



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PROYECTO DE MAESTRIA TITULADO:

Efecto del estado redox de macrófagos humanos sobre la expresión de *whiB3* en
Mycobacterium tuberculosis en el proceso de infección.

PRESENTA:

OMAR MORALES BARRIENTOS

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Elizabeth Langley McCarron, Instituto Nacional de Cancerología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Silvia Guzmán Beltrán, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Diciembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

CGEP/PMDCB/1854/2019

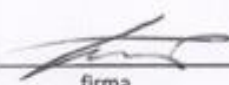
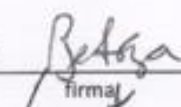

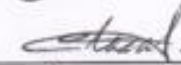

SINODALES DESIGNADOS

Presente

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 12 de agosto del presente año, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** del/la estudiante **Morales Barrientos Omar**, con la tesis "Efecto del estado redox de los macrófagos humanos sobre la expresión del regulador transcripcional WhiB3 de Mycobacterium tuberculosis", dirigida por el/la Dr(a). **Langley McCarron Elizabeth**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado, en el que se encuentra usted incluido:

		Acepto			
PRESIDENTE	Servín González Luis	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	10/18/19 fecha		firma
VOCAL	Pedraza Chaverri José	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	10/11/2019 fecha		firma
VOCAL	Morett Sánchez Juan Enrique	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	16/10/2019 fecha		firma
VOCAL	Rosales Ledesma Carlos	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	16/10/2019 fecha		firma
SECRETARIO	Hernández Lucas Ismael (S)	Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	16/10/2019 fecha		firma

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de agosto de 2019


COORDINADORA
Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No. 482750 otorgada para la realización de este trabajo.



A la Universidad Nacional Autónoma de México, por todos los conocimientos adquiridos dentro de sus aulas.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” por todos los conocimientos adquiridos en mis años de estadía, por las amistades invaluables.



A mis tutoras, las doctoras Clara Espitia, Elizabeth Langley y Silvia Guzmán, cuyas aportaciones ayudaron a enriquecer este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional en cada una de mis decisiones, siempre estaré en deuda con ustedes.

A mi tía Verónica, que pese a ya no estar entre nosotros, la confianza depositada en mí será siempre un aliciente para jamás darme por vencido.

A mi estimado amigo y maestro Ivan Monsalvo Montiel, quien me indicó el camino que me trajo hasta este momento.

A la Dra. Silvia Guzmán Beltrán, por regalarme más que sus conocimientos.

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad
y la energía atómica: la voluntad”*

Albert Einstein

ABREVIATURAS

ADC	Albúmina, dextrosa, catalasa
ATP	Trifosfato de adenosina
CD14	Grupo de diferenciación 14 (cluster differentiation 14)
ClO_4^-	Anión hipocloroso
CMTB	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
CR3	Receptor de la fracción 3 del complemento
DAMP	Patrones moleculares asociados a peligro (Dangerous associated molecular pattern)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DosR	Regulador del sistema de dormancia
DPI	Difeniliodonio
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESX-5	Miembro 5 del sistema de excreción tipo VII
FcR	Receptor de la fracción Fc de los anticuerpos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Icl1	Isocitrato liasa 1
IgG	Inmunoglobulina G
Lip	Lipasa
LipY	Lipasa Y
MDM	Macrófagos derivados de monocitos
MOI	Multiplicidad de infección
MosR	Regulador mycobacteriano de los operones de supervivencia
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NOX	Oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OMS	Organización Mundial de la Salud
O ₂	Oxígeno molecular

PAMP	Patrones moleculares asociados a patógeno
PDIM	Dimicocerato de ptiocerol
PIP3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
PMBC	Células mononucleares de sangre periférica
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qRT-PCR	Retrotranscripción cuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa
RAC	Proteína Ras relacionada a C3
Ras	Proteína cuyo gen puede producir sarcomas en rata
RhoA	Proteína A homóloga a Ras
RhoG	Proteína G homóloga a Ras
RLT	Buffer
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SH	Suero humano
SHD	Suero humano descomplementado
SodA	Superóxido dismutasa A
TAG	Triacilglicerol
TB	Tuberculosis
Tgs1	Tiacilglicerol sintetasa 1
TLR	Receptores tipos Toll
UFC	Unidades formadoras de colonia
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
WhiB3	Factor transcripcional WhiB3
X/XO	Sistema Xantina/Xantina oxidasa

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	12
3. ANTECEDENTES	15
3.1 Tuberculosis	15
3.2 Epidemiología de la tuberculosis	15
3.3 Etiología de la tuberculosis pulmonar	16
3.4 Relación patógeno-hospedero.....	17
3.4.1 NADPH oxidasa (NOX)	18
3.5 Respuesta de la micobacteria a estímulos externos.....	20
3.6 Familia de factores transcripcionales Wbl.....	21
3.7 WhiB3 como factor transcripcional	22
3.7.1 Regulación de la expresión de la superóxido dismutasa A (<i>sodA</i>).....	23
3.8 Expresión genética durante el estado de dormancia	23
3.9 Metabolismo de lípidos en <i>M. tuberculosis</i>	24
3.9.1 Papel de la lipasa Y en el proceso de infección	25
3.9.2 Papel de la triacilglicerol sintetasa 1 en el estado de dormancia	26
3.9.3 El ciclo del glioxilato y el papel de la isocitrato liasa 1 en el estado de dormancia.	26
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1 Obtención de macrófagos derivados de monocitos	33
6.2 Infección de MDM con <i>M. tuberculosis</i>	34
6.3 Modulación de la actividad de NOX en MDM	34
6.4 Modulación del estado redox por la adición de oxidantes en macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i>	35
6.5 Cuantificación de la viabilidad celular	35
6.6 Detección de la actividad de NOX	36
6.7 Extracción de RNA de <i>M. tuberculosis</i> en cultivo in vitro y de células fagocitadas	36
6.8 Síntesis de cDNA de <i>M. tuberculosis</i>	36

6.9 Cuantificación de la expresión por retrotranscripción cuantitativa de PCR..	37
6.10 Análisis estadístico	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
7.1 <i>whiB3</i> se induce en bacterias fagocitadas por macrófagos humanos.	40
7.2 La actividad de NOX modula la expresión de <i>whiB3</i> en micobacterias intracelulares.	43
7.3 La actividad de la NOX induce la expresión de genes asociados a dormancia.	45
7.4 La expresión de <i>whiB3</i> en <i>M. tuberculosis</i> está asociado al estado redox del macrófago.....	46
7.5 La expresión de genes de dormancia en <i>M. tuberculosis</i> está asociado al estado redox del macrófago.	47
7.6 La expresión de <i>whiB3</i> , <i>sodA</i> , <i>lipY</i> , <i>icl1</i> y <i>tgs1</i> se inducen en presencia de agentes oxidantes en cultivos de <i>M. tuberculosis</i>	49
7.7 Modelo propuesto de la inducción de la expresión de <i>whiB3</i> y de genes del metabolismo de lípidos.	52
8. CONCLUSIÓN	54
9. PERSPECTIVAS.....	55
10. REFERENCIAS	57
ANEXO 1 MEDIOS DE CULTIVO Y AMORTIGUADORES.....	64
ANEXO 2 SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS EMPLEADOS PARA EL qRT-PCR.....	66
ANEXO 3 PRODUCCIÓN DE O ₂ ^{•-} in vitro.	67

1. RESUMEN

La tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública ya que una tercera parte de la población mundial esta infectada, y de esa proporción el 10% presentará la enfermedad activa. Esta enfermedad es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Una característica esencial de Mtb es la capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos humanos; en consecuencia, es vital conocer la interacción entre la célula hospedera y Mtb. En este sentido, se ha descrito que el estado fisiológico del macrófago como la concentración de O₂, CO, especies reactivas de oxígeno (ERO) y pH pueden influir en el metabolismo y la persistencia de Mtb en el hospedero. También se sabe que Mtb responde a las condiciones del microambiente a través de varios reguladores de la transcripción micobacteriana. Además, se ha demostrado en actinobacterias de vida libre (*Streptomyces*) que posee un regulador transcripcional, WhiD, que puede responder al estado redox y es capaz de modular la diferenciación morfo-fisiológica. Recientemente, se demostró que en el género *Mycobacterium*, existen genes homólogos a WhiD (nombrados WhiB). Particularmente WhiB3 se ha asociado al aumento en el metabolismo de lípidos de reserva para sobrevivir al estado de latencia en el huésped. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del estado redox controlado por la NADPH oxidasa (NOX) de los macrófagos humanos sobre la expresión de WhiB3 y los genes involucrados en el metabolismo de lípidos de reserva (LipY, Icl-1 y Tgs-1) en Mtb que permiten la activación de la dormancia. Para ello, primero se obtuvieron monocitos de sangre periférica de voluntarios sanos, luego se diferenciaron a macrófagos y se pretrataron con moduladores de NOX como DPI (inhibidor) y PMA (activador). Posteriormente, los macrófagos se infectaron a una multiplicidad de infección de 1:15 durante 1 h, se eliminaron las bacterias no fagocitadas y las células se incubaron durante 1 h en presencia de DPI (inhibidor ERO) y PMA (generación ERO).

Determinamos la actividad de la NOX por ensayo del cloruro de nitroazul de tretazolio (NBT) y la expresión de WhiB3, LipY, Icl-1 y Tgs-1 por RT-PCR. Se demostró que la expresión de WhiB3 aumentó en Mtb en el contexto de infección en comparación con micobacterias cultivadas *in vitro*. Además la expresión de WhiB3 fue menor en las bacterias fagocitadas por los macrófagos tratados con DPI (bajo nivel de ERO) en comparación con los macrófagos tratados con PMA (alto nivel de ERO). Para comprobar que el aumento de las ERO fueron las que contribuyen significativamente en el aumento de la expresión de los genes de interés, se adicionó directamente H₂O₂ (5 mM) y un sistema generador de anión super óxido (O₂^{•-}), la xantina/xantina oxidasa, pudimos reiterar que las condiciones oxidantes promueven la expresión de *whiB3* y los genes del metabolismo de lípidos. Finalmente pudimos concluir que la generación de ERO en macrófagos humanos indujo la expresión WhiB3 y posiblemente este regulador transcripcional participe en la activación del metabolismo de lípidos de reserva producidos para sobrevivir en estado de dormancia en el hospedero, lo que puede explicar la persistencia de Mtb durante largos períodos de tiempo.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

La presente investigación tuvo como finalidad comprender cómo la interacción patógeno-hospedero puede promover cambios en la expresión de genes involucrados en el estado de dormancia en *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis (TB). Actualmente, sigue siendo necesario el estudio de la TB, ya que al año provoca cerca de 1.2 millones de muertes y más de 10 millones de casos nuevos a nivel mundial. La TB es una enfermedad infecto-contagiosa que puede transmitirse por el aire, se estima que una tercera parte de la población mundial está infectada, sin presentar signos ni síntomas, lo que potencialmente supone un severo problema de salud público a nivel mundial.

Pese a la amplia distribución de dicho patógeno en la población, resulta interesante cómo un patógeno que produce uno de los cuadros clínicos más severos en un proceso infeccioso de vías respiratorias, puede permanecer inactivo por décadas sin causar la enfermedad. Es precisamente este estado de mínima actividad metabólica o llamado estado de dormancia lo que permite a la bacteria poder sobrevivir dentro del hospedero.

Aunque se ha descrito un sistema de dos componentes cuyos dominios extra-membranales pueden censar la concentración de gases atmosféricos como CO₂ y N₂ y promover la dormancia por regulación de la expresión de su correspondiente regulador, creemos que la rápida respuesta a las condiciones oxidantes a las que se enfrenta la micobacteria al ser fagocitada, podría atribuirse a otro factor transcripcional llamado WhiB3, que por sus características es posible que tenga un papel importante al ser susceptible a oxidación.

El principal interés de este trabajo radica en la capacidad de la bacteria en entrar a ese estado de dormancia, en el cual presenta una resistencia natural a los tratamientos empleados para combatir la infección. Para poder entrar en este estado, la bacteria requiere de reservas energéticas en forma de triacilgliceroles, lo cual es imperante para asegurar su supervivencia, por ello es necesario comprender los mecanismos implicados en la acumulación de estos lípidos.

A pesar de lo descrito anteriormente, no se conocen las condiciones predeterminantes en el hospedero, ni los mecanismos que se activan en *M. tuberculosis* que provocan la TB activa o TB latente. Por ello, nosotros sugerimos que una de las condiciones preponderantes que inducen un estado bacteriano replicativo o de dormancia es el estado oxidante de los macrófagos en el hospedero generado para evitar la infección. Sugerimos que durante la infección, se induce la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) lo que provoca un estado oxidado del grupo 4Fe-4S de WhiB3 promoviendo la unión a sus genes blanco e induciendo dormancia en la bacteria, que le permite estar en un estado de TB latente.

Por ello, se extrajo el RNA total de micobacterias a partir de cultivos de macrófagos infectados con una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* no virulenta y tratados con moduladores de la actividad de la enzima responsable de la producción del estallido respiratorio, la oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NOX). Se evaluó la expresión del RNA mensajero de *whiB3* y de genes implicados en el metabolismo de lípidos micobacterianos.

2. ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES

3.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. La TB es un término acuñado en 1882 por Roberto Koch, hace alusión a la forma que adquiere la lesión pulmonar producida por dicho microorganismo (1). Esta enfermedad es ocasionada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) que incluye a diferentes especies. Las bacterias pertenecientes a este grupo están estrechamente emparentadas y cada una posee la capacidad de infectar a diferentes especies de mamíferos (2).

M. tuberculosis es un patógeno exitoso, que después de infectar al hospedero puede evadir su sistema inmune y permanecer en estado de dormancia por décadas, asegurando su sobrevivencia (3).

3.2 Epidemiología de la tuberculosis

La Organización Mundial de Salud (OMS) estima que aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis*, pero solo del 3 al 10% de éstos desarrollarán la enfermedad activa. La OMS indica que en 2018 se reportaron 10 millones de casos nuevos de TB, además de 1.2 millones de muertes por esta enfermedad, de los cuales 0.4 millones presentaron co-infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (4). En la Figura 1, se presenta un esquema en el que se puede apreciar la incidencia de la tuberculosis a nivel mundial por cada 100,000 habitantes. Se observa que los países desarrollados, en América del norte y Europa muestran incidencia más baja, comparándola con países en vías de desarrollo como los del sur de África.

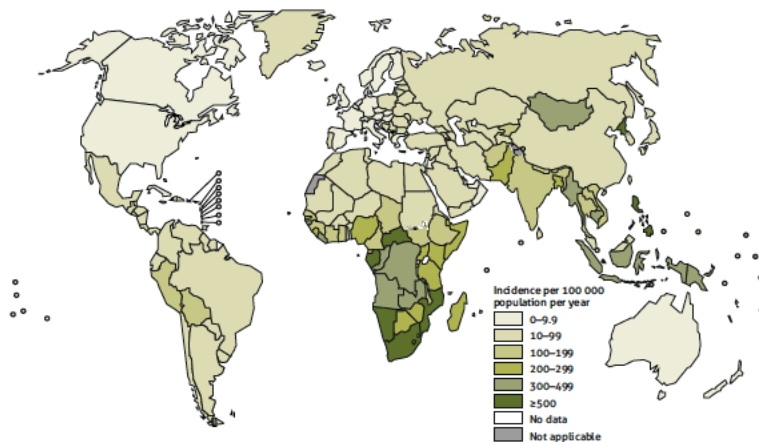


Figura 1. Incidencia de TB por cada 100,000 habitantes, se observa que los países desarrollados, en América del norte y países europeos muestran baja incidencia; esto, en comparación con países en vías de desarrollo como los del sur de África según el informe de la OMS 2016, Tomado de OMS, 2019. Disponible en: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ 2020.

A pesar de existir medicamentos efectivos para el tratamiento de la TB activa, el desapego al tratamiento, el diagnóstico incorrecto, o el tratamiento inapropiado favorecen el surgimiento de cepas resistentes a los fármacos de primera línea. Esto constituye un grave problema de salud pública al cual se enfrenta la sociedad actual (5). Lamentablemente, pese a la efectividad de los fármacos antituberculosos, aún frente a cepas sensibles, se ha observado que son poco efectivos contra los bacilos que se encuentran en un estado no replicativo; es decir, en dormancia (6).

3.3 Etiología de la tuberculosis pulmonar

La TB se transmite de una persona con lesión pulmonar abierta a otra por medio de aerosoles producidos al hablar, toser o estornudar. Estos aerosoles están formados por gotas de Pflugë y pueden contener de 1 a 3 bacilos. Estas gotas pueden permanecer suspendidas en el aire por un par de horas, hasta que son inhaladas por un hospedero susceptible (7).

Al ser inhaladas las micobacterias, éstas llegan a las vías respiratorias bajas, que en caso de infectar a un individuo inmuno-competente, produce una infección que se limita al sitio primario de invasión, lo cual representa al 90% de los casos de

infección. El 10% restante no logra contener la infección y ésta progresa a un estado de replicación activo, con aparición de signos y síntomas (7). En pacientes con TB pulmonar activa se ha reportado una carga bacteriana en el esputo que puede oscilar entre 1×10^7 y 5×10^7 bacterias/mL (8), sin embargo, este valor podría ser subestimado, debido a la expresión a la baja del rRNA que presentan las bacterias que se encuentran en dormancia (9).

El cuadro clínico que presenta un paciente con TB activa incluye síntomas como dolor en el pecho, escalofríos, pérdida de apetito, astenia y signos como síndrome pseudogripal, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna, eritema nodoso, necrosis de tejidos y hemoptisis (3).

3.4 Relación patógeno-hospedero

La micobacteria al llegar al pulmón se enfrenta a las células de la respuesta inmune innata dentro de las que se encuentran los macrófagos alveolares, células dendríticas, neutrófilos y células *natural killer*.

Las personas inmuno-competentes pueden eliminar a la bacteria gracias al reconocimiento de los patrones moleculares asociado a patógenos (PAMP por sus siglas en inglés), que son identificados por receptores de los macrófagos como los receptores tipo Toll (TLR). Los componentes de la micobacteria que son reconocidos por los macrófagos forman parte de la pared celular, como: los lipoarabinomananos, lipomananos y el manósido de fosfatidil-mio-inositol (10).

Posterior al reconocimiento del patógeno, la membrana plasmática de las células hospederas cubren por completo a las bacterias y éstas son internalizadas al citoplasma dentro de una vesícula que constituye al fagosoma temprano. Posteriormente sufre algunas modificaciones que lo transforman en un fagosoma tardío que luego se fusiona con un lisosoma formando un fagolisosoma. Esto provoca la disminución del pH (5-5.5) y la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) por la activación de la oxidasa del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NOX) (11). Este proceso es conocido como estallido respiratorio, activado como sistema de defensa para eliminar a los patógenos intracelulares. Sin embargo, este proceso puede ser interrumpido, el cual depende de la interacción inicial que se haya establecido entre el patógeno y el hospedero. Si la fagocitosis

se lleva a cabo por medio del receptor de manosa, éste interactúa con el lipoarabinomano glicosilado con manosa (ManLAM) que forma parte de la pared celular de la micobacteria y bloquea el reclutamiento de sintaxina 6, proteína involucrada en el proceso de fusión de vesículas (12). Por otra parte, la fagocitosis de partículas opsonizadas por la fracción C3bi del complemento y reconocidas por el receptor CR3, facilita la captura y la unión, no así la internalización, el proceso está mediado por RhoA y RhoG, ambas RhoGTPasas involucradas en el reclutamiento y re-arreglo de la F-actina del macrófago. Al ser este proceso independiente de RAC, no se recluta a la NOX, con lo que no se presenta el estallido respiratorio, ambos procesos llevan a la supervivencia de la bacteria intracelularmente. Contrario a esto, el reconocimiento de partículas recubiertas por IgG, reconocidas por su fracción Fc por medio del receptor FcR requiere de la participación de Rac, una RhoGTPasa que forma parte de la NOX y que tiene un papel regulatorio en la actividad de la NOX. Esto promueve la generación del estallido respiratorio y la eliminación del patógeno (13,14).

3.4.1 NADPH oxidasa (NOX)

La NOX es la fuente principal de ERO para la eliminación de patógenos; ésta es una enzima multimérica, posee dos dominios transmembranales, las subunidades gp91^{PHOX} o NOX2 y p22^{PHOX}, además de tres subunidades citoplasmáticas p67^{PHOX}, p47^{PHOX} y p40^{PHOX}. La activación de la NOX requiere de su ensamblaje en el fagosoma (Figura 2), la cual inicia al fosforilar tres residuos de serina en la subunidad gp91^{PHOX} por la enzima fosfatidil inositol kinasa (PI3K) (15).

Hasta el momento se han descrito 7 isoformas de la subunidad catalítica. De hecho, la NOX2 (Figura 2) es la que se encuentra presente en las células fagocíticas. La principal función de la NOX en dichas células, es la transferencia de dos electrones desde la molécula de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) hasta el oxígeno molecular para producir anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$, Figura 3). El $O_2^{\bullet-}$ es altamente reactivo y puede ser transformado por otras enzimas produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión hipoclorito (ClO^-) o peroxinitrito ($ONOO^-$) (16).

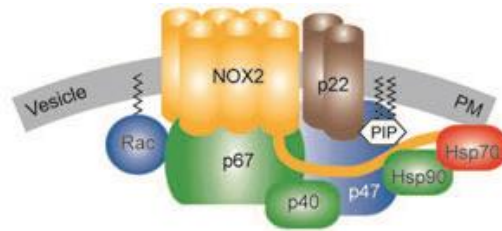


Figura 2. NADPH oxidasa del macrófago humano. Se muestra la forma activa ensamblada con sus seis subunidades. Tomado de Altenhöfer S. (2015)

Las ERO dañan a las macromoléculas; sin embargo, aún se desconoce el mecanismo y su contribución a la eliminación de los patógenos intracelulares (Figura 3). Se ha propuesto que el efecto de la presencia de ERO podría estar relacionado con la disminución del pH (ácido), promoviendo la oxidación de los componentes celulares del patógeno (17).

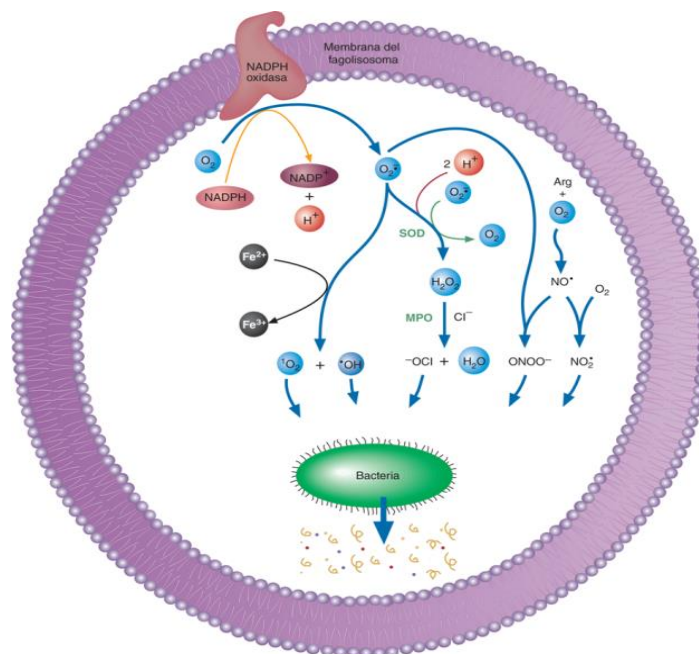


Figura 3. Formación intracelular de ERO. Actividad de la NADPH oxidasa en la membrana del fagosoma, y ERO producidas por reacción del anión superóxido, con otros elementos del fagosoma. Tomado de McKee T.; McKee J. R. (2014).

3.5 Respuesta de la micobacteria a estímulos externos

M. tuberculosis se ha descrito como una bacteria aerobia; es decir, dependiente de oxígeno. Sin embargo, se ha demostrado que puede crecer en condiciones de hipoxia e inclusive en anaerobiosis (18). Debido a esto, *M. tuberculosis* cuenta con mecanismos para reducir el efecto de las ERO que se producen durante la infección, así como formas para censar el estado redox del microambiente dentro del hospedero. De los mecanismos mejor descritos para censar las ERO es el sistema DosS/DosT, el cual es capaz de censar las concentraciones de oxígeno (O₂), óxido nítrico (NO), y monóxido de carbono (CO) y activar al regulador DosR que es un factor transcripcional que induce genes para activar el estado de dormancia en *M. tuberculosis* (19).

Definir el proceso de dormancia resulta complejo, pero de forma general se ha observado que se presenta incapacidad para crecer en medio sólido, baja actividad metabólica, alteración de la regulación de la expresión génica, acumulación de triacilglicerol, además de una tasa de crecimiento lenta, la cual le permite sobrevivir por décadas en el hospedero (20). Recientemente, se ha descrito que se inducen las enzimas que participan en el ciclo del glioxilato, hay disminución en la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) y de NADPH, hay reducción significativa de las enzimas del aparato transcripcional y traduccional, así como disminución de la tasa de respiración (21). Se ha descrito que durante la dormancia muestran resistencia a rifampicina e isoniazida, ya que pueden sobrevivir por más de 18 días a concentraciones de 5 µg/mL y 0.8 µg/mL respectivamente. Además, las células presentan cuerpos de inclusión lipídicos en dormancia inducida por condiciones de anaerobiosis (22).

3.6 Familia de factores transcripcionales Wbl

Entre las actinobacterias (*Streptomyces*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*) existe una familia de factores transcripcionales cuyo nombre se estableció con base al color blanco (white) que presentan las colonias de *Streptomyces coelicolor* en mutantes carentes del gen *whiB*. Éste fue el primer miembro descrito para dicha familia (23).

En términos generales las proteínas que integran la familia Wbl (del inglés “whiB like”) son pequeñas, sus tamaños oscilan entre los 81 y 139 residuos de aminoácidos, dentro de los cuales se presentan cuatro residuos conservados de cisteína así como una secuencia de cinco residuos (G[V/I]WGG) localizada en un bucle después del último residuo de cisteína y que ha sido considerado como un candidato para interactuar con otros componentes celulares. Así mismo, estas proteínas presentan motivos hélice-vuelta-hélice de unión al ácido desoxirribonucleico (DNA) (24).

