

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA RNA-Seq PARA EL ESTUDIO DEL  
TRANSCRIPTOMA DE *Mycobacterium tuberculosis* CULTIVADA EN MEDIO  
RICO EN ÁCIDOS GRASOS Y SOMETIDA A ESTRÉS CELULAR *In Vitro*

JUAN PABLO GARCÍA LÓPEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SAN JUAN DE PASTO  
2011

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA RNA-Seq PARA EL ESTUDIO DEL  
TRANSCRIPTOMA DE *Mycobacterium tuberculosis* CULTIVADA EN MEDIO  
RICO EN ÁCIDOS GRASOS Y SOMETIDA A ESTRÉS CELULAR *In Vitro*

JUAN PABLO GARCÍA LÓPEZ

Trabajo de grado en modalidad de pasantía presentado como requisito para optar  
el título de Biólogo

Directores:

EDITH MARIELA BURBANO ROSERO

M.Sc. Ph.D. en Microbiología

JUAN GERMÁN RODRÍGUEZ

Ph.D en Bioquímica

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
SAN JUAN DE PASTO  
2011

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado son responsabilidad exclusiva del autor”

Artículo 1° del acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

Nota de Aceptación

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente de Jurado

---

Firma del Jurado

---

Firma del Jurado

San Juan de Pasto, 22 de Noviembre del 2011

## DEDICATORIA

A la vida misma por darme ilusión y ganas de estudiarla. Por mostrarme que conociéndola puedo preguntarme más.

A mi familia por brindarme un gran apoyo, comprensión y préstamo de su aliento a mis ganas de alcanzar esta meta. En especial a mi Madre y Padre por sus consejos y especial cariño.

A mis amigos por compartir pasos en este camino, por su tiempo prestado y sus voces con sonrisas, lágrimas y fuerza.

A todos aquellos que inspiran las ideas de un científico para confrontar los problemas de la vida.

## AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios por ser el amigo que me ayudo a concluir esta meta con salud y conciencia.

A mis padres Gladis Amelia López y Javier Gilberto García, por darme el apoyo, cariño y comprensión.

Al profesorado del Departamento de Biología de la Universidad de Nariño, por brindarme las herramientas de mi labor en ciencia. En especial a las profesoras Fedra Lorena Ortiz por darme buenos cimientos en investigación, Dolly Margott Revelo por permitirme adentrar en el mundo de la microbiología y Milena Guerrero por darme visión en ciencia.

A la directora del Departamento de Biología Martha Sofía Gonzales Insuasti por prestarme su ayuda incondicional y hacerme conocer la amistad en Biología.

Al grupo Salud Pública del Centro de Estudio en Salud de la Universidad de Nariño y su directora María Clara Yepez por el acompañamiento y colaboración en mis investigaciones de pregrado. En especial a los integrantes que me acompañaron en el laboratorio.

A la profesora Sandra Jaqueline Mena Huertas por su guía como docente y amiga, y en especial por darme claridad para comprender los problemas en investigación.

A la profesora Edith Mariela Burbano, un especial agradecimiento, por llegar al momento exacto en mi carrera para la culminación de mis estudios. En especial por mostrarme que no hay fronteras en ciencia.

A la Corporación Corpogen por la pasantía, un especial agradecimiento por incluirme como uno más de su familia y permitirme comprender lo significativo de la aplicación en ciencia. En especial a la Directora Ejecutiva Patricia del Portillo y a la Directora Científica María Mercedes Zambrano, quienes aprobaron mi estancia como pasante en sus laboratorios.

Al grupo de Micobacterias de la Corporación Corpogen por sus enseñanzas en investigación de punta. Destacando a Juan Germán Rodríguez, Adriana Carolina Hernández y Carolina Mazo por sus consejos y paciencia como amigos y compañeros de trabajo. Totalmente agradecido.

A los profesores Alvaro Pazos y Luz Estela Lagos, quienes dedicaron tiempo para corregir este documento.

A mis compañeras de semestre quienes estuvieron conmigo a lo largo de toda mi carrera, Jazmín Vanessa Pérez y Cindy Nathaly Nicola, por brindarme calor de amistad día y noche.

A mis mejores amigos Francisco Jurado y Lady Nathaly Hache por darme ánimos de seguir adelante y brindarme sus cálidos abrazos en el trascurso de mi vida.

A mis profesores de la vida Johan Byron Rincón, Mario Risueño y Vicky Loaiza, por ayudarme a encontrar el equilibrio en las cosas.

A quienes me acompañaron en los comienzos de mi carrera Karen Castro y Martin Delgado por darme el impulso que necesitaba. A Jairo Arley Coral un agradecimiento por ser un buen amigo.

A las personas que me acompañaron en mi estancia en Bogotá, es especial a Harlly José Jiménez y Mae Sánchez Taylor por sus consejos, su apoyo y presencia.

Finalmente a la Universidad de Nariño por su enseñanza resumida en “tanto poseemos, cuanto sabemos”.

## RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad pandémica con elevadas tasas de incidencia y mortalidad alrededor del mundo; las estadísticas muestran que aproximadamente 1/3 de la población mundial se encuentra infectada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de la enfermedad. En la tuberculosis latente (estadio asintomático para el paciente), *M. tuberculosis* adopta un estado de dormancia, consecuencia de las condiciones de estrés a las que es sometido (inanición de nutrientes, hipoxia, pH ácido, etc.). La literatura reporta que en estas condiciones el patógeno puede usar los ácidos grasos como fuente de nutrientes, induciendo una respuesta de adaptación metabólica, y la expresión diferencial de genes. Dado el poco conocimiento sobre el comportamiento de la bacteria en estado dormante, y sobre los mecanismos de expresión génica que este microorganismo manifiesta en este estado, el presente estudio se enfocó en estandarizar la técnica de secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) acoplada a la plataforma de *Illumina*, con el propósito de estudiar el transcriptoma (conjunto de rRNA resultante de la traducción del genoma bajo determinadas condiciones) de *M. tuberculosis* cultivada en medio rico de ácidos grasos y sometida a estrés celular *in vitro*, todo esto como una alternativa para determinar biomarcadores moleculares y blancos terapéuticos. La técnica de RNA-Seq se realizó utilizando RNA de la cepa H37Rv cultivada en medios Dubos suplementado con ácidos grasos, y sometido a hipoxia; para la construcción de la librería direccional de cDNA, se modificaron las etapas de remoción de rRNA y fragmentación de mRNA, teniendo en cuenta las características genómicas de *M. tuberculosis*. La estandarización de todas las etapas asociadas a la técnica permitió determinar la expresión génica cuando fue visualizada en el programa bioinformático Artemis, concluyendo que la técnica puede utilizarse en estudios futuros para el análisis del transcriptoma del patógeno.



## ABSTRACT

Tuberculosis is a pandemic disease with high incidence and mortality around the world, statistics show that approximately 1/3 of the world population is infected by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of the disease. In latent tuberculosis, an asymptomatic stage to the patient, *M. tuberculosis* adopts a state of dormancy, consequence of the conditions under which it is found. Under these conditions, in which the bacillus has been subjected to various types of stress (eg: nutrient starvation, hypoxia and acidic pH). The literature reports that under these conditions the pathogen can use fatty acids as a source of nutrients, inducing metabolic adaptive response and differential expression of genes. Given the limited knowledge about the behavior of the bacteria in dormant state, and the mechanisms of gene expression that this organism shows in this state, this study focused on standardizing the technique of mass RNA sequencing (RNA-Seq) coupled to Illumina platform, in order to study the transcriptome (the set of rRNA resulting from the translation of the genome under certain conditions) of *M. tuberculosis* grown in medium rich in fatty acids and subjected to cellular stress in vitro, all of this as an alternative to identify molecular biomarkers and therapeutic targets. The technique of RNA-Seq was performed using RNA from the H37Rv strain grown in Dubos media supplemented with fatty acids and subjected to hypoxia, for the construction of directional cDNA library were modified the rRNA removal step and the fragmentation of mRNA taking into account the genome of *M. tuberculosis*. The standardization of the all steps associated with the technique allowed us to determine gene expression when it was displayed in the Artemis bioinformatics program, concluding that the technique can be used in future studies to analyze the transcriptome of the pathogen.

## TABLA DE CONTENIDO

	<i>Pág.</i>
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO DE REFERENCIA	20
1.1 PATÓGENO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.1.1 Características celulares	20
1.1.2 Características genómicas	21
1.1.3 Mecanismo de infección	22
1.2 ESTADO DE DORMANCIA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
1.3 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
1.3.1 Metabolismo del carbono a partir de ácidos grasos	25
1.3.2 Metabolismo de Lípidos	25
1.4 PLATAFORMAS DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)	27
1.5 SECUENCIACIÓN MASIVA DE RNA (RNA-Seq)	28
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	29
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	30
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO	31
5. OBJETIVOS	32
5.1 OBJETIVO GENERAL	32
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
6. JUSTIFICACIÓN	33
7. ANTECEDENTES	34
8. METODOLOGÍA	35
8.1 CULTIVO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
8.1.1 Activación de la cepa H37Rv	35
8.1.2 Escalado del Inóculo	35
8.1.3 Construcción de tratamientos de estrés <i>in vitro</i>	35
8.1.4 Cinética de crecimiento	36
8.1.4.1 Cinética antes de disgregar células	36
8.1.4.2 Cinética después de disgregar células	36
8.2 EXTRACCIONES DE RNA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> CULTIVADA EN UN MEDIO RICO DE ÁCIDOS GRASOS	36
8.2.1 Extracción de RNA por lisis físico-química empleando <i>Bead Beater</i>	36
8.2.2 Extracción de RNA empleando otros métodos	37
8.2.2.1 Extracción de RNA por CETAB	37
8.2.2.2 Extracción de RNA por Tiozianato de Guanidina	37
8.2.2.3 Extracción por otros métodos	37
8.2.3 Cuantificación y purificación de RNA	39

8.3	EXTRACCIONES DE RNA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> CULTIVADA EN UN MEDIO RICO DE ÁCIDOS GRASOS BAJO CONDICIONES DE HIPOXIA	39
8.4	CONSTRUCCIÓN DE LAS LIBRERÍAS DE cDNA PARA RNA-SEQ A PARTIR DE RNA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> CULTIVADA EN MEDIO RICO DE ÁCIDOS GRASOS BAJO CONDICIONES DE HIPOXIA	39
8.4.1	Flujo de trabajo para la construcción de las librerías de cDNA	39
8.4.2	Remoción de RNA ribosomal (rRNA)	40
8.4.3	Construcción de cDNA a partir de mRNA	41
8.4.4	q-PCR del gen PCL1 para determinar la remoción del RNA ribosomal 16S	41
8.4.5	Construcción de la librería direccional de cDNA	41
8.5	VERIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE SECUENCIAS Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS DE RNA-Seq	43
8.6	FLUJOGRAMA DE TODA LA INFORMACIÓN	43
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
9.1	CULTIVO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	46
9.2	EXTRACCIÓN DE RNA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> CULTIVADA EN UN MEDIO RICO DE ÁCIDOS GRASOS	47
9.3	CONSTRUCCIÓN DE LAS LIBRERÍAS DE cDNA PARA RNA-Seq	51
9.3.1	Remoción de rRNA mediante el <i>Kit</i> de MICROBExpress	51
9.3.2	Fragmentación de RNA usando hidrólisis catalizada por cationes en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	53
9.3.3	Preparación de las librerías de cDNA con muestras de RNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> bajo hipoxia vs. cultivo aerobio	54
9.4	VERIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE SECUENCIAS Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS DE RNA-Seq	58
10.	CONCLUSIONES	61
11.	RECOMENDACIONES	62
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

## LISTA DE TABLAS

	<i>Pág.</i>
Tabla 1. Clasificación general de los genes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
Tabla 2. Diferencias entre las técnicas de <i>Illumina</i> y SOLiD	27
Tabla 3. Técnicas probadas para la extracción de RNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv crecida en medio Dubos AC ácidos grasos y Dubos ADC	38
Tabla 4. Programa de corrido de la q-PCR para determinar la concentración del promotor ribosomal PCL1	41
Tabla 5. Temperaturas y tiempos empleados en la fragmentación de mRNA mediante el <i>Kit</i> de Ambion	42
Tabla 6. Extracción de RNA de <i>Escherichia coli</i> con diferentes tiempos de agitación en <i>Bead Beater</i>	48
Tabla 7. Lisis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con el protocolo de CETAB	49
Tabla 8. Extracción de RNA de <i>Escherichia coli</i> mediante lisis mecánica hecha por dos <i>Bead Beater</i> diferentes variando el tiempo de lisis, utilizando fenol frío o caliente y adicionando Tiozianato de Guanidina	50
Tabla 9. Extracción de RNA de <i>Mycobacterium smegmatis</i> mediante lisis mecánica hecha por dos <i>Bead Beater</i> diferentes variando el tiempo de lisis, utilizando fenol frío o caliente y adicionando Tiozianato de Guanidina	50
Tabla 10. Fragmentación de RNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a diferentes tiempos y temperaturas con el <i>Kit</i> de Ambion	54
Tabla 11. Cuantificación de RNA mediante NanoDrop de las muestras de México antes de la construcción de librerías de cDNA	55
Tabla 12. Amplificación de las librerías de cDNA con los iniciadores de secuenciación.	56
Tabla 13. Cuantificación final de cDNA total mediante NanoDrop de las muestras de México después de la construcción de librerías	57
Tabla 14. Numero de lecturas obtenidas de la secuenciación por <i>Illumina</i> . Antes y después de filtrar por calidad	58

## LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1: Estructura y composición química de la pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
Figura 2. Promotores del operón <i>rrn</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
Figura 3. Patogénesis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
Figura 4. Curso clínico de la tuberculosis	23
Figura 5. Vía del glicoxilato por el cual se degradan los ácidos grasos en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
Figura 6. Sistema FAS I para la síntesis de ácidos grasos en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , en el que se aprecia el gen <i>fas</i> y el ácido graso que codifica	26
Figura 7. Flujo de trabajo de la construcción de la librería direccional de cDNA	40
Figura 8. Flujograma 1 de las etapas presentadas en la metodología	44
Figura 9. Flujograma 2 de las etapas presentadas en la metodología	45
Figura 10. Tinción Ziehl-Nielsen del precipitado obtenido después de la lisis mecánica	48
Figura 11. Extracción de RNA de <i>Escherichia coli</i> con diferentes tiempos de agitación en <i>Bead Beater</i> .	48
Figura 12. Lisis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con el protocolo de CETAB	49
Figura 13. Extracción de RNA de <i>Escherichia coli</i> mediante lisis mecánica hecha por dos <i>Bead Beater</i> diferentes variando el tiempo de lisis, utilizando fenol frío o caliente y adicionando Tiozianato de Guanidina	50
Figura 14. Extracción de RNA de <i>Mycobacterium smegmatis</i> mediante lisis mecánica hecha por dos <i>Bead Beater</i> diferentes variando el tiempo de lisis, utilizando fenol frío o caliente y adicionando Tiozianato de Guanidina	50
Figura 15. Resultados de la cuantificación de RNA total de dos ensayos de remoción de rRNA	52
Figura 16. Resultados de la cuantificación de PCL1 de dos ensayos de remoción de rRNA	52
Figura 17. Fragmentación de RNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en diferentes tiempos y a diferentes temperaturas con el Kit de Ambion	54
Figura 18. Enriquecimiento por q-PCR de las librerías de cDNA	56
Figura 19. Amplificación de las librerías de cDNA con los iniciadores de secuenciación.	56
Figura 20. Captura de ventana del programa Artemis con los datos procesados de RNA-Seq	60

## GLOSARIO

*Bead Beater*: Homogenizador que permite agitar viales a grandes revoluciones. Dependiendo de las perlas que se adicionen en los viales, este objeto puede ser empleado para disgregar células o realizar rompimiento de paredes celulares.

cDNA: DNA complementario sintetizado a partir de rRNA

DNAsas y RNAsas: Enzimas encargadas de degradar DNA y RNA respectivamente.

Estado de Dormancia: Estado no replicativo del microorganismo en el cual se mantiene baja actividad metabólica.

Expresión génica o genética: Niveles de expresión de genes transcritos en un estado o condición fisiológica celular.

Fagolisosoma: Es una fusión del lisosoma primario con una vesícula procedente de la fagocitosis, denominada fagosoma.

Genoma: Hace referencia a toda la información genética de un organismo.

Granuloma: Estructura conformada por una capa periférica de linfocitos y una capa interna de macrófagos que controlan la diseminación de la infección de *Mycobacterium tuberculosis* y en el cual se pueden encontrar bacterias en dormancia.

*Illumina*: Tecnología de secuenciación por el método de síntesis química, puede secuenciar muchos fragmentos a la vez.

Librería direccional: El conjunto de transcritos individualizados con secuencias conocidas a los extremos 5' y 3'.

Macrófago: Célula del sistema inmunitario que se encargan de fagocitar todos los cuerpos extraños que se introducen en el organismo como las bacterias y sustancias de desecho de los tejidos.

Microarreglo: Conjunto ordenado de genes en una pequeña superficie, considerado como una herramienta en biología molecular para determinar la expresión de ciertos genes.

*MICROBExpress*: *Kit* empleado para la remoción de la fracción rRNA

mRNA: Ácido ribonucleico que contiene la información genética procedente del DNA para utilizarse en la síntesis de proteínas.

NanoDrop: Espectrofotómetro para medir micro volúmenes, empleado para determinar la absorbancia de ácidos nucleicos y proteínas.

PCL1: Promotor de un gen ribosomal de *Mycobacterium tuberculosis*

PCR: Técnica molecular que permite amplificar una o varias moléculas de DNA de variada magnitud, generando miles de millones de copias de la secuencia de DNA

Q-PCR: Reacción de PCR en tiempo real, en la que se puede monitorear la expresión de los genes determinando su concentración.

RNA-Seq: Método empleado para cuantificar y mapear el transcriptoma empleando tecnologías de secuenciación de nueva generación

rRNA: Molecula en las células que forma parte de los organelos que sintetizan proteínas conocidos como ribosomas y que ayuda a traducir la información de mRNA a proteínas

Secuenciación: Conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en uno o varios oligonucleótidos de ADN.

SOLiD: Plataforma de secuenciación de nueva generación que soporta un gran rango de aplicaciones relacionadas con la secuenciación.

SYBR Green: Agente intercalante utilizado en la tinción de DNA para el análisis por electroforesis de productos de PCR, o como fluorocromo utilizado como medio de visualización directa de los productos de la PCR en tiempo real.

Transcriptoma: El total de un conjunto de transcritos de RNA, en una población celular bajo condiciones específicas.

Tuberculosis latente: Estado de la infección en la cual *Mycobacterium tuberculosis* se encuentra en estado de Dormancia, el individuo no presenta síntomas de la enfermedad y es positivo a la prueba inmunológica de la tuberculina.

