



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

“SALVADOR ZUBIRÁN”

**“CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CEPAS H37Rv, H37Ra,
SUDA27 y MDR DE *Mycobacterium tuberculosis*”**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

PRESENTA

Q.B.P. LUIS ARMANDO SARIAS CUETO

TUTOR

**BIOL. EMECB JUAN CARLOS LEÓN CONTRERAS
ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo está dedicado a la maestra Ernestina Ubaldo Pérez por su enorme labor, trayectoria y aportes a la microscopía electrónica en México.

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	ii
ABREVIATURAS Y SIGLAS	iii
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
Antecedentes	7
Patogénesis	8
Estructura y ultraestructura de <i>M. tuberculosis</i>	11
Pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	13
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
IV. JUSTIFICACIÓN	20
V. HIPÓTESIS	21
VI. OBJETIVOS	22
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	23
VIII. RESULTADOS	25
X. DISCUSIÓN	32
XI. CONCLUSIONES	34
XIII. APÉNDICE	35
XII. REFERENCIAS	37

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras	Página
Fig. 1. Tasa de incidencia estimada de la tuberculosis.	4
Fig. 2. Principales linajes de la especie <i>M. tuberculosis</i> .	7
Fig. 3. Lesiones anatomopatológicas de la tuberculosis	10
Fig. 4. Tinción ZN para búsqueda de BAAR en muestra de esputo	11
Fig. 5. Micrografía electrónica de <i>M. tuberculosis</i> en SEM	12
Fig. 6. Envoltura de <i>M. tuberculosis</i>	14
Fig. 7. Estructura de la pared celular de las micobacterias	15
Fig. 8. Micrografías de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra	28
Fig. 9. Micrografías electrónicas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	29
Fig. 10. Micrografías electrónicas de <i>M. tuberculosis</i> Suda27	30
Fig. 11. Micrografías electrónicas de <i>M. tuberculosis</i> MDR	31
Tablas y gráficas	
Tabla 1. Principales linajes de la especie <i>M. tuberculosis</i>	6
Tabla 2. Características ultraestructurales generales de las cepas estudiadas	26
Tabla 3. Grosor (T) de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	26
Gráfico 1. Grosor de las paredes celulares	27

ABREVIATURAS Y SIGLAS

- AFM:** Atomic Force Microscopy (Microscopía de Fuerza Atómica)
- AG:** Arabinogalactano
- ANOVA:** Analysis of variance (análisis de varianza)
- BAAR:** Bacilo Ácido-Alcohol Resistente
- CAS:** Linaje Centroasiático o Dehli
- Crtl:** Control
- DAP:** Ácido-L-alanil-D-*iso*-glutaminil-*meso*-diaminopimélico
- EAI:** Linaje Indoafricano del Este
- FW:** Peso formula, del inglés Formula Weight
- LAM:** Linaje Latinoamericano-Mediterráneo
- MA:** Ácidos micólicos
- MDR:** Multidrogorresistente
- MTC:** Complejo *Mycobacterium tuberculosis*
- NAG:** N-acetilglucosamina
- NAM:** Ácido N-acetilmurámico
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- PG:** Peptidoglucano
- SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
- SEM:** Scanning Electron Microscopy (Microscopía Electrónica de Barrido)
- TB:** Tuberculosis (abreviatura del inglés)
- TEM:** Transmission Electron Microscopy (Microscopía Electrónica de Transmisión)
- XDR:** Extremadamente drogorresistente
- VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana

I. RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa considerada como emergencia mundial. La principal vía de contagio es aérea, afecta principalmente pulmones y también puede afectar otros órganos. Es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Se ha evidenciado su diversidad genética que se traduce también en repercusiones clínicas y diagnósticas. Una de las características mejor estudiadas de esta bacteria es la composición de su pared celular que también confiere el principal factor de virulencia. Dentro de la misma especie existen linajes que presentan diferentes características clínicas una vez que infecta al hospedero y es probable que existan algunas características morfológicas aun no descritas. Este estudio pretende encontrar las principales diferencias ultraestructurales de cuatro cepas de distinto linaje de la misma especie de *M. tuberculosis*. Mediante microscopia electrónica de transmisión (MET) se procesaron cuatro cepas de distinto linaje de la misma especie de *M. tuberculosis* con las siguientes características, una cepa virulenta estándar de laboratorio utilizada como control (H37Rv), una cepa hipervirulenta (Suda27), una cepa atenuada (H37Ra) y una cepa multidrogoresistente (MDR). Las cepas se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos a pH 7.2 al 0.15 M, se post-fijaron con tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1%, fueron deshidratadas en alcohol etílico en concentraciones graduales e incluidas en resina *Spurr*. Se realizaron cortes ultrafinos de 70 nm de grosor los cuales fueron recogidos en rejillas de cobre. El contraste se realizó con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo de Reynolds. Se midió el grosor de la pared bacteriana de cortes transversales (n=30) con el software ImageJ 1.51j y se analizaron los resultados mediante la prueba estadística ANOVA con el software Graphpad Prisma 4.0.

De las cuatro bacterias estudiadas la pared celular de la cepa MDR presentó un mayor grosor (18.5 nm \pm 3.9), contrastando con este resultado la cepa Suda27 presentó el menor grosor (6.7 nm \pm 2.0), se encontró diferencia estadística

significativa entre ambas bacterias frente a la cepa control H37Rv ($p \leq 0.05$). Por otro lado, se encontraron algunas estructuras en el citoplasma aun no descritas. Algunas cepas presentan vacuolas electrón-lucidas de contenido desconocido y gránulos de composición desconocida. La pared celular juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad y también en el proceso de resistencia bacteriana. Se desconoce el mecanismo exacto por el cual *M. tuberculosis* cambia la conformación no solo de su pared, si no de sus estructuras citoplasmáticas. La ultraestructura de esta bacteria es variable entre cada cepa por lo que este trabajo sugiere existan también variaciones intraindividuales dentro de la misma especie bacteriana.

II. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa que afecta principalmente a los pulmones pero también puede afectar otros órganos lo que se conoce como TB extrapulmonar (hígado, bazo, médula ósea, entre otros) y es causada por el bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR) *Mycobacterium tuberculosis*, que fue descrito por primera vez en 1882 por el médico alemán Robert Koch¹. Esta bacteria está integrada en el complejo *M. tuberculosis* (MTC) con otras diez especies las cuales son: *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae*, *M. mungi*, *M. dassie*, and *M. oryx*.^{2,14}

El bacilo es un patógeno intracelular obligado y desencadena respuesta inmune celular, es aerobio pues tiene preferencia por tejidos bien oxigenados. Afecta a los animales domésticos y salvajes, siendo los humanos el hospedador preferente.³

M. tuberculosis se divide lentamente cada 18-20 h, en comparación a los 20 min de la mayoría de las bacterias.³ El bacilo se transmite de una persona a otra a través de gotículas generadas en el aparato respiratorio de 1 a 5 µm de diámetro (gotitas de Flügge) de pacientes con enfermedad pulmonar activa. La infección por *M. tuberculosis* suele ser asintomática en personas sanas, dado que su sistema inmunitario actúa formando una barrera alrededor de la bacteria. Los síntomas de la tuberculosis pulmonar activa son tos (hemoptisis en casos avanzados), dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna. La tuberculosis se puede tratar mediante la administración de antibióticos de alto espectro por tiempos prolongados que van de cuatro a seis meses.⁴ La tuberculosis es una de las diez principales causas de mortalidad en el mundo. En 2016, 10,4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,7 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos, 0,4 millones de personas con VIH). Más del 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países de ingresos bajos y medianos.⁵

La tuberculosis es una de las causas principales de defunción en las personas VIH-SIDA. En 2016, el 40% de las muertes asociadas al VIH se debieron a la tuberculosis. Se estima que en 2016 enfermaron de tuberculosis un millón de niños y que 250 000 niños murieron debido a esta causa (incluidos los niños con tuberculosis asociada al VIH). Más del 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países en vías de desarrollo (Fig.1). Se estima que en 2016 desarrollaron tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR) unas 490 000 personas a nivel mundial.⁵

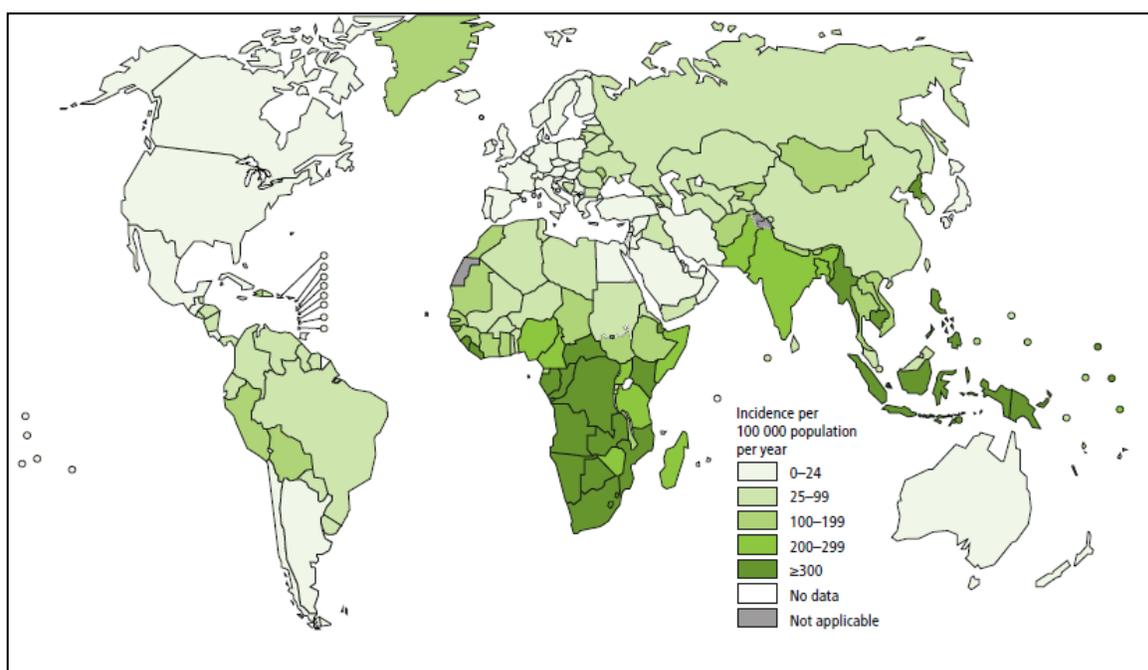


Figura 1. Tasa de incidencia estimada de la tuberculosis. Tomado de Global Tuberculosis Report, OMS, 2017.⁶

En 2016 se presentó el mayor número de nuevos casos de tuberculosis que fueron registrados en Asia a lo que correspondió el 45%, seguida de África, con un 25%. En 2016 alrededor del 87% de nuevos casos de tuberculosis se registraron en los 30 países considerados de alta carga de morbilidad por esta enfermedad. Siete de ellos acaparan el 64% de los nuevos casos de tuberculosis: la India, Indonesia, China, Filipinas, el Pakistán, Nigeria y Sudáfrica.^{5,6} Son muchos los países que siguen dependiendo del diagnóstico de la tuberculosis por medio de la

baciloscopía de esputo, una prueba que viene utilizándose desde hace mucho tiempo. Este método consiste en el examen microscópico de muestras de esputo para detectar la presencia de la bacteria de la tuberculosis. Sin embargo, la microscopía de luz sólo detecta la mitad de los casos de tuberculosis y es incapaz de determinar si hay farmacorresistencia. Actualmente las pruebas diagnósticas para TB incluyen:

Microscopia de frotis de esputo (BAAR). Fue desarrollada hace más de cien años. Las muestras de esputo son examinadas bajo el microscopio compuesto para observar si la bacteria está presente. En la actualidad en los casos definitivos, la OMS recomienda que para diagnosticar tuberculosis pulmonar, un resultado debe ser positivo para este examen así como también las pruebas moleculares rápidas. La única prueba rápida para diagnóstico de TB recomendada actualmente por la OMS es la Xpert®.