De estas proteínas, se han descrito hasta el momento siete en *M. tuberculosis*, cada una asociada a diferentes procesos regulatorios, confiriendo cualidades particulares a la bacteria. Por ejemplo, WhiB2 se induce durante la oxigenación de un cultivo posterior a un proceso de hipoxia, o WhiB7 que se induce en presencia de antibióticos confiriéndole resistencia (25).

Otro regulador transcripcional es WhiB3, el cual presenta ortólogos tanto en *Streptomyces* como en *Corynebacterium*. En *Streptomyces* está presente WhiD, es una de las tres proteínas que llevan a la formación de espora a partir de la forma vegetativa y WhcB_{C9} de *Corynebacterium*, aunque poco estudiado, se ha observado que aumenta su expresión en la fase estacionaria de crecimiento y se ha sugerido que tiene un papel en la regulación de la expresión de genes de respuesta a estrés oxidante.

3.7 *WhiB3* como factor transcripcional

WhiB3 es una proteína de 102 aminoácidos con un motivo hélice vuelta hélice de unión al DNA. Sus cuatro residuos de cisteína están localizados en las posiciones 23, 53, 56 y 62, que se encuentran flanqueados por residuos de arginina, los cuales potencialmente pueden modificar el pKa de los residuos de cisteína, que a pH neutro pueden formar tiolatos de cisteína, que son altamente susceptibles a la oxidación (26). Recientemente se ha descrito que la expresión de *whiB3* es inducible a pH ácido como respuesta a la activación del regulador de fosfato PhoR/PhoP. PhoR es una histidin cinasa con un dominio sensor de pH. Mientras que PhoP es una proteína de unión al DNA que al ser activada por PhoR, promueve la expresión de genes de respuesta a pH ácido (27). Sin embargo, se ha demostrado que una de las diferencias entre la cepa virulenta de *M. tuberculosis* (H37Rv) y la no virulenta (H37Ra), es una mutación puntual en la secuencia de *phoR*, un cambio de una serina por una leucina, que genera disminución significativa en la capacidad de PhoR para unirse al promotor de *whiB3* y otros genes blanco (28).

Adicionalmente, se ha demostrado que mutantes *whiB3*⁻ son más sensibles a pH menor a 5 comparadas con la cepa silvestre y presentan disminución de la expresión de genes de virulencia (29). A pesar de la evidencia presentada, aún no se ha confirmado la interacción directa de WhiB3 con los genes a los que se ha asociado, por lo que la interacción proteína-DNA es un campo poco explorado.

De hecho, se han propuesto diversos modelos para dilucidar el papel de WhiB3 en el contexto de infección. Por ejemplo, se demostró en un modelo murino que en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, se exagera la producción de NO y éste podría reaccionar con WhiB3 formando un complejo con el hierro (Fe) del cluster redox (30,31). Este mecanismo difiere de la respuesta inmune en los macrófagos humanos, ya que la producción de NO no es inducible en respuesta a la infección, por ello, el modo de acción de WhiB3 en ambas especies difiere significativamente.

Por tanto, WhiB3 se ha postulado como una proteína cuyo papel podría ser esencial en la inducción del estado de dormancia, a través de la activación del metabolismo de lípidos para la degradación de ácidos grasos en el hospedero y síntesis de los lípidos bacterianos necesarios para la supervivencia durante la dormancia (32).

3.7.1 Regulación de la expresión de la superóxido dismutasa A (sodA)

Tras la infección con *M. tuberculosis*, células de la respuesta inmune innata migran y fagocitan al patógeno, lo que activa dos mecanismos de respuesta principales; una de ella es la liberación de péptidos antibacterianos y otra es la generación de ERO como: el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) e hipocloroso (ClO^-) A pesar del microambiente hostil, *M. tuberculosis* puede sobrevivir ya que cuenta con mecanismos de respuesta antioxidante conformados por: la catalasa/peroxidasa (KatG), tioredoxina reductasa (Tpx), alquilhidroperóxido reductasa (AhpC), peroxiredoxina (AhpE) y la superóxido dismutasa (SodA). Esta última enzima dismuta al anión superóxido disminuyendo su efecto letal. Por ello, la inducción de las enzimas antioxidantes es indicador de un microambiente intracelular oxidante en la bacteria (33,34). Por su actividad catalítica, SodA resulta ser una enzima de gran importancia para la micobacteria en el contexto de infección, lo cual se ve representado por una concentración 93 veces mayor si la comparamos con la expresión de su homólogo en *M. smegmatis*, una bacteria de vida libre (35).

3.8 Expresión genética durante el estado de dormancia

El estado de dormancia puede inducirse por condiciones de hipoxia establecidas paulatinamente, ya que la eliminación del oxígeno en un período corto de tiempo puede llevar a la muerte de la bacteria (6). Se ha descrito que en respuesta a la concentración de oxígeno el sistema de dos componentes DosS/DosT activa a DosR e inicia un estado de transición de crecimiento activo al estado de dormancia. Durante esta etapa de transformación, se genera un cambio generalizado en la

expresión de genes bacterianos (7). En 2016, se describió el perfil de expresión durante esta etapa. Por ejemplo, se inducen los factores transcripcionales de la familia sigma, el sistema DosS/DosT-DosR, genes de respuesta a hipoxia (*trxB1*), genes de replicación del DNA (*dnaA*), genes involucrados en la duplicación bacteriana como (*ftsZ*), y genes del metabolismo de lípidos (*lipY* y *fadD21*), así como la activación del ciclo del glioxilato (*icl1*), entre otros. De especial interés para este trabajo es la expresión de los genes *lipY* (lipasa), *tgs1* (triacilglicerol sintasa) e *Icl1* (isocitrato liasa). Se ha descrito que *tgs1* se expresa 200 veces más, mientras que *icl* solo 2 veces más durante un estado prolongado de hipoxia (9 días). Esto supone que durante la hipoxia hay acumulación de lípidos que le permite sobrevivir durante la dormancia. Por otra parte, la expresión de *lipY* se indujo dos veces durante 16 días de hipoxia, lo que está asociado al metabolismo de lípidos ya que aumenta la degradación de lípidos del hospedero para sintetizar los propios (36). Uno de los destinos de los lípidos está involucrado con la remodelación de la pared micobacteriana, la cual cambia cuando la bacteria se encuentra en los estados de crecimiento lento y no replicativo. En bacterias intracelulares se observa un aumento en la cantidad de ptiocerol dimicocerato (PDIM), así como de sulfolípidos, esto lleva a la generación de una pared más gruesa que restringe el paso de compuestos tóxicos, como los antibióticos y mayor resistencia a condiciones oxidantes (37).

3.9 Metabolismo de lípidos en *M. tuberculosis*

En la naturaleza, está ampliamente distribuido el uso de lípidos como moléculas de reserva energética, siendo almacenados en forma de triacilgliceroles (TAG). Se ha observado la acumulación de estos compuestos en el tejido adiposo de mamíferos, en las semillas oleosas de plantas y como cuerpos de inclusión en procariontes (38). Aunado a lo anterior se ha descrito que de los 4.4 millones de pares de bases que conforman el genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, éste codifica para 4500 proteínas aproximadamente; de las cuales, 250 están implicadas en el metabolismo

de lípidos, esto se debe a que muchos de estos genes se encuentran duplicados, esto demuestra la importancia del metabolismo de lípidos para la micobacteria, en comparación con los 50 genes con los que cuenta *E. coli* para cubrir la misma función (39).

El metabolismo de lípidos resulta esencial para *M. tuberculosis*, ya que para sobrevivir dentro del hospedero requiere llevar a cabo la síntesis de TAG como reserva energética para poder entrar al estado de dormancia, de igual manera son necesarios para la síntesis de su pared celular que comprende la acumulación de ácidos micólicos, tiocerol de dimicocerato, lipoarabinomanano entre otros (40). De igual manera, se han descrito mutantes que, al ser incapaces de sintetizar TAG, se ve comprometida su capacidad para entrar en dormancia. Por otra parte, aquellas mutantes incapaces de hidrolizar los TAG son incapaces de salir de su estado de persistencia en dormancia (22,38,41).

3.9.1 Papel de la lipasa Y en el proceso de infección

La micobacteria posee 24 genes que codifican para lipasas (Lip), cuya función consiste en hidrolizar lípidos, produciendo *in vivo* ácidos grasos libres, los cuales provienen de los fosfolípidos del hospedero de éstas la lipasa Y (LipY) es la que presenta mayor afinidad por su sustrato. LipY es una enzima lipolítica que degrada los TAG del hospedero, mediante la hidrólisis del enlace éster formado entre el glicerol y el ácido graso, hidrolizando preferentemente los ácidos grasos esterificados en los carbonos 1 o 3 de la molécula del glicerol (42). Se ha descrito que lipY se expresa en bacterias intracelulares aunque también está presente en el ambiente extracelular, debido a que es externalizada por el miembro 5 (ESX-5) (43) del sistema de secreción tipo 7, por lo que se ha postulado como la principal enzima involucrada en la degradación de lípidos del hospedero para su posterior internalización y su uso en la síntesis de los TAG endógenos (38).

Pese a que la micobacteria tiene la capacidad de asimilar carbohidratos, se cree que el consumo de estos tiene como principal finalidad la biosíntesis, en contraste con su uso en procesos catabólicos.

3.9.2 Papel de la triacilglicerol sintetasa 1 en el estado de dormancia

La triacilglicerol sintetasa 1 (Tgs1) es la última enzima involucrada en la síntesis de TAG endógenos, cataliza la incorporación de un ácido graso a una molécula de diacilglicerol. La delección de su gen causa una disminución en la cantidad de TAG almacenados durante el estado de dormancia inducido por hipoxia. Por medio de ensayos con isótopos radiactivos se ha logrado evidenciar que los TAG que almacena la micobacteria provienen de los ácidos grasos derivados del hospedero (38).

Además, durante la dormancia hay incremento en la producción de lípidos de reserva formando cuerpos de inclusión de TAG. A partir de éstos se obtiene la fuente de energía necesaria para su supervivencia. Además, los lípidos son usados preferentemente sobre carbohidratos como fuente de carbono durante este estado (44).

Se ha demostrado que la expresión de *tgs1* es regulada por el sistema DosS/DosT-DosR y MosR, se induce en condiciones de hipoxia, en presencia de NO, en etapas donde hay limitación de nutrientes y a pH ácidos (≥ 5) (45–47). Esto sugiere que pudiera inducirse por diversos factores transcripcionales que activan dormancia.

3.9.3 El ciclo del glioxilato y el papel de la isocitrato liasa 1 en el estado de dormancia.

El ciclo del glioxilato es una ruta metabólica ausente en mamíferos; sin embargo, está ampliamente distribuida en procariontes, hongos, protistas nemátodos y plantas, donde ejerce un papel importante en el metabolismo de lípidos. El ciclo del glioxilato es empleado para reponer intermediarios del ciclo de los ácidos

tricarboxílicos, con lo que se evitan dos pasos de descarboxilación lo que lleva a una asimilación total del carbono proveniente de compuestos de dos carbonos (48).

Mediante análisis bioinformáticos se ha postulado que el ciclo del glioxilato es empleado por organismos aerobios o anaerobios facultativos, lo cual lleva a pensar que la expresión de genes implicados en el ciclo del glioxilato tiene cierta relación con las condiciones oxidantes generadas durante la respiración aerobia. Se demostró en *Pseudomonas aeruginosa*, que tras la adición de H₂O₂ (1 mM) y paraquat (1 mM) que es un generador del radical anión superóxido, se incrementó significativamente la expresión de la isocitrato liasa (*aceA*)(49). De igual forma, en *Corynebacterium glutamicum* el ciclo del glioxilato es la ruta anaplerótica dominante cuando esta bacteria crece en una mezcla de glucosa y ácidos grasos, así mismo, *Escherichia coli* es capaz de crecer en medios limitados en glucosa, en donde puede reponer oxaloacetato vía el ciclo del glioxilato (50).

El consumo alto de ácidos grasos durante el estado de dormancia tiene como resultado la formación de acetil-CoA y en algunos casos propionil-CoA, este último generado por la degradación de ácidos grasos de cadena con número impar de carbonos (51). La acumulación de propionil-CoA es tóxica, por ello esta molécula se metaboliza en el ciclo del glioxilato, en donde la *Icl1* evita dos pasos oxidantes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (52). De hecho, se ha demostrado que deleciones en el gen *icl1*, genera mutantes atenuadas en modelos de infección en animales, presentando dicha mutante repercusión en la fase crónica de la infección (53).

3. HIPÓTESIS

4. HIPÓTESIS

Durante la infección con *M. tuberculosis* se activa la NOX, aumentando la producción de $O_2^{\bullet-}$ y luego H_2O_2 , lo que provoca la inducción y la activación de WhiB3 por la oxidación del grupo [4Fe-4S], promoviendo la unión a sus genes blanco (*lipY*, *tgs1* e *icl1*) e induciendo la latencia/dormancia.

5. OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar si el estado redox de los macrófagos humanos controlado por la NOX modifica la expresión del mRNA de *whiB3* y los genes del metabolismo de los lípidos (*lipY*, *tgsl* e *icl1*) en *M. tuberculosis*.

PARTICULARES

1. Evaluar la expresión de *whiB3* de *M. tuberculosis* en cultivo y en el proceso de infección en macrófagos humanos.

2. Modular el estado redox del macrófago humano por la adición de agentes oxidantes y regulando a la NOX por la adición de un inductor y un inhibidor.
 - 2.1 Evaluar la viabilidad y la generación de ERO en macrófagos humanos derivados de monocitos obtenidos de sangre periférica.
 - 2.2 Evaluar la expresión de *whiB3* y de genes metabólicos asociados a la dormancia como (*lipY*, *tgsl* e *icl1*) en *M. tuberculosis*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de macrófagos derivados de monocitos

Los monocitos son células de la respuesta inmune innata provenientes de sangre periférica, con capacidad fagocítica limitada, la cual se desarrolla durante el proceso de migración a tejidos y diferenciación a macrófagos (MDM). Los monocitos se caracterizan por su capacidad de adherencia, su densidad y la expresión de moléculas específicas de la estirpe celular (CD14⁺) lo que permite su purificación a partir de sangre periférica o de concentrados leucocitarios del banco de sangre .

Se obtuvieron paquetes leucocitarios del banco de sangre del instituto Nacional de enfermedades respiratorias Ismael Cosío Villegas. La separación se llevó a cabo por gradiente de densidad empleando una dilución 1:2 del concentrado leucocitario, adicionando 10 mL de solución separadora de linfocitos Lymphoprep™ (Aler Technologies AS, NOR) y centrifugando por 45 minutos a 316 x g en una centrífuga Rotanta 460R (Hettich, DEU). Se extrajo la fracción que corresponde a las células mononucleares y se lavó tres veces. Para la separación de monocitos se agregó, al paquete celular 70 µl de perlas inmunomagnéticas antiCD14⁺ (MACS Miltenyi Biotec, EUA), además de 315 µl de amortiguador de Miltenyi. La suspensión se incubó durante 15 minutos a 4 °C, posteriormente se lavó con 6 mL de amortiguador de Miltenyi, el precipitado se resuspendió con 1 mL con el mismo amortiguador y se transfirió a una columna de separación previamente humedecida, una vez filtrada la suspensión, se lavó la columna con 1 mL de amortiguador, posteriormente se eluyó la fracción CD14⁺ con 7 mL más. Las células se precipitaron por centrifugación, después se resuspendieron en medio RPMI + glutamina + SHD 10%, ajustándolas a 1.5 x10⁶/mL y colocando 1 mL de la suspensión por pozo en placas de 24 pozos.

Las células se contaron y se determinó la viabilidad con azul de tripano. La suspensión celular se ajustó a 1.5 X 10⁶ células/mL con RPMI complementado y se transfirió a placas de 24 pozos, 1 mL por pozo [Corning, EUA]. Se incubó a 37 °C

en atmósfera húmeda con dióxido de carbono (CO₂) al 5% por 7 días, para permitir su diferenciación a MDM.

6.2 Infección de MDM con M. tuberculosis

Primero, las bacterias se disgregaron para lograr una suspensión de células individuales. Para ello, se descongeló una stock bacteriano y se lavó en medio RPMI sin antibióticos complementado con suero humano total (SH). La suspensión bacteriana se disgregó a través de una aguja de 1G (30 veces), seguido de sonicación durante 3 min. A partir del sobrenadante, se preparó una suspensión de bacterias a un índice de infección de 1:15 (macrófagos:bacterias) en RPMI con 10% de SH por condición y se incubaron en atmósfera húmeda durante 1 h a 37°C en 5% CO₂. Las células se lavaron para eliminar las bacterias no fagocitadas y se volvió a poner medio fresco.

6.3 Modulación de la actividad de NOX en MDM

Se sabe que la NOX es la fuente principal de ERO para eliminar a los patógenos intracelulares, por ello se reguló la actividad de la enzima de la siguiente manera:

a) *Activación de NOX.* Esto se realizó añadiendo forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich, EUA) 0.75 ng/mL. El PMA activa a la enzima fosfatidil inositol 3 cinasa, promoviendo el ensamblaje de la NOX aumentando su acción. El PMA se adicionó 1 h previo a la infección, durante y 2 horas posteriores, con el fin de mantener activa a la enzima en ese tiempo. Finalmente se midió la viabilidad celular y la producción de ERO de los macrófagos infectados.

b) *Inhibición de NOX.* La inhibición se llevó acabo por la adición de cloruro de difeniliodonio (DPI) 20 μM, el cual se une a la subunidad NOX2 bloqueando la transferencia de electrones y evitando la generación de ERO. El DPI (Sigma-Aldrich) se adicionó 1 h previa a la infección, durante y 2 h después. Transcurrido el tiempo se determinó la viabilidad celular y la producción de ERO de los macrófagos

infectados y por otro lado, se aisló RNA bacteriano para la determinación de la expresión de genes.

*6.4 Modulación del estado redox por la adición de oxidantes en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*.*

Otra estrategia para generar un estado oxidante fue añadir directamente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 5 mM y por la generación de anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) *in situ*, por el sistema xantina-xantina oxidasa (X/XO). La xantina oxidasa cataliza la oxidación de xantina a ácido úrico y en $\text{O}_2^{\bullet-}$. Ambos agentes oxidantes se adicionaron 15 min previos a la infección y durante dos horas posteriores a la misma. Luego se midió la producción de ERO, la viabilidad en los MDM y se aisló RNA bacteriano para la determinación de la expresión de genes de interés

6.5 Cuantificación de la viabilidad celular

Los monocitos se sembraron a una densidad de 0.3×10^6 células/300 μL por pozo en placas de 48 y se incubaron durante siete días para permitir su diferenciación, se infectaron y se trataron con las diferentes condiciones antes mencionadas. Posteriormente se determinó la viabilidad de los MDM por la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa según las instrucciones del fabricante (CytoTox 96 Non-Radiative Cytotoxicity Assay, Promega, EUA).

Las células se pretrataron con: PMA (Sigma-Aldrich, EUA) (0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DPI 50 mM (Sigma-Aldrich), H_2O_2 10 mM y el sistema generador de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y se infectaron durante una hora. Luego se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se adicionó medio RPMI sin rojo de fenol con suero humano descomplementado al 10% (Lonza, EUA) junto a los estímulos con PMA, DPI, H_2O_2 y $\text{O}_2^{\bullet-}$ por dos horas más. Transcurrido el tiempo, se recolectó el medio y se evaluó la toxicidad de los estímulos por medio de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (CytoTox 96 Non-Radiative Cytotoxicity Assay, Promega, EUA)

6.6 Detección de la actividad de NOX

El NBT (Azul de nitro-tetrazolio, Sigma-Aldrich) es una sal de tetrazolio soluble en agua, de color amarillo. En presencia de ERO, el NBT se reduce a formazán, una sustancia colorida insoluble en agua. Para esta prueba se sembraron 0.3×10^6 células por pozo en una placa de 48 pozos. Luego de la infección y los tratamientos descritos, se adicionó NBT a 20 mg/mL, para una concentración final de 1 mg/mL y se incubaron durante una hora a 37 °C. Luego se aspiró el medio y adicionó metanol al 70% , se eliminó y luego se adicionó metanol al 100%. Finalmente, los cristales se disolvieron con 150 μ L de KOH 2 M y 175 μ L de DMSO para disolver los cristales, y la solución se leyó a 590 nm. Los resultados se informaron como veces de producción de ERO con respecto al control sin tratamiento.

6.7 Extracción de RNA de *M. tuberculosis* en cultivo *in vitro* y de células fagocitadas

Después de los diferentes tratamientos, las células se cosecharon en tubos de 2 mL con perlas de vidrio de 425-600 μ m (Sigma Aldrich, EEUUA) y se lisaron con lisozima 20 mg/mL y proteinasa K 2 mg/mL incubando 10 min a 37 °C. Luego se agregaron 600 μ L de amortiguador RLT (QIAGEN, DE) y para asegurar la ruptura de las bacterias se agitaron en Homogeneizador Fast Prep (MP Biomedicals, EUA) a una velocidad de 6.5, 2 ciclos de 30 s. Luego se centrifugaron a 8000 x g por 1 min (Eppendorf, DEU) para eliminar los restos celulares. Luego se extrajo el RNA total con el sistema RNeasy según las especificaciones del fabricante. El RNA total se cuantificó por espectrofotometría y se conservó a -70 °C hasta la síntesis de cDNA.

6.8 Síntesis de cDNA de *M. tuberculosis*.

Para la síntesis de cDNA se utilizaron 500 ng de RNA total de cada muestra derivada de las micobacterias intracelulares y 200 ng para las muestras que fueron obtenidas de cultivos puros en un volumen final de reacción de 20 μ L. Se utilizó el sistema de iScript cDNA de BioRad. En la Tabla 1 se enlista el sistema de reacción.

Tabla 1. Volúmenes necesarios de los reactivos para la síntesis de cDNA.

REACTIVOS	VOLUMEN
iScript mix cDNA	4 μ L
Transcriptasa reversa	1 μ L
RNA total	De 200 a 500 ng
H ₂ O libre de nucleasas	cbp 20 μ L

6.9 Cuantificación de la expresión por retrotranscripción cuantitativa de PCR.

Para evaluar la expresión de los genes de micobacterias se utilizó el sistema de BioRad.

Se evaluó la expresión de *whiB3* de *M. tuberculosis* por PCR en tiempo real, se llevó a cabo en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems), con el programa de amplificación estándar de 2 h, en un volumen de reacción de 20 μ L, anexando controles negativos para excluir inespecificidad. El análisis de los resultados se llevó a cabo por el método del $\Delta\Delta$ Ct,. Los oligonucleótidos utilizados se enlistan en el Anexo 2.

Para la determinación de la expresión genética, bajo las condiciones experimentales se preparó la mezcla de reacción de acuerdo con las especificaciones del fabricante (BioRad, EUA), como se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Volúmenes de reacción

REACTIVO	VOLUMEN
iQ Sybr Green Super mix	10 μ L
Oligo sentido	1 μ L
Oligo antisentido	1 μ L
H ₂ O	3 μ L
Muestra (cDNA)	5 μ L

6.10 Análisis estadístico

Se comparó la media de la expresión relativa de cada gen contra un valor hipotético que corresponde a la expresión del control sin tratamiento, mediante un análisis estadístico en GraphPad Prisma, mediante la prueba de t de Student para muestras desapareadas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 *whiB3* se induce en bacterias fagocitadas por macrófagos humanos.

La micobacteria es capaz de censar el microambiente para favorecer una infección activa o latente en los individuos. De hecho, el sistema de regulación más estudiado que censa el microambiente, es un conjunto de proteínas llamado Dos S/T/R (3). También se han descrito un grupo de proteínas de la familia de WhiB que responden a concentraciones altas de CO, O₂, ON. Estas proteínas WhiB solo están presentes en el grupo de los actinomicetos como *Streptomyces*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*. La primera proteína descrita de esta familia (WhiB), fue descubierta en *Streptomyces coelicolor* y se encontró que responde al O₂ y al ON y es esencial para activar la esporulación y la formación de hifas aéreas (54). Las proteínas WhiB, son pequeñas de aproximadamente 84 residuos de aminoácidos con motivos de unión a DNA y poseen una secuencia consenso que contienen cuatro residuos de cisteínas y un aspartato que están unidos a un grupo 4Fe-4S sensible a oxidación por ERO. Anteriormente se demostró que la proteína WhiD de *S. coelicolor* es activa a pH ácido (4-7) y reacciona más rápidamente con O₂^{•-} y en menor grado con O₂, y H₂O₂ (55)

Con base en lo anterior, se ha especulado que WhiB3 podría ser uno de los principales sensores del estado redox en *M. tuberculosis* por su similitud a su homólogo presente en *S. coelicolor*. Hasta el momento se ha demostrado que este regulador se activa a pH ácido (29,55) y podría participar en la inducción de latencia/dormancia (54) A pesar de lo descrito anteriormente, no se conocen los efectores en el hospedero, ni los mecanismos que se activan en *M. tuberculosis* que provocan la TB activa o la TB latente. En este trabajo se propone que durante la infección con *M. tuberculosis*, se induce la NOX aumentando la producción de O₂^{•-} y luego de H₂O₂, lo que provoca un incremento de ERO y la inducción y la activación de WhiB3 por oxidación del grupo 4Fe-4S, promoviendo la unión a sus genes blanco e induciendo la latencia/dormancia.

Primero se demostró que la expresión de *whiB3* en *M. tuberculosis* es significativamente mayor en bacterias intracelulares comparado con bacterias cultivadas *in vitro*. En la figura 4 se muestra que *whiB3* se indujo 200 veces más con respecto a las bacterias cultivadas en medio 7H9c durante 7 días.

