. Los mayores cambios observados en el citoesqueleto son producidos con el aislado meníngeo. Las células fueron teñidas con faloidina-TRITC para marcar los filamentos de actina, las imágenes fueron tomadas a 400x.

Evaluación de la movilización de la eNOS inducida por la infección micobacteriana

Debido a la relación molecular que tiene la eNOS con otras proteínas presentes en las caveolas, se determinó la distribución y movilización de caveolina-1, eNOS, PTRF y utrofina mediante inmunofluorescencia indirecta. Para ello, las células se dispusieron en

monocapas a un 50-60 % de confluencia en cubreobjetos y se infectaron por 3 horas con MAB y el aislado meníngeo.

Distribución y movilización de caveolina 1

En las figuras 11 A y B se puede observar que no se presentan grandes cambios en la distribución de la caveolina-1. En las células de la línea celular y del cultivo primario sin infectar se observó una distribución homogénea de esta proteína en todo el citoplasma celular, la infección por MAB y por el aislado clínico no provocó cambios en la distribución de la caveolina-1, la localización de la proteína se mantuvo semejante al de las células sin infectar.

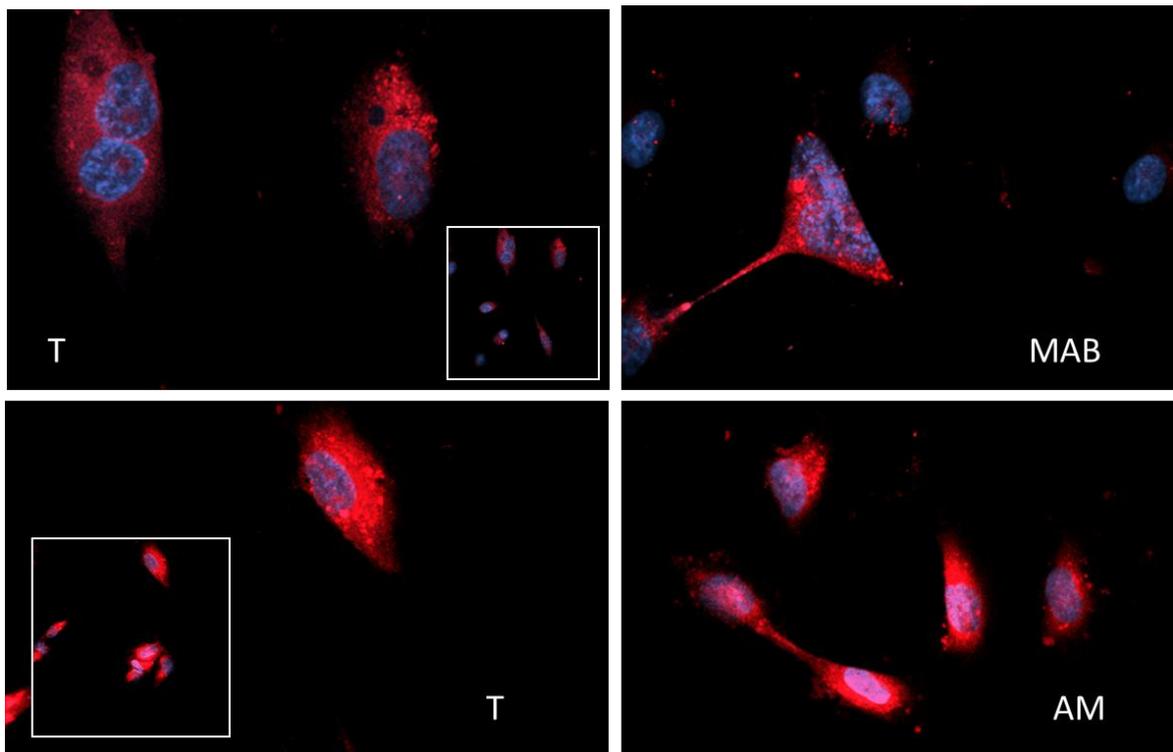


Figura 11 A. **Localización y movilización de Caveolina-1 inducida por la infección micobacteriana en HUVEC EA.hy926.** Se utilizó un anticuerpo primario específico contra Caveolina-1, a una dilución 1:500, y un anticuerpo secundario acoplado a Rodamina, a una dilución 1:300. Para teñir el núcleo se utilizó vectashield + DAPI 10 μ l. Rojo = Cav-1, Azul = núcleo, todas las imágenes originales se observaron en modo confocal a 400 x.

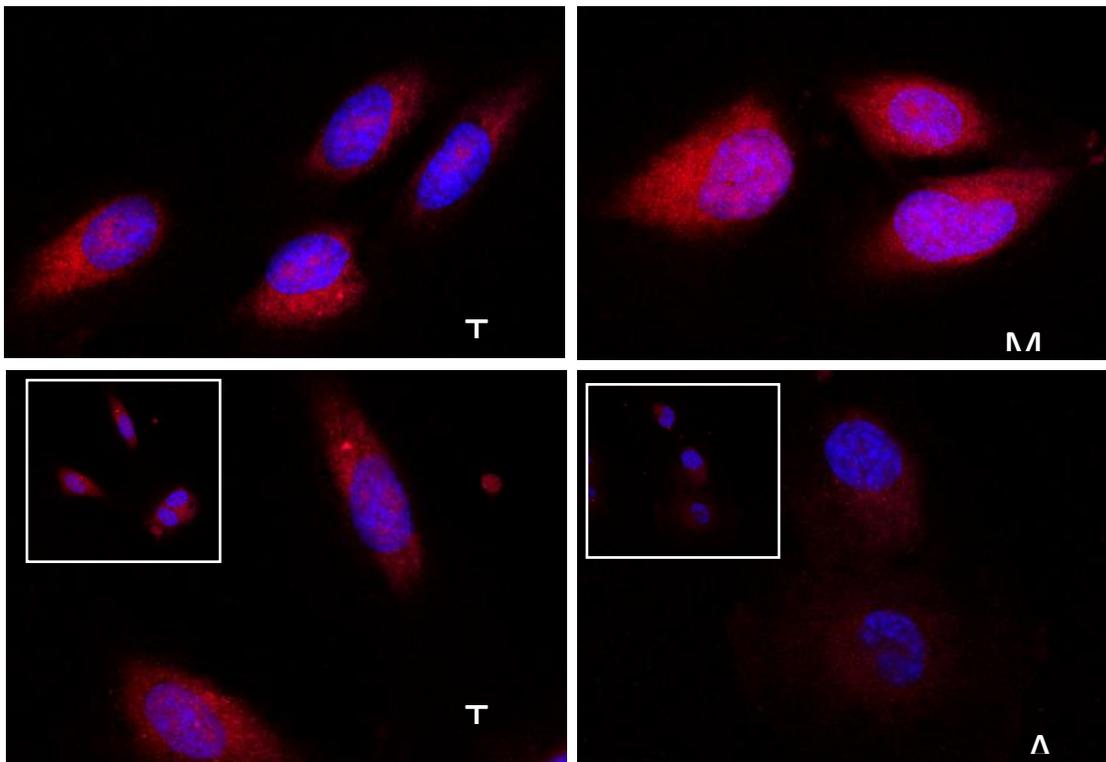


Figura 11 B. **Localización y movilización de Caveolina-1 inducida por la infección micobacteriana en HUVEC de cultivo primario.** Se utilizó un anticuerpo primario específico contra Caveolina-1, a una dilución 1:500, y un anticuerpo secundario acoplado a Rodamina, a una dilución 1:300. Para teñir el núcleo se utilizó vectashield + DAPI 10 μ l. Rojo = Cav-1, Azul = núcleo, todas las imágenes originales se observaron en modo confocal a 400 x.

Distribución y movilización de eNOS

En las figuras 12 A y B se puede observar que cambia la distribución de eNOS, ya que en las células control, que son células sin infectar se puede observar una distribución por toda la célula, mientras que en las células infectadas se observa una acumulación perinuclear, incluso un incremento en la intensidad de la marca en el caso de las células infectadas con el aislado meníngeo. Este fenómeno se presenta similarmente en tanto en las células de cultivo primario como en las células de línea celular, sin embargo, se aprecia mucho mejor en las células de cultivo primario.