El ensayo Xpert® MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale USA). Fue inicialmente recomendado en 2010 para el diagnóstico de TB pulmonar en adultos. Desde 2013, también se ha recomendado para niños y formas específicas de TB extrapulmonar. Esta prueba ha sido mucho sensible y específica que la microscopía.

Los métodos de cultivo. Son actuales estándares de referencia pero requieren mucho más tiempo de desarrollo en el laboratorio y puede llevar más de 12 semanas para arrojar el resultado.⁶ El cultivo primario de *M. tuberculosis* en medio Löwestein-Jensen y el medio Coletsos usualmente resulta en colonias características con textura rugosa y el aspecto típico de cordón bajo el microscopio óptico. Estas características permiten a los microbiólogos distinguir *M. tuberculosis* de otras especies de micobacterias. Esto es particularmente importante en países en desarrollo, donde las técnicas bioquímicas o moleculares no están disponibles.⁷

Biopsias. El hallazgo en la histología de la inflamación granulomatosa con necrosis caseosa se considera diagnóstico suficiente para iniciar el tratamiento, aunque la confirmación microbiológica es el diagnóstico definitivo y permite, además, comprobar la sensibilidad a los fármacos.⁸

En la práctica diagnóstica los integrantes del MTC son difícilmente diferenciables entre sí por sus características fenotípicas, por lo que se identifican como MTC sin diferenciar, aunque en más del 95% se trata de *M. tuberculosis*.³

En 1998 se publicó el genoma completo de *M. tuberculosis* y se ha evidenciado su diversidad genética con siete linajes (Tabla 1), predominando cada uno de ellos en distintos lugares del mundo (Fig. 2). Esta diversidad se traduciría también en características fenotípicas, con repercusiones clínicas y diagnósticas. Se han observado diferencias entre linajes en el tropismo por localizaciones y en la virulencia. Las cepas de las familias genéticas Beijing y las predominantes en Asia, se asocian a mayor transmisión y virulencia.⁹

Tabla 1. Principales linajes de la especie *M. tuberculosis*

1. Linaje Indo africano del Este (EAI).
 2. Linaje Beijing
 3. Linaje centroasiático o Dehli (CAS)
 4. Familia Harlem
 5. Familia Latinoamericana y Mediterránea (LAM)
 6. Familia X
 7. Familias T y otras
-

Tomado y modificado de Velayati & Farnia, 2017.¹⁴

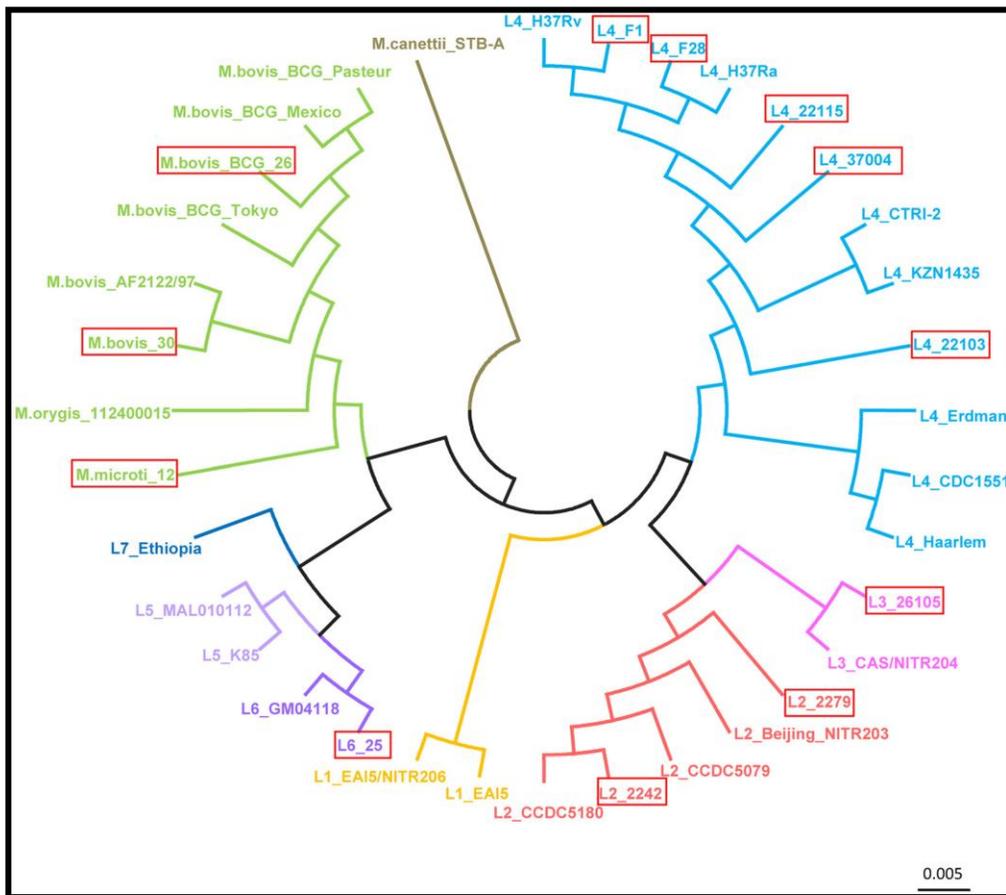


Figura 2. Árbol filogenético de las cepas del complejo *M. tuberculosis*. El color azul indica las cepas que pertenecen al linaje LAM, rosa las cepas del linaje EAI, rojo a aquellas cepas pertenecientes al linaje Beijing, naranja al linaje Indo-Océanico, púrpura a las cepas del linaje del Oeste africano las cuales son dos. Azul marino al linaje Etiopia y verde son las cepas adaptadas a especies animales. Tomado y modificado de Zhu *et al.* 2016.⁴²

Antecedentes

La forma clásica del bacilo de la tuberculosis es de bastón delgado que se observa en los frotis teñidos. Tiene un citoplasma liso y homogéneo en cortes claros y bordes definidos. Las primeras imágenes de microscopio electrónico del bacilo de la tuberculosis fueron obtenidas en 1939 en los laboratorios del Technische Hochschule, Berlín. Von Borries y Ernst Ruska en 1939 publicaron micrografías electrónicas de la cepa aviar de micobacterias a 26,000X. El citoplasma de esos

bacilos contenía cuerpos oscuros de distintos tamaños. Más tarde, Lembke y Ruska en 1940, cultivaron el bacilo en medio Petraghani y observaron cerca de ocho cuerpos grandes en el citoplasma del bacilo. Rosenblatt, Fullam y Gessler en 1942 en sus estudios de *M. tuberculosis* aportaron nuevos datos de la estructura interna del bacilo. El tamaño del bacilo presentó variación, el tamaño de la cepa H37 subcultivada en la Universidad de Columbia mostró variaciones de 4.3 μm x 0.4 μm a 1.0 μm x 0.2 μm . La estructura interna presenta masas electrón-densas dentro del citoplasma granular. La densidad del citoplasma contenía mucho gránulos y vacuolas de diferentes tamaños. Más tarde se confirmó que el citoplasma de las bacterias jóvenes es denso, contiene vacuolas y cuerpos muy electrón-densos.⁵

Patogénesis

La tuberculosis es la causa más frecuente de granulomas y esta a su vez es la característica patológica más sobresaliente, se desarrollan por la respuesta inmune del hospedador y por las bacterias en los pulmones de los pacientes infectados.¹⁰ Un granuloma es un agregado compacto de macrófagos maduros, estos se caracterizan por el incremento del tamaño del citoplasma (por el gran número de organelos) y la membrana plasmática plegada. Se cree que esta disposición lo hace más fagocítico y microbicida. Los macrófagos del granuloma pueden sufrir cambios adicionales: se pueden fusionar en células multinucleadas gigantes o diferenciarse en células espumosas, que se caracterizan por la acumulación de lípidos. También pueden transformarse a células epitelioides que tienen interdigitaciones estrechas en la membrana celular asemejando un arreglo de cierre unida a células adyacentes.

Otra característica de la tuberculosis son las regiones de necrosis dentro de los propios granulomas, la muerte de las células participantes, incluyendo macrófagos. Las áreas necróticas son conocidas como *caseum* o caseosas cuando son vistas con técnicas de histopatología convencional. Otros tipos de células del granuloma son los neutrófilos, células dendríticas, linfocitos T y B,

células NK y fibroblastos. Se piensa que las células epiteliales que rodean el granuloma también participan en su formación.¹¹

El riesgo de desarrollar TB activa es mayor en pacientes con inmunidad celular alterada. La infección inicia cuando el bacilo alcanza los alvéolos pulmonares, lo invade y posteriormente es fagocitado por los macrófagos alveolares, donde se replica intracelularmente. El macrófago interactúa con los linfocitos T, lo que resulta en la diferenciación de los macrófagos en histiocitos epitelioides. El bacilo no siempre es eliminado y permanece inactivo, causando una infección latente.

El sitio de infección primario es el pulmón, en donde existe la lesión conocida como foco de Ghon que está constituido por la lesión del parénquima pulmonar y en ocasiones crece con la progresión de la enfermedad y se resuelve dejando una cicatriz visible que puede ser densa y presentar focos de calcificación.

