

TESIS DEFENDIDA POR

**Biol. Daniela Alejandra Munro Rojas**

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

*Director del Comité*

---

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

*Miembro del Comité*

---

Dr. Oscar Sosa Nishizaki

*Miembro del Comité*

---

M.S.P. Rafael Laniado Laborin.

*Director del Comité*

---

Dra. Mónica Rodríguez

Hernández

*Coordinador del programa en  
Acuicultura y biotecnología.*

---

Dr. Federico Graef Ziehl

*Director de Estudios de Posgrado*

30 de Marzo del 2005

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE EDUCACION SUPERIOR  
DE ENSENADA



---

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN  
BIOTECNOLOGIA MARINA

---

**ANALISIS DEL EFECTO DE TOXINAS DE *Anthopleura elegantissima*, *Conus californicus* Y *Auronoctonus phaiodactylus* EN *Mycobacterium tuberculosis*.**

TESIS

Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

**Daniela Alejandra Munro Rojas**

Ensenada, Baja California, México. Marzo 2005.

**ABSTRACT** from the Thesis presented by **Daniela Alejandra Munro Rojas**, as a partial requirements to obtain the **Master in Science** degree with orientation in **MARINE BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California, Mexico. March 2005.

**“ANALYSIS OF THE EFFECT OF WHOLE VENOM AND TOXINS FRACTIONS FROM *Anthopleura elegantissima*, *Conus californicus* AND *Auronoctonus phaiodactylus* AGAINST *Mycobacterium tuberculosis*”.**

*Resume approved by*

---

PhD. Alexei F. Licea Navarro  
Thesis Director

The increasing incidence of tuberculosis in immuno-compromised persons and the emergence of multidrug-resistant strain over world have highlighted the importance of screening effective novel drugs against *Mycobacterium tuberculosis*.

The treatment of TB requires a multidrug regimen administrated over a long period of time, and a high level of compliance with therapy. At least 2% of tuberculosis is caused by multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) and the cure rate of MDR-TB is reduced to less than 60. The screening of peptides and toxins from organism or natural products to struggle this problem in the last years is a great hit to discover novel drugs against microorganism resistant. In this field certain taxonomic groups have developed special chemical strategies for the interaction with other organisms in their environment. *Conus californicus*, *Auronoctonus phaiodactylus* and *Anthopleura elegantissima* are predators, they produce venoms with a remarkable diversity of pharmacologically active peptides, their targets are ion channels and receptors, and some others components having activity and specify. In this study, the activities of crude venom and fractions isolates from the venom apparatus of *Conus californicus* (Conus), the venom of *Auronoctonus phaiodactylus* (scorpion) and the extraction with ethanol 30% of *Anthopleura elegantissima* (Anemone) were investigated against strain H37RV of *Mycobacterium tuberculosis*. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by colorimetric method MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-difenil bromide of tetrazolium) and Blue Alamar. It was found activities from the crude extract of anemone with MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of 40 mg/ml, the crude extract of conus with 20 mg/ml and 7.5 mg/ml depending the method employed, and with the fraction I of anemone by SEC (Size Exclusion Chromatography) and the fraction II of conus by HPLC with a MIC of 400 µg/ml. We also found an activity in the fraction from 15 to 20 minutes obtained by HPLC (High pressure liquid chromatography) from the fraction I by SEC with a MIC 1.45 µg/ml, but we did not find any activity with the venom of the scorpion. Besides it was carried an analysis by PCR (Polymerase Chain Reaction) and RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) of 96 clinical isolates for identification of species and epidemiologic data base of the Hospital General of Tijuana B.C. México.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, toxins, RFLPs, PCR.

**RESUMEN** de la Tesis de **Daniela Alejandra Munro Rojas** presentada como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** con orientación en **BIOTECNOLOGIA MARINA**, Ensenada, Baja California, México. Marzo del 2005.

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DE TOXINAS DE *Anthopleura elegantissima*, *Conus californicus* Y *Auronoctonus phaiodactylus* EN *Mycobacterium tuberculosis*”.**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Alexei F. Licea Navarro  
Director de Tesis

El incremento de Tuberculosis en personas inmuno deprimidas y el surgimiento de cepas multidrogo-resistentes en todo el mundo, ha originado la búsqueda de nuevos medicamentos contra *Mycobacterium tuberculosis*. El tratamiento contra Tuberculosis consiste de una terapia administrada por largos periodos, los cuales en su mayoría son agresivos y como consecuencia provocan efectos secundarios. Al menos el 2 % de la tuberculosis es causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogo-resistente (MDR-TB) cuya tasa de recuperación o cura de los pacientes es menos del 60%. En los últimos años, la búsqueda de péptidos y toxinas a partir de organismos o productos de origen natural para combatir este problema es uno de los objetivos para el descubrimiento de nuevos fármacos que ataquen microorganismos resistentes a antibióticos. En este campo, ciertos grupos taxonómicos han desarrollado estrategias de origen químico para interactuar con otros organismos en su ambiente ya sea como defensa o para depredación. Los agentes usados por estos organismos constituyen una gran variedad de moléculas con características bioquímicas diferentes especializadas para cada grupo, muchas de ellas son de origen peptídico dirigidos receptores y canales iónicos. En esta investigación, se realizó el análisis del extracto crudo y fracciones obtenidas del veneno de *Auronoctonus phaiodactylus* (Alacrán), *Anthopleura elegantissima* (Anémona) y *Conus californicus* (Conus) en la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. Las concentraciones mínimas inhibitorias (MCI) fueron determinadas por los métodos colorimétricos MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- difenil bromide of tetrazolium] y Azul Alamar (AA). Se encontró actividad antifúngica del extracto crudo anémona, con una CMI (concentración mínima inhibitoria) de 40 mg/ml, del extracto crudo de Conus a 20 mg/ml y 7.5 mg/ml, dependiendo del método empleado; con la fracción I de anémona por cromatografía de exclusión molecular (SEC), y la fracción II de conus por HPLC ambas con una CMI de 400 µg/ml. También fue posible detectar actividad en la fracción por HPLC (cromatografía líquida de alta presión) de 15 a 20 minutos a partir de la Fracción I de anémona por SEC, a una CMI de 1.45 µg/ml. Para el caso del veneno de alacrán no se detectó actividad antifúngica. Además, se realizó un análisis por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y por RFLPs (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción), para la identificación de especies y un análisis epidemiológico a nivel molecular de 96 aislados clínicos del Hospital General de Tijuana B.C. México.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, toxinas, RFLPs y PCR

*A PADRES*

*Ma. Del Carmen Rojas Graduño*

*Daniel Munro Olmos*

*A MIS HERMANAS*

*Abril Munro*

*Celeste Rojas*

*MIS SOBRIJNOS*

*Celes, Emmy, Juan y Ale*

*A MI PAREJA*

*Alejandro Franco*

*A mi profesor*

*Hector Morales*

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis el Dr. Alexei F. Licea Navarro por su apoyo, paciencia y confianza durante la realización de este trabajo y algo mas importante su amistad.

A la Dra. Iris Estrada del Departamento de Inmunología del Instituto Politécnico Nacional, por permitirme realizar gran parte del trabajo experimental de esta investigación en su laboratorio, además del apoyo que me ofreció durante mi estancia en la ciudad de México.

A la M.C. Patricia Mendez Aragon, por su ayuda en el trabajo experimental, en los bioensayos y en los RFLPs, sus consejos, y su apoyo en mi estancia en el DF y por supuesto por la gran amistad que surgió.

A la Dra. Clara Espitía Pinzon, del departamento de Inmunología de Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar parte del trabajo experimental en su laboratorio, a Ingrid Cohen y Martha que me apoyaron en la realización y captura de imágenes de los RFLPs.

Al Dr. Montoro del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", por recibirme en su laboratorio, por sus consejos y apoyo durante mi estancia en Cuba, así como a la Dra. Dihadenys Lemus, por sus enseñanzas y asesoría en los métodos colorimétricos, y la sincera amistad que me ofreció y a Migue por su ayuda y los buenos momentos que pase en Cuba.

A mis sinodales, la Dra. Elizabeth Ponce, el Dr. Oscar Sosa y el M.S.P. Rafael Laniado por sus comentarios, asesoría, paciencia y disposición durante las exposiciones de los avances de la investigación y sus aportaciones en el escrito.

Al M.C. Eduardo Morales por su gran ayuda y disposición en el HPLC.

A mis compañeros de laboratorio, Carlo por enseñarme a extraer el veneno y hacer cromatografías, a Gaby Prior por su ayuda con las Anémonas, a Sujey, Karla, Amanda, Mario, Alhelí, Bernardo, y Tanya.

A mis compañeros y amigos de colecta, Carlo, Karla, Amanda, Alhelí, Mario, Glenda y Alejandro.

A Glenda Castro, Mario Navarro, Amanda Davila, Héctor Ocampo y Amayali, los mejores amigos que tuve la suerte de encontrar en estas tierras del Norte. A mis amigos en tierras michoacanas, Maritelmá, Julieta, Valeria, Luis Antonio, David, Salvador, Erick, Martha, Carlos, Ruth (aunque vivas en Francia sigues en Michoacán) y Cederick, Todos ustedes me siguen confirmando que la amistades se pueden conservar aun después de la distancia y el tiempo.

A Araceli Olvera, Estelita, Jeannette, Rommel, Angel, Alberto, Mayra y al resto del laboratorio de la Dra. Iris Estrada, así como a Ingrid, Antonio, Martha, Pedro y el resto del laboratorio de la Dra. Clara Espitía por todo el apoyo y amistad que me ofrecieron.

A Alejandrina que a pesar de tanto trabajo siempre ha tenido el tiempo suficiente para atenderme y ayudarme en los trámites que se han requerido, siempre amable. Gracias.

A mis compañeros de generación y profesores por ayudar en mi formación.

Al profesor Héctor Morales, el primero que me hablo de ADN y me hizo reflexionar sobre mi futuro, aunque el tiempo me gano la batalla y ya no tuve la oportunidad de darle este trabajo.

A mis padres por todo su apoyo durante tantos años, por que si algo aprendí es su espíritu de lucha, y más que nada por el amor que me tienen, gracias por estar ahí siempre.

A mi hermana Abril, por que si algo me da seguridad es tu voz y tu temple. A mi hermana Celeste, aunque tienes muchas responsabilidades se que siempre estas al pendiente de mi.

A mis sobrinos Celes, Emmy, Juan y Ale, por ustedes se que los ángeles existen.

A la familia Franco Rivera, mis compadres Hugo y Roxxini, por su apoyo durante estos años.

A Alex simplemente por ser como eres, por permitirme estar a tu lado y conocerte cada día más, por tu apoyo, tu amor, por ser parte de mi vida y el cimiento mas fuerte que me ha permitido no derrumbarme en tiempos difíciles.

Beca Crédito del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para estudiar la maestría con el número de registro 171340



## Lista de Abreviaciones

Å: Amstrong	HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión
AA: Azul Alamar	IS3 : Familia de secuencias de inserción
ADN: Ácido desoxirribonucleico	IS986: Secuencia de inserción
ATX: Péptidos de <i>A. Sulfata</i>	IS987: Secuencia de inserción
B.C.: Baja California.	IS1081: Secuencia de inserción
MgCl <sub>2</sub> : Cloruro de Magnesio	IS1561: Secuencia de inserción
CMI: Concentración mínima inhibitoria	IS6110: Secuencia de inserción
CP: Capreomicina	K <sup>+</sup> : ión potasio
CS: Cicloserina	Kb: Kilobases
° C : Grados centígrados	KDa: Kilodalton
DMF: Dimetilformamida	Km: Kilómetro
DMSO: Dimetil sulfóxido	l: litro
dNTPs: Deoxinucleótidos trifosfatados	LJ-M: Lowenstein Jensen modificado
E: Etambutol	LD50: Dosis letal media
ECA: Extracto crudo de anémona	M: Molar
ECAL: Extracto Crudo de alacrán	MDR: Multidrogo resistente
ECC: Extracto crudo de conus	mg: miligramos
ETH: Etionamida	mm: milímetros
F1A: Fracción 1 de anémona por SEC	mM: milimolar
F2A: Fracción 2 anémona por SEC	ml: mililitros
F3A: Fracción 3 de anémona por SEC	mpcA: gen que codifica para fosfolipasa C
F1C: Fracción 1 de conus por HPLC	mpcB: gen que codifica para fosfolipasa
F2C: Fracción 2 de conus por HPLC	MscL: Canal mecanosensible de alta conductibilidad
g: Gravedades	MTT: (3-4(4,5)-dimetiltriazol-2-1)-2,5 difenil bromuro de tetrazolio)
H: Isoniacida	<i>mtp40</i> : gen que codifica MTP40

H37Rv: Cepa tipo de <i>M. tuberculosis</i>	MTP40: proteína de 134aa de <i>M. tuberculosis</i>
HCl: ácido clorhídrico	MTB: oligonucleotidos para PCR
HindIII: enzima de restricción	<i>murA</i> : secuencia de Micobacterias
	NaCl: Cloruro de sodio
NADH: Nicotin Adenina dinucleótidos	SSC: Solución de sales de citrato
NADPH: Nicotin Adenin difosfato	SSPE: Solución de sales fosfato y EDTA
nm: nanómetros	TB: tuberculosis
nM: nanomolar	TC: control de crecimiento
NaOH: Hidróxido de sodio.	TCM: control de esterilidad del medio
NCBI: National center of biotechnology I.	T: tiacetazona
Na <sup>+</sup> : Ion Sodio	TDM: a-a trehalosa dimicolato
ng: nanogramos	TM: temperatura de alineamiento
OADC: ácido oleico albúmina dextrosa catalasa	TM1: hélice transmembranal de MscL
OmpATb: porina	TM2: hélice citoplasmática de MscL
OMS: Organización mundial de la salud	TFA: ácido trifluoroacético
PAS: ácido paraaminosalicilico	U: unidades
pb: pares de bases	UV: Ultravioleta
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa	VI: viomicina
pH: potencial hidrógeno	VIH: Virus de inmunodeficiencia humana
<i>pncA</i> : gen de <i>M. tuberculosis</i>	V: volts
PPD: prueba de hipersensibilidad a la tuberculina	Z: pirazinamida
PVUII: enzima de restricción	μ: micras
R: rifampicina	μ l: microlitros
RAC: oligonucleótidos	μ g: microgramos
RD4: oligonucleótidos	μ M: micromolar
RFLP: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción	% de GC: porcentaje de Guaninas y citocinas
RNAr: ácido ribonucleico ribosomal	γ: gamma

rrnA: operon de *M. tuberculosis*

$\alpha$ : alfa

r.p.m.: revoluciones por minuto

$\beta$ : beta

S: svedberg o estreptomicina

$\Sigma$ : suma o combinación de fracciones

s: segundos

SDS: sodio duodecil sulfato

SEC: Cromatografía de Exclusión  
molecular

## CONTENIDO

	Páginas
I. Introducción.....	1
I.2. Canales iónicos en micobacterias.....	6
II. Antecedentes.....	9
II.1. Epidemiología.....	9
II.2. Métodos de diagnóstico.....	12
II.3. Tratamientos.....	18
II.4. Toxinas.....	24
III. Justificación.....	30
IV. Objetivos.....	32
IV.1. Objetivo General.....	32
IV.2. Objetivos Particulares.....	32
V. Metodología.....	33
V.1. Cepas.....	33
V.2. Extracción de ADN y caracterización de las cepas.....	33
V.3. Caracterización por PCR.....	35
V.4. Caracterización por RFLPs.....	37
V.4.1. Digestión de ADN cromosomal por PVUII.....	37
V.4.2. Separación de los fragmentos de ADN por electroforesis.....	38
V.4.3. Estimación de la concentración de ADN.....	38
V.4.4. Southern blotting.....	39
V.5. Colecta de organismos.....	43
V.6. Extracto Crudo.....	44
V.7. Separación de fracciones por cromatografía.....	44
V.7.1. Separación por cromatografía por exclusión molecular.....	44
V.7.2. Separación por cromatografía líquida de alta presión.....	46
V.8. Evaluación de la actividad antibacteriana.....	46
V.8.1. Preparación del inóculo.....	47
V.8.2. Preparación de los extractos.....	48
V.8.3. Montaje de la placa.....	50
V.8.4. Revelado de la placa.....	51
V.8.5. Lectura e interpretación de los resultados.....	51

## CONTENIDO (Continuación)

	Páginas
VI. Resultados.....	53
VI.1. Caracterización de las cepas por PCR.....	53
VI.2. Caracterización de las cepas por RFLPs.....	56
VI.3. Separación de Fracciones de los Extractos Crudos.....	64
VI.3.1. Cromatografía por exclusión molecular.....	64
VI.3.2. HPLC.....	66
VI.4. Evaluación de la actividad antibacteriana.....	76
VII. Discusiones.....	85
VII.1. Caracterización de las cepas.....	85
VII.2. Extractos y Fracciones.....	88
VII.3. Evaluación de la actividad antifúngica.....	89
VIII. Conclusiones.....	94
IX. Bibliografía.....	95