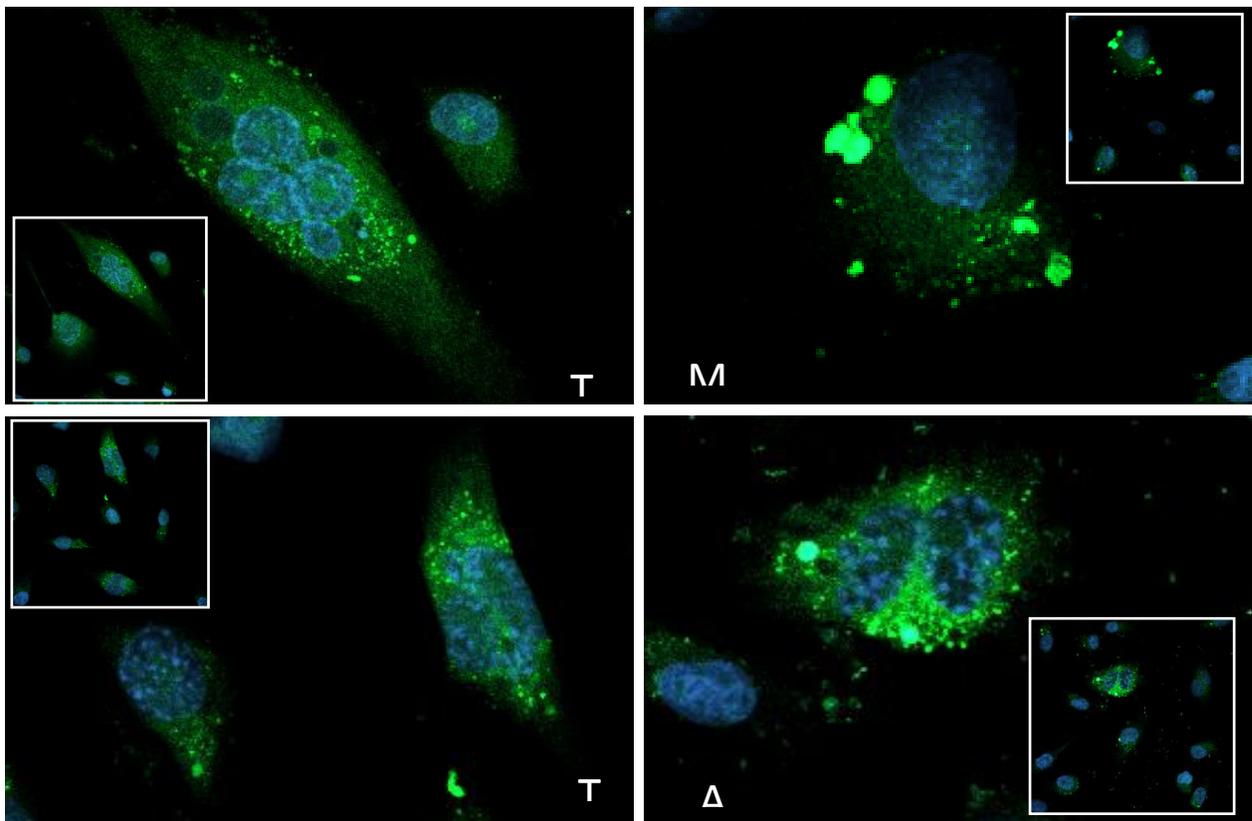


Figura 12 A. Localización y movilización de eNOS inducida por la infección micobacteriana en HUVEC EA.hy926. Se utilizó un anticuerpo primario específico contra eNOS, a una dilución 1:200, y un anticuerpo secundario acoplado a FITC, a una dilución 1:300. Para teñir el núcleo se utilizó vectashield + DAPI 10 μ l. Verde = eNOS, Azul = núcleo, todas las imágenes originales se observaron a microscopio confocal a 400x.

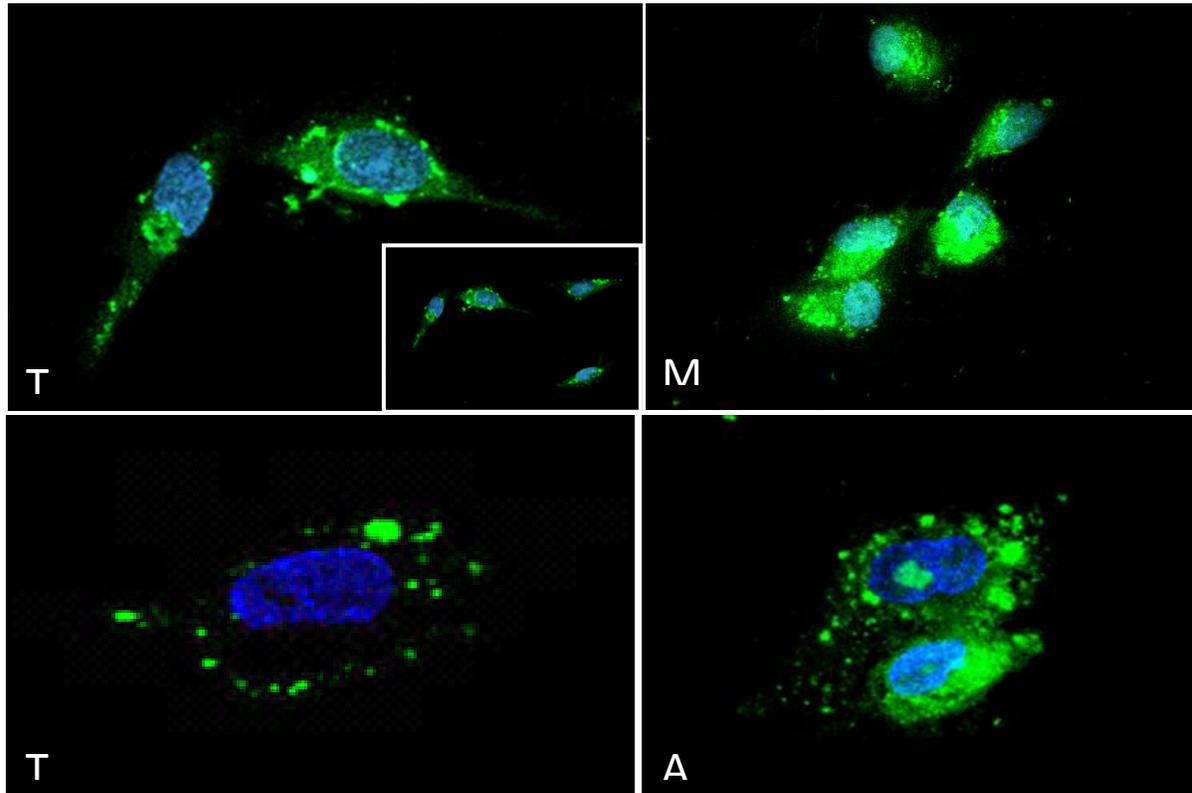


Figura 12 B. **Localización y movilización de eNOS inducida por la infección micobacteriana en HUVEC de cultivo primario.** Se utilizó un anticuerpo primario específico contra eNOS, a una dilución 1:200, y un anticuerpo secundario acoplado a FITC, a una dilución 1:300. Para teñir el núcleo se utilizó vectashield + DAPI 10 μ l. Verde = eNOS, Azul = núcleo, todas las imágenes originales se observaron a microscopio confocal a 400x.

Distribución y movilización de la utrofina

En la figura 13 se puede observar que la distribución de utrofina se modifica una vez que las células son infectadas. En las células sin infectar se aprecia una distribución por todo el citoplasma celular con depósitos intensos de la marca fluorescente. Las células infectadas por MAB presentaron una disminución en la intensidad de fluorescencia y una distribución más fina de la marca fluorescente. En el caso del aislado meníngeo, la marca fue más intensa y aparente en el área perinuclear.