Durante el estadio temprano de la infección, los microorganismos se diseminan por la vía linfática a la región hiliar y mediastinal, y por vía hematológica a sitios más distantes. La TB en individuos inmunocomprometidos se desarrolla clínicamente en enfermedad activa un año después de la infección, lo que se denomina como infección progresiva primaria. La TB primaria se ha considerado en pacientes que desarrollan la enfermedad después de una exposición inicial y postprimaria o reactivación en aquellos que la desarrollan de un foco previo de TB. El paciente con inmunodeficiencia grave tiende a desarrollar TB primaria, mientras que el paciente inmunocompetente tiende a la forma de reactivación.¹²

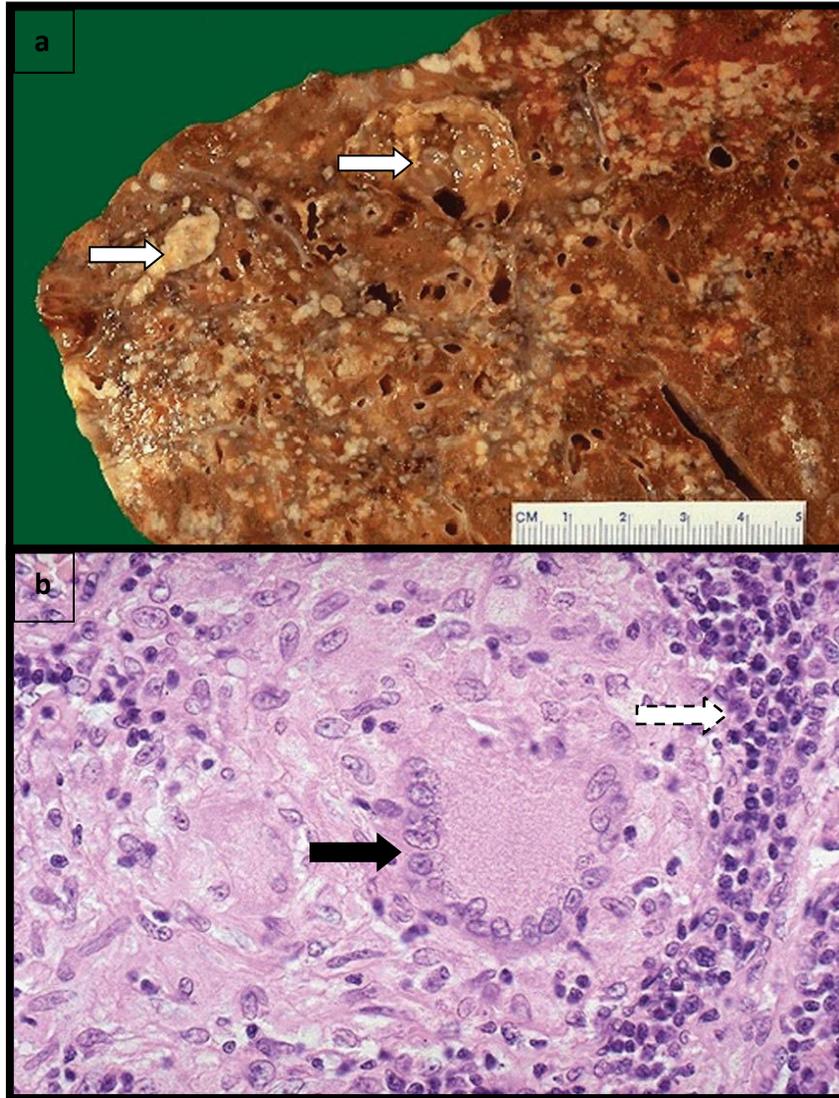


Figura 3. Lesiones anatomopatológicas de la tuberculosis pulmonar. a) Macroscópicamente los nódulos de mayor tamaño pueden tener necrosis caseosa central, que incluye elementos de necrosis de licuación y de coagulación (flechas). Este patrón de afectación de lóbulos superiores es muy característico de la tuberculosis secundaria (reactivación o reinfección), que clásicamente se ve en los adultos. **b)** Corte histológico de granuloma tuberculoso 400X. La respuesta inflamatoria granulomatosa a la tuberculosis incluye principalmente células epitelioides (flecha negra), linfocitos y fibroblastos (flecha discontinua). Los macrófagos epitelioides del granuloma son alargados y tienen núcleos pálidos y citoplasmas rosados. Tomado de Robbins & Cotran, 2007 ⁴⁰.

Estructura y ultraestructura *M. tuberculosis*

M. tuberculosis generalmente tiene una morfología colonial distintiva cuando se cultiva en medios sólidos, pero la dificultad surge cuando se dispone solo de microscopia de luz. Esta bacteria exhibe pleomorfismo (capacidad de cambiar de forma) en ciertas circunstancias y puede existir, inclusive sin pared celular que son llamadas formas L, que predominan y son cruciales para la supervivencia de micobacterias, cuya ausencia de pared celular escapa a la destrucción por el sistema inmune del hospedador.¹³

Bajo el microscopio de luz, el bacilo de la tuberculosis aparece típicamente recto o ligeramente curvado. De acuerdo con las condiciones de crecimiento y edad del cultivo, el bacilo puede variar en forma y tamaño, desde cocobacilo a bastones largos. Se ha reportado que el bacilo puede llegar a medir de 1 a 10 μm de longitud (usualmente 3 a 5 μm) y 0.2 a 0.6 μm de ancho (Fig. 4 y 5).

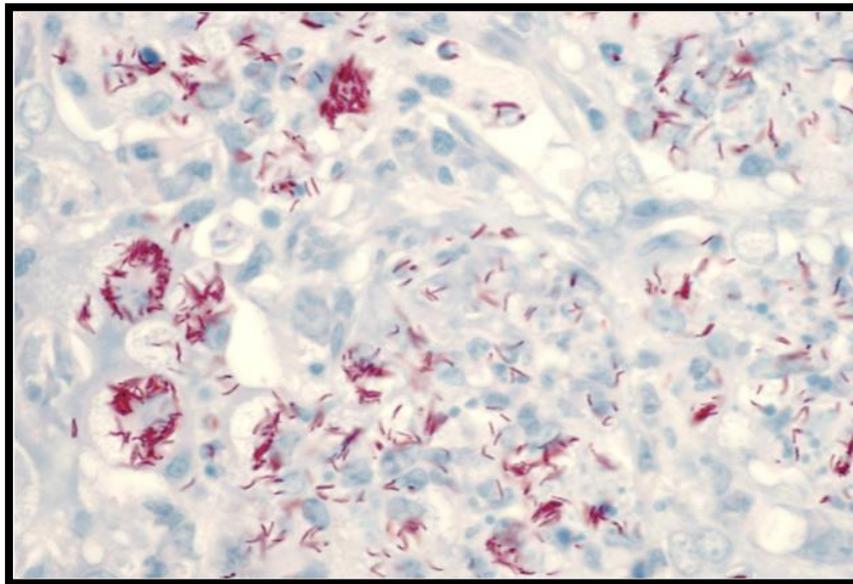


Figura 4. Tinción de Ziehl Neelsen para búsqueda de BAAR en muestra de esputo. Tomado de página web: *Sociedade Brasileira de Imunología. A Tuberculose e o Brasil.*⁴³

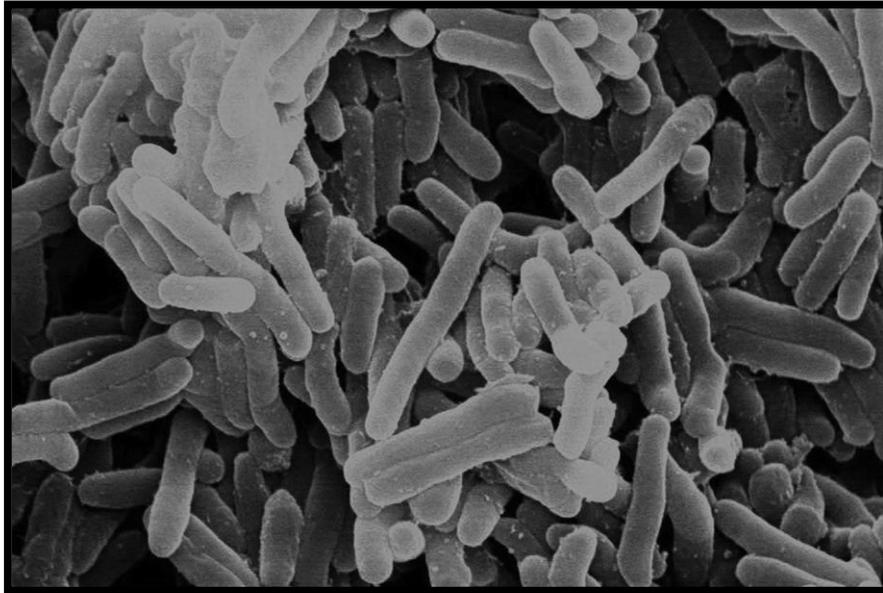


Figura 5. Micrografía de *M. tuberculosis* en microscopía electrónica de barrido (SEM) Tomado y modificado de Velayati & Farnia. 2017.¹⁴

La posibilidad de variaciones morfológicas en el bacilo de la tuberculosis fue sugerida por algunos investigadores como Malassez y Vignal (1883), Nocard y Roux (1887), Metchnikoff (1888), Lubarsch (1899), Fischel (1893) y Vera y Rettger (1939). Ellos demostraron que, bajo condiciones desfavorables como suplemento limitado de nutrientes, privación de oxígeno *M. tuberculosis* tomaba una apariencia gruesa sin formar cuerpos vacuolares. Los bacilos se vuelven más cortos en cultivos más viejos, filamentosos dentro de los macrófagos y ovoides durante inanición de las colonias. Pueden producir gemación y ramificarse en cepas resistentes a fármacos (MDR-TB). Estas variaciones son ventajosas en condiciones de estrés del choque osmótico o desecación y también atribuida a su considerable resistencia a muchos fármacos.¹⁴

Todas las micobacterias comparten la propiedad de ser BAAR debido a la presencia de ácidos micólicos en su pared celular. Los ácidos micólicos permiten a éstos organismos retener el colorante rojo fucsina básica fenicada incluso después de lavados con ácido clorhídrico con alcohol al 3% .¹

Pared celular de *M. tuberculosis*

La pared celular es el principal factor de virulencia de *M. tuberculosis* que contribuye a la resistencia a fármacos y a la supervivencia en condiciones de estrés.¹⁵

La bacteria tiene capacidad de entrar en un metabolismo latente cuando se ve agredida, la pared celular le confiere una especificidad que explica el cuadro clínico, la respuesta a las pruebas diagnósticas y al tratamiento.³

Básicamente, la pared celular de *M. tuberculosis* consiste en tres polímeros unidos covalentemente: la capa basal de peptidoglucano (PG), una capa intermediaria electronlúcida probablemente compuesta de un complejo de arabinogalactano-micolatos y una capa externa densa que se revela por los depósitos de metales pesados en el contraste y bordean la capa electronlúcida rica en lípidos (Fig. 6).^{16,17}