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Páginas</b>
1	Membrana de <i>Mycobacterium</i> , peptidoglicanos, ácidos micólicos y glicolípidos	3
2	Mapa de las regiones con mayor incidencia de tuberculosis y de las regiones con epidemias causadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> multiresistente a antibióticos	5
3	Estructura tridimensional del canal MscL de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> izquierda vista lateral, derecha vista frontal	8
4	Mapa de las regiones afectadas por tuberculosis, mostrando en diferentes tonalidades el número aproximado de casos en cada región	10
5	Mecanismo de acción de isoniazida	19
6	Mecanismo de resistencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a isoniazida	20
7	Tasa de resistencia primaria a cualquier medicamento antimicrobiano o de multiresistencia en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de pacientes de treinta y cinco países.	21
8	Descripción de las tasas de resistencia primaria y secundaria de tuberculosis en México.	22
9	Estructura de Alpha-conotoxina de <i>Conus imperialis</i>	27
10	Amplificación de las cepas 16, 21, 28, 59 con los oligonucleótidos RAC carril y con los oligonucleótidos MTB	53
11	Amplificación de las cepas 16, 21, 28, 59, 74 y 92 con los oligonucleótidos RD4.	54
12	Amplificación de las cepas 16, 21, 28, 59, 74, 92, 98, 100 Y 116 con los oligonucleótidos Mtp40	54

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<b>Figura</b>		<b>Páginas</b>
---------------	--	----------------

13	Extracción de ADN de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	57
14	Digestiones de ADN cromosomal de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	57
15	Digestiones de ADN cromosomal de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	58
16	PCR de un fragmento de 245 pb de la secuencia de inserción IS6110	59
17	RFLPs de las cepas clínicas	60
18	RFLPs de las cepas clínicas	60
19	Dendograma de la hibridación por IS6110 de la cepas clínicas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> analizadas	63
20	Cromatografía de exclusión molecular del extracto crudo de anemone	64
21	Exclusión molecular del extracto crudo de Alacrán	65
22	Cromatograma del HPLC fase reversa del extracto crudo de Conus	66
23	Fracción I de Anémona separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa	67
24	Fracción II de Anémona separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa	68
25	Fracción III de Anémona separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa	70
26	Fracción I Alacrán separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa	71

#### LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<b>Figura</b>		<b>Páginas</b>
27	Fracción II Alacrán separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa	72

28	Fracción III Alacrán separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa	73
29	Fracción IV Alacrán separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa	74
30	Fracción V Alacrán separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa	75
31	Prueba de toxicidad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con extractos crudos, fracciones por exclusión molecular de anémona, alacrán y HPLC de Conus	78
32	Prueba de toxicidad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> fracciones de HPLC de conus y Fracción I SEC de anémona	79
33	Prueba de toxicidad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> fracciones de anémona por HPLC de la fracción I SEC de anémona	80
34	Fracciones por minuto por HPLC de la Fracción I SEC de anémona.	81
35	Prueba de toxicidad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con fracciones de HPLC de la fracción I SEC de anémona	82
36	Prueba de toxicidad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con fracciones de HPLC de la fracción I SEC de anémona	82
37	Prueba de toxicidad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con fracciones de HPLC de la fracción I SEC de anémona	82

#### LISTA DE TABLAS.

Tabla		Página
I	Nombre y secuencia de los oligonucleótidos empleados para la caracterización de las cepas	37



II	Concentración del stock, y el rango de concentraciones probadas de extractos crudos y fracciones de exclusión molecular de Anémona, y por HPLC de Conus por medio del ensayo MTT	48
III	Concentraciones del Stock, y rango de concentraciones de extractos crudos, y fracciones de exclusión molecular y HPLC de anémona, y HPLC de conus probadas por medio del ensayo Azul Alamar.	49
IV	Resultados de los PCR en los aislados clínicos	55
V	Componentes detectados a 230nm en un HPLC de la fracción I de anémona	68
VI	Componentes detectados a 230nm en un HPLC de la fracción II de anémona	69
VII	Componentes detectados a 230nm en un HPLC de la fracción III de anémona	70
VIII	Componentes detectados a 230nm en un HPLC de la fracción I Alacrán	71
IX	Componentes de la Fracción II de alacrán detectados a 230nm.	72

#### LISTA DE TABLAS (Continuación)

Tabla		Página
X	Componentes de la Fracción III de alacrán detectados a 230nm	73
XI	Componentes de la Fracción IV de alacrán detectados a 230nm	75

XII	Componentes de la Fracción V de alacrán detectados a 230nm	76
XIII	Fracciones probadas en los bioensayos y concentraciones	82
XIV	Fracciones de Anémona, minuto de colecta y max. Concentración, probadas en bioensayos contra micobacterias	83
XV	Fracciones de conus, minuto de colecta y max. Concentración probadas en los bioensayos	84

## I. INTRODUCCIÓN.

El género *Mycobacterium* comprende un grupo de microorganismos muy diverso, de amplia distribución en la naturaleza. Se han descrito más de 100 especies, 25 de las cuales han sido identificadas como agentes infecciosos frecuentes para el hombre. (Cortinas *et al.*, 2002).

El mayor logro del trabajo de Roberto Koch en el campo de la bacteriología médica está relacionado con la tuberculosis (TB). Aunque la obtención de cultivos puros para Koch no fue fácil, logró obtenerlos sobre suero de sangre coagulada y posteriormente en Agar, anunciando al mundo su descubrimiento en Berlín en 1882 (Madigan *et al.*, 1999).

La tuberculosis es, sin duda alguna, una de las entidades infecciosas que más preocupa a las autoridades sanitarias mundiales en la actualidad. De acuerdo con las estadísticas oficiales de la Organización Mundial de la Salud, casi un tercio de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*. Es más, tan sólo en 1996 fueron reportados 7 millones de casos nuevos y fallecieron por esta causa cerca de dos millones de personas, lo que representa un 6% de la mortalidad global por año. Si bien, hasta hace algunos años la enfermedad parecía confinada a regiones geográficas específicas, como el sudeste asiático o el África subsahariana, hoy en día se ha diseminado de manera alarmante por todo el planeta, adquiriendo proporciones importantes incluso en varios países industrializados, donde su incidencia durante el último lustro se ha triplicado (Zumbla *et al.*, 1999).

El aumento de la incidencia se le ha atribuido a tres factores, la migración, la diseminación de la infección causada por el VIH y al surgimiento de cepas multirresistentes a antibióticos (Caminero, 2001).

El material genético de *M. tuberculosis* consta de 4,411,529 pares de bases con un alto porcentaje de G-C y con 4402 genes, con varias secuencias de inserción utilizadas para la identificación y análisis epidemiológico de gran importancia para el estudio de la diseminación de la tuberculosis (Alberts *et al.*, 2000); (Cole *et al.*, 1998).

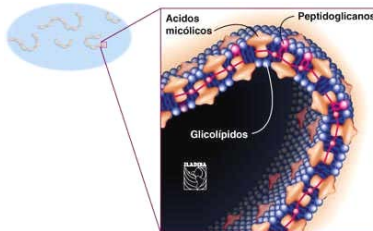
*M. tuberculosis* es un bacilo delgado, de forma ligeramente curvada, con una longitud que oscila entre 1 y 4  $\mu\text{m}$  y 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho.

La característica química más sorprendente de la micobacteria es su contenido en lípidos en cantidades que varían de un 20 a un 40% de su peso seco, en donde la pared celular contiene el porcentaje más alto (60%) (Landeros, 2000).

El género *Mycobacterium* comprende organismos bacilares que en algún momento de su crecimiento poseen la propiedad distintiva de la tinción ácido-alcohol resistente. Esta característica se debe a la presencia en la superficie de la célula micobacteriana de lípidos especiales llamados ácidos micólicos, que se encuentran sólo en el género *Mycobacterium*. La pared celular de la micobacterias, contiene un peptidoglicano que está unido mediante enlaces covalentes a un polímero de ácido micólico-galactosa-arabinosa. Este complejo lípido-polisacárido-peptidoglicano, proporciona el carácter hidrofóbico a la superficie de la célula, además, posee un alto contenido de glicolípidos, en

particular  $\alpha$ - $\alpha'$ -trehalosa dimicolato (TDM) y  $\alpha$ - $\alpha'$ -trehalosa monomicolato (Figura1) (Madigan *et al.*, 1999).

La organización de estos componentes ácidos en la pared celular bacteriana determina ciertas características de permeabilidad limitada, de manera que la mayoría de agentes antimicrobianos son incapaces de atravesar la pared (Madigan *et al.*, 1999).



**Figura 1.** Membrana de *Mycobacterium*, peptidoglicanos, ácidos micólicos y glicolípidos (www.iladiba.com).

En general las micobacterias se pueden separar en dos grupos principales: las de crecimiento lento y las de crecimiento rápido (Madigan *et al.*, 1999). *M. tuberculosis* es de crecimiento lento, ya que necesita un largo periodo de incubación o incluso semanas para producir colonias visibles a partir de un inóculo diluido, debido tal vez al carácter hidrofóbico de la superficie celular (Landeros, 2000).

Las características de la pared celular de las micobacterias permite la formación de una barrera para la penetración de agentes microbianos. De esta manera los antibióticos hidrofílicos y nutrientes de estas características no se pueden difundir a través de la capa, por lo tanto estos organismos utilizan un mecanismo por medio de proteínas formadoras de canales llamadas porinas, algunas de las cuales se han logrado caracterizar, identificando su función en

el transporte de cationes (Lambert, 2002). Otro de los canales identificados que no pertenece a las porinas se ha denominado canal mecanosensible de alta conductibilidad (MscL), el cual tiene un papel importante en la respuesta del estrés osmótico y transporte de iones (Le Dain *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 1998; Maingret *et al.*, 1999).

Los tratamientos actuales para la tuberculosis consisten en fármacos como la isoniacida (H), rifampicina (R), Etambutol (E), estreptomina (S), Kanamicina, ácido paraaminosalicílico (PAS), etionamida (ETH), cicloserina (CS), capreomicina (CP), viomicina (VI), tiacetazona (T), embiomicina, pirazinamida (Z), estos son usados en terapias de manera combinada con más de dos fármacos, debido a que el uso de la monoterapia con estreptomina provoca el desarrollo de mutantes resistentes (Lambert, 2002; Caminero, 2001). Los cuales afectan la viabilidad de la bacteria por medio de la inhibición de enzimas importante para su reproducción y crecimiento, interviniendo en la biosíntesis, ensamblaje, traducción proteica y transcripción, tal es el caso de la isoniacida que inhibe la síntesis de ácidos micólicos y la pared de la micobacteria se desintegra; el etambutol el cual inhibe la síntesis de arabinogalactano; la estreptomina que inhibe la subunidad ribosomal 30S para impedir la síntesis de proteínas y; la rifampicina que inhibe la subunidad  $\beta$  de la proteína RNA polimerasa impidiendo la transcripción (Takayama y Kilburn *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1992; Banerjee *et al.*, 1994).

Debido a que el tratamiento completo se lleva en largos periodos, el abandono de éste es común, ocasionando el surgimiento de cepas resistentes.

La infección por cepas multirresistente aumenta año con año, registrándose en varios países, y haciendo más ineficaz su control en la dispersión de esta enfermedad causando muertes principalmente en individuos con VIH (Figura 2). TB se ha dispersado de manera global desde la década de los 80s, concentrándose en el Sureste de Asia y la región que se encuentra al sur del Sahara en África (Mercado *et al.*, 1992).



**Figura 2.** Mapa de las regiones con mayor incidencia de tuberculosis (rojo) y de las regiones con epidemias causadas por *Mycobacterium tuberculosis* multiresistente a antibióticos (Amarillo) (World Health Organization).

Recientemente se han descrito péptidos con acción antibacteriana en la secreción externa de diferentes organismos. Las armas químicas de estos organismos con actividad antibacteriana y antifúngica son consideradas como parte un mecanismo de defensa innato. Estos péptidos han sido de interés médico estimulando así la investigación por nuevos antibióticos contra bacterias que han desarrollado resistencia. Los péptidos antibacterianos han sido encontrados en una gran variedad de organismos, como en la piel de las ranas, en las pupas de mariposas, veneno de arañas, alacranes y hormigas así como en una gran variedad de organismos marinos, como cangrejos, anémonas y caracoles. Todos estos péptidos tienen en común la función de interrumpir la permeabilidad selectiva de la membrana bacteriana por la

formación de poros o desestabilizando la bicapa fosfolipídica (Verdonck *et al.*, 2000).

Por medio de esta información se realizó una investigación enfocada a el análisis molecular de la variabilidad de cepas encontrada en el estado de Baja California por medio de aislados clínicos del hospital de Tijuana y a el análisis del efecto de toxinas de tres organismos, el alacrán *Auronoctonus phaiodactylus*, la anémona *Anthopleura elegantissima* y el caracol marino *Conus californicus*, en el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, de los cuales ya se han reportado péptidos activos contra canales iónicos

## I.2. CANALES IONICOS DE MICOBACTERIAS

Las porinas en el género *Mycobacterium* fueron descubiertas cuando observaron la difusión de azúcares y aminoácidos dentro de vesículas lipídicas después de la reconstrucción de una pared celular del extracto de *M. chelonae* (Trials *et al.*, 1992), purificando a partir de este una proteína de 59 kD y demostrando su actividad como canal. MspA es la porina más abundante en *M. smegmatis*, su función es el intercambio de solutos hidrofílicos a través de la pared celular, cuya estructura tetramérica posee un poro central de 10 nm de longitud (Heinz *et al.*, 2003) (Niederweis, 2003).

La porina OmpA es una proteína transmembranal relacionada a bacterias Gram Positivas, cuya función y homología en secuencia se ha encontrado también en Micobacterias a la cual se le ha denominado OmpATb. Las funciones de OmpATb, producto del gen *ompATb* de *M. tuberculosis* fue

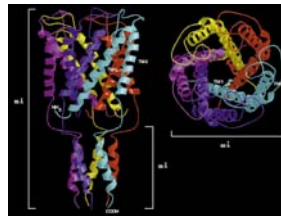


investigado y se observó su expresión en la cepa H37Rv. La pérdida de *ompATb* no tiene un efecto en el crecimiento bajo condiciones normales, pero causa una reducción importante en la habilidad del crecimiento de la bacteria en condiciones de bajo pH, inhabilitándolas para su crecimiento y propagación dentro de macrófagos, así como en pruebas realizadas en ratones normales, aunque esta fue igual de virulenta que las de tipo silvestre en ratones que carecen de células T. La escisión del gene *ompATb* redujo la permeabilidad a varias sustancias pequeñas solubles en agua. Esto fue evidente a pH de 5.5, sugiriendo que a este pH OmpATb puede ser la única porina funcionando (Raynaud *et al.*, 2002). Por medio de experimentos con bicapas de lípidos se observó que la pared celular de *M. tuberculosis* contiene al menos 2 porinas diferentes además de OmpATb : 1) Una selectiva de cationes, sensible al calor con cortos periodos en estado abierto y probablemente compuesta de subunidades de 15 KDa y ; 2) un canal compuesto por subunidades de 60 KDa, con largos periodos en estado abierto similar a los encontradas en Micobacterias de crecimiento rápido (Kartmann *et al.*, 1999).

Otro de los canales presentes en Micobacterias es el canal mecanosensible de alta conductibilidad (MscL), este canal en procariotes juega un papel crucial en la exocitosis, así como en la respuesta al estrés osmótico (niveles bajos). El canal puede ser abierto por tensión en la bicapa (Finney *et al.*, 2002). El canal mecano sensible juega un papel importante a nivel fisiológico en las células de diversos orígenes filogenéticos. Estos son ubicuos en procariotes y han sido caracterizados recientemente en archeobacterias así como en células de mamíferos (Le Dain *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 1998;

Maingret *et al.*, 1999). En bacterias, la respuesta a la osmolaridad del ambiente es esencial para el mantenimiento de la viabilidad de las células (Sukharev *et al.*, 1994).

Varios estudios han confirmado la importancia de este canal para la osmorregulación en bacterias, una bacteria expuesta a un shock osmótico incrementa la tensión de la membrana, lo cual lleva a la lisis celular a menos que el gradiente osmótico pueda ser revertido. Bajo estas circunstancias el canal Mecanosensible permite el transporte de Potasio y otros osmoprotectantes para ser excretados por la célula (Blount *et al.*, 1997; Ou *et al.*, 1998; Ajouz *et al.*, 1998) (Chang *et al.*, 1998). Es una proteína con estructura homopentamérica aproximadamente de 50 Å y 85 Å de largo. Cada subunidad de 151 residuos consiste de 2 hélices transmembranales marcadas como TM1 y TM2 y una hélice citoplasmática que se extiende 35 Å por debajo de la bicapa (Figura 3) (Finney *et al.*, 2002).



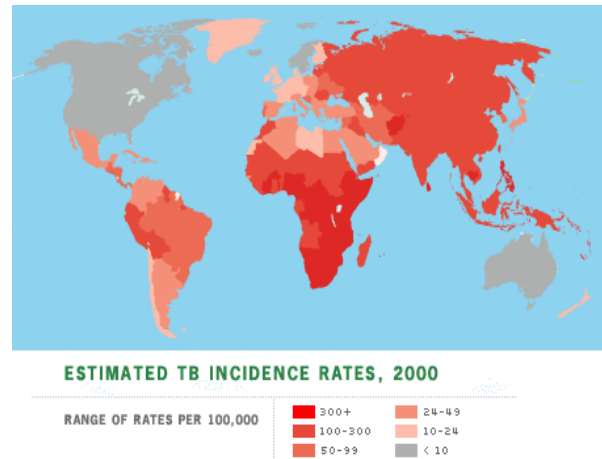
**Figura 3.** Estructura tridimensional del canal MscL de *M. tuberculosis* izquierda vista lateral, derecha vista frontal (Chang *et al.*, 1998)

Las hélices TM1 están arregladas para bloquear la difusión a través del canal en sus extremos N-terminal, esta región de la proteína también exhibe secuencias altamente conservadas (Ajouz *et al.*, 2000; Gullingsrud *et al.*, 2001).