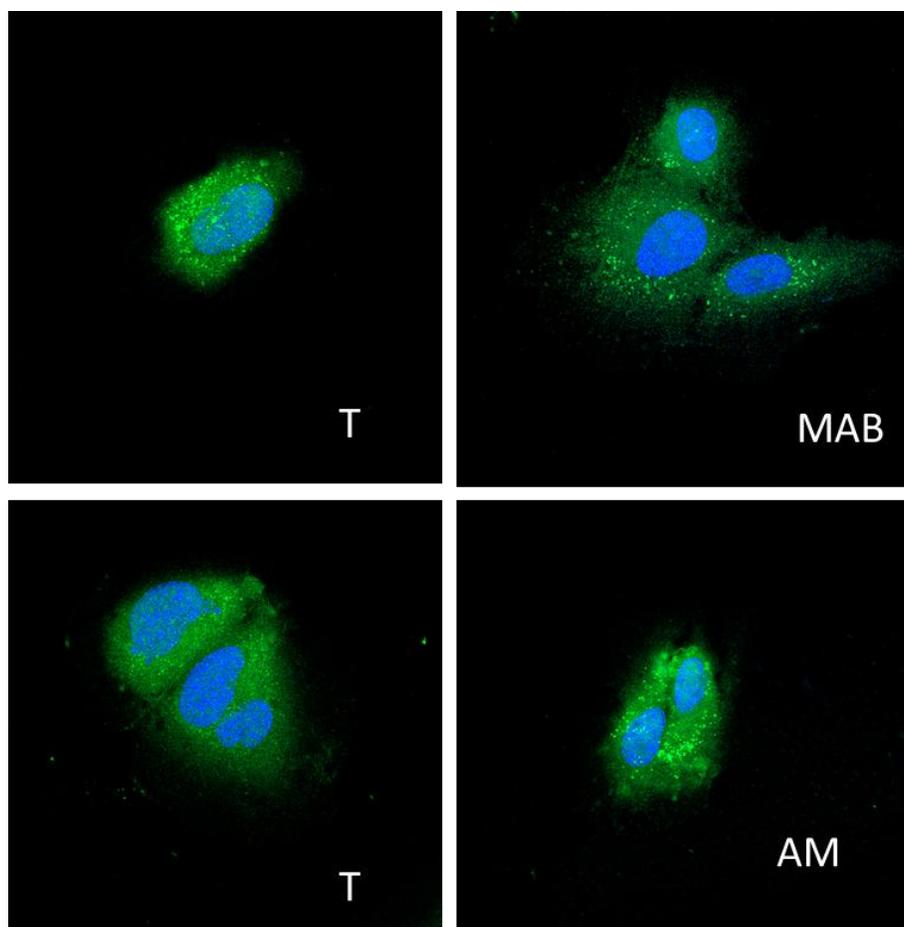


Figura 13. Localización y movilización de Utrifina inducida por la infección micobacteriana en HUVEC de cultivo primario. Se utilizó un anticuerpo primario específico contra utrofina, a una dilución 1:200, y un anticuerpo secundario acoplado a FITC, a una dilución 1:300. Para teñir el núcleo se utilizó vectashield + DAPI 10 μ l. Verde = Utrifina, Azul = núcleo, se observaron a microscopio confocal a 630x.

Distribución y movilización de PTRF

En las células sin infectar se observó una distribución homogénea y bien definida de PTRF a lo largo de todo el citoplasma celular. Por el contrario cuando las células se infectaron por MAB y por el aislado meníngeo, la intensidad de la marca, indicativa de la presencia de la proteína, disminuyó considerablemente, alcanzándose apenas a observar una pequeña marca en el área perinuclear, esta observación fue más evidente en las células infectadas por el aislado meníngeo (Figura 14).

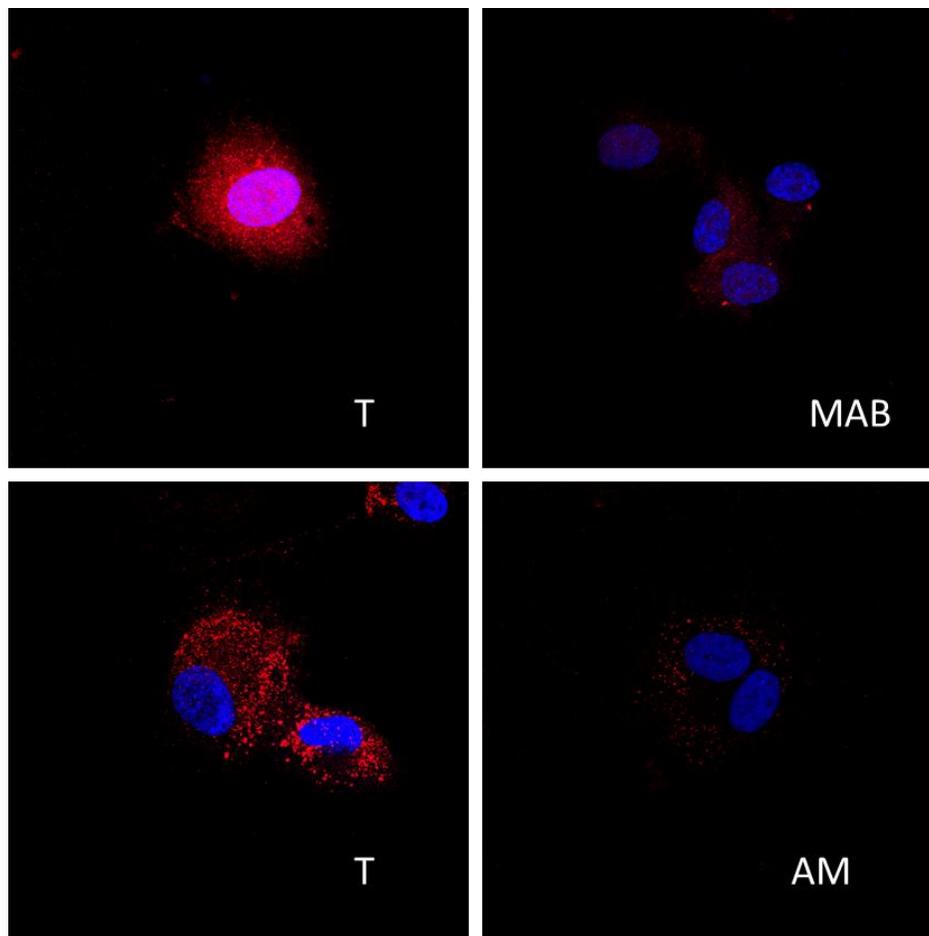


Figura 14. **Localización y movilización de PTRF inducida por la infección micobacteriana en HUVEC de cultivo primario.** Se utilizó un anticuerpo primario específico contra PTRF, a una dilución 1:200, y un anticuerpo secundario acoplado a rodamina, a una dilución 1:300. Para teñir el núcleo se utilizó Vectashield + DAPI 10 μ l. Rojo = PTRF, Azul = núcleo, se observaron a microscopio confocal a 630x.



Determinación de la liberación de la eNOS del complejo mediante Western Blot

Para determinar si la activación de la eNOS conduce a su liberación del complejo en donde se encuentra regulada y su movilización en el citoplasma celular se realizó un ensayo de fraccionamiento celular en gradiente de sacarosa. La separación de las fracciones se realizó tomando en cuenta el punto isopícnico de las proteínas y tomando como referencia la proteína mas pesada asociada a la membrana se estableció la división en las fases obtenidas. De acuerdo a esto, se estableció una fracción asociada a caveolas (AC, fracciones 1-6) y una fracción no asociada a caveolas (NAC, fracciones 7-11).

En las células sin infectar no se detectó la presencia de la utrofina en las fracciones AC, solo se encontró en las fracciones NAC, PTRF se encontró tanto en las fracciones AC como en las fracciones NAC y la caveolina-1 se encontró asociada al complejo, es decir, su localización se evidenció en las fracciones AC.

