



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONALES Y DE POSGRADO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**BIOQUÍMICA DE MYCOBACTERIUM tuberculosis
EN CULTIVO: METABOLISMO DE GLUCOSA
Y GLUCONEOGENESIS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A

SANDRA MARIA DE LOS DOLORES SANDOVAL PEREZ



UNAM-CCH

MEXICO, D. F. SEPTIEMBRE DE 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONALES Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

BIOQUIMICA DE *Mycobacterium tuberculosis*
EN CULTIVO: METABOLISMO DE GLUCOSA Y
GLUCONEOGENESIS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A.

SANDRA MARIA DE LOS DOLORES SANDOVAL PEREZ.

UNAM-CCH

SEPTIEMBRE DE 1993

INDICE.

- RESUMEN	1
- INTRODUCCION	1-20
Características Morfológicas	5
Características de Cultivo	7
Características Fisiológicas	9
Composición Química	10
Patogenicidad	14
Productos Tóxicos	16
- ANTECEDENTES	16-18
- HIPOTESIS	18
- OBJETIVOS	19
- METODOLOGIA	20-32
Determinación de Piruvato	23
Determinación de Triglicéridos	26
Determinación e Incorporación de ¹⁴ C-Glucosa	29
Determinación de Proteínas Totales	30
Determinación de Glucosa	31

- RESULTADOS	33-43
- DISCUSION	44-56
- CONCLUSIONES	57-59
- BIBLIOGRAFIA	60-64

RESUMEN

Se sabe que la mayor parte de la protección de las Micobacterias reside en su pared celular, por lo que mientras más tiempo emplee la Micobacteria en elaborar su pared celular, más tiempo tardará en desarrollarse y por ende, en inducir enfermedad al huésped. Debido a que los principales componentes de la pared bacteriana, responsables de generar hipersensibilidad antigénica, son principalmente glicolípidos lipooligosacáridos y peptidoglicanos se considera la posibilidad de que las micobacterias efectuen algún proceso que permita la glicosilación de proteínas, lípidos, y que al incrementar este proceso se elabore más rápidamente la pared celular y por ende su crecimiento sea más rápido.

En este trabajo se observó que cuando al medio de cultivo se le adicionó como fuente de carbono algún carbohidrato simple las micobacterias crecieron más rápidamente en comparación con aquellas a las que se les agregó carbono a partir de otras fuentes como el glicerol.

Los resultados sugieren que la presencia de carbohidratos como fuente de carbono activan la vía glucolítica esta vía aparentemente es más eficiente que la gluconeogénesis en términos metabólicos y que algunos residuos de glucosa y/o carbonos producto del metabolismo sean incorporados a

**moléculas protéicas por procesos semejantes a la
glicosilación de proteínas en eucariotes.**

INTRODUCCION.

El bacilo de la tuberculosis pertenece al orden de los Actinomycetes, familia de las Mycobacteriaceae y al género Mycobacterium. Está clasificado dentro del grupo III de Runyon como una bacteria no cromógena. Es un bacilo ácido-alcohol resistente que se tiñe por la coloración de Ziehl Neelsen, es aeróbico estricto, muy sensible a desecación y a la luz solar y está formado por proteínas, y lípidos. Los proteínas y probablemente los glúcidos son los responsables de la respuesta tuberculínica y por lo tanto de la lesión anatomopatológica específica, en tanto que los lípidos son los responsables de la propiedad ácido-alcohol resistente.

El bacilo se multiplica por división directa y se cultiva en medios apropiados como el de Lowenstein-Jensen Holmes. La enfermedad se transmite mediante la entrada de los bacilos que se encuentran en las gotitas de la expectoración de un enfermo que acaba de toser y son inhalados por el sujeto sano. El germen llega al parénquima pulmonar, habitualmente a la parte media del pulmón derecho, produciendo una neumonitis. Provocan

después una linfangitis y una adenitis mediastinal y se desarrolla el complejo tuberculoso primario, quedando como prueba de la primoinfección tuberculosa la positividad a la tuberculina (PPD).

En algunas ocasiones el bacilo no se detiene en el ganglio del hilio pulmonar sino que asciende por los linfáticos mediastinales y llega a desembocar a través de la gran vena linfática derecha al torrente sanguíneo en la unión de las venas subclavia y yugular interna.

De ahí pasa a las cavidades derechas del corazón y es lanzado por el ventrículo al territorio vascular pulmonar en donde con gran frecuencia deja nódulos en la parte más alta de ambos lóbulos pulmonares superiores y continúa su camino para hacer siembras que no producen manifestaciones clínicas en otros órganos y sitios, como los riñones, los genitales, la columna vertebral, la cadera y las rodillas, entre los más frecuentes. Este mecanismo patogénico constituye la diseminación hematógena de la enfermedad (Emori y col 1985); (Goren, 1974).

En ocasiones la diseminación se hace aparente provocando las manifestaciones clínicas del aparato o sistema que esta afectado como ocurre con frecuencia en el sistema

nervioso central que provoca meningoencefalitis y, segundo lugar la tuberculosis hemat6gena generalizada postprimaria del ni6o.

Los bacilos que llegaron por v1a hem1tica y que habitualmente permanecen durante muchos a6os en estado latente sin dar sintomatolog1a, sin embargo pueden activarse por circunstancias todav1a no conocidas, entre las que se anotan defectos de nutrici3n, esfuerzos f1sicos exagerados, gran estres o enfermedades que alteran el equilibrio inmunol3gico como la diabetes. Los bacilos en el interior del organismo aumentan la virulencia y producen la enfermedad, bien sea en el lugar donde se implantaron provocando una tuberculosis pulmonar, renal, genital u 3sea, o bien son diseminados por v1a hemat6gena al territorio vascular pulmonar ocasionando una diseminaci3n hemat6gena pulmonar tard1a.

Finalmente cuando los bacilos producto de la primoinfecci3n que llegaron a los 3rganos por v1a hem1tica y dejaron n3dulos, especialmente en los v3rtices pulmonares, reactivan su virulencia y originan la enfermedad tuberculosa, se habla de tuberculosis de reinfecci3n. Esta es m1s frecuente en el pulm3n que en cualquier otro 3rgano. Ah1 destruye el par3nquima formando

cavernas y se expulsan bacilos con la expectoración, constituyendo fuentes de contagio que infectan nuevamente a sujetos sanos.

Con menor frecuencia, la tuberculosis se reactiva a través de la llegada del exterior de nuevos bacilos que encuentran al individuo en estado inmunodeficiente facilitándose así su proliferación y generando una reinfección que se califica como exógena. El enfermo presenta la sintomatología del proceso infeccioso pulmonar con baciloscopia positiva (Brennan, 1990).

Histológicamente la enfermedad se caracteriza por la formación de granulomas; la tuberculosis debe ser diferenciada mediante estudios bacteriológicos de otras enfermedades producidas por especies de Micobacterias semejantes, que causan tuberculosis extrapulmonar como la de los huesos, las articulaciones, los riñones, etc. (Barkasdale, and Kim, 1977.); (Ikawa y col. 1989).

Características morfológicas.

La Micobacteria es una bacteria procariota, que carece de mitocondrias, aparato de Golgi y reticulo endoplásmico; es ácido-alcohol resistente (Daffé y col. 1987). Al microscopio óptico se observan bacilos delgados: rectos o curvos que miden de 0.3 a 0.6 micras de ancho por 0.5 a 4.0 micras de largo, se encuentran solos o aglomerados; son inmóviles, no esporulados, y no forman cápsula, presentan un gran polimorfismo debido a lo cual se observan bacilos filamentosos, ramificados, cocoides o en forma de L (Fournié y col. a 1987).

En la superficie celular se ha observado una estructura a la que se le ha denominado microcápsula. Entre la microcápsula y la pared celular se encuentra una zona osmiofobia y en el citoplasma se observan vacuolas y ciertas estructuras parecidas a la volutina (Azuma y col 1970).

Al microscopio electrónico se observan gránulos y vacuolas en los extremos celulares del citoplasma que es homogéneo en los bacilos jóvenes pero es granular en los bacilos viejos; una de las funciones de los gránulos de volutina, también llamados gránulos metacromáticos (metafosfatos y

polifosfatos), es el de reserva de alimento, así como de energía (Goren, 1972).

La cápsula generalmente esta formada por polisacáridos de varios tipos (dextrán, leván y celulosa) aunque también contiene polipéptidos y polimeros (Brennan, 1990). Se cree que la sustancia capsular es material excretado de la propia bacteria que le sirve como: a) una cubierta protectora, b) depósito de alimento, o bien, c) un componente que aumenta la capacidad infecciosa.

Si se realiza una tinción de Gram, el bacilo se tiñe de color violeta (Gram positivo) debido a los gránulos de Much; estos gránulos que no son acidorresistentes, se encuentran en lesiones tuberculosas en las cuales no se han podido encontrar bacilos tuberculosos. Pese a que Much afirma que estos gránulos son viables, infectantes y virulentos y que dan lugar a bacilos ácidosresistentes típicos, aún no se conoce su verdadera función. Los gránulos de Much se transforman en bacilos acidorresistentes en el organismo y en cultivos de tejidos, pero no en medios artificiales (Draper, 1982).

Características de cultivo.

El desarrollo de Mycobacterium es lento en todos los medios de cultivo, y requiere de varias semanas para que la colonia sea visible (Goren, b 1970). Se han empleado varios medios de cultivo para este género obteniéndose los siguientes resultados:

- a) Agar glicerina: Al cabo de 8 semanas se observan colonias elevadas, de color crema y con la superficie corrugada.

- b) Caldo glicerina: después de la octava semanas de cultivo se forma una película gris corrugada, sin turbidez, con depósito granuloso.

- c) Medio de huevo de Dorset: al cabo de 3 a 4 semanas se

forma una película verrugosa, seca, de color gris mate con tinte amarillento.

d) Medio de Bordet-Gengou: desarrollo visible pasados 12 días, con desarrollo máximo en 4 semanas, colonias elevadas, finamente granulosas de 1.1 a 3.3 mm de diámetro con borde dentado.

e) Medio de Lowenstein: Después de 4 semanas se observan colonias elevadas con aspecto de ovillo.

f) Medio especial de Petragani: A las 4 semanas se detectan colonias de desarrollo exuberante, elevado, granuloso, color crema y coalescente.

