

Enfermedades Infecciosas y Microbiología

Volumen
Volume **23**

Número
Number **3**

Julio-Septiembre
July-September **2003**

Artículo:

E. Investigación básica

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

E-01

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS, TH1 Y TH2 EN LAVADOS BRONCOALVEOLARES DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA

Arellano Rangel Gloria C. Arce Mendoza Alma Y.*, Revol Agnes. Depto. de Inmunología. Fac. de Medicina. UANL Monterrey, NL México.

Introducción: La respuesta inmune protectora contra *Mycobacterium tuberculosis* es mediada por células, principalmente el fagocito mononuclear y el linfocito T. Las células T median la inmunidad amplificando la capacidad de los macrófagos para matar y digerir al bacilo, estas células con la producción de sus citocinas, como IFN- γ , atraen y activan macrófagos y linfocitos adicionales. Por otro lado, citocinas como IL-8 cuya acción principal es la de actuar como quimiocina, logra un reclutamiento eficaz de neutrófilos hacia el foco de infección. **Objetivo:** Determinar si existía un patrón de citocinas característico presente en los pacientes con tuberculosis pulmonar activa que fueron estudiados. **Material y métodos:** Se analizaron muestras de lavados broncoalveolares (LBA), obtenidos por medio de broncoscopia en aquellos pacientes que tuvieran indicado el estudio, así logramos conformar tres grupos: 19 pacientes con TB, 7 pacientes con neumonía NO TB, y un grupo control de 5 sujetos sanos. El LBA se separó en dos fracciones: botón celular y sobrenadante; en el sobrenadante, se llevó a cabo la determinación de citocinas por la técnica de ELISA, en donde las citocinas medidas fueron: IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-8 e IL-4. En el botón celular, se llevó a cabo la búsqueda de los RNAm de las diferentes citocinas, excepto para IL-8 e IL-4, utilizando la técnica de RT-PCR, posterior a un análisis de poblaciones celulares en dichas muestras. **Resultados:** Los resultados que obtuvimos de las ELISAS: encontramos un alto nivel de IL-8 en la mayoría de los sobrenadantes de las muestras, además, IL-10 fue otra de las citocinas que se encontró aumentada en la mayoría de los pacientes, a diferencia de TNF- α , IL-2, IFN- γ e IL-4, las cuales aunque presentaron un incremento, éstas tuvieron una mayor variación en su concentración. Estos resultados fueron los mismos tanto para los grupos de TB y NO TB. La población celular predominante en la mayoría de las muestras de LBA, eran los neutrófilos, posteriormente, encontramos linfocitos y por último, monocitos en ese orden de predominancia. Además, encontramos expresión de RNAm sólo para TNF- α y no para las demás citocinas analizadas. **Conclusiones:** No existen diferencias en la producción de citocinas, independientemente del agente etiológico que esté causando el proceso pulmonar infeccioso. IL-8 e IL-10 fueron las citocinas que se encontraron en mayor concentración, lo cual puede deberse a la gran respuesta inflamatoria. TNF- α fue la única citocina en la que se observó la expresión de su RNAm, posiblemente debido a que en las muestras la segunda población celular predominante encontrada fueron los macrófagos. No observamos ninguna diferencia en los niveles de expresión de RNAm para TNF- α entre los 7 pacientes analizados.

E-02

EFEITO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO Y TRANSFORMACIÓN DE *LEISHMANIA MEXICANA* AISLADA DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA LOCALIZADA Y DISEMINADA

Carrada Figueroa G.*, Sánchez Barragán B, Becker Fauser I. Secretaría de Salud del Estado de Tabasco, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Hospital PEMEX y Universidad Nacional Autónoma de México.

Objetivo: Comparar el crecimiento y la transformación de promastigotes a formas redondeadas de cepas de *Leishmania mexicana* aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y diseminada. **Material y métodos:** En este estudio se analizó el crecimiento *in vitro* y la transformación de promastigotes (flagelados) a formas redondeadas ("amastigote-like") de cepas de *Leishmania mexicana* aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada o LCL ($n=4$) y diseminada o LCD ($n=4$), formas clínicas que son polarmente opuestas de acuerdo a su severidad. Las cepas fueron cultivadas en medio de Senekjje modificado a temperaturas de 20, 25 y 30° C, a partir de aliquots de 50 X 10⁶ promastigotes/ml. El crecimiento se midió durante 15 días consecutivos realizando una dilución 1:20 con solución de Locke a partir de la fase líquida del medio de cultivo y utilizando una cámara de Neubauer para el recuento de los parásitos. Para cada cepa se realizó una curva de crecimiento. La transformación de promastigotes a formas redondeadas o formas parecidas a amastigotes ("amastigote-like") a una temperatura de 30° C fue medida durante el mismo periodo de tiempo, transfiriendo una muestra del cultivo a un portaobjetos que se colocó en una cámara húmeda de fenol al 5%. La transformación fue medida porcentualmente. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando la prueba de U de Mann Whitney ($p<0.05$). **Resultados:** Las cepas de *Leishmania mexicana* aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) crecieron de manera más abundante

que aquellas aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) en el 6º día a 20° C y en los días 3, 5, 6 y 7 a una temperatura de incubación de 25° C ($p<0.05$). Cuando las cepas fueron incubadas a 30° C, se observó un mayor crecimiento de las cepas de la forma diseminada (LCD) que de la forma localizada (LCL) durante los quince días de incubación, el cual fue estadísticamente significativo ($p<0.05$). No se observaron diferencias en la transformación de promastigotes a la forma redondeada a 30° C entre ambos grupos de cepas. **Conclusiones:** Las cepas de *Leishmania mexicana* aisladas de pacientes con LCD (forma severa) crecen de manera más abundante *in vitro* a 30°C que las cepas de pacientes con LCL (forma benigna). Se ha reportado que es probable que la temperatura de la piel humana, alcance esta temperatura si la temperatura ambiente es de 26° C, lo cual ocurre en Tabasco que es el Estado de la República Mexicana con el mayor número de casos de estas formas clínicas de la leishmaniasis.

E-03

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MOLÉCULAS EXPRESADAS POR MACRÓFAGOS INFECTADOS CON CEPAS DE DIFERENTE VIRULENCIA DEL COMPLEJO TUBERCULOSIS

Chacón Salinas R*, Serafín López J, Ramos Payán R, Hernández Pando R*, Estrada Parra S, Estrada García I. Departamento de Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. *Departamento de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas Y Nutrición 'Salvador Zubirán'.

La interacción entre *Mycobacterium tuberculosis* y su huésped se encuentra determinada por los procesos moleculares que se establezcan entre ellos. Así, el huésped monta mecanismos de defensa que tienen como finalidad eliminar al patógeno, mientras que éste por su lado presenta otros procesos que le permiten evadir a los mecanismos de defensa y asegurar de esta forma su supervivencia. Es por ello de gran relevancia el identificar qué mecanismos monta el huésped cuando logra controlar la infección y cuáles se ven afectados cuando se establece la infección. **Objetivo:** Identificar moléculas que se expresan diferencialmente en macrófagos infectados con cepas del complejo tuberculosis con diferente grado de virulencia. **Material y métodos:** se infectaron macrófagos a distintos tiempos con bacilos de *M. tuberculosis* cepas H37Rv, Beijing y *M. canetti*. Extractos proteicos fueron analizados por electroforesis bidimensional utilizando el sistema IPG. Los RNA's mensajeros para citocinas fueron analizados por RT-PCR en tiempo real. **Resultados:** Al analizar la expresión de proteínas por geles bidimensionales de macrófagos infectados no observamos proteínas expresadas de manera diferencial en los macrófagos infectados con distintas cepas. Por ello decidimos analizar la expresión de RNA's mensajeros por medio de una técnica más sensible, como lo es la RT-PCR en tiempo real. En este caso nos enfocamos en un grupo de moléculas conocidas como citocinas, las cuales desempeñan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune en contra de *M. tuberculosis*. Resultados preliminares nos muestran un aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β) en macrófagos que han sido infectados por bacilos de baja virulencia, mientras que los macrófagos que han sido infectados con cepas de alta virulencia muestran una baja expresión de estas citocinas y mayor expresión de citocinas reguladoras como TGF- β . **Conclusión:** De confirmarse estos resultados, nos sugeriría que las cepas con baja virulencia generan una respuesta inflamatoria que explicaría la patogenia de la enfermedad.

E-04

PRODUCCIÓN DE β -DEFENSINA-2 EN LA INFECCIÓN POR VIRUS SINICIAL RESPIRATORIO

Galván Morales MA,* Cabello C, Rosete D, Manjarrez ME. Departamento de Investigación en Virología, INER, México, D.F.