## ABREVIATURAS

AC: Albumina – Catalasa  
Ac. Gr.: Ácidos grasos  
CoA: Coenzima A  
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario  
CETAB: Cetil trimetil amonio bromuro  
DEPC: Dietilpirocarbonato  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
DO: Densidad óptica  
DTT: DL-Ditiotreitol  
EST: Fase estacionaria  
H37Rv: Cepa de referencia de *Mycobacterium tuberculosis*  
LOG: Fase Logarítmica  
min: minuto  
MQ: Agua bidestilada y desionizada  
ml: Mililitros  
MPM: Marcador de peso molecular  
mRNA: RNA mensajero  
Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*  
NGS: Secuenciación de nueva generación  
nm: Nanómetros  
NRP: Estado no replicativo  
OADC: Acido oleico – Albumina – Dextrosa – Catalasa  
ORF: Marco abierto de lectura  
Pb: Pares de bases  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
q-PCR: PCR cuantitativa  
RNA: Ácido ribonucleico  
RNA-Seq: Secuenciación de RNA  
rpm: Revoluciones por minuto  
rRNA: RNA ribosomal  
RT-q-PCR: PCR cuantitativa con retrotranscriptasa  
seg.: Segundo  
SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido  
TAE: Tris-acetato-EDTA  
Tb: Tuberculosis  
TBE: Tris-borato-EDTA  
TCA: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos  
TE: Tris-EDTA  
TG: Tiozianato de Guanidina  
UE: Unión Europea



UFC: Unidades Formadoras de Colonia

UV: Luz Ultravioleta

VBNC: Viable pero no cultivable

µg: Microgramos

µl: Microlitros

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (Tb) humana es considerada una enfermedad infecciosa epidémica global que ha tenido gran prevalencia a través de la historia, presentando elevadas tasas de mortalidad e incidencia en varias poblaciones (Russell, 2001). La enfermedad presenta dos estadios a los que se asocian dos estados del patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), agente etiológico de la enfermedad: un estado replicativo asociado a la Tb activa y un estado dormante en la Tb latente, en donde el paciente no desarrolla sintomatología (Shleeva *et al*, 2010). En este segundo estado el bacilo infecta el macrófago alveolar y modula una respuesta inmunológica que involucra la formación del granuloma, una lesión de células linfoides y macrófagos. El estrés al cual está sometida la bacteria en esta estructura, parece conferirle a Mtb resistencia fenotípica a antimicrobianos, además de que le impide que sea cultivable, dificultando el rastreo por técnicas convencionales de microbiología (Barry *et al*, 2009). La interacción Mtb-macrófago en la Tb latente da como resultado una adaptación del patógeno a tolerar los diferentes tipos de estrés celular generados por el fagolisosoma, tales como: acidificación del pH, disminución en la entrada de nutrientes y oxígeno, y resistencia al ataque de moléculas microbicidas como el óxido nítrico, radicales libres y péptidos antimicrobianos (Shleeva *et al*, 2010).

Los estudios actuales con Mtb han demostrado que el bacilo emplea como fuente de carbono y energía los ácidos grasos (Ac. Gr.), después de sobrevivir al ambiente intracelular generado en el fagolisosoma (Álvarez *et al*, 2009; Deb *et al*, 2009 y Shleeva *et al*, 2010). La combinación de factores como la fuente de nutrientes a base de Ac. Gr., el estrés generado por el fagolisosoma y la modulación del sistema inmunitario del hospedero, desarrollan en Mtb una respuesta adaptativa que involucra cambios en el metabolismo, los cuales son el reflejo de la expresión diferencial de genes en las distintas etapas de la infección (Rachman *et al*, 2006; Rustad *et al*, 2008; Haller *et al*, 2009 y Keren *et al*, 2011).

Actualmente se han desarrollado diferentes tipos de técnicas para determinar la transcripción de los genes de Mtb bajo el sometimiento de condiciones de cultivo que asemejan un grado de dormancia. Entre estas técnicas están: las de amplificación como la retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-q-PCR), la cual puede determinar la expresión de uno o pocos genes, midiendo su concentración (Shi *et al*, 2010); por otro lado, las técnicas de hibridación como *Northen Blotting* y los microarreglos, se puede cuantificar la expresión de muchos transcritos que se codifican bajo determinadas condiciones fisiológicas y ambientales en las que se encuentra una célula (transcriptoma)

(Jang *et al*, 2009). Sin embargo, el inconveniente con estas técnicas, es la necesidad de un conocimiento *a priori* del genoma (Malome y Oliver, 2011). Con el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) el espectro de detección se ha ampliado y la limitante del conocimiento *a priori* ha sido superada, permitiendo analizar la expresión molecular de un modo más preciso y adecuado (*Illumina*, 2008 y Metzker, 2010). Bajo este contexto, es importante resaltar que son escasos los reportes bibliográficos completos en el momento sobre el estudio del transcriptoma de Mtb empleando tecnologías NGS.

El conocimiento del comportamiento de Mtb en estado dormante, es una necesidad para mejorar las estrategias que permitan un mejor tratamiento de la Tb. En relación a lo anterior actualmente existen diversas instituciones que financian la investigación dirigida al patógeno con propósitos a su detección y erradicación, entre estas se encuentra la Unión Europea (UE). La rama ejecutiva de la UE y la Comisión Europea busca fomentar la investigación interdisciplinaria, en torno a temas prioritarios como calentamiento global y salud pública, propuso un proyecto multilateral que está siendo actualmente ejecutado por un consorcio internacional de 7 instituciones, de Europa y Latinoamérica, en el cual está participando la Corporación Corpogen. El proyecto titulado *LATENT TUBERCULOSIS: New Tools for Detection and Clearance of Dormant Mycobacterium tuberculosis*, conocido con el acrónimo de StopLATENT-Tb, tiene como objetivo, analizar la actividad básica de Mtb durante la Dormancia, y los cambios de dicha actividad en presencia de fármacos (<http://www.latenttuberculosis.com/>).

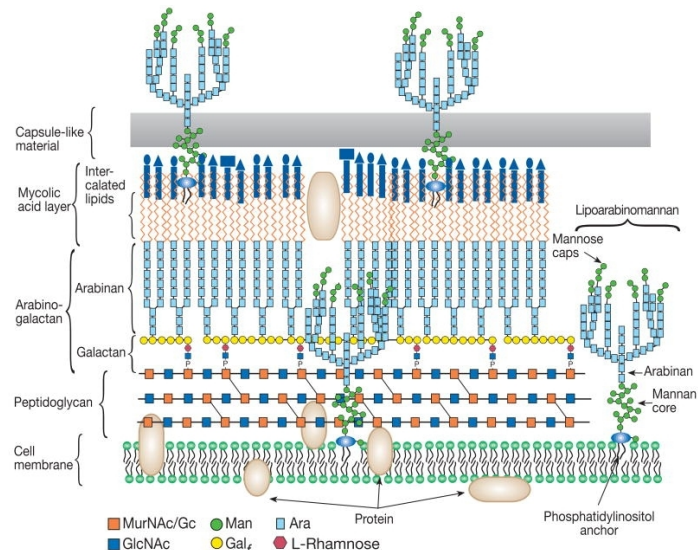
En este contexto, Corpogen tiene como objetivo específico el diseño de un modelo *in vitro* que simule el estado no replicativo de Mtb en un medio enriquecido con Ac. Gr.. El propósito final es la determinación de la expresión génica en dichas condiciones. Teniendo en cuenta lo anterior la presente investigación, tiene como objetivo estandarizar la técnica de RNA-Seq para el estudio del transcriptoma de Mtb cultivada en medio rico de Ac. Gr. y sometida a estrés celular *in vitro*.

## 1. MARCO DE REFERENCIA

### 1.1 PATÓGENO *Mycobacterium tuberculosis*:

1.1.1 Características celulares. Mtb es un bacilo Gram variable, aerobio facultativo, posee un alto contenido de lípidos en la pared adquiriendo la característica de ácido alcohol resistente y por tanto positivo para la tinción Ziehl-Neelsen; debido a que su pared es altamente hidrofóbica, en medios de cultivo líquido, tienden a crecer en agregados o en filamentos. Es de crecimiento lento, con una tasa de replicación de 20 a 22 horas y sus condiciones óptimas de crecimiento se dan a 37°C y pH de 7.0 a 7.2 (Madigan y Martinko, 2004).

La composición química de la pared celular evidencia una proporción elevada de ácidos micólicos, ceras complejas y glicolípidos (Figura 1). Los ácidos micólicos contienen cadenas laterales que se unen a una molécula de ácido murámico del peptidoglicano a través de enlaces fosfodiésteres y a arabino-galactanos por uniones de glicolípidos. Otros componentes importantes son los dimicolatos de trehalosa y los sulfolípidos, involucrados en el proceso de virulencia, igualmente el constituyente lipo-arabino-manano (L.A.M.) también contribuye al proceso de patogénesis (Brennan, 2003).



**Figura 1. Estructura y composición química de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis***

Fuente: Varki *et al* (2009)

1.1.2 Características genómicas. El genoma de Mtb presenta una longitud aproximada de 4.411 kb, con un contenido de G + C de 65.6%, es rico en DNA repetitivo (cerca del 10% del genoma), secuencias particulares de inserción, familias multigénicas y genes *housekeeping* duplicados. A lo largo de su genoma, se han identificado 3.924 marcos abiertos de lectura (ORF), denotando un 91% del potencial de codificación (Tabla 1) (Cole *et al*, 1998).

Cerca de 250 genes de Mtb codifican para enzimas del metabolismo de Ac. Gr., esto equivale a aproximadamente el 6% del total del genoma; de los cuales cien de ellos están fuertemente implicados en la -Oxidación de estas moléculas (Cole *et al*, 1998 y Smith, 2003).

**Tabla 1. Clasificación general de los genes de *Mycobacterium tuberculosis***

Función	N° de Genes	Porcentaje del Total (%)	Porcentaje de Capacidad Codificante (%)
Metabolismo de Lípidos	225	5.7	9.3
Señalización Intracelular	207	5.2	6.1
Procesos Celulares y Pared Celular	517	13.0	15.5
Estabilidad de RNA's	50	1.3	0.2
Elementos IS y Bacteriófagos	137	3.4	2.5
Proteínas PE* y PPE*	167	4.2	7.1
Metabolismo intermediario y Respuesta	877	22.0	24.6
Proteínas Reguladoras	188	4.7	4.0
Virulencia, Detoxificación y Virulencia	91	2.3	2.4
Funciones Hipotéticamente Conservadas	911	22.9	18.4
Proteínas de Función Desconocida	607	15.3	9.9

\*, \*\* Proteínas acidas ricas en glicina

Fuente: Smith (2003)

A nivel molecular las micobacterias presentan una baja tasa de transcripción y muy bajo contenido de RNA por unidad de ADN (Blanco, 1998), por lo cual el crecimiento replicativo es muy lento en comparación con otras bacterias. Hoy se acepta que estas diferencias no pueden ser atribuidas únicamente a una inherente baja actividad de la RNA polimerasa de las micobacterias, sino principalmente a la estructura de las regiones promotoras, como las del ribosoma (Blanco, 1998).

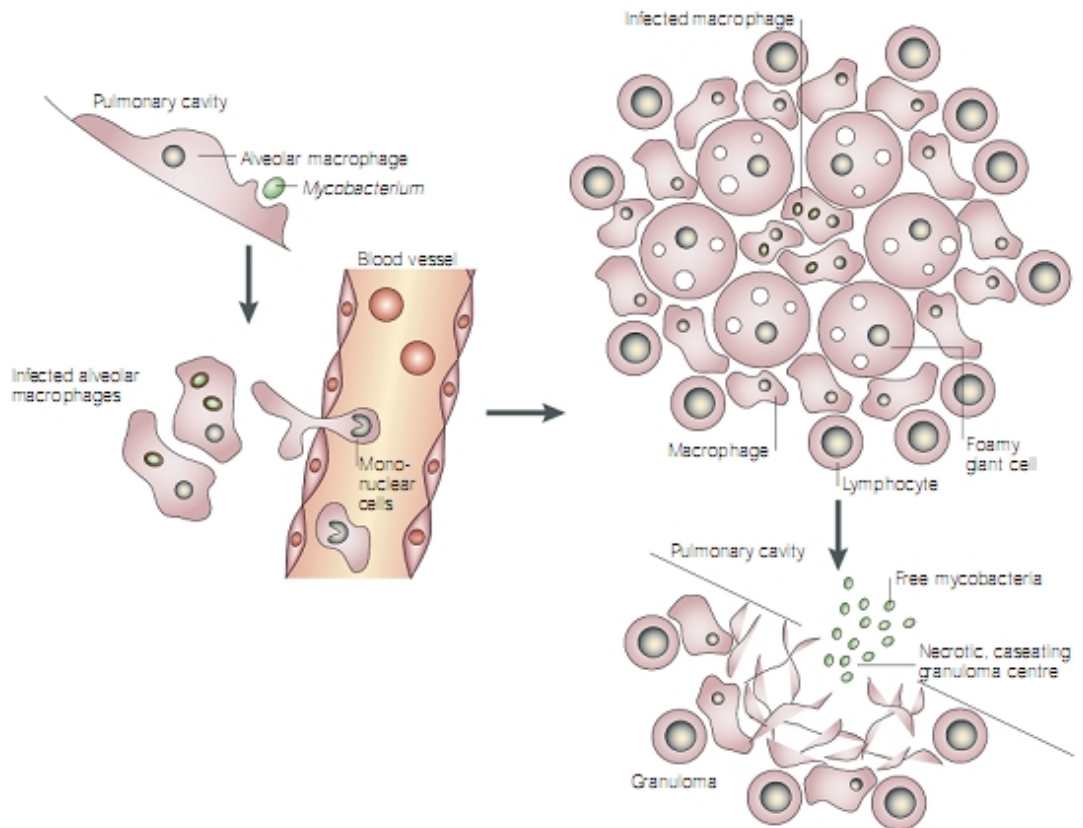
La tasa de crecimiento de las micobacterias también es consecuencia de la estructura de las regiones promotoras del operon ribosomal 16s, denominado *rrn*. En el caso de Mtb se reporta un solo operon *rrn* con dos promotores P1 y PCL1, separados por 77 pb (Figura 2) (Gonzalez *et al*, 1997).



**Figura 2. Promotores del operón *rrn* de *Mycobacterium tuberculosis***

Fuente: Gonzales *et al* (1997).

1.1.3 Mecanismo de infección. La infección de Mtb depende de dos parámetros fundamentales: la virulencia de la bacteria y la resistencia del hospedero frente a la misma. El proceso de infección consta de pasos secuenciales: primero los bacilos son inhalados de la atmósfera en la que se encuentra el hospedero, luego en el pulmón, las bacterias son fagocitadas por los macrófagos alveolares; en este paso se induce una respuesta localizada proinflamatoria que conduce al reclutamiento de las células mononucleares de los vasos sanguíneos, cercanas a la localización del foco de infección. Estos macrófagos son los bloques de construcción para el granuloma, estructura que se compone de un núcleo de macrófagos infectados, rodeado de macrófagos *foamy* (macrófagos de aspecto esponjoso) no infectados y una capa de linfocitos que delimitan la periferia de la estructura (Figura 3) (Russell, 2001).

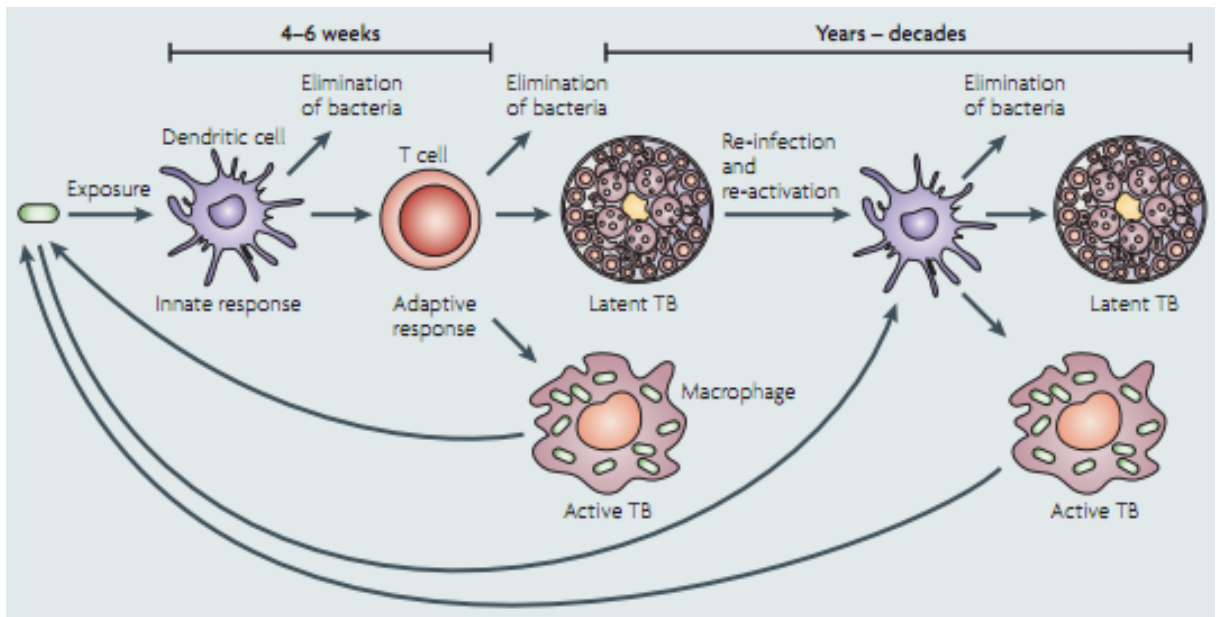


**Figura 3. Patogénesis de *Mycobacterium tuberculosis***

Fuente: Russell (2001)

Esta respuesta del tejido tiene como fin controlar la diseminación, mas no logra la eliminación de todos los bacilos; estas bacterias entran en estado de dormancia, constituyendo la fase de latencia de la infección, en la cual no hay signos manifiestos de la enfermedad; es también en este estado que el hospedero no puede transmitir la infección a otras personas. La latencia finaliza después de un cambio en el estado inmunitario del hospedero, que suele ser consecuencia de la vejez, la desnutrición, la infección por virus o bacterias e inmunosupresión. En tales circunstancias, el centro del granuloma sufre calcificación y se produce la salida de los bacilos viables, produciendo la enfermedad infecciosa en las vías respiratorias, lo cual es sintomático para las personas que la padecen. La bacteria reanuda su actividad metabólica normal y sale del estado dormante en el que estaba, entrando en un estado replicativo. Esta nueva fase promueve el desarrollo de una tos productiva que facilita la diseminación de los bacilos infecciosos a la atmosfera (Russell, 2001).

Un escenario más detallado explica que en los alveolos bronquiales se activa la respuesta inmune comenzando con las células dendríticas, quienes a su vez estimulan a las células T, las cuales mediante interleuquinas como las citoquinas llaman a los macrófagos hacia el sitio de infección. Lo más sorprendente de este curso clínico es que los individuos infectados albergan las dos poblaciones del patógeno, en estado replicativo y no replicativo, por tanto cuando se suministra antibióticos que atacan a los patógenos en replicación, se dejan de lado las poblaciones persistentes de Mtb dormante (Figura 4) (Young *et al*, 2008).