Características fisiológicas

Las micobacterias son microorganismos aerobios que crecen en medios con pH casi neutro, entre 6.8 - 7.2, a temperaturas que oscilan entre 30 y 42 °C siendo la óptima de 37 °C para las cepas que son patógenas para el hombre; estos organismos poseen una actividad metabólica elevada y sus fuentes de carbono o de energía pueden ser fácilmente aportadas por medios que están constituidos por el suero animal, la albúmina de huevo y la glicerina (Kamisango y col 1985).

Las bacterias contienen enzimas proteolíticas que son activas, tanto en el medio alcalino como en medio ácido (Brennan, 1989); así como otras enzimas que llevan a cabo la fermentación del alcohol, a partir de glicerina y carbohidratos simples; de estos últimos los más importantes son la glucosa, la levulosa, la arabinosa y la galactosa pero no metabolizan la sacarosa ni la lactosa (Rojas y col. 1984). Las micobacterias contienen lecitinas, fosfátidos, urea; presentan poder reductor por lo que desintegran los aceites de oliva, ricino, etc. No producen exotoxinas aunque tienen sustancias tóxicas que se liberan al desintegrarse sus células (Draper, 1982).

Estos microorganismos presentan elevada resistencia a los desinfectantes, (fenol al 1%, ác. clorhídrico al 2%, etc) pero son destruidos por la pasteurización y la esterilización al calor ordinario, son resistentes a la desecación y pueden sobrevivir durante largos períodos en esputos secos u otros líquidos corporales.

Estos microorganismos crecen muy lentamente por lo que, para su aislamiento en muestras clínicas, los medios de cultivo deben contener una sustancia que inhiba a todas las bacterias excepto a las micobacterias.

Composición Química

La sobrevivencia de las micobacterias dentro de las células fagocíticas se ha atribuido a diversos mecanismos entre los que sobresale la presencia de una zona electrones que rodea a la micobacteria a manera de cápsula y cuya estructura es muy similar a la pared celular; esta zona esta formada principalmente por compuestos de naturaleza lipídica que se localizan en 3 zonas distinguibles por microscopía electrónica (Minnikin, 1982).

Estudios químicos recientes han demostrado que los miembros de los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia* comparten una composición de la pared celular que es distintiva y única de los miembros de estos tres géneros.

El péptidoglicano de su pared celular es del tipo A (unión transversal directa entre el ácido meso-diaminopimélico y la D-alanina). Covalentemente unido al peptidoglicano hay un polisacárido formado por arabinosa y galactosa.

La presencia de este arabinogalactano en la pared confiere reactividad inmunológica cruzada con las bacterias de los tres géneros.

Además esta pared posee un alto contenido de lípidos, que incluye la clase distintiva de lípidos conocidos como ácidos micólicos, que son B-hidroxiácidos ramificados, cuya estructura general está representada en la figura 1.



Figure 1. β -Hidroxiácidos ramificados donde, R_1 y R_2 son grupos alquílicos.

Los ácidos micólicos de las micobacterias contienen de 79 a 85 átomos de carbono. Estos componentes de la pared celular están unidos al arabinogalactano a través de enlaces de tipo éster; este tipo dominante de peptidoglicanos contiene ácido meso-diaminopimélico en la posición 3 de la cadena peptídica y las cadenas adyacentes están ligadas entre si directamente por el grupo amino libre del ácido meso-diaminopimélico y el grupo carboxilo libre de la D- alanina (union 3:4). Figura 2 (Hetch y Causay 1976).



Figure 2. Representación de la unión transversal entre el grupo carboxilo terminal de la D-alanina en una subunidad y el grupo amino libre del ácido diaminopimélico de la subunidad adyacente M. tuberculosis.

Las micobacterias contienen grandes cantidades de materiales lipídicos como: ácidos grasos, ceras y lípidos complejos, también contienen proteínas y gran variedad de polisacáridos a algunos de los cuales se les atribuye la especificidad antigénica (Mc. Neil, y col. 1989).

Se han identificado en las micobacterias diversas familias de lípidos y los más importantes para *Mycobacterium tuberculosis* son:

- Ácidos micólicos. Son los ácidos grasos más abundantes en las micobacterias patógenas para el hombre, son la matriz sobre la cual el resto de los lípidosmicobacterianos se anclan a la pared celular y lo hacen a través de sus residuos acílicos. Los ácidos micólicos se pueden encontrar aislados o formando parte de lípidos más complejos (Lanéelle, 1989); (Hunter, 1985 y 1988).

- Los lipopolisacáridos. Son compuestos solubles en agua, parte de su estructura atraviesa los péptidoglicanos y está anclada a la membrana citoplasmática mediante su residuo fosfolipídico (Hunter y col 1986). La porción glicosídica de la lipoarabinomanana está constituida por arabinosa y manosa, en tanto que la porción lipídica está constituida de glicerol, mioinositol-1-fosfato y ácidos grasos como lactato, succinato y/o palmitato-10-

metiloctadecanato tuberculoestearato (Pozo y col 1990).

Patogenicidad.

Mycobacterium tuberculosis es un microorganismo estrictamente patógeno. En el hombre el bacilo se encuentra en lesiones tuberculosas, por lo general en los pulmones. La vía de entrada ocurre por lo general a través de las vías respiratorias o digestivas, mientras que el mecanismo de transmisión más común es a través del esputo.

Cuando el microorganismo penetra, se forma el tubérculo característico, pero al seguir desarrollandose los microorganismos, las células circundantes mueren llegando a haber coalescencia de tubérculos adyacentes.

El tejido muerto en el centro de tales masas se pone amarillento, con aspecto de queso, de ahí el término caseoso; este material favorece la proliferación de las micobacterias (Jardine and Brennnan, 1987).

El factor cuerda es un lípido complejo que se encuentra en la pared de la bacteria, su función es destruir las mitocondrias de las células que infecta alterando la función respiratoria y de fosforilación. La estructura química de este factor se esquematiza en la figura 3. (Shankaran and Venkitasubramanian, 1970); (Kato, 1972 y 1974). Este factor es el único reconocido como causante de virulencia.



Figure 3. Característica estructural del factor cuerda de *M. tuberculosis* (6,6'dimicolil trehalosa)

Productos tóxicos

Mycobacterium tuberculosis no produce exotoxinas. Los filtrados de cultivos en caldo glicerinado contienen determinados productos proteínicos que cuando se inoculan en animales sanos ocasionan una reacción pirogénica transitoria diferente a la que se observa en el animal tuberculoso. Esta reacción es provocada por sustancias liberadas como resultado de la muerte celular durante el crecimiento de las bacterias (Butler and Kilburn, 1988).

ANTECEDENTES

La glicosilación es un proceso donde los carbohidratos se unen por el extremo no reducido de una cadena en formación de proteínas, lípidos o nucleótidos para formar compuestos que posiblemente proporcionan cierta rigidez estructural a las membranas y/o pared de las células.

En las células eucariotas este proceso se lleva a cabo en el retículo endoplásmico rugoso y en la parte distal del complejo de Golgi. Sin embargo como algunas bacterias Gram negativas que efectúan la glicosilación no se sabe donde se lleva a cabo este proceso.

En las micobacterias se desconoce si son capaces de realizar este proceso y se desconoce el o los sitios donde este se efectúa.

Quizas por este motivo no existe ningún dato en la literatura del proceso de glicosilación en micobacterias aunque la existencia de compuestos tales como peptidoglicolípidos, lipooligosacáridos, lipopolisacáridos, etc., en la pared celular sugiere el proceso de glicosilación en estas células es mediante procesos enzimáticos.

Por otra parte hasta el momento tampoco se ha reportado la elaboración de un medio de cultivo en el cual la fuente de carbono sea un carbohidrato y no el glicerol a pesar de que Rojas y col en 1984, demostraron que las micobacterias tienen las enzimas necesarias para degradar ciertos carbohidratos.

El hecho de que en todos los medios de cultivo se emplea el glicerol como fuente de carbono sugiere que la gluconeogénesis es la principal ruta metabólica para obtener: a) energía y b) formar intermediarios necesarios para su metabolismo.

Todo esto ha creado la necesidad de analizar las posibles rutas metabólicas que emplea la micobacteria y para tratar de entender su comportamiento in vivo tomando como base las observaciones hechas in vitro.

HIPOTESIS

- Basandonos en resultados obtenidos por variaciones realizadas en el medio de cultivo en cuanto a la fuente de carbono sugerimos que la micobacteria lleva a cabo la glucólisis además de la gluconeogénesis siendo esta última la ruta clásica por las bacterias en los medios habituales para su desarrollo ya que contienen glicerol.

- Sabemos que los glicolípidos y las glicoproteínas forman parte de la pared celular de las micobacterias y, si las micobacterias llevan a cabo la glicosilación, el uso de bloqueadores de la glicosilación modificará la pared celular de las micobacterias y por tanto la destrucción de las mismas será más rápida, al igual que la labilidad o resistencia a la destrucción.

OBJETIVOS.

En general el interés de nuestro laboratorio es el de estudiar las rutas metabólicas (glucólisis y gluconeogénesis) en micobacterias. Ya que como se ha visto, no hay informacional respecto de los mecanismos de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* con fundamento en las rutas metabólicas que emplea para su desarrollo.

- Los objetivos generales de este estudio están orientados en determinar en que grado y como el empleo de una u otra ruta metabólica favorece el desarrollo óptimo de las micobacterias.

- En particular nos interesa demostrar que las micobacterias:
 - 1.- Emplean la glucólisis como ruta metabólica.

 - 2.- Llevan a cabo la ruta de la gluconeogénesis.

MATERIAL Y METODOS.

Los microorganismos utilizados en este estudio son:

Mycobacterium tuberculosis.

Mycobacterium avium.

Mycobacterium tuberculosis cepa H37Rv

Mycobacterium tuberculosis aislada de paciente.

Mycobacterium tuberculosis aislada de paciente con diabetes.

Bacilo de CALMETTE-GUERIN. (BCG).

Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aislada de pacientes se obtuvieron de enfermos internados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, con diagnóstico confirmado de tuberculosis pulmonar. Estas cepas fueron aisladas de esputos de pacientes, primero se descontaminaron con hidróxido de sodio al 5% y unas gotas de fenoftaleína incubando 15 min a 37 °C y después se centrifugaron a 3600 rpm durante 30 min. Posteriormente se decantó la muestra y se neutralizó el pH con HCl, se realizó un lavado con agua destilada estéril y se centrifugó a 3600 rpm durante 10 min. Se realizó un frotis del material obtenido en un porta objetos, y se coloreó

con la técnica de Zieln Nielsen; se buscaron al microscopio las micobacterias ácido-alcohol-resistentes.

Finalmente se procedió a sembrar la muestra en 4 tubos de ensaye los caules contenian medio de cultivo de Lowenstein-Jensen por cada muestra descontaminada. Transcurridas 10 semanas se inocularon botellas con medio líquido de P.B.Y. y con colonias aisladas del medio de Lowenstein-Jensen.

Después de obtener suficiente masa bacteriana (8 a 10 semanas) se realizaron las pruebas bioquímicas de tipificación.

Las cepas de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y el Bacilo de CALMETTE-GUERIN fueron proporcionadas por el Laboratorio de Referencia de la Tuberculosis, Organización Mundial para la Salud (OMS).

Todas estas cepas se hicieron crecer en el medio de cultivo de Lowenstein-Jensen a 37 °C durante aproximadamente 8 semanas, tiempo en que se obtuvo mayor cantidad de masa bacteriana viable. A estas micobacterias, como a las aisladas de pacientes, se les realizaron pruebas bioquímicas para su tipificación en las cuales se evalúan: temperatura óptima de crecimiento, pigmentación de la colonia, acumulación de niacina, reducción de

nitratos, producción de catalasa, inhibición del desarrollo bacteriano por la hidrazida del ácido tiofeno 2-carboxílico.

Todas estas cepas se sembraron en medios de cultivo líquidos con el objeto de obtener mayor cantidad de masa bacteriana así como de obtener el extracto de las micobacterias para determinar las diferencias que existen entre las células bacterianas y el extracto. Esta resiembra se realizó en el medio de PBY (PROSKAUER-BECK-YOUMANS), que se preparó de acuerdo a la siguiente fórmula:

ASPARAGINA	5.0 g
FOSFATO MONOBASICO DE POTASIO	5.0 g
SULFATO DE POTASIO	0.5 g
CITRATO DE SODIO	0.617 g
CLORURO DE MAGNESIO	0.190 g
GLICEROL	50 ml.

El pH del medio se ajustó a 6.8 y se aforó a 1000 ml con agua destilada, se distribuyó en tubos de ensaye y se esterilizó a 15 libras durante 30 minutos.

Este medio de cultivo fué la base para las determinaciones de: piruvato, proteínas, triglicéridos, glucosa y colesterol, así como pruebas bioquímicas para la

identificación de la especie.

Se obtuvo una curva de crecimiento de la micobacteria para confirmar que el medio que se empleó fué el adecuado, así como para determinar el tiempo generacional de estas bacterias. Para estos ensayos se emplearon tubos estériles con tapón de rosca a los cuales se les agregó 10 ml de medio de PBY y 0.1 uL de masa bacteriana medidos con asa bacteriológica calibrada e incubados a 37 °C. La curva de crecimiento se realizó por triplicado y los resultados que se presentan son el promedio de tres tubos por día.

Una vez transcurido el tiempo de incubación, se separó la masa bacteriana del extracto de cada tubo por medio de filtración con papel Whattman # 42 previamente pesado; el papel se secó por calentamiento en una estufa a 45 °C por 15 min aproximadamente, después se volvió a pesar y se consideró la diferencia de peso del papel filtro para obtener así el peso real de la masa bacteriana.

DETERMINACION DE PIRUVATO.

Para tratar de identificar las rutas metabólicas utilizadas por *Mycobacterium tuberculosis* en cultivo, se realizó la determinación de la reducción del piruvato por

NADH₂, ya que el lactato es el producto final del metabolismo anaerobio de la glucosa.

La lactato deshidrogenasa reduce el ácido pirúvico en presencia de DPNH (difosfopiridinucleótido reducido) (equivalente al NDH) y lo convierte en ácido láctico; después de esta reducción, el resto del ácido pirúvico se hace reaccionar con 2,4-dinitro fenilhidrazina y forma un piruvato dinitro fenilhidrazona; que con una solución alcalina forma un compuesto cuyo color es proporcional a la cantidad de piruvato presente. La dinitrofenilhidrazina detiene la acción de la LDH: mientras mayor sea la actividad de la LDH, menor será la cantidad de piruvato que quedó sin ser convertido a lactato.

Reactivos.

- Dinucleótido de la Dihidronicotinamida Adenina NADH₂ (DPNH)
- Sustrato de Piruvato.
- Desarrollador de Color: Solución de 2,4 Dinitrofenilhidrazina.

REACCION.

PIRUVATO + NADH ----- LACTATO + NAD⁺

LACTATO = PIRUVATO x K (NADH₂ / NAD).

K = Constante que varía de acuerdo a la temperatura
empleada.

Esta prueba se realizó con cada una de las cepas ya mencionadas anteriormente.

El sonicado de la masa bacteriana de todas las cepas se obtuvo con 3 sonicados de 15 segundos a 40 Hz, en el sonicador marca Beckman. Se confirmó la lisis bacteriana por observación al microscopio. Se sembraron tubos con 10 ml del medio de PBY conteniendo el sonicado de la masa bacteriana o el extracto.

La masa bacteriana que se empleo para la sonicación, así como el extracto empleado fueron incubados por 4 meses a 37 °C; para esta prueba se emplearon 100 uL de muestra y la concentración final del lactato se reporto en unidades

por litro (U/L).

DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS

Por medio de una lipasa, los triglicéridos se hidrolizan enzimáticamente en glicerina y ácidos grasos libres; posteriormente la glicerina se transforma en:

GC

GLICEROL + ATP ----- GLICEROL 3-FOSFATO + ADP

GDH

GLICEROL 3-FOSFATO + NAD ----- DIHIDROXIACETOFOSFATO +
NADH₂

DIAFORAZA

NADH₂ + INT ----- NAD + FORMAZAN.

donde la concentración de Formazan es proporcional a la concentración total de glicerina.

La disminución de la concentración de NADH₂ es proporcional a la concentración total de glicerol.

Reactivos

n -Nonano

Alcohol isopropílico

Acido sulfúrico 0.04M

Metaperyodato de sodio 0.06M en Acido acético 0.875 M

Acetato de amonio 2M

Reactivo de acetilacetona

Estandar de triglicéridos 200 mg/dl.

Esta prueba se realiza para conocer la cantidad de glicerina que consume la micobacteria así como determinar la ruta metabólica que emplea la micobacteria en presencia de glicerol como fuente de carbono.

Técnica:

	BLANCO	PROBLEMA	ESTANDAR
EXTRACTO *	--	0.5 ml	--
Agua Destilada	0.5 ml	--	--
Estandar	--	--	0.5 ml
Alcohol isopropílico	3.5 ml	3.5 ml	3.5 ml
Acido sulfúrico	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
n-Nonano	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

Mezclar 2 minutos y centrifugar 5 minutos a 3600 rpm. Tomar de la capa superior (sobrenadante) y colocar en tubos limpios y secos.

Sobrenadante	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Reactivo de NaOH en Isopropílico	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml

Incubar a 70 °C por 20 minutos

Metaperyodato	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Acetilacetona	3.0 ml	3.0 ml	3.0 ml

Mezclar e incubar a 70 °C durante 15 minutos

Leer a 546 nm.

Determinación e incorporación de ^{14}C -Glucosa.

Se inocularon 4 botellas conteniendo cada una 250 ml de medio de cultivo PBY y 2000 cuentas por minuto de glucosa marcada en todos los carbonos con C-^{14} y se les agregó 0.1 μL de las micobacterias problema, esto se incubó a 37°C por 5 semanas posteriormente se separó por filtración la masa bacteriana y se sonicó como en los anteriores casos

Una vez obtenida la masa bacteriana sonicada se procedió a deslipidizarlas, utilizando como solventes una mezcla de: metanol-cloroformo (2-1) y cloroformo-metanol (2-1).

Estos extractos se evaporaron, y de los residuos se emplearon 50 microlitros a los cuales se les agregó 3 ml de líquido de centelleo y se les midió la cantidad de ^{14}C -Glucosa incorporada. Se empleó el contador de centelleo (Ready Safe Beckman) Bekman Modelo LS 6000 SE utilizando 3 ml de mezcla de centelleo y 50 microlitros de muestra, cada una de las cépas se realizó por triplicado y el resultado obtenido es el promedio de las tres muestras.

Determinación de Proteínas Totales.

Esta prueba se realizó para determinar la existencia de proteína que la bacteria excreta al medio de cultivo. Las proteínas reaccionan con los iones cúpricos en solución alcalina, produciendo una coloración violeta debida a la formación de un complejo ión cúprico y los enlaces peptídicos adyacentes.

Reactivos:

Cloruro de Sodio al 0.85 %

Reactivo de Biuret.

Solución Patrón 6 g/dl.

Extracto

Sonicado Bacteriano.

Técnica:

	PROBLEMA	PATRON	BLANCO
NaCl al 0.85%	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Extracto *	0.05 ml	--	--
Estandar	--	0.05 ml	--
Reactivo de Biuret	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

Mezclar y reposar a Temperatura

Ambiente durante 20 min. Leer a

535 nm.

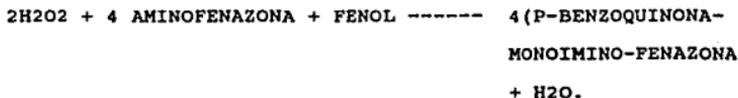
Determinación de Glucosa.

La enzima glucosa-deshidrogenasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa de acuerdo con la siguiente reacción:

GOD



POD



GDH



La enzima glucosa-deshidrogenasa reacciona directamente con glucosa y transfiere el H⁺ del átomo del carbono (C1) de la glucosa a la molécula de NAD; la cantidad de NADH formado es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

La enzima glucosa-deshidrogenasa es específica para B-glucosa. Para prevenir la existencia de alfa y beta glucosa en equilibrio se usa la mutarrotasa.

Reactivos:

Reactivo de O-toluidina 800 mmol/l en ácido acético.