Las defensinas son parte de respuesta innata ante agentes infecciosos. Son producidas por neutrófilos y células epiteliales y de acuerdo a las células productoras se dividen en α y β . Se localizan en diferentes sitios del organismo. En vías aéreas incluyendo pulmón se han identificado y caracterizado a las β defensinas-1, 2 y 3. La β -defensinas-2 es la mejor caracterizada, principalmente durante infecciones por bacterias y hongos, no se sabe si en la infección por virus estas moléculas son producidas. Las β defensinas son pequeños péptidos con capacidad citolítica, lesionan membrana plasmática, son importantes en procesos inflamatorios y su actividad se ha descrito en diferentes padecimientos. El aparato respiratorio es la vía de ingreso de numerosos microorganismos, como los virus que causan infecciones respiratorias agudas (IRAs). El virus sincicial respiratorio (VSR) es agente etiológico de IRAs y en niños pequeños, y en lactantes ocasiona neumonía o bronquiolitis. El virus provoca inflamación y rompe la fisiología del tracto. Esta observación sugiere que en períodos normales de contacto con el medio hay una eficiente vigilancia de defensa no

inflamatoria, que mantiene libre de microorganismos y capaz de tratar con un extenso espectro de virus, previendo de larga protección en esta trascendental área. No se conoce mucho sobre la patogenia viral, ni los mecanismos de protección de estas superficies. Proponemos que la β -defensina-2 se produce durante una infección viral y protegen eficientemente a los epitelios. **Objetivo:** Detectar la presencia de β -defensinas-2 en células HEp-2 infectadas con el VSR. **Material y métodos:** Se infectaron células HEp-2 con VSR cepa Long a una multiplicidad de infección de 0.01, y se realizó una cinética de infección a diferentes tiempos. Para detectar la presencia de la proteína, se extrajo el ARN mensajero de la β defensina-2 de las células HEp-2 infectadas y se corrieron ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos específicos. Para confirmar la presencia de la proteína, se corrieron ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos específicos. **Resultados:** Se detectó la presencia de la β -defensina-2 en las células infectadas y observamos que hay un aumento en la concentración de la proteína que es proporcional al tiempo de exposición de las células al virus. También observamos un aumento gradual en la expresión del gen durante los tiempos de infección. Los resultados obtenidos sugieren que el VSR si induce la producción de β -defensina 2 y que esta inducción es proporcional al tiempo de exposición.

E-05

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE 12 GENES INVOLUCRADOS EN LATENCIA Y CICLO CELULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EMPLEANDO EL MODELO DE WAYNE

González Mejía A,* González y Merchand J. Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

Antecedentes: La búsqueda de un modelo que semeje la latencia *in vivo* de *M. tuberculosis* en humanos, ha arrojado numerosos modelos experimentales, entre ellos el modelo a falta de nutrientes de Loebel, modelo murino de Cornell, de Sever-Youmans, modelo de células "no cultivables" de Kaprellyants, modelo microaerofílico de Wayne, etc. Este último ha mostrado ser coherente con la expresión que se ha observado en los pocos estudios *in vivo* que se han realizado en humanos, dificultados por razones éticas y prácticas, así como en modelos animales. Numerosos estudios se han realizado con el modelo Wayne a fin de dilucidar la expresión de diversos genes, en especial el que codifica para la alfa-crystalina (*hspX*). Con este trabajo se pretende ampliar la gama de genes analizados, así como ofrecer un panorama de las aplicaciones que tiene el modelo y la información que de él se pueda obtener para estudios posteriores. **Objetivo:** Determinar la expresión de 6 genes asociados al ciclo celular y 6 genes asociados a la latencia en *M. tuberculosis* usando para ello el modelo de persistencia no replicativa propuesto por Wayne. **Metodología:** Se creció *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Cepa Pasteur, en 200 mL de Medio Dubos adicionado de ADC hasta fase logarítmica, se extrajo RNA a 100 mL, los 100 mL restantes se colocaron según el modelo de Wayne por 5 días; al final de los cuales se extrajo RNA, se eliminó el DNA residual en ambas muestras y se realizó RT-PCR para conocer la expresión de genes asociados a latencia y ciclo celular. **Resultados:** Se obtuvieron diferentes patrones de expresión tanto en los genes ligados a ciclo celular, así como en aquéllos asociados a la latencia cuando se realizó RT-PCR al RNA de *Mycobacterium tuberculosis* en fase logarítmica y al RNA en el modelo microaerofílico de Wayne. El patrón de expresión fue:

Cuadro 1. Expresión de genes asociados al ciclo celular.

	<i>murA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>dnaA</i>	<i>parA</i>	<i>ParB</i>	<i>smc</i>
Fase log	Débil	Fuerte	Fuerte	Débil	Moderada	Fuerte
Modelo Wayne	Moderada	Negativa	Moderada	Fuerte	Negativa	Fuerte

Cuadro 2. Expresión de genes asociados a latencia.

	<i>sigE</i>	<i>sigF</i>	<i>aceA</i>	<i>hspX</i>	3133	2660
Fase log	Negativa	Débil	Débil	Moderada	Fuerte	Moderada
Modelo Wayne	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Débil	Fuerte

E-06

LA EXPRESIÓN DEL RNA DE DOS MICOBACTERIAS PATÓGENAS NO TUBERCULOSAS

Helguera Repetto AC,* Stadthagen Gómez G, González y Merchand JA. Departamento de Microbiología, ENCB, IPN.

Introducción: Las micobacterias se dividen de acuerdo a su tiempo de generación en micobacterias de crecimiento lento y micobacterias de crecimiento rápido. Anteriormente se había descrito que las micobacterias de crecimiento rápido poseen dos copias del rDNA 16S (*rRNAf* y *rRNBl*), mientras que las de crecimiento lento tienen sólo una copia (*rRNA*s). Sin embargo, recientemente se ha reportado la existencia de dos genes del rDNA 16S en el genoma de la micobacteria de crecimiento lento: *Mycobacterium celatum*. Por otra parte, en *Mycobacterium marinum*, recientemente clasificada como micobacteria de crecimiento rápido, se ha propuesto que al menos presenta 2 copias del mismo gen. El objetivo del presente trabajo fue confirmar el número de copias del rDNA 16S que presentan: *M. celatum* y *M. marinum*, así como determinar el número, la localización y la actividad de sus sitios de inicio de la transcripción.

Metodología: Se trabajó con las cepas de *Mycobacterium marinum* ATCC 927 y *M. celatum* ATCC 51131. Las cepas se cultivaron en caldo Dubos, el DNA genómico se extrajo y se realizó una digestión utilizando las enzimas *Pst I*, *Bam HI* y *Pvu II*. El DNA digerido se transfirió a una membrana de nylon y se realizó una hibridación tipo Southern. Para la determinación del número y la localización de los sitios de inicio de la transcripción se realizó la técnica de "Primer extensión". **Resultados y discusión:** Con la hibridación tipo Southern se confirmó la presencia de 2 copias del rDNA 16S en *M. celatum*, una de las cuales correspondió al operón *rRNA*s de las micobacterias de crecimiento lento; mientras que para *M. marinum* solamente se encontró una copia del operón *rrn*, siendo homólogo, de igual manera, al operón *rRNA*s. Ninguna de las dos especies estudiadas obedece a lo descrito anteriormente en cuanto a número de operones *rrn* dentro de su genoma, debiendo existir otro nivel de regulación del crecimiento de estas especies. De los estudios de expresión se encontraron en *M. celatum* dos sitios de inicio de la transcripción en uno de sus operones, correspondiendo a los elementos PCL1 y P1; ambos promotores se encontraron encendidos al mismo tiempo, siendo la actividad de PCL1 5.5 veces mayor que la de P1. Por otra parte se encontró un tercer promotor encendido y que quizás corresponde al segundo operón de esta misma especie. En *M. marinum* se encontraron de igual forma, los dos promotores PCL1 y P1 encendidos al mismo tiempo y con una actividad similar, siendo PCL1 1.1 veces más activo que P1. **Conclusiones:** Se encontró por primera vez que uno de los operones de *M. celatum* corresponde al operón *rRNA*A; que *M. marinum* presenta una sola copia del operón *rrn* y que de igual manera, corresponde al operón *rRNA*A. Ambas especies presentan los elementos promotores PCL1 y P1.

E-07

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA REGULADAS POR HIERRO EN CEPAS DE EAEC PRODUCTORAS DE PIC

Hernández U,* Villaseca JM, Eslava CA. Departamento de Salud Pública Facultad de Medicina UNAM.