**Figura 4. Curso clínico de la tuberculosis**

Fuente: Young *et al* (2008)

## 1.2 ESTADO DE DORMANCIA DE *Mycobacterium tuberculosis*.

El estado dormante de Mtb es entendido como un estado reversible, en el cual la bacteria presenta baja actividad metabólica, que le permite sobrevivir por un largo tiempo sin entrar en fisión binaria (Álvarez *et al*, 2009). El patógeno en estado dormante en condiciones *in vivo*, adopta una morfología particular con la disminución del diámetro y engrosamiento de la pared celular (Álvarez *et al*, 2009). Estos cambios son el resultado de la interacción con el fagolisosoma en donde Mtb tolera el estrés celular mencionado anteriormente (Álvarez *et al*, 2009 y Shleeva *et al*, 2010).

El conocimiento sobre las condiciones particulares en las cuales Mtb se encuentra en dormancia ha permitido el diseño de modelos *in vitro*, en los cuales se ha abordado estudios desde la genómica (Gonzales *et al*, 1997; Cole *et al*, 1998; Bacon *et al*, 2004; Manabe *et al*, 2005 y Shi *et al*, 2010), transcriptómica (Schnapinger *et al*, 2003; Kendall *et al*, 2004; Jang *et al*, 2008 y Haller *et al*, 2009), proteómica (Sinha *et al*, 2002) y metabolómica (Carvalho *et al*, 2010). Específicamente, se han estudiado los niveles de expresión de genes esenciales que se activan en modelos de estrés *in vitro*; por ejemplo se ha encontrado que en el patógeno bajo la reducción gradual de oxígeno en condiciones *in vitro* (modelo de Wayne - hipoxia), eleva los niveles de expresión de los genes de un programa transcripcional denominado DosR, en el cual se expresan los genes *dosS* y *dosR*, quienes codifican para un sistema de respuesta de dos componentes, esencial para la supervivencia del patógeno (Shleeva *et al*, 2010).

Estos resultados son congruentes con la investigación de Bacon y colaboradores (2004) quienes determinaron la expresión de genes en un cultivo quimiostático de *Mtb* bajo condiciones de saturación de oxígeno al 1% (microaerofilia). Los resultados de este estudio reportaron la expresión de 77 genes, de los cuales 33 eran parte del programa transcripcional DosR.

Los estudios actuales muestran que en condiciones *in vitro* el patógeno no adopta todas las características anteriormente mencionadas que las adquiere *in vivo*, sin embargo en la investigación de Deb y colaboradores (2009) donde se imitó las condiciones *in vivo* mediante la aplicación de una combinación de cuatro factores: baja saturación de oxígeno (5%), alta concentración de CO<sub>2</sub> (10%), baja emisión de carbono y de nutrientes como nitrógeno y pH ácido (5.0), presentando resultados de múltiple estrés, Mtb adquirió la totalidad de las principales características de la dormancia *in vivo*.

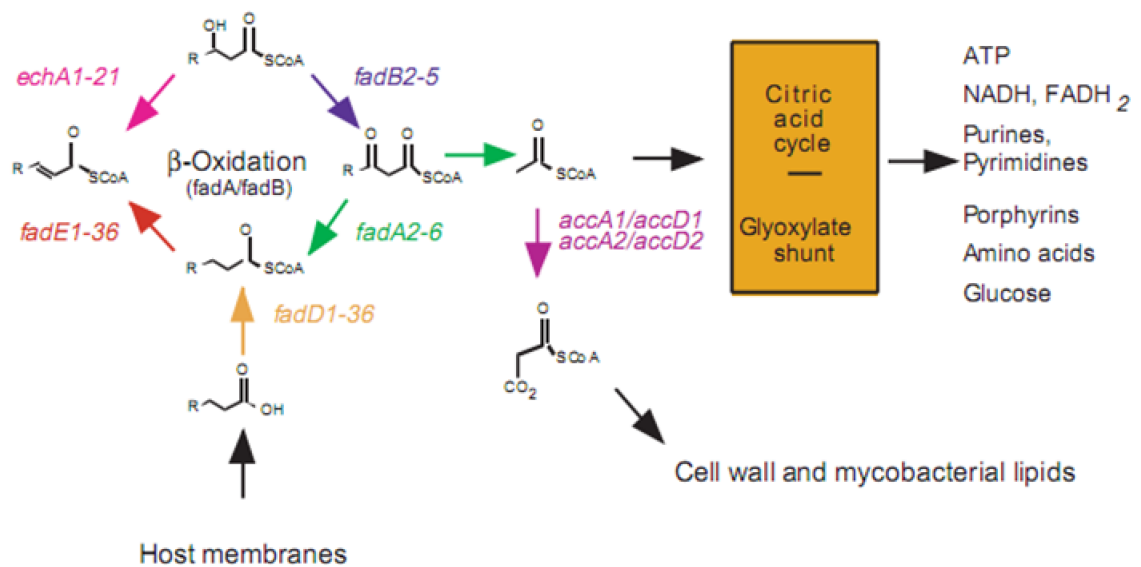


### 1.3 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE *Mycobacterium tuberculosis*.

1.3.1 Metabolismo del carbono a partir de ácidos grasos. El metabolismo del carbono en *Mtb* es un determinante significativo de la habilidad del bacilo para persistir en estado dormante. Los Ac. Gr. son sustratos para el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y la gluconeogénesis, ciclos involucrados en la producción de energía y de biomasa, respectivamente. Cuando se da la producción de biomasa únicamente con la fuente de Ac. Gr., las células tienen que evitar la pérdida de carbono en forma de CO<sub>2</sub> durante la oxidación del ciclo TCA. Esta preservación del carbono se realiza con el ciclo del glicoxilato, el cual convierte isocitrato a succinato y glicoxilato a través de la isocitrato liasa y la malato sintasa. La enzima isocitrato liasa es codificada por los genes *icl1* e *icl2*, los cuales se expresan en condiciones *in vivo*. Esta enzima también funciona como una metilisocitrato liasa, la cual se ve involucrada en el metabolismo del propionil-CoA, a través del ciclo metilcitrato produciendo piruvato (Marreroa *et al*, 2010).

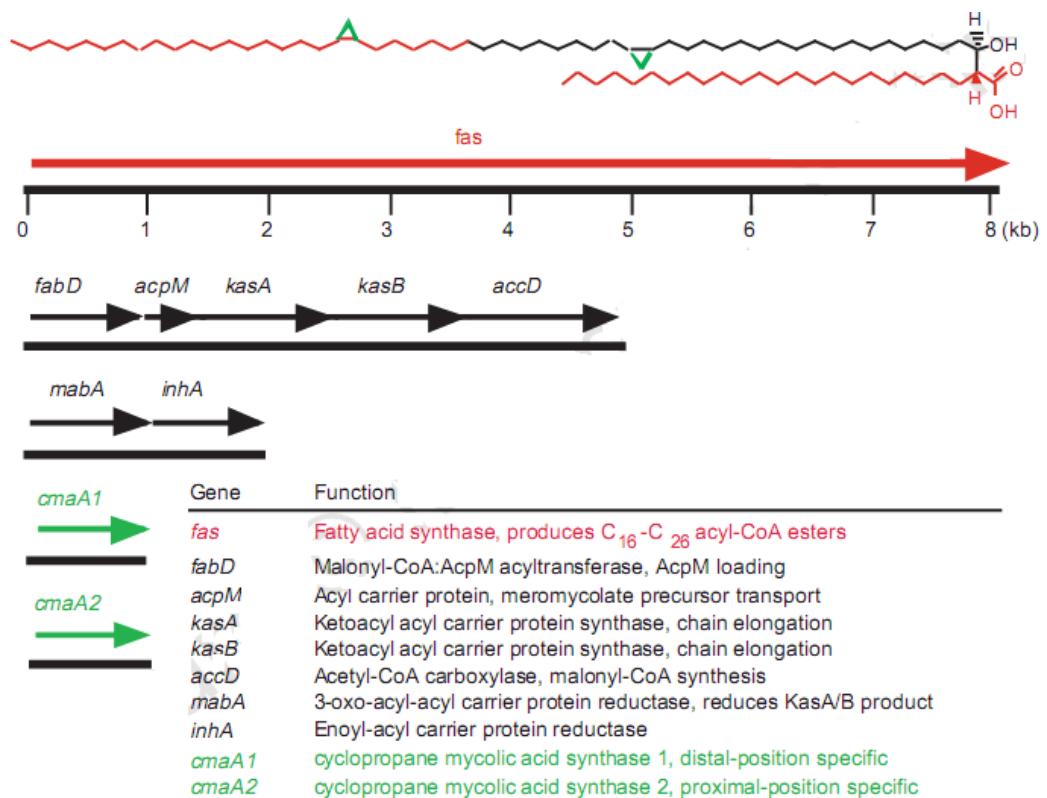
1.3.2 Metabolismo de Lípidos. Dado que los lípidos son importantes en la sobrevivencia y virulencia del bacilo en la enfermedad latente, es fundamental entender el metabolismo de este componente celular. El genoma de *Mtb* contiene cerca de 36 acetil-CoA sintasas y una familia de 36 enzimas relacionadas con el primer paso de la catálisis de la degradación de Ac. Gr., que tiene lugar en la vía del glicoxilato (Figura 5). Existen 21 enzimas homólogas a la superfamilia de las isomerasas hidratasas CoA, las cuales rehidratan el producto de las deshidrogenasas acetil-CoA; 4 enzimas que convierten el extremo 3-hidroxi de los Ac. Gr. a 3-ceto y 5 enzimas que ayudan en el ciclo de la tiolisis de la B-cetoésteres (Cole *et al*, 1998).

En el metabolismo de los Ac. Gr. están involucrados dos tipos de sistemas de enzimas, el sistema FAS I y FAS II. El sistema FAS I (Rv2524, *fas*) es un solo polipéptido con actividad multi-catalítica que genera varios ésteres CoA y probablemente crea los precursores para la elongación de otros Ac. Gr. y sistemas polipéptidicos (Figura 6). El sistema FAS II contiene componentes de enzimas disociables que actúan sobre un sustrato de proteínas acilo (ACP), este sistema elonga las proteínas ACP hasta la obtención de Ac. Gr. de 24 a 56 carbonos en longitud (Cole *et al*, 1998)



**Figura 5. Vía del glicoxilato por el cual se degradan los ácidos grasos en *Mycobacterium tuberculosis*.**

Fuente: Cole et al, 1998



**Figura 6. Sistema FAS I para la síntesis de ácidos grasos en *Mycobacterium tuberculosis*, en el que se aprecia el gen *fas* y el ácido graso que codifica.**

Fuente: Cole et al, 1998

## 1.4 PLATAFORMAS DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)

Las tecnologías NGS permiten secuenciar miles de megabases de DNA en poco tiempo. Entre las técnicas, más utilizadas se encuentran: la pirosecuenciación de 454 Roche, SOLiD *Applied Biosystem* e *Illumina*, sin embargo, el empleo de cada una de estas es consecuente con la aplicación y ventajas que presentan (Metzker, 2010); la técnica de 454 es considerada una técnica de alto rendimiento, sin embargo, una gran cantidad de aplicaciones no son prácticas debido a su alto precio por nucleótido.

Las tecnologías de NGS, son adecuadas para la investigación de varios fenómenos en el genoma, incluyendo el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), eventos epigenéticos, copia de variantes numéricas, expresión diferencial y *splicing* alternativo (Metzker, 2010).

**Tabla 2. Diferencias entre las técnicas *Illumina* y SOLiD** (Shendure y Ji, 2008; <http://seq.molbiol.ru/>).

	Parámetro	<i>Illumina</i>	SOLiD
Principal	Rendimiento		
	Longitud del transcrito		
	Calidad	++	+++
Precio	Preparación de librerías		
	Preparación de la superficie y secuenciación		
Procedimientos	Fragmentos de las librerías		
	Librerías <i>Mate pair</i> < 600 pb	+++	Imposible sobre las perlas
	Librerías <i>Mate pair</i> > 600 pb		
	Preparación de la superficie	++	-
	Secuenciación	+++	+
Desarrollo de la técnica en laboratorio (fuera de la empresa)	Bioinformática		
	Librerías	++	-
	Preparación de la superficie	-	++
	Secuenciación	++	+
Organización	Procesamiento de datos		
	<i>Kits</i>	+++	-
	Equipamiento adicional		
Organización	Estabilidad del sistema	++	+
	Servicio y soporte	+	+++

+: cumple el parámetro; ++: cumple adecuadamente el parámetro; +++: cumple muy adecuadamente el parámetro; -: no cumple el parámetro; : cumplen similarmente el parámetro

Fuente: <http://seq.molbiol.ru/>

Las NGS SOLiD e *Illumina*, se diferencian principalmente en la construcción de librerías para secuenciar las dos hebras, esto hace referencia al número de *iniciadores* empleados para la secuenciación, ya sea *single end read* (cuando se emplea un solo primer y se secuencia en una dirección) ó *pair end* (dos lecturas del mismo fragmento, cada una a partir de un extremo diferente). Las librerías *mate pair* son únicamente posibles con *Illumina*, debido a que este tipo de librerías necesitan un ciclo de recircularización entre fragmentos modificados y posterior digestión con enzimas de restricción, esta recircularización es imposible con una longitud menor de 600 pb lo que no se puede lograr con SOLiD, por esta característica *Illumina* es considerada una técnica de gran cobertura y precisión. Aun cuando esta es la principal diferencia, existen otros puntos a considerar dependiendo de la aplicación que se le quiera dar al experimento (Tabla 2) (<http://seq.molbiol.ru/>).

### 1.5 SECUENCIACIÓN MASIVA DE RNA (RNA-Seq)

Una de las aplicaciones de estas NGS es la llamada secuenciación masiva de RNA (RNA-seq), que permite secuenciar, mapear, y cuantificar una población de transcritos (Langmead *et al*, 2010). Comparada con los análisis convencionales de aproximación al transcriptoma, RNA-Seq ofrece varias ventajas claves. Primero, cuantifica los niveles más bajos de expresión génica, es muy sensible y puede detectar un gran rango dinámico de niveles de expresión, a diferencia de los microarreglos, en los cuales la sensibilidad se reduce para la expresión de genes con tasas de transcripción bajas. RNA-Seq supera la necesidad de tener un conocimiento *a priori* de la expresión de genes, como se necesita en microarreglos. Finalmente, los experimentos de RNA-Seq son altamente reproducibles para replicas técnicas y replicas biológicas. Igualmente la técnica permite revelar mucho más preciso el conjunto de regiones transcritas hasta la resolución de un solo nucleótido, además de detectar RNAs reguladores pequeños, confirmar la anotación de los genes y el inicio de la transcripción de los mismos (Wang *et al*, 2009).

La técnica requiere de fragmentación de todo el RNA en pequeños segmentos, los cuales son retrotranscritos (Oshlack *et al*, 2010). Posteriormente se le pegan secuencias adaptadoras, a partir de las cuales se lleva la secuenciación de los fragmentos. La información obtenida son millones de lecturas de fragmentos entre 50 y 150 pb, que son alineados al genoma de referencia de la bacteria que se está trabajando; de esta manera se determina cuáles son los genes transcritos. La limitación que se ha presentado con este procedimiento para determinar qué cadena de DNA se deriva el transcrito, ha sido superada por muchos autores que sugieren la ligación directa de adaptadores sobre la molécula de RNA; así esta cadena puede ser identificada al final de la secuenciación (Wang *et al*, 2009).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La diseminación de la Tb humana en el hospedero se ve alterada cuando el bacilo Mtb entra en estado dormante disminuyendo su actividad metabólica, alterando su morfología y deteniendo su replicación, lo que conduce a un estadio de Tb latente (Álvarez *et al*, 2009; Deb *et al*, 2009 y Shleeva *et al*, 2010). Estos cambios del patógeno son el producto de la exposición a diferentes factores, dentro de los cuales se nombra, el estrés celular generado al interior del macrófago alveolar (Shleeva *et al*, 2010) y la modulación de la respuesta inmunológica del hospedero en beneficio del patógeno (Behar *et al*, 2010). La tolerancia a las anteriores condiciones dan como respuesta una adaptación metabólica en Mtb, relacionada con el empleo de Ac. Gr. como fuente de carbono y energía (Russell, 2001; Daniel *et al*, 2004; Álvarez *et al*, 2009; Deb *et al*, 2009; Carvalho *et al*, 2010 y Shleeva *et al*, 2010), y que a nivel molecular se ve asociada con una expresión diferencial de genes (Madigan y Martinko, 2004).

En consecuencia a la necesidad de conocer los niveles de expresión de los genes del bacilo en condiciones *in vitro* que simulen la dormancia, es fundamental para el entendimiento del estado fisiológico del bacilo en este estado.

Teniendo en cuenta que el estudio del transcriptoma de Mtb no ha sido abordado con las técnicas NGS, y considerando que a pesar de existir resultados de estudios en el estado de dormancia de Mtb, es poco el conocimiento respecto al estado fisiológico y los mecanismos moleculares que permiten que la bacteria sobreviva en este periodo empleando los Ac. Gr. como fuente de carbono y energía (Álvarez *et al*, 2009 y Deb *et al*, 2009), el presente estudio se planteó con el fin de estandarizar la técnica de secuenciación masiva de RNA acoplada a la plataforma de *Illumina*. Este es el primer paso requerido para el estudio del transcriptoma de Mtb H37Rv cultivada en medio rico en Ac. Gr. y sometida a estrés celular *in vitro*.

### 3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible estandarizar la técnica de RNA-Seq para el estudio del transcriptoma de Mtb cultivada en medio rico de ácidos grasos y sometida a estrés *in vitro*?

#### 4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En la Tb latente, Mtb se adapta al estrés celular generado al interior del fagosoma (por ejemplo, pH ácido, moléculas microbicidas, radicales libres, etc.) (Russell, 2001; Daniel *et al*, 2004; Álvarez *et al*, 2009; Deb *et al*, 2009; Carvalho *et al*, 2010 y Shleeva *et al*, 2010), igualmente, el patógeno modula la respuesta inmunológica del hospedero a su beneficio (formando el granuloma) (Behar *et al*, 2010). Esta adaptación evidencia, a nivel molecular, en una expresión diferencial de genes. Teniendo en cuenta lo anterior se manejó la hipótesis de que: Estudiar el transcriptoma de la bacteria en condiciones *in vitro*, como el cultivo en un medio rico de ácidos grasos y bajo estrés celular, se puede determinar el comportamiento molecular por el cual opta la bacteria para sobrevivir en estado de dormancia.