Solución Patrón de Glucosa 1g/dl.

Técnica:

	PROBLEMA	PATRON	BLANCO
EXTRACTO	0.05 ml	--	--
Solución Patrón	--	0.05 ml	--
Agua Destilada	--	--	0.05 ml
Reactivo de O-toluidina	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml

Colocar los tubos en baño de agua en ebullición durante 8 min. Enfriar en baño de hielo y Leer a 510 nm.

Todas estas pruebas se realizaron para determinar que componentes son indispensables para el máximo y óptimo desarrollo de las micobacteria y todas las determinaciones se repitieron tres ocasiones diferentes.

RESULTADOS.

Curva de Crecimiento de *Mycobacterium H37Rv* en *PBY**TABLA 1. Efecto de diferentes carbohidratos en el desarrollo de *H37Rv*.

	<u>DIAS</u>		<u>PESO EN MILIGRAMOS</u>							
	CONTROL		+ GLUCOSA		+ GALACTOSA		+ LACTOSA			
		D.S. +/-		D.S. +/-		D.S. +/-		D.S. +/-		
2	4.1	0.23	9.0	0.28	8.4	0.02	4.0	0.11		
4	7.4	0.17	9.2	0.02	8.8	0.05	7.1	0.02		
6	10.7	0.17	10.6	0.05	10.0	0.11	9.9	0.17		
8	11.2	0.11	13.0	0.17	12.3	0.02	10.4	0.23		
10	13.6	0.23	22.3	0.11	21.8	0.17	13.1	0.05		
12	19.6	0.11	25.4	0.11	24.5	0.02	17.9	0.02		
14	21.1	0.17	28.7	0.05	27.3	0.11	21.0	0.11		

*** Masa bacteriana cuantificada por peso seco**

Como se puede apreciar en la tabla 1 el crecimiento de *Mycobacterium H37Rv* en medios de cultivo enriquecidos con glucosa y galactosa se incrementó el 100% en los primeros 2 días debido probablemente a que la micobacteria utiliza carbohidratos simples antes que al glicerol como fuente de carbóno, sin embargo la utilización de lactosa como suplemento de carbono no induce cambios en el incremento de la masa bacteriana con respecto al control.

CURVA DE CRECIMIENTO DE H37RV A DIF. CONC. DE GLUCOSA

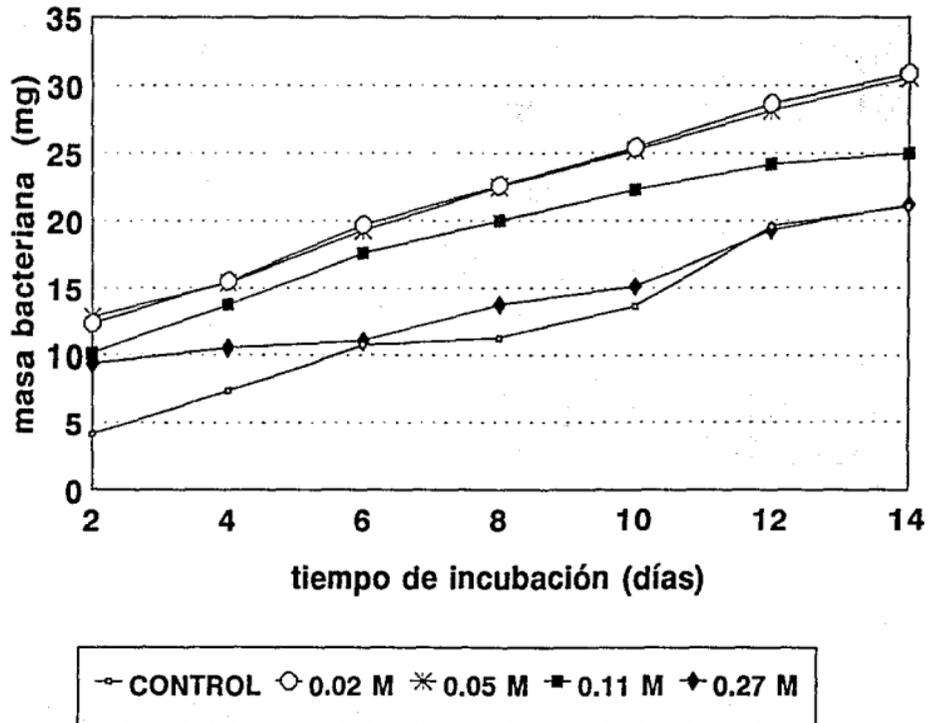


FIGURA 1

- Del cuarto al octavo día se puede apreciar que la velocidad de crecimiento de la micobacteria se estabiliza y no hay diferencia entre el grupo control y los grupos cultivados en presencia de diferentes carbohidratos como fuentes de carbono sin embargo:

- A partir del décimo día se observa un aumento considerable de masa bacteriana en la curva de crecimiento de *Mycobacterium H37Rv* con glucosa. Este incremento es de casi el doble en los grupos problema versus el grupo control.

Aunque la diferencia entre el peso en miligramos de masa bacteriana (Tabla 1) de *Mycobacterium H37Rv* en los 4 grupos no alcanzaron una diferencia estadísticamente significativa utilizando la prueba de T de student para comparación de grupos, si se hace manifiesta la tendencia a obtener una mayor masa bacteriana cuando se facilita la vía glucolítica como se observa en los grupos incubados con glucosa y galactosa.

TABLA 2. Determinación de Piruvato* U/L en diferentes cepas de Micobacterias.

MICROORGANISMOS.	EXTRACTO D.S.		SONICADO. D.S.	
		+/-		+/-
M. tuberculosis H37Rv				
cepa control	50	0.23	105	1.1
B.C.G.	25	0.05	55	0.5
M. avium	25	0.05	72	1.1
M. tuberculosis				
Paciente con Diabetes	50	0.23	475	2.8
H37 Rv + glucosa	65	0.28	230	0.5
H37 Rv + galactosa	25	0.05	140	1.7
H37 Rv + lactosa	65	0.28	165	2.8

* Determinada por el método de la LDH.

La tabla 2 demuestra la presencia de actividad de la Lactato Deshidrogenasa en todas la micobacterias probadas.

DETERMINACION DE PIRUVATO

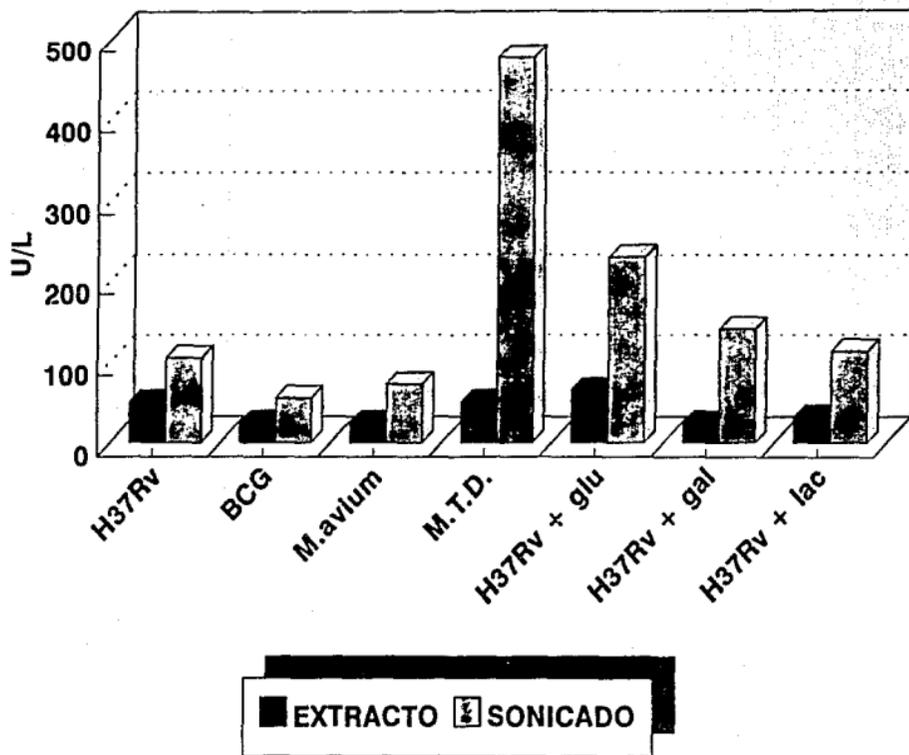


FIGURA 5

Llama la atención la diferencia entre la cantidad de enzima detectada en *M. avium* y B.C.G. (micobacteria atenuada) versus las otras micobacterias patógenas para el humano. (el doble y triple en las patógenas para el hombre).

Nuestros resultados indican que en presencia de glucosa como sustrato que activa la vía glucolítica, se induce un incremento en la actividad de la enzima tal como lo sugieren los resultados obtenidos con las micobacterias en presencia de glucosa y la del paciente diabético. En este último caso se observa un incremento del 400% de la actividad enzimática con respecto a la actividad en la cepa utilizada como control.

Se observa también que las micobacterias poseen a la enzima galactosidasa ya que la inducción de la Lactato Deshidrogenasa que es secundaria a la presencia de glucosa también se vió incrementada con respecto al control en los cultivos en los cuales se agregó galactosa, lo cual traduce la habilidad de la bacteria para producir glucosa a partir de galactosa.

Aunque no se descarta la posibilidad de que una enzima

epimerasa se encuentre en la bacteria y que permita la transformación de la galactosa a glucosa.

TABLA 3. Determinación de Triglicéridos en diferentes cepas de Micobacterias

MICROORGANISMO	EXTRACTO		SONICADO	
	mg/dl	D.S.	mg/dl	D.S.
		+/-		+/-
M. tuberculosis H37Rv				
Cepa control.	2.3	0.05	89.8	0.69
M. avium	6.5	0.23	82.6	0.60
M. tuberculosis				
Paciente con Diabetes	4.4	0.02	93.0	0.75
H37 Rv + glucosa	4.0	0.28	84.7	0.57
H37Rv + galactosa	4.1	0.05	82.7	0.64
H37 Rv + lactosa	2.4	0.11	81.5	0.47

Determinado por el método enzimático-colorimétrico.

DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS

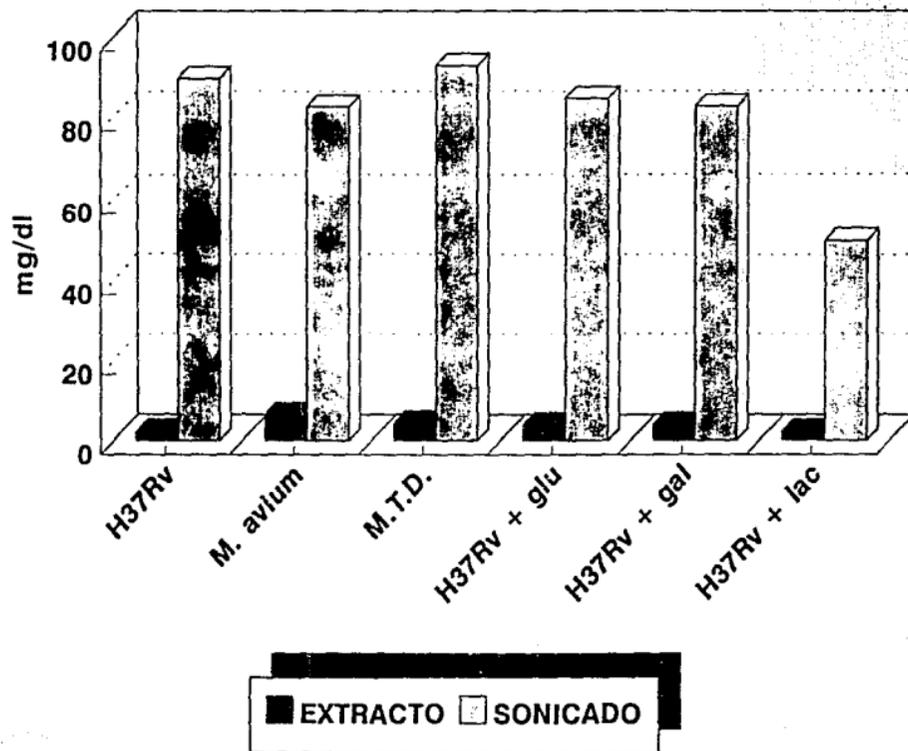


FIGURA 7

La concentración de triglicéridos en el sonicado se observa incrementado ligeramente en la cepa aislada del paciente diabético pero en las determinaciones realizadas en el material obtenido por sonicación se aprecia casi el doble del contenido de ácidos grasos en las cepas bacterianas incubadas con galactosa y glucosa así como en la cepa aislada del paciente tuberculoso.

TABLA 4. Determinación de Glucosa en diferentes cepas de Micobacterias

MICROORGANISMO	SONICADO mg/dl.	D.S. +/-
M.tuberculosis H37Rv		
Cepa control	2.70	0.05
M. avium	4.50	0.13
M. tuberculosis		
Paciente con Diabetes	10.3	0.23
H37 Rv + glucosa	4.96	0.05
H37Rv + galactosa	4.80	0.11
H37 Rv + lactosa	3.6	0.11

Determinada por el método de la glucosa oxidasa.

DETERMINACION DE GLUCOSA

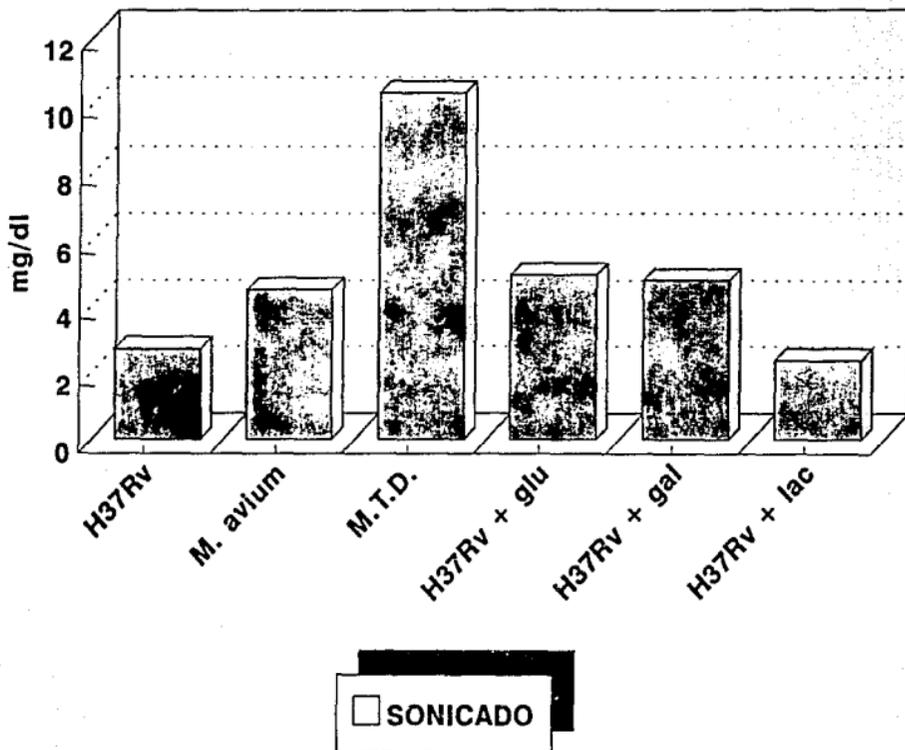


FIGURA 4

TABLA 5. Incorporación de 14C-Glucosa a *Mycobacterium tuberculosis* *

SONICADO	FRACC. LIPIDICA		FRACC. NO LIPIDICA	
	‡ 14-C inc. C.P.M.		‡ 14-C inc C.P.M.	
H37Rv + Glucosa	12	4843.01	78	23502.04
Desviación estandar	+/- 2.8		+/- 1.7	
* Después de 30 días de cultivo.				

En el material obtenido después del sonicado se observa que las bacterias del paciente con diabetes incorpora la glucosa a sus estructuras celulares así como las cepas H37Rv con glucosa y con galactosa.

En este ensayo también se observa que las cepas H37Rv con glucosa y con galactosa tienen un comportamiento muy similar al cepa *M. avium*. Esto parece indicar que una

parte de la glucosa que no participa en alguna de las vías metabólicas es almacenada dentro de la bacteria hasta que esta lo requiera.

La tabla 5 muestra como el 78% de la glucosa marcada esta incorporada a la fracción no lipídica del sonicado de los cultivos y el remanente 12% de radioactividad se encontró en la fracción extraída con metanol-cloroformo fracción en la que se encuentra la mayoría de las lipoproteínas y glicolípidos. Vale la pena mencionar que menos del 5% de la glucosa radioactiva se encontró de manera libre.

TABLA 6. Determinación de Proteínas totales en diferentes cepas de Micobacterias.

MICROORGANISMO	EXTRACTO		SONICADO	
	mg/dl		mg/dl	
	D.S.		D.S.	
M. tuberculosis H37Rv				
Cepa control	0.091	0.003	0.103	0.003
M. avium	0.122	0.007	0.131	0.005
M.tuberculosis				
Paciente con diabetes	0.106	0.001	0.209	0.02
H37 Rv + glucosa	0.125	0.031	0.142	0.007
H37 Rv + galactosa	0.122	0.007	0.112	0.001
H37 Rv + lactosa	0.086	0.002	0.108	0.002

Realizada por el método de Biuret.

En esta prueba se determinó la concentración de proteínas totales. Nuevamente se observa que las cepas de lento crecimiento según la taxonomía de Runyon como es

DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES

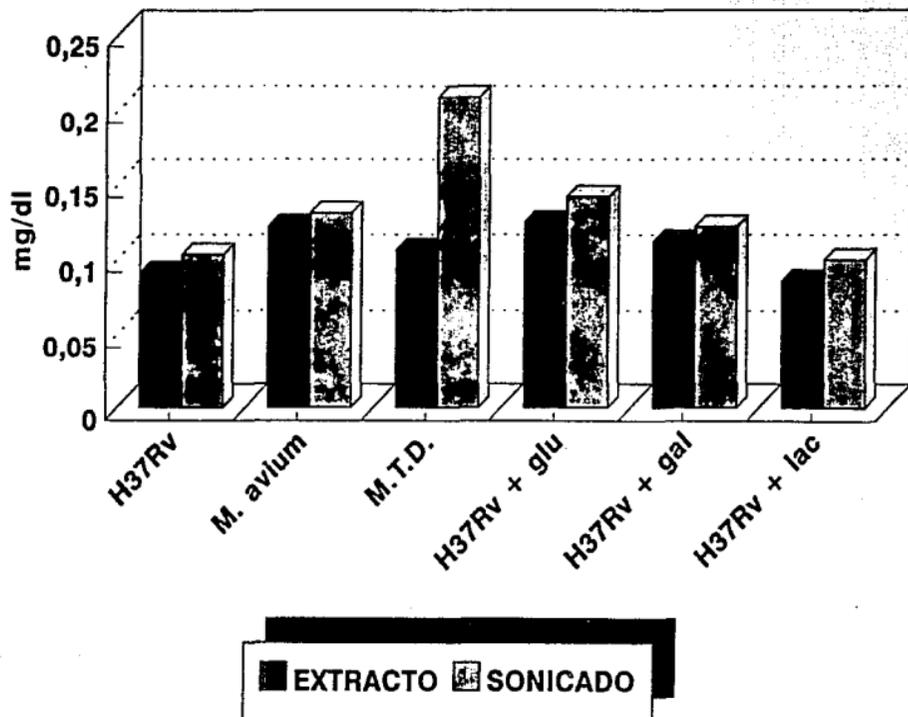


FIGURA 6

H37Rv al incorporarle glucosa o galactosa al medio de cultivo presenta un comportamiento muy similar con respecto a la cepa de rápido crecimiento como *M. avium*. En general esta prueba indica que las micobacterias en presencia de componentes que estimulan la vía glucolítica no afectan los mecanismos de síntesis de proteínas.

DISCUSION.