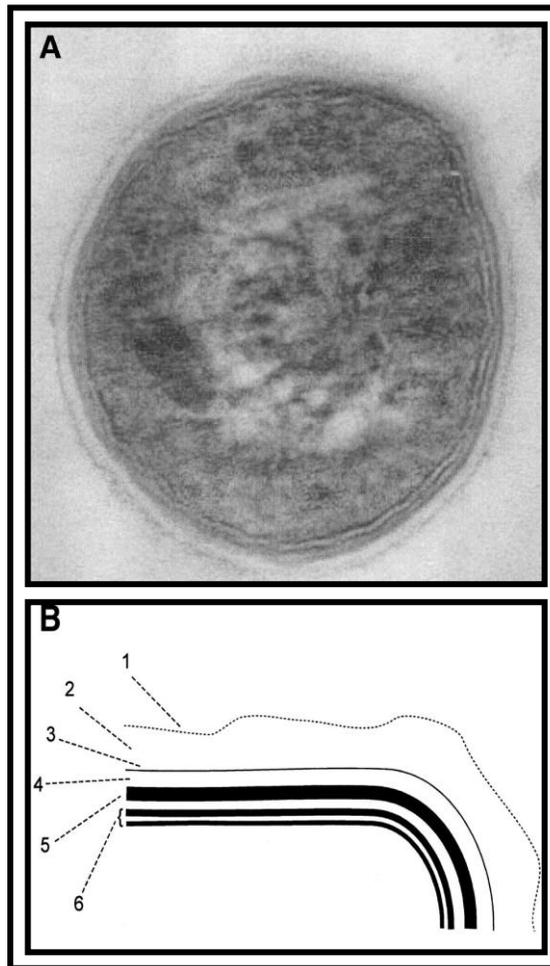


Figura 6. Envolvura de *M. tuberculosis*. A) sección transversal de micobacteria. B) Diagrama de la construcción de la envoltura: 1, posición de los lípidos superficiales de la cápsula. 2, capsula principalmente de polisacáridos y proteína. 3, posición de los lípidos de la cápsula. 4, capa de ácidos micólicos. 5, peptidoglucano mas arabinogalactano. 6, capa trilaminar de la membrana plasmática. Tomado de Cole *et al.* 2005.⁴¹

El peptidoglucano (PG) y arabinogalactano (AG), y una capa gruesa de ácidos micólicos (MA), que están unidos covalentemente y forman el complejo MA-AG-PG, el complejo comienza en el lado externo de la membrana plasmática, que comienza con el PG y AG, y termina con los MA y ácidos grasos (Fig. 7). El PG forma la “columna vertebral” del esqueleto de la pared celular.^{5,18} También se encuentran glicolípidos y porinas en estas paredes como el lipidoarabinomanano que está anclado a la membrana celular por el diacilglicerol.

El PG está hecho de cadena de péptidos y glicanos. La gran cadena de glicano consiste típicamente en unidades repetidas de N-acetilglucosaminas (NAGs) unidas a ácido N-acetilmurámico (NAM). Estas cadenas están unidas formando redes con los péptidos unidos por el grupo lactil de los NAM's. Estas cadenas peptídicas normalmente están compuestas de ácido-L-alanil-D-iso-glutaminil-meso-diaminopimélico (DAP). Esta red altamente organizada que rodea a la bacteria es el principal componente que mantiene la forma de la bacteria. Esta pared celular rodea la membrana de lípidos.¹⁹

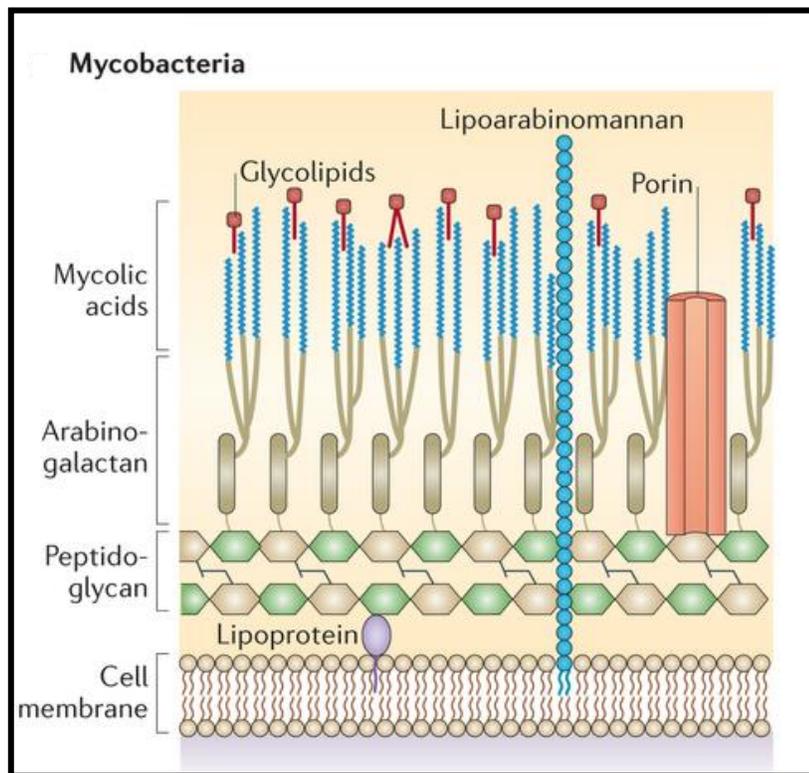


Figura 7. Estructura de la pared celular de las micobacterias. Tomado y modificado de Brown *et al*, 2015.¹⁹

Los PGs contribuyen a la forma resultante de la bacteria. Se han propuesto varios modelos para explicar cómo su organización afecta la forma. Dos modelos (de sitios de competición) de ensamble del PG defienden esto, en los bacilos, la forma depende de la actividad de dos reacciones químicas que ocurren en los estadios

terminales de la síntesis del PG; un sitio es responsable del alargamiento lateral de la pared, y otra es responsable de la formación del septo.

La forma normal de la bacteria está determinada por el balance de estas dos reacciones competitivas, la prevalencia anormal del sitio para el alargamiento lateral de la pared termina en la formación de cocobacilos o cocos. Otras bacterias portan solo un sitio de ensamble del PG que puede formar solo un septo y crecen solo como cocos.⁷ Notablemente la generación del PG maduro ocurre fuera de la membrana celular y es mediada por enzimas que incorporan las nuevas subunidades de PG, que son polimerizadas en el citoplasma. PonA1 y PonA2 son las dos enzimas que se encargan de la polimerización de las cadenas de glicano y péptidos reticulados.²⁰

La organización de la membrana externa está conformada por los ácidos micólicos. Las mutaciones en las micobacterias que afectan la organización de la membrana o de la longitud de los ácidos micólicos resultan en fenotipos con la morfología colonial alterada o la persistencia en las células hospederas o en una estructura lábil de la membrana externa con cambios en las propiedades de la permeabilidad. Algunos compuestos hidrofílicos requieren de proteínas formadoras de poros para ingresar a la célula. Estas porinas han sido detectadas en la membrana externa de *M. tuberculosis* (OmpAtb y Rv1698) y pueden jugar un papel importante en la resistencia a fármacos, al igual que los procesos de reflujo mediados por proteínas transportadoras como la ABC de la membrana interna.¹⁵

El bacilo de la tuberculosis es un organismo prototrófico (que puede sintetizar todos sus componentes a partir de fuentes básicas de carbono y nitrógeno) y heterotrófico (que utiliza componentes orgánicos sintetizados como fuente de carbono y energía). El éxito de este bacilo como patógeno puede ser atribuido a su extraordinaria capacidad de adaptarse a los cambios intracitoplasmáticos en el macrófago a través del curso de la infección. Estos cambios pueden incluir la privación de nutrientes, hipoxia, temperatura, pH, salinidad y varias condiciones exógenas de estrés.^{21,22,23}

Brevemente, la variación morfológica reportada en *M. tuberculosis* está clasificada en dos categorías, aquella que se observa frecuentemente en la fase exponencial

del crecimiento que es el bacilo, que es la forma V, Y, ramificada o de brote. Y aquella que se observa ocasionalmente bajo condiciones ambientales de estrés que es redonda, oval, como espora o formas L. La prevalencia con el estado de transformación a formas L es la que confiere resistencia los fármacos de varios agentes microbianos.²⁴ Los otros tipos de forma celular (V o Y) ocurren en menor frecuencia. El bacilo en forma V es causada por los movimientos de postfisión. El término de “división por rotura” fue descrito por Kurth en 1898 y ha sido reportado por muchos otros investigadores. El mecanismo exacto de este tipo de división aun no es muy claro.⁶

En cuanto a la ultraestructura interna del bacilo, Koike *et al.* describieron un organelo membranoso que nombraron tentativamente como “estructura lamelar” que consiste en una unidad membranosa en un arreglo laminar y que tiene continuidad con la membrana citoplasmática.²⁵ Más tarde se denominó a esta estructura mesosoma, y ahora se sabe que se encuentra en muchas otras bacterias diferentes a *M. tuberculosis* y su función es desconocida.

Estudios de epidemiología molecular han demostrado que ciertos genotipos de *M. tuberculosis* son representativos en regiones geográficas definidas,²⁶ sugiriendo cada una, compatibilidad patógeno-hospedero específica o que ciertos genotipos tienen propiedades únicas que potencian la patogenicidad y virulencia.²⁷

La complejidad de la enfermedad en referencia a la presencia de cepas resistentes obliga a realizar investigaciones en cuanto a cambios morfológicos a nivel ultraestructural. Por lo que en este trabajo se pretende realizar la diferenciación de la pared celular y relacionar la virulencia de cuatro cepas distintas de *M. tuberculosis*, las cuales fueron seleccionadas por ser las cepas tipo por su capacidad de producir o no enfermedad. Las cepas fueron obtenidas de la colección del Departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), que desde hace 25 años se dedica a la investigación activa de la inmunopatología de la TB, siendo este, el primer trabajo que aborda los aspectos ultraestructurales del bacilo de Koch en el instituto. Las cepas utilizadas en este estudio fueron las siguientes:

- *M. tuberculosis* H37Rv cepa de virulencia estable, es la más estudiada y se utiliza como control, fue aislada por Edward R. Baldwin en 1905. La cepa proviene del esputo de un paciente de 19 años de edad con tuberculosis pulmonar crónica del Instituto Trudeau en Saranac Lake, New York. Es susceptible a todos los medicamentos de primera línea para el tratamiento de la TB. Esta cepa pertenece al linaje LAM.^{28,29}
- *M. tuberculosis* H37Ra es una cepa atenuada originalmente deriva de la cepa H37Rv, también del linaje LAM. Fue obtenida en 1935 por William Steenken al envejecer un cultivo de la cepa H37Rv e inocularlo en cobayos en el Instituto Trudeau, Saranac Lake, New York.³⁰
- *M. tuberculosis* suda27 cepa hipervirulenta del linaje Beijing. La hipervirulencia se caracteriza por acortar la sobrevivencia de los animales inoculados en modelo murino en comparación a la cepa H37Rv. Proviene de un aislado clínico de la Ciudad del Cabo, Sudáfrica y fue proporcionada por la Universidad de Stellenbosch de la misma ciudad.
- *M. tuberculosis* MDR (CIBIN/UMF15:99) proveniente de un aislado clínico de un paciente con tuberculosis pulmonar avanzada de la Unidad de Medicina Familiar No. 15 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Monterrey, Nuevo León, México. La cepa pertenece al linaje X1 fue identificada y caracterizada en el Laboratorio de Micobacteriología del Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, IMSS de la misma ciudad. La cepa es resistente a antibióticos de primera línea: isoniazida (Inh), rifampicina (Rif) etambutol (Emb), estreptomycin (Str) y pirazinamida (Pza).³¹

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existen diferencias ultraestructurales en la pared celular de las cepas de distinto linaje H37Rv, H37Ra, Suda27 y MDR de *M. tuberculosis* que confieren distinto grado de virulencia y resistencia a fármacos en el hospedero?

IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad con los avances de las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM), algunos investigadores han sugerido que el bacilo de la tuberculosis puede presentar variaciones en la ultraestructura. Avances recientes han demostrado cambios adaptativos en tamaño y forma del bacilo bajo condiciones de estrés. El conocimiento de la anatomía y fisiología de *M. tuberculosis* durante este proceso ha sido limitado por el crecimiento lento de las bacterias. Desafortunadamente en muchos casos no se sabe si la forma es un mecanismo de adaptación por lo que pocos estudios han abordado este aspecto. Se ha observado incluso dentro de la misma especie, variaciones morfológicas macroscópicas y microscópicas que podrían explicar el comportamiento diferente de cada cepa. Una de estas variaciones podría ser la pared celular que juega un papel importante en la virulencia del bacilo y en la resistencia a antibióticos. De ser así podrían encontrarse características morfológicas que ayuden a una identificación más clara, y sistemática de los bacilos de la tuberculosis para estudios epidemiológicos, por lo que en el presente trabajo se pretende demostrar las diferencias ultraestructurales de la pared celular y demostrar su correlación con la virulencia y la resistencia a fármacos en las cepas utilizadas en este estudio.

V. HIPÓTESIS

Dado que la pared celular de *M. tuberculosis* es el factor principal de virulencia, es posible que las cepas más virulentas tengan una pared celular más compleja que las cepas atenuadas que no producen enfermedad. También que los bacilos presenten una ultraestructura diferente entre cada cepa, que aun siendo de diferente linaje son de la misma especie.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Describir las principales características ultraestructurales de las cepas H37Rv, H37Ra, Suda27 y MDR de *M. tuberculosis*.

Objetivos específicos:

- Determinar las características de la pared celular de las cepas estudiadas.
- Relacionar la ultraestructura con la patogenicidad y virulencia de las micobacterias utilizadas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron cepas de *M. tuberculosis* (H37Ra, H37Rv, Suda27 y MDR) de la colección del Departamento de Patología Experimental del INCMNSZ que inicialmente fueron recolectados de aislados clínicos. Se utilizó como control la cepa H37Rv debido a su virulencia estable que no ha cambiado desde el primer aislamiento en 1905.

Las cepas fueron guardadas y congeladas a -70°C con criopreservadores (glicerol) para su posterior resiembra en caldos de cultivo Middlebrock 7H9 (BD, Difco) y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO_2 al 15% de 14 a 21 días, pasando este periodo se midió la densidad óptica (D.O.) para determinar si había fase exponencial. De esta fase se obtuvo 1 ml de alícuota de este cultivo del cual se obtuvo un botón de células por medio de centrifugación a 2,500 rpm y luego se resuspendió en 1 ml de mezcla de glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos a pH 7.2 0.15 M.

Las células se fijaron durante 24 horas colocando previamente los tubos Eppendorf en lámpara de luz ultravioleta durante 30 minutos como medida de bioseguridad para asegurar la esterilización de la superficie de los tubos antes de comenzar con el procesamiento para MET. El proceso consistió en centrifugar a 3000 rpm hasta obtener un botón blanquecino el cual se lavó dos veces con buffer de cacodilatos, se colocaron 0.5 ml de tetraóxido de osmio al 1% (OsO_4), resuspendiendo las bacterias. Se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora con veinte minutos. Se centrifugaron nuevamente a 3000 rpm y se realizaron dos lavados con buffer de cacodilatos.

La deshidratación de la muestra se llevó a cabo con alcohol etílico a distintos grados de concentración (30, 50, 70, 80, 96 y 100%), cada una de 15 minutos. Las últimas dos gradaciones se realizaron dos veces cada una. Enseguida las

muestras se deshidrataron con óxido de propileno absoluto (C_3H_6O). La preinclusión se realizó con resina Spurr-óxido de propileno (1:1) durante toda la noche. La inclusión se hizo en tubos pequeños que fueron incubados en calor durante una noche a 70 °C. Posteriormente se realizaron cortes semifinos de 350 nm utilizando un ultramicrotomo Leica EMUC7, los cortes fueron teñidos con azul de toluidina y observados a microscopio de luz para evaluación de la zona donde las bacterias no estuviesen tan aglomeradas. Los cortes finos de 70 nm de grosor fueron recogidos en rejillas de cobre de 200 mesh y contrastados con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo Reynolds (22 y 12 min respectivamente) para su observación al microscopio electrónico de transmisión FEI, modelo Tecnai Spirit BioTwin® operando a 80 kV y con spot size de 2.

Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa para computadora ImageJ 1.51j con el cual se midieron las paredes bacterianas. Posteriormente se realizó un análisis ANOVA. Las gráficas y el análisis estadístico se elaboraron con el programa Graphpad Prisma 4.0.

VIII. RESULTADOS

Se examinaron al MET con la técnica convencional treinta células de cada cepa de diferentes linajes de *M. tuberculosis*, H37Rv (virulenta) como control, H37Ra (atenuada), Suda27 (hipervirulenta) y MDR (multidrogorresistente). Todas presentaron distinta morfología ultraestructural, desde el grosor de la pared, y presencia de vacuolas de distinto tamaño. Todas las cepas presentaron mesosoma en el citoplasma (Tabla 2).

El grosor de la pared celular es variable en las cuatro cepas (Tabla 3), presentándose el mayor grosor en MDR (18.5 ± 3.9 nm) y menor en Suda27 (6.7 ± 2.0 nm). Se encontró diferencia estadística significativa en estas dos cepas en comparación con el control ($p < 0.05$).

La cepa control H37Rv presentó zonas más electrondensas en el citoplasma, también presenta mesosomas, y poca vacuolización, el mesosoma se ubica en el centro del citoplasma y está rodeado de una pequeña zona electronlúcida. El citoplasma presenta granulaciones (Fig. 8).

H37Ra presenta varias zonas electronlúcidas en el citoplasma, presentando también una aparente retícula y mesosomas. Se observan algunos gránulos adyacentes a esta retícula (Fig. 9). Suda27 al tener el menor grosor de las cepas de este estudio, no se observa cápsula y se observan algunas vacuolas en el citoplasma. El mesosoma también está presente. También se encontró la “retícula intracitoplasmática” en el centro del citoplasma (Fig. 10). MDR presentó el mayor grosor en pared, se distingue muy bien la cápsula, y la pared celular muy electrondensa, presenta vacuolas que ocupan gran parte del volumen citoplasmático y también presenta granulación citoplasmática muy fina (Fig. 11).

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CEPAS ESTUDIADAS (n=120)

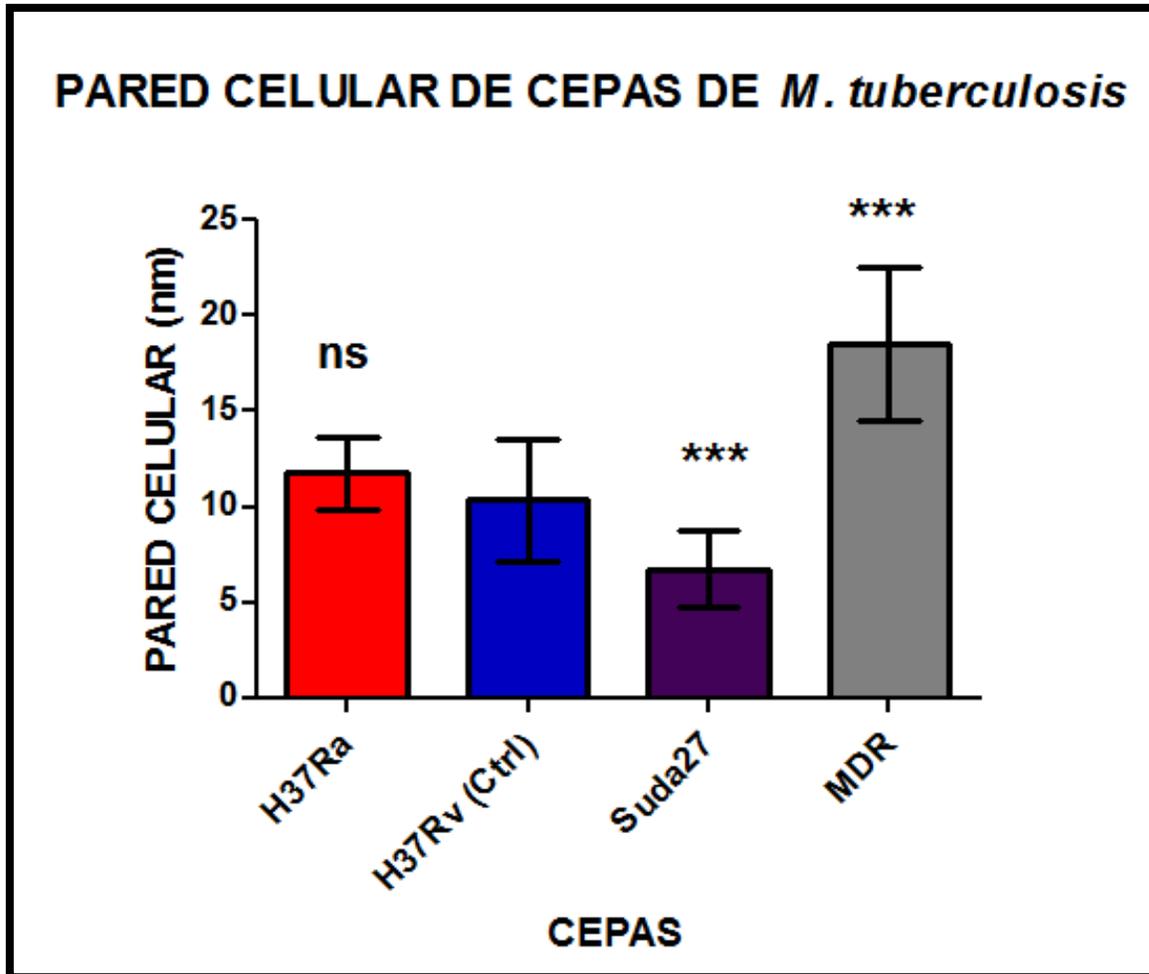
CEPA	PARED CELULAR (T)	MESOSOMA	VACUOLAS	GRANULACIÓN
H37Rv (ctrl)	++	PRESENTE	ESCASAS	ABUNDANTE
H37Ra	++	PRESENTE	ESCASAS	ESCASA
Suda27	+	PRESENTE	AUSENTES	ABUNDANTE
MDR	+++	PRESENTE	ABUNDANTES	ABUNDANTE