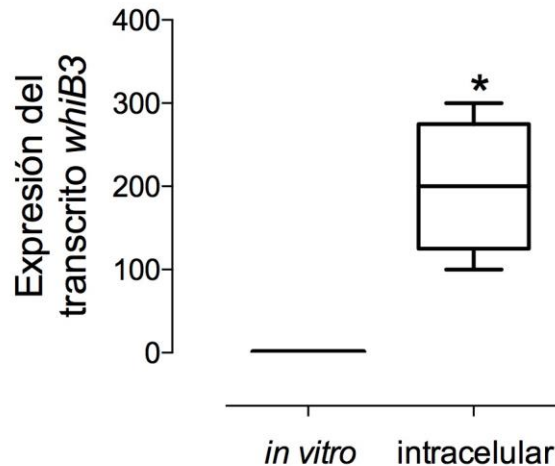


Figura 4. Expresión de *whiB3* en *M. tuberculosis*. Los MDM se infectaron con *M. tuberculosis* a un MOI 1:15 se incubó durante 1 h, después se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se incubaron 2 h más. Las bacterias *in vitro* se cultivaron en 7H9c durante 7 días. Se aisló RNA total de ambas condiciones y se cuantificó la expresión de *whiB3* por qRT-PCR. Los resultados se expresaron como $\Delta\Delta CT$. El gen del RNA ribosomal 16s (rRNA) se utilizó como gen constitutivo. La expresión de *whiB3* de las bacterias intracelulares se comparó con la expresión del cultivo *in vitro*. Los valores de la gráfica son los máximos y mínimos (n = 6). *p <0.05.

La inducción de la expresión de *whiB3* en las bacterias intracelulares podría ser en respuesta al estallido respiratorio (producción de ERO) generado en el hospedero por la cepa H37 Ra, nuestro modelo experimental. En contraste, Mehta y colaboradores (29) demostraron un aumento de 36 veces en la expresión del mismo gen a pH 4.5 y en la cepa H37 Rv. Al respecto, se ha demostrado que a pH 4-5 se induce *whiB3* por el sistema de dos componentes PhoP-R en especies virulentas del género *Mycobacterium* (27). Sin embargo, *M. tuberculosis* H37Ra presenta una mutación puntual en PhoP que lleva al cambio de una serina por leucina en su dominio de unión al DNA disminuyendo la afinidad por el promotor (28). Con base

en lo anterior posiblemente la inducción de *whiB3* en *M. tuberculosis* H37Ra podría atribuirse a otros reguladores. Es posible que la regulación de WhiB3 sea redundante, y existan otros factores transcripcionales que respondan al estado oxidante y modulen su actividad de manera distinta. En el análisis *in silico* del promotor de *whiB3* en la región “upstream” presenta 70% de identidad con la secuencia consenso de unión para MosR (U-MosR), posiblemente la expresión controlada por MosR sea mayor en comparación con PhoP-R. En la siguiente figura 5 se muestre el posible sitio de unión a MosR.

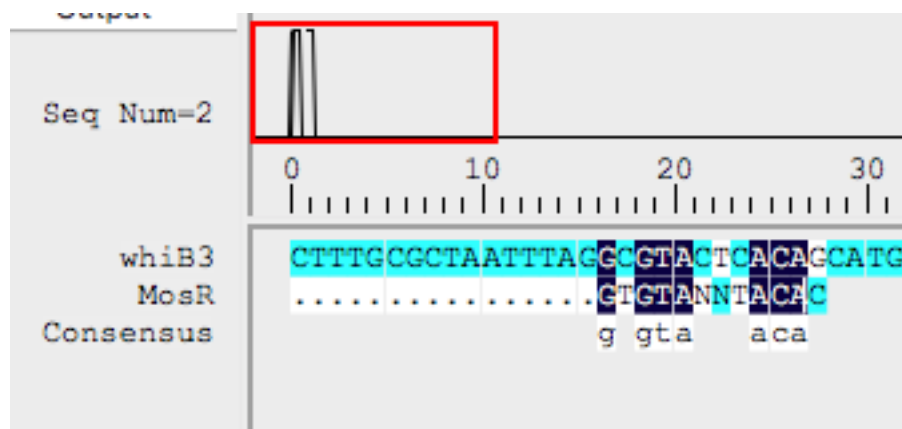


Figura 5. Posible sitio de regulación de *whiB3* por MosR en *M. tuberculosis*. Alineamiento de la secuencia consenso de unión de MosR (U-MosR) descrita por Brugarolas en 2012 (56), con la región a 300 pb “upstream” del codón de inicio de la traducción de *whiB3* realizado mediante DNAMAN. Se muestra el consenso entre ambas secuencias.

7.2 La actividad de NOX modula la expresión de *whiB3* en micobacterias intracelulares.

Con base en lo anterior, lo siguiente fue determinar el efecto de las ERO sobre la expresión de *whiB3* en el proceso de infección, para ello se moduló la actividad de NOX en macrófagos infectados y se evaluó la expresión de *whiB3* y un gen de respuesta antioxidante en las micobacterias, la superóxido dismutasa (*sodA*). Éste último se usó para demostrar que la bacteria se encontraba en condiciones oxidantes (Fig. 6).

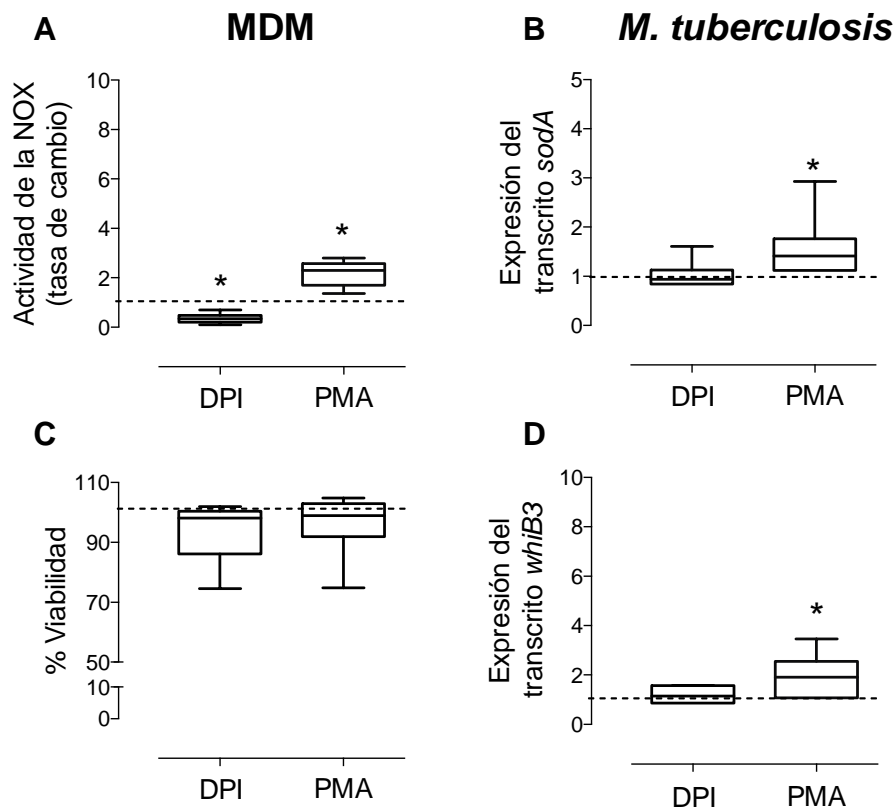


Figura 6 Efecto de la modulación de la actividad de la NOX en MDMs infectados. A) Producción de ERO y C) viabilidad de MDM infectados; y (B,D) expresión de *sodA* y *whiB3* en bacterias intracelulares. Los MDM se trataron con PMA (750 ng/mL) o DPI (20 μ M) durante 1h, posteriormente se infectaron con *M. tuberculosis* (MOI=1:15) en presencia de PMA o DPI por 1 h. Luego, se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se añadió medio fresco con PMA o DPI y se incubaron por 2 h más y se hicieron las cuantificaciones descritas. Los datos muestran los

máximos y los mínimos. * $p < 0.05$ diferencia significativa en comparación con la expresión de las bacterias intracelulares sin tratamiento (línea punteada), $n=7$.

Con el fin de asociar la expresión de *whiB3* de micobacterias intracelulares por el aumento de ERO producida por el macrófago, las células infectadas se trataron con PMA que promueve y DPI que bloquea la producción de ERO. El PMA induce diferenciación y generación de ERO en los macrófagos (57–59). En nuestro modelo experimental el PMA indujo 2.037 veces más ERO en los macrófagos (Fig 6A) y 1.62 veces más *sodA* (Fig 6B) en las micobacterias intracelulares con respecto a los macrófagos infectados sin tratamiento. Por otro lado, el DPI es un inhibidor no específico de la NOX, sin embargo, ha sido ampliamente empleado para bloquear la actividad de esta enzima en diferentes modelos experimentales (17,59,60). Al respecto se observó que DPI inhibió el 65% la formación de ERO (Fig 6A) y no se afectó la expresión de *sodA* (1.031 veces) con respecto a los macrófagos infectados sin tratamiento. Ahora bien, con respecto a la expresión de *whiB3* hubo aumento significativo respecto al control, de 2.5 veces más posterior a la adición de PMA, mientras que con DPI presentó un aumento de 1.2 veces, lo que sugiere que hay una asociación entre el aumento de ERO, la activación de la respuesta antioxidante (*sodA*) de *M. tuberculosis* y aumento en la expresión de *whiB3*. Para descartar cualquier efecto adverso del PMA y del DPI sobre de los macrófagos infectados se determinó la viabilidad y se mostro que no hubo cambios significativos en ningún tratamiento durante el tiempo de experimentación (Fig 6c).

7.3 La actividad de la NOX induce la expresión de genes asociados a dormancia.

Se ha demostrado que el metabolismo de lípidos es esencial para la activación y establecimiento de la dormancia, ya que la disponibilidad de lípidos garantiza su sobrevivencia. Hay evidencia que en diferentes modelos experimentales como: hipoxia, limitación de nutrientes o en el proceso de infección (22,32,36,38,61) hay un metabolismo alto de lípidos, por lo que se evaluó el efecto de las condiciones oxidantes en la expresión de genes del metabolismo de lípidos.

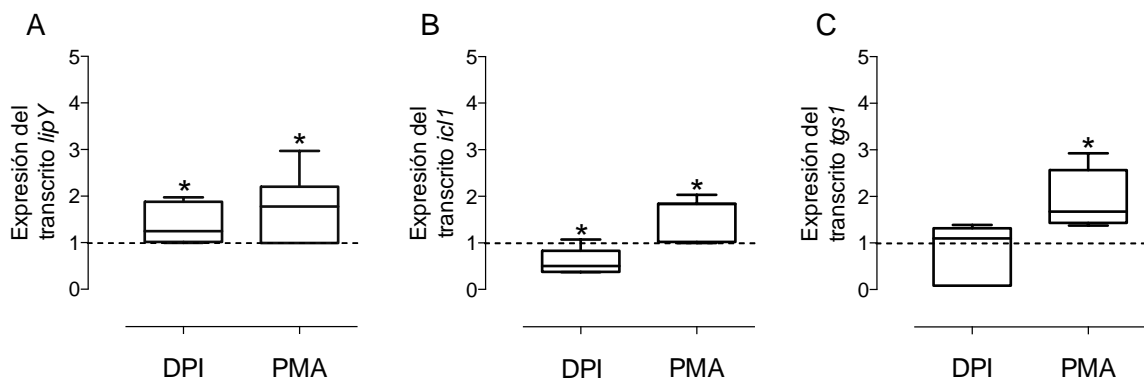


Figura 7. Efecto de la modulación de la actividad de la NOX sobre la expresión de genes del metabolismo de lípidos asociados a dormancia en micobacterias intracelulares. Se evaluó la expresión de (A) *lipY*, (B) *icl1* y (C) *tgs1*. Los MDM se trataron con PMA (750 ng/mL) o DPI (20 μ M) durante 1 h. Posteriormente se infectaron con *M. tuberculosis* (MOI=1:15) en presencia de PMA o DPI y se incubaron una hora más. Transcurrido el tiempo se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se adicionó medio fresco con PMA o DPI por 2 h. Luego se aisló el RNA y se cuantificó la expresión de los genes. Los datos expresan los máximos y mínimos. *p < 0.05 diferencia significativa en comparación con la expresión de las bacterias intracelulares sin tratamiento (línea punteada), n=7.

Como se observa en la figura 7, hubo un aumento significativo en la expresión de (A) *lipY* de 1.415 y 1.830 veces bajo el tratamiento con DPI y PMA respectivamente, comparándolo con el control sin estímulo (línea punteada). La expresión de (B) *tgs1* fue de 0.8604 y 1.909 en respuesta al tratamiento con DPI y PMA comparado con

el control. Mientras que la expresión de (C) la *Icl1* se redujo a 0.5782 veces en el tratamiento con DPI y aumenta a 1.523 al estimular a los MDM con PMA.

7.4 La expresión de *whiB3* en *M. tuberculosis* está asociado al estado redox del macrófago.

Con base en nuestros resultados se demostró que condiciones oxidantes pueden promover la expresión de *whiB3*, por lo que lo próximo a evaluar fue el efecto de agentes oxidantes sobre la expresión de este factor transcripcional y de *sodA* en bacterias intracelulares (Figura 8).