En el presente estudio se hace un análisis metabólico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv la cual es una micobacteria de lento crecimiento, altamente virulenta y considerada como cepa de referencia (ATCC 102, Fournié, 1897 (a), Bergey's, 1986). Con fines analíticos se comparan diversas cepas de micobacterias; *M. avium*, que es de rápido crecimiento y no patógena para el hombre (Runyon, 1972) *M. bovis* BCG que es de crecimiento lento y por estar atenuada no es patógena para el humano y, las cepas aisladas de pacientes tuberculosos con o sin diabetes las cuales fueron micobacterias de lento crecimiento tipificadas como *M. tuberculosis* (Tsukamura, 1981; Knisley, 1985).

La observación inicial que desencadenó este proyecto fue que los pacientes tuberculosos diabéticos por lo general tienen una enfermedad difícilmente controlable con los esquemas terapéutico clásicos (Dr., Fernando Reborá, comunicación personal); esto nos hizo pensar que a) o las cepas que infectan a estos pacientes eran cepas de micobacterias atípicas (Orme, 1993), probablemente de rápido crecimiento, o b) que la presencia de grandes concentraciones de glucosa en el suero y de baja

concentración intracelular de glucosa en los macrófagos, células en las que las micobacterias crecen, favorecían el crecimiento de las micobacterias como consecuencia de la utilización y optimización de otras vías para la síntesis de glucosa.

Debido a lo anterior se iniciaron experimentos en los que la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* se creció en medio líquido de Proskawer-Bekman-Youmans (Tsukamura, 1967 y 1985) que contenía concentraciones de glucosa similares a las encontradas en un paciente diabético grave (0.27 M, 300 mg/dl).

Como se puede apreciar en los resultados de la figura 1, las concentraciones de glucosa mayores a 0.11 M no favorecieron la velocidad de crecimiento de las micobacterias mientras que concentraciones menores incrementaron de manera importante y estadísticamente significativa la velocidad de crecimiento de las micobacterias.

Esta diferencia probablemente resulta de que el incremento de glucosa favorece la fermentación de la misma con la consecuente producción de CO₂ (Strayer, 1979). y por ende el favorecimiento de condiciones anaeróbicas que de alguna manera interfieren en el desarrollo de las bacterias.

CURVA DE CRECIMIENTO DE H37RV A DIF. CONC. DE GLUCOSA

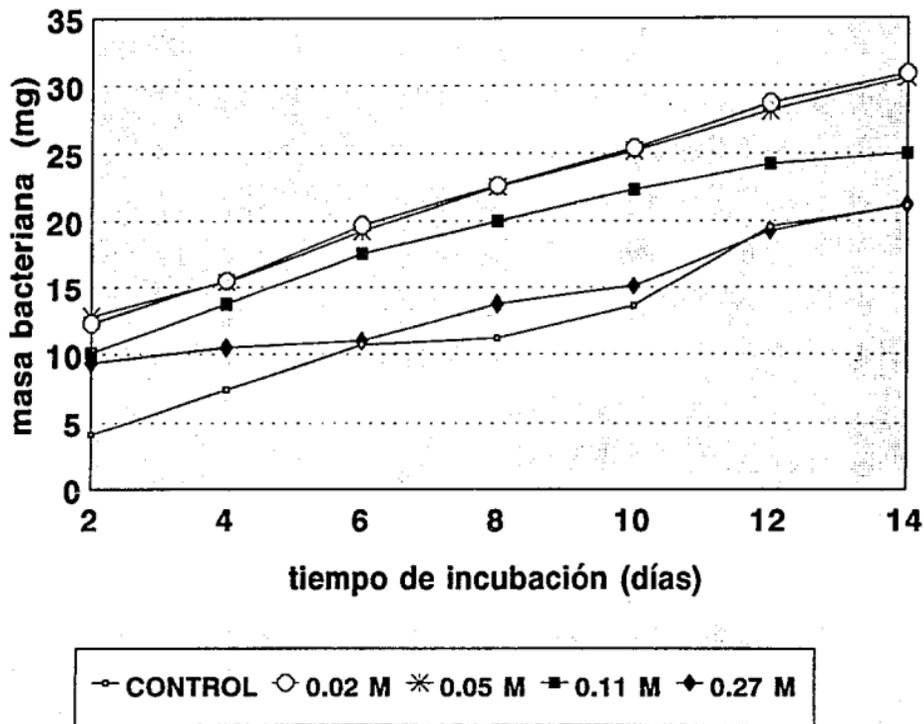
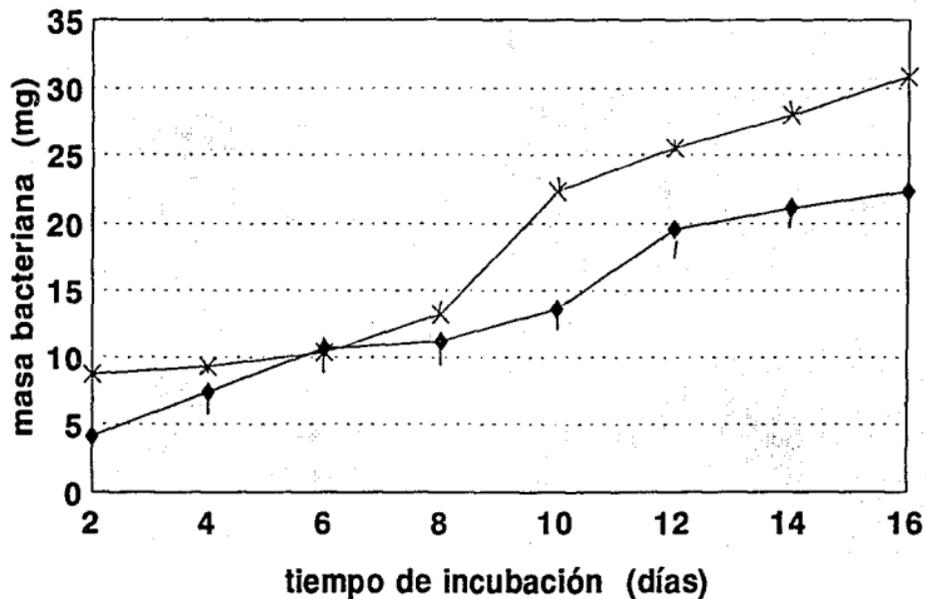


FIGURA 1

Resultó interesante, sin embargo, observar que a concentraciones relativamente bajas de glucosa, las micobacterias aceleraron de manera importante su velocidad de crecimiento; esto llevó a tratar de determinar el comportamiento de las micobacterias aisladas de pacientes tuberculosos diabéticos en medio de PBY no adicionado con glucosa. Como se demostró claramente en la figura 2, dichas micobacterias tuvieron una velocidad de crecimiento similar a la cepa H37Rv crecida en presencia de glucosa 0.02 M; es probable que este comportamiento sea secundario o que las bacterias que han estado expuestas a concentraciones pobres de glucosa in vivo, mantengan activa alguna vía metabólica similar o idéntica a la que utiliza la cepa H37Rv (Tsukamura, 1967), en presencia de glucosa.

Esta observación se basa en el hecho de que las bacterias aisladas de pacientes diabéticos son procesadas para su cultivo en ausencia de azúcares. Fue interesante observar que la velocidad de crecimiento de las cepas aisladas de pacientes diabéticos fue muy parecida, ya que se hubiera esperado, en caso de que nuestra hipótesis no fuese cierta, que las velocidades fuesen diferentes para cada una de las micobacterias aisladas, sin embargo, es importante considerar que existe la posibilidad de que las cepas aisladas de pacientes tuberculosos activen durante su etapa de crecimiento intracelular vías de síntesis de

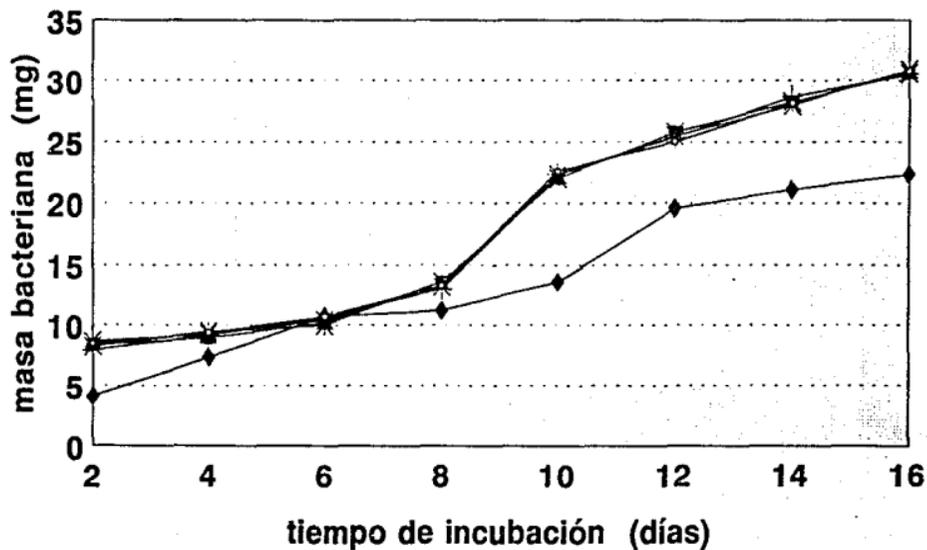
CURVA DE CRECIMIENTO DE *M. tuberculosis* DE PACIENTES DIABETICOS



* N=5 pacientes ◆ H37Rv

FIGURA 2.

CURVA DE CRECIMIENTO DE *M. tuberculosis* DE PACIENTES DIABETICOS



n=5, pacientes

◆ H37Rv

FIGURA 2

glucosa a partir de otras fuentes de carbono, debido a que las condiciones intracelulares en los macrófagos de pacientes diabéticos o inmunosuprimidos, no son las más adecuadas, en términos de concentración de nutrientes muy especialmente de glucosa en el caso que nos interesa. Los siguientes experimentos se efectuaron con la cepa aislada de un paciente tuberculoso diabético.

Como se puede observar en las figuras 1 y 2, todas las micobacterias que se probaron siempre mostraron un incremento importante en la velocidad de crecimiento a partir del sexto día de crecimiento, antes de esto, las velocidades de crecimiento no mostraron diferencias significativas entre la cepa control (*M. tuberculosis* H37RV) y las otras cepas.

Es probable que este fenómeno se deba a las condiciones de cultivo ya que las bacterias utilizan una vía dependiente de oxígeno en los primeros días del cultivo (sexto día) y posteriormente como consecuencia de la escasez de oxígeno se favorezca una vía anaeróbica.