DELGADO (+), MEDIO (++), GRUESO (+++)

TABLA 3. GROSOR (T) DE LA PARED CELULAR DE *M. tuberculosis*

CEPA	T (nm) MEDIA ± S.D.
H37Ra¹	11.5 ± 1.8 (n=30)
H37Rv² (ctrl)	10.4 ± 3.2 (n=30)
Suda27³	6.7 ± 2.0 (n=30)
MDR⁴	18.5 ± 3.9 (n=30)
Total	n = 120

1. Atenuada, 2. virulenta, 3. hipervirulenta, 4. multidrogresistente



Gráfica 1. Grosor de las paredes celulares. El análisis mostró significancia estadística (***) en cepas Suda27 y MDR ($p < 0.05$), ns (no significance), $n = 120$

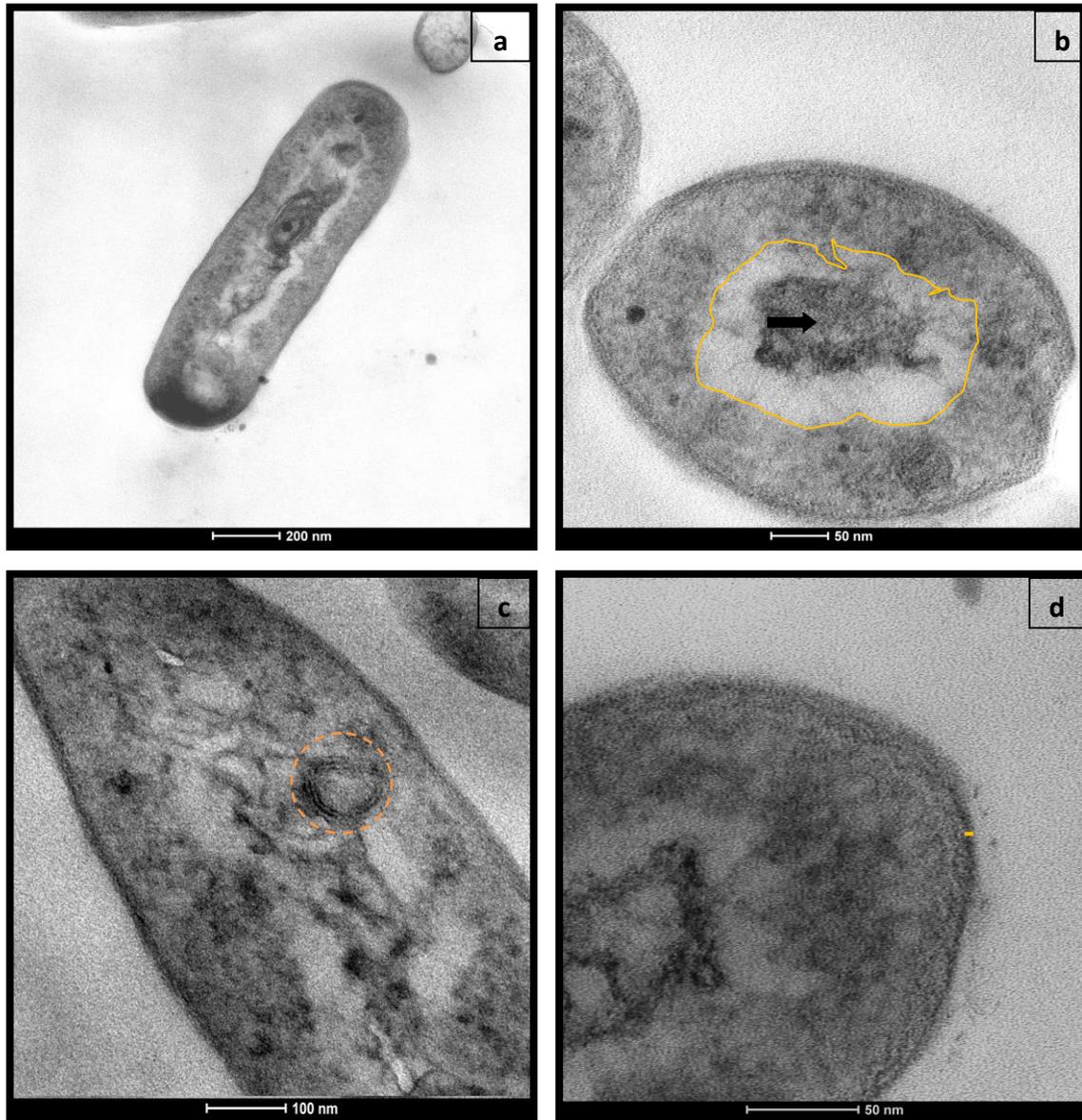


Figura 8. Micrografía electrónica de *M. tuberculosis* H37Rv (ctrl); a) corte longitudinal b) corte transversal, se observa el citoplasma con reticula electrodensa (flecha) con una zona clara (delimitado con línea naranja), c) acercamiento a mayor aumento al citoplasma donde se observa un mesosoma (circulo discontinuo) y d) corte transversal a mayor aumento de la pared celular.

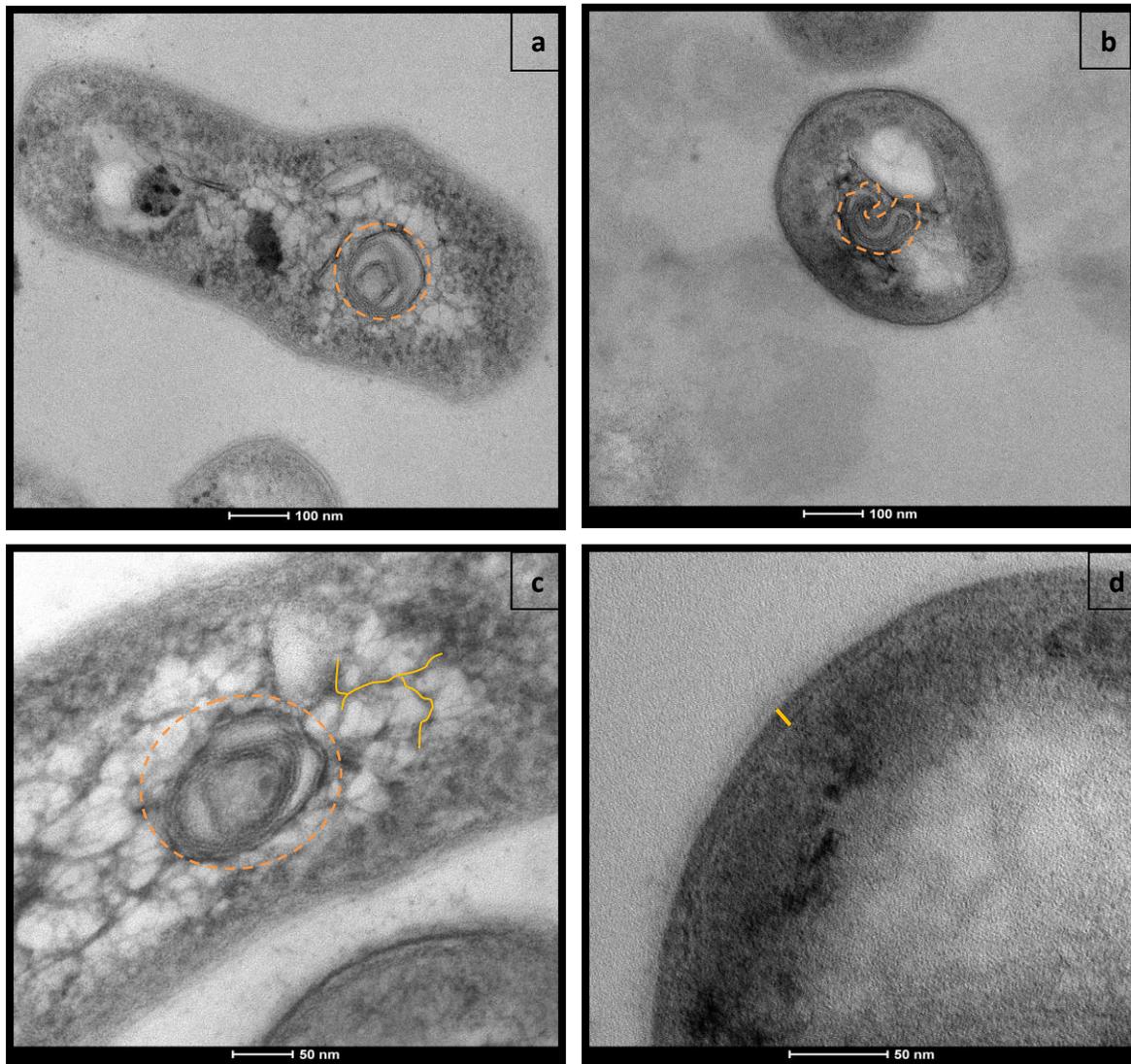


Figura 9. Micrografías electrónicas de *M. tuberculosis* H37Ra. a) Corte longitudinal, se aprecia un mesosoma (círculo discontinuo), **b)** corte transversal mostrando un mesosoma (línea discontinua), **c)** corte longitudinal, se observa un mesosoma (círculo discontinuo) y también se aprecia una “retícula citoplasmática” (remarcada con las líneas naranjas) que da el aspecto de vacuolar y **d)** corte transversal a mayor aumento de la pared celular donde se aprecia el grosor de esta (línea naranja).