## II. ANTECEDENTES.

### II.1 EPIDEMIOLOGIA.

En 1993 la OMS reportó en estudios estadísticos que considera el combate de la tuberculosis una prioridad, ya que es responsable del 6.7% de las muertes en el mundo, 18.5% de las muertes en adultos de 15-59 años de edad. En 1994 se notificaron 3.3 millones de casos. Se ha calculado que cerca de una tercera parte de la población mundial ha sido infectada por el bacilo de la TB, esto es cerca de 2000 millones de personas. El número actual de personas del grupo infectado que desarrolló una TB activa por cada año fue estimado por la OMS y fue de 7.5 millones en 1990 y de 8.8 millones en 1995. Usando diferentes métodos estadísticos para estimar la incidencia, se calculó que 7.3 millones de nuevos casos se presentaron en 1997. El número de nuevos casos se incrementó en un 37% entre 1990 al año 2000. Tres cuartas partes se presentan en los trópicos, siendo África el continente más afectado, seguido por Asia y América Latina (Figura 4). Por la elevación de las tasas de mortalidad y morbilidad la tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública importante tanto en países en vías de desarrollo como en los países desarrollados. En un análisis de 1999, la OMS calculó que el número anual de muertes para el año 2004 sería de 4 millones (Zumbra *et al.*, 1999).



**Figura 4.** Mapa de las regiones afectadas por tuberculosis, mostrando en diferentes tonalidades el número aproximado de casos en cada región (World Health Organization).

En México, García *et al* en 1995 analizaron las tendencias de la morbilidad por TB, las cuales muestran un descenso desde 1941 hasta 1976, año en que se estabilizan. Para 1993, la tasa de morbilidad notificada por TB es de 17.1 casos por 100 000 habitantes. De haberse conservado la tendencia observada entre 1941 y 1976, la tasa para 1993 hubiera sido de 12.5 casos por 100 000 habitantes. Se calcula que en los últimos 10 años han ocurrido 27 000 casos mas de los calculados estadísticamente. Al analizar la distribución de estos casos adicionales por grupo de edad, se observa un predominio en los sujetos en edad productiva. El modelo calcula que existen de 39 a 59 casos bacilíferos por cada 100 000 habitantes por cada 1% de riesgo anual de infección y 1.22 casos extrapulmonares por cada caso bacilífero.

La tuberculosis ha representado un problema de salud pública en la República Mexicana. A nivel mundial también es un serio problema. Se calcula

que en 1999 se informó de 8.4 millones de casos de tuberculosis superando los 8 millones registrados en 1997. Si las tendencias actuales continúan, se espera llegar a 10.2 millones de nuevos casos en el año 2005 (Villalba-Caloca, 2003).

En México, la tasa de incidencia de tuberculosis disminuyó hasta la década de los ochenta. A partir de entonces las tasas de incidencia se han mantenido estables. Sin embargo, existe subestimación del número real de casos de tuberculosis que ocurren en México, de acuerdo con diferentes fuentes el número real triplica ya que muchos de ellos no son notificados. Resulta relevante entonces, aplicar técnicas de epidemiología molecular para describir la transmisión de la tuberculosis (García, 2003).

De acuerdo con las cifras del censo de población más reciente, la ciudad de Tijuana tiene una población de 1 237 000 habitantes, y se encuentra urbanizada en una zona central y 412 colonias. Se localiza en la región noroccidental de nuestro país en el estado de Baja California. Su puerto fronterizo con los Estados Unidos de América (EUA) registra el mayor número de cruces legales (60 millones en 1996) e ilegales de toda la frontera entre México y los EUA, representando un foco de atracción para inmigrantes (y emigrantes potenciales), al grado de que aquéllos han llegado a constituirse en el segmento de mayor número (52.5%) y causa del crecimiento de la población de la ciudad (2.79% anual), contribuyendo a un crecimiento demográfico explosivo. Esto ha favorecido el desarrollo de condiciones insalubres en algunas áreas de la ciudad debido principalmente al encarecimiento de los servicios urbanos en todos los niveles (Laniado *et al.*, 1998).

## II.2. METODOS DE DIAGNOSTICO (ELEMENTOS O SECUENCIAS DE INSERCIÓN)

Uno de los procedimientos, que los distingue de otras bacterias para el diagnóstico tradicional de TB, es la tinción del bacilo, que por la composición química de su envoltura lo hace ácido resistente. Existen otras micobacterias con estas características entre las que se encuentran especies de *Nocardia* sp. y *Rhodococcus* sp. que son de manera parcial ácido resistentes igual que *Legionella micdadei* un agente causal de neumonía. Además, de *Cryptosporidium* e *Isospora* que son definitivamente ácido resistentes. Existen tres procedimientos empleados para llevar a cabo las baciloscopias, uno es la tinción de Ziel-Nielsen la cual utiliza carbolfucsina como colorante primario, que requiere de calentamiento de la placa para una mejor penetración del colorante dentro de la pared celular de la micobacteria, por lo tanto también es conocida como el procedimiento de tinción caliente. Otro es la tinción de Kinyoun, que utiliza también como colorante primario la carbolfucsina, solo que no necesita calentamiento de la placa por lo que se conoce como tinción fría. En estos dos métodos los bacilos se observan con microscopía de luz. El tercer método utiliza el fluorocromoauramina O, que es un método más sensible que la tinción convencional con carbolfucsina, debido a la fluorescencia brillante de los bacilos en un campo oscuro, los bacilos se observan con microscopía de fluorescencia. La sensibilidad de la microscopía varía de un 30% a 80%, dependiendo de la concentración de los bacilos en la muestra, aproximadamente 1000 bacilos por mililitro de expectoración. Sin embargo, los estudios de baciloscopía negativa no descartan la posibilidad de tener TB, siendo este estudio el menos sensible para diagnosticar la infección, por lo que

el cultivo debe realizarse en todas las muestras. Otro de los diagnósticos de TB es la prueba de la hipersensibilidad a la tuberculina o PPD, conocida también como prueba de Mantoux, los sujetos sensibilizados desarrollan de las 48 a 72 horas un eritema, tumefacción en un área de 5-10mm de diámetro, dependiendo de la dosis de la tuberculina (Landeros, 2000).

Los métodos que se mencionaron antes tienen ciertas limitaciones, en cuanto a sensibilidad, especificidad y algo muy importante el tiempo prolongado para obtener un resultado. En los últimos 20 años se han desarrollado tecnologías para estudio y detección por medio de la información genética, las cuales poco a poco se han adaptado para su incorporación a laboratorios de diagnóstico. La utilización de estas metodologías, ha servido para detectar secuencias de ácidos nucleicos específicos en templados de origen diverso. Desde 1905, la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, que se ha usado en estudios aplicados a la investigación biomédica, por su susceptibilidad a fármacos, es la cepa tipo que se utilizó en los estudios de secuenciación del genoma. El cual comprende 4 411 529 pares de bases y contiene alrededor de 4000 genes. Su contenido es de 65.6% de GC es una característica constante en el genoma por lo que se les ha llamado secuencias polimórficas ricas en G+C (PGRS). Los elementos o secuencias de inserción (IS) se encuentran en regiones intergénicas no codificantes. Son elementos genéticos móviles que han servido como herramientas de provecho para la identificación en muchos organismos pero en particular de las micobacterias (Bifani *et al.*, 2000).

La mayor parte de las cepas de *M. tuberculosis* contienen múltiples secuencias de inserción de IS6110, hasta 16 copias, solo una minoría contiene un sola copia. Esta secuencia de inserción parece ocupar la misma posición en todas las cepas, sugiriendo que en estos microorganismos el elemento es defectivo en su transposición y que esta pérdida ha podido suceder en un estadio precoz de la evolución del complejo tuberculoso. Dentro de las secuencias de inserción del complejo que han sido localizadas dentro del genoma se encuentran IS6110 también conocido como IS986 e IS987 en 16 copias y una secuencia de inserción más estable llamada IS1081 que se repiten seis copias. Las secuencias de inserción recientemente descubiertas pertenecen a la familia IS3. Otras secuencias de inserción como IS1561 comparten similitud con secuencias de inserción encontradas en *Nocardia* y *Rodhococcus*. Por medio de estas secuencias ha sido posible implementar el método de PCR para la detección de *Mycobacterium*, en donde se ha demostrado la especificidad y sensibilidad, misma que se ha utilizado para la detección de varias especies de micobacterias, demostrando los límites mínimos de detección de 10 microorganismos por mililitro. Una de las secuencias con mayor especificidad para la detección de *M. tuberculosis* es el gen *mtp40* que codifica para una proteína llamada MTP40, de característica inmunogénica, la cual es de 134 aminoácidos y hasta el momento no tiene ninguna otra homología con alguna otra proteína reportada en la base de datos. Por medio de esta técnica, se han hecho varias combinaciones para mejorar la metodología y detectar incluso el grado de infección en un individuo,



por medio de PCR competitivo, PCR nested y en tiempo real (Bermudez y Goodman, 1996).

También se han realizado la diferenciación entre las mismas especies de Micobacterias en donde variantes de cepas son utilizadas para identificar la contaminación cruzada por controles positivos frecuentemente usados en laboratorios. Las cepas H37Rv/Ra son distinguidas eficientemente por medio de la técnica de spoligotyping y por medio de la secuencia IS6110, dando una mayor resolución al momento de comparación (Bifani *et al.*, 2000).

Un PCR basado en la secuencia específica de *mtp40* fue desarrollado para la detección e identificación de *M. tuberculosis* en diferentes especímenes clínicos, el objetivo de la investigación de Herrera en 1996 y de Segovia en 1996, fue el evaluar la aplicación clínica del DNA como blanco en comparación con los métodos microbiológicos convencionales, y de esta manera, comparar los resultados con aquellos obtenidos después de la amplificación con los elementos repetidos IS6110. Por medio de esto se observó que *mtp40* es específico para *M. tuberculosis*, ya que no se obtuvo ninguna amplificación de esta secuencia con *M. bovis*. La aplicación del PCR tanto con las secuencias IS6110, sirven para la identificación de Micobacterias y *mtp40* para la identificación de *M. tuberculosis*.

Marchetti en 1998 comparó la sensibilidad y especificidad del PCR nested para la detección de *M. tuberculosis* a partir de tejidos fijados, tomando 37 muestras de autopsias de humanos con VIH, de las cuales 15 fueron positivas (en cultivo) 11 negativas y 11 fueron positivas para la prueba de Ziehl-

Neelsen sin la confirmación de la obtención de cultivos positivos. Tres secuencias genómicas se tomaron como blanco (*mtp40*, 65 kDa gene antígeno e IS6110) con diferentes masas moleculares y números de repeticiones dentro del genoma de *M. tuberculosis*. En la secuencia IS6110 dos fragmentos de diferentes tamaños 106 y 123 pb fueron amplificados, con dos pares de oligonucleótidos diferentes. Los oligonucleótidos, probados, mostraron una sensibilidad en un rango de 80-87%. La amplificación del fragmento de *mtp40* presentó una sola copia en el genoma de la bacteria y con resultados falsos-negativos en un rango de 66-80%. Una sensibilidad muy débil fue obtenida a partir de la amplificación del gen del antígeno de 65 kDa con un tamaño de 142 pb. Estas amplificaciones concordaron con las cepas positivas en cultivos y por la pruebas de Ziehl-Neelsen. Por lo tanto, mediante esta investigación se verificó, que por medio de muestras fijadas de las que no se tiene un diagnóstico definitivo es posible identificar *M. tuberculosis*.

El gen *mtp40* fue originalmente encontrado en una región pequeña de *M. tuberculosis* y está ausente en *M. bovis*. Estudios subsecuentes revelaron que la secuencia es parte del gen *mpcA*, el cual codifica para una fosfolipasa C. Para investigar la distribución de la secuencia *mtp40*, Vera-Cabrera *et al* en 1997 analizaron cepas del complejo de *M. tuberculosis* por PCR, logrando amplificar la secuencia de *mtp40* en 90 de 94 cepas de *M. tuberculosis*, 2 cepas de *M. microti* pero no en *M. bovis*. Basados en estos resultados los investigadores desarrollaron un análisis dot blot usando ADN genómico distinguiendo perfectamente *M.bovis* de *M. tuberculosis*, también se realizaron pruebas de Southern blot de 140 aislados clínicos, para determinar la

frecuencia de las cepas que carecen de *mtp40* revelando un elevado polimorfismo en la región de la fosfolipasa, en el 57 % de las cepas se detectaron 2 fragmentos, el fragmento esperado de 0.75 Kpb que corresponde al gen *mpcA* que contiene el fragmento *mtp40* y un fragmento de 2.1 Kpb que pertenece a una fosfolipasa recientemente descubierta cuyo gen se le llamó *mpcB*. Sin embargo, algunas cepas carecen de ambos genes, algunas solo tiene el gen *mpcA* y algunas presentan bandas adicionales, indicando que existen homólogos a los genes de las fosfolipasas (Castro *et al.*, 2002).

Un PCR múltiple basado en la secuencia IS6110 y *mtp40* fue evaluado, para una diferenciación rápida de *M. bovis* y *M. tuberculosis*, dos de los agentes causantes de la tuberculosis. IS6110 se encuentra presente en ambas especies, mientras que *mtp40* solo se presenta en *M. tuberculosis*. Sin embargo el gen *mtp40* no está presente en todas las cepas de *M. tuberculosis*, por lo tanto se ha comprobado no ser una buena opción para tal diferenciación (Weil *et al.*, 1996).

Recientemente, se encontró una región intergénica que se encuentra en *M. tuberculosis* pero ausente en otras bacterias. Esta región separa dos genes que codifican para un sistema de dos componentes nombrados SenX-RegX. Mediante PCR se detectaron cepas de *M. tuberculosis* que carecen de secuencias IS6110 y *mtp40* (Magdalena *et al.*, 1998).

### II.3. TRATAMIENTOS

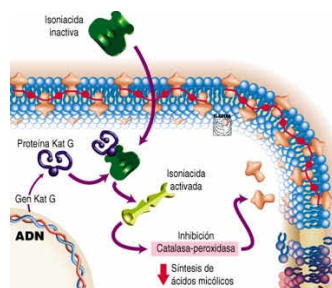
#### TRATAMIENTOS y MULTIRRESISTENCIA.

La resistencia natural que presenta *M. tuberculosis* a los fármacos antituberculosos es una característica que ha acompañado a este microorganismo desde sus orígenes. En la actualidad se acepta que en un cultivo de bacilo tuberculoso silvestre aparece, por mutación espontánea natural, un microorganismo resistente a isoniacida (H), por cada  $10^5$ - $10^7$  bacilos y un mutante resistente a rifampicina (R), por cada  $10^7$ - $10^9$  bacilos, un mutante resistente para Etambutol (E), estreptomycin (S), Kanamicina y ácido paraaminosalicílico (PAS), por cada  $10^5$ - $10^7$  bacilos. Para etionamida (ETH), cicloserina (CS), capreomicina (CP), viomicina (VI), tiacetazona (T) y embiomicina, uno por cada  $10^3$  bacilos, y para pirazinamida (Z),  $10^2$ - $10^4$  bacilos (Caminero, 2001).

Estas mutaciones de los bacilos son independientes para cada uno de los medicamentos, por lo que la posibilidad de que se presenten asociadas es igual al producto de sus tasas respectivas de mutación. Si además se tiene en cuenta que la población bacilar que puede alojarse en una TB con lesiones cavitarias es de  $10^8$ - $10^9$  y de  $10^3$ - $10^5$ , cuando existen lesiones nodulares, puede apreciarse que si se inicia un tratamiento con un solo fármaco en una TB cavitaria, tras una primera fase en la que se eliminarán la mayoría de los bacilos y en la que el enfermo mejorará, se producirá una selección de bacilos resistentes que, en poco tiempo, llegarán a ser la población dominante. Además, el fármaco se habrá invalidado para el resto de la vida del enfermo, ya

que la resistencia en TB es cromosómica definitiva e irreversible. Por lo tanto toda monoterapia (real o encubierta por asociación de fármacos previamente resistentes e ineficaces), llevará ineludiblemente al fracaso y a la selección de resistencias (Caminero, 2001).

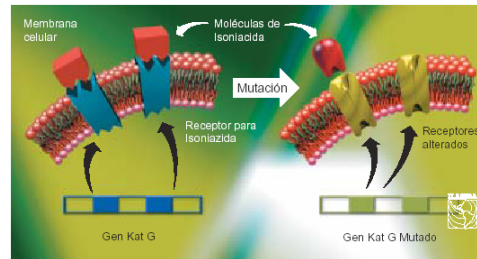
La pared es tan importante para la viabilidad de la bacteria, que isoniacida, uno de los agentes antituberculosos más efectivos, actúa inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos, evento que conduce a la desintegración de esta estructura (figura 5). El medicamento inhibe la actividad del sistema enzimático dependiente de catalasa-peroxidasa, de manera que bloquea la síntesis de ácidos micólicos y la pared de la micobacteria se desintegra. Otros fármacos como el ácido p-aminosalicílico, la pirazinamida, cicloserina, etambutol y la rifampicina son usados en terapias de manera combinada con más de dos fármacos, debido a que el uso de la monoterapia con estreptomina provoca el desarrollo de mutantes resistentes (Lambert, 2002).



**Figura 5.** Mecanismo de acción de isoniacida ([www.iladiba.com](http://www.iladiba.com)).

La tuberculosis multirresistente se originó, debido, a que los pacientes no terminaban el tratamiento, o lo tomaban de manera irregular, así como a la

selección inadecuada de los fármacos; por ejemplo, la isoniazida y su relación con Gen Kat G mutado, imposibilitando una respuesta para este tratamiento (Figura 6).