La infección por MAB claramente modificó la presencia de PTRF y caveolina-1. La presencia de PTRF se vio notablemente disminuida al grado de desaparecer de las fracciones asociadas a la caveola y con una disminución notable en las fracciones NAC comparadas con las células sin infectar. En el caso de la caveolina-1, ésta solo se movilizó de la fracción 1 a la 2. La localización de la utrofina no se modificó por la infección de MAB.

En el caso del aislado meníngeo, se observaron resultados similares. La utrofina no sufrió cambios notables comparada con las células sin infectar y PTRF solo se evidenció en las fracciones NAC, indicando una posible degradación de esta proteína debida a la infección por el aislado meníngeo. A diferencia de lo observado en la infección por MAB, el aislado meníngeo causó un mayor desplazamiento de la caveolina-1, ya que ésta fue evidente a partir de la fracción 3.

En la figura 16 se observa nuevamente como en una infección con MAB el PTRF disminuye su intensidad, al grado de desaparecer, mientras que en la infección con el aislado meníngeo ya no se detectó. En las bandas correspondientes a la ubicación de eNOS se



observa como en una infección con MAB la eNOS es completamente movilizada a las fracciones no asociadas a caveolas, lo que denota su salida del complejo de proteínas asociadas a utrofina.

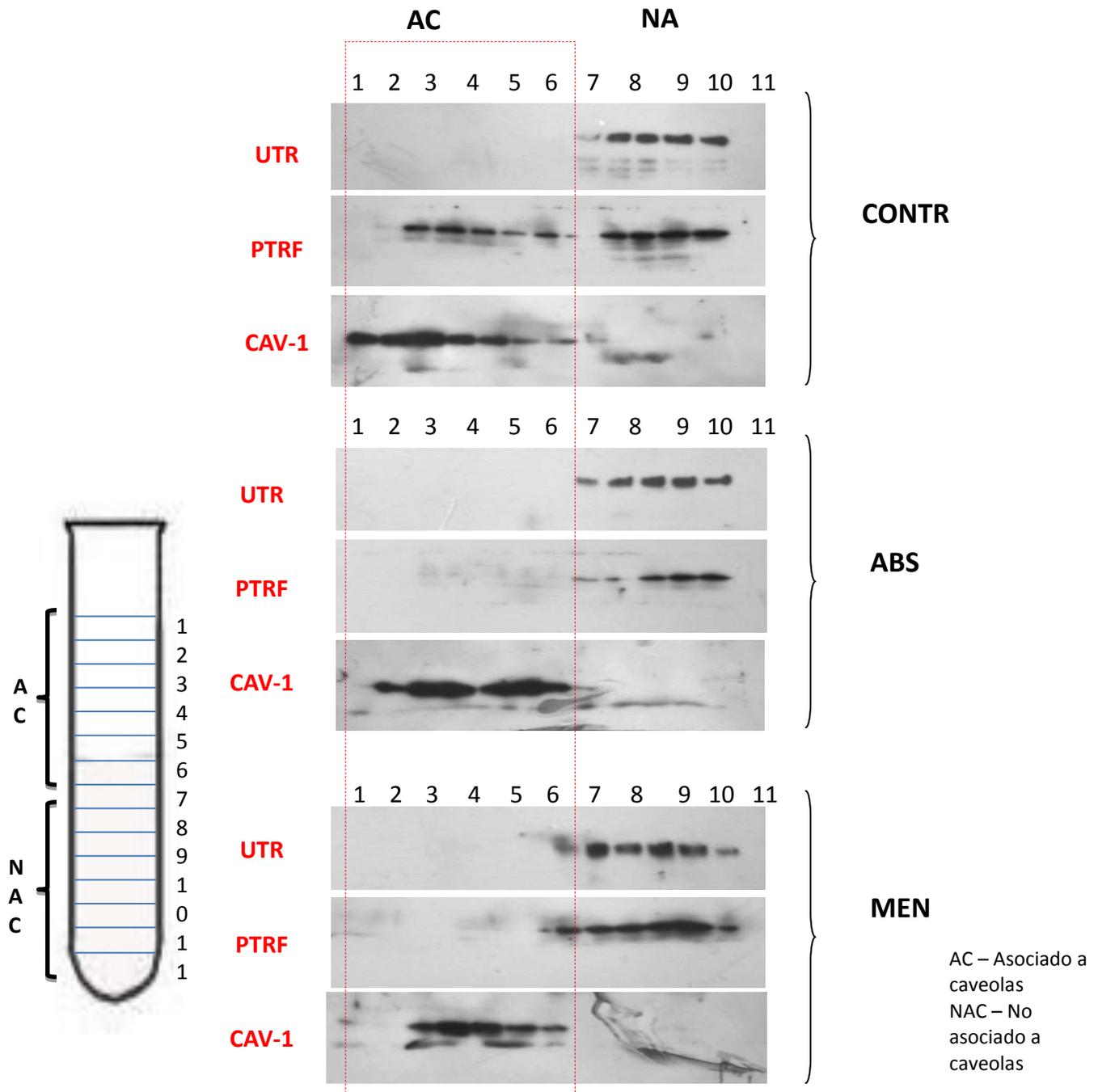




Figura 15. **Determinación de la liberación de la eNOS del complejo de proteínas por la infección micobacteriana en HUVEC de cultivo primario mediante western blot.** Se utilizaron anticuerpos primarios específicos, a una dilución 1:100, y un anticuerpo secundario acoplado a una enzima, a una dilución 1:2000. Se reveló por quimioluminiscencia.

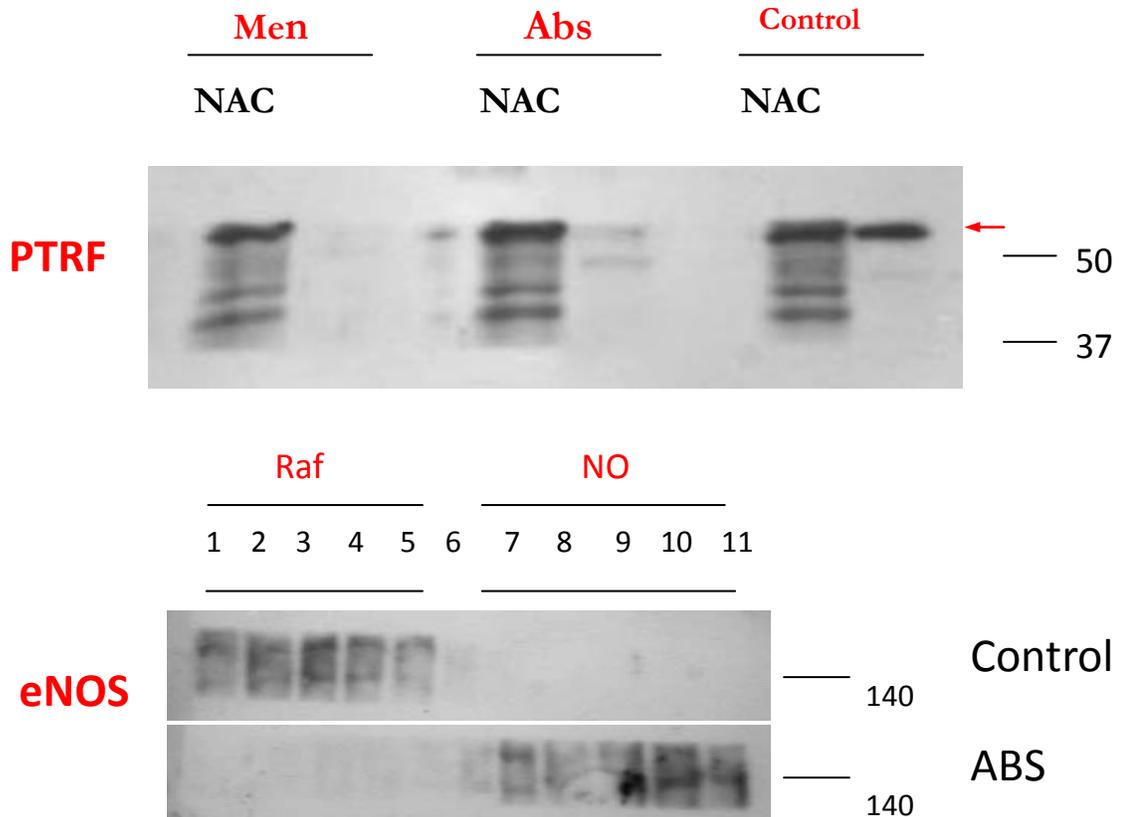


Figura 16. **Determinación de la liberación de la eNOS del complejo de proteínas por la infección micobacteriana en HUVEC de cultivo primario mediante western blot.** Se utilizaron anticuerpos primarios específicos, a una dilución 1:100, y un anticuerpo secundario acoplado a una enzima, a una dilución 1:2000. Se reveló por quimioluminiscencia.