Pic es una serina proteasa secretada por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), la cual posee la capacidad de degradar la mucina y el complemento, esta propiedad le permite colonizar el intestino. Recientemente, se encontró que Pic presenta, además, actividad de hemoglobina-proteasa, y de unión a la hemina. Esta observación sugiere que Pic funciona también como una molécula transportadora de Fe³⁺. **Objetivo:** Evaluar si en un medio de cultivo carente de hierro se induce la expresión de proteínas de membrana externa (OMPS), que pudieran estar relacionadas con la captación de Fe³⁺ por la bacteria. **Métodos:** Se utilizó la cepa O42 (O44:H18) productora de Pic. Ésta se sembró en diferentes condiciones de cultivo: caldo Luria (LB), caldo Luria deplegado de Fe³⁺ (LBD) tratado con 1mM de 2,2'-dipiridil, el cual a su vez fue complementado con 2mM de FeSO₄ (LBDFe). Además, se utilizó medio Luria sin hierro complementado con 1mM de cada una de las siguientes sales (LBDS): magnesio, manganeso, zinc, cobre y cobalto. Despues de 18 h de incubación, los diferentes medios se centrifugaron para obtener el paquete bacteriano, éste se lisó por ultrasonido, las células rotas fueron removidas, las membranas se separaron por ultracentrifugación y las proteínas solubles fueron recuperadas. Las OMPS, se solubilizaron con sarkosyl para realizar el análisis por electroforesis (SDS-PAGE). **Resultados:** Las bacterias cultivadas en LB y LBDFe mostraron un mayor crecimiento que las cultivadas en LBDS, en LBD no hubo crecimiento. El análisis electroforético de las OMPS de la cepa O42 cultivada en LB y LBDFe fue similar. Sin embargo, el perfil de OMPS de la misma cepa cultivada en LBDS mostró una proteína de 75 kDa no observada con los otros medios, así como la sobreexpresión de una de 80 kDa y la disminución de dos proteínas una de 100 y otra de 15 kDa. **Conclusiones:** La proteína de 75 kDa expresada por la cepa O42 en condiciones de falta de Fe³⁺, pudiera corresponder a FecA o FepA, OMPS involucradas en el transporte de Fe³⁺. Lo anterior apoyaría la participación de Pic la proteína secretada por EAEC, en los eventos de captación y transporte de Fe³⁺.

E-08

INTERACCIÓN IN VITRO ENTRE *MYCOPLASMA HOMINIS* Y ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Alma Patricia Herrera Mendoza,* Francisco Javier Díaz García,** Fernando Martín Guerra Infante.**-HC CMN SXXI México D.F. **Instituto Nacional de Perinatología D.F.

Objetivos: Determinar la interacción del micoplasma con espermatozoides normales en un modelo *in vitro*. **Material y métodos:** Para determinar esta interacción se empleó una cepa de campo de *Mycoplasma hominis* cuyas membranas fueron marcadas con un fluorocromo (DiIC_{18}) y los espermatozoides purificados por gradiente de Percoll se obtuvieron de 3 donadores aparentemente sanos y a los cuales previo al estudio se les comprobó la ausencia de micoplasmas (*Mycoplasma* y *Ureaplasma*) y *Chlamydia trachomatis* en muestras de semen mediante la técnica de PCR. La infeción experimental se realizó en microplacas de 96 pozos previamente preparadas con 2×10^6 espermatozoides/pozo los cuales fueron inoculados con los micoplasmas marcados (MOI's 15,36,480), se realizaron preparaciones sobre portaobjetos a los 10, 30, 60 y 120 minutos y a las 24 horas de incubación a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Las preparaciones fueron fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% y al mismo tiempo se determinó la viabilidad de los espermatozoides por citometría de flujo. Se analizaron por microscopía confocal empleando el objetivo de inmersión y un láser He/Nea una longitud de onda de 543 nm. **Resultados:** Se observó adherencia a cola, cabeza y cuello de los espermatozoides desde los primeros 10 minutos, este patrón de adherencia no fue definido, en algunos espermatozoides se observó formando microcolonias en otros a lo largo de las membranas. La capacidad de invadir tuvo diferentes grados tanto en el cuello como en la cabeza de los espermatozoides. Esta respuesta fue muy similar en dos de los donadores, el tercero de ellos tuvo una interacción mayor. Hubo cambios morfológicos en los espermatozoides, en las colas se observó un enrollamiento de la parte distal de las mismas, formación de abultamientos en el cuello de los espermatozoides. Aparentemente la viabilidad de los espermatozoides no se vio afectada por la presencia de los micoplasmas. **Conclusiones:** Hubo adherencia a las colas desde los primeros 10 minutos de interacción. Entre los 30 y 60 minutos se observó que los micoplasmas se encontraban dentro de la cabeza de los espermatozoides. La interacción entre los donadores fue diferente. No fue posible definir un patrón de adherencia. Al parecer la presencia de los micoplasmas en los espermatozoides no afecta la viabilidad de los mismos.

E-09

EXPRESIÓN GENÉTICA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS

León Solís L, Ramos Payan R, González y Merchand JA. Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Introducción: *Mycobacterium tuberculosis*, es el agente causal de la tuberculosis (TB), es un bacilo aerobio, no móvil, no produce esporas y posee una estructura inusual de la pared celular. La TB es una infección bacteriana crónica que se transmite principalmente de persona a persona por vía respiratoria. Además, es responsable de un gran número de muertes en países en vías de desarrollo y de una gran morbilidad en todo el mundo. Las micobacterias, como otras bacterias, responden a las señales ambientales llevando a cabo cambios en la expresión genética, la cual es regulada a nivel de transcripción. Esta regulación es necesaria para la sobrevivencia y replicación de la bacteria durante la infección. Por esta razón se han iniciado algunos estudios de expresión genética en estas bacterias (Cole y col., 1996). Una metodología con gran potencial para el análisis de la variación de la expresión genética es la expresión diferencial de genes por medio de la transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (DDRT-PCR). Las ventajas de esta técnica consisten en que no se requiere de la purificación de los mRNAs; además permite estudiar dos o más poblaciones o estados fisiológicos simultáneamente (Liang y Pardee, 1992). **Objetivos:** Aplicar la técnica de DDRT-PCR para el análisis de la expresión genética de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bajo diferentes condiciones de estrés. Determinar la expresión diferencial de algunos genes de *M. tuberculosis* H37Rv bajo la presencia de SDS y surfactantes pulmonares; clonar, secuenciar y analizar las bandas expresadas o reguladas positivamente bajo las condiciones antes mencionadas. **Material y métodos:** Se cultivó la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv en medio Dubos, la cual fue sometida a dos condiciones de estrés: adición de SDS al 0.05% y adición del surfactante pulmonar conocido como palmitato de colfoscerilo (13.5 mg/100 mL de cultivo). Se aplicó la DDRT-PCR con el RNA total de *M. tuberculosis*, utilizando tres iniciadores de anclaje y tres iniciadores arbitrarios. Se seleccionó el par de iniciadores que mostró un mejor patrón de bandas, y se aplicó nuevamente la DDRT-PCR con el RNA total micobacteriano, el cual se aisló de los cultivos de *M. tuberculosis* que habían estado sujetos a las condiciones de estrés mencionadas en el párrafo anterior. **Resultados:** Se seleccionó el par de iniciadores que presentó un mejor patrón de bandas, aquel en el que se observó un número considerable de bandas de alto peso molecular. El iniciador de anclaje seleccionado fue: HT₁₁

(5'AAGCTTTTTTTTTTG) y el arbitrario: MyC1 (GCC AAG CTC CAG). Al analizar los patrones de bandas de las diferentes condiciones de estrés, se observó que había bandas que se apagaban y otras que se sobre-expresaban para cada una de las condiciones antes mencionadas. Estas últimas son las que se seleccionarán para realizar estudios más detallados.

E-10

LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO FUSOGÉNICO DEL VIRUS DE INFLUENZA EN LA SUPERFICIE DE ENTEROBACTERIAS EMPLEANDO MISL COMO AUTO-TRANSPORTADOR DESESTABILIZA MEMBRANAS DE GLÓBULOS ROJOS DE CERNO

Luría-Pérez R1,2,* Ruiz-Pérez F1,2, Cedillo-Barrón L2, Santos-Argumedo L2, Osorio-León JF1, Ocaña-Mondragón A1, Mora-Navarrete M1, González-Velázquez F1, González-Bonilla CR1. 1 Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología. Hospital de Infectología, CMN "La Raza", México D.F. 2 Departamento de Biomedicina Molecular. CINVESTAV-IPN, México D.F.