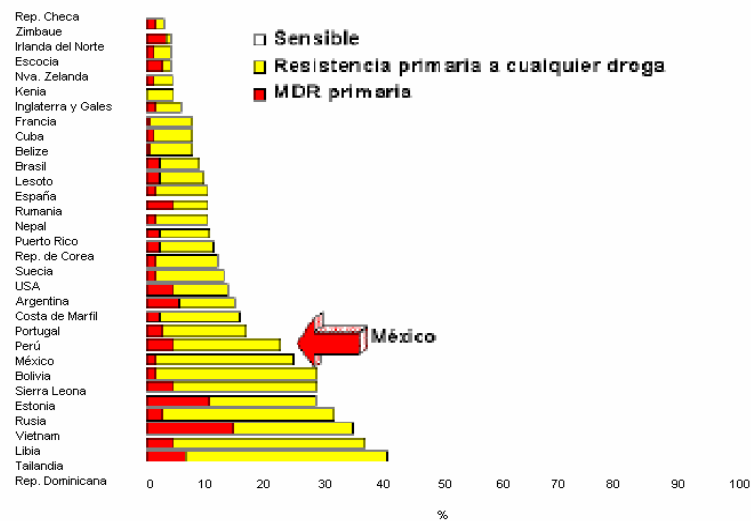


**Figura 6.** Mecanismo de resistencia de *M. tuberculosis* a isoniazida. La resistencia se genera a partir de mutaciones en genes que codifican para los sitios blancos de los antimicobacterianos. Estas mutaciones generan sitios de unión alterados (a), como el gen *katG* en el caso de isoniazida. Otro mecanismo es la alteración de genes codificadores para enzimas involucradas en la vía biosintética del ácido micólico, la cual debe ser interrumpida por la isoniazida para su efecto farmacológico ([www.iladiba.com](http://www.iladiba.com)).

Una vez que se ha diagnosticado al enfermo con TB, uno de los problemas más importantes es lograr la continuidad al tratamiento. De acuerdo con los datos proporcionados por la Dirección General de Medicina Preventiva, en México la tasa de abandono de tratamiento entre 1983 y 1991 estuvo entre 13.3% (tratamientos supervisados de seis meses) y 23.2% (tratamientos auto administrados de un año). El abandono del tratamiento es un factor que favorece la transmisión del bacilo y la aparición de resistencia a medicamentos (García *et al.*, 1995).

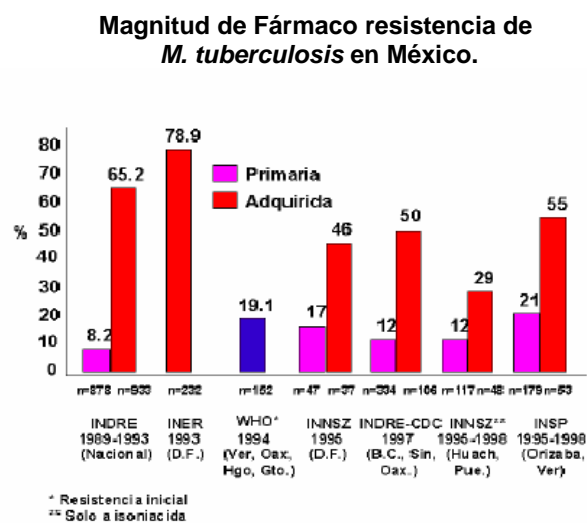
La tasa de multirresistencia en los casos de retratamiento, se ha incrementado progresivamente en todo el mundo, hasta alcanzar proporciones de verdadera alarma en varias regiones del mundo, especialmente en algunos países donde pareciera que han olvidado o abandonado los programas de control de la tuberculosis. La OMS ha publicado recientemente, información, referente a la resistencia antimicrobiana en tuberculosis, presentando los datos de vigilancia de 35 países, donde se coloca a México en el grupo de países con problemas de resistencia semejantes a Bolivia, Perú, Sierra Leona, entre otros, con una tasa de multirresistencia primaria del 6%, (Figura 7), (Sifuentes *et al.*, 1998).

**Resistencia de *M. tuberculosis* en 35 países.**



**Figura 7.** Tasa de resistencia primaria a cualquier medicamento antimicrobiano o de multirresistencia (resistencia combinada a isoniacida y rifampicina) en *M. tuberculosis* de pacientes de treinta y cinco países (Sifuentes *et al.*, 1998).

En la figura 8 se aprecia que la resistencia primaria, cuando menos a un antibiótico, ha tenido un comportamiento creciente en los diversos estudios realizados en México. La resistencia secundaria se ha elevado hasta el 79% en el reporte del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (centro de referencia) en 1993 y por encima del 50% en los diversos estudios de vigilancia realizados recientemente.



**Figura 8.** Descripción de las tasas de resistencia primaria y secundaria de tuberculosis en México (Sifuentes, 1998).

De forma habitual, la tuberculosis se cura en seis meses de tratamiento con antibióticos, pero las cepas multirresistentes de este bacilo necesitan entre 18 y 24 meses de tratamiento con regímenes medicamentosos múltiples por lo general más tóxicos y costosos (Sifuentes, 1998).



La técnica que se ha estandarizado internacionalmente es el análisis de fragmentos de longitud restringida. Se basa en la utilización de endonucleasas de restricción, que cortan el ADN en sitios específicos de reconocimiento que determinan el número y tamaño de los fragmentos que se generan. Estos fragmentos se separan en base a su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa. A continuación, los fragmentos de ADN se desnaturalizan para formar fragmentos de una sola cadena y se transfieren a una matriz sólida de nitrocelulosa. Una vez que se han inmovilizado los fragmentos de ADN, se pueden “señalar” con una cadena de ácido nucleico marcada, con digoxigenina o luminol. Mediante Southern blot se hibridan los fragmentos de restricción que se encuentran contenidos en las secuencias nucleotídicas complementarias con una sonda marcada (IS6110). Estos fragmentos forman un perfil que se compara con el de otros aislados (García, 2003).

Se ha realizado la caracterización de *M. tuberculosis* multiresistentes en humanos que presentaban VIH comparándose incluso con cepas que afectaban a personas sanas, las cepas mostraron todas las características fenóticas de *M. bovis*, presentando un alto número de copias de IS6110, así como el fragmento *mtp40*. Estas características genéticas, revelaron la causa del parecido fenotípico con *M. bovis* y como consecuencia, probablemente las alteraciones celulares asociadas con la multirresistencia a fármacos. Realizando spoligotipin y RFLP con la secuencias de IS6110 se encontró, que la cepa que afectaba tanto enfermos de VIH como a pacientes sin VIH era la misma, sin embargo tres años después se analizaron las cepas de los pacientes sin VIH, encontrando un patrón de bandeo diferente al de las cepas

analizadas tres años antes, esto se explica por eventos genéticos en las cepas (Gutierrez *et al.*, 1999).

#### **II.4. TOXINAS.**

El veneno de muchos animales son mezclas de 20 a 100 diferentes tipos de moléculas disueltas, la mayoría tienen proteínas o pequeños polipéptidos que varían de un rango de 20 a 80 aminoácidos, también se pueden encontrar alcaloides y polímeros de naturaleza no proteica con fuertes efectos biológicos (Castañeda. 2000).

Los receptores de acetilcolina, canales de potasio, canales de calcio, etc., son receptores de la superficie de las células nerviosas o musculares que tienen un papel básico en el mantenimiento y propagación de señales. Debido a que una de las funciones principales de los venenos es el inmovilizar a la presa o al predador, las toxinas tienen como blancos las moléculas que juegan un papel importante en la locomoción. El receptor de acetilcolina es uno de los blancos de dichas toxinas ya que su función es conservada en muchas especies animales (Castañeda, 2000).

Hay algunas toxinas como las dendrotoxinas y algunas bungarotoxinas que atacan la unión neuromuscular, pero no actúan en las células del músculo, provocando la inhibición de la liberación de la acetilcolina en el nervio terminal o causando una alta liberación provocando anormalidades, como el bloqueo neuromuscular, y posteriormente la falta de respiración y muerte de la víctima. Las toxinas tienen actividades similares en los diferentes taxa, por ejemplo,

toxinas que actúan en el mismo receptor de acetilcolina se han aislado de corales, caracoles, serpientes de mar y cobras. Toxinas similares interfieren con la operación normal de las células nerviosas por su acción en canales de potasio aisladas a partir de escorpiones, abejas y mambas (Castañeda, 2000).

El canal de sodio es una proteína grande de la membrana citoplasmática, y es un excelente blanco de diferentes toxinas, como es el caso de las toxinas de escorpiones, anémonas y anfibios. Algunas toxinas de origen no proteico pueden incluso atravesar la membrana lipídica y unirse en el núcleo del canal de sodio, tal es el caso de la Batrachotoxina. También se ha descrito la toxina beta de escorpión la cual es un polipéptido grande que se une a la superficie del canal de sodio (Castañeda, 2000).

Existe un grupo muy importante de toxinas de naturaleza proteica cuyo efecto fundamental es retardar el proceso de inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$ , por lo cual el canal permanece abierto durante más tiempo. Esto provoca un incremento notable en la excitabilidad de nervios y músculos, como consecuencia del aumento en la liberación de acetilcolina desde las terminaciones nerviosas. En este grupo se incluyen las  $\gamma$ -toxinas de escorpiones, presentes en los venenos de especies procedentes de África y América del Norte, tales como: *Andronoctonus australis* y *Tityus serulatus*, entre otras, (Castañeda, 2000), así como las toxinas de anémonas que referiremos a continuación.

Los trabajos pioneros (Béress *et al.*, 2000) permitieron aislar una serie de polipéptidos análogos a partir de la anémona *Anemonia sulcata* (ATXI, II, III y

IV) de los cuales, el más abundante y activo en membranas de vertebrados es ATXII. Diferentes toxinas con propiedades similares han sido aisladas a partir de otras especies: *Anthopleura xantogrammica*, *Radianthus paumotensis*, *Condylactis gigantea*, *Heteractis macrodactylus*, *Phyllactis flosculífera*, *Stichodactyla giganteum* y *S. helianthus*. Todas provocan actividad espontánea y repetitiva en axones y en músculo esquelético o cardíaco. Las propiedades químicas y las relaciones estructura-función de las toxinas de anémonas que actúan a nivel de los canales de sodio han sido revisadas ampliamente (Norton, 1981).

La primera toxina caracterizada con acción específica sobre canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje, fue la noxiustoxina (NTX), obtenida a partir del veneno del escorpión de México *Centruroides noxius*, la cual es un polipéptido de 36 residuos de aminoácidos y tres enlaces disulfuros (Possani *et al.*, 1984). Bloquea la corriente de rectificación tardía en axones gigantes de calamar y en concentraciones superiores, bloquea algunos canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup>. Se ha demostrado que facilita la liberación de acetilcolina en terminaciones nerviosas motoras de mamíferos (Castañeda, 2002).

Los organismos de la familia Conidae se caracterizan por poseer un aparato venenoso, son principalmente animales nocturnos, predadores y capturan su alimento gracias a la inyección de su veneno. Sus conotoxinas actúan en una gran diversidad de canales iónicos o receptores neuronales para paralizar a la presa (Olivera, 1997).

El veneno de un solo conus contiene de 50 a 200 agentes o compuestos biológicamente activos, siendo las conotoxinas la mayoría de estos, los cuales son péptidos de 6-40 aminoácidos (Olivera, 1997).

Las conotoxinas cuentan con estructuras altamente comprimidas que están conformadas por motivos estabilizantes  $\alpha$ -hélice y por varios enlaces disulfuro formados por la unión entre las Cisteínas (Figura 9).

Las conotoxinas se almacenan en forma de propéptidos, de manera que la organización de las cisteínas se encuentra en el extremo C-terminal que corresponde a la toxina madura. Una vez que la conotoxina va a ser utilizada ocurre una proteólisis que libera a la conotoxina madura.

Los péptidos de conus son más selectivos que cualquier otro ligando para el mismo receptor, es por esta razón que la actividad es tan rápida. En el caso de las toxinas dirigidas a canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes, la discriminación entre los diferentes subtipos de canales de calcio puede ser de más de 106 veces. Esta capacidad se le ha dado utilidad en medicina para el desarrollo de fármacos contra el dolor (Olivera, 1997).



**Figura 9.** Estructura de Alpha-conotoxina de *Conus imperialis* (NCBI).

En estudios recientes se encontraron péptidos de conus que interactúan con canales de Na<sup>+</sup> y algunos otros con canales de K<sup>+</sup>, siendo también altamente específicos (Ferber *et al.*, 2002).

Las toxinas de alacranes y anémonas marinas difieren de la conotoxinas, aunque todos son ligandos específicos de canales iónicos y receptores neuronales y son estabilizados por enlaces disulfuro, solo que no se almacenan como propéptidos (Kelso y Blumenthal, 1998). Las toxinas de alacranes y anémonas de mar se unen a un sitio extracelular común en el canal de Na<sup>+</sup> e inhibe rápidamente la inactivación. Algunos aminoácidos básicos y los dominios I y IV de los canales de Na<sup>+</sup> han sido implicados en la unión de la toxina (Rogers *et al.*, 1996).

De acuerdo a su modo de acción las toxinas de anémonas pueden ser divididas en neurotoxinas (< 5KD) que interactúan con canales iónicos y las citolisinas (generalmente de 20KD) las cuales dañan la membrana formando poros o canales (Samejina, 2000).

Las toxinas proteicas formadoras de poros o canales son uno de los principales constituyentes del veneno de las anémonas. En la actualidad se han aislado más de 30 de estas proteínas de aproximadamente 20 especies diferentes de anémonas (Anderluh *et al.*, 1999).

Se han caracterizado ocho toxinas diferentes de origen peptídico de cuatro especies de anémonas (*Anemonia sulcata*, *Anthopleura xanthogrammica*, *Stoichactis giganteus*, y *Actinodendron plumosum*). Tres de

estas toxinas se obtuvieron por nuevos métodos de purificación. Estas toxinas fueron analizadas por ensayos de toxicidad contra cangrejos y ratones, así como su afinidad para receptores y canales de  $\text{Na}^+$  en sinaptosomas de cerebro de rata y para su capacidad de incrementar la entrada de sodio por medio de sinergismo con veratridinen en células de neuroblastomas. Algunas de las toxinas son mas activas en crustáceos, mientras que otras presentan mayor actividad en células de mamíferos, mostrando una buena correlación entre la actividad citotóxica a ratones y la afinidad de la toxina a canales de  $\text{Na}^+$  en los sinaptosomas, así como la estimulación en la entrada de sodio en neuroblastomas. La LD50 para ratones de las toxinas de anémona más activas y las toxinas de escorpión mas activas son muy similares. Además si se aumenta la concentración de las toxinas de anémona estas previenen la unión de las toxinas de escorpión a su receptor. Sin embargo, las toxinas de escorpión tienen afinidades hasta 60 veces más altas a los canales de  $\text{Na}^+$  que las toxinas de anémona (Schweitz *et al.*, 1981).

Recientemente (Xie *et al.*, 2003) lograron aislar un péptido pequeño a partir del veneno de la serpiente *Naja atra* que tiene actividad contra cepas clínicas de *M. tuberculosis*, péptido que presumiblemente pertenece a la familia de las saponinas, cuya estructura contiene 3 uniones disulfuro, este péptido se le denominó vgf-1. Sin embargo, aun no se ha analizado la función que lleva a cabo en las micobacterias para detener su crecimiento.

### III. JUSTIFICACIÓN

En México, dada la falta de control, aun no se tiene una estimación exacta del número de casos de TB. En el año 2000 se registró un rango de 2,400,000 a 4,900,000 casos de infección tanto latentes como activos, en donde Baja California ocupa el sexto lugar, de las entidades federativas con más casos de tuberculosis.

Debido a la deficiencia en los servicios médicos públicos, así como a la falta del conocimiento de la enfermedad por gran parte de la población, se ha incrementado el surgimiento de cepas multi-resistentes a antibióticos y que requieren de largos periodos de tratamiento, de seis a nueve meses, en donde en muchos casos la bacteria aún permanece latente, activándose cuando el sistema inmune disminuye su actividad.

La necesidad de encontrar nuevos fármacos que ataquen a las micobacterias, tanto en su estado latente como en estado activo, son necesarios para evitar la propagación de la enfermedad y erradicarla del país.

Una de las fuentes que en la actualidad han tenido auge, es la búsqueda en organismos marinos, que presentan diversas toxinas como parte de su defensa natural o para la captura de sus presas, los cuales pueden tener actividad antibacteriana sin efectos dañinos a células de mamíferos, dando una especificidad importante para el tratamiento a largos períodos de tiempo, o incluso que tengan una actividad más rápida que los fármacos desarrollados en las últimas décadas.

Por esta razón en el presente trabajo de investigación, se realizó la búsqueda de sustancias activas en toxinas de anémonas del género



*Anthopleura*, moluscos de la familia Conidae, género *Conus*, y en el alacrán del género *Auronoctonus* (Clase Aracnida), contra micobacterias, probablemente afectando canales iónicos, de acuerdo a los antecedentes de la acción de las toxinas reportadas para estos organismos.

## IV.OBJETIVOS

### IV.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos de toxinas de *Anthopleura elegantissima*, *Conus californicus* y *Auronoctonus phaiodactylus* en *M. tuberculosis*.