7. DISCUSION

Se ha demostrado que células consideradas como no fagocíticas como las células epiteliales, fibroblastos y endoteliales son susceptibles a la infección por MTB (Bermúdez y Sangari *et al*, 1996, García-Pérez y Villagómez-Palatto, *et al.* 2011, Hernández-Pando y Aguilar, *et al.* 2001). De igual forma, se ha propuesto que estas células contribuyen a la persistencia de MTB convirtiéndose en reservorios que favorecen su estado de latencia y sobrevivencia en el organismo.

En este trabajo evidenciamos la susceptibilidad de las células endoteliales de cordón umbilical de humano tanto de cultivo primario como de una línea celular para establecer y comparar la utilidad de la línea celular como modelo de estudio, y eventualmente reemplazar al cultivo primario de células HUVEC.

Iniciamos el estudio determinando las UFC y encontramos que las células endoteliales son susceptibles a la infección por las micobacterias tanto las patogénicas (MTB y MAB) como la no patogénica (MSM). Además reconocimos que los aislados tanto pulmonares como meníngeos podían infectar a esta estirpe celular, sin embargo el aislado meníngeo B se caracterizó por alcanzar una multiplicación intracelular importante, similar a la que presentó MAB, en comparación el aislado pulmonar si bien fue infectivo, no presentó replicación intracelular ni tampoco fue eliminado por las células, mostrando así un comportamiento similar a la cepa de MTB H37Rv. Estos hallazgos corroboraron lo descrito anteriormente por nuestro grupo de trabajo (García-Pérez y Villagómez-Palatto, *et al.* 2011), sobre el carácter infectivo y la sobrevivencia intracelular diferencial de las cepas MAB, MTB H37Rv y MSM en las células HUVEC. Por otro lado apoyan la hipótesis de que los aislados pulmonares (a diferencia de los meníngeos) pudieran expresar en estas células el estado de latencia, sin embargo para corroborar esta hipótesis es necesario realizar estudios que por ejemplo pongan en evidencia la expresión de proteínas de latencia por



parte de la micobacteria como son la alfa-cristalina durante la infección de HUVEC (Sherman y Voskuil *et al*, 2001).

El siguiente mecanismo analizado durante la infección de las HUVEC, fue la producción de NO, metabolito fundamental para la homeostasis de estas células (Barnes, 1993). Encontramos que el aislado meníngeo B disparó la producción más alta de NO, casi de igual magnitud a la obtenida por MAB. La elevada producción de no inducida por MAB fue similar a la descrita por García-Pérez en 2011. En cuanto al aislado pulmonar, los niveles de no fueron parecidos a los producidos con la cepa H37Rv, y de igual forma comparables a los reportados por García-Pérez *et al.*, en 2001. La bacteria que indujo los menores niveles de no fue MSM, concordando con los autores anteriormente mencionados. la elevada producción de no inducida por el aislado meníngeo es probable que contribuya al deterioro celular observado después de las 48 h de infección, y muy probablemente la presencia sola del metabolito no es suficiente para contener el desarrollo bacilar ya que el efecto bactericida del no es por la presencia de peroxinitritos (Radi y Beckman *et al*, 1991; Timmins y Master *et al*, 2004) y como discutiremos adelante tanto la cepa meníngeoa como MAB son los menores inductores de ROS y consecuentemente de la menor cantidad de los metabolitos tóxicos. En cuanto al aislado pulmonar y H37RV, indujeron niveles intermedios de NO, sobretodo en el inicio de la infección, García-Pérez *et al.*, (2011), sugirieron que esta situación pudiera ser la responsable de la expresión del estado de latencia característico de MTB, y de acuerdo a nuestros resultados podríamos sugerir que los aislados pulmonares, a diferencia de los meníngeos, al estar expuestos a niveles elevados de no podrían entrar en estado de latencia (Marshall y Wangoo *et al*, 2001; Timmins y Master *et al*, 2004). En comparación, MSM que indujo la menor cantidad de NO, pero la mayor de ROS (VER ADELANTE), es probable que fuera controlada por la buena cantidad de metabolitos tóxicos derivados del oxígeno y generados a causa de la infección.



Por otro lado, de acuerdo con varios grupos de trabajo, un aumento en la producción de NO, conlleva a una disminución en la producción de ROS (Kondrikov y Fonseca *et al*, 2010; Försterman, 2010), ya que ambos son metabolitos son reguladores de enzimas claves para mantener la homeostasis de la célula, de tal forma que en las infecciones en donde se da una producción preferente de uno de los metabolitos (como el caso de MAB o MTB), se podría afectar la homeostasis celular y contribuir con la sobrevivencia bacteriana. De tal suerte que durante la infección con MAB y MTB se observó una pobre producción de ROS, mientras que la infección con MSM indujo la mayor producción de estos metabolitos y los aislados pulmonares y H37Rv dispararon niveles intermedios de ROS. De esta forma los ROS parecieran ser metabolitos fundamentales NO solo para la eliminación bacteriana y la homeostasis de la célula endotelial.

Kondrikov, *et al.* (2010), relacionó a la β -actina con la generación de NO y ROS, y señala a la actina como una molécula activadora de eNOS, de igual manera describe que cuando actina se une a eNOS en su extremo N-terminal (dominio de oxigenasa) favorece su actividad como enzima productora de NO. En nuestro estudio concordantemente con la observación de Kondrikov, observamos que durante la infección con MAB y MTB se presentó un rearrreglo importante de la actina, niveles elevados de NO y una disminuida producción de ROS, lo que sugiere que la infección con estas bacterias favorece la unión de actina a eNOS para sobre producir NO y disminuir la producción de ROS. En comparación durante la infección con el aislado pulmonar y la cepa H37Rv el rearrreglo del citoesqueleto no fue tan marcado y tras algún tiempo las células retornaron a su estado basal. Finalmente MSM fue la micobacteria que indujo los menores cambios en el citoesqueleto, los menores niveles de NO y los mayores niveles de ROS. Durante la infección con MSM se activa de forma importante la fosfatidil-inositol-3 cinasa, enzima fundamental para la producción de ROS. De tal forma que la infección con MSM al NO modificar sustancialmente el citoesqueleto reduce la formación de NO, pero activa la producción de ROS y de esta manera se puede dar el control de la infección.