Teniendo en cuenta que mediante el empleo de la secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) se puede evaluar de manera precisa el transcriptoma, la hipótesis en específico de esta investigación se centro en si la estandarización de la preparación de las genotecas para RNA-Seq, permitirá obtener resultados de calidad que reflejen la expresión de genes de la bacteria cultivada *in vitro*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica de RNA-Seq para el estudio del transcriptoma de *Mycobacterium tuberculosis* cultivado en medio rico de ácidos grasos y sometido a estrés celular *in vitro*

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar el protocolo de extracción de RNA de *Mycobacterium tuberculosis*
- Mejorar la remoción de rRNA de *Mycobacterium tuberculosis* para la construcción de librerías de cDNA
- Optimizar la fragmentación de mRNA de *Mycobacterium tuberculosis* para la construcción de librerías de cDNA en la técnica de RNA-Seq
- Optimizar la construcción de librerías direccionales de cDNA para determinar la dirección de los transcritos



## 6. JUSTIFICACIÓN

La Tb es una de las enfermedades infecciosas que causa mayor número de muertes en el mundo. Aproximadamente 8 millones de personas están presentando Tb tipo activa, y casi se calcula que 1/3 de la población mundial padece la forma latente de la enfermedad (Álvarez *et al*, 2009). Esta Tb latente recibe especial interés, debido a que la recurrencia de Tb activa es causa de una pequeña fracción de personas que han tenido el patógeno dormante durante años o décadas (Russell, 2001). Estas estadísticas incrementan en países tercermundistas, en los cuales existen condiciones de saneamiento insuficientes, y una mala alimentación de la población, incrementando los factores de riesgo de la enfermedad. Colombia es uno de los países donde la enfermedad tipo activa se presenta en dos formas: Tb pulmonar y extrapulmonar, con 5885 y 1352 casos anuales acumulados respectivamente, reportados para septiembre del 2011 (INS, 2011). Por este motivo, la Tb constituye un importante problema de salud pública y un foco de interés en investigación con fines a la detección del patógeno Mtb y tratamiento de la enfermedad.

Para un control eficaz de la Tb, es necesario desarrollar herramientas con las que se pueda detectar la infección latente. Desafortunadamente, no se han encontrado biomarcadores del hospedero asociados con el estado de latencia de la enfermedad (<http://www.biomarkers-for-tb.net/>), y por otro lado, hay un desconocimiento muy grande sobre el estado fisiológico del bacilo durante este estado de la infección. Los estudios hasta ahora realizados, indican que el bacilo debe encontrarse en un estado dormante no replicativo con un metabolismo reducido (Carvalho *et al*, 2010), sin embargo, se sabe muy poco sobre la regulación génica de este mecanismo y los genes involucrados en ella. Teniendo en cuenta lo anterior, se hace necesario el análisis del transcriptoma del bacilo en estado dormante, con el fin de entender los mecanismos que le permiten a Mtb adaptarse a estas condiciones de estrés y, con este conocimiento, poder encontrar nuevas dianas para el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y control de la enfermedad.

La aplicación de NGS al estudio del transcriptoma (RNA-Seq) esta revolucionando la visión de la expresión y regulación de los genes de una célula, por lo cual, el uso de estas técnicas será de gran valor en el estudio de la expresión génica del bacilo dormante, arrojando nueva información que con otros métodos no es posible obtener (Auer y Doerge, 2010).

## 7. ANTECEDENTES

La corporación Corpogen, tiene antecedentes específicos con relación al proyecto de StopLATENT-TB, demostrado que Mtb puede tener un mejor crecimiento en un medio suplementado con la mezcla de tres Ac. Gr. de cadena larga (ácido oleico, ácido estérico y ácido palmítico), en una mezcla con concentración de 0.001%. Este medio tiene fue construido con el suplemento de albumina y catalasa sin dextrosa, esta característica se la tomo en cuenta, para establecer el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y la expresión de genes. Por otro lado, la corporación ha estandarizado la técnica para el monitoreo de la cinética de crecimiento del bacilo en medio de cultivo líquido.

Por otro lado, Corpogen, ha participado con la estandarización de las condiciones de extracción de RNA por ruptura de membrana con un método de lisis físico-química y el empleo de *Bead Beater*.

La metodología de RNA-Seq ha sido aplicada para el desciframiento del transcriptoma de diferentes organismos, entre los que se nombran la levadura (Nagalakshmi et al., 2008), el humano (Cloonan et al., Morin et al., Marioni et al. 2008), el ratón (Mortazavi et al., 2008), Arabidopsis (Lister et al., 2008), la mariposa (Vera et al., 2008). En cuanto a bacterias se tiene reportes de *Mycoplasma pneumoniae*, *Pseudomonas syringae*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica Typhimurium* (Croucher y Thomson, 2010)

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 CULTIVO DE *Mycobacterium tuberculosis*

8.1.1 Activación de la cepa H37Rv. En esta investigación se utilizó la cepa de referencia H37Rv. Para la activación de esta cepa, se siguió la técnica estandarizada en Corpogen, realizando inoculos de 100 µl de la cepa en 3 ml de medio 7H9 OADC. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en constante agitación a 100 rpm en agitador orbital por un periodo de 15 días hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0.2 a 0.3 a 600 nm.

8.1.2 Escalado del Inóculo. Los cultivos de 3 ml en medio 7H9 OADC se utilizaron para inocular 50 ml de los mismos medios estériles en un frasco *shott* en las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente. Una vez alcanzada la densidad óptica de 0.25, los 50ml de medio se centrifugaron a 4000rpm a 4°C y todo el pelet se utilizó para inocular 500ml de medio Dubos ADC o de medio Dubos AC suplementado con Ac.Gr.: ácido palmítico, ácido estérico y ácido oleico a una concentración de 0.01%.

8.1.3 Construcción de tratamientos para el estrés *in vitro*. Los resultados presentados en este documento solo llegaron hasta la inoculación en 50 ml en el procedimiento de escalado, sin embargo se describe los tratamientos de las condiciones *in vitro*, como parte de la técnica propuesta por Corpogen.

Con base en lo anterior Corpogen realiza una recomendación puntual: “que con tres cultivos de 400 ml se pueden construir 6 curvas en las cuales se reproducirán las dos condiciones de estrés *in vitro*, en las que se monitoreará la cinética de crecimiento cada 5 días y se realizará la extracción de RNA de Mtb cuando se encuentre en fase log y estacionaria. Las curvas evaluarán el efecto del pH y la falta de nutrientes. Para ello se utilizarán los siguientes medios: Dubos ADC, Dubos Ac. Gr., Dubos Ac. Gr. pH ácido y PBS para cultivar las bacterias en inanición en el medio. Los medios de Ac.Gr. serán suplementados con un mix de Ac.Gr.: ácido palmítico, ácido estérico y ácido oleico a una concentración de 0.01%

8.1.4 Cinética de crecimiento. La cinética de crecimiento se monitoreó cada 5 días por un periodo de aproximadamente 40 días. Esta se registró en dos momentos, antes de la disgregación celular y después de esta:

8.1.4.1 Cinética antes de disgregar células. Se tomó 1 ml del cultivo, y se lo agregó en una celda para la medición de absorbancia a 600 nm. Las mediciones se efectuaron por triplicado.

8.1.4.2 Cinética después de disgregar células. Se agregó 1 ml de cultivo bacteriano a un tubo tapa rosca, que contenía 100 µg de perlas de vidrio de 0.1mm. Posterior a la centrifugación a 5000 rpm por 2 min. a 4°C, se eliminó el sobrenadante, y se agregó 1 ml de Tween 80 al 0.05%. La solución se incubó a 37°C durante 30 min. Finalizado este tiempo se sometió a *Bead Beater* por 1 min., para posterior medición de absorbancia a 600 nm. Igualmente se tomaron 100 µl del tubo de disgregación para realizar diluciones seriadas hasta  $10^{-2}$ , de las cuales 100 µl fueron sembrados con rastrillo en agar 7H10.

Los datos de DO se registraron después de cada medición y el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) se determinó 30 días después de realizada la siembra.

## 8.2 EXTRACCIONES DE RNA DE *Mycobacterium tuberculosis* CULTIVADA EN UN MEDIO RICO DE ÁCIDOS GRASOS

8.2.1 Extracción de RNA por lisis físico-química empleando *Bead Beater*. Se transvasó 20 ml de la bacteria crecida en medio líquido en un tubo falcón y se centrifugó a 8.000 rpm durante 15 min.. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 3 ml de la mezcla Tween 80 al 0.05% con SDS en relación 1:1, este falcón fue nuevamente centrifugado. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con AGUA DEPC, para la inhibición de RNA-sas el primero con 5 ml y el seg. con 1 ml.

Se adicionaron 500 µl del *pellet* resuspendido (en 1ml de agua DEPC) a un tubo que contenía: 200 µl de perlas de Zirconio-Silica 0.1mm, 500 µl de solución detergente (detergente comercial, acetato de Na 500 mM y agua libre de RNAsas), 500 µl de fenol ácido (equilibrado con acetato de Na 500 mM a pH 4) y 100 µl de cloroformo alcohol isoamílico 24:1. Esta mezcla se realizó en un tubo tapa rosca de 2 ml; el cual fue sometido a agitación por *Bead Beater* durante 1 min., este procedimiento por *Bead Beater* con perlas de Zirconio-Silica permitió fraccionar las

paredes celular, por el movimiento del Homogenizador; posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm por 5 min.. Las etapas siguientes se realizaron en un cuarto especial para extracción de RNA.

Se extrajo nuevamente la mayor parte de la fase acuosa con 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico 24:1, este procedimiento se realizó en un *ependorff* de 1.5 ml, el cual se sometió a vortex y a centrifugación a 13.000 rpm durante 5 min.. Al finalizar se observaron 2 fases, la fase superior se depositó en otro *ependorff* que contenía 1 volumen de isopropanol (acidificado con acetato de Na 3M a pH 4), el cual se dejó a -80°C toda la noche.

Pasado este tiempo se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 min., posteriormente se descartó el sobrenadante, y al *pellet* se le adicionó 300 µl de etanol al 75%, se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min. Finalmente se descartó el sobrenadante (etanol), el *pellet* se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 35 µl de Agua DEPC.

Las muestras de RNA y DNA se mezclaron con rojo cresol en proporción 1:1 y se corrieron en un gel al 1% de agarosa en TAE 1X con *Sybr Safe* (Invitrogen). Las condiciones de corrida en cámara de electroforesis horizontal fueron de 80 V con amperios variables por 30 min.. Al finalizar la corrida se visualizó el gel en un transiluminador Gel Doc de Bio Rad, con luz ultravioleta (UV).

#### 8.2.2 Extracción de RNA empleando otros métodos.

8.2.2.1. Extracción por CETAB. Los *pellets* de los cultivos de 10 ml, fueron congelados a -80°C por 3 horas y luego incubados en 1ml de solución de lisis (CETAB al 2%, SDS al 3%, 200mM Tris-HCl, 25mM EDTA) a 65°C por 2 horas. Posteriormente se continuó el protocolo de fenol ácido, detergente y cloroformo que se menciona arriba.

8.2.2.2. Extracción por Tiozianato de Guanidina. Se centrifugaron 20 ml del cultivo de Mtb (Para *M. smegmatis* se emplearon 10 ml y para *E. coli* se empleó 1.5 ml) a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, el pellet fue lavado con 1 ml de TE 1X y centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos, finalmente el pellet fue reconstituido en Tiozianato de Guanidina a una concentración final de 0.8 M. Posteriormente se continuó el protocolo de fenol ácido, detergente y cloroformo que se menciona arriba.

8.2.2.3. Extracción por otros métodos. Se emplearon otros métodos de extracción de RNA, los cuales se encuentran referenciados en la tabla 3. Todos los métodos se realizaron partiendo de un volumen inicial de cultivo de 10 ml.

**Tabla 3. Técnicas probadas para la extracción de RNA de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv crecida en medio Dubos AC ácidos grasos y Dubos ADC**

No.	Pretratamiento	Rompimiento celular	Denaturación del complejo nucleoproteínico y remoción de proteínas y DNA	Concentración de RNA	Eliminación de isopropanol
1	Se agregaron 10 ml de TE-DEPC 1X posteriormente se centrifugó a 8000 rpm por 15 min, (se eliminó el sobrenadante) y se resuspendió en 1 ml de TE-DEPC 1X	Se agregó 500 ul de muestra en un tubo de lisis que contenía 200 ul de perlas de Zirconio-Slica de 0.1 mm, 500 ul de solución detergente, 500 ul fenol ácido y 100 ul de cloroformo alcohol isoamílico (24:1). La mezcla anterior fue sometida a <i>Bead Beater</i>	Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, el sobrenadante se transfirió a un <i>eppendorf</i> con 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1)	Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min y se precipitó con 500 ul de isopropanol, posteriormente se incubó a -80°C por tres horas	Se centrifugó a 13.000 rpm por 30 min., el sobrenadante se descartó y el <i>pellet</i> fue tratado con 300 ul de etanol al 75%. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 35 ul de agua DEPC
2		Se agregó 500 ul de muestra en un tubo de lisis y se sometió a <i>Bead Beater</i>	Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo criogénico con 500 ul de fenol ácido y 100 ul de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo criogénico con 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1)		
3	Se llevó a -80°C por una hora, posteriormente se descongeló a 65°C	Se agregó 500 ul de muestra en un tubo que contenía 500 ul de solución de lisis (SDS-EDTA) caliente y 40 ul de mercapto etanol, se llevó todo el tubo a 65°C por 2 horas, posteriormente se transfirieron 500 ul a un tubo de lisis que fue sometido a <i>Bead Beater</i>	Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, el sobrenadante fue transferido a un tubo criogénico con 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1)		
4		Se agregó 500 ul de muestra en un tubo de lisis que fue sometió a <i>Bead Beater</i>			
5	A 20 ml de un cultivo se le agregaron 500 ul de RNA later, se llevó a -80°C por 3 horas	Se agregó 500 ul de muestra en un tubo que contenía 500 ul de solución de lisis caliente se llevó todo el tubo a 65°C por 1 hora, se transfirieron 500 ul a un tubo de lisis y se sometió a <i>Bead Beater</i>			
6		Se agregó 500 ul de muestra en un tubo que contenía 200 ul de AGUA DEPC, se transfirieron 500 ul a un tubo de lisis y se sometió a <i>Bead Beater</i>			

Fuente: Esta investigación

8.2.3 Cuantificación y purificación de RNA. El RNA fue cuantificado por espectrofotometría en NanoDrop 2000/2000c *Thermo Scientific* a 260nm y 280nm, tomando como base los parámetros de Sambrook y colaboradores (1993). Para la determinación de contaminación por DNA se tuvo en cuenta los resultados del gel y una reacción de q-PCR amplificando un gen ribosomal. En los casos en los que se determinó contaminación se sometió a un tratamiento con DNAsa libre de RNAsa, empleando 1 U de la enzima por cada  $\mu\text{g}$  de RNA en la muestra, con una temperatura de reacción de 37° C por 10 min e inactivación a 65°C por 10 min con 1  $\mu\text{l}$  de solución de DNAsa Stop incluido.

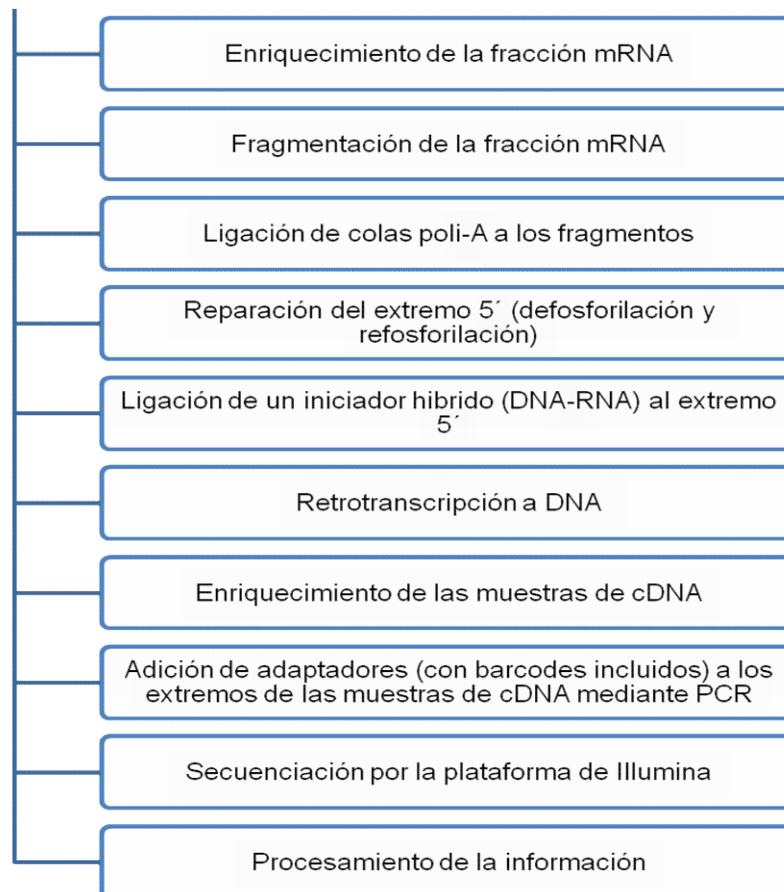
### 8.3 EXTRACCIONES DE RNA DE *Mycobacterium tuberculosis* CULTIVADA EN UN MEDIO RICO DE ÁCIDOS GRASOS BAJO CONDICIONES DE HIPOXIA

Las extracciones de RNA de este tratamiento se realizaron en los laboratorios de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional de México. La cepa de referencia H37Rv fue cultivada en dos medios de cultivo: Dubos ADC y Dubos AC Ac. Gr., bajo dos 2 tratamientos: condiciones normales de crecimiento y sometimiento a depleción de oxígeno por el modelo de Wayne, el cual consiste en dos estados NRP1 (condición microaerofílica) y NRP2 (condición anaerobia), en las fases de crecimiento logarítmica (LOG) y estacionaria (EST), al finalizar se obtuvieron los tratamientos: LOG Dubos, EST Dubos, NRP1 Dubos, NRP2 Dubos, LOG Dubos Ac. Gr., EST Dubos Ac. Gr., NRP1 Dubos Ac. Gr. y NRP2 Dubos Ac. Gr.. Estas muestras de RNA fueron enviadas a Corpogen y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento para la técnica RNA-Seq.

### 8.4 CONSTRUCCIÓN DE LAS LIBRERÍAS DE cDNA PARA RNA-Seq A PARTIR DE *Mycobacterium tuberculosis* CULTIVADA EN MEDIO RICO DE ÁCIDOS GRASOS BAJO CONDICIONES DE HIPOXIA

Cuando se realiza la extracción de RNA bacteriano se extraen todas las fracciones de RNA (rRNA, mRNA, sRNA y tRNA), lo cual dificulta la construcción de las librerías genómicas. Por este motivo se han empleado estrategias para remover el RNA ribosomal y así asegurar un menor sesgo en la técnica de RNA-Seq.