### IV.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar 100 cepas de aislados clínicos de *M. tuberculosis* por medio de la secuencias *mtb*, *rac*, *rd4*, *Mtp 40* e *IS6110*
- Analizar la actividad antifúngica del extracto crudo de *Conus* (*Conus californicus*), del extracto crudo de anémonas (*Anthopleura elegantissima*) y del extracto crudo del veneno de los alacranes (*Auronoctonus phaiodactylus*).
- Fraccionar por cromatografía de exclusión molecular y cromatografía líquida de alta resolución aquellos extractos que presenten actividad antifúngica.
- Caracterizar las fracciones que resulten activas en la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis*

## **V. METODOLOGIA**

### **V.1. Cepas**

Se emplearon 96 cepas, que se obtuvieron a partir de muestras biológicas, proporcionadas por el M.S.P. Rafael Laniado del Hospital General de Tijuana. La cepa control H37Rv y los aislados clínicos, fueron sembrados en medio Lowenstein-Jenssen (LJ-M), e incubados a 37°C por 5 a 7 semanas. Los tubos con medio fueron incubados en posición horizontal, con los tapones ligeramente cerrados por una semana, para permitir la evaporación del exceso de líquido.

### **V.2. Extracción de ADN y Caracterización de las cepas**

Las cepas de interés se inocularon en medio LJ-M e incubaron a 37 °C hasta que el crecimiento de las colonias conglomeradas (se recomienda mas de la mitad de la superficie del medio con presencia de colonias) fuera visible. Posteriormente se transfirió una asada (10 µl) de células en un tubo eppendorf, con 400 µl de buffer TE 1X, se calentó 20 minutos a 80 °C para lisar las células y se enfrió a temperatura ambiente. Se adicionó 50 µl de una solución stock 10 mg/ml de lizosima, se agitó por vortex y se incubó toda la noche. Se adicionaron 75 µl de proteinasa K (10mg/ml) preparada con SDS 10%, se agitó por inversión y se incubó 10 minutos a 65 °C. Se adicionó 100µl de NaCl 5 M (precalentado a 65 °C) y posteriormente 100 µl de CTAB/NaCl (precalentado a 65 °C) se agitó por inversión hasta que el líquido tomó una coloración blanquizca (lechoso) y se incubó 10 minutos a 65 °C. Se adicionó un volumen de 750 µl de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y se agitó por inversión por al

menos 10 segundos, al terminar se centrifugó a temperatura ambiente por 5 minutos a 12 000g, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se adicionó 450 µl de isopropanol para sedimentar los ácidos nucleicos y se colocó por 30 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugó por 15 a 12 000g, al sedimento se le adicionó 1 ml de Etanol al 70 % se agitó brevemente por inversión y se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el etanol y se dejó secando la pastilla de sedimento por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió la pastilla en 20 µl de buffer TE 1X y se almacenó a 4 °C. Se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm por medio de diluciones 1:100 y usando la siguiente fórmula para el cálculo de su concentración.

$$[\text{abs de la muestra} - \text{abs del blanco}] * 50 = \text{Conc. ADN } (\mu\text{g/ml}) \quad (1)$$

Para la realización de los PCRs, se obtuvo ADN de los aislados clínicos por medio de lisis celular, la cual consistió, en colocar en 200 µl de buffer TE una asada de 10 µl de células, en baño maría a 100°C durante 2 horas.

Las amplificaciones de las secuencias *mtb*, *rac*, *rd4* y *mtp40*, se emplearon para la identificación de los aislados clínicos y su caracterización. Los productos fueron analizados por medio de electroforesis, en geles de agarosa al 1.2% y bromuro de etidio (Cobos *et al.*, 2003). Mientras que la extracción de ADN por medio de la metodología descrita inicialmente, se utilizó para la caracterización de las cepas por RFLPs con la secuencia de inserción IS6110 (Soolingen *et al.*, 1995).

### V.3. Caracterización por PCR

Las 98 aislados clínicos se evaluaron por medio de PCRs con 4 juegos de oligonucleótidos diferentes:

**RAC8 y RAC1** combinación de primers que amplifican una región que codifica para el gen *murA*, la región promotora del operon *rrnA* y el extremo 5' del gen 16S RNAr. El blanco para el primer RAC1 es la secuencia complementaria de la posición 46-69 del extremo 3' del gen *murA*. El blanco de RAC8 es la posición 339-357 de la región del gen RNAr 16S. Este fragmento amplificado solo se encuentra presente en el genero de las micobacterias, el segmento amplificado es de un tamaño aproximado de 950pb, cuya secuencia se muestra en la tabla I.

**MTB** amplifica otro fragmento del gen que codifica para los últimos 5 codones del gen *murA*, la región promotora del operon *rrnA* y el extremo 5' del gen 16S RNAr. El blanco para el primer MTB-F, es la secuencia complementaria de los últimos 15 nucleótidos del gen *murA* y los primeros 6 nucleótidos de la región promotora del operon *rrnA*, el blanco para el primer MTB-R es la posición 192-210 de la región V2, localizada dentro del gen 16S RNAr, la cual amplifica para un fragmento de un tamaño de 500pb presente solo en miembros del complejo *M. tuberculosis* el cuál comprende *M. canettii*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis*

**RD4** amplifica para una región que está presente en el genoma de todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*, excepto *M bovis* la cual es de un

tamaño aproximado de 1031 pb., que amplifica una región del gen *pncA* el cual esta mutado en *M.bovis*

**Mtp 40** amplifica para una región del gen *mtp40*, que codifica para una fosfolipasa C, el fragmento obtenido es de un tamaño aproximado de 587pb y es específico para *M. tuberculosis* (Cobos *et. al.* 2003).

Para las amplificaciones se añadió a cada tubo 10 µl de Agua destilada, desionizada estéril, 0.75 µl de oligonucleótido Forward (20 mM) y 0.75µl del oligonucleótido reverso (20 mM), 1 µl de ADN cromosomal (50 nM) de la cepa de interés, y 12.5 µl de Taq Mater Mix (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de dNTPs, 0.05 unidades/µl Taq Pol, 0.02% Tween 20, 125 mM Tris-HCl pH 8.8 a 2 °C y 32 mM de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>).

El contenido del tubo se mezcló por pipeteo. La reacción se sometió a una temperatura de 94°C por 10 minutos y 30 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento de los oligonucleótidos a 55 °C por 45 s y extensión a 72 °C por 45 s.

Después del ciclo final la reacción fue terminada manteniendo una temperatura de 72 °C por 10 min. Los productos de PCR permanecieron en el termociclador a una temperatura de 4°C. Estas condiciones se siguen para los oligonucleótidos RAC, MTB y RD4, ya que con los oligonucleótidos de Mtp 40 la Temperatura de alineamiento (TM) se aumentó a 60°C, siendo esta la única modificación de las condiciones.

**Tabla I.** Nombre y secuencia de los oligonucleótidos empleados para la caracterización de las cepas (Cobos *et al.*, 2003).

Oligonucleótido	Secuencia	Longitud	TM	%GC
RAC1	5'TCGATGATCACCGAGAACGTGTTTC3'	23 bases	55	47
RAC8	5'CACTGGTGCCTCCCGTAGG3'	19 bases	55	63
MTB Forward	5'CGGGTATGCTGTTAGGCGACG3'	21 bases	58	61
MTB Reverso	5'CCACCACAAGACATGCATG3'	19 bases	58	52
RD4 Forward	5'GACATGTACGAGAGACGGCATGAG3'	24 bases	55	54
RD4 Reverso	5'AATCCAACACGCAGCAACCAG3'	21 bases	55	52
Mtp 40 Forward	5'CAGCCCGCTGGAGTCCCGC GGA3'	21 bases	60	80
Mtp 40 Reverso	5'GCGCGTTCACCATGGACA CCG3'	21 bases	60	66.6

#### V.4. Caracterización por RFLPs

##### V.4.1. Digestión del ADN cromosomal por *PvuII*

Las endonucleasas de restricción reconocen pequeñas secuencias de ADN y cortan en sitios específicos dentro de los sitios de reconocimiento o de manera adyacente, estos cortes dan como resultado la formación de fragmentos de ADN discretos. *PvuII* corta en la secuencia CAG ---- CTG

GTC ---- GAC

Ya que se tiene cuantificado la concentración de ADN entonces se calcula el volumen necesario para tener 4.5 µg totales para la digestión con *PvuII*.

La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera

1. en un tubo de microcentrífuga (ependorf) se colocó 2µl de Buffer 10 X
2. 1 µl de enzima PVUII (10U/ µl)

3. X  $\mu$ l ADN (4.5  $\mu$ g)
4. Y  $\mu$ l agua mQ para un volumen final de 20  $\mu$ l

Finalmente se mezcló y se centrifugó por 5 segundos a 12 000g y se incubó 90 minutos a 37°C

#### **V.4.2. Separación de los fragmentos de ADN por electroforesis**

Se separaron los fragmentos de ADN de aproximadamente 0.5 a 25 Kb en un gel de agarosa para propósitos analíticos y preparativos.

#### **V.4.3. Estimación de la concentración de ADN.**

Se preparó un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (500 ng/ml) en una cámara de electroforesis Biorad 14X11, aproximadamente con 90 ml de agarosa. Se cargaron 5  $\mu$ l de la digestión con 1  $\mu$ l de buffer de carga, preparado con RNAasa (10 mg/ml), y se dejaron correr a 100 Volts durante 20 minutos.

La concentración de ADN digerido, se estimó de acuerdo a la metodología reportada para RFLPs de IS6110 de *M. tuberculosis* (Soolingen *et al.*, 1995). Finalmente de acuerdo a su estimación, se colocaron los microlitros adecuados para homogenizar las concentraciones de cada muestra, las cuales se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 25 volts durante 11 h. Como marcadores de peso molecular, se utilizó, el fago lambda digerido con *HindIII*, y el marcador 1 kb plus ADN ladder (Gibco). Y como cepa de referencia H37Rv.



Al día siguiente se tomó la foto con una regla fluorescente (VWR gel fluorescens), posteriormente el gel se trató para su transferencia a una membrana de nylon Hybond -N+ (Amersham Pharmacia Biotech) .

#### **V.4.4. SOUTHERN BLOTTING**

##### **Transferencia del Gel**

Previo a la transferencia el gel se expuso a luz UV durante 5 min. Posteriormente se trasladó a una bandeja, y se colocaron 500 ml de HCl 0.25 M durante 10 min, posteriormente se enjuagó con agua destilada durante 10 segundos, se decantó el agua y se adicionaron 500 ml de NaOH 0.4 M durante 20 minutos, posteriormente se repitió el enjuague y el último paso con NaOH.

En seguida se colocó en la bandeja para transferencia (BIO-RAD 14X11 cm), en el siguiente orden: como buffer una solución 10X de SSPE (0.1 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.8 M de NaCl, 10 mM EDTA y a un pH 7.4). Posteriormente se colocó: 1) una capa de papel filtro, 2) gel, 3) membrana Hybond -N+, 4) dos capas de papel filtro, 5) una lámina de acetato con un corte en medio de 10X13 cm, 6) una capa más de papel filtro, 7) servilletas 11X14 y 8) y un objeto para el contrapeso. La transferencia se dejó toda la noche.

Posteriormente se hicieron dos lavados a la membrana por 2 minutos cada uno con SSC 2X (preparado a partir de una solución 20X SSC la cual contiene 3M de NaCl y 0.3 M de citrato de sodio, ajustado a un pH de 7).

Los restos del gel fueron observados en UV para corroborar si la transferencia había sido completa, la membrana se colocó 5 minutos del lado donde se encuentra el ADN directamente a rayos UV para fijarlo, la membrana

se seco y se conservó seca, envuelta en bolsas plásticas a 4°C hasta su hibridación.

### **Preparación de la Sonda**

1. Se preparó una mezcla para PCR la cual contenía para cada reacción:

Buffer PCR 10X con MgCl<sub>2</sub>                      5 µl

dNTPs mix (2.5 mM de cada dNTP)      4 µl

Primer 1 (50 ng/ µl)                              5 µl

INS-1 (5'CGTGAGGGCATCGAGGTGGC)

INS-2 (5'GCGTAGGCGTCGGTGACAAA)

(Hermans *et al.*, 1992)

Primer 2 (50 ng/ µl)                              5 µl

2. Se adicionó 0.25 µl de Taq polimerasa (1.25 U) por reacción, se agitó con vortex y se mantuvo en hielo la mezcla.

3. Se adicionó 30 µl de ADN blanco (10ng), aislado de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis*, y cepas clínicas.

4. Se mezcló y se centrifugó por 5 segundos a 12000 g

Se colocó en el termociclador (PCR Perkin Elmer Gene Amp. PCR system 2400) bajo las siguientes condiciones:

3 min 94 °C (un ciclo)

1min 94 °C; 1min 65 °C; 2min 72 °C (25 ciclos)

4 min 72 °C (un ciclo)

1. Los productos de PCR se examinaron por electroforesis en un gel al 1%, teñido con bromuro de etidio. Esperándose un producto de 245 pb.
2. Se cuantificó la cantidad del producto de PCR por medio del espectrofotómetro Pharmacia GeneQuant 2.1, a una Densidad Óptica de 260 nm, por medio de una dilución 1:50.
3. La sonda fue marcada por medio del Kit ECL direct nucleic acid labelling and detection system Amersham Life Science RPN 3000, la cual consiste en un marcaje por medio de peroxida-luminol.
4. El producto de PCR se diluyó para quedar a una concentración de 10 ng/  $\mu$ l usando agua libre de nucleasas.
5. Se desnaturalizó 100 ng de ADN muestra (10  $\mu$ l) por calentamiento por 5 minutos en baño maría hirviendo.
6. Se enfrió inmediatamente en hielo por 5 minutos, se centrifugó brevemente para coleccionar el contenido en el fondo del tubo.
7. Se adicionó reactivo para marcado equivalente al volumen de la muestra (10  $\mu$ l) y se mezcló gentilmente varias veces.
8. Se adicionó la solución de Glutaraldehido, usando un volumen equivalente al volumen del reactivo, se mezcló continuamente.
9. Se incubó por 10 minutos a 37 °C y se usó antes de que transcurrieran 15 minutos.

## Hibridación

1. Preparación de los buffers de hibridación: al buffer de hibridación del Kit ECL se adicionó Cloruro de sodio 0.5 M grado analítico y agente bloqueador (caseína o albúmina de suero bovino) a una concentración final del 5%, se mezcló inmediatamente para evitar la formación de grumos, se mezcló durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se calentó a 42 °C
2. Se colocó la membrana en el buffer preparado y se dejó prehibridando una hora, con agitación suave a 42 °C
3. Posteriormente se adicionó la sonda marcada con luminol, al buffer de prehibridación evitando colocarla directamente a la membrana y se mezcló suavemente, se continuó su incubación a 42 °C con agitación constante durante toda la noche.
4. Se transfirió la membrana al buffer de lavado primario precalentado a 52 °C (urea 6M, SDS 0.4 % y SSC 0.5X) y se lavó durante 20 minutos en un volumen de 2 a 5 ml por cm<sup>2</sup> de membrana, en agitación suave a 52 °C.
5. Se desechó el buffer de lavado primario y se adicionó nuevamente la misma solución durante 10 minutos adicionales a 52 °C
6. Posteriormente se colocó la membrana en un contenedor limpio y se adicionó en exceso buffer de lavado secundario (20X SSC) y se agitó suavemente por 5 minutos a temperatura ambiente.

**Detección**

1. Se mezcló un volumen igual de reactivo 1 (Kit ECL) con reactivo de detección 2, lo suficiente para cubrir la membrana del lado donde se encuentra el ADN.
2. Se drenó el exceso de buffer secundario de la membrana y se adicionó el reactivo de detección, evitando que la membrana se seque.
3. Se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente
4. Se drenó el exceso y se quitaron las burbujas de aire al cubrirla en bolsas plásticas transparente o laminas de acetato.
5. Se colocó la membrana del lado del ADN hacia arriba en un casete para revelado, se apagaron las luces y se colocó la placa para autorradiografía arriba de la membrana, se cerró el casete y se expuso durante 10 minutos.

**V.5. Colecta de Organismos**

Los caracoles (62 organismos 1er colecta y 55 2da colecta) y anémonas (58 organismos) se colectaron en el Km 58 a 200 m de la carretera Tijuana-Ensenada, B.C. México. Debido a que los organismos se encuentran en zona intermareal se consultó el calendario de mareas para determinar la fecha de colección.

Los alacranes (100 organismos) se colectaron en la localidad del Zorrillo, Ensenada B.C.

## **V.6. Extracto crudo**

Se sacrificaron 62 caracoles y se extrajo el conducto venenoso, el cual se homogenizó con Acetonitrilo 40% y TFA 1%, se centrifugó y se colectó el sobrenadante, posteriormente se liofilizó y se resuspendió en agua estéril previo a su uso (Ferber *et al.*, 2002).

Se colocaron 58 anémonas en etanol al 30% por 24 horas a temperatura ambiente (metodología por Norton, 1976), posteriormente se decantó y se filtró al vacío con un filtro Wattman de 2 mm para eliminar restos de tejido y arena, el filtrado se liofilizó, se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se resuspendió en agua estéril previo a su uso (Prior Mier, 2002).

El veneno de alacrán se extrajo directamente del telson (Valdez, 1998), por medio de estimulación eléctrica, cada alacrán se humedeció y se colocó sobre un electrodo positivo que tiene un voltaje de 8 V de corriente continua, y con el electrodo de carga negativa se estimula el Telson, provocando que la glándula que lo contiene se contraiga y lo expulse, las gotas se colectaron en un tubo eppendorf que posteriormente se centrifugó en frío ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se decantó y se liofilizó para resuspenderse en agua previo a su uso. Se ordeñaron 100 alacranes aproximadamente.

## **V.7. Separación de Fracciones por Cromatografía**

### **V.7.1. Separación por cromatografía de exclusión molecular.**

Se resuspendieron 0.5 g de extracto crudo de *A. elegantissima* en 2.5 ml de acetato de amonio 10 mM (pH 4.7). Una vez resuspendidos, se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante media hora. Se tomó el sobrenadante (2 ml

aproximadamente), que representa el extracto crudo soluble y se calculó la concentración de proteína por espectrofotometría, a una longitud de onda de 280 nm.