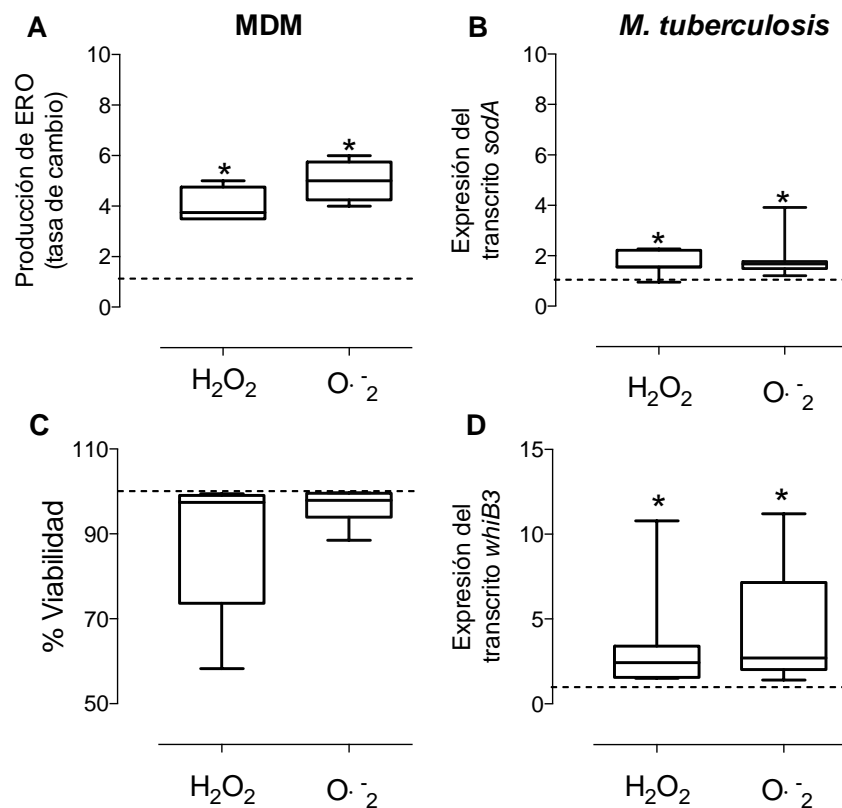


Figura 8. Efecto de agentes oxidantes sobre la expresión de *whiB3* en micobacterias intracelulares. A) Producción de ERO y C) viabilidad de MDM infectados; y (B,D) expresión de *sodA* y *whiB3* en bacterias intracelulares. Los MDM

fueron tratados con H₂O₂ (5 mM) y con un sistema generador de O₂^{•-}, (X-XO), por 15 min, luego se infectaron con *M. tuberculosis* (MOI= 1:15) y se adicionaron los oxidantes durante 1 h. Luego, se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se adicionó medio fresco y los oxidantes por 2 h más y finalmente se hicieron las cuantificaciones descritas. Los datos muestran los máximos y mínimos por cuartiles. *p <0.05 diferencia significativa en comparación con la expresión de las bacterias intracelulares (línea punteada) sin tratamiento, n=7.

En la Figura 8 se muestra que (A) el H₂O₂ y O₂^{•-} producen ERO 4.1 y 5.3 veces más, (D) e inducen significativamente la expresión de *whiB3* 3.298 y 4.319 veces con respecto al control, respectivamente. Estas condiciones oxidantes (B) promovieron significativamente la expresión de *sodA* 1.668 más con O₂^{•-} y 1.923 más con H₂O₂. Es importante puntualizar que la adición de agentes oxidantes a los MDM no altera de manera significativa la viabilidad de los mismos durante el tiempo de experimentación (C).

7.5 La expresión de genes de dormancia en *M. tuberculosis* está asociado al estado redox del macrófago.

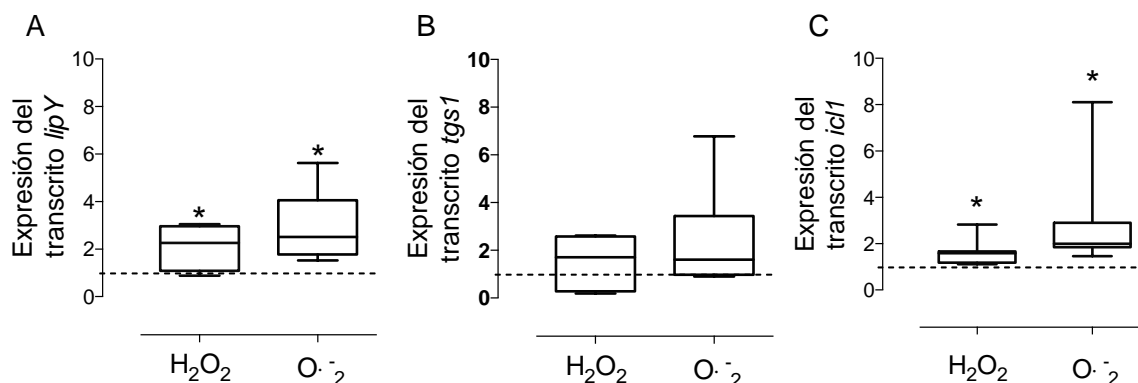


Figura 9. Efecto de agentes oxidantes sobre la expresión de genes del metabolismo de lípidos asociados a dormancia en micobacterias intracelulares. Se evaluó la expresión de (A) *lipY*, (B) *icl1* y (C) *tgs1*. Los MDM fueron tratados con H₂O₂ (5 mM) y sistema para la generación de O₂^{•-}, (X-XO), se

incubaron por 15 min, luego se infectaron con *M. tuberculosis* (MOI= 1:15) junto con H₂O₂ y O₂^{•-} por 1 h más. Después se eliminaron las bacterias no fagocitadas y se adicionó medio fresco junto con H₂O₂ y O₂^{•-} por 2h. Luego se aisló el RNA y se cuantificó la expresión de los genes. Los datos revelan los máximos y mínimos por cuartiles. *p <0.05 diferencia significativa en comparación con la expresión de las bacterias intracelulares sin tratamiento (línea punteada), n=7.

En la figura 9 se muestra que (A) la expresión de *lipY* aumenta significativamente 2.067 veces en presencia de H₂O₂ y 2.943 veces con O₂^{•-}. Por otra parte, (B) la expresión de *tgs1* incrementa 1.513 y 2.395 veces bajo las mismas condiciones, comparado con el control. Por último, (C) la expresión de la *icl1* aumenta 1.614 y 2.857 con H₂O₂ y O₂^{•-}, respectivamente.

Se observa que hay mayor expresión de los genes involucrados en el metabolismo de lípidos en los macrófagos infectados en presencia de O₂^{•-} en comparación con el tratamiento con H₂O₂.

Estos genes, esenciales para el metabolismo de lípidos, se han evaluado en diferentes condiciones experimentales, ya sea en cultivo *in vitro*, en condiciones de hipoxia (22), en cultivos líquidos con alta concentración de lípidos (44) o en modelos de infección en macrófagos o en adipocitos de ratón (61,62). Apoyando lo anterior se observó en un modelo de infección en adipocitos de ratón, un aumento en la expresión de diferentes lipasas, de las cuales *lipY* es la que presentó mayor inducción, además de ser la principal responsable de la degradación de lípidos del hospedero (61). Por otra parte, la inducción de dormancia bajo condiciones de hipoxia muestra también aumento de la expresión de *tgs1* e *icl1*, lo que demuestra la importancia del metabolismo de lípidos en este estado (36)

En otro modelo experimental en macrófagos de ratón los cuales se infectaron con una cepa *whiB3* de *M. tuberculosis* se demostró que la relevancia de este factor transcripcional radica en el mantenimiento de la homeostasis bioenergética en

respuesta a las fuentes de carbono disponibles durante el proceso de infección dentro del macrófago (63).

7.6 La expresión de *whiB3*, *sodA*, *lipY*, *icl1* y *tgs1* se inducen en presencia de agentes oxidantes en cultivos de *M. tuberculosis*

Se pudo demostrar que las condiciones oxidantes de las micobacterias intracelulares inducen *whiB3*, *lipY*, *tgs1* e *icl1*. Lo siguiente en evaluarse fue el efecto de agentes oxidantes sobre el cultivo de las micobacterias en crecimiento activo *in vitro*, para ello se monitoreo en primer lugar la expresión de *whiB3* durante la cinética de crecimiento en medio 7H9c (Anexo 1).

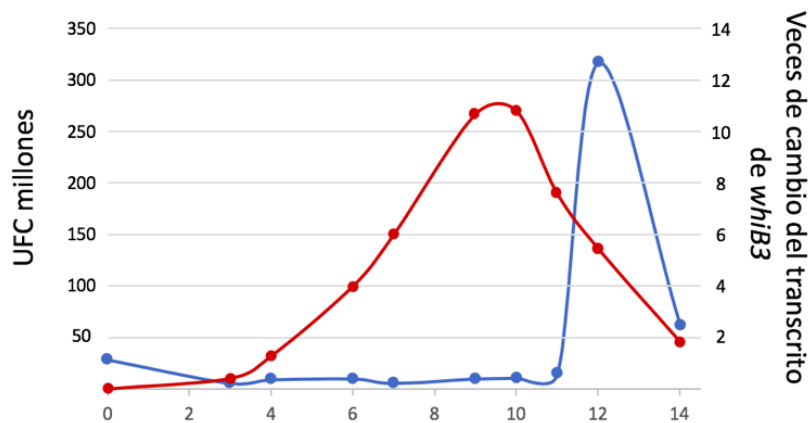


Figura 10. Expresión de *whiB3* durante el crecimiento micobacteriano “*in vitro*”. Se cuantificó a partir de 1 L de cultivo en 7H9c inoculado con 1.0×10^7 - 2.0×10^7 bacterias/mL. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante a 120 rpm y se cuantificó el crecimiento por UFC (línea roja) y se determinó la expresión de *whiB3* (línea azul) cada tercer día, n=2.

En la Figura 10 se observa la curva de la cinética de crecimiento del cultivo micobacteriano (roja) y la expresión de *whiB3* (azul). Se normalizó la expresión de *whiB3* con una muestra de cultivo a las 4 h de incubación después a la inoculación. Se observó que durante el crecimiento activo hay expresión de *whiB3* de 0.2 veces

con respecto al control y aumentó doce veces cuando el cultivo llega a fase estacionaria.

Con base en estos resultados se tomó el día 7 como el tiempo óptimo para evaluar el efecto de los agentes oxidantes sobre la expresión de *whiB3*, éste corresponde a bajos niveles del transcrito que permite observar cambios en la expresión del transcrito y se asocia con una muestra óptima de biomasa para optimizar la extracción de RNA.

En la Figura 11 se ilustra el efecto de H₂O₂ 5 mM y el sistema generador de O₂^{•-} (X-XO) sobre la expresión de *whiB3* y genes del metabolismo en cultivos de micobacterias.

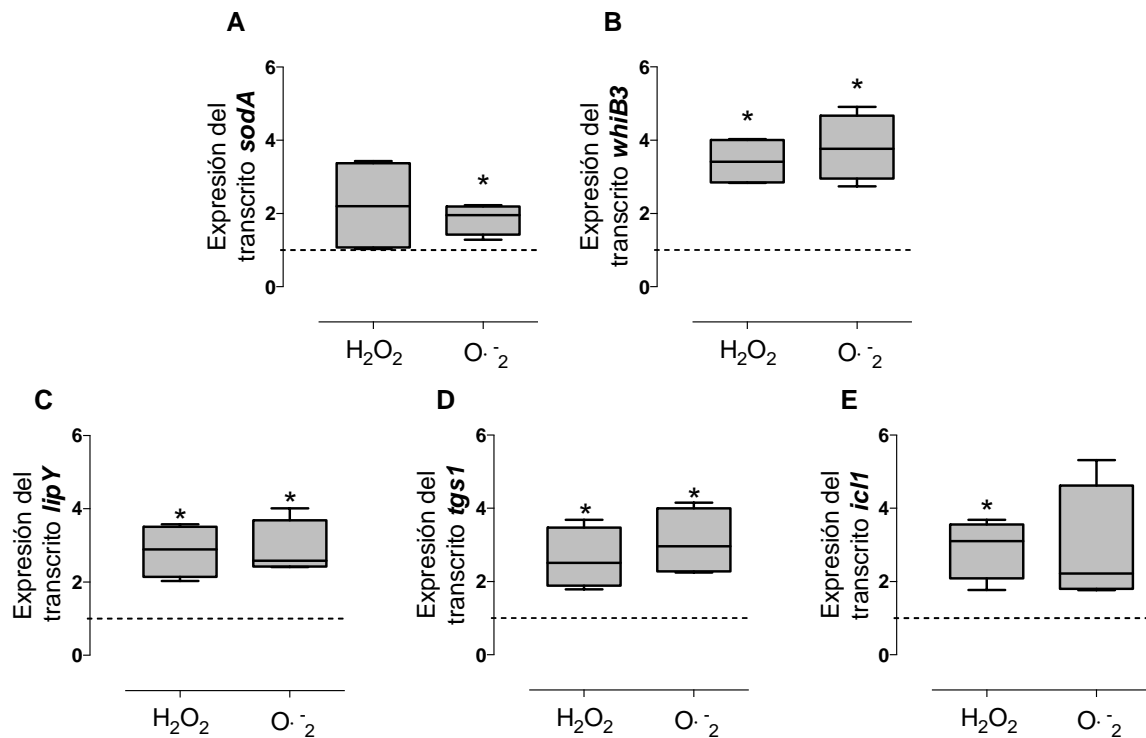


Figura 11. Efecto de agentes oxidantes sobre la expresión de *whiB3*, *sodA*, *lipY*, *tgs1* e *icl1* en micobacterias cultivadas “*in vitro*”. Cultivos en fase exponencial se crecieron en presencia de H₂O₂ 5 mM y el sistema generador de O₂^{•-} (X-XO) durante 2 h. Luego se aisló el RNA total y se determinó la expresión de (A) *sodA*, (B) *whiB3*, (C) *lipY*, (D) *tgs1*, (E) *icl1* por qRT-PCR *p<0.05 diferencia

significativa en comparación con la expresión de las bacterias sin tratamiento (línea punteada), n=4.