8.4.1 Flujo de trabajo para la construcción de las librerías de cDNA. Se desarrolló el siguiente flujo de trabajo (figura 7):



**Figura 7. Flujo de trabajo en la construcción de la librería direccional de cDNA.**

Fuente: Esta investigación

8.4.2 Remoción de RNA ribosomal (rRNA). Se empleó el *Kit MICROBExpress* para la remoción de rRNA con perlas magnéticas que hibridan y separan las fracciones 16S y 23S. La reacción se efectuó con 3 µg de RNA purificado. El RNA fue anillado con una mezcla de oligonucleótidos (4 µl) en 200 µl de *Buffer Binding*, la mezcla fue precalentada a 70°C por 10 min. y la reacción fue incubada a 37°C por 15 min..

La captura fue efectuada con 50 µl de oligo perlas magnéticas a 37°C por 15 min., posteriormente se separaron fracciones con ayuda de un imán, y el RNA libre fue recuperado y eluido con 100 µl de la solución de lavado precalentada a 37°C. El mRNA obtenido se precipitó con etanol al 75% con la modificación de la adición de glicógeno, finalmente el *pellet* fue resuspendido en TE 1X disuelto en Agua DEPC.

8.4.3 Construcción de cDNA a partir de mRNA. Se empleó un volumen de reacción de 20 µl, con 2 µl de mRNA, 1 µl de dNTP's 10mM, 1 µl de iniciadores *random* 50 ng/ul y 12 µl de Agua tipo MQ, el anillamiento se efectuó a 65 °C por



10 min., posteriormente a 4°C se agregaron: 4 µl de Buffer, 1 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de la enzima Súper Script III. Las reacciones fueron corridas en un termociclador con el programa de 25°C/ 5 min, 55°C/1h, 72°C/15 min y 4°C/indefinido, por un ciclo.

8.4.4 q-PCR del gen PCL1 para determinar la remoción del RNA ribosomal 16S. Para realizar la reacción de q-PCR se empleó el sistema QuantiTect SYBR Green RT-q-PCR de Quiagen. El volumen final de la reacción fue de 15 µl, de los cuales 6 µl fueron de mRNA, 3 µl de la mezcla ya preparada de la casa comercial *Roche Applied Science* (enzima Taq-Polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, Buffer y dNTP's), 3 µl de los iniciadores *forward* PCL1 y *reverse* PCL1 (5 mM) y 3 µl de agua MQ. El programa de corrido se llevó a cabo en el equipo de Lygth Cyler (Tabla 4).

**Tabla 4. Programa de corrido de la q-PCR para determinar la concentración del promotor ribosomal PCL1**

Programa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos	Velocidad (°C/s)
Denaturación	95	10 min.	1	10
Amplificación	95	15 s	40	20
	60	10 s		
	72	20 s		
	85	00 s		
Extensión	95	00 s	1	20
	60	55 s		0.1
	95	00 s		20
Enfriamiento	4	30 s	1	20

Fuente: Esta investigación

Las mediciones q-PCR se efectuaron previa normalización de las muestras a un volumen igual, y se llevaron a cabo empleando cuantificación absoluta con dos curvas patrón de diluciones seriadas de un DNA plasmidico.

8.4.5 Construcción de la librería direccional de cDNA. El mRNA obtenido fue tratado con el buffer de fragmentación de Ambion, empleado 2 – 10 µg de RNA de muestra, la reacción fue estandarizada probando diferentes temperaturas y tiempos (tabla 5). Los diferentes tratamientos de fragmentación fueron visualizados en un gel denaturante de poliacrilamida al 10% coloreado con SYBR Green disuelto en TBE 1X. El gel tuvo un pre-corrido de 100V a 30 min. y las muestras fueron corridas en iguales condiciones posteriormente. Este mRNA fragmentado fue purificado y concentrado con el *Kit* de Zymo Research, la purificación fue realizada en columnas de Spim-Zymo™. Al finalizar se reconstituyó el mRNA con 6 ul de agua DEPC.

**Tabla 5. Temperaturas y tiempos empleados en la fragmentación de mRNA mediante el *Kit* de Ambion**

No.	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	70	15
2	70	10
3	70	5
4	70	0
6	95	5
7	95	3
8	95	0

Fuente: Esta investigación

Los fragmentos de mRNA purificados y concentrados fueron poliadenilados con el *Kit* de poly-A polimerasa de *E. coli* de New England Biolabs (NEB), este procedimiento se realizó para determinar la dirección de los transcritos. La reacción se realizó en un volumen de 20 µl en condiciones de 37°C por 10 min. Seguidamente los extremos 5' de los fragmentos fueron reparados con el *Kit* de la fosfatasa antártica de NEB, la reacción se llevó a cabo a 37°C por 10 min., con una inactivación enzimática a 65°C por 5 min.

Posteriormente los extremos 5' defosforilados fueron tratados con el *Kit* de la quinasa T4 polinucleotídica de NEB, las condiciones de reacción e inactivación fueron las mismas que para la fosfatasa antártica. Estos extremos reparados y refosforilados se trataron con el *Kit* de ligasa T4 de RNA para la ligación de un oligonucleótido híbrido (DNA-RNA).

Posteriormente los fragmentos con extremos 3' y 5' modificados fueron pasados a través del *Kit* AgenCourt RNA Clean XP de Beckman. Seguidamente se construyó la primera hebra de cDNA con Superscript III RT e iniciadores específicos a los extremos. Consecutivamente se realizó un primer enriquecimiento de las muestras empleando dos iniciadores, el primero en dirección *forward* que hibrida contra la región donde estaba el oligonucleótido híbrido y el segundo en dirección *reverse* que hibrida con la secuencia del iniciador poli-A. Posteriormente, las muestras fueron enriquecidas y dos adaptadores fueron adicionados en los extremos (mediante reacciones de q-PCR hasta el inicio de la fase estacionaria), uno de estos iniciadores contiene en su secuencia una región de reconocimiento "código de barras" (secuencias de 6 nucleótidos ubicados), la cual permite identificar cada uno de los tratamientos en el proceso de secuencia. Estos dos enriquecimientos fueron realizados mediante dos reacciones de q-PCR por cada muestra. Finalmente el cDNA fue purificado con el *Kit* de AgenCourt AMPure XP SPR1. Una vez construidas las librerías, estas fueron enviadas a *Ambry Genetics* en Estados Unidos, para realizar la secuenciación en dos direcciones, por la plataforma de *Illumina*.

La secuenciación se realizó con tres iniciadores, el primero ligó contra el adaptador ubicado hacia el extremo 5', el segundo ligó contra un sitio de reconocimiento ubicado antes del "código de barras" del adaptador ubicado al extremo 3', y el último iniciador ligó contra una secuencia complementaria al sitio de reconocimiento para el segundo iniciador, de esta forma se aseguró la secuenciación en las dos hebras y el "código de barras".

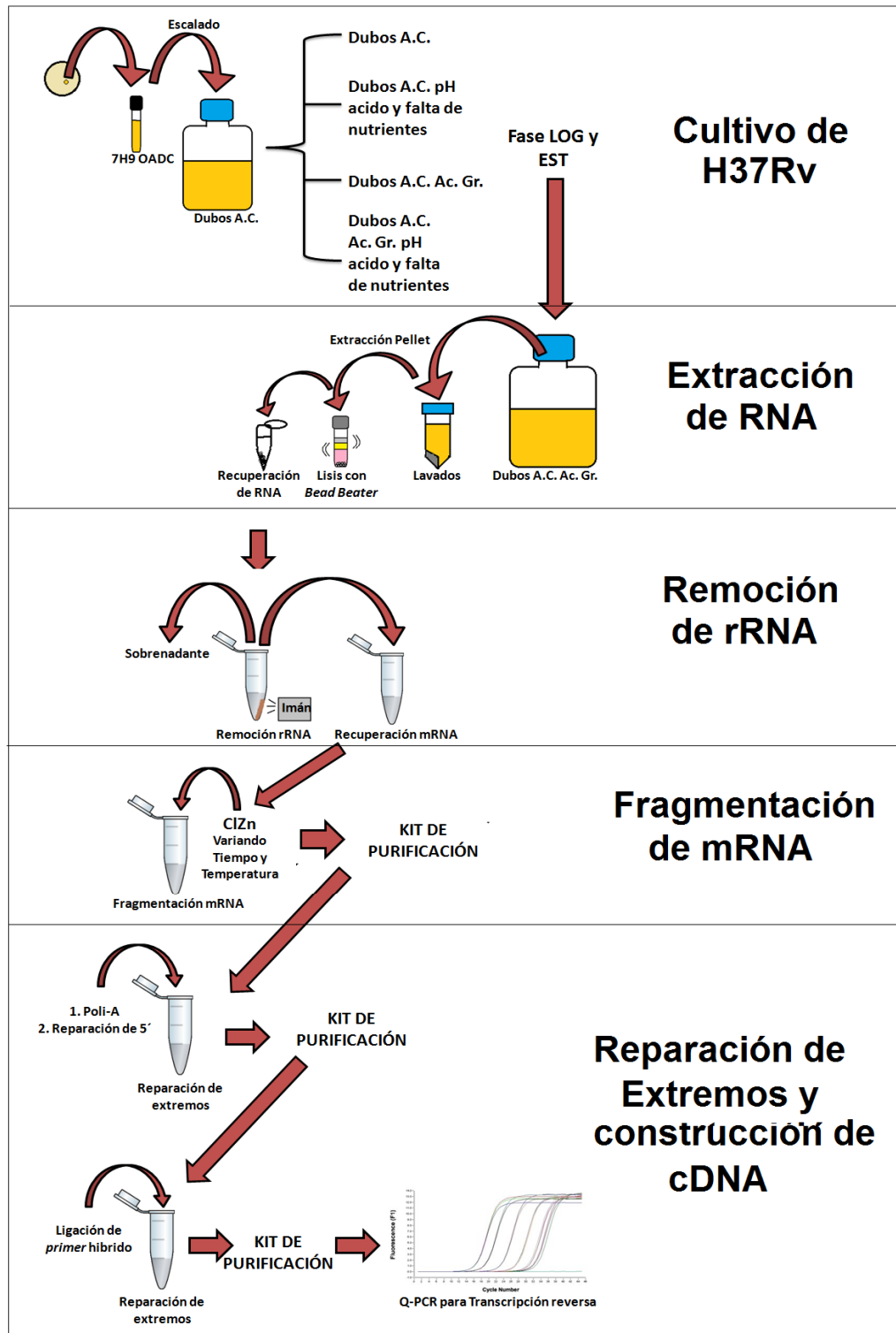
Para determinar la reproducibilidad de la técnica de RNA-Seq con las muestras tratadas en este experimento, se realizaron dos replicas biológicas de la misma muestra.

## 8.5 VERIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE SECUENCIAS Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS DE RNA-Seq

El tratamiento de los datos fue llevado a cabo por el grupo de bioinformática de la Corporación Corpogen, el cual es descrito en términos generales a continuación: El archivo de *Illumina* en formato fastaq, fue analizado para la determinación de calidad de las secuencias y posterior eliminación de regiones poliA y poliT. Seguidamente se convirtió el archivo a formato SAM y las lecturas fueron mapeadas sobre el genoma de Mtb, empleando el programa de Bowtie y ensamblado mediante el programa Cufflinks. Finalmente se visualizó la cobertura de los transcritos por el programa Artemis.

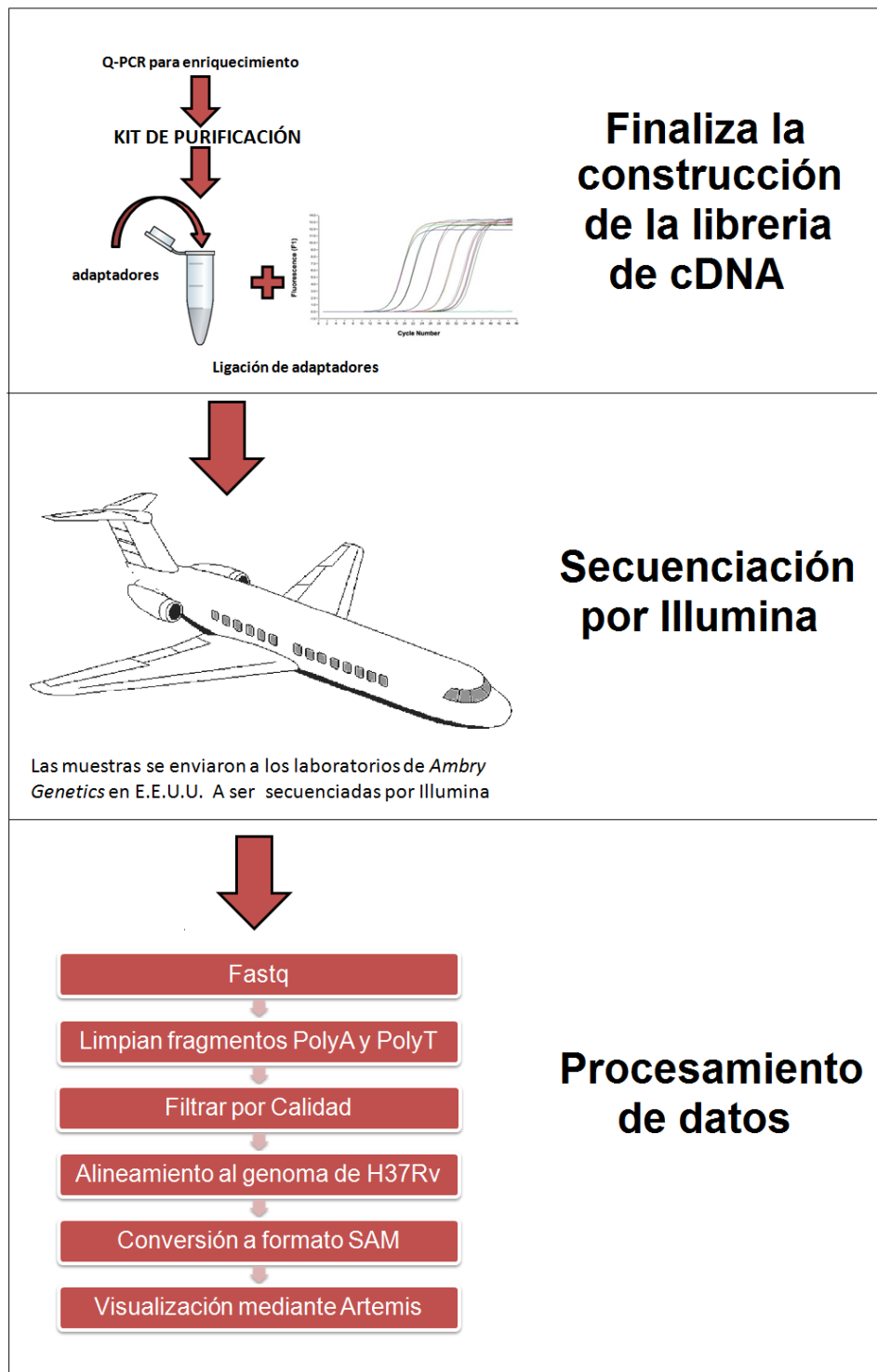
## 8.6 FLUJOGRAMA DE TODA LA INFORMACIÓN

Todas las etapas presentadas en la metodología, se resumen en los siguientes flujogramas (figura 8 y 9).



**Figura 8. Flujoograma 1 de las etapas presentadas en la metodología.** Cultivo de H37Rv, Extracción de RNA, Remoción de rRNA, Fragmentación de mRNA y Reparación de extremos y construcción de cDNA

Fuente: Esta investigación



**Figura 9. Flujograma 2 de las etapas presentadas en la metodología.** Finaliza la Construcción de la librería de cDNA, Secuenciación por *Illumina* y Procesamiento de datos. Fuente: Esta investigación.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 CULTIVO DE *Mycobacterium tuberculosis*.

La cuantificación por espectrofotometría a 600nm del inóculo bacteriano de Mtb cultivado hasta el día 40, osciló entre dos rangos 0.014 - 0.041 (antes de disgregar las células) y 0.050 - 0.110 (después de disgregar las células); igualmente el recuento de UFC en las cajas 7H10 OADC fue < 100 UFC/ml, estos resultados indican que durante el tiempo monitoreado, El crecimiento de *M. tuberculosis* (H37Rv) no fue el esperado detectado mediante los dos métodos empleados. Teniendo en cuenta que en la mayoría de los artículos científicos la cinética de crecimiento de Mtb muestra que el patógeno entra en fase logarítmica cuando presenta una densidad óptica mayor a 0.2, por esta razón, debido a que la densidad óptica no fue la ideal no se pudo realizar los experimentos de sometimiento a estrés. Estos resultados son consecuencia probablemente de que la bacteria entró en un estado viable pero no cultivable (VBNC).

Existen varias hipótesis específicas para la explicación al estado VBNC de Mtb. La primera es referida a los cambios fisiológicos que la bacteria adopta por los repiques en los medios de cultivo. Andreu y Gibert (2008), mencionan sobre la adquisición de mutaciones *in vitro* a causa de los continuos repiques en medios de cultivo, probablemente por la tasa de mutación que ocurre a lo largo de las diferentes generaciones (Madigan y Martinko, 2004). Por otro lado, el proceso de escalado empleado en este experimento podría estar afectando en este cambio fisiológico. En esta etapa se empleó dos medios de cultivo 7H9 OADC y Dubos AC, los cuales difieren en la fuente de carbono. Los estudios de Carvalho y colaboradores (2010), demostraron también que los cambios metabólicos, dependientes de la fuente de carbono, son factibles de suceder en Mtb.

Otra hipótesis se encuentra relacionada con el efecto que el medio de cultivo Dubos ejerce sobre las bacterias. En estudios anteriores se ha comprobado que el medio Dubos dejado en reposo por varias semanas sin utilizarlo (como sucedió en este estudio), podría generar una interacción del componente polisorbato 80 con la fracción de albumina (incluidos en la formulación del medio) liberando sustancias tóxicas con actividad lipolítica (Davis y Dubos, 1948; Glover, 1952 y Lyon *et al* 1963;). Como resultado de esta interacción se puede liberar una molécula lipídica soluble e hidrolizada (ácido oleico) que puede adquirir propiedades inhibitoras del crecimiento para Mtb (Cutinelli, 1942; Dubos, 1947; Saz, 1949; Seiji, 1953 y Youmans y Youmans, 1953).