Introducción: "Cross priming" denota la presentación de antígenos exógenos en moléculas del MHC clase I. Este fenómeno permite modular la respuesta inmune para estimular linfocitos T CD8+ citotóxicos. Para diseñar vacunas con este principio, se han ideado mecanismos de salida del antígeno desde endosomas hacia el citosol. Una estrategia consiste en emplear péptidos fusogénicos de virus, cuyos amino ácidos hidrofóbicos, a pH ácido adquieren la estructura que posibilita la fusión de la envoltura viral y la membrana endosomal de la célula huésped. **Objetivo:** Construir una cepa de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* que exprese un péptido antigénico acoplado a un péptido fusogénico capaz de desestabilizar la membrana endosomal. **Material y métodos:** Oligonucleótidos que codifican los péptidos, fusogénico del virus de influenza (PHA), fusogénico sintético (PFS), del virus del dengue (PNS3) y una "bandera molecular" (FLAG o NANP) se insertaron en un vector que contiene el promotor inducible en anaerobiosis nirB, la secuencia señal LTB y el dominio beta del autotransportador MisL. De igual manera se pretende solubilizar el péptido fusogénico acoplado al péptido antigénico mediante la inserción de un sitio de corte de la proteasa OmpT (SCOT). Las construcciones se transformaron en *E. coli* DH5α y *S. enterica* serovar *Typhimurium* SL3261 y su expresión se evaluó en PAGE-SDS, Western blot e Inmunofluorescencia. Para probar la funcionalidad de los péptidos fusogénicos *in vitro* se realizaron ensayos de lisis de glóbulos rojos de cernero (GRC). **Resultados:** Se construyeron los plásmidos pnirLTB-PHA-FLAG-βMISL, pnirLTB-PHA-PNS3-FLAG-βMISL, pnirLTB-PHA-PNS3-FLAG-SCOT-βMISL, pnirLTB-PFS-FLAG-βMISL, pnirLTB-PFS-FLAG-PNS3-βMISL, pnirLTB-PFS-PNS3-FLAG-SCOT-βMISL, pnirLTB-NANP-PNS3-βMISL, pnirLTB-NANP-PNS3-SCOT-βMISL. Al evaluar la expresión y translocación de las proteínas de fusión se observaron bandas de ~70 kDa tanto en PAGE-SDS como en Western-blot, que corresponden al peso esperado. La inmunofluorescencia empleando anti-FLAG demuestra expresión de las proteínas en la superficie bacteriana y mediante citometría de flujo hemos demostrado que el sitio de corte de la proteasa OmpT es funcional. La evaluación *in vitro* de los péptidos fusogénicos revela que las construcciones con PFS lisan en un 40% los GRC a diferencia de las construcciones con PHA que lo hacen en un 24%. **Conclusión y perspectiva:** Se ha logrado construir los plásmidos para evaluar si un péptido fusogénico (PHA o PFS) desestabiliza la membrana endosomal y lleva a un antígeno (PNS3) hacia el citosol para montar una respuesta citotóxica. Los ensayos *in vitro* de lisis de glóbulos rojos de cernero demuestran que el péptido fusogénico sintético tiene mayor eficiencia para desestabilizar membranas que el péptido fusogénico nativo. Los ensayos *in vivo* de respuesta citotóxica se evaluarán en un modelo murino.

E-11

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SOBRE LA HEMOGLOBINA HUMANA DE ESPC SECRETADA POR *ESCHERICHIA COLI*/ENTEROPATÓGENA (EPEC)

Drago-Serrano ME, Manjarrez Hernández HA,* Gavilanes-Parra S; Chávez-Berrocal ME. Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco y Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM.

EPEC es uno de los principales agentes etiológicos de diarrea en países en vías de desarrollo. Algunas cepas de EPEC secretan una proteína de 110 kDa de peso molecular llamada EspC, la cual pertenece a la familia de las proteínas serin proteasas autotransportadoras (SerProtAT) y que son secretadas por diversas bacterias patógenas. La especificidad enzimática las SerProtAT es diversa lo que sugiere diferentes funciones. En el caso particular de la EspC, se ha demostrado que posee actividad proteolítica sobre el factor V y la espestrina, ambos de origen humano; no se conoce si mediante la hidrólisis de estos sustratos, EspC contribuye a la virulencia de EPEC. El objetivo de este trabajo fue detectar si la EspC, al igual que otros miembros de las SerProAT como la proteasa Hbp secretada por la cepa *E. coli* patogénica cepa EB1, posee actividad proteolítica sobre la hemoglobina humana. Para lograr lo anterior, la cepa silvestre EPEC E 2,348/69 se cultivó en medio sintético o

medio mínimo esencial (DMEM). La suspensión bacteriana se centrifugó y el sobrenadante se concentró bajo presión de N₂ y se sometió a electroforesis en geles de PAGE-SDS y Westernblott para confirmar la presencia de EspC. El sobrenadante crudo concentrado se sometió a recambios con HEPES 50 mM pH 7, se concentró y se purificó por cromatografía líquida de intercambio iónico. El ensayo de proteólisis de hemoglobina para detectar el pH de actividad óptima, consistió en incubar Hemoglobina (Hb) humana purificada y la proteína EspC purificada a pH 5, 6, 7 y 8. El ensayo para evaluar el efecto de la dosis sobre la proteólisis, consistió en incubar la Hb y diferentes cantidades de EspC a pH 6. Después de incubar, las muestras se sometieron a electroforesis nativa en geles de poliacrilamida al 9%. Se observó que la EspC ejerce un efecto proteolítico sobre la Hb a un pH óptimo de 5 y 6, se pudo determinar que dicha actividad fue dosis dependiente. No se observó proteólisis de Hb en control negativo correspondiente al sobrenadante purificado obtenido de la cepa mutante EPEC EspC [-]. Los resultados obtenidos sugieren que la EspC podría contribuir a la virulencia de algunas cepas de EPEC por su capacidad de liberar hierro de hemoproteínas.

E-12

DESARROLLO DE UN ANTISUERO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *S. PYOGENES* DE LOS SEROTIPOS M-1 Y M-3 ASOCIADOS A ENFERMEDADES INVASIVAS Y SÍNDROME DE CHOQUE TÓXICO

Márquez-Rosales MG,¹* Villaseñor-Sierra A^{2,*}^{1,2}Laboratorio de Microbiología Molecular. Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Guadalajara, Jalisco.

Objetivos: Producir un antisuero (AS) para identificar serotipos M-1 y M-3 asociados a enfermedades invasivas y síndrome de choque tóxico. **Materiales y métodos:** Para elaborar las vacunas, se usaron cepas de *S. pyogenes* de aislamientos clínicos de pacientes mexicanos, identificadas por la OMS como M-1 y M-3, y se inocularon a conejos de Nueva Zelanda acorde con protocolo de la OMS. Se extrajo proteína M para microprecipitación en capilar (PMC). Los títulos de anticuerpos y la serotipo-especificidad se evaluaron con la prueba bactericida indirecta (PBI) y la PMC, usando el AS con y sin adsorción. La PBI se expresó como índice bactericida (IB) e interpretó de acuerdo a Stollerman (< 25 a > 500) y la PMC de acuerdo a Lancefield (\pm a ++++). **Resultados:** Cepa M-1: vs AS homólogo IB = 1,657, PMC = (+++). vs AS heterólogo IB = 3.1, PMC (+). Cepa M3: vs AS homólogo IB = 1,643, PMC (+++). vs AS heterólogo IB = 5.3, PMC (+). **AS adsorbidos vs cepas homóloga y heteróloga:** Cepa M-1: vs ASAdM1 BI = 4.4, PMC = (\pm). vs ASAdM3 IB = 2,230, PMC = (+++). Cepa M-3: vs ASAdM3 IB = 1.2, PMC = (\pm). vs ASAdM1 IB = 1,511, PMC = (+++). Los AS diluidos 1:64 precipitaron en la PMC. **Conclusiones:** Se obtuvo AS serotipo específico y con títulos elevados contra *S. pyogenes* de serotipos homólogos. La adsorción eliminó los anticuerpos cruzados. El AS será probado para la tipificación de cepas de aislamientos clínicos de nuestro país.

E-13

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ÁCIDA SIMILAR A LA TRAP 5B DE OSTEOCLASTOS EN AISLADOS CLÍNICOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CAUSANTES DE OSTOMIELITIS CRÓNICA

Martínez Canseco CJ,* Franco-Bourland RE, Hernández Arellano MB, Hernández-Flores C, Méndez Heredia J. Bioquímica-Ortopedia, Centro Nacional de Rehabilitación, Secretaría de Salud.