Apoyando esta hipótesis sabemos que la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (vía anaeróbica genera 36 ATP por cada molécula de glucosa en comparación con los 2 ATP que produce la vía aeróbica de Entner-Doudoroff (Lehninger, 1973; Strayer, 1979).

El emplear la cepa de crecimiento rápido, *M. avium* se debió principalmente a que se quiso determinar si el efecto de la glucosa sobre la velocidad de crecimiento era privativo de las cepas de rápido crecimiento. Los resultados demostraron que esta cepa si incrementó su velocidad de crecimiento pero nunca llegó a la velocidad de una micobacteria de rápido crecimiento cultivada en ausencia del carbohidrato en el medio de cultivo.

Con objeto de determinar si las micobacterias poseen la habilidad de desdoblar azúcares más complejos (disacáridos) probamos el efecto de la galactosa y la lactosa sobre la velocidad de crecimiento de las micobacterias. Los resultados demostraron que las micobacterias utilizan de manera similar la glucosa y la galactosa, mientras que son incapaces de romper el enlace galactosa (β -1,4) glucosa que conforma a la lactosa.

Lo anterior sugiere que las micobacterias solamente tienen la capacidad de utilizar azúcares simples ya que aparentemente las micobacterias carecen de disacaridasas (enzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos; Strayer, 1979) en contra posición con otras bacterias, como *E. coli* y levaduras, que si poseen estas enzimas (Konemman, 1989; Wickerham, L.J. and Burton, K.A. 1948).

Aún más estos resultados sugieren que es posible que las micobacterias posean epimerasas que son enzimas que transforman la galactosa en glucosa para poder ser metabolizada.

El metabolismo de los carbohidratos por las bacterias tiene lugar por varias vías e implica una serie de etapas en las que los iones H^+ son transferidos sucesivamente a compuestos de mayor potencial Redox con la liberación final de energía en la forma de adenosin trifosfato (ATP). Los carbohidratos son inicialmente degradados a ácido pirúvico este proceso puede llevarse a cabo por tres vías: la Entner-Doudoroff (ED), Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y la de Warburg-Dickens (hexosa monofosfato).

Las bacterias utilizan una o más de estas tres vías para metabolizar la glucosa de acuerdo con su estructura enzimática y a la utilización de oxígeno (Strayer, 1979 y Lehninger, 1973; Koneman 1982). Nuestros resultados demostraron que las micobacterias en condiciones basales de cultivo son capaces de sintetizar glucosa, sin embargo, cuando se añade este azúcar al medio la síntesis se ve favorecida; cuando se añadió lactosa al medio, confirmando la observación anteriormente efectuada, la capacidad de síntesis de glucosa de las micobacterias no se modificó.

Llamo mucho la atención el hecho de que las micobacterias aisladas de pacientes diabéticos tuberculosos sintetizaron un 164% más de glucosa que la cepa control en condiciones basales de cultivo. Esto probablemente se debe a que estas micobacterias utilicen vías metabólicas diferentes a las que usa la cepa control ya que debemos recordar que in vivo la cantidad de glucosa presente dentro de las células donde la bacteria crece, es mínima.

Además las micobacterias en cultivo metabolizan aparentemente más eficientemente la asparagina (ciclo de Krebs y urea Ellner, 1979; Sharma, 1973) y el glicerol (gluconeogénesis Runyon, 1972) del medio Figura 5.

Los microorganismos del género mycobacterium son aeróbios estrictos y por esta razón en estas bacterias la degradación de los carbohidratos se efectúa por la vía de Entner-Doudoroff, o vía aeróbica pero esta ruta metabólica carece de las deshidrogenasas necesarias para oxidar ácido láctico u otros ácidos mixtos, por lo que los hidrogeniones del ácido pirúvico los trasfiere al ciclo de Krebs donde se une al oxígeno elemental y forma agua (Koneman, 1983).

La vía de Embden-Meyerhof-Parnas es conocida como la vía fermentativa o del metabolismo anaerobio porque no requiere de la presencia de oxígeno. La vía de Entner-

Doudoroff si requiere de oxígeno y la vía de la hexosa monofosfato es la vía utilizada por los microorganismos anaeróbios facultativos.

Cuando se adicionó glucosa al medio de cultivo la actividad de la deshidrogenasa láctica se incremento con respecto a los cultivos que sólo contenían glicerina como fuente de carbono.

De acuerdo a nuestros resultados descartamos que las micobacterias empleen la ruta de Entner-Doudoroff ya que los resultados obtenidos al utilizar lactato deshidrogenasa nos demuestran que las bacterias en cultivo si poseen capacidad oxidativa; de igual manera descartamos también la vía de Embden-Meyerhof-Parnas ya que al determinar el pH del medio de cultivo donde creció la micobacteria este se mantuvo constante (pH= 6.8) por lo que se descarta el hecho de que la bacteria produzca ácidos fuertes, por otra parte como no existe producción de gas (CO₂) sugerimos que la micobacteria para degradar carbohidratos hasta ácido pirúvico emplea principalmente la ruta de las pentosas (hexosa monofosfato ya que por esta ruta metabólica puede entrar a ciclo de Krebs (Karp, 1987).

El hecho de que el pH del medio de cultivo nunca se modificó y el que se haya encontrado piruvato libre en el

sonicado, elimina prácticamente la utilización de la vía aeróbica. Estos resultados nos permiten suponer que la clasificación de las micobacterias como aeróbios estrictos debería de reconsiderarse, puesto que es posible que sean anaeróbios facultativos.

De acuerdo a diversos autores (Campbell, 1969; Ellouz, 1974; Fournié, 1987 a y b; Kamisango, 1985) las micobacterias emplean al glicerol como fuente principal de carbono in vitro y por esta razón se sugiere que las micobacterias emplean la vía de la gluconeogénesis para sintetizar glucosa, ya que bioquímicamente el glicerol entra a la vía glucolítica, a la gluconeogénesis y a ciclo de Krebs; el que se favorezca una u otra ruta metabólica va a depender de la tensión parcial de oxígeno, de la necesidad de sintetizar algún componente en particular, de la cantidad de energía que requiera la micobacteria, así como la etapa o fase de desarrollo en que se encuentre la bacteria en un momento determinado.

Con base en nuestros resultados sugerimos que la micobacteria in vivo forma reservas energéticas las cuales le servirán posteriormente para cuando las condiciones nutricionales sean desfavorables para ella, sin embargo, cuando las condiciones nutricionales in vivo son difíciles, como sería en el caso de los pacientes diabéticos, la formación de reservas se genera a través de

vías enzimáticas que normalmente no están activas.

Es posible que también in vivo participen factores que no se presentan in vitro y que estos sean precisamente los que intervienen en el desarrollo óptimo de la bacteria en cuanto a las concentraciones de carbohidratos.

Consideramos que otro factor que interviene en el óptimo desarrollo de las micobacterias es el relacionado a la concentración de oxígeno y que además determina la ruta metabólica que las bacterias deben de seguir para metabolizar los nutrimentos de acuerdo a las necesidades propias de la bacteria.

Diversos autores: (Goren 1972; Brennan 1989; Camphausen 1987; y Kanatsuna 1970) han demostrado que las micobacterias presentan en la pared celular un polisacárido formado por unidades repetidas de arabinosa y galactosa y se supone que las micobacterias tienen que sintetizar de nuevo dichos carbohidratos, sin embargo es posible a raíz de nuestros resultados suponer que la galactosa de la pared celular sirva también como una reserva nutricional a la micobacteria.

Esto nos permite suponer que el empleo de alguna de las dos vías metabólicas puede ser indicativo de que las

micobacterias emplearán alguna de las rutas metabólicas dependiendo de los nutrientes de que disponga.

D. Chatterjee y col, 1992; Chang et al, 1989; Rojas et al, 1984; Papa et al, 1989; Hunter y col 1983 y Kamisango y col 1985 mencionan la presencia de compuestos glicosilados como glicolípidos, proteoglicanos, lipooligosacáridos, etc en las micobacterias. La presencia de estos compuestos sugiere que las micobacterias llevan a cabo un proceso de glicosilación muy similar al de los eucariotes, ya que los resultados obtenidos con Glucosa marcada con ^{14}C indican que este azúcar se incorporó principalmente a la pared celular (78%) de las micobacterias en mayor proporción que a los lípidos (20%) y el resto pudo haber sido metabolizado.

Así mismo sería interesante tratar de identificar los mecanismos exactos de incorporación de los carbohidratos que podían ser realizados por procesos enzimáticos de la glicosilación. Al identificar estos mecanismos muy posiblemente conoceríamos cual o cuales son los sitios donde se efectúa este proceso debido a que dicho proceso se lleva a cabo en el complejo de Golgi y en el retículo endoplásmico, de los organismos eucariotes, pero debido a que los organismos procariotes carecen de estos orgánulos no se conoce todavía cuales son estos sitios.

En conclusión, creemos que nuestros resultados aportan varias observaciones interesantes: a) las micobacterias no son necesariamente aeróbios estrictos ya que es probable que sean anaeróbios facultativos; b) la velocidad de crecimiento de las micobacterias se regula mediante la adición de ciertos componentes en los medios de cultivo, especialmente glucosa; c) las micobacterias carecen de disacaridasas; d) las micobacterias probablemente poseen epimerasas; e) la vía metabólica que utilizan las micobacterias para sintetizar glucosa depende de diferentes factores tanto intrínsecos como extrínsecos; f) las micobacterias aisladas de pacientes diabéticos se podrían considerar como atípicas desde el punto de vista metabólico en comparación con la cepa control.

Lo anterior nos permite proponer dos aplicaciones clínicas inmediatas: a) utilizar medios de cultivo que contengan glucosa para siembras primarias de muestras de pacientes, ya que como hemos demostrado en este trabajo, se incrementa la velocidad de crecimiento de las micobacterias y por ende se obtiene masa bacteriana más rápido para así lograr la identificación y tipificación de las micobacterias aisladas de pacientes, con el consiguiente beneficio para el paciente y la institución (menos días de hospitalización e inicio de una terapia más adecuada de manera más temprana); y b) reconsiderar la necesidad de efectuar pruebas de drogasensibilidad y de

dosificación antes de iniciar un esquema terapéutico en
pacientes diabéticos tuberculosos.