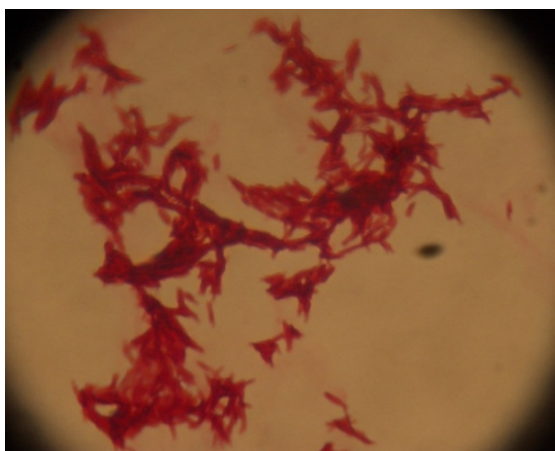
Igualmente la estabilidad del componente polisorbato 80 también puede tener un efecto sobre el crecimiento de Mtb. El compuesto puede someterse a auto oxidación, que resulta en la formación de hidroxiperoxido y ácidos de cadena corta como el ácido fórmico, caracterizados como compuestos inhibidores del crecimiento bacteriano (Kerwin, 2007). Esta reacción puede ser el resultado de la exposición del medio a la luz, por ello las condiciones de almacenamiento del medio Dubos siempre involucran 2 – 8 °C en oscuridad, asegurando estabilidad del surfactante (BD, 2006). En esta investigación el almacenaje del medio Dubos no fue efectuado con todas las recomendaciones, puesto que las condiciones de oscuridad no fueron monitoreadas durante todo el proceso de almacenaje.

Otra hipótesis que permite explicar la no evidencia de crecimiento se encuentra en la calidad del agua utilizada en la preparación del medio de cultivo. El agua tipo manantial, adquirida de forma comercial, puede tener tratamientos de reducción o aumento de minerales según lo estipula la Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios (CODEX STAN 192-1995) y los Principios Generales del Codex para la Adición de Nutrientes Esenciales a los Alimentos (CAC/GL 9-1987) (Codex Standard, 2001). Entre estos minerales se encuentra el hierro, considerado como un metal esencial en varias funciones celulares (Madigan y Martinko, 2004). Muy probablemente el lote de agua empleada en este experimento no contenía la cantidad de hierro necesaria para suplir el crecimiento de Mtb.

## 9.2 EXTRACCIÓN DE RNA DE *Mycobacterium tuberculosis* CULTIVADA EN UN MEDIO RICO DE ÁCIDOS GRASOS

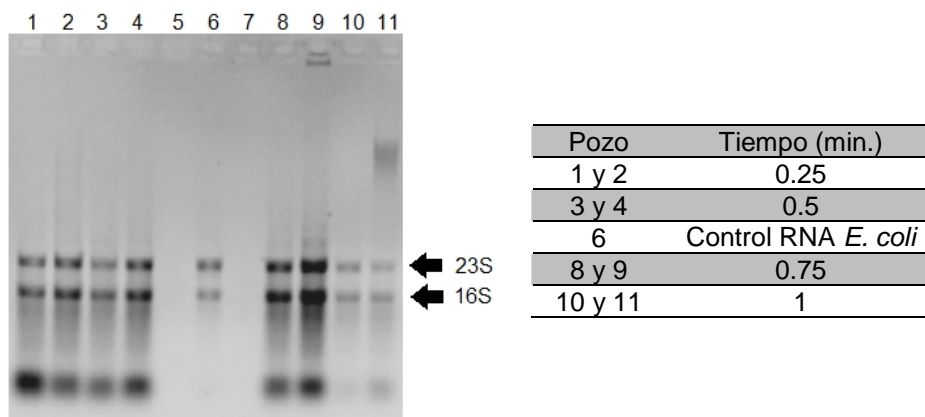
La extracción de RNA de la cepa Mtb H37Rv crecida en los medios Dubos AC Ac. Gr. y Dubos ADC de cultivos mantenidos desde diciembre del 2010 en incubadora a 37°C, no mostraron bandas de RNA en un gel de agarosa al 1%. Por consiguiente, se realizaron dos puntos de control en la extracción: coloración de Ziehl-Neelsen, para observar si había lisis bacteriana y extracción de RNA de *E. coli* como punto de verificación de las etapas del proceso.

Se realizó la coloración Ziehl-Neelsen convencional del precipitado de las perlas de Zirconio-Silica del tubo de lisis después de haber pasado por *Bead Beater*. Los resultados esperados eran observar fragmentos celulares, sin embargo en este experimento se observaron células intactas, lo cual permitió concluir que el procedimiento no permitía una adecuada lisis celular, en consecuencia, el protocolo para la ruptura de la pared estaba siendo ineficaz (Figura 10).



**Figura 10. Tinción Ziehl-Nielsen del precipitado obtenido después de la lisis mecánica.** Imagen observada a través de microscopio con un aumento de 1000X.  
Fuente: Esta investigación

Para determinar que la lisis en *Bead Beater* era efectiva se decidió realizar el procedimiento de extracción con una cepa de *E. coli* de Corpogen efectuando diferentes tiempos de lisis (Figura 11 y tabla 6). Debido a que fue posible la extracción de RNA, se comprobó que la integridad de esta molécula no se ve comprometida por el rompimiento mecánico, sin embargo estos resultados no son comparables con *Mtb*, debido a las diferencias de la conformación en la pared celular. *E. coli* presenta una pared a base de peptidoglicano (Madigan y Martinko, 2004), cuyos enlaces entre glicanos pueden romperse más fácilmente por acción del choque con perlas de Zirconio-Silica, a diferencia de *Mtb* la cual contiene una proporción elevada de lípidos en su pared, confiriéndole estabilidad y resistencia (Brennan, 2003).



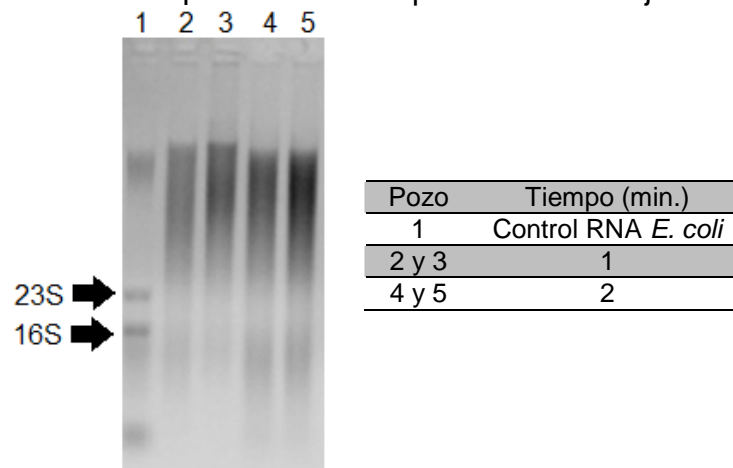
**Figura 11 y Tabla 6. Extracción de RNA de *Escherichia coli* con diferentes tiempos de agitación en *Bead Beater*.** Gel de agarosa al 1% corrido a 80 V por 30 min en cámara horizontal en *buffer* TAE 1X.  
Fuente: Esta investigación



Se decidió realizar 9 variaciones a la extracción convencional para la obtención de RNA, 6 de estas fueron probadas con variaciones en el orden y composición química de los reactivos empleados, las técnicas se describen en la tabla 5, y 3 procedimientos más fueron probados con variaciones en el rompimiento mecánico, más precisamente con diferentes tiempos de lisis en el *Bead Beater*. Acoplado a estos experimentos se realizó tinción Ziehl-Neelsen de las perlas en el tubo de lisis después del rompimiento mecánico, los resultados muestran que no hay ruptura celular, igualmente en los geles no se pudo evidenciar ninguna banda de RNA.

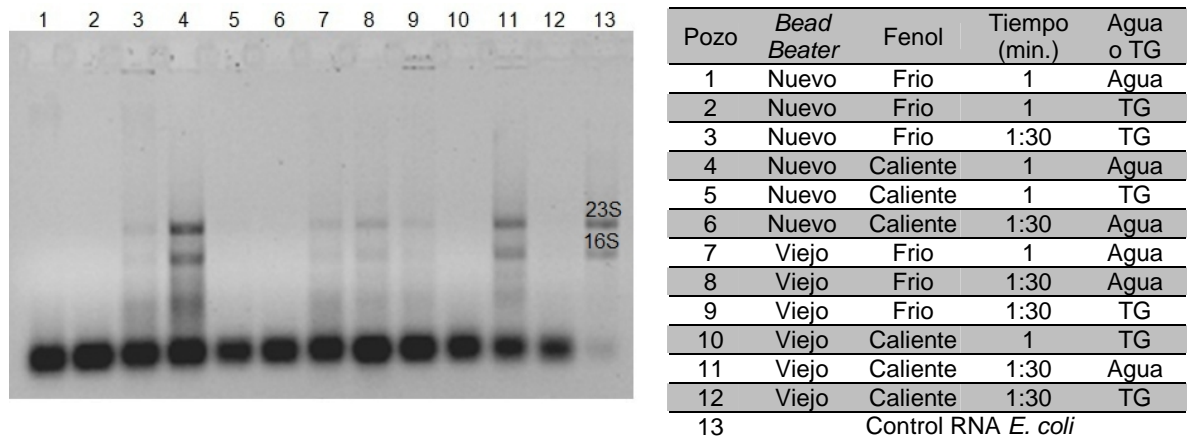
La variación en el protocolo con respecto al empleo de una temperatura elevada, es considerada como efectiva para la disgregación de los puentes entre glicanos del peptidoglicano y de lípidos del arabinomanano, provocando lisis celular, sin embargo las investigaciones respecto a la extracción de DNA de *M. smegmatis* han concluido que una temperatura adecuada para la lisis celular se encuentra entre 80 a 90°C (Valente *et al*, 2009), de acuerdo a esto, es posible una temperatura menor a 80°C como se empleo en este experimento, no haya provocado lisis celular.

Por otro lado, se realizó un protocolo acoplando CETAB. En este proceso las bacterias se sometieron a 1 y 2 min de agitación con *Bead Beater*, los resultados indican que hay degradación de ácido nucleico (Figura 12 y tabla 7). Aunque este experimento ayudó a concluir que la lisis de Mtb puede darse en el proceso de extracción por acción del surfactante catiónico CETAB ayudando a romper la membrana, no se decidió acoplarlo debido a que solo se extrajo DNA.



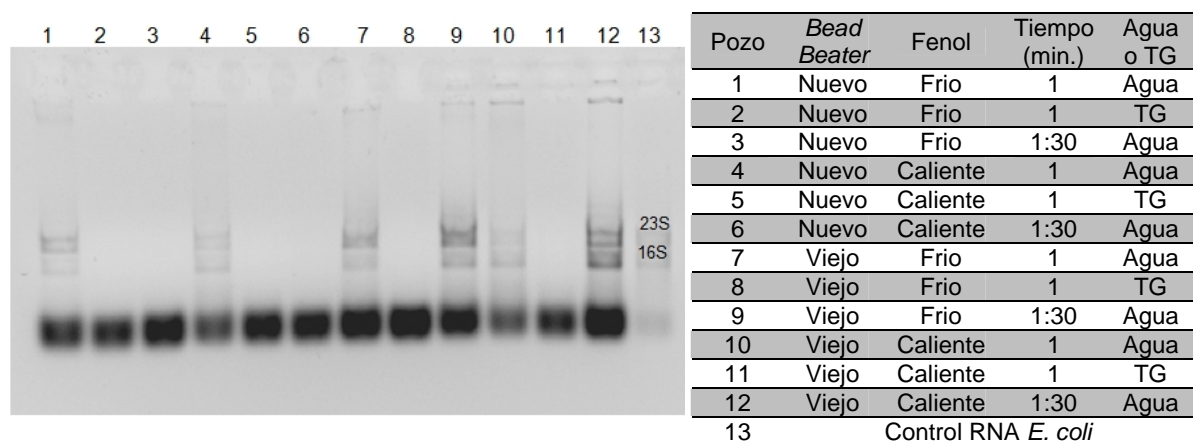
**Figura 12 y tabla 7. Lisis de *Mycobacterium tuberculosis* con el protocolo de CETAB.** Gel de agarosa al 1% corrido a 80 V por 30 min en cámara horizontal.  
Fuente: Esta investigación

Por otro lado, en el transcurso de este experimento Corpogen adquirió otro *Bead Beater*, por consiguiente se decidió repetir la extracción con este nuevo *Bead Beater*, sin embargo los resultados fueron negativos. Por lo tanto y siguiendo con el acoplamiento de nuevos métodos, se realizó una extracción de RNA de *E. coli* y *M. smegmatis* con los dos *Bead Beater* en diferentes tiempos de lisis y con el empleo de Tiozianato de Guanidina, variando igualmente el empleo de fenol frío o caliente para mejorar la solubilización de lípidos a nivel de pared celular (Figuras 13 y 14 y tablas 8 y 9).



**Figura 13 y tabla 8. Extracción de RNA de *Escherichia coli* mediante lisis mecánica hecha por dos *Bead Beater* diferentes variando el tiempo de lisis, utilizando fenol frío o caliente y adicionando Tiozianato de Guanidina.** Gel de agarosa al 1% corrido a 80 V por 30 min en cámara horizontal.

Fuente: Esta investigación



**Figura 14 y tabla 9. Extracción de RNA de *Mycobacterium smegmatis* mediante lisis mecánica hecha por dos *Bead Beater* diferentes variando el tiempo de lisis, utilizando fenol frío o caliente y adicionando Tiozianato de Guanidina.** Gel de agarosa al 1% corrido a 80 V por 30 min en cámara horizontal

Fuente: Esta investigación

Los resultados mas óptimos en la extracción de RNA de *M. smegmatis* empleando la variación en el tiempo de lisis, el empleo de fenol frio o caliente y el uso de los dos *Bead Beater*, fueron probados en un experimento de extracción de RNA de Mtb, esta variación se puede observar en el pozo 12 de la figura 14 (fenol caliente, sin Tiozianato de Guanidina y realizando la lisis mecánica en el *Bead Beater* viejo en 1 min. 30 segundos); sin embargo estos parámetros ajustados al protocolo de extracción no evidenciaron fracciones de RNA para Mtb, cuando fueron observadas en el gel de agarosa.

Al finalizar todos los protocolos ensayados y los puntos de confirmación permitieron concluir que la lisis celular no estaba siendo adecuada. Debido a que el protocolo inicial de extracción de RNA realizado en Corpogen ya había sido estandarizado, una posible hipótesis que permite explicar estos resultados, es la aparición de un cambio estructural en la pared celular de Mtb. En relación a lo anterior, la literatura reporta que los cambios mutacionales en Mtb son frecuentes (Andreu y Gilbert, 2008), los cuales muy posiblemente alteraron el fenotipo de la pared celular y dificultaron el proceso de ruptura mecánica de las bacterias.

### 9.3 CONSTRUCCIÓN DE LAS LIBRERÍAS DE cDNA PARA RNA-Seq

9.3.1 Remoción de rRNA mediante el *Kit* de MICROBExpress. Se realizaron dos tratamientos para la remoción de rRNA por MICROBExpress, en las cuales se ejecutaron tres mediciones antes y después de la aplicación del *Kit*, estas incluyeron visualización de RNA en gel de agarosa al 1%, cuantificación por NanoDrop y reacciones de q-PCR para cuantificar el promotor ribosomal PCL1.

Los resultados por NanoDrop y q-PCR del primer tratamiento, el cual sigue las indicaciones del *Kit*, indican un 20% de remoción de la fracción rRNA (Figura 15). La explicación a tales resultados se basa en las características genéticas del genoma de Mtb. El patógeno presenta un genoma rico en G-C (Cole *et al*, 1998), el cual es susceptible a formar estructuras secundarias que generan problemas en la denaturación del RNA y la consecuente unión a las sondas de remoción. Para solucionar este inconveniente se incrementó la temperatura de denaturación de 70° a 80°C y la temperatura de anillamiento de las sondas de 37° a 42°C (segundo tratamiento). Los resultados por NanoDrop indican una remoción de 56.97%, y la cuantificación de remoción del PCL 1 comparando los valores CP antes y después del *Kit*, indican una remoción del 64% (Figura 16), por lo cual se decidió acoplar las temperaturas de este segundo tratamiento para la ejecución de RNA-Seq.

### Cuantificación de RNA total por Nanodrop en las dos estandarizaciones

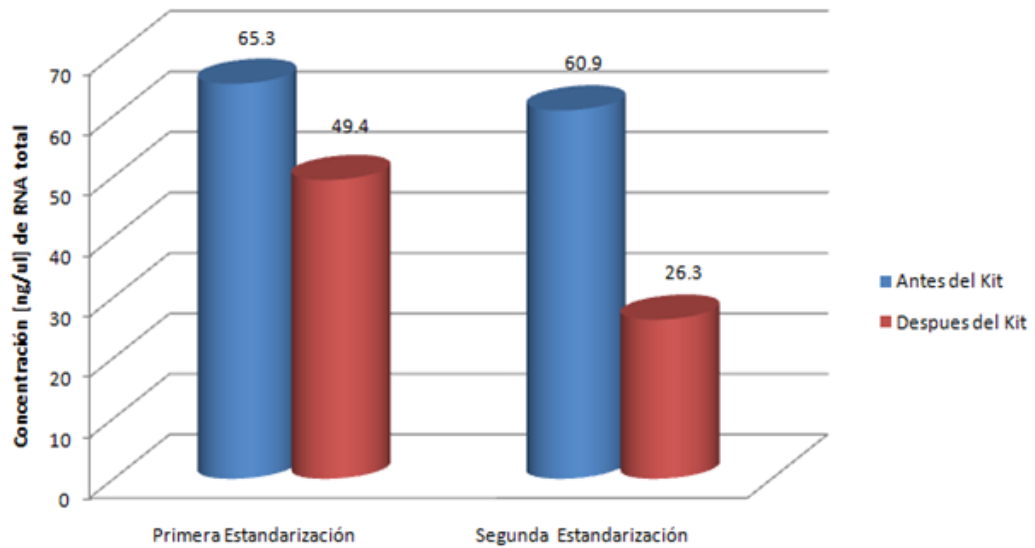


Figura 15. Resultados cuantificación de RNA total de los dos ensayos de remoción de rRNA