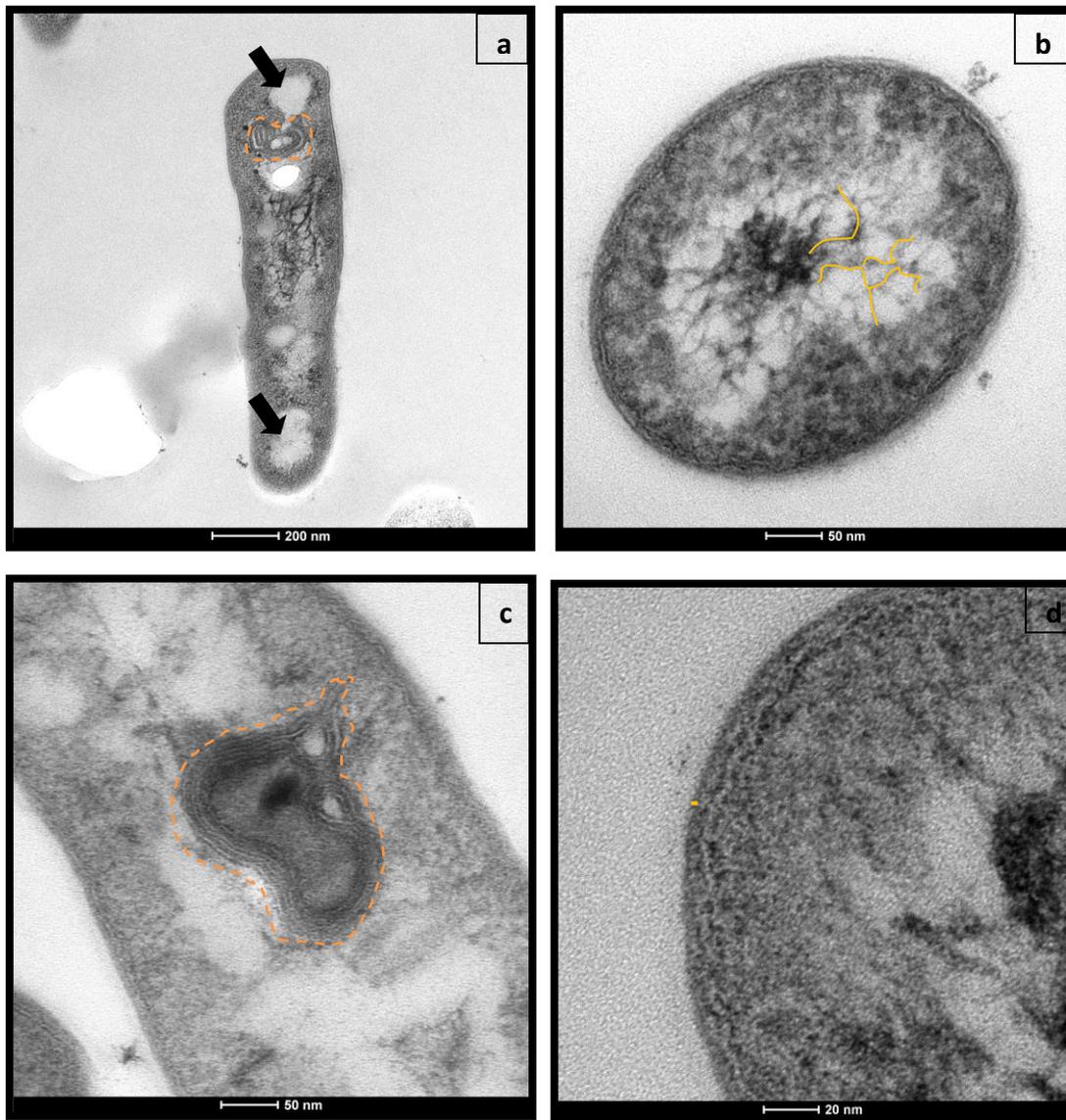


Figura 10. Micrografías electrónicas de *M. tuberculosis* Suda27. **a)** Corte longitudinal, se aprecia el citoplasma, mesosoma (líneas discontinuas) y vacuolas (flechas) **b)** a mayor aumento corte transversal donde se observa una “retícula citoplasmática” (línea naranja). **c)** Mesosoma en plano longitudinal a mayor aumento (línea discontinua), se observa una zona electronlúcida rodeada de una zona granular y **d)** corte transversal a mayor aumento donde se aprecia la membrana citoplasmática con poca pared celular.

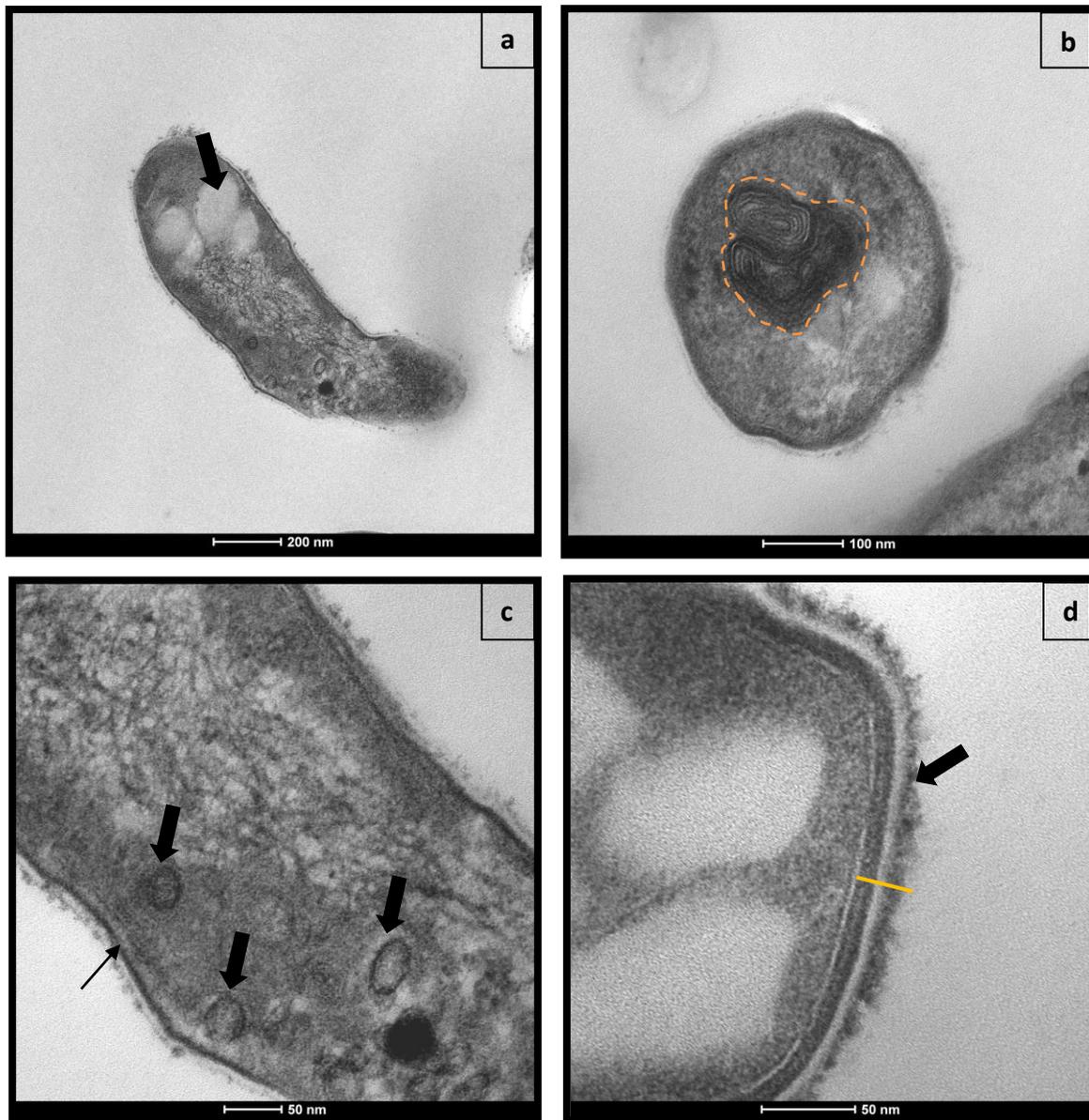


Figura 11. Micrografías electrónicas de *M. tuberculosis* MDR; **a)** corte longitudinal, donde se observan vacuolas que ocupan gran parte del espacio citoplasmático (flecha), **b)** corte transversal donde se observa un mesosoma (circulo discontinuo), **c)** corte longitudinal donde se observan algunas vesículas de contenido desconocido, así como una pared celular muy gruesa (flecha delgada), un citoplasma electrondenso de aspecto reticular y **d)** corte transversal a mayor aumento, se aprecia una pared celular muy gruesa junto con la cápsula (flecha).

X. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran una variación en el grosor de las paredes celulares de cuatro cepas de distinto linaje siendo la misma especie: *M. tuberculosis*. La pared de la cepa MDR es la más gruesa (18.5 ± 3.9 nm) comparadas con las demás micobacterias. Además, presentó la cápsula situada por encima de la pared, en contraste con la cepa hipervirulenta Suda27 (6.7 ± 2.0 nm) cuya pared es la más delgada, ambas cepas presentaron diferencia estadística significativa frente al control H37Rv ($p < 0.05$). Dado que la pared celular es el principal factor de virulencia¹⁵ esperábamos que las cepas más virulentas tuvieran un mayor grosor de la pared celular, pero de acuerdo a los resultados obtenidos esta virulencia es inversamente proporcional al grosor de la pared. En nuestro estudio, las micobacterias MDR presentaron mayor grosor en la pared algo similar a los estudios de Velayati *et al.*³² que demostraron que el grosor de las paredes celulares en cepas de *M. tuberculosis* XDR y MDR son más gruesas que las paredes de cepas sensibles. La cepa MDR presenta una alta resistencia a antibióticos de amplio espectro, por lo que esta estructura juega un papel importante en el fenómeno de adaptación al microambiente, aunque Malhotra también señala que las formas L que carecen de pared celular rígida también son resistentes a varios agentes antimicrobianos.^{13, 14}

Suda27 es una cepa hipervirulenta, que se caracteriza por el menor tiempo de sobrevida de los animales inoculados en modelo murino y en los pacientes infectados. La disminución en el grosor de la pared celular podría jugar un papel importante en la evasión del sistema inmune del hospedero, por lo que da lugar a cuestionar cual es el factor de virulencia principal si la pared disminuye en este tipo de cepas. Sin embargo, *Borrero et al* mencionan que ningún factor de virulencia es en particular considerado esencial como tal, pues la patogenia del bacilo parece ser un fenómeno multifactorial aun poco dilucidado.³³

El aspecto citoplasmático de las bacterias demostró ser diferente, H37Ra presentó un citoplasma con aspecto reticulado fibrilar electrondenso que según Velayati podría ser el nucleoide agregado debido al efecto de la fijación.³²

Esta cepa no produce daño al hospedero es por eso que se le conoce por ser atenuada. El citoplasma de las demás bacterias es distinto. H37Rv contiene un citoplasma muy uniforme donde solo se observan gránulos en la periferia adyacente a la membrana celular. Algunos autores han determinado que la composición química de los gránulos es de polifostato.^{25,14} Otra característica morfológica encontrada fueron las vacuolas, las cuales se observan de una a dos en el citoplasma de las bacterias MDR. Las vacuolas son grandes y delimitadas por una doble membrana, la composición interior de estas se desconoce. Se ha postulado que el contenido de las vacuolas es de origen lipídico.^{1,14} La cepa MDR presentó vesículas intracitoplasmáticas las cuales solo se presentaron en esta cepa. Otro hallazgo sobresaliente fue la observación de una estructura lamelar conocida como mesosoma, del cual se desconoce su función exacta. Algunos autores consideran que tiene una función de oxidación-reducción³⁴, acumulación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2).¹⁴ Xin *et al.* indujeron la formación de mesosomas en *Escherichia coli* por efecto de la rifampicina, lo cual resultó con un exceso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cabe mencionar que la preparación de las bacterias fue mediante criofijación.³⁵ En contraste con otros autores que descartan la posibilidad que el mesosoma sea un organelo como tal y es catalogado como un artefacto producido por efecto del procesamiento de la muestras y atribuido directamente a la fijación por los aldehídos de los métodos tradicionales de ME.^{36,37,38,39}

La presencia del mesosoma estuvo en las cuatro cepas estudiadas, aunque su frecuencia por campo microscópico fue variable, pues esto es proporcional a la cantidad de bacterias por muestra y por la profundidad y orientación la bacteria ante el corte. La diversidad morfológica en *M. tuberculosis* podría deberse a los ambientes heterogéneos de los que originalmente se aislaron. También a las distintas regiones geográficas en las que se encuentren, sin embargo, esta bacteria es conocida por presentar pleomorfismo en ciertas circunstancias.