Objetivos: Identificar y caracterizar una actividad de fosfatasa ácida en aislados clínicos de pacientes con osteomielitis crónica (OC) por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). **Material y métodos:** Se estudiaron 12 cepas de *S. aureus* aisladas del mismo número de pacientes adultos con OC. A partir de cultivos de estas cepas en fase de crecimiento estacionaria, se obtuvieron los sobrenadantes por centrifugación a 4,000 xg. Estos sobrenadantes fueron esterilizados por filtración a través de membranas Millipore de 0.2 μ y conservados a-20°C hasta su procesamiento. Las proteínas totales de los sobrenadantes fueron precipitadas con acetona ultrapura a-75°C durante 1 h y medidas por un micrométodo de Lowry. La actividad de fosfatasa ácida total (FA) de este extracto proteínico fue medida empleando dos sustratos: la a-naftil fosfato y el α -nitro-fenil fosfato (pNPP). El efecto del pH sobre esta actividad enzimática, así como los efectos del tartrato de sodio (50 mM), la heparina (20 U/ensayo) y el fluoruro de sodio (50 mM), estos últimos inhibidores conocidos de las isoenzimas de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) 5a y 5b, respectivamente, se determinaron empleando pNPP como sustrato. Además se midió la actividad de la enzima sobre el fosfato de naftol AS-BI en placas de agarosa a pH 5.0, empleando como reactivo acoplante Fast Garnet GBC. Después de 1 h a 37°C, una reacción positiva resulta en un precipitado color marrón en el sitio de aplicación de la proteína. **Resultados:** Los sobrenadantes de los cultivos de *S. aureus* presentaron tres niveles de actividad de FA en presencia de la α -naftil fosfato y del pNPP, tanto a pH 5.0 como a pH 6.1; no

hubo reacción con el naftol AS-BI. La actividad de FA fue resistente al tartrato de sodio y a la heparina, mientras que su inhibición con fluoruro de sodio fue parcial. **Conclusiones:** La actividad de FA, que sintetizan y secretan en la fase de crecimiento estacionaria los aislados clínicos de *S. aureus* en cultivo, se comporta cinéticamente como una TRAP 5b osteoclástica. Actualmente estamos valorando el impacto sobre su virulencia, de altas y bajas actividades de FA de diversas cepas de *S. aureus* en tibias de ratas con el propósito de generar un modelo experimental de OC.

E-14

PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEINAS SECRETADAS POR AISLADOS CLÍNICOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CAUSANTES DE OSTOMIELITIS CRÓNICA

Martínez Canseco CJ,* Franco-Bourland RE, Hernández Arellano MB, Hernández-Flores C, Méndez Heredia J. Bioquímica-Ortopedia, Centro Nacional de Rehabilitación. Secretaría de Salud.

Objetivo: Conocer el perfil de actividad caseinolítica, gelatinolítica y collagenolítica secretadas por aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) causantes de osteomielitis crónica (OC). **Material y métodos:** Se estudiaron 12 cepas de *S. aureus* aisladas de 12 pacientes adultos con OC. De cultivos almacenados en agar de soya y tripticaseína (ST) de estas cepas, se tomaron muestras de cada una de ellas, se inocularon en 10 mL de una infusión dializada de cerebro y corazón (D-BHI) y se incubaron a 37°C durante 18 h. Un mL de cada uno de los 12 cultivos se centrifugó, decantó y resuspendió en 250 μ L de una solución salina estéril, ajustándose la turbidez a un valor de absorbancia de 1.0 a 600 nm. Enseguida se alinearon 4 mL de cada una de estas soluciones en pequeñas muescas hechas sobre la superficie de placas de agar al 1.5% en D-BHI, preparadas con diferentes sustratos proteínicos: hemoglobina bovina (Hb) al 0.1%, gelatina bacteriológica al 1%, leche descremada al 1%, colágeno tipo I al 0.1% y colágeno tipo II al 0.1%. Se incubaron las placas a 37°C durante 18-24 h y se midieron los halos de proteólisis. **Resultados:** Las 12 cepas de *S. aureus* mostraron actividad caseinolítica, 9 cepas mostraron actividad gelatinolítica, 3 cepas presentaron actividad collagenolítica (tipo I y tipo II). De estas 12 cepas, 3 mostraron únicamente actividad caseinolítica, 6 mostraron actividades caseinolítica y gelatinolítica y 3 presentaron actividad caseinolítica, gelatinolítica y collagenolítica. Ninguna de las cepas hidrolizó Hb. **Conclusiones:** La caracterización de los perfiles de actividad proteolítica de nuestras cepas de *S. aureus* nos ha permitido identificar aquellas que poseen actividad collagenolítica. Suponemos que esta actividad debe contribuir a que estas cepas puedan invadir eficazmente tejido óseo y en consecuencia, de ser inoculadas en la tibia de ratas, obtenerse un modelo experimental de OC.

E-15

FRECUENCIA DE INFECCIÓN POR *HELICOBACTER PYLORI*/MEDIANTE LA PRUEBA DE UBT EN POBLACIÓN INDÍGENA NÁHUATL Y SU ASOCIACIÓN CON DQB1 DE HLA PARA LA BÚSQUEDA DE MARCADORES AMERINDIOS

Mendoza Camarillo Irma,*² González Valencia Gerardo,³ Camorlinga Ponce Margarita,³ Pérez Rodríguez Martha,⁴ Kretschmer S. Roberto Rodolfo,¹ Torres López F. Javier,^{3,*} ¹Unidad de Investigación Médica en Inmunología, HP CMN SXI, México D.F., ²Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, HP CMN SXI, México D.F.

Objetivos: Determinar la frecuencia de la infección de *H. pylori* en una población indígena Náhuatl y caracterizar polimorfismos de DQB1 para determinar la frecuencia de genes Amerindios en la población. **Material y métodos:** Se trabajó con 134 individuos voluntarios de Milpa Alta, ubicada al sur de la Cd. de México. Se realizó prueba de aliento (UBT) con carbono¹³ para diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Los pacientes con valores > 3.5 fueron considerados positivos y se les realizó la prueba de hilo, para intentar aislar a la bacteria. Se tomó muestras de sangre para extracción de DNA que amplificaron para el exón 2 del gene HLA-DQB1 y se analizaron con una técnica conformacional del DNA. El producto de PCR y el DNA de referencia (PCR de DQB1 marcado con fluorocromo) se desnaturizaron e hibridaron para obtener dúplex que se estudiaron en el secuenciador. **Resultados:** Se detectó infección por *H. pylori* en 91 (67.91%) individuos con 44 individuos resultaron negativos (32.08%). La edad promedio fue de 41.2 años (rango 17-97). En 83 de estos pacientes se realizó la prueba de hilo para recuperar *H. pylori*, sólo se logró recuperar 25 (30.12%) cepas de *H. pylori*. De las 73 muestras que se amplificaron para el exón 2 del gene HLA-DQB1, 43 muestras eran de pacientes infectados con *H. pylori*. De estos 43 infectados se obtuvieron 24 alelos y 33 alelos de DQB1*0402. Entre los no infectados se obtuvieron 19 alelos de DQB1*030101 y 14 alelos de DQB1*0402. **Conclusiones:** La frecuencia de infección en esta población Náhuatl es similar a la reportada en población general. Además, los marcadores genéticos de HLA empleados en el estudio indican la presencia de genes Amerindios en la población Náhuatl.

E-16

PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR *HELICOBACTER PYLORI* EN NIÑOS DE 2 A 16 AÑOS DE EDAD CON ENFERMEDAD ÁCIDO PÉPTICA EN EL HOSPITAL DE PEDIATRÍA, DEL CMN SIGLO XXI

¹Ramos-Vega I P,* ¹Corona-García E, ²Madrazo de la Garza A, ¹Torres J, ¹Gordillo-Pérez MG. ¹Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. ²Servicio de Gastroenterología del Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS.

Objetivo general: Determinar la prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en niños de 2 a 16 años de edad con enfermedad ácido péptica. **Material y métodos:** Estudio transversal descriptivo. Se seleccionaron los pacientes, de 2 a 16 años con enfermedad ácido péptica que ingresaron a la consulta de gastroenterología durante 1997-2001, con diagnóstico clínico de enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), gastritis, esofagitis. El diagnóstico de infección se hizo por cultivo de biopsia gástrica y por prueba de aliento (UBT). Se estudiaron como factores de riesgo la escolaridad de los padres el hacinamiento y la convivencia con animales. **Resultados:** Se estudiaron 282 niños, de 10 ± 4 años de edad. La relación entre sexo M:F fue de 1:1.3. Los pacientes tuvieron como diagnóstico endoscópico, gastritis antral-nodular, folicular, pangastritis (71.7%), esofagitis (12.2 %), úlcera (2.1%), duodenitis (3.5%). La prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en niños con enfermedad ácido péptica, fue por cultivo de 28% y por UBT de 34%. En niños < de 5 años fue de 6.5% y en > 5 de 27.5%. La escolaridad de los padres, el hacinamiento y la convivencia con animales, no fueron factor de riesgo para infección. **Conclusión:** En niños, la infección por *H. pylori* se asocia a enfermedad ácido péptica en el 34%. La úlcera péptica es rara en la población estudiada. No se identificaron factores de riesgo para infección en dicha población.