### Cuantificación de PCL1 por q-PCR en las dos estandarizaciones

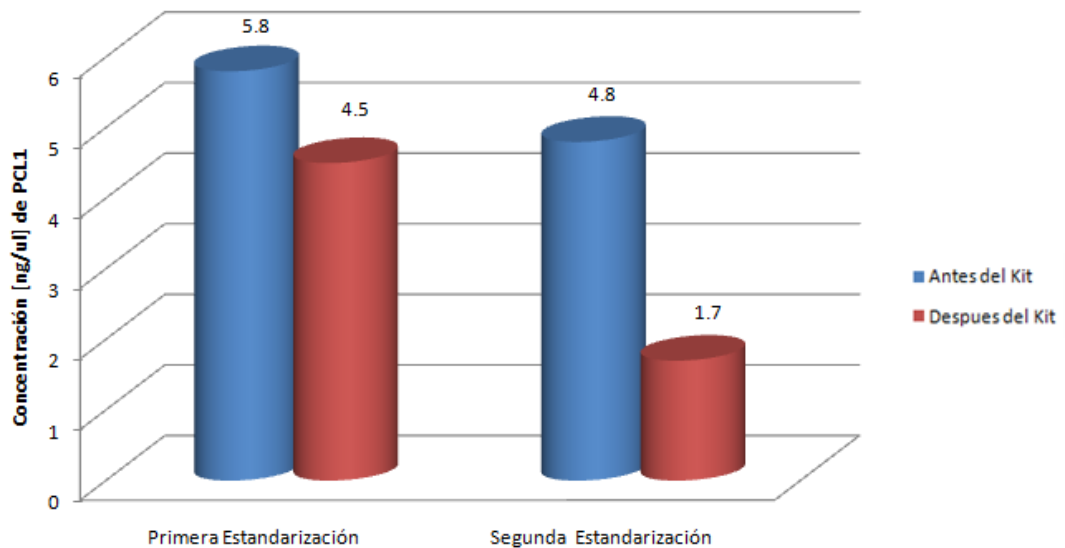


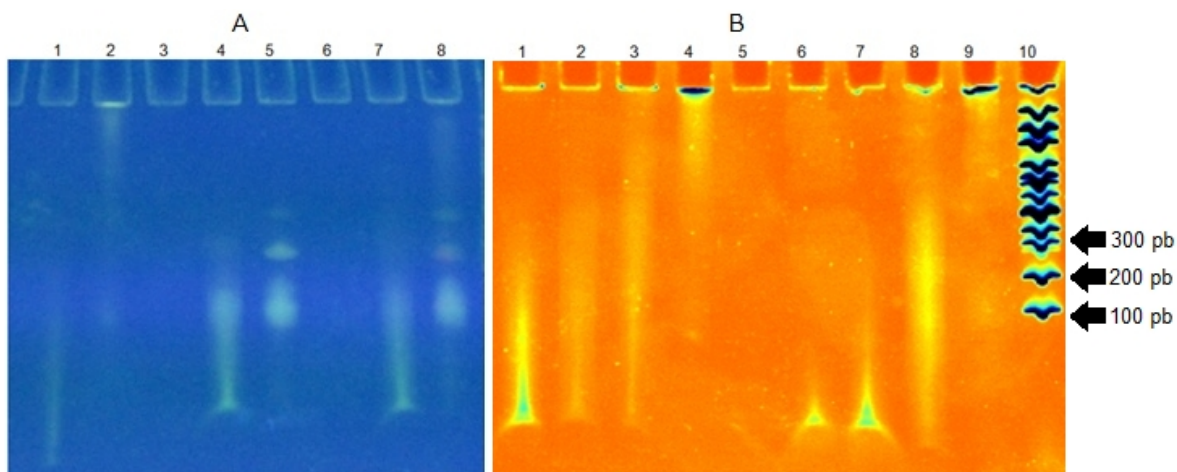
Figura 16. Resultados de la cuantificación de PCL1 de los dos ensayos de remoción de rRNA

9.3.2 Fragmentación de RNA usando hidrólisis catalizada por cationes en *Mycobacterium tuberculosis*. Como lo menciona la literatura, las librerías de cDNA en las técnicas de RNA-Seq pueden ser construidas de dos formas: la primera es fragmentando el RNA y luego retrotranscribiéndolo a cDNA o se puede efectuar la transcripción reversa a cDNA y posteriormente fragmentar esta molécula, sin embargo para el reconocimiento de la cadena (codificante) de la cual proviene el transcrito de RNA, es recomendable fragmentar y luego retrotranscribir (Wilhelm *et al*, 2010). Por otro lado la fragmentación de RNA permite reducir las estructuras secundarias que se formarían intermolecularmente, lo cual resulta en un menor sesgo en la construcción de la librería (Wilhelm *et al*, 2010). Por la anterior razón, se justifica que en esta investigación, se decidió realizar la construcción de la librería con el primer criterio (fragmentar y luego retrotranscribir). La estandarización de la fragmentación de RNA se realizó con el *Kit* de Ambion a base de cloruro de zinc, debido a que el zinc permite el rompimiento de los enlaces fosfodiéster, generando muchos fragmentos de diferentes longitudes.

En la figura 17 A, se puede apreciar que la fragmentación del RNA de *E. coli*, empleando el *Kit*, tiene resultados reproducibles. Igualmente, se puede valorar que existen diferencias en la fragmentación entre el RNA de *E. coli* y el de *Mtb*, probablemente debido a las diferencias genómicas entre los genomas de las dos cepas. La principal diferencia que se atribuye es el contenido de GC, el cual en *E. coli* corresponde aproximadamente al 50% y en *Mtb* es el 64%.

Por otro lado, los RNA's de *Mtb*, a diferencia de las muestras de *E. coli*, presentan una menor intensidad en el color visualizado indicando una menor cantidad de RNA.

Igualmente, en la figura 15 A y B se puede apreciar que no existe una adecuada integridad del RNA de *Mtb* sin tratamiento, sin embargo, el ensayo de fragmentación fue realizado variando los tiempos de incubación y temperatura de la exposición con la solución de ClZn. Al finalizar se escogió el tratamiento que dio como resultado fragmentos entre longitudes de 60 – 200 pb. Se estableció este rango debido a que son las longitudes de fragmentos admitidas por la secuenciación de la librería de cDNA para la plataforma de *Illumina*. El tratamiento más adecuado fue 10 min. a 70°C (Figura 17, tabla 10 y 11).



Gel	Pozo	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
A	1	RNA Mtb con el Kit de fragmentación sin modificaciones	
A	2	RNA Mtb sin fragmentación	
A	4 y 7	RNA <i>E. coli</i> con el Kit de fragmentación sin modificaciones	
A	5 y 8	RNA <i>E. coli</i> sin fragmentación	
B	1	70	15
B	2	70	10
B	3	70	5
B	4	70	0
B	6	95	5
B	7	95	3
B	8	95	0
B	9	RNA sin tratamiento	
B	10	MPM 100 pb	

**Figura 17, tabla 10. Fragmentación de RNA de *Mycobacterium tuberculosis* en diferentes tiempos y a diferentes temperaturas con el Kit de Ambion.** A: RNA *E. coli* y *Mycobacterium tuberculosis* & B: RNA *Mycobacterium tuberculosis*. Gel de poliacrilamida denaturante al 10% corrido a 100 V por 30 min en cámara vertical  
Fuente: Esta investigación

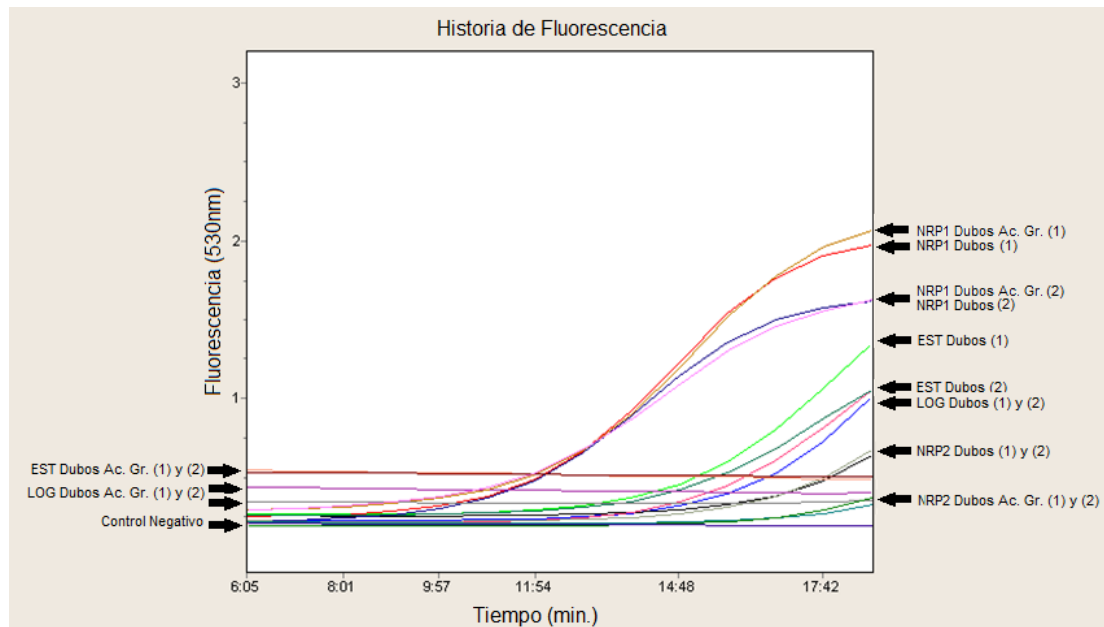
9.3.3 Preparación de las librerías de cDNA con muestras de RNA de *Mycobacterium tuberculosis* bajo hipoxia vs. cultivo aerobio. Las muestras de RNA provenientes de México fueron cuantificadas por NanoDrop (Tabla 11), y visualizadas en un gel de agarosa al 1% en el que se estimó contaminación por DNA, por lo cual se les aplico un tratamiento con DNAsa de Promega. Los resultados evidencian que las muestras correspondientes al tratamiento de Dubos Ac. Gr. presentan baja concentración de RNA en comparación con los tratamientos de Dubos, esto posiblemente está vinculado con las interferencias que los Ac. Gr. y otro tipo de componentes celulares tienen en el proceso de extracción.

**Tabla 11. Cuantificación de RNA total mediante NanoDrop de las muestras de México antes de la construcción de librerías de cDNA**

No.	Muestra	[ng/ $\mu$ l]	A260	A280	260/280
1	LOG Dubos	134.5	3.358	1.736	1.934
2	EST Dubos	164.3	4.107	2.076	1.978
3	NRP1 Dubos	147.1	3.678	1.926	1.910
4	NRP2 Dubos	181.6	7.026	3.457	2.032
5	LOG Dubos Ac. Gr.	120.4	3.011	1.486	2.026
6	EST Dubos Ac. Gr.	94.7	2.369	1.164	2.035
7	NRP1 Dubos Ac. Gr.	35.4	0.884	0.423	2.090
8	NRP2 Dubos Ac. Gr.	5.3	0.134	0.053	2.028

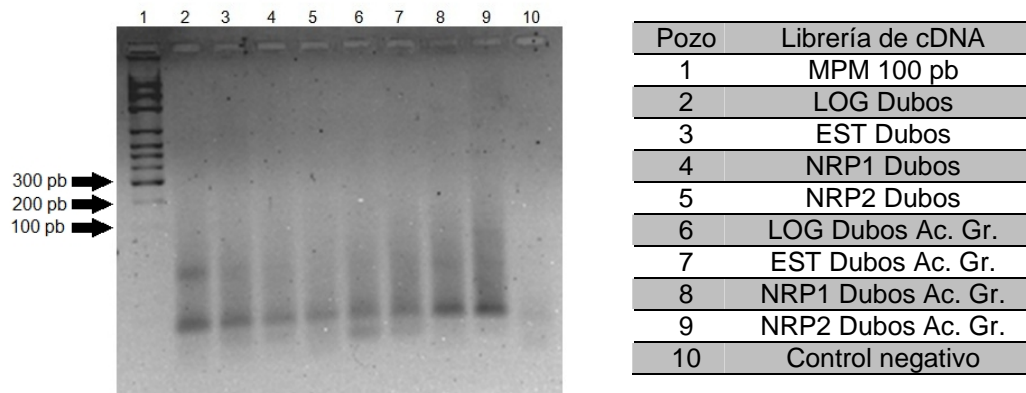
Posteriormente se realizó el proceso de trabajo planteado hasta la construcción de las librerías de cDNA. El primer enriquecimiento se monitoreó mediante q-PCR empleando SYBR-Green I en el equipo de *Lyght Cycler*, las reacciones fueron detenidas cuando las muestras mostraban una cinética antes de la fase estacionaria, asegurando una buena representación de los transcritos amplificados (Figura 18). Los resultados observados con respecto a la figura 18 indican que las muestras de los tratamientos NRP1 Dubos y NRP1 Ac. Gr., a diferencia de los demás, llegaron más rápidamente a la fase estacionaria, por otro lado las muestras que se tardaron más tiempo en amplificar fueron NRP2 Dubos y NRP2 Ac. Gr. Estos resultados no son congruentes con la concentración determinada por NanoDrop, indicando que los procedimientos y técnicas empleadas en la construcción de la librería, pueden alterar la concentración de las muestras.

Igualmente en la figura 18 se observa que las muestras LOG Ac. Gr. y EST Ac. Gr. no pudieron ser amplificadas, razón por lo cual fueron recuperadas a partir de una alícuota recogida después del uso del *Kit AgenCourt* y siguiendo el protocolo consecutivo hasta este primer enriquecimiento. El resultado de esta recuperación permitió concluir que es viable y necesario el almacenamiento de alícuotas después de cada procedimiento o técnica empleada en la construcción de esta librería.



**Figura 18. Enriquecimiento por q-PCR de las librerías de cDNA.** Captura de pantalla del software para Lygth Cycler, se muestran 17 muestras indicadas en el recuadro azul, el color de las curvas corresponde al de la muestra referenciada  
Fuente: Esta investigación

Una vez construidas las librerías se determinó la integridad de las muestras amplificando los cDNA con los iniciadores de secuenciación. Los resultados de las amplificación mediante q-PCR, muestran un barrido de fragmentos de cDNA que oscila entre <100 pb y 300 pb (Figura 19 y tabla 12), indicando que la longitud de fragmentos esperada se mantuvo durante la construcción de la librería, asegurando una óptima secuenciación por la plataforma de *Illumina*.



**Figura 19 y tabla 12. Amplificación de las librerías de cDNA con los iniciadores de secuenciación.** Gel de agarosa al 1% corrido a 80 V por 30 min en cámara horizontal  
Fuente: Esta investigación



Los resultados de la cuantificación por NanoDrop de las librerías de cDNA, muestran que la cantidad de RNA osciló entre 6 y 27,93 ng/ul, y que la relación de absorbancia estuvo en un rango de 1,85 y 2,10, garantizando una buena calidad y cantidad necesaria para el proceso de secuenciación en la plataforma de *Illumina* (Tabla 13). Después del segundo enriquecimiento de la librería, los resultados indican que la concentración de las muestras se normalizo entre los tratamientos LOG Dubos, NRP1 Dubos, NRP1 Dubos Ac. Gr. y NRP2 Dubos Ac. Gr., adicionalmente los tratamientos correspondientes a EST Dubos y NRP2 Dubos, en relación con los demás tratamientos, siguen manteniendo una alta concentración de RNA, resultado que concuerda con lo observado antes de la construcción de las librerías (Tabla 13).

Por otro lado, las muestras de los tratamientos LOG. Dubos Ac. Gr. y EST Dubos Ac. Gr. a diferencia de las otras muestras, son los que presentan una menor concentración de RNA, esto es posiblemente debido a que las muestras fueron recuperadas nuevamente a partir del *Kit* de purificación AgenCourt (Tabla 13).

**Tabla 13. Cuantificación de cDNA total mediante NanoDrop de las muestras de México después de la construcción de librerías**

No.	Muestra	[ng/ul]	Absorbancia a 260	Absorbancia a 280	260/280
1	LOG Dubos	13.70	0.27	0.15	1.85
2	EST Dubos	23.47	0.47	0.25	1.91
3	NRP1 Dubos	14.63	0.29	0.15	2.00
4	NRP2 Dubos	27.93	0.56	0.29	1.90
5	LOG Dubos Ac. Gr.	6.00	0.12	0.06	2.10
6	EST Dubos Ac. Gr.	8.87	0.18	0.09	1.95
7	NRP1 Dubos Ac. Gr.	11.30	0.23	0.12	1.97
8	NRP2 Dubos Ac. Gr.	12.50	0.25	0.13	1.86

Fuente: Esta investigación

En la plataforma de *Illumina*, los adaptadores adicionados en la librería, presentan secuencias que hibridan por complementariedad a unos oligonucleotidos que se encuentran pegados a una plataforma sólida. Posteriormente, las moléculas ligadas son amplificadas en puente por ciclos de PCR, resultando en la formación de cientos de millones de conjuntos de transcritos, denominados *clusters*. La secuenciación simultanea de estos clusters se lleva a cabo según la tecnología de *Illumina*.

#### 9.4 VERIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE SECUENCIAS Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS DE RNA-Seq

Las secuencias de las librerías por la plataforma de *Illumina* se recibieron en varios archivos en formato Fastq (formato fasta con los archivos de calidad). Este formato contiene la secuencia, las coordenadas de ubicación en la celda, el código de barras de la muestra: y los valores *qseq* de calidad de la asignación del nucleótido según la señal obtenida (secuencias con los *scores* de calidad). Se removieron las colas de poliA de las secuencias y fueron filtradas por calidad, seleccionando los nucleótidos con un score superior a 25 y cuya longitud fuese igual o mayor a 50 nucleótidos. Los resultados indican un promedio de 28% de remoción de lecturas, después del procedimiento por el filtro de calidad.

Igualmente, los resultados de la secuenciación, después de aplicar el filtro de calidad, muestran lecturas que oscilan entre 7000000 y 50000000 (Tabla 14). La muestra No 5, correspondiente al tratamiento de LOG Dubos Ac. Gr. a diferencia de las demás muestras, es la que menor cobertura tiene. Este resultado es coherente con lo encontrado por la cuantificación con NanoDrop, en donde se indica que esta muestra es la que tiene menor concentración de cDNA. Esta comparación permite concluir que la recuperación de muestras en la construcción de las librerías de cDNA, puede afectar el proceso de secuenciación por la plataforma de *Illumina*.

A diferencia de esta muestra No 5, los otros datos de cobertura no presentan congruencia con la cantidad de cDNA detectado. Adicionalmente, en la tabla 14, se puede apreciar que los tratamientos NRP1 y NRP2 a diferencia de los de Dubos, presentan mayor cobertura de lecturas, posiblemente por efectos de la preparación de las genotecas y la calidad de RNA inicial.