CONCLUSIONES.

- 1.- De acuerdo con los resultados obtenidos en la curva de crecimiento podemos concluir que *M. tuberculosis* en cultivo tiene la capacidad para utilizar hexosas como fuente de carbono.

- 2.- Adicionando carbohidratos simples al medio de cultivo, se reduce el tiempo generacional de la bacteria, ya que se obtiene mayor cantidad de masa bacteriana en menor tiempo.

- 3.- Los disacáridos como la lactosa no modifican el tiempo generacional de la bacteria debido posiblemente a que carece de las enzimas necesarias para desdoblar las moléculas o porque la bacteria requiere mayor energía para llevar a cabo la ruptura de dicha molécula.

- 4.- En base a las conclusiones anteriores, suponemos que las micobacterias poseen posiblemente epimerasas, pero no disacaridasas.

- 5.- La utilización de la vía glucolítica por parte de la micobacteria no ocasiona modificaciones morfofisiológicas ni bioquímicas, y ofrece la ventaja de que crecen en un menor tiempo (los patrones de corrimiento electroforético es exactamente el mismo).

- 6.- La adición de carbohidratos simples al medio de cultivo propicia aparentemente un incremento en la concentración de proteínas (tabla 3) y disminución en la formación de lípidos.

- 7.- La incorporación de ^{14}C -Glucosa a la pared bacteriana sugiere que el aumento de carbohidratos simples al medio de cultivo favorece la síntesis de proteínas, o que el material de la pared sufre un proceso de glicosilación.

- 8.- La micobacteria lleva a cabo la glucólisis además de la gluconeogénesis cuando se adicionan al medio de cultivo carbohidratos simples y ambas vías no se excluyen mutuamente.
- 9.- El empleo de carbohidratos simples acelera el crecimiento bacteriano, lo cual se traduce en mayor cantidad de masa bacteriana viables. Esto a nivel clínico es muy favorable porque se puede realizar al mismo tiempo la tipificación de la micobacteria y las pruebas de drogasensibilidad por lo que se puede conocer en menor tiempo los fármacos que se deben emplear en cada uno de los pacientes tuberculosos.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS.

- Azuma, I., Thomas, D.W., Adam, A., Ghuyssen, J.M., Bonaly, R., Petit, J.F. and Lederer, E.; 1970. Chemical structure of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. I. Isolation and partial characterization of the peptidoglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35:478.

- Barkasdale, L. and Kim, K.S. 1977. *Mycobacterium*. *Bacteriol. Rev.* 41:217.

- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1986 Vol 2 Section 16 Editorial Board Baltimore USA.

- Brennan, P.J. 1989. Structure of mycobacteria: recent development in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev. Infec. Dis.* 11. (Suppl. 2):420.

- Brennan, P.J. 1990. Primera Conferencia Internacional sobre Patogénesis de Infecciones Micobacterianas. Junio. 27-29. Estocolmo, Suecia.

- Campbell, J.M. and Naworal, J. 1969. Composition of the saturated and monounsaturated fatty acids of *Mycobacterium phlei*. *J. Lipid Res.* 10:593.

- Camphausen, R.T., Mc Neil, M., Jardine, I. and Brennan, P.J. 1987. Location of acyl groups of trehalose-containing lipooligosaccharides of mycobacteria. *J. Bacteriol.* 189:5473.

- Chang, J., Fujiwara, T., Brennan, P.J., Mc Neil, M., Turco, S.J., Sibille, J.C., Snapper, M., Aisen, P. and Bloom, B.R. 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2453.

- Chatterjee, D., Hunter, S.W., Mc Neil, M., Jardine, I. and Brennan, P.J. 1989. Structure and function of mycobacterial glycolipids and glycopeptidolipids. *Acta Leprologica.* 7 (Suppl. 1):81.

- Daffé, M., Lacave, C., Lanéelle, M.A., Lanéelle, G. 1987. Structural elucidation of the major triglycosyl phenol-phthiocerol of *Mycobacterium tuberculosis* (strain Canetti). *Eur. J. Biochem.* 167:155.

- Draper, P. 1982. The anatomy of mycobacteria. En the *Biology of mycobacteria*. Vol. I. C. Ratledge and J. Stanford ed. Academic Press. Inc. (London). Ltd. London.

- Ellner, J.J. & Daniel, T.M. 1979. Immunosuppression by Mycobacterial Arabinomannan. *Clin. Exp. Immunol.* 35:250

- Ellouz, F., Adam, A., Ciorbani, R. and Lederer, E. 1974. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59:317.

- Emori, K., Nagao, S., Shigematsu, N., Kotani, S., Tsjimoto, M., Tetsuo, S., Kusumoto, S. and Tanaka, A. 1985. Granuloma formation by muramyl dipeptide associated with branched fatty acids, a structure probably essential for tubercle formation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 49:244.

- Fournié, J.J., Rivière, M., Papa, F. and Puzo, G. 1987.(a) Structural elucidation of the major phenolic glycolipid from *Mycobacterium kansasii*. I. Evidence for tetrasaccharide structure of the oligosaccharide moiety. *J. Biol. Chem.* 262:3174.

- Fournié, J.J., Riviere, M., Papa, F. and Puzo, G. 1987.(b) Structural elucidation of the major phenolic glycolipid from *Mycobacterium kansasii*. II. Presence of a novel dideoxyhexose. *J. Biol. Chem.* 262:3180.

- Fournié, J.J., Adams, E., Mullins, R.J. and Basten, A. 1989. Inhibition of human lymphoproliferative responses by mycobacterial phenolic glycolipids. *Infect. Immun.* 57:3653.

- Goren, M.B. 1970.(b) Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37 Rv. II. Structural studies. *Biochem. Biophys. Acta.* 210:127.

- Goren, M.B. 1972. Mycobacterial lipids: selected topics.

Bacteriol. Rev. 36:33.

- Goren, M.B. 1974. Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: correlation of virulence with elaboration of sulfatides and strongly acidic lipids. *Infect. Immun.* 9:142.

- Hetch, S.T. and Causey, W.H. 1976. Rapid method for the detection and identification of mycolic acids in aerobic actinomycetes and related bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 4:284.

- Hunter, S.W., Murphy, R.C., Clay, K., Goren, M.B. and Brennan, P.J. 1983. Trehalose-containing lipooligosaccharides: a new class of species-specific antigens from *Mycobacterium*. *J. Biol. Chem.* 258:10481.

- Ikawa, H., Kaneda, K., Goto, K., Tsuyuguti, I., Ueno, Y., Hua, H., Oka, S. and Yano, I. 1989. Rapid and precise diagnosis of atypical mycobacterial infection by chemotaxonomical and immunological methods. *Acta Leprologica.* 7 (suppl. 1):85.

- Kamisango, K.I., Saadat, S., Dell, A. and Ballou, C.E. 1985. Pyruvylated glycolipids from *Mycobacterium smegmatis*. Nature and localitation of the lipid components. *J. Biol. Chem.* 260:4117.

- Kanetsuna, F. and San Blas, G. 1970. Chemical analysis of a mycolic acid-arabinogalactan-mucopeptide complex of *Mycobacterium* cell wall. *Biochem. Biophys. Acta.* 208:434.

- Karp, G. 1987. *Biología Celular*. Editorial Mc Graw-Hill.

- Knisley, C.V., Damato, J.J., McClatchy, J.K. and Brennan, P.J. 1985. Rapid and sensitive identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 22:761.

- Koneman, E; Allen, S; Dowell, V; Sommers, H. 1983. *Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas color.* Cap 3, 12. Editorial Medica Panamericana.

- Lehninger, A.L. 1973. *Bioquímica.* 2a ed. Ediciones Omega, S.A. Barcelona España.

- Mc. Neil, M., Chatterjee, D., Hunter, S.W. and Brennan, P.J. 1989. Mycobacterial glycolipids: isolation, structures, antigenicity and synthesis of neoantigens. *En Methods in enzymology*. Vol. 179. Academic Press. Inc. USA.
- Minnikin, D.E. 1982. Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. *The biology of mycobacteria*. Vol. 1. C. Ratledge and J. Stanford ed Academic Press. inc. (London). Ltd. London.
- Orme, I. Andersen, P. and Boom, W. 1993. T cell Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases*. 167:1481-97.
- Papa, F., Laszlo, A., David, H.L. and Daffé, M. 1989. Serological specificity of *Mycobacterium tuberculosis* glycolipids. *Acta Leprologica*. 7 (Suppl.1):98.
- Rojas, E.O., Gonzalez, C.O., Oltra, R.A. and Arce, P.A. 1984. On the presence of arabinose in mycobacterial and related special. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 26:261.
- Puzo, G., Rivieré, M., Gilleron, M. and Venisse, A. 1990. A new route for the characterization and structural elucidation of immunogenic mycobacterial glycolipids. Resumen. *Primera Conferencia Internacional sobre Patogénesis de Infecciones Micobacterianas*. Junio 27-29. Estocolmo, Suecia.
- Runyon, E.H. 1972. *Identificación of acidfast pathogens utilizing colony characteristics*, 3rd ed. Veterans Administration. Salt Lake City, UTAH.
- Sharma, S.C., Jayaram, H.N. and Ramakrishnan, T. 1973. L-Asparaginase Activity on Mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Disc.* 108:688.
- Stryer, L. 1979 *Bioquímica* Cap. 12, 13, 14, 15, 16 y 17. Editorial Reverté. S.A.
- Tsukamura, S. Mizuno, S; Tsukamura, M. 1967. Utilization for Growth of ten Carbohydrates by Slowly Growing Mycobacterial in the Presence of Ammoniacal nitrogen and

Trimethylene Diamine nitrogen. Am. Rev. Respir. Dis. 96:529.

- Tsukamura, M. 1981. A Review of the Methods of Identification and Differentiation of Mycobacterias. Reviews of Infectious Diseases. Vol 3 No 5.

- Tsukamura, M. Mizuno, S. and Toyama, H. 1985. Taxonomic Studies on the Mycobactreium tuberculosis, Series. Microbiol. Immunol. Vol 29(4) 285.

- Wickerham, L.J. and Burton, K.A. 1948. Carbon Assimilation Tests for the Classification of Yeast. J. Bacteriol. 56:363.ts