E-17

IDENTIFICACIÓN DE OTROS LOCUS GENÉTICOS EN *SAFMONELLA* DIFERENTES A FLAGELINA, INVOLUCRADOS EN LA INDUCCIÓN DE MACROPINOCITOSIS (MPC), FAGOSOMAS GIGANTES (FG), SOBREVIDA Y CITOTOXICIDAD (CTX) EN MACRÓFAGOS MURINOS

Ramírez Aguilar ML,* González Merchand J, Alpuche Aranda C. Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM y Microbiología Molecular, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.

La interacción de *Salmonella* con macrófagos (Mo), está considerada como un factor clave en su virulencia. Está demostrado que *S. typhimurium* induce en Mo murinos MPC y es fagocitada formando FG, la formación de MPC y FG se ha asociado a virulencia, porque la cepa avirulenta de *S. typhimurium* con mutación constitutiva (*phoP^c*), exhibe un defecto marcado para producir MPC, FG y capacidad de sobrevivir e inducir muerte en Mo murinos. Recientemente se ha identificado que mutantes de *Salmonella* en *flagelina*, pierden la capacidad de inducir MPC y FG. Sin embargo, *flagelina* purificada no es capaz de producir este fenómeno. Para mayor definición de la implicación directa de este efecto y la caracterización de otros elementos moleculares, nos propusimos identificar al menos otro locus genético involucrado en inducción de MPC y FG, diferente a *flagelina*. **Métodos:** Se construyó un banco de 2,000 mutantes de *S. typhimurium* por mutagénesis aleatoria con el transposición *TnphoA* para mutar genes de proteínas de membrana externa. Se infectó Mo murinos con las mutantes, incluyendo las cepas silvestre (Wt) y *phoP^c* como controles, visualizando por tinción y microscopía, MPC y FG. **Resultados:** hasta el momento analizamos 500 mutantes identificando 3 cepas móviles diferentes a *flagelina*, que muestran disminución en producción de MPC, FG, sobrevida y CTX en Mo murinos.

Cepas:	Mo:	MPC:	FG:	% de		% CTX:
				Índice	Sobrevida	
14028 Wt	104 ± 4	157 ± 27	73 ± 11	1.5	6X10 ³	95.5 ± 7
<i>phoP^c</i>	114 ± 16	33 ± 5	3 ± 1	0.29	1X10 ³	10.8 ± 2
627:: <i>TnphoA</i>	99 ± 4	62 ± 23	12 ± 7	0.6	3X10 ²	6.5 ± 1
628:: <i>TnphoA</i>	110 ± 4	32 ± 3	5 ± 3	0.28	4X10 ²	8.2 ± 1
1284:: <i>TnphoA</i>	112 ± 5	34 ± 13	3 ± 2	0.3	3X10 ¹	10.3 ± 1
<i>flicCflJB</i>	125 ± 1.7	23 ± 1.5	4 ± 2	0.18		4.8 ± 1
<i>Flg K</i>	125 ± 19	106 ± 34	40 ± 4	0.8		61 ± 1

Nuestros resultados muestran que las mutantes en *TnphoA* son móviles y muestran defecto en inducción de MPC, FG, CTX y sobrevida y no parecen estar relacionadas a *flagelina*. Mayor definición de estos locus genéticos, podrían evidenciar más proteínas co-adyuvantes a *flagelina* en la inducción de FG y MPC y relacionar estos fenotipos con la virulencia de la bacteria.

E-18

HETEROGENEIDAD EN LA ISLA DE PATOGENICIDAD DE *HELICOBACTER PYLORI* EN COLONIAS AISLADAS DE NIÑOS Y ADULTOS MEXICANOS

Reyes León A*,¹ Torres López J,¹ Puente García JL,² Vázquez Ramos A,² González Valencia G.¹ ¹Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Hospital de Pediatría. CMN Siglo XXI, IMSS. México, D.F. ²Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos.

Antecedentes: La isla de patogenicidad (*cag PAI*) de *H. pylori*, es de 37 Kb con 27 genes, algunos de ellos codifican para proteínas con homología a proteínas involucradas en sistemas de secreción tipo IV, por el cual se translocan factores de virulencia de *H. pylori* hacia las células epiteliales gástricas.

Objetivos: Determinar la heterogeneidad que existe en el contenido de genes de *cag PAI* en colonias de *H. pylori* aisladas de niños y adultos mexicanos.

Material y métodos: Se estudiaron 318 colonias de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas de antro y cuerpo, 200 fueron de 10 pacientes niños y 118 de 8 pacientes adultos. *H. pylori* se cultivó en agar sangre al 5% por 3 días a 37°C y 9% CO₂. La extracción de DNA se realizó por el método de Wizard. Se determinó la presencia de los genes *cagA*, *cagE*, *cagTy* *cag10* de *cag PAI* por Dot-Blot, las sondas se prepararon por PCR con DNA de la cepa de referencia 84-183 y se marcaron con [α -³²P] dCTP por random primer, los resultados se obtuvieron por autorradiografía. Los controles utilizados fueron DNAs de las cepas de referencia 84-183 (PAI +) y 86-313 (PAI -). La ausencia de *cag PAI* se confirmó por PCR. **Resultados:** En niños encontramos de 1 a 5 patrones distintos de presencia/ausencia de los 4 genes de *cag PAI* y en adultos de 1 a 6 patrones distintos. En niños de las 200 colonias de *H. pylori* estudiadas el 69% fueron positivas para la presencia de los 4 genes de *cag PAI*, el 27% para 3 genes, el 3% para 2 genes y el 1% para un gen. Así, en niños el 31% de las colonias tienen heterogeneidad en la presencia de los genes de *cag PAI*. En adultos de las 118 colonias el 52% tuvieron los 4 genes, el 3.4% 3 genes, el 3.3% un gen y el 40% ningún gen. Así, en adultos el 6.8% de las colonias tienen heterogeneidad en *cag PAI*. El gen más ausente en las colonias de *H. pylori* aisladas de niños y adultos fue *cag10*. **Conclusiones:** La heterogeneidad en el contenido de genes de *cag PAI*, es mayor en colonias aisladas de niños. La ausencia de *cag PAI* es más frecuente en colonias aisladas de adultos.

E-19

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA REGIÓN DE PROMOTORES DEL GEN *MURA* DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Rivera Gutiérrez S,* González Y Merchant JA. Departamento de Microbiología, ENCB, IPN.

Introducción: La estructura química de la pared celular de las bacterias confiere rigidez a la célula y la protege del choque osmótico. Así mismo, es una de las barreras de permeabilidad que poseen la mayoría de los microorganismos. El principal componente de la pared celular es la peptidoglicana, la cual se encuentra formada por N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. En la síntesis de dicha peptidoglicana se encuentran involucrados varios genes. El gen *murA* codifica para la enzima denominada UDP-N-acetyl glucosamin carboboxinil transferasa (2.5.1.7), también conocida como *MurA*, la cual cataliza la transferencia de un grupo enol éter desde el fosfoenolpiruvato al grupo 3'-OH de la UDP-N-acetilglucosamina, durante los primeros pasos de la biosíntesis de la pared celular de las micobacterias. El genoma de *M. tuberculosis* posee sólo una copia del gen *murA*. El objetivo del presente estudio fue analizar la región de promotores del gen *murA* en *M. tuberculosis*, para ayudar al entendimiento de la síntesis de peptidoglicana en dicha bacteria; y al mismo tiempo, buscar nuevos blancos para la fabricación de drogas más efectivas para el control de esta enfermedad. **Metodología:** Se trabajó con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, la cual se cultivó en caldo Dubos, se extrajo el DNA genómico y se realizó una reacción de PCR con los iniciadores específicos para amplificar la región de promotores del gen *murA*. Posteriormente se purificó el fragmento amplificado y se clonó en el vector pCRII. Así mismo, dicha región promotora se subclonó en un vector que contiene el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (pPFV27), el cual funcionó como gen reportero. Para la determinación del número y la localización de los sitios de inicio de la transcripción se realizó la técnica de "Primer extensión".