Tabla 3. Expresión genética de *M. tuberculosis* cultivada en presencia de agentes oxidantes (H₂O₂ y O₂^{•-})

Condición	<i>whiB3</i>	<i>sodA</i>	<i>lipy</i>	<i>tgs1</i>	<i>icl1</i>
H ₂ O ₂ (5mM)	3.424±	2.217±	2.849±	2.617±	2.911±
	0.3244	0.6366	0.3570	0.4151	0.4069
O ₂ ^{•-}	3.797±	1.858±	2.898±	3.080±	2.881±
	0.4482	0.2071	0.3769	0.4624	0.8290

Los valores son expresados como el número de veces de expresión del mRNA con respecto al control sin estímulo ± desviación estándar.

En la Tabla 3 se presenta el promedio de 4 experimentos independientes en células obtenidas de un cultivo *in vitro* de *M. tuberculosis* tratadas con H₂O₂ y el sistema generador de O₂^{•-} (X-XO). Se observa que la expresión relativa de *whiB3* aumenta bajo estas condiciones, esto sugiere que este gen es capaz de responder a condiciones oxidantes independientemente del microambiente, es decir en el proceso de infección o en cultivo *in vitro*. Se evidenció la generación de estrés oxidante en cultivo micobacteriano, ya que aumentó la expresión de *sodA*. La expresión de *whiB3* se indujo más en presencia de O₂^{•-} en comparación con H₂O₂, esto puede explicarse por la mayor reactividad que presenta un radical libre como el O₂^{•-} sobre un compuesto eléctricamente neutro como lo es el H₂O₂ lo que le confiere mayor capacidad de oxidar los componentes celulares (64).

Por otro lado, se puede observar que la expresión de genes del metabolismo de lípidos (*lipY*, *tgs1* e *icl1*) aumentó al incrementar la concentración de los agentes oxidantes, siendo el $O_2^{\bullet-}$ el mayor inductor de la expresión de los mismos en la mayoría de los casos.

7.7 Modelo propuesto de la inducción de la expresión de *whiB3* y de genes del metabolismo de lípidos.

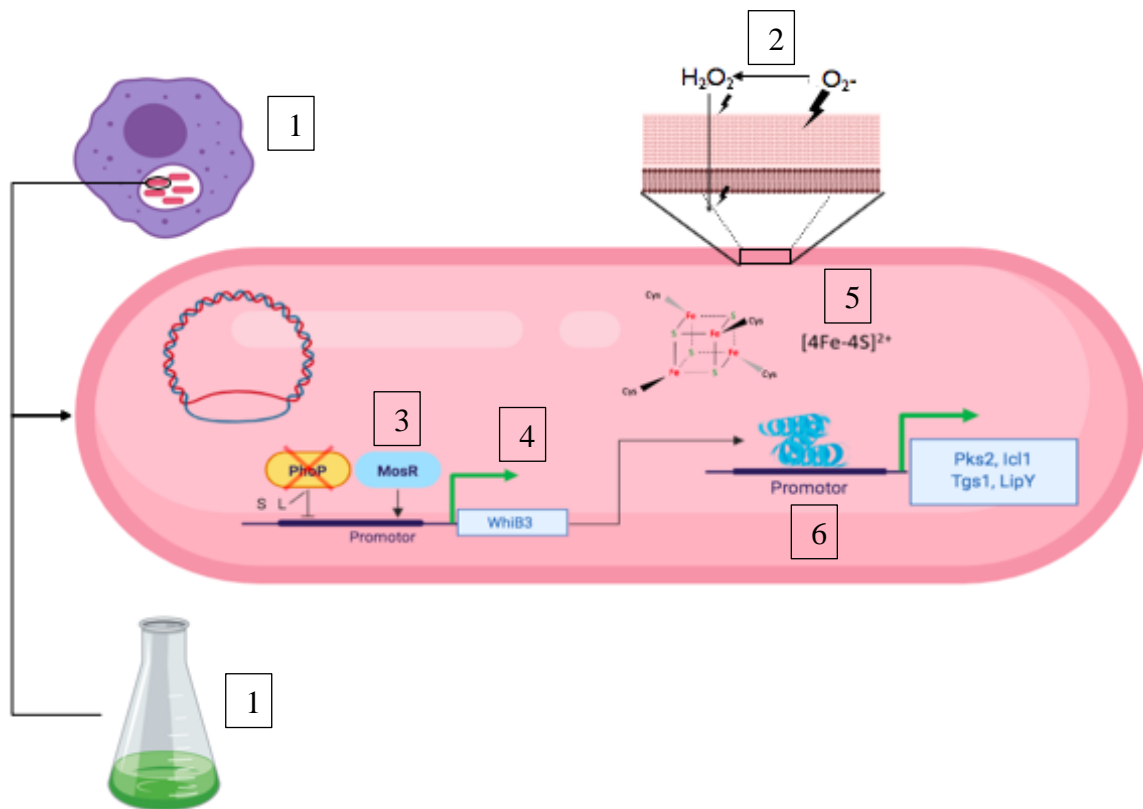


Figura 12. Modelo del efecto de condiciones oxidantes en micobacterias cultivadas en medio 7H9c y en micobacterias intracelulares. Las bacterias de vida libre (1) o intrafagosomales (2) al estar expuestas a agentes oxidantes, son susceptibles a la oxidación, ya sean los lípidos de la pared celular, por medio de $O_2^{\bullet-}$ o por el H_2O_2 , que por ser una molécula eléctricamente neutra puede atravesar membranas y generar daño intracelular. Posiblemente MosR (3) censa el ambiente oxidante, (4) promoviendo la expresión de *whiB3* aumentando la concentración de la proteína, entonces si el microambiente oxidante persiste, se favorece su estado oxidado de WhiB3 promoviendo la formación del cluster de Fe-S (5), promoviendo su unión a los promotores de sus genes blanco (6), generando un cambio metabólico que induce el estado de dormancia.

8. CONCLUSIÓN

8. CONCLUSIÓN

La generación de ERO en macrófagos humanos indujo la expresión de *whiB3*, así como la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos en un período de 2 h, generando en la micobacteria un perfil transcripcional con el que puede acumular lípidos promoviendo la activación del estado de dormancia en las micobacterias.

9. PERSPECTIVAS

- Se evaluará la interacción de WhiB3 recombinante con los promotores de los genes asociados a la dormancia como: isocitrato liasa (*icl1*), Lipasa Y (*lipY*), y triacilglicerol sintetasa (*tgs1*) de *M. tuberculosis* mediante el ensayo de EMSA.
- Generar una delección de *whiB3* y su correspondiente complementación, evaluando la respuesta transcripcional bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo.
- Determinar la secuencia de unión de WhiB3 al DNA.
- Evaluar la expresión de WhiB3 en respuesta a la activación de MosR.

10. REFERENCIAS

10. REFERENCIAS

1. Sharma SK, Mohan A. Tuberculosis: From an incurable scourge to a curable disease - Journey over a millennium. *Indian J Med Res.* 2013;137(3):455–93.
2. Reddington K, O’Grady J, Dorai-Raj S, Maher M, Van Soolingen D, Barry T. Novel multiplex real-time PCR diagnostic assay for identification and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, and *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):651–7.
3. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, Fordham von Reyn C. Tuberculosis. *N Engl J Med.* 2013;368(8):745–55.
4. OMS. Tuberculosis [Internet]. Tuberculosis. 2017 [cited 2018 Nov 10]. Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
5. Raviglione MC, Smith IM. XDR Tuberculosis — Implications for global public health. *N Engl J Med.* 2007;356(7):656–9.
6. Wayne LG, Hayes LG. An *in vitro* model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun.* 1996;64(6):2062–9.
7. Peddireddy V, Doddam SN, Ahmed N. Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis. *Front Immunol.* 2017;8:1–19.
8. Honeyborne I, McHugh TD, Phillips PPJ, Bannoo S, Bateson A, Carroll N, et al. Molecular bacterial load assay, a culture-free biomarker for rapid and accurate quantification of sputum *Mycobacterium tuberculosis* bacillary load during treatment. *J Clin Microbiol.* 2011 Nov;49(11):3905–11.
9. Honeyborne I, Mtafya B, Phillips PPJ, Hoelscher M, Ntinginya EN, Kohlenberg A, et al. The molecular bacterial load assay replaces solid culture for measuring early bactericidal response to antituberculosis treatment. *J Clin Microbiol.* 2014 Aug 1;52(8):3064–7.

-
10. Mishra A, Akhtar S, Jagannath C, Khan A. Pattern recognition receptors and coordinated cellular pathways involved in tuberculosis immunopathogenesis: Emerging concepts and perspectives. *Mol Immunol*. 2017;87:240–8.
 11. Uribe-Quero E, Rosales C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Front Immunol*. 2017;8(OCT):1–23.
 12. Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(9):5437–42.
 13. Mao Y, Finnemann SC. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Small GTPases*. 2015;6(2):89–99.
 14. Caron E. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different *Rho* GTPases. *Science* (80-). 1998;282(5394):1717–21.
 15. Weigert A, von Knethen A, Fuhrmann D, Dehne N, Brüne B. Redox-signals and macrophage biology. *Mol Aspects Med*. 2018;63:70–87.
 16. Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PWM, Wingler K, Schmidt HHHW. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: Selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(5):406–27.
 17. Kim JY, Park J, Lee JE, Yenari MA. NOX Inhibitors - A promising avenue for ischemic stroke. *Exp Neurobiol*. 2017;26(4):195–205.
 18. Rustad TR, Sherrid AM, Minch KJ, Sherman DR. Hypoxia: A window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell Microbiol*. 2009;11(8):1151–9.
 19. Park H-D, Guinn KM, Harrell MI, Liao R, Voskuil MI, Tompa M, et al. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2003 May;48(3):833–43.
 20. Lipworth S, Hammond RJH, Baron VO, Hu Y, Coates A, Gillespie SH. Defining dormancy in mycobacterial disease. *Tuberculosis*. 2016;99:131–42.
 21. Trivedi A, Singh N, Bhat SA, Gupta P, Kumar A. Redox biology of tuberculosis pathogenesis. In: *Advances in microbial physiology*. 2012.
 22. Deb C, Lee C-M, Dubey VS, Daniel J, Abomoelak B, Sirakova TD, et al. A novel in vitro multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis*

-
- generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. PLoS One. 2009;4(6):e6077.
23. Mulder NJ, Zappe H, Steyn LM. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* ... [Tuber Lung Dis Characterization of a Mycobacterium tuberculosis homologue of the Streptomyces coelicolor *whiB* gene . Lung. 1999;79:10707258.
 24. Bush MJ. The actinobacterial WhiB-like (Wbl) family of transcription factors. Mol Microbiol. 2018 Dec;110(5):663–76.
 25. Larsson C, Luna B, Ammerman NC, Maiga M, Agarwal N, Bishai WR. Gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* putative transcription factors whib1-7 in redox environments. PLoS One. 2012; 7 (7):1-7
 26. Saini V, Farhana A, Steyn AJC. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3: A Novel iron–sulfur cluster protein that regulates redox homeostasis and virulence. Antioxid Redox Signal. 2012;16(7):687–97.
 27. Feng L, Chen S, Hu Y. PhoPR positively regulates *whiB3* expression in response to low pH in pathogenic mycobacteria. J Bacteriol. 2018;200(8):1–11.
 28. Lee JS, Krause R, Schreiber J, Mollenkopf HJ, Kowall J, Stein R, et al. Mutation in the transcriptional regulator PhoP contributes to avirulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain. Cell Host Microbe. 2008;3(2):97–103.
 29. Mehta M, Rajmani RS, Singh A. Mycobacterium tuberculosis WhiB3 responds to vacuolar pH-induced changes in mycothiol redox potential to modulate phagosomal maturation and virulence. J Biol Chem. 2016;
 30. Singh A, Guidry L, Narasimhulu K V., Mai D, Trombley J, Redding KE, et al. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O₂ and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. Proc Natl Acad Sci. 2007;104(28):11562–7.
 31. Banaiee N, Jacobs WR, Ernst JD. Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* whiB3 in the mouse lung and macrophages. Infect Immun.