Los 2 ml recuperados se colocaron en una columna de 50 cm de largo, y 1.5 cm de diámetro (econocoluma de biorad), con una matriz de Bio-gel P-30 estabilizada con acetato de amonio 10 mM (pH 4.7). El flujo de la columna fue de 1.5 ml/min y se colectaron alícuotas de 2 ml aproximadamente. Durante la colecta se llevó a cabo un registro de absorbancias de 280 nm (luz UV), con un espectrofotómetro Smartspec de Biorad. Las lecturas se graficaron por medio del programa Microsoft Excel.

A partir de las graficas obtenidas, se seleccionaron los tubos en los que se encontraban las fracciones, y se leyó la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (luz UV), con celdas de cuarzo de 2 ml con un volumen mínimo de lectura de 100 µl. Las fracciones fueron separadas de acuerdo a la gráfica.

Se mezclaron los tubos de cada fracción, se cuantificó la proteína por espectrofotometría (280 nm), y se calculó el porcentaje de recuperación de la columna, así como el porcentaje de cada fracción en el extracto soluble. Las fracciones se liofilizaron inmediatamente.

Para el extracto de alacrán se siguió la misma metodología mencionada para el extracto de anémona, variando en la cantidad de miligramos resuspendidos. En un tubo eppendorf, se disolvieron 20mg de extracto de veneno de alacrán en 2 ml de acetato de amonio 10 mM. La solución se fraccionó por medio de exclusión molecular. Al igual que en la metodología

anteriormente descrita, se recolectaron cada 2ml del flujo, y se cuantificó a 280 nm, graficándose y separando las fracciones correspondientes.

#### **V.7.2. Separación por cromatografía líquida de alta presión**

Se realizó un HPLC en fase reversa, a través de una columna semipreparativa C-18, con un gradiente lineal de 0 a 60% de acetonitrilo en 60 min; con una fase de solución amortiguadora A, de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.12 % en agua, y una fase móvil de solución amortiguadora B, de TFA en acetonitrilo al 0.1% con un flujo de 1ml/min, para la separación de las fracciones de conus.

Las Fracciones de exclusión molecular, fueron subfraccionadas por HPLC y colectadas cada 5 minutos, posteriormente se realizó la separación cada minuto. Se emplearon las mismas condiciones utilizadas para *Conus californicus*, tanto para Anémona (*Anthopleura elegantissima*) como para el alacrán (*Auronoctonus phaiodactylus*). De la fracción I de Anémona, se inyectó 438.6 µg, de la fracción II, se inyectó 479.91 µg y de la fracción III 449.99 µg. Para el caso de las fracciones de alacrán, se inyectaron 153 µg para la Fracción I, 148.75 µg para la Fracción II, 187 µg para la fracción III, 135.15 µg para la Fracción IV y 123.93 µg para la Fracción V.

#### **V.8. Evaluación de la actividad antibacteriana**

Se realizaron varias diluciones del extracto liofilizado, así como de las fracciones obtenidas tanto por exclusión molecular, en el caso de anémona y



alacrán, y de HPLC para Conus, las cuales se utilizaron para los bioensayos en cultivos de *M. tuberculosis*.

Para la determinación de la actividad de los extractos crudos y fracciones, tanto de exclusión molecular como de HPLC, se realizó el ensayo colorimétrico por MTT y Azul Alamar, ambos funcionan bajo el mismo fundamento, que se explica a continuación. Debido a la actividad metabólica de las células, la enzima deshidrogenasa cataliza la reacción de reducción de la sal MTT (3-(4,5-dimetil-1H-tetrazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio), donde la sal acepta electrones desde NADH a NADPH, produciéndose la destrucción del anillo tetrazolio, formándose cristales púrpuras insolubles (formazan), que posteriormente se solubilizan, y pueden observarse de manera visual o cuantificarse por medio de espectrofotometría a 450 nm.

Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

#### **V.8.1.Preparación del inóculo**

Se realizó un subcultivo de la cepa H37Rv en medio Lowenstein Jensen Modificado, el cual se incubó durante tres semanas.

Se recuperó, aproximadamente una azada de las células y se homogenizó en un frasco de vidrio con perlas de vidrio de 3 mm, con 2 ml de medio Middlebrook 7H9 ajustando la turbidez a la escala 1 de McFarland. Se realizó una dilución 1:20 en medio Middlebrook 7H9 libre de grumos.

### V.8.2. Preparación de los extractos

Se realizó la solubilización con agua destilada desionizada y estéril, de los extractos crudos liofilizados a diferentes concentraciones, así como de las fracciones purificadas por cromatografía de exclusión molecular, y por HPLC fase reversa:

Para el ensayo colorimétrico MTT:

Se realizó previamente un stock de cada uno de los extractos y fracciones, a una concentración doble de la que se probaría en la primera dilución, de esta manera el stock fue empleado para posteriores repeticiones.

**Tabla II.** concentración del stock, y el rango de concentraciones probadas de extractos crudos y fracciones de exclusión molecular de Anémona, y por HPLC de Conus por medio del ensayo MTT.

Extracto o fracción	Stock mg/ml	Rango final. (mg/μl)
Extracto Crudo de Anémona	160 mg/ml	40-1.25
Extracto Crudo de Conus	80 mg/ml	20-0.6
Extracto Crudo de alacrán	20 mg/ml	5-0.15
Fracción I Anémona SEC	1.6 mg/ml	0.4-0.0125
Fracción II Anémona SEC	1.6 mg/ml	0.4-0.0125
Fracción III Anémona SEC	1.6 mg/ml	0.4-0.0125
Fracción IV Anémona	1.6 mg/ml	0.4-0.0125
Fracción I Conus HPLC	1.6 mg/ml	0.4-0.0125
Fracción II Conus HPLC	1.6 mg/ml	0.4-0.0125

Para el ensayo colorimétrico Azul Alamar. Se empleó la metodología descrita para el ensayo de MTT.

**Tabla III.** Concentraciones del Stock, y rango de concentraciones de extractos crudos, y fracciones de exclusión molecular y HPLC de anémona, y HPLC de conus probadas por medio del ensayo Azul Alamar.

<b>Extracto o Fracción</b>	<b>Stock (mg/ml)</b>	<b>Rango Final (mg/ml)</b>
Extracto Crudo de Anémona	320 mg/ml	80-2.5
Extracto Crudo de Conus	120 mg/ml	30-0.93
Extracto Crudo Alacrán	14 mg/ml	3.5-0.104
Fracción I Anémona SEC	27.04 mg/ml	6.76-0.21
Fracción II Anémona SEC	190.38 mg/ml	47.59-1.48
Fracción III Anémona SEC	93 mg/ml	23.25-0.726
Fracción IV Anémona SEC	1.8 mg/ml	0.46-0.028
Fracción I Conus HPLC	0.6 mg/ml	0.18-0.0056
Fracción II Conus HPLC	0.546 mg/ml	0.136-0.427
HPLC 30'-35' Conus II	0.26 mg/ml	0.065-0.002
HPLC 35'-40' Conus II	0.11 mg/ml	0.028-0.0009
HPLC 40'-45' Conus II	0.35 mg/ml	0.039-0.001
HPLC 45'-50' Conus II	0.04 mg/ml	0.010-0.0003
HPLC 50'-55' Conus II	0.012 mg/ml	0.003-0.00009
HPLC 55'-60' Conus II	0.004 mg/ml	0.001-0.000004
HPLC 0'-5' Anémona I	0.33 mg/ml	0.082-0.002
HPLC 5'-10' Anémona I	0.054 mg/ml	0.013-0.0004
HPLC 10'-15' Anémona I	0.15 mg/ml	0.037-0.001
HPLC 15'-20' Anémona I	0.011 mg/ml	0.0029-0.00009
HPLC 20'-25' Anémona I	0.028 mg/ml	0.007-0.00022
HPLC 25'-30' Anémona I	0.024 mg/ml	0.011-0.0003
HPLC 30'-35' Anémona I	0.040 mg/ml	0.010-0.0003
HPLC 35'-40' Anémona I	0.82 mg/ml	0.209-0.006
HPLC 40'-45' Anémona I	0.32 mg/ml	0.082-0.001
HPLC 45'-50' Anémona I	0.14 mg/ml	0.037-0.001
HPLC 50'-55' Anémona I	0.033 mg/ml	0.016-0.0002
HPLC 55'-60' Anémona I	0.045 mg/ml	0.022-0.0003

Para el ensayo de MTT (Sigma) se preparó un stock de 5 mg/ml en agua destilada estéril y se filtró con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , se realizaron alícuotas y se almacenaron protegidos de la luz en refrigeración, se preparó el buffer de solubilización mezclando una relación 1:1 de DMF al 50% en agua destilada y SDS al 20% en agua destilada.

Para el ensayo de Azul Alamar se realizaron alícuotas de la solución comercial de Biosource y se almacenaron protegidos de la luz en refrigeración. Se preparó Tween 80 al 20 % en agua destilada para su dilución previa a su adición a la placa.

### **V.8.3. Montaje de la Placa**

En una placa de 96 pocillos para cultivo celular, estéril, de fondo plano y con tapadera de poliestireno (Corning Costar Mod. 3596), se realizó el siguiente ensayo.

1. Se depositaron 200  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril en todos los pocillos de la periferia de la placa.
2. Se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de medio Midlebrook 7H9 + OADC a los 60 pocillos restantes.
3. Se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de la dilución de trabajo de cada extracto o fracción en los pocillos de la fila B.
4. Se realizaron diluciones dobles seriadas hasta la fila G descartando los 100  $\mu\text{l}$  finales.
5. Se colocaron 100  $\mu\text{l}$  del inóculo en todos los pocillos con excepción de los pocillos marcados como TCM (control de esterilidad del medio).

6. En los pocillos marcados como TCM se colocaron 100µl mas de medio Midlebrook 7H9 + OADC
7. Se incubó la placa a 37°C hasta el día 5, considerando el inicio del ensayo como día cero.

#### **V.8.4. Revelado de la Placa**

Para el ensayo de MTT se añadió 10 µl de MTT 5 mg/ml y 12 µl de tween 80 al 20% y se incubó la placa 24 horas, al ocurrir la formación de precipitado violeta, se añadió 50 µl de la mezcla de SDS 20%- DMF 50%, una vez que se realizó el ensayo en el pocillo control se realizó en los pocillos con los extractos y fracciones en estudio.

Para el ensayo de Azul Alamar se añadió 25 µl de Alamar azul y 25 µl de Tween 80 al 20% y se incubó 24 horas, si se presenta algún cambio de color azul a rosado en el pocillo control se realizó el ensayo en los pocillos restantes.

#### **V.8.5. Lectura e interpretación de los resultados**

La lectura se realizó de manera visual, definiéndose la CMI (Concentración mínima inhibitoria), como la concentración del extracto o fracción de fármaco, donde no ocurrió cambio de color, cuya intensidad fue igual o menor a la obtenida en el control de crecimiento.

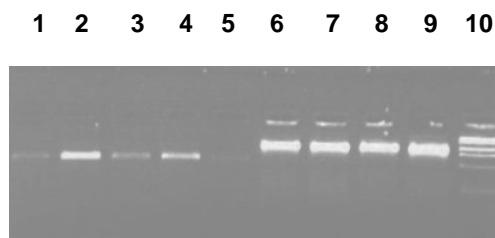
Una vez identificados los extractos con actividad antifúngica, se probaron la fracciones obtenidas por Cromatografía de exclusión molecular y HPLC en fase reversa.

Las Fracciones que presentaron actividad antibacteriana, se purificaron por HPLC fase reversa, debido a las características de las toxinas que se han reportado anteriormente, además de ser un método más fino y de mayor capacidad para la purificación, permitiendo separar los compuestos de acuerdo a su tiempo de elusión interactuando con la fase móvil. Cada una de estas fracciones se evaluó en cultivos de *M. tuberculosis*.

## VI. RESULTADOS

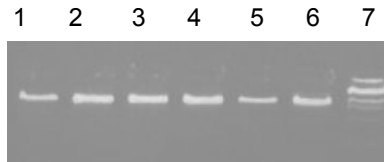
### VI.1. Caracterización de las cepas por PCR.

Para la secuencia de RAC todas las cepas mostraron una banda de 950 pb, lo cual indica que presentan las secuencias específicas para el grupo de Mycobacterias. Para la secuencia MTB la mayoría de las cepas mostraron una banda de 500 pb, por excepción de 4, indicando que la mayoría pertenece al complejo tuberculoso. De manera representativa se muestran en la figura 10 amplificados de las muestras. Los resultados de los 98 PCR se encuentran resumidos en la Tabla 13.



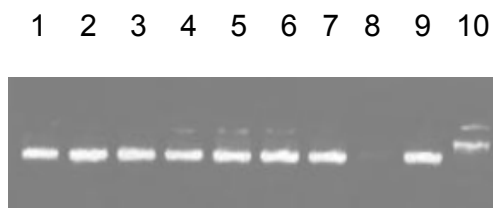
**Figura 10.** Amplificación de las cepas 16, 21, 28, 59 con los oligonucleótidos RAC carril (1-5) y con los oligonucleótidos MTB carril (6-9) en el carril 10 MPM (XIV 100 pb Gibco)

Para la secuencia RD4 la banda de 1050 pb que se esperaba fue positiva para las 98 cepas, por lo cual ninguna de ellas pertenece a la especie de *M. bovis*. De manera representativa se muestran en la figura 11 amplificados de algunas muestras. Los resultados de los 98 PCR se encuentran resumidos en la Tabla 13.



**Figura 11.** Amplificación de las cepas con los oligonucleótidos RD4. En los carriles 1-6 se muestran los amplificadores de las cepas 16, 21, 28, 59, 74 y 92 respectivamente, el carril 7 MPM (XIV 100 pb Gibco).

Para la secuencia de Mtp40 se obtuvo un resultado positivo del 100% de las muestras, por lo cual las 98 cepas pertenecen a la especie *M. tuberculosis*. De manera representativa se ilustra en la figura 12. Los resultados de los 98 PCR se encuentran resumidos en la Tabla IV.



**Figura 12.** Amplificación de las cepas con los oligonucleótidos Mtp40. En los carriles 1-9 se muestran las amplificaciones de las cepas 16, 21, 28, 59, 74, 92, 98, 100 y 116.



**Tabla IV.** Resultados de los PCR en los aislados clínicos.

Cepa	Mtp40	MTB	RAC	RD4
16	+	+	+	+
21	+	+	+	+
28	+	+	+	+
59	+	+	+	+
74	+	+	+	+
92	+	+	+	+
98	+	+	+	+
100	+	+	+	+
116 (02) y (03)	+	+	+	+
127	+	+	+	+
137	+	+	+	+
149	+	+	+	+
154	+	+	+	+
156	+	+	+	+
178	+	+	+	+
190	+	+	+	+
221	+	+	+	+
223	+	+	+	+
224	+	+	+	+
225	+	+	+	+
239	+	+	+	+
240	+	+	+	+
256	+	+	+	+
268	+	+	+	+
271	+	+	+	+
275	+	+	+	+
282	+	+	+	+
289	+	+	+	+
297	+	+	+	+
298	+	+	+	+
305	+	+	+	+
319	+	+	+	+

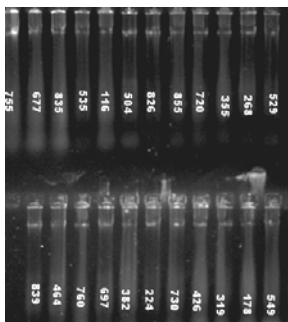
Cepa	Mtp40	MTB	RAC	RD4
337	+	+	+	+
338	+	+	+	+
345	+	+	+	+
354	+	+	+	+
355	+	+	+	+
356	+	+	+	+
358 (02 y 03)	+	+	+	+
369	+	+	+	+
374	+	+	+	+
377	+	+	+	+
381	+	+	+	+
382	+	+	+	+
409	+	+	+	+
410	+	+	+	+
416	+	+	+	+
418	+	+	+	+
420	+	+	+	+
422	+	+	+	+
426	+	+	+	+
429	+	+	+	+
437	+	+	+	+
455	+	+	+	+
466	+	+	+	+
468	+	+	+	+
469	+	+	+	+
471	+	+	+	+
475	+	+	+	+
476	+	+	+	+
481	+	+	+	+

Tabla IV. Cont.

Cepa	Mtp40	MTB	RAC	RD4
504	+	+	+	+
514	+	+	+	+
526	+	+	+	+
529	+	+	+	+
530	+	+	+	+
532	+	+	+	+
534	+	+	+	+
535 (02 y 03)	+	+	+	+
540	+	+	+	+
542	+	+	+	+
547	+	+	+	+
554	+	+	+	+
559	+	+	+	+
586	+	+	+	+
590	+	+	+	+
600	+	+	+	+
603	+	+	+	+
606	+	+	+	+
612	+	+	+	+
616	+	-	+	+
646	+	+	+	+
648	+	+	+	+
675	+	+	+	+
676	+	-	+	+
680	+	+	+	+
720	+	+	+	+
728	+	-	+	+
754	+	+	+	+
767	+	+	+	+
787	+	+	+	+
796	+	+	+	+
810	+	+	+	+
821	+	-	+	+
990	+	+	+	+

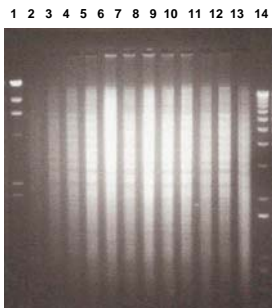
## VI.2. Caracterización de las Cepas por RFLPs

La extracción de ADN por medio del método descrito, permitió la obtención de ADN de buena calidad (Figura 13), así como la cantidad necesaria para las digestiones con la enzima *PvuII* (4.5 µg en un volumen menor de 20 µl), y así realizar la caracterización por medio de Southern Blot y RFLPs con IS6110.