La eNOS requiere ser activada tanto por diversas moléculas como por diversos estímulos (Ramírez-Sánchez y Ceballos-Reyes *et al*, 2007); esta enzima se encuentra asociada a un complejo multiproteico presente en las caveolas membranales, que están conformadas por balsas lipídicas o “lipid rafts”. Estos autores pudieron evidenciar la asociación de diversas proteínas en el denominado complejo de proteínas asociadas a la utrofina (UAPC), el cual bajo un estímulo mecánico como el estiramiento, provocaba modificaciones en la caveola activación de la eNOS y aumento en los niveles de NO. Otros grupos de investigación señalaron la participación de otras proteínas del complejo como la Caveolina-1, la cual es fundamental para la formación de caveolas y señalaron la importancia de esta proteína en la producción de NO (Maniatis y Brovkovich *et al*, 2006). En el presente trabajo analizamos LA distribución y movilización de 4 diferentes proteínas presentes en el complejo UAPC, como son la caveolina -1, la cavina-1 o PTRF, la utrofina y la eNOS. Mediante inmunofluorescencia analizamos la distribución de la caveolina-1 y encontramos que su distribución no era sustancialmente diferente al comparar las células sin infectar y las células infectadas con MAB o MTB, presentándose distribuida en la totalidad de la célula. Al realizar un análisis más preciso como lo es la separación en gradientes de la fracción membranal de la no membranal y su posterior análisis de proteínas mediante Western-blot, encontramos una movilización de ésta proteína de las fracciones membranales menos densas a unas de mayor densidad pero permaneciendo aun en la región membranal. Por otro lado, se ha descrito que CAVEOLINA-1 es una proteína que puede estar asociada y no asociada a caveolas (Rath y Dessy *et al*, 2009; Salahaldin y Park *et al*, 2009). Para la formación de la caveola es necesario que caveolina-1 reclute a la cavina-1 o PTRF, lo cual dará estabilización a la estructura de la invaginación. En comparación, la proteína PTRF o cavina-1, se puede encontrar tanto en las caveolas como en forma libre en el citoplasma (Sengupta y Philip *et al*, 2008). En este trabajo pudimos observar que durante LA infección con MAB, PTRF deja de estar asociada a las caveolas, sin embargo no se encontró un aumento (o movilización) hacia la fracción no asociada a caveolas, lo que nos podría estar sugiriendo que durante el proceso de



infección micobacteriana esta proteína se está degradando, éste fenómeno se observa de igual manera en las células infectadas con el aislado meníngeo; la inmunofluorescencia confirmó estas observaciones, de tal forma que no solamente no hubo una redistribución de la marca, sino que la proteína estuvo prácticamente ausente en las células infectadas con ambas bacterias, confirmando la hipótesis de la destrucción de esta proteína a consecuencia de la infección. Otra proteína estudiada fue la utrofina, la cual es el análogo estructural y funcional de la distrofina, ambas son proteínas encargadas de evitar el daño a las células durante los estímulos mecánicos, como son las contracciones musculares (Perkins y Davies, 2002). La utrofina es más abundante en las células endoteliales que en otras células y se ha descrito su asociación con eNOS (Ramírez-Sánchez y Ceballos-Reyes *et al*, 2007). En nuestro análisis no se pudo detectar la utrofina en el estudio de gradiente y Western-blot, sin embargo, en el estudio de inmunofluorescencia no se observaron cambios importantes en la redistribución o concentración de esta proteína durante la infección con MAB o MTB. El principal metabolito alterado durante la infección de las células endoteliales es el NO, por lo que fue fundamental analizar la movilización y redistribución de eNOS durante el proceso infeccioso. Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia demostraron que durante la infección, la eNOS se concentra de en la región perinuclear, además de que la marca se observa mucho más intensa sugiriendo una mayor concentración de la proteína. Por otro lado, el análisis de gradiente demostró que la proteína se disocia de las fracciones caveolares, presentándose en regiones citoplasmáticas. Esto sugiere que la enzima se libera del complejo durante el proceso infeccioso, activándose para producir NO.

En este trabajo por primera vez se evidencia la movilización de eNOS y se correlaciona su participación en la patogénesis de la infección micobacteriana, principalmente en la ocasionada por los aislados de tuberculosis meníngea, señalando además la relevancia de PTRF, y su probable destrucción durante el proceso infeccioso. Por otro lado señala el papel fundamental de la movilización del citoesqueleto en la activación de la eNOS.



Finalmente este trabajo sugiere que existen subtipos de micobacterias tuberculosas, y que aquellas de tropismo hacia sistema nervioso central, poseen características que le permiten modificar al endotelio y de esta forma “abrir” el camino hacia el SNC, interesantemente, algunas de estas características son compartidas con otras micobacterias como el MAB. Para poder controlar a la TB meníngea, es importante reconocer estos factores de patogenicidad exhibidos por los aislados meníngeos.



8. CONCLUSIONES

- Las células HUVEC de una línea celular exhiben una respuesta comparativamente semejante a las HUVEC de cultivo primario ante la infección con micobacterias, por lo que pueden ser utilizadas como modelo de estudio de infección de HUVEC.
- Los aislados meníngeos muestran una capacidad infectiva diferente a los aislados pulmonares.
- Las células HUVEC responden de forma diferencial cuando son infectadas con aislados meníngeos o pulmonares.
- En las micobacterias tuberculosas existen subtipos y aquellas de tropismo hacia SNC modifican de forma importante a la célula endotelial.



9. BIBLIOGRAFÍA

- Amyere, M., Mettlen, M., Van Der Smissen, P., et al. Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 2002; 291:487–494.
- Arciniegas W, Orjuela DL. Tuberculosis extrapulmonar: revisión de 102 casos en el Hospital Universitario San Jorge de Pereira, 2000-2004. *Biomédica.* 2006; 26:71-80.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview. Structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 1-13.
- Barnes PJ. Nitric oxide and lung disease. *Thorax.* 1993. 48:1034-43.
- Beckman J. S. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J Dev Physiol* 1991; 15(1): 53-9.
- Benavides-Trujillo MC, Pinzón-Tovar A. Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Rev Col Anest.* 2008; 36:45-52.
- Bermudez LE, Sangari FJ, Kolonoski P, et al. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 2002; 70:140–6.
- Bermudez LE, Sangari FJ, Kolonoski P, et al. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infection and Immunity.* 2002; 70(1):140-146
- Blake DJ, Nawrotzki R, Loh NY, et al. beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc Nat Acad Sci.* 1998. 95:241-246.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, et al. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002. 82:291-329.
- Briand N, Dugail I, Le Lay S. Cavin proteins: new players in the caveola field. *Biochimie* 2010; 93: 71-77.
- Castro L, Rodriguez M, Radi R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269(47): 29409-15.



- Caws M, Thwaites G, Dunstan S, et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with Mycobacterium tuberculosis. PLoS Pathog 2008; 4: 1-9.
- Christie LJ, Loeffler AM, Honarmand S, et.al. Diagnostic challenges of central nervous system tuberculosis. Emerging Infectious Diseases. 2008; 14(9):1473-1475.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. Regulated portals of entry into the cell. Nature. 2003; 422,37–44.
- Cossart P, Veiga E. Non-classical use of clathrin during bacterial infections. Journal of Microscopy. 2008; 231(3):524-528
- Coyle C. H., Kader K. N. Mechanisms of H₂O₂- induced oxidative stress in endothelial cells exposed to physiologic shear stress. ASAIO J 2007; 53(1): 17-22.
- Díaz ML, Muñoz S, García LB. Tuberculosis en el Hospital Universitario San José, Popayán, 1998-2000. Biomédica 2004;24(Suppl.1):92-101.
- Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. Reviews in Advance. 2009; 13:23.
- Donald PR, Schaaf HS, Schoeman JF. Tuberculous meningitis and military tuberculosis: the Rich focus revisited. J Infect 2005; 50:193–5.
- Drevets DA, Leenen PJ, Greenfield RA. Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. Clin Microbiol Rev 2004; 17:323–47.
- Eckl-Dorna J, Batista FD. BCR-mediated uptake of antigen linked to TLR9-ligand stimulates B-cell proliferation and antigen-specific plasma cell formation. Blood Journal. 2009; 10:1182.
- Escobar A, Gómez-González B. Barrera hematoencefálica. Neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. Revista Mexicana de Neurociencia 2008; 9(5): 395-405.
- Estrada FJ, Mornet D, Rosas-Vargas H, et al. A novel isoform of delta-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun. 2006. 340:865-871.
- Fanning A. Tuberculosis: 6. Extrapulmonary disease. CMAJ. 1999;160:1597-603.