Resultados y discusión: Una vez que se obtuvieron las células recombinantes, se determinó la expresión de la región de promotores midiendo la intensidad de la fluorescencia mediante un fluorómetro, leyendo a una emisión de 485 nm y una extinción de 535 nm. De acuerdo con lo anterior se obtuvieron 16 colonias recombinantes y las cuales presentaban una señal de fluorescencia, y por lo tanto, poseían la región de promotores. Así mismo, se determinó que existe un único sitio de inicio de la transcripción para el gen *murA* de *M. tuberculosis*; dicho punto correspondió a una guanina. **Conclusiones:** Se encontró que existe un único sitio de inicio de la transcripción en la región de

promotores del gen *murA* y que dicha región de promotores se encuentra activa durante la fase logarítmica de crecimiento.

E-20

EXPRESIÓN DE RECEPTORES USADOS POR MICOBACTERIAS Y CO-RECEPTORES EMPLEADOS POR EL VIH Y CITOQUINAS EN PACIENTES CON TB Y VIH
 Rosas-Taraco A,* Arce-Mendoza A, Caballero Olín G, Rivera Morales L, Salinas Carmona M. Depto. Inmunología, Fac. Medicina y Fac. Ciencias Biológicas UANL y Clínica 28 IMSS, Monterrey, N.L.

La unión de *M. tuberculosis* al macrófago se lleva a cabo por la interacción de componentes de la micobacteria con la molécula expresadas en la superficie celular del macrófago, como CD11c y CD14, mientras CD40 interacciona con HSP70 de *M. tuberculosis*. Los co-receptores CCR5 y CXCR4 empleados por el VIH, juegan un papel importante en la inmunopatogénesis del virus. Las citocinas proinflamatorias regulan la respuesta inmune en ambas infecciones para una pronta resolución del problema. **Objetivo:** Determinar si pacientes con TB modifican los receptores empleados por micobacterias e incrementan la expresión de CXCR4 y CCR5 y viceversa en pacientes infectados con VIH, además, evaluar los niveles de citocinas proinflamatorias en suero de estos pacientes. **Material y métodos:** Sangre heparinizada y sueros fueron obtenidos de donadores sanos y pacientes infectados con TB, VIH, VIH-TB. La sangre heparinizada fue incubada con Acm: control de isótipo, CD11c-FITC/CD45-PE, CD14-FITC/CD45-PE, CD40-FITC/CD45-PE, CCR5-FITC/CD45-PE y CD45-FITC/CXCR4-PE, los eritrocitos fueron lisados y las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACsort. Los sueros fueron usados para determinar los niveles de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- δ y RANTES) por la técnica de ELISA. **Resultados:** Las células de pacientes con TBMDR disminuyeron la IMF (intensidad media de fluorescencia) de CD11c. El porcentaje de células CD14 $^{+}$ en pacientes con TBEP y TB-MDR fue disminuida, pero la IMF se incrementa. La expresión de CD40 fue disminuida en todos los pacientes con TB, mientras las células de pacientes con VIH incrementaron la expresión de CD40. Las células de pacientes con TBP incrementaron la expresión de CCR5 y CXCR4 en monocitos. Las células de pacientes con VIH disminuyeron la expresión CCR5 y CXCR4, pero el co-receptor CCR5 se incrementó en monocitos. Los niveles de IL-1 β e IL-6 se incrementaron en la mayoría de los grupos, excepto pacientes con VIH. TNF- α sólo se incrementó en los pacientes con TBEP y VIH. Mientras los niveles de RANTES disminuyeron en los pacientes con TBP. Finalmente, la producción de IL-8 fue elevada sólo en pacientes con TBMDR. **En conclusión:** El incremento en la IMF de CD14, posiblemente sea a que *M. tuberculosis* induce la expresión de esta molécula para asegurar un sitio de entrada a su célula huésped. Los niveles de CXCR4 y CCR5 se encuentran elevados en pacientes con TBP, quizás esto sea un factor importante en la susceptibilidad a una co-infección por VIH en estos pacientes. El incremento de CD40 en pacientes con VIH podría favorecer la producción de quimiocinas involucradas en el reclutamiento del macrófago. Los niveles de citocinas proinflamatorias en general se encontraron en niveles elevados en los grupos de pacientes.

E-21

AUSENCIA DE LA EXPRESIÓN DE mRNA DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37RV EN PRESENCIA DE FIERRO

Serafin-López J.* Méndez-Ortega P.* Chacón-Salinas R.* Muñoz-Cruz S,* Enciso-Moreno JA,* Estrada-Parra S,* Estrada-García I.*

*Departamento de Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.

*Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Centro Médico Siglo XXI IMSS.

Estudios clínicos muestran que hay una relación entre muertes por tuberculosis en la población negra de África con altos niveles de fierro (Fe) en bajo contenido principalmente en macrófagos. Además se conoce que los pacientes con HIV exhiben alteraciones en el metabolismo de Fe, que como consecuencia generan depósitos de este elemento en tejidos como pulmón e hígado favoreciendo el crecimiento de *Mycobacterium avium*, un patógeno común en estos pacientes. Estos y más estudios sugieren que un exceso de Fe juega un papel importante en la patogénesis de las infecciones micobacterianas. **Objetivo:** Conocer el efecto del fierro sobre el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* H37Rv. Analizar los mecanismos efectores del macrófago que son afectados por este elemento durante la infección. **Material y métodos:** El primer paso fue evaluar como el Fe afecta el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*. Para ello se infectaron macrófagos de ratón J774A.1 con un MOI de 10 bacterias por célula (10:1) y diferentes concentraciones de Fe: 5,25 y 50 μ M de Fe. Se hicieron cuentas viables a las 6,48 y 72h posinfección. El RNA total de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv sin o con Fe para analizar la expresión de mRNA de la enzima iNOS, TNF α y ferritina por Northern blot e IL-12 p35, IL-12 p40, IL-10, IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-6, IFN γ ,

MIF, L32 y GAPDH se analizaron por RPA. **Resultados:** Observamos que el fierro modifica el crecimiento intracelular de la micobacteria y que es diferente al crecimiento extracelular. De igual forma encontró que el crecimiento bacteriano es dependiente de la ausencia de mRNA de IL-1 α , IL-1 β e IL-6. **Conclusiones:** Se sugiere que las IL-1 α , IL-1 β e IL-6 desempeñan un papel importante para el control de la infección en el macrófago.

E-22

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL OPERÓN *PSTDE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Sáurez Sánchez F,* Espitia Pinzón C,* González y Merchand J.* Laboratorio de Microbiología Molecular, Dpto. de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN,¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM,² México, D.F.

Antecedentes: Recientemente se ha estudiado la expresión *in vitro* de algunos genes del operón *pst* de *M. tuberculosis*. En el vector pMV261 se subclonó un fragmento del operón el cual contiene 918 pb arriba del codón de inicio del gen *pstB* y a todo el operón *pst* fusionado al gen *lacZ*, creando el pJT19971. A partir del pJT19971, se construyeron los plásmidos pJT19972, pJT19973, pJT1997 y pJT19975, los cuales contienen distintas regiones del operón *pst*. Se transformaron células de *M. smegmatis* con cada uno de los plásmidos y estas células se crecieron en condiciones de alto y bajo fosfato. En el caso de *M. smegmatis* transformada con el pJT19971 en condiciones de bajo fosfato, se encontró un incremento en las unidades de β -galactosidasa respecto a las encontradas en condiciones de alto fosfato. El resultado sugirió la presencia de una región promotora dentro de los 918 pb que se encuentran corriente arriba del gen *pstB*. Se obtuvieron resultados similares con el pJT19972, al cual se le habían eliminado tanto los 918pb arriba del gen *pstB* como otros 402bp de su región codificante; estos últimos resultados sugieren la posible existencia de otra región promotora correspondiente posiblemente al gen *pstS*. **Objetivo:** Determinar la localización *"in vivo"* del(s) promotor(es) del operón *pst* de *M. tuberculosis* y su expresión en diferentes condiciones de crecimiento. **Metodología:** Se determinó la curva de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv cultivándola en condiciones de alto(36.7 mM) y de bajo fosfato(0.1 mM) y se eligieron 5-6 puntos de cada una de las curvas para realizar la extracción de RNA total y determinar el sitio de inicio de la transcripción (tsp) para los dos genes (*pstB* y *pstS*) mediante la técnica de "primer extensión" (extensión del iniciador). **Resultados:** Con respecto a la curva de crecimiento en presencia de alto y bajo fosfato, *M. tuberculosis* alcanzó la fase logarítmica a los 3-6 días de incubación y la fase estacionaria a los 12 días. La diferencia principal entre estas dos curvas fue que el crecimiento máximo (As) para alto fosfato fue de 2.6, mientras que para bajo fosfato fue de sólo 1.0. Se determinó el tsp para el gen *pstS*, el cual fue una guanina. Así mismo, se detectó la caja de fosfatos, la cual presenta cierta similitud con la secuencia propuesta para *Escherichia coli*. Al mismo tiempo se localizó el tsp para el gen *pstB*, pero debido a que se encuentra muy lejos del iniciador, no se pudo identificar el nucleótido, ni sus regiones río arriba. Ninguno de estos dos tsp se detectó durante el crecimiento de *M. tuberculosis* en alto fosfato. Al mismo tiempo se determinó la expresión de los genes *pstB* y *pstS-1* mediante RT-PCR en condiciones de alto y bajo fosfato, obteniendo señal sólo en condiciones de bajo fosfato.