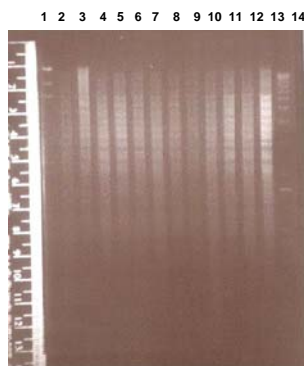
**Figura 13.** Extracción de ADN de cepas de *M. tuberculosis*.

Las digestiones con la enzima de restricción *PvuII* mostraron que se requiere más de una hora de incubación para obtener una digestión completa del ADN de las diferentes cepas, el cual se verificó en geles de agarosa al 1% (Figura 14) en una cámara de electroforesis 14 X 11 de Gibco. Esto ayudó a determinar las cantidades en microlitros necesarios para homogeneizar las cantidades de las muestras cargadas en el gel que se transfirió posteriormente, ya que este es un paso importante para la determinación de las bandas al momento de la hibridación con la sonda marcada.



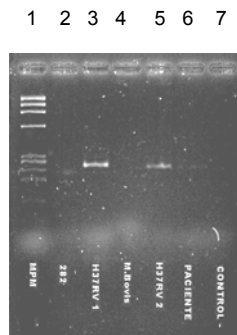
**Figura 14.** Digestiones de cepas de *M. tuberculosis*; carril 1) ADN de lambda digerido con *HindIII*; 2) cepa 374; 3) C 410; 4) C 481; 5) C 455; 6) C 821; 7) C 270; 8) C 355, 9) C 268; 10) C 319; 11) C 28; 12) C420; 13) H37Rv; 14) MPM 1 kb ADN ladder, gel base para homogeneizar las concentraciones del siguiente gel para su transferencia.

Los geles se cargaron con el ADN de las diferentes cepas clínicas a evaluar, se corrieron a 25 volts por 11 horas colocándose una regla fluorescente como referencia así como dos marcadores de peso molecular que consistieron en ADN de fago lambda digerido con *HindIII* y MPM 1 Kb plus ADN ladder (Gibco). Esto permitió la visualización de los diversos fragmentos que fueron de un rango de 0.25 a 25Kb (Figura 15). En uno de los geles transferido se colocó como cepa de referencia H37Rv y Cannetti.



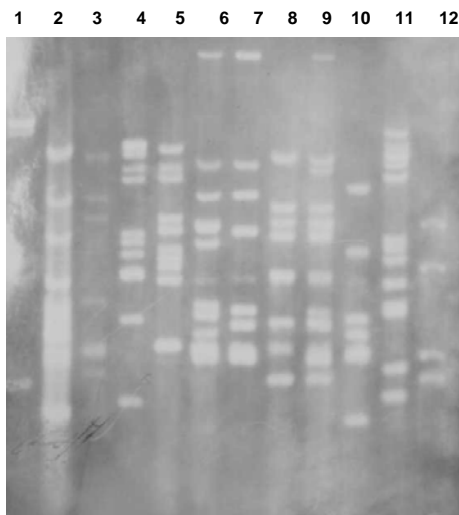
**Figura 15.** Digestiones de cepas de *M. tuberculosis*; carril 1) ADN de lambda digerido con *HindIII*;; 2) cepa 374; 3) C 410; 4) C 481; 5) C 455; 6) C 821; 7) C 270; 8) C 355, 9) C 268; 10) C 319; 11) C28; 12) C 420; 13) H37Rv; 14) MPM 1 kb ADN ladder , gel para transferencia teñido con bromuro de etidio 0.5 $\mu$ g/ml.

Por medio de los primer INS-1 e INS-2 se amplificó un fragmento de 245 pb aproximadamente, a partir de las cepas de H37Rv (300  $\mu$ g/ $\mu$ l), la cepa 282 y a partir de la muestra del paciente (50 ng/ $\mu$ l) (Figura 16), debido a que en estas dos ultimas la intensidad de la banda fue muy baja el fragmento se aisló a partir de la cepa H37Rv. La amplificación obtenida a partir de las cepas H37Rv fue utilizada como sonda para la hibridación posterior en las membranas de nylon.

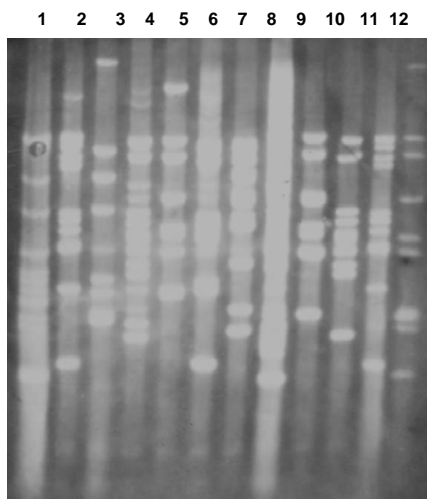


**Figura 16.** PCR de un fragmento de 245 pb de la secuencia de inserción IS6110 carril 1) MPM; 2) PCR de C 282; 3)PCR de H37Rv; 4) PCR de *C. M. bovis*; 5) PCR C H37Rv; 6) PCR aislado de paciente. 7) Control –

Por medio del Kit ECL direct nucleic acid labelling and detection system Amersham Life Science RPN 3000 se realizó la detección de las secuencias de inserción de IS6110 en los ADNs digeridos y transferidos a membranas de Nylon Hybond -N+ obteniéndose patrones de bandeado (Figuras 17 y 18), de los cuales fue posible agrupar por medio del software Quantity one (Biorad) y Taxotron 2000 (Copyright © 1994,1996,1998,200 by Institute Pasteur) con el uso de los siguientes programas: RestrictoScan.ppc, RestrictoTyper.ppc, Adanson.ppc y Dendograf.ppc para la realización de arboles filogenéticos que relacionaron las diferentes cepas de acuerdo a la diversidad de las bandas de la hibridación.



**Figura 17.** RFLPs de las cepas clínicas en el siguiente orden 1) Cannetti, 2) H37Rv, 3) 464, 4) 606, 5) 137, 6) 275, 7) 612, 8) 369, 9) 305, 10) 416, 11) 116, 12) 59.



**Figura 18.** RFLPs de las cepas clínicas en el siguiente orden; 1)H37Rv, 2) 420, 3)28, 4) 319, 5) 268, 6) 355 7) 270, 8) 821, 9) 455, 10) 481, 11) 410, 12) 374.

De las 96 cepas clínicas proporcionadas por el Hospital General de Tijuana solo 90 fueron analizadas por Fingerprinting con IS6110, ya que de las 6 restantes no se obtuvo un crecimiento adecuado de las cepas para la

extracción de ADN cromosómico. En este análisis fueron incluidas 2 cepas colombianas, y como controles las cepas Canetti y H37Rv. Se identificaron 71 patrones de bandeo diferentes en las 90 cepas (con un rango de 2-23 bandas). 10 de las 90 cepas (11.11%), tienen patrones con 5 o menos bandas de IS6110; a las cuales no se les agrupó, debido a las diferencias en el tamaño de las bandas. Por lo cual se recomienda realizar un estudio posterior por medio de la técnica spoligotyping.

Fue posible la identificación de patrones de bandeo repetitivos por medio de los cuales se realizaron 10 grupos (nombrados A, B, C, D, E, F, G, H, I, y J).

El grupo A integrado por 4 (4.4%) cepas (409, 297, 16 y 137) que tienen un patrón de 9 a 13 bandas con un rango de tamaño de 4.5 Kpb a 1.1 Kpb.

El grupo B integrado por 7 (7.7%) cepas (429, 275, 116-03, 529, 178, 606, 600), las cuales tienen un patrón de 11 bandas con un rango de 4.5 Kpb a 1 Kpb.

El grupo C con 3 (3.3%) cepas (100, 256 y 676) que tienen un patrón de 9 a 11 bandas con un rango de 36.2 Kpb a 0.9 Kpb

El grupo D con 2 (2.2%) cepas (810 y 221) con un patrón de 10 bandas de un rango de 4.2 Kpb a 0.9 Kpb.

El grupo E con 2 (2.2%) cepas (374 y 420) con un patrón de 11 y 10 bandas de un rango de 7 Kpb a 0.8 Kpb.

El grupos F con 2 (2.2%) cepas (16-02, 586) con un patrón de 12 y 13 bandas de un rango de 5.5 Kpb a 1 Kpb.

El grupo G con 3 (3.3%) cepas (612, 271 y 28) con un patrón de 11 a 9 bandas de un rango de 22.4 Kpb a 1.22 Kpb.

El grupo H con 2 (2.2%) cepas (240 y 355) con un patrón de 18 a 14 bandas de un rango de 12.1 Kpb a 1.0 Kpb.

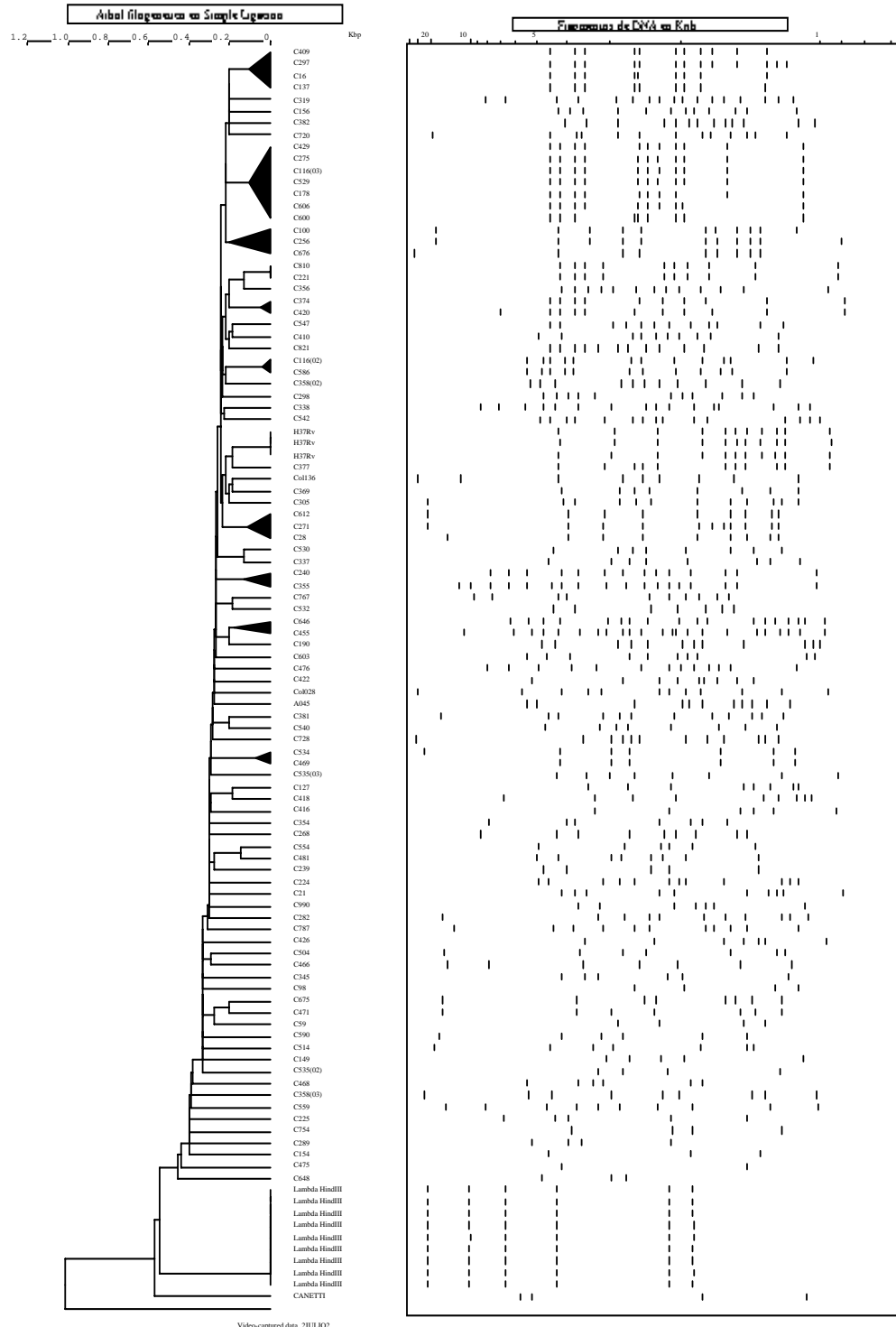
El grupo I con 2 (2.2%) cepas (646 y 455) con un patrón de 23 a 18 bandas, con un rango de 11.16 Kpb a 0.9 Kpb.

El grupo J con 2 (2.2%) cepas (534 y 469) con un patrón de 7 y 6 bandas, con un rango de 24.2 Kpb a 1.1 Kpb.

El grupo más numeroso de acuerdo al patrón de bandeo fue el grupo B, sin embargo, muchas de las bandas presentes en este grupo son compartidas por otros grupos o patrones de bandeo aislados, como es el caso de las bandas de 4.5, 4.2, 3.8, 3.0, 2.2. y 2.0 Kpb.

Las agrupaciones fueron realizadas de acuerdo al número de bandas y a su posición relativa observada en su patrón de migración (Figura 19). Algunos de los patrones pueden presentar de una a cuatro bandas más, lo cual varía de acuerdo al tiempo de exposición y los errores por manipulación al momento de la digestión de ADN o bien al cargar los geles con la cantidad estandarizada de ADN digerido para su posterior transferencia.





**Figura 19.** Dendograma de la hibridación por IS6110 de la cepas clínicas de *M. tuberculosis* analizadas.

### VI.3. Separación de fracciones de los Extractos Crudos

#### VI.3.1. Cromatografía por Exclusión Molecular

##### Anémoma.

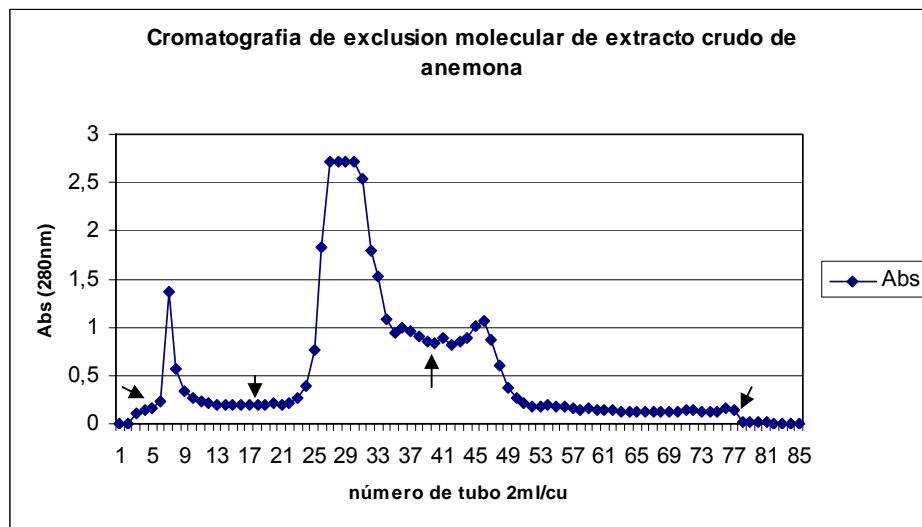
De la cromatografía por exclusión molecular, se obtuvieron tres fracciones denominadas Fracción I, Fracción II y III, respectivamente (figura 20)

\*La fracción I representa el 11.37% del extracto crudo

\*La fracción II representa el 48.09% del extracto crudo

\*La fracción III representa el 7.57% del extracto crudo

\*El porcentaje de recuperación de la columna fue de 67.04%



**Figura 20.** Cromatografía de exclusión molecular del extracto crudo de anémoma, en donde las flechas indican el sitio de corte.

## Alacrán

De la cromatografía por exclusión molecular usando como buffer acetato de amonio 10mM se obtuvieron 5 fracciones a partir del extracto crudo. Denominadas Fracción I, II, III, IV y V (figura 21).