- Ferrer-Viant D, Jorge-Fonseca C, García-Rodríguez RE, et.al. Oxido Nitrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *Medisan*. 1998; 2(3):45-53.
- Förstermann Ulrich. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Eur J Physiol* 2010; 459: 923-939.
- Furuse M, Fujita K, Hiragi T, et al. Claudin -1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occluding. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-50.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123: 1777-88.
- García-Pérez B, Villagómez-Palatto D, Castañeda-Sánchez J, et al. Innate response of human endothelial cells infected with mycobacteria. *Immunobiology* 2011; en prensa.
- García-Pérez BE, Hernández-González JC, Luna-Herrera J, et al. Internalization of a non-pathogenic mycobacteria by macropinocytosis in human alveolar epithelial A549 cells. *Microb Pathog*. 2008; 45(1):1-6.
- García-Pérez BE, Mondragón-Flores R, Luna-Herrera J. Internalization of Mycobacterium tuberculosis by macropinocytosis in non-phagocytic cells. *Microb Pathog*. 2003; 35(2):49-55.
- Garg KR. Tuberculosis of the central nervous system. *Postgrad Med J* 1999; 75: 133-140.
- Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001. 280:F193-F206.
- Granger D. N., Korthuis R.J. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 311-32.
- Gusarov I, Starodubtseva H, Wang Z.Q. et al. Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. *J Biol Chem* 2008; 283(19): 13140-7.
- Hernández-Pando R, Aguilar D, Cohen I, et al. Specific bacterial genotypes of Mycobacterium tuberculosis cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model. *Tuberculosis* 2010; 90(4): 268-77.



- Hernández-Pando R, Cohen II, Guerrero M, et. al. Experimental model of extensive *M. tuberculosis* dissemination with brain infection induced by specific bacterial genotype.
- Hernández-Pando R, Orozco EH, Arriaga K, et al. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997, 90: 507-516
- Hoffman JA, Katatos FC, Janeway CA Jr, et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 1999; 284:1313-1318.
- Hussain R, Talat N, Shahid F, et al. Biomarker changes associated with tuberculin skin test (TST) conversion: a two-year longitudinal follow-up study in exposed household contacts. *PLoS ONE* 2009; 4(10): e7444.
- Hyun-Seok P, Young-Jin S. Multiple Tuberculoma involving the brain and spinal cord in a patient with miliary pulmonary Tuberculosis. *J Korean Neurosurg Soc*. 2008; 44:36-39.
- Ignarro L. J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* 1999; 19(2): 51-71.
- Iseman MD. *A clinician's guide to tuberculosis*. Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins 2000. P.199-252.
- Ivanov AI, Pharmacological inhibition of endocytic pathways: Is it specific enough to be useful?, *Methods in Molecular Biology*, vol. 440
- Jain SK, Paul-Satyaseela M, Lamichhane G, et.al. Mycobacterium tuberculosis invasion and traversal across an in vitro human blood-brain barrier as a pathogenic mechanism for central nervous system Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2006; 193:1287-95.
- James SL. Role of nitric oxide in parasitic infection. *Microb Rev*. 1995; 59:533-547.
- Jasmin J.F., Yang M, Lacovitti L, et al. Genetic ablation of caveolin-1 increases neural stem cell proliferation in the subventricular zone (SVZ) of the adult mouse brain. *Cell Cycle* 2009; 23(8): 3978- 3983.
- Kerr MC, Teasdale RD. Defining Macropinocytosis. *Traffic (The Authors Journal Compilation)*. 2009; 10:364-371.



- Kirsch M, Korth H.G., Stenert V, et al. The autoxidation of tetrahydrobiopterin revisited. Proof of superoxide formation from reaction of tetrahydrobiopterin with molecular oxygen. *J Biol Chem* 2003; 278(27): 24481-90.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994; 298:249-258.
- Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Bull World Health Organ* 2001; 79:71–5.
- Koivisto A, Matthias A, Bronnikov G, et al. Kinetics of the inhibition of mitochondrial respiration by NO. *FEBS Lett* 1997; 417(1): 75-80.
- Kondrikov D, Fonseca F.V., Elms S, et al. β -actin association with endothelial nitric-oxide synthase modulates nitric oxide and superoxide generation from the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285(7): 4319-4327.
- Kumar P, Srivatsava MVP, Singh S, et.al. Filtration of cerebrospinal fluid Improves isolation of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology.* 2008; 46(8):2824-2825.
- Kwan A.L., Solenski N.J., Kassell N.F., et al. Inhibition of nitric oxide generation and lipid peroxidation attenuates hemolysate-induced injury to cerebrovascular endothelium. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139(3): 240-7.
- Maniatis A. N., Brovkovich V, Allen S.E. et al. Novel mechanism of endothelial nitric oxide synthase activation mediated by caveolae internalization in endothelial cells. *Circ. Res.* 2006; 99: 870-877.
- Marshall B.G., Wangoo A, O'Gaora P, et al. Enhanced antimycobacterial response to recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing latency-associated peptide. *Infection and Immunity* 2001; 69(11): 6676-6682.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997; 91:295-298.
- Menozzi FD, Reddy VM, Cayet D, et al. Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin adhesion (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions. *Microb Infect* 2006; 8: 1-9.
- Michel R. N., Chin E.R., Chakkalakal J.V., et al. Ca^{2+} /calmodulin-based signaling in the regulation of the muscle fibre phenotype and its therapeutic potential via modulation of



utrophin a and myostatin expression. *Physiol. Nutr. Metab* 2007; 32: 921-929.

- Moon S, Son J, Chang W. A case of oculomotor nerve palsy and choroidal Tuberculous granuloma associated with Tuberculous Meningoencephalitis. *Korean Journal of Ophthalmology*. 2008; 22:201-204.
- Nagotkar L, Shanbag P, Dasarwar N. Cerebral Salt Wasting Syndrome Following Neurosurgical Intervention in Tuberculous Meningitis. *Indian Pediatrics*. 2008; 45:598-601.
- Namer IJ, Steibel J. Antibody directed against mannan of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope provokes blood-brain barrier breakdown. *Journal of Neuroimmunology*. 2003; 103:63-68.
- Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*. 1991; 3:65-70.
- Navarrete AC, Rosas KM, Sáenz MD, et.al. Síndrome cerebeloso secundario a granulomas de fosa posterior y tuberculosis multisistémica en un paciente con SIDA. *Rev Chil Infect*. 2008; 25(2):122-126.
- O'Brien L, Carmichael J, Lowrie DB, et al. Strains of *Mycobacterium tuberculosis* differ in susceptibility to reactive nitrogen intermediates in vitro. *Infect Immun*. 1994; 62:5187-5190.
- Oliván-del-Cacho MJ, Ferrero-Cáncer M, Fayed-Miguel N, et.al. Tuberculosis diseminada con afectación grave del sistema nervioso central poco sintomática. *An Pediatr (Barc)*. 2008; 69(2):181-96.
- Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, et al. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis*. 2005; 62 (Suppl II): ii17-ii21.
- Parton, R.G., and Richards, A.A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*. 2003; 4, 724–738.
- Perkins K. J., Davies K. E. The role of utrophin in the potential therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 2002; 12: 78-89.
- Radi R, Beckman J. S., Bush K. M., et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288(2):481-7
- Ramirez-Sánchez I, Ceballos-Reyes G, Rosas-Vargas H, et al. Expression and function of