E-23

POLIMORFISMO DEL GEN *CAGA* DE *HELICOBACTER PYLORI* EN CEPAS MEXICANAS DE NIÑOS Y ADULTOS Y SU RELACIÓN FILOGENÉTICA CON CEPAS DE OTRAS ZONAS GEOGRÁFICAS.

*Torres M. Araceli^{1,2}, Giono C. Silvia², Camorlinga P. Margarita¹, González V. Gerardo¹, Torres L. Javier¹. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias¹ CMN Siglo XXI. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN²

Introducción: *H. pylori* (*Hp*) está presente en el estómago en más del 50% de la población mundial y es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. Pacientes con cepas *cagA+* aumentan el desarrollo de cáncer en países occidentales, en países asiáticos, se ha encontrado que la infección con cepas *cagA+* no es un marcador útil de virulencia. La proteína CagA varía de tamaño; esta variación correlaciona con la presencia de un número variable de secuencias repetidas (R1=5, R2=14 y R3= 49 aa) localizadas en el extremo 3' del gen. Dentro de R3 se localiza una secuencia de 15 aa diferentes en cepas occidentales y asiáticas. En cepas mexicanas no se conoce el polimorfismo dentro de esta región del gen y la diferencia con cepas de otras regiones geográficas. **Objetivo:** Analizar el polimorfismo del extremo 3' del gen *cagA* en cepas de *Hp* aisladas de niños y adultos mexicanos y observar su relación filogenética con cepas de otras zonas geográficas. **Método:** Se amplificó por PCR la región 3' del gen *cagA* en 12 cepas de *Hp* aisladas de 5 adultos y 7 niños mexicanos y de las cepas de referencia 26695 (UK) y J99 (USA). Se realizó secuenciación automatizada de los productos. Las secuencias fueron

comparadas con las de otras zonas geográficas ya reportadas en el Genbank. El polimorfismo y el análisis filogenético se realizó con los programas DNAsP3.5 y MEGA2.0. **Resultados:** Se observaron diferentes tamaños de los productos de PCR en las cepas de *Hp* mexicanas con respecto al producto de cepas de referencia. Las secuencias mostraron la inserción y delección de 1 aa en R3 y cambio de 1 aa en R1 en una cepa de adulto y una de niño. Dos cepas aisladas de niños mostraron una distribución de repetidos diferente a lo reportado en trabajos anteriores. **Conclusiones:** Las secuencias del extremo 3' del gen *cagA* de *Hp* de cepas de niños y adultos mexicanos tienen una similitud promedio de 96 % con otras secuencias de origen latino y una similitud promedio de 91 % con cepas asiáticas. Se observó mayor polimorfismo en cepas aisladas de niños que de adultos. El análisis filogenético del extremo 3' del gen no agrupa a las cepas mexicanas dentro de los grupos descritos en otras zonas geográficas.

E-24

DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE PERSISTENCIA PARA *ESCHERICHIA COLI*/ENTEROPATÓGENA TÍPICA

Vázquez López HG,¹ López Saucedo C, Estrada García T.¹ Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN. México, D.F.

Introducción: *Escherichia coli* enteropatogénica típica (EPEC) es una de las causas principales de diarrea bacteriana infantil en países subdesarrollados, este grupo patógeno afecta principalmente a infantes menores de 2 años y preferentemente a menores de 6 meses. En estudios con voluntarios adultos se observó, que las dosis infectivas de EPEC para producir diarrea son altas (10^8 a 10^{10} UFC) y en infantes es desconocida. Basados en estudios *in vitro* y de biopsias de intestino se ha observado que EPEC típica se une al enterocito formando microcolonias, este patrón de adhesión es dependiente de la fimbria (bfp), posteriormente a la unión se observa la característica lesión de adhesión y esfacelamiento de las microvellosidades intestinales (uno de los factores responsables de esta lesión es la intimina). Sin embargo, se carece hasta el momento de un modelo animal *in vivo*, que nos permita reproducir los eventos de adhesión y formación de lesión A/E de EPEC típica por un lado, y que además permita saber cuándo y cuáles son los genes de la bacteria que están participando y que por otra parte reconozcamos cuáles son los eventos de la respuesta inmune que se desencadenan en presencia de la bacteria. **Objetivo:** Desarrollo de un modelo murino de persistencia con cepas de EPEC típicas. **Métodos:** Diferentes cepas de ratones fueron inoculados orogástricamente con diferentes concentraciones de la cepa EPEC B171. La persistencia en heces de la bacteria se demostró utilizando un PCR múltiple que identifica la presencia de 2 genes característicos de EPEC típica *bfp* y *eaeA* para la intimina. **Resultados:** Los ratones de las cepas BALB/C, C57 Y KO CD40L se inocularon con concentraciones de 1×10^8 y 5×10^8 UFC. Observándose persistencia hasta de 6 días en los ratones KO CD40L con la concentración

de 1×10^8 , mientras que la cepa de ratones C57 con la concentración 5×10^8 UFC mostró persistencia de tan sólo 48 h. **Conclusiones:** El modelo murino de persistencia de EPEC más prometedor parece ser el de las cepas de ratón KOCD40L debido a la alta persistencia observada (6 días). Lo que hay que demostrar ahora es, si en efecto se observa la formación de las microcolonias y la lesión A/E, dos características de la EPEC típica.

E-25

EFECHO DE LA ACTIVACIÓN DE MAPK CINASAS SOBRE EL DAÑO AL CITOESQUELETO INDUCIDO POR PET, SERINA-PROTEASA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA

Villaseca Flores JM,^{1*} Vázquez Alatorre S,¹ Torres-Márquez ME,² Molina López J,¹ Hernández Chiñas U,¹ Cravioto Quintana A,¹ Eslava Campos C.¹ Deptos: 1 Salud Pública; 2 Bioquímica; Fac. Medicina UNAM, CD. Universitaria, México D.F.

Pet (Plasmid-encoded toxin) es una proteína secretada por *Escherichia coli* enteroaggregativa (EAEC), la cual produce alteraciones de la membrana celular y rompimiento de proteínas del citoesqueleto. El daño celular se caracteriza por alteración en las uniones intercelulares, disminución de los contactos de adhesión focal, disminución de las fibras de estrés de actina y el rompimiento de la espectrina/fodrina. Pet activa la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK); cascada de señalización que regula una gran variedad de actividades celulares. **Objetivo:** Determinar la relación entre la activación de las MAPK y el daño al citoesqueleto inducido por Pet. **Métodos:** Células HEp-2 en cultivo fueron tratadas con Pet e incubadas a diferentes tiempos. De manera alterna, cultivos de células tratadas en las mismas condiciones se incubaron además con los inhibidores SB203580 para MAPK³⁸ y PD98059 para MAPK^{42/44}. Células libres de toxina e inhibidores y células sólo con inhibidores se utilizaron como controles. Por la técnica de FAS se analizaron las fibras de estrés de actina. Con anticuerpos anti-espactrina/fodrina marcados con fluoresceína se observaron las alteraciones del esqueleto membranal. Células en suspensión tratadas con toxina e inhibidores para MAPK fueron rotas y las membranas analizadas por inmunotransferencia para determinar la degradación de la molécula de fodrina. **Resultados:** Las células tratadas con la toxina sola o en combinación con los inhibidores para MAPK muestran desarreglo y disminución de las fibras de estrés de actina, sin embargo, las alteraciones fueron más intensas en presencia de los inhibidores. La fodrina y la actina presentaron una distribución irregular en las células tratadas con la toxina. Con respecto al efecto de degradación de la fodrina, éste fue mayor en las células tratadas con Pet en presencia de los inhibidores de MAPK. **Conclusiones:** Los resultados muestran que la activación de MAPK inducida por Pet, es una respuesta protectora de sobrevivencia celular al estrés tóxico, ya que la activación de estas cinasas disminuye el daño al citoesqueleto. Es probable que dependiendo de la intensidad en la activación de las MAPK la célula sobreviva o entre a un estado de apoptosis, y esto se vea reflejado en la intensidad del daño celular.