XI. CONCLUSIONES

- Las diferentes cepas de *M. tuberculosis* presentan diferentes características ultraestructurales a pesar de ser de la misma especie.
- La pared celular presenta distinto grosor entre cada cepa, proporcionando mayor virulencia en aquellas con menor grosor mientras que la resistencia a fármacos está determinada por las paredes celulares más gruesas.
- Las características citoplasmáticas también presentan diferente disposición entre cada cepa, presentándose aspecto granular, vacuolas y mesosomas.
- El mesosoma es una estructura de origen y función indeterminada que está presente en las micobacterias estudiadas con la técnica de microscopia electrónica de transmisión convencional.

XII. APÉNDICE

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Glutaraldehído 2.5% ($\text{OHC}_3\text{H}_6\text{HCO}$) FW 100.12 ***Electron Microscopy Sciences.***
- Buffer de cacodilatos pH 7.2 a 0.15 M. cacodilato de sodio trihidratado (sodio dimetil arsenato/ácido cacodílico-sal de sodio) ($\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) FW 214.02
- Solución de tetraóxido de osmio al 1%. Ampollas de tetraóxido de osmio de 1 g (OsO_4). FW 254.2. ***Electron Microscopy Sciences.***
- Óxido de propileno (1,2 epoxipropano) ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) FW 58.08. ***Electron Microscopy Sciences.***
- Soluciones porcentuales de alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (30, 50, 70, 80, 96 y 100 %).
- Resina de baja viscosidad (Spurr). ***Electron Microscopy Sciences.***
 - I. NSA (anhídrido nonenil succínico) FW 227.0
 - II. ERL 4221 (7-Oxabicyclo[4.1.0]heptane-3-ácido carboxílico, 7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-ilmetil éster) EW 133.2 g/eq
 - III. DER 736 (polímero de poliglicol-epiclorohidrina) EW 184.6 g/eq
 - IV. DMAE (2-dimetilaminoetanol) FW $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}$
- Azul de Toluidina (cloruro de tolonio) $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{SCl}$ FW 305.84 **Merck**

- Borato de sodio decahidratado $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ FW 381.422 **J.T. Baker**
- Acetato de uranilo 3%. $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{UO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ FW 424.15, **Merck**
- Citrato de Plomo (Reynolds, 1963)
 - I. Nitrato de plomo $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, FW 331.23.....1.33 g
Mallinckrodt Chemicals Works
 - II. Citrato sódico $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, FW 294.10.....1.76 g
Mallinckrodt Chemicals Works
 - III. Solución 1 N NaOH FW 40.0.....0.8 ml
 - IV. Agua destilad (H_2O)30 ml

XIII. REFERENCIAS

1. - Madigan T, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Biología de los microorganismos de Brock. 12ª edición. Pearson. Madrid, España 2009.
2. - Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011;378:57–72.
- 3.- González-Martin J. Microbiología de la tuberculosis. *Semin Fund Reumatol*. 2014,15(1):25-33
4. - <http://www.who.int/topics/tuberculosis/es/> (consultado el 13/11/16)
5. - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/> (consultado el 11/11/17)
6. - Global Tuberculosis Report, World Health Organization, 2017.
7. - Koeck JL, Fabre M, Simon F, Daffé M, Garnotel É, Matan AB, Gérôme P, Bernatas JJ, Buisson Y and Pourcel C. Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli *Mycobacterium canetti* infection suggest the existence of an environmental reservoir. *Clin Microbiol Inf* 2011;17(7):1013-1019
- 8.- Fuentes Ferrer M, Gutiérrez Torres L, Ayala Ramírez O, Rumayor Zarzuelo M, del Prado González N. Tuberculosis of the spine. A systematic review of case series. *Int Orthop*. 2012;36:221–31.
- 9.- Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 2007;7:328-37
10. -Ndlovu H, Marakalala MJ. Granulomas and inflammation: host-directed therapies for tuberculosis. *Front Immunol* 2016;434(7):1-11
11. - Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma of tuberculosis. *Science* 2012;352-366.
- 12.- Jeong Y. Pulmonary Tuberculosis: Up to date. Imaging and management. *AJR* 2008;191:834-44
13. - Malhotra S, Bhatia NK, Kaushal M, Kaur N, Chauhan A. Pleomorphic appearance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Public Health Epidemiol* 2010;2(2):11-12
14. - Velayati A, Farnia P. Morphological Characterization of *Mycobacterium tuberculosis*. En Understanding tuberculosis. Deciphering the secret life of the bacilli. Pere-Joan Cardona (ed.) Intech, 2012.
15. - Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, Hoffmann G and Engelhardt H. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol* 2010;18(3):109-116
16. - Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko M, Engelhardt H: Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 3963–3967.

-
17. - Watanabe M, Aoyagi Y, Ridell M, Minnikin DE: Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria. *Microbiology* 2001; 147: 1825–1837.
18. - Brennan, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2003;83, 91–97.
- 19.- Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*, 2015. **13**,620–630
20. - Kieser KJ, Baranowski C, Chao MC., Long JE, Sasseti CM, Waldor MK, Sacchettini JC, loerger TR, and Rubin EJ. Peptidoglycan synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* is organized into networks with varying drug susceptibility. *PNAS*, 2015;42(112):13087-92
21. - Farnia P, Masjedi MR, Farnia P, Merza MA, Tabarsi P, Zhavnerko GK, Ibrahim TA, Kuan HO, Ghanavei J, Farnia P, Ranjbar R, Poleschuyk NN, Titov LP, Owlia P, Kazampour M, Setare M, Sheikolslami M, Migliori GB, Velayati AA. Growth and cell division in extensive (XDR) and extremely drug resistany (XXDR) tuberculosis strains: transmission and atomic force observation. *Int. J. Clin. Exp. Med*, 2010; 3:320-326
22. - Singh, B., Ghosh, J., Islam, N, M., Dasgupta, S., and L.Kirsebom. Growth, cell division and sporulation in mycobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2010;98:165-177.
23. - Shleeva, M.O., Kudykina, Y.K., Vostroknutova, G.N., Suzina N.E., Mulyukin, A. L., and, A.S.Kaprelyants. Dormant ovoid cells of *M. tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification. *Tubercle* 2011;91:146
24. - Brennan PJ. Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2003;83:91-97
25. - Koike M, Takeya K. Fine structures of intracytoplasmic organelles of mycobacteria. *J Biophysic and Biochem Cytol* 1961;9:597-607
26. - Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy CRE, Kidd M et al. A recently evolved sublineage of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol* 2007;45:1483-90
27. - Gagneaux S, De Remier K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanans S, et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2869-73
28. - Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiol* 2002;148(10)2967-2973
29. - Steenken W, Oatway WH, Petroff SA. Biological studies of tubercle bacillus. *JEM* 1934; 60(14):515
30. - Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhu G, Shi W, Zhang L, Wang H, Wang S, Zhao G, Zhang Y. Genetic Basis of Virulence Attenuation Revealed by Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS ONE* 2008;(6):2375.

-
31. - Molina-Salinas GM, Ramos-Guerra MC, Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, Becerril-Montes P, Said-Fernández S. Bactericidal activity of organic extracts from *Fluorensia cernua* DC on sensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res* 2006; 37: 45-49.
32. - Velayati A, Farnia P, Ibrahim TI, Haroun RZ, Kuan HO, Ghanavi J, Farnia P, AN Kabarei, Tabarsi P, Omar AR, Varahram M, Masjedi MR. Differences in Cell Wall Thickness between Resistant and Nonresistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* : Using Transmission Electron Microscopy. *Chemotherapy* 2009;55:303–307
33. - Borrero R, Álvarez N, Reyes F, Sarmiento ME, Acosta A. Mycobacterium tuberculosis: factores de virulencia. *VacciMonitor* 2011;20(1):34-38
34. - Arijji, F., Yamaguchi, J., Fukushi, K., Oka, S. Electron microscopic localization of enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep Res Inst* 1968. Tohoku Univ. Med. 15: 88–97.
35. - Xin L, Lipeng Y, Jiaju Q, Hanqing F, Yunhong L, Min Z, Yuxian Z, Hongyu L. Revisiting the Mesosome as a Novel Site of Hydrogen Peroxide Accumulation in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* 2016 May;72(5):652
36. - Nanninga N. The mesosome of *Bacillus subtilis* as affected by chemical and physical fixation. *J Cell Biol* 1971;48:219-224
37. - Ebersold HR, Cordier JL, Lüthy P. Bacterial mesosomes: method dependet artifacts. *Arch Microbiol* 1981;130:19-22
38. - Higgins ML, Tsien HC, Daneo-Moore L. Organization of mesosomes in fixed and unfixed cells. *J Bacteriol* 1976;127(3):1519-1523.
39. - Silva MT, Sousa JCF, Polónia JJ, Macedo MAE, Parente AM. Bacterial mesosomes: real structures or artifacts? *Biochim Biophys Acta* 1976;443:92-105
40. - Robins & Cotran. Atlas de anatomía patológica. Elsevier. Madrid, España 2007
41. - Cole Stewart T, Davis Eisenach K, McMurray DN, Jacobs WR. Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. ASM Press. Washington DC, 2005.
42. - Zhu L, Zhong J, Jia X, Liu G, Kang Y, Dong M, Zhang X, Li Q, Yue L, Li C, Fu J, Xiao J, Yan J, Zhang B, Lei M, Chen S, Lv L, Zhu B, Huang H, Chen F. Precision methylome characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) using PacBio single-molecule real-time (SMRT) technology. *Nucleic Acids Research*, 2016,2;(44):730-743
43. - <http://sbi.org.br/tuberculose-e-o-brasi/> (consultado el 12/11/17)