- utrophin associated protein complex in stretched endothelial cells: dissociation and activation of eNOS. *Frontiers in Bioscience* 2007; 12: 1956-1962.
- Ramírez-Sánchez I, Ceballos-Reyes G, Rosas-Vargas H, et al. Expression and function of utrophin associated protein complex in stretched endothelial cells: dissociation and activation of eNOS. *Front Biosci.* 2007; 12:1956-62.
 - Rando TA. The dystrophin glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle and Nerve.* 2001; 24:1575-1594.
 - Rath G, Dessy C, Feron O. Caveolae, caveolin and control of vascular tone: nitric oxide (NO) and endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2009; 60(4): 105-109
 - Raviglione MC. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis.* 2003;83:4-14.
 - Reed MB, Domenech P, Manca C, et al. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strain that inhibits the innate immune response. *Nature* 2004; 431: 84-87.
 - Restrepo BI, Pino PA, Volcy M, et.al. Interpretation of mycobacterial antibodies in the cerebrospinal fluid of adults with tuberculous meningitis. *Tropical Medicine and International Healt.* 2008; 13(5):653-658.
 - Rich AR, McCordock HA. Pathogenesis of tubercular meningitis. *Bull John Hopkins Hosp.* 1933;52:5–13
 - Roitt I. 2001. *Inmunología Fundamental.* 10ª ed. Editorial Médica Panamericana, pág: 6-10.
 - Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22:11–28.
 - Sadek M, Yue FY, Lee EY, et.al. Clinical and immunologic features of an atypical intracranial *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection compared with those of pulmonary MAC infections. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2008; 15(10):1580-1589.
 - Salahaldin A. T., Park S, Thompson T.C. Caveolin-1 regulates VEGF-stimulated angiogenic activities in prostate cancer and endothelial cells.
 - Sengupta P, Philip F, Scarlata S. Caveolin-1 alters Ca²⁺ signal duration through specific interaction with G α_q family of G proteins. *J Cell Sci.* 2008; 121(9):1363-1372.
 - Sherman D.R., Voskuil M, Schnappinger D, et al. Regulation of the *Mycobacterium*



tuberculosis hypoxic response gene encoding α -crystallin. PNAS 2001; 98(13): 7534-7539.

- Sung-Han K, Chu K, Su-Jin C, et.al. Diagnosis of central nervous system tuberculosis by T-cell-based assays on peripheral blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008; 15(9):1356-1362.
- Swanson, J.A., and Watts, C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*. 1995; 5, 424–428.
- Takahashi K, Mulliken B.J., Kozakewich H.P.W., et al. Cellular markers than distinguish the phases of Hemangioma during Infancy and childhood. *J. Clin. Invest*. 1994; 93: 2357-2364.
- Talati NJ, Roupael N, Kuppalli K, et.al. Spectrum of CNS disease caused by rapidly growing mycobacteria. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8:390-398.
- Tatoyan A, Giulivi C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1998; 273(18):11044-8.
- Taylor B.S., Kion Y. M., Wang Q, et al. Nitric oxide down regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. *Arch Surg* 1997; 132(11): 1177-83.
- Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhunt M, et al. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains wich are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell* 2002; 13:238-50.
- Timmins G.S., Master S, Rusnak F, et al. Requirements for nitric oxide generation from isoniazid activation in vitro and inhibition of mycobacterial respiration in vivo. *Journal of Bacteriology* 2004; 186(16): 5427 - 5431
- Tsenova L, Bergtold A, Freedman VH, Young RA, Kaplan G. Tumor necrosis factor alpha is a determinant of pathogenesis and disease progression in mycobacterial infection in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5657-62.
- Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 1999; 9: 268-73.
- Umezawa K, Akaike T, Fuji S, et.al. Induction of nitrix oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infect Immun*. 1997; 65:2932-2940.
- Van der Flier M, Hoppenreijts S, Van Rensburg AJ, et.al. Vascular endothelial growth factor and blood-brain barrier disruption in Tuberculous Meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23:608-613.



-
- Vila B, Martín C, Leal P, et.al. Meningitis tuberculosa. A propósito de un caso. *Med Intensiva*. 2008; 32(5):258-61.
 - Wei XQ, Charles LG, Smith A, et.al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*. 1995; 375:408-411.
 - Wu HS, Kolonoski P, Chang Y, Bermudez L. Invasion of the brain and chronic central nervous system infection after systemic *Mycobacterium avium* complex infection in mice. *Infect and Immun* 2000; 68: 2979-2984.



10. APENDICE

Agar Middlebrook 7H9

Medio de cultivo (DIFCO)	4.7 g
Tween 80 (SIGMA)	0.5 g
Glicerol (J.T.Baker)	2.0 ml
Agua destilada	900 ml

Mezclar perfectamente los ingredientes anteriores. Esterilizar a 15 libras de presión y 121-124 ° C por 10 minutos. Adicionar asépticamente, cuando el medio se encuentre a 45° C, 100 ml de enriqueciendo OADC, agitar para lograr una solución homogénea

Agar Middlebrook 7H10

Medio de cultivo (DIFCO)	19 g
Glicerol (J.T.Baker)	5 ml
Agua destilada	900 ml

Mezclar perfectamente los ingredientes anteriores. Esterilizar a 15 libras de presión y 121-124 ° C por 10 minutos. Adicionar asépticamente, cuando el medio se encuentre a 45° C, 100 ml de enriqueciendo OADC, agitar para lograr una solución homogénea.

Albúmina sérica bovina al 5%

Albúmina bovina fracción V	5.0 g
Agua destilada	100 ml

Agitar hasta disolver y esterilizar por filtración.

Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 0.25 %



SDS (SIGMA) 0.25 g

Agua destilada 100 ml

Agitar hasta disolver y esterilizar por filtración.

Enriquecimiento OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa)

Solución de Albúmina

Solución de Oleato de Sodio

Albúmina bovina fracción V(ROCHE) 50 g Hidróxido de sodio 0.05 N 60 ml

Agua destilada 900 ml Ácido oleico 0.6 ml

Agitar para disolver. Calentar a 56° C y agitar hasta disolución.

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH al 4%

Solución de Dextrosa 50%

Solución de Catalasa Técnica

Dextrosa (Glucosa) (SIGMA) 25 g

Catalasa (SIGMA) 100 µg

Agua destilada 50 ml

Agua destilada 100 µl

Hervir para disolver

Agitar para disolver.

- Adicionar 60 ml de solución de oleato de sodio a la solución de albúmina. Agitar y ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1 N.
- Calentar a baño maría a 56° C por una hora. Agitar periódicamente.
- Adicionar 40 ml de solución de dextrosa 50%.
- Adicionar 20 µl de la solución de catalasa técnica.
- Agitar hasta homogeneizar la solución.
- Esterilizar la solución tibia, por filtración por membrana de 0.22 µm de diámetro de poro.
- Depositar alícuotas en contenedores estériles.
- Almacenar a 2-8° C de temperatura.



N- naftil etilendiamina al 0.5%

- a) Dimetil- a- naftil- amina 5.0 g
- b) Ácido acético 5N 1000 ml

Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS)

- a) A 900 ml de agua destilada adicionar el medio, agitar hasta disolver, sin calentar.
- b) Adicionar 3.7 g de bicarbonato de sodio ó 49.3 ml de solución de bicarbonato de sodio estéril, 7.5% w/v. Agitar hasta disolver.
- c) Ajustar el pH, agitando la mezcla, 0.1 a 0.3 unidades de pH por debajo del valor deseado. Usar HCl 1 N o NaOH 1N.
- d) Agregar cuanto sea suficiente de agua destilada para tener un volumen de 1lt.
- e) Esterilizar inmediatamente por filtración por membrana de 0.22 μ m de diámetro de poro.
- f) Depositar alícuotas en contenedores estériles.
- g) Almacenar a 2-8° C de temperatura.

2) Suero Fetal Bovino (SFB) descomplementado

- a) Depositar alícuotas de 10 ml de SFB en tubos cónicos de plástico estériles.
- b) Incubar en baño maría a 56° C por 30 minutos. Agitar periódicamente.
- c) Almacenar a -70° C.

Sulfanilamida al 0.8%

- a) Ácido sulfanílico 8.0 g
- b) Ácido acético 5N 1000 ml



Tinción de Ziehl - Neelsen

- a) Cubrir la muestra con fucsina fenicada.
- b) Calentar hasta emisión de vapores y mantener tal emisión por cinco minutos.
- c) Enjuagar con agua corriente.
- d) Cubrir con alcohol-ácido por 30 segundos.
- e) Enjuagar con agua corriente
- f) Cubrir con azul de metileno 0.3% por minuto.
- g) Enjuagar con agua destilada.
- h) Dejar secar la muestra.