-
- 2006;74(11):6449–57.
32. Rodriguez JG, Hernandez AC, Helguera-Repetto C, Ayala DA, Guadarrama-Medina R, Anzola JM, et al. Global adaptation to a lipid environment triggers the dormancy-related phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio*. 2014;5(3):e01125-14.
 33. Nambi S, Long JE, Mishra BB, Baker R, Kenan C, Olive AJ, et al. Reveals coordination between radical detoxification systems. 2016;17(6):829–37.
 34. Mishra A. Proteomic analysis of hydroxyl radical-induced resuscitation of hypoxia-induced dormant mycobacterial cells. *Int J Mycobacteriology*. 2018;7(1):7.
 35. Harth G, Horwitz MA. Export of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* superoxide dismutase is dependent upon both information in the protein and mycobacterial export machinery: A model for studying export of leaderless proteins by pathogenic mycobacteria. *J Biol Chem*. 1999;274(7):4281–92.
 36. Iona E, Pardini M, Mustazzolu A, Piccaro G, Nisini R, Fattorini L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression at different stages of hypoxia-induced dormancy and upon resuscitation. *J Microbiol*. 2016;54(8):565–72.
 37. Kieser KJ, Rubin EJ. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Aug 7;12(8):550–62.
 38. Daniel J, Maamar H, Deb C, Sirakova TD, Kolattukudy PE. *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathog*. 2011;7(6).
 39. Armstrong RM, Zahrt TC. Mycobacteria infection and lipid droplets: Host and pathogen stealing, sharing and storing fat. In: *Tuberculosis host-pathogen interactions*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 201–29.
 40. Côtes K, Bakala N’Goma JC, Dhouib R, Douchet I, Maurin D, Carrière F, et al. Lipolytic enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;78(5):741–9.
 41. Low KL, Rao PSS, Shui G, Bendt AK, Pethe K, Dick T, et al. Triacylglycerol

-
- utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. *J Bacteriol.* 2009;191(16):5037–43.
42. Tuberculist. LipY [Internet]. 2018 [cited 2018 May 24]. Available from: <http://svitsrv8.epfl.ch/tuberculist/quicksearch.php?gene+name=LipY&submit=Search>.
 43. Garrett CK, Broadwell LJ, Hayne CK, Neher SB. Modulation of the activity of mycobacterium tuberculosis LipY by its PE domain. *PLoS One.* 2015;10(8):1–14.
 44. Rodriguez JG, Hernandez AC, Helguera-Repetto C, Ayala DA, Guadarrama-Medina R, Anzola JM, et al. Global adaptation to a lipid environment triggers the dormancy-related phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio.* 2014;5(3):e01125-14.
 45. Sivaramakrishnan S, De Montellano PRO. The DosS-DosT/DosR mycobacterial sensor system. *Biosensors.* 2013;3(3):259–82.
 46. Sirakova TD. Identification of a diacylglycerol acyltransferase gene involved in accumulation of triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis* under stress. *Microbiology.* 2006;152(9):2717–25.
 47. Abomoelak B, Hoye EA, Chi J, Marcus SA, Laval F, Bannantine JP, et al. mosR, a novel transcriptional regulator of hypoxia and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 2009;191(19):5941–52.
 48. Dunn MF, Ramírez-Trujillo JA, Hernández-Lucas I. Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology.* 2009;155(10):3166–75.
 49. Ahn S, Jung J, Jang I-A, Madsen EL, Park W. Role of Glyoxylate Shunt in Oxidative Stress Response. *J Biol Chem.* 2016;291(22):11928–38.
 50. Munoz-Elias EJ, McKinney JD. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell Microbiol.* 2006;8(1):10–22.
 51. Masiewicz P, Brzostek A, Wolański M, Dziadek J, Zakrzewska-Czerwińska J. A novel role of the PrpR as a transcription factor involved in the regulation of

-
- methylcitrate pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One. 2012;7(8).
52. Bi J, Wang Y, Yu H, Qian X, Wang H, Liu J, et al. Modulation of central carbon metabolism by acetylation of isocitrate lyase in *Mycobacterium tuberculosis*. Sci Rep. 2017;7(February):1–11.
 53. Muñoz-Elías EJ, McKinney JD. Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. Nat Med. 2005 Jun 15;11(6):638–44.
 54. Molle V, Palframan WJ, Findlay KC, Buttner MJ. WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Bacteriol. 2000 Mar;182(5):1286–95.
 55. Crack JC, den Hengst CD, Jakimowicz P, Subramanian S, Johnson MK, Buttner MJ, et al. Characterization of [4Fe-4S]-containing and cluster-free forms of *Streptomyces* WhiD. Biochemistry. 2009;48(51):12252–64.
 56. Brugarolas P, Movahedzadeh F, Wang Y, Zhang N, Bartek IL, Gao YN, et al. The oxidation-sensing regulator (MosR) Is a new redox-dependent transcription factor in *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem. 2012;287(45):37703–12.
 57. Greenberger JS, Newburger PE, Sakakeeny M. Phorbol myristate acetate stimulates macrophage differentiation and replication and alters granulopoiesis and leukemogenesis in long-term bone marrow cultures. Blood. 1980;56(3):368 LP – 379.
 58. Beaumel S, Picciocchi A, Debeurme F, Vivès C, Hesse A-M, Ferro M, et al. Down-regulation of NOX2 activity in phagocytes mediated by ATM-kinase dependent phosphorylation. Free Radic Biol Med. 2017;113:1–15.
 59. Zhu Y, Fan S, Wang N, Chen X, Yang Y, Lu Y, et al. NADPH oxidase 2 inhibitor diphenyleneiodonium enhances ROS-independent bacterial phagocytosis in murine macrophages via activation of the calcium-mediated p38 MAPK signaling pathway. Am J Transl Res. 2017;9(7):3422–32.
 60. Kim SK, Rho SJ, Kim SH, Kim SY, Song SH, Yoo JY, et al. Protective effects of diphenyleneiodonium, an NADPH oxidase inhibitor, on lipopolysaccharide-

-
- induced acute lung injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2019;46(2):153–62.
61. Rastogi S, Agarwal P, Krishnan MY. Use of an adipocyte model to study the transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to store and degrade host fat. *Int J Mycobacteriology*. 2016;5(1):92–8.
62. Cumming BM, Rahman MA, Lamprecht DA, Rohde KH, Saini V, Adamson JH, et al. *Mycobacterium tuberculosis* arrests host cycle at the G1/S transition to establish long term infection. *PLoS Pathog*. 2017;13(5):1–29.
63. Cumming BM, Rahman MA, Lamprecht DA, Rohde KH, Saini V, Adamson JH, et al. *Mycobacterium tuberculosis* arrests host cycle at the G 1 /S transition to establish long term infection. *PLoS Pathog*. 2017;13(5):1–29.
64. Brieger K, Schiavone S, Miller J, Krause K. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012 Aug 17;
65. Wheelwright M, Kim EW, Inkeles MS, De Leon A, Pellegrini M, Krutzik SR, et al. All- Trans Retinoic Acid–Triggered Antimicrobial Activity against *Mycobacterium tuberculosis* Is Dependent on NPC2. *J Immunol*. 2014;192(5):2280–90.
66. Hille R, Hall J, Basu P. The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev*. 2014;114(7):3963–4038.

ANEXO 1 MEDIOS DE CULTIVO Y AMORTIGUADORES

MEDIOS DE CULTIVO MYCOBACTERIANO

Medio líquido 7H9

Para 1000 mL

Componente	Cantidad
<i>Middlebrook7H9</i>	4.7 g
<i>Glicerol al 100%</i>	5 mL
<i>Agua</i>	895 mL
<i>ADC</i>	100 mL

Agar 7H10

Para 560 mL, 8 mL por placa

Componente	Cantidad
<i>Agar 7H10</i>	11.4 g
<i>Asparagina</i>	2.5 g
<i>Glicerol al 100%</i>	6 mL
<i>Agua</i>	494 mL
<i>OADC</i>	60 mL

MEDIO PARA MONOCITOS

Componente	Cantidad/Concentración
<i>Glutamina</i>	2 mM
<i>Suero humano inactivado por calor o suero humano total</i>	10% v/v
<i>Medio RPMI Lonza</i>	c.b.p. 1 L

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE MILTENYI

Para la separación de monocitos de sangre periférica por selección positiva.

Reactivo	Cantidad
Solución amortiguadora de fosfatos (Lonza)	cbp 500 mL
Albúmina sérica bovina	2.5 g
EDTA (0.5 M pH=8)	2 mL

ANEXO 2 SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS EMPLEADOS PARA EL qRT-PCR

<i>Gen</i>	Secuencia de Oligonucleotidos	Referencia
<i>whiB3</i>	F: 5' tggactcatcgatgttcttcc 3' R: 5' tagggctcaccgacctctaa 3'	Este trabajo
rRNA 16s	F: 5' ggtgcgagcgttgccgg 3' R: 5' cgcccgcacgctcacagtta 3'	Wheelwright M y col. 2014 (65)
Lipasa Y (<i>lipY</i>)	F: 5' gtattagccgctgccgagga 3' R: 5' gataccgctggcgaattcactct 3'	Cumming y col. 2017 (63)
Triacilglicerol sintetasa (<i>tgs1</i>)	F: 5' aacgaagaccagttattcgagc 3' R: 5' ctcatactttcatcgagagcc 3'	
Isocitrato liasa (<i>icl1</i>)	F: 5' cggatcaacaacgcactgca 3' R: 5' ttctgcagctcgtagacgtt 3'	
Superóxido dismutasa (<i>sodA</i>)	F: 5' acacctgcccagacctgga 3' R: 5' cgccctttacgtaggtggc 3'	Este trabajo

ANEXO 3 PRODUCCIÓN DE $O_2^{\bullet-}$ *in vitro*.

REACTIVOS

-Solución de xantina oxidasa en amortiguador de fosfatos (KH_2PO_4/K_2HPO_4) 50 mM, pH 7.4.

-Xantina 5 mM en amortiguador de fosfatos pH 8.5.

-Medio RPMI complementado (glutamina 2 mM y suero humano descomplementado 10% v/v).

PROCEDIMIENTO

La producción de $O_2^{\bullet-}$ se midió por medio de la extinción de la xantina en la reacción, para ello se preparó una curva estándar de Xantina con diluciones seriadas en medio RPMI, la curva se leyó a 269 nm en cubeta de cuarzo.

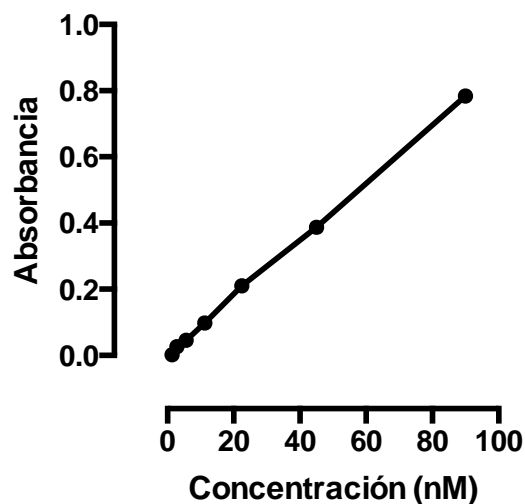


Figura 14. Curva estándar de la absorbancia de la Xantina. Se determinó la absorbancia a 269 nm en celdas de cuarzo de diluciones seriadas 1:2 partiendo de la concentración de xantina empleada en los cultivos celulares.

Se realizó una regresión lineal obteniendo la ecuación de la recta con un coeficiente de correlación de 0.9993. Posteriormente se preparó la mezcla de reacción en medio RPMI con suero humano en la cubeta, registrando el cambio en la absorbancia leída a 269 nm, cada 30 s.

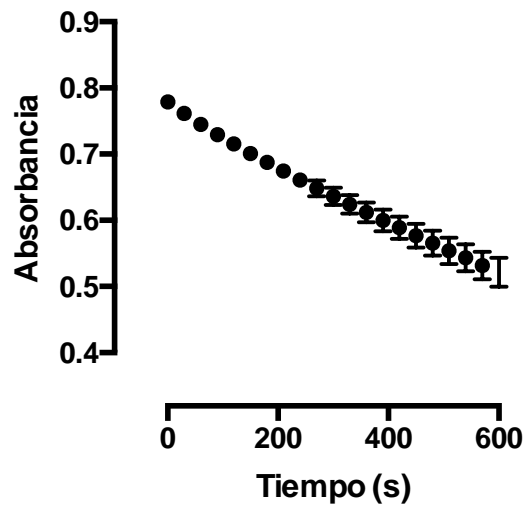


Figura 15. El consumo de xantina por actividad de la xantina oxidasa se evaluó por espectrofotometría en celda de cuarzo, registrando las absorbancias a 269 nm, n=4.

El consumo de la xantina se determinó por comparación con la curva estándar de la Figura 14. Con base en las absorbancias registradas se determinó que después de 10 min se consumió aproximadamente el 30 % de xantina colocada en la reacción lo que de acuerdo con la estequiometría de 2:1 moles de $O_2^{\bullet-}$ a partir de 1 mol de xantina (66), esto corresponde en promedio a 6 pmol de $O_2^{\bullet-}$.