**Tabla 14. Numero de lecturas obtenidas de la secuenciación por *Illumina*. Antes y después de filtrar por calidad**

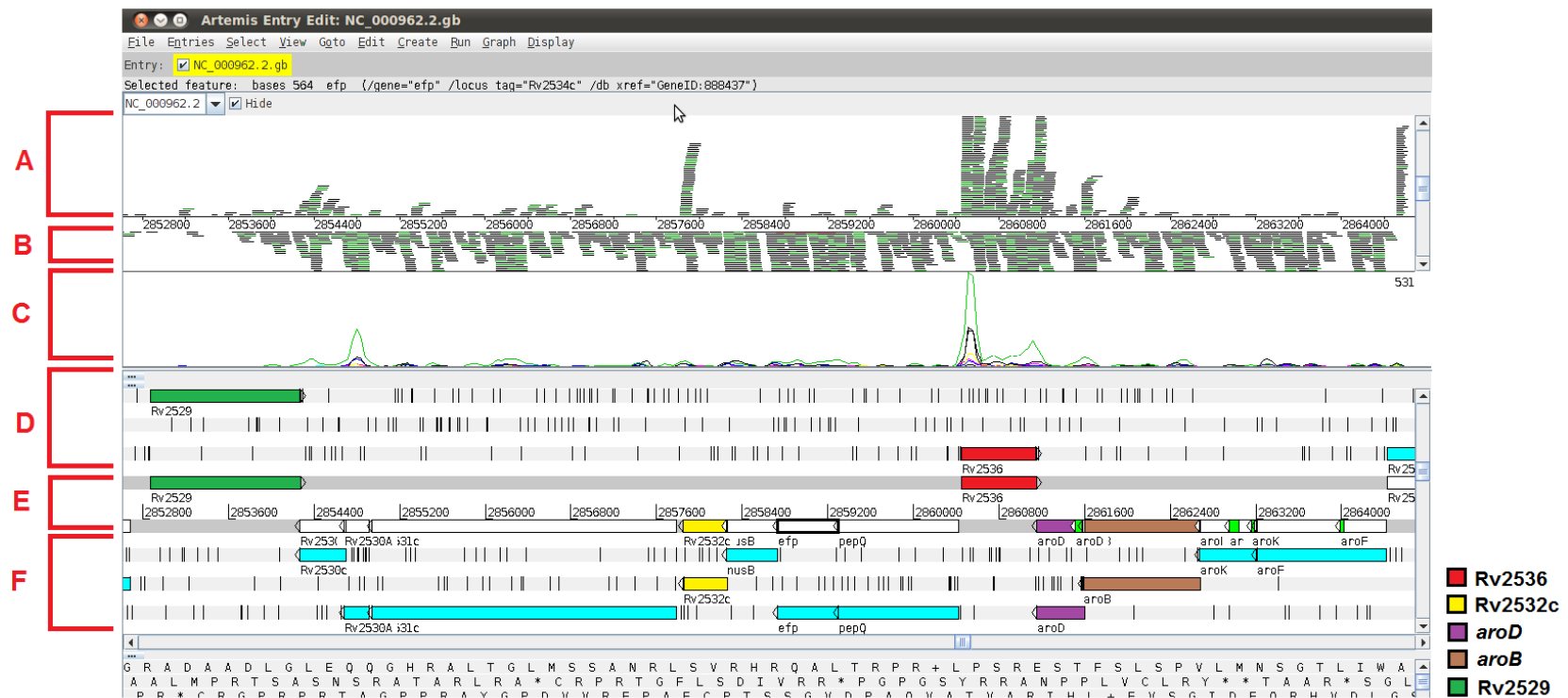
No.	Muestra	No. de Lecturas		Porcentaje que se conserva (%)
		Antes del filtro de calidad	Después del filtro de calidad	
1	LOG Dubos	21157117	16341178	77.24
2	EST Dubos	25300910	19750200	78.06
3	NRP1 Dubos	61106728	47806067	78.23
4	NRP2 Dubos	35358589	26881253	76.02
5	LOG Dubos Ac. Gr.	10251520	7152175	69.77
6	EST Dubos Ac. Gr.	25397117	14960773	58.91
7	NRP1 Dubos Ac. Gr.	34008301	24446431	71.88
8	NRP2 Dubos Ac. Gr.	24289241	16532242	68.06

Fuente: Esta investigación

Los resultados de los niveles de expresión fueron analizados en el programa Artemis (Figura 20). En este programa se puede estimar la direccionalidad de los transcritos y determinar los niveles de expresión de cada gen analizado. Entre estos resultados se puede hacer una aproximación visual: algunos genes están probablemente siendo silenciados, como en el caso de Rv2536, en donde se aprecia la transcripción de toda la región del gen en ambas direcciones, sin embargo, el silenciamiento no implica la transcripción complementaria a toda la región del gen, sino también el silenciamiento de algún promotor dentro del gen, como posiblemente podría estar sucediendo con Rv2532c. La baja regulación o nula expresión de los genes también puede darse por la no codificación de los transcritos, como se muestra para el gen Rv2529 (Figura 20).

Los datos visualizados en Artemis, permiten también valorar las anotaciones de los genes sobre el genoma de referencia de H37Rv. En la figura 20, se puede determinar que los transcritos que alinean contra el gen *aroD* inician en la región intergenética (coloreada de verde) entre los genes *aroB* y *aroD*, indicando que probablemente el gen *aroD* está mal anotado.

Como se ha demostrado, los resultados en la determinación de los perfiles de expresión de los genes que fueron visualizados en el programa Artemis, permiten responder a la pregunta de investigación planteada en este estudio. Mediante la estandarización de la técnica de RNA-Seq, es posible estudiar el transcriptoma de *Mtb* cultivada en medio rico de ácidos grasos y sometida a estrés *in vitro*.



**Figura 20. Captura de ventana del programa Artemis con los datos procesados de RNA-Seq.** A: Trascritos alineados en la hebra 5´ 3´; B: Trascritos alineados en la hebra 3´ 5´; C: Cobertura del conjunto de transcritos; D: Genes anotados que se transcriben en la hebra 5´ 3´; E: Unión de D y F; y F: Genes anotados que se transcriben en la hebra complementaria  
Fuente: Esta investigación

## 10. CONCLUSIONES

1. La modificación de las etapas de remoción de rRNA y fragmentación de mRNA, permitió estandarizar la técnica RNA-Seq para el estudio del transcriptoma de Mtb cultivada en medio rico de ácidos grasos y sometida a estrés celular *in vitro* por hipoxia.
2. El incremento en la temperatura de denaturación y anillamiento en la ejecución del *Kit* MICROBExpress, permitió optimizar el proceso de remoción de la fracción rRNA en la construcción de las librerías de cDNA.
3. La fragmentación de RNA para la generación de fragmentos entre longitudes 60 y 200 pb en la construcción de la librería, se presentó dependiente de la variación en los tiempos y temperaturas empleadas por la catálisis a base de Zinc.
4. Los problemas generados en el cultivo de Mtb H37Rv en este estudio fueron causados por cambios en la fisiología del patógeno, el estrés generado por los repiques y las condiciones del medio de cultivo empleado.
5. Los problemas generados en la extracción de RNA de Mtb H37Rv fueron causados por cambios estructurales adaptativos de la pared celular del patógeno, lo que pudo ocasionar una resistencia en la lisis celular.
6. Efectuando la fragmentación de RNA y posterior modificación de extremos de cada fragmento, fue posible la construcción de la librería direccional de cDNA, con secuencias de alta calidad como fue evidente cuando fueron observadas en el programa Artemis.
7. Las etapas de purificación en la construcción de las librerías de cDNA, son cuidadoso minucioso, pues el proceso pueden disminuir significativamente la cantidad de RNA recuperado. Razón por la cual es viable y necesario, el almacenamiento de alícuotas remanentes, como una alternativa adicional de recuperación.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Se propone la adquisición de una cepa de referencia H37Rv con el fin de replicar los datos obtenidos en esta estandarización preliminar de la técnica de RNA-Seq
2. Se recomienda protocolos de validación de la técnica, donde se analice la reproducibilidad, sensibilidad y especificidad.
3. Se sugiere un monitoreo en las condiciones de almacenamiento del medio de cultivo Dubos, asegurando la estabilidad de los compuestos presentes en este.
4. Se recomienda el monitoreo de los lotes de agua, empleadas en la preparación del medio de cultivo Dubos, asegurando que no haya cambio en las etiquetas del agua embotellada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Anders, S. y Huber, W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, Vol. 11(10).

Andreu, N. y Gibert, I. 2008. Cell population heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuberculosis*, Vol. 88(6): 553 – 559.

Álvarez, N., Borrero, R., Reyes, F., Camacho, F., Mohd, N., Sarmiento, M. y Acosta, A. 2009. Mecanismos de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente. *Vaccimonitor*, Vol. 18(3).

Auer y Doerge, R. 2010. Statistical design and analysis of RNA-Seq data. *Genetics*, Vol. 185(2): 405 - 416

Bacon, J., James, B., Wernisch, L., Williams, A., Morley, K., Hatch, G., Mangan, J., Hinds, J., Stoker, N., Butcher, P., y Marsh, P. 2004. The influence of reduced oxygen availability on pathogenicity and gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis*, Vol. 84(3) 205 – 217.

): –

Barry, C., Boshoff, H., Dartois, V., Dick, T., Ehrt, S., Flynn, J., Schnappinger, D., Wilkinson, R. y Young, D. 2009. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 7: 845 – 855.

Behar, S., Divangahi, M. y Remold, H. 2010. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy?. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 8(9): 668 – 674.

Brennan, P. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, Vol. 83(3): 91 – 97.



Carvalho, L., Fischer, S., Marrero, J., Nathan, C., Ehrh, S. y Rhee, K. 2010. Metabolomics of *Mycobacterium tuberculosis* reveals compartmentalized co-catabolism of carbon substrates. *Chemistry y Biology*, Vol. 17(10): 1122 – 1131.

Chang, J., Wysocki, A., Tchou-Wong, K., Moskowitz, N., Zhang, Y. y Rom, W. 1996. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* and its components on macrophages and the release of matrix metalloproteinases. *Thorax*, Vol. 51(3):306-311

Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, S., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, T., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M., Rajandream, M., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J., Taylor, K., Whitehead, S. y Barrell, B. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, Vol. 393(6685): 537 – 544.

Croucher, N. y Thomson, N. 2010. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Current Opinion Microbiology*, Vol. 13(5): 619–624.

Cutinelli, C. 1941. Influence of fatty acids on the development of the bacillus of Koch (*Bacillus tuberculosis*). *Archive Italian of Medicine Sperimentale*. , Vol. 8: 487 – 492.

Daniel, J., Deb, C., Dubey, V., Sirakova, T., Abomoelak, B., Morbidoni, H. y Kolattukudy, P. 2004. Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *Journal of Bacteriology*, Vol. 186(15): 5017 – 5030.

Davis, S. y Dubos, R. 1948. The inhibitory effect of lipase on bacterial growth in media containing fatty acids esters. *Journal of Bacteriology*, Vol. 55(11.)

Deb, C., Lee, C., Dubey, V., Daniel, J., Abomoelak, B., Sirakova, T., Pawar, S., Rogers, L. y Kolattukudy, P. 2009. A novel in vitro multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. *Plos One*, Vol. 4(6).

- Dubos, R. 1947. The effect of lipids and serum albumin on bacterial growth. *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 85: 9 – 22
- Filiatrault, M., Stodghill, P., Bronstein, P., Moll, S., Lindeberg, M., Grills, G., Schweitzer, P., Wang, W., Schroth, G. y Luo, S. 2010. Transcriptome analysis of *Pseudomonas syringae* identifies new genes, noncoding RNAs, and antisense activity. *Journal of Bacteriology*, Vol. 192(9): 2359 – 2372.
- Glover, R. 1952. The growth of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium johnei* in a Modification of Dubos Medium. *Journal of General Microbiology*, Vol. 6: 251 – 260
- Guell, M., Noort, V., Yus, E., Chen, W., Leigh-Bell, J., Michalodimitrakis, K., Yamada, T., Arumugam, M., Doerks, T. y Kuhner, S. 2009. Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science*, Vol. 326(5957): 1268 – 1271.
- Gonzalez, J., Garcia, M., Gonzalez, S., Colston, M. y Cox, R. 1997. Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. *American Society for Microbiology*, Vol. 179(22): 6949 – 6958.
- Haller, R., Kennedy, M., Arnold, N. y Rutherford, R. 2009. The transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 86(1): 1 – 9.
- Jang, H., Nde, C., Toghrol, F. y Bentley, W. 2008. Microarray analysis of *Mycobacterium bovis* BCG revealed induction of iron acquisition related genes in response to hydrogen peroxide. *Environmental of Science and Technoly*, Vol. 43 (24): 9465 – 9472.
- Kendall, S., Rison, Rusell, D. 2004. What do microarrays really tell us about *M. tuberculosis*?. *Trends of Microbiology*, Vol. 12(12): 537-544.
- Keren, I., Minami, S., Rubin, E. y Lewis, K. 2011. Characterization and Transcriptome Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Persisters. *MBio*, Vol. 2(3).

Kerwin, B. 2007. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 97 (8): 2924–2935.

Langmead *et al.* 2010. Cloud-scale RNA-sequencing differential expression analysis with Myrna. *Genome Biology*, Vol. 11(8).

Lyon, R., Lichstein, H. y Hall, W. 1963. Effect Of Tween 80 On The Growth Of Tubercle Bacilli In Aerated Cultures. *Journal of Bacteriology*, Vol. 86: 280-284

Manabe, Y., Hatem, C., Kesavan, A., Durack, J. y Murphy, J. 2005. Both *Corynebacterium diphtheriae* DtxR(E175K) and *Mycobacterium tuberculosis* IdeR(D177K) are dominant positive repressors of ideo-regulated genes in *M. tuberculosis*. *Infection and Immunity*, Vol. 73(9): 5988–5994

Malone, J. y Oliver, B. 2011. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptoma. *BMC Biology*, Vol. 9(34).

Metzker, M. 2010. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*. Vol. 11: 31 – 46

Muttucumaru, D., Roberts, G., Hinds, J., Stabler, R. y Parish, T. 2004. Gene expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* in a non-replicating state. *Tuberculosis*, Vol. 84(3-4): 239 – 246

Neyrolles, O., Pando, R., Rouxel, F., Fornès, P., Tailleux, L., Payán, J., Pivert, E., Bordat, Y., Aguilar, D., Prévost, M., Petit, C. y Gicquel, B. 2006. Is Adipose Tissue a Place for *Mycobacterium tuberculosis* Persistence?. *Plos One*, Vol. 1(1).

Oshlack, A., Robinson, M. y Young, M. 2010 From RNA-seq reads to differential expression results, *Genome Biology*, Vol. 11(220)

Rachman, H., Strong, M., Ulrichs, T., Grode, L., Schuchhardt, J., Mollenkopf, H., Kosmiadi, G., Eisenberg, D. y Kaufmann, S. 2006. Unique Transcriptome Signature of *Mycobacterium tuberculosis* in Pulmonary Tuberculosis. *Infection and Immunity*, Vol. 74(2): 1233–1242

Russell, D. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: Here Today, And Here Tomorrow. Nature Reviews: Molecular Cell Biology, Vol. 2.

Rustad, T., Harrell, M., Liao, R. y Sherman, D. 2008. The enduring hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. Plos One, Vol. 3(1).

Saz, A. 1949. Effect of long-chain carbon compounds, particularly hydrocarbons, on the metabolism of tubercle bacilli. Archives of Biochemistry, Vol. 22: 195 - 203

Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M., Liu, Y., Mangan, J., Monahan, I., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P., Nathan, C. y Schoolnik, G. 2003. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. Journal of Experimental Medicine, Vol 2.

Seiji, I. 1935. The effect of fatty acids on tubercle bacilli and other acid-fast bacilli. Journal of Experimental Medicine, Vol. 25: 424 – 436

Sharma, C., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiss, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermuller, J. y Reinhardt, R. 2010. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. Nature, Vol. 464: 250 – 255.

Shendure, J. y Ji, H. 2008. Next-generation DNA sequencing. Nature Biotechnology, Vol. 26(10): 1135 – 1145

Shi, L. Sohaskey, C., Pfeiffer, C., Datta, P., Parks, M., McFadden, J., North, R. y Gennaro, M. 2010. Carbon flux rerouting during *Mycobacterium tuberculosis* growth arrest. Molecular Microbiology, Vol. 78(5): 1199 – 1215.

Shleeva, M., Salina, E. y Kaprelyants, A. 2010. Dormant fForms of Mycobacteria. Microbiology, Vol. 79(1): 1 – 12.

Sinha, S., Arora, S., Kosalai, K., Namane, A., Pym, A. y Cole, S. 2002. Proteome analysis of the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis*. Computational Functional Genome, Vol. 3: 470–483.

Smith, T. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbioly Reviews*, Vol. 16 (3): 463 – 496.

Sugarbaker, D., Richards, W., Gordon, G., Dong, L., DeRienzo, A., Maulik, G., Glickman, J., Chirieac, L., Hartman, M., Taillon, B., et al. 2008. Transcriptome sequencing of malignant pleural mesothelioma tumors. *Proceedings National Academics*, Vol. 105(9): 3521 – 3526.

Valente, W., Pienaar, E., Fast, A., Fluitt, A., Whitney, S., Fenton, R., Barletta, R., Chacon, O. y Viljoen, H. 2009. A kinetic study of in vitro lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *Chemical Engineering Science*, Vol. 64(9): 1944 – 1952.

Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 10: 53 - 67

Wayne, L. y Sohaskey, C. 2001. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol*, Vol. 55: 139 – 163

Weber, A., Weber, K., Carr, K., Wilkerson, C., Ohlrogge, J. 2007. Sampling the *Arabidopsis* transcriptome with massively parallel pyrosequencing. *Plant Physiology*, Vol. 144: 32 – 42.

Wilhelm, B., Marguerat, S., Goodhead, I. y Bähler, J. 2010. Defining transcribed regions using RNA-seq. *Nature Protocols*, Vol. 5(10): 255 - 266

Wurtzel, O., Sapra, R., Chen, F., Zhu, Y., Simmons, B. y Sorek, R. 2010. A single-base resolution map of an archaeal transcriptome. *Genome Research*, Vol. 20: 133 – 141.

Youmans, A. y Youmans, G. 1953. Studies on the metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 67: 731-733

Young, D., Stark, J. y Kirschner, D. 2008. Systems biology of persistent infection: tuberculosis as a case study. *Nature Review*, Vol. 6: 520 – 528

Páginas de Internet:

Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS), Link: <http://www.ins.gov.co/>. Consultada en Noviembre del 2011

Second-generation sequencing, Link: <http://seq.molbiol.ru/>. Consultada el 15 de Octubre del 2011.

The Biomarkers for TB Consortium is part of the Global Health initiative launched in 2003 by the Bill & Melinda Gates Foundation. Link: <http://www.biomarkers-for-tb.net/>. Consultada el 18 de Agosto del 2011.

Tesis, Libros y otros documentos:

BD. 2006. Dubos Broth, Enriched BD Prepared Tubed Medium for Cultivation of Mycobacteria, consultado en el link: [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8806871JAA\(0106\).pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8806871JAA(0106).pdf)

Blanco, J. 1998. Identificación de promotores de *Mycobacterium tuberculosis* que se activan bajo condiciones de estrés ambiental. Tesis de posgrado para otra el título de Magister en Biología. Universidad Pontificia Javeriana. Bogotá D.C.

Codex Standard. 2001. NORMA GENERAL PARA LAS AGUAS POTABLES EMBOTELLADAS/ENVASADAS (Distintas de las Aguas Minerales Naturales). Link: [www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net)

Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 2002. Unión Europea versiones consolidadas, del tratado de la unión europea y del tratado constitutivo de la comunidad europea. Encontrado en el link: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2006/ce321/ce32120061229es00010331.pdf>

*Illumina*. 2008. Multiplexed Sequencing with the *Illumina* Genome Analyzer System. Link: [http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet\\_sequencing\\_multiplex.pdf](http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_sequencing_multiplex.pdf)

Madigan, M. y Martinko, J. 2004. Brock: *Biología de los microorganismos*. Pearson, Barcelona. 1011 p.

Sambrook, J., Fritsch, E., y Maniatis, T. 1993. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1659 p.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Stanley, P., Bertozzi, C., Hart, G. y Etzler, M. 2009. *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition. Cold Spring Harbor. NY