\*La fracción I representa el 3.74% del extracto crudo

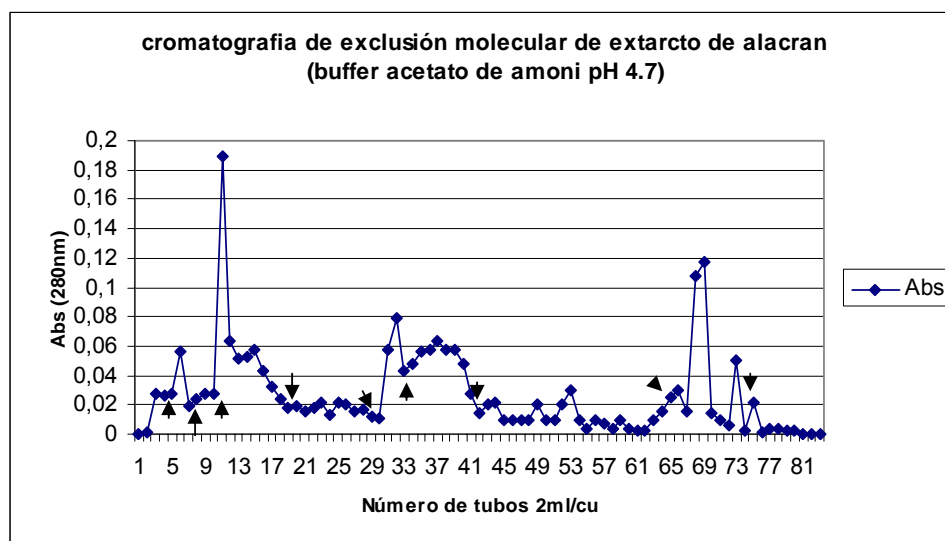
\*La fracción II representa el 18.09% del extracto crudo

\*La fracción III representa el 5.92% del extracto crudo

\*La fracción IV representa el 13.41% del extracto crudo

\*La Fracción V representa el 12.47% del extracto crudo

\*El porcentaje de recuperación de la columna fue de 53.66%

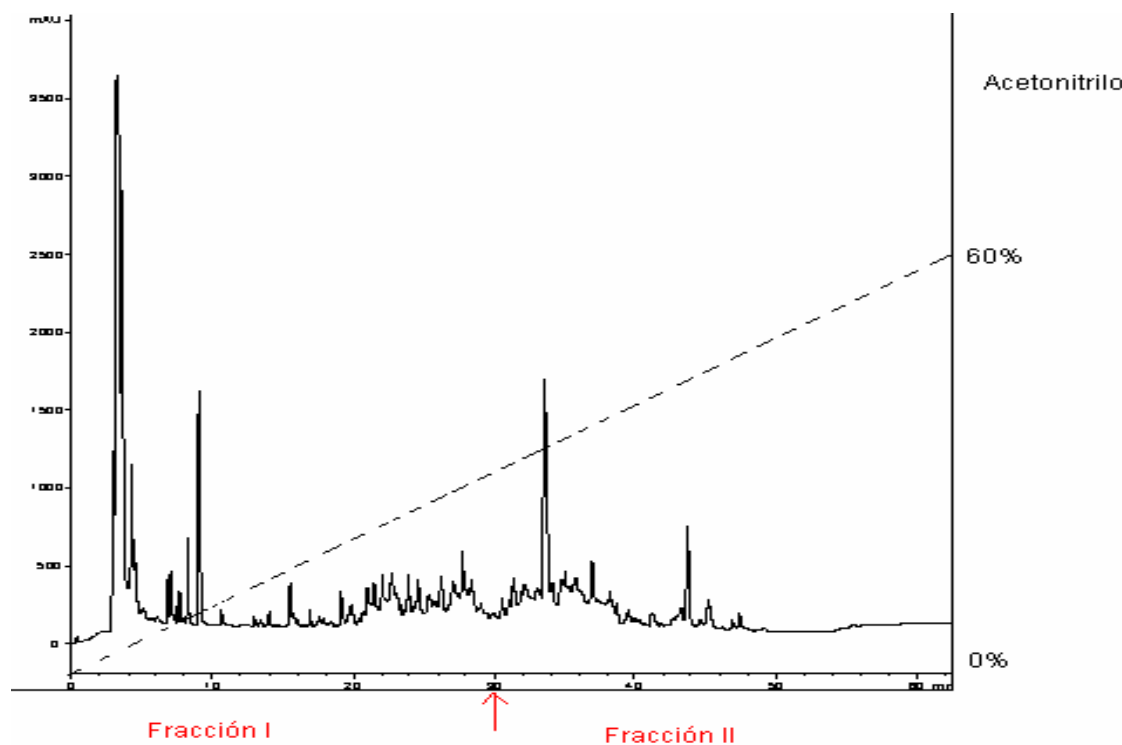


**Figura 21.** Exclusión molecular del extracto crudo de Alacrán, las flechas indican los sitios de corte.

### VI.3.2. HPLC

#### Separación de fracciones de los Extractos Crudos de Conus

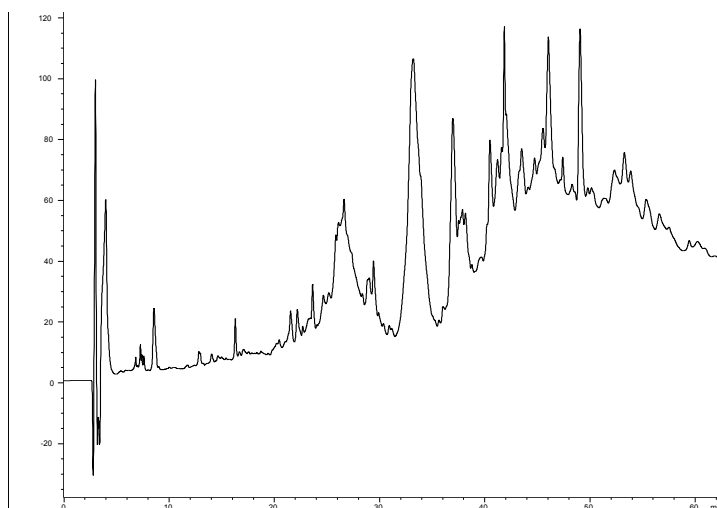
El extracto de Conus se pasó a través de una columna C-18 por HPLC fase reversa. Se colectaron dos grandes fracciones con el fin de facilitar el manejo en los bioensayos (Figura 22). La primera fracción del minuto 0-35 y la segunda del 35-60 (Febrer *et al.*, 2002).



**Figura 22.** Cromatograma del HPLC fase reversa del extracto crudo de Conus, la flecha indica el sitio de corte.

### **Separación de las Fracciones de Cromatografía por Exclusión Molecular de Anémona por HPLC.**

Las fracciones I, II, y III de anémona se fraccionaron cada 5 minutos por HPLC en fase reversa través de una columna C-18, en la fracción I (Figura 23) se detectaron 40 componentes (Tabla V), con un porcentaje de recuperación del 100%, las fracciones fueron colectadas cada 5 minutos, y 1 minuto para probarlos en bioensayos posteriores.

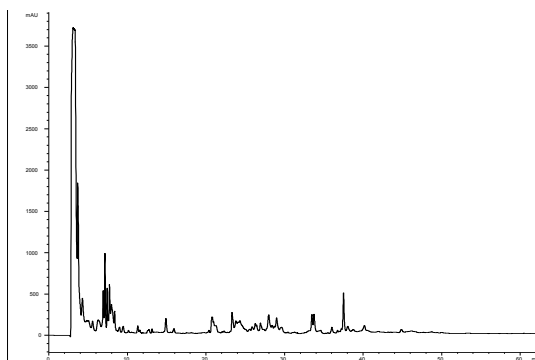


**Figura 23.** Fracción I de Anémoma separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa en un gradiente 0-60 de acetonitrilo TFA 0.1%

**Tabla V.** Componentes detectados a 230 nm en un HPLC de la fracción I de anémoma

No. Componente	Tiempo Retención (min)	Cantidad ( $\mu$ g)	% de la Fracción	No. comp.	Tiempo de retención	Cantidad ( $\mu$ g)	% de la FR
1	2.9	46.49	10.6	22	32.4	0.17	0.04
2	3.94	20	4.57	23	33.2	1.09	0.25
3	5.3	0.21	0.05	24	35.5	146	33.29
4	7.7	2.88	0.64	25	39.0	23.5	5.36
5	9.0	7.8	1.79	26	40.5	30.92	7.05
6	10.1	27.01	6.16	27	42.8	10.13	2.31
7	14.4	3.5	0.80	28	43.4	4.42	1.01
8	15.7	0.7	0.16	29	44.3	21.02	4.81
9	18.3	1.6	0.38	30	45.9	14.2	3.24
10	20.2	0.21	0.05	31	47.4	0.92	0.21
11	22.9	2.6	0.60	32	48.4	39.3	8.98
12	24.5	2.8	0.66	33	49.4	4.5	1.03
13	25.5	1.09	0.25	34	49.9	2.1	0.48
14	27.0	1.2	0.28	35	50.8	3.28	0.75
15	28.1	3.2	0.73	36	51.7	0.35	0.08
16	28.7	1.0	0.23	37	52.3	0.65	0.15
17	29.4	2.80	0.64	38	52.6	0.48	0.11
18	30.1	0.74	0.17	39	53.8	3.59	0.82
19	30.8	3.28	0.75	40	54.8	5.17	1.18
20	31.4	2.33	0.54				
21	31.9	0.43	0.10				

En la fracción II de anémoma (Figura 24) se detectaron 53 componentes (tabla VI), con un porcentaje de recuperación del 100%, las fracciones fueron colectadas cada 5 minutos.

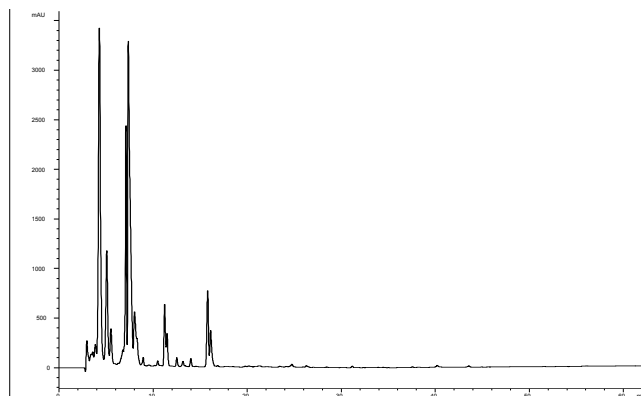


**Figura 24.** Fracción II de Anémoma separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa en una gradiente 0-60 de acetonitrilo TFA 0.1%

**Tabla VI.** Componentes detectados a 230 nm en un HPLC de la fracción II de anémona.

No. Comp.	Tiempo Retención Min	Cantidad ( $\mu$ g)	% de la FR.	No. Comp.	Tiempo De retención	Cantidad ( $\mu$ g)	% de la FR
1	2.81	116.9	24.36	21	17.4	0.33	0.07
2	3.1	199.4	41.55	22	18.2	0.09	0.02
3	4.2	14.92	3.11	23	18.8	0.14	0.03
4	4.9	0.43	0.09	24	19.8	3.02	0.63
5	5.51	3.02	0.63	25	20.8	2.63	0.55
6	6.75	15.40	3.21	26	22.3	0.23	0.05
7	7.24	19.19	4.0	27	22.7	0.76	0.16
8	7.56	2.54	0.53	28	23.43	3.16	0.66
9	7.78	20.49	4.27	29	23.8	0.23	0.05
10	8.3	1.05	0.22	30	24.3	1.43	0.30
11	8.51	2.06	0.43	31	25.9	2.54	0.53
12	9.63	2.54	0.53	32	26.3	0.09	0.02
13	10.1	0.18	0.038	33	26.4	0.33	0.077
14	10.2	0.43	0.09	34	27	2.15	0.45
15	11.4	1.96	0.41	35	27.9	4.6	0.96
16	12.7	1.43	0.30	36	28.9	2.63	0.55
17	13.2	0.52	0.11	37	29.5	0.52	0.11
18	13.6	0.19	0.04	38	30.4	0.28	0.06
19	15	3.69	0.77	39	31.1	0.19	0.04
20	15.9	7.05	1.47	40	32.1	0.09	0.02
41	33.12	0.47	0.10	47	40.2	3.74	0.78
42	33.6	1.63	0.34	48	43.4	0.28	0.06
43	34.9	1.8	0.39	49	43.9	0.11	0.025
44	36	1.10	0.23	50	44.7	0.57	0.12
45	36.8	0.23	0.05	51	47.9	6.14	1.28
46	37.5	7.29	1.52	52	49.9	0.28	0.06
				53	55.8	15.78	3.29

En la fracción III de anémona (Figura 25) se detectaron 23 componentes (Tabla VII), con un porcentaje de recuperación del 100%, las fracciones fueron colectadas cada 5 minutos.



**Figura 25.** Fracción III de Anémoma separa cada 5 minutos por HPLC fase reversa en un gradiente de 0-60 de acetonitrilo TFA 0.1%

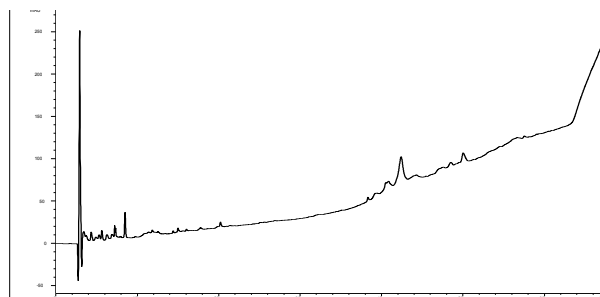
**Tabla VII.** Componentes detectados a 230 nm en un HPLC de la fracción III de anémoma

No. Comp.	Tiempo Retención Min	Cantidad (μ g)	% de la FR.	No. Comp.	Tiempo Retención min	Cantidad (μ g)	% de la FR
1	2.9	12.2	2.72	13	14.1	3.41	0.76
2	3.3	0.31	0.07	14	16.2	40.9	9.1
3	3.6	0.17	0.04	15	18.6	0.44	0.1
4	4.2	157.94	35.10	16	20.17	1.93	0.43
5	5	43.64	9.7	17	21.3	0.31	0.07
6	5.9	1.16	0.26	18	24.8	2.56	0.57
7	6.6	5.17	1.15	19	34.9	37.03	8.23
8	7.1	4.76	1.06	20	37.5	0.35	0.08
9	7.3	4.18	0.93	21	40.2	0.62	0.14
10	7.8	119.06	26.46	22	48	3.82	0.85
11	11.6	4.13	0.92	23	62	1.30	0.29
12	13.3	3.46	0.77				



### Separación de las Fracciones de Cromatografía por Exclusión Molecular De Alacrán por HPLC.

Las fracciones I, II, III, IV y V de alacrán se separaron cada 5 minutos por HPLC en fase reversa través de una columna C-18. En la fracción I de alacrán (Figura 26) se detectaron 23 componentes (tabla VIII) a 230 nm.

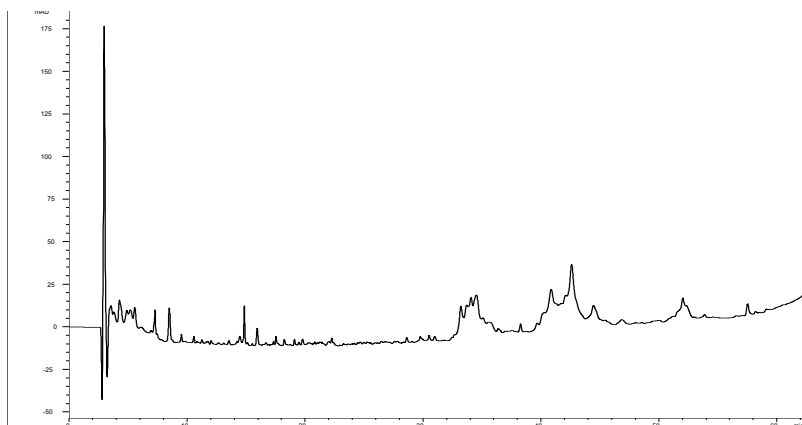


**Figura 26.** Fracción I Alacrán separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa en un gradiente de 0-60 de acetonitrilo TFA 0.1%

**Tabla VIII.** Componentes detectados a 230 nm en un HPLC de la fracción I Alacrán

No. Comp.	Tiempo Retención Min	Cantidad ( $\mu$ g)	% de la FR.	No. Comp.	Tiempo Retención min	Cantidad ( $\mu$ g)	% de la FR
1	2.9	69.2	45.24	13	12.5	0.71	0.47
2	3.4	9.24	6.04	14	14.3	0.64	0.42
3	4.3	2.46	1.61	15	15	1.26	0.83
4	4.9	0.81	0.53	16	16	0.52	0.34
5	5.3	1.08	0.71	17	17.7	1.05	0.69
6	5.6	2.09	1.37	18	20.2	2.09	1.37
7	6.2	1.97	1.29	19	40.8	8.53	5.58
8	6.8	1.02	0.67	20	42.4	25	16.40
9	7.2	2.66	1.74	21	44.2	4.2	2.75
10	8.4	5.66	3.70	22	48.5	2.15	1.41
11	11.4	2.18	1.43	23	50	7.42	4.85
12	11.8	0.68	0.45				

La Fracción II de Alacrán (Figura 27) se detectó 42 componentes (tabla IX) a 230 nm, y las fracciones empleadas para los bioensayos fueron colectadas cada 5 minutos.

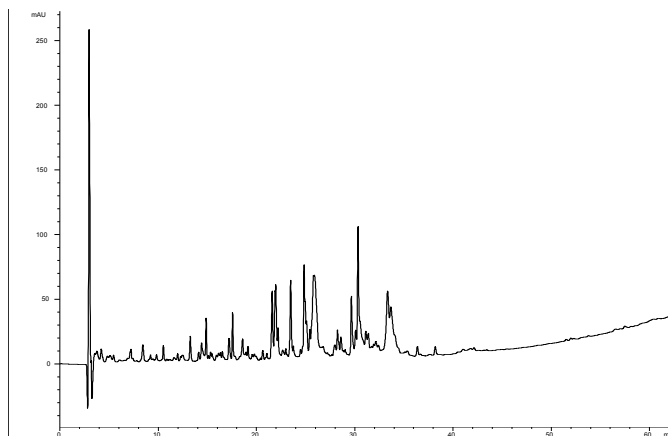


**Figura 27.** Fracción II Alacrán separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa en una gradiente 0-60 de acetonitrilo TFA 0.1%

**Tabla IX.** Componentes de la Fracción II de alacrán detectados a 230nm.

No. Componente	Tiempo Retención (min)	Cantidad (μ g)	% de la Fracción	No. comp.	Tiempo de retención	Cantidad (μ g)	% de la FR
1	2.9	50.30	33.83	22	22.2	0.41	0.28
2	3.53	8.5	5.77	23	24.6	0.37	0.25
3	4.26	3.89	2.62	24	26.4	2.24	1.51
4	4.89	0.78	0.53	25	27.5	0.55	0.37
5	5.18	0.93	0.63	26	28.6	0.72	0.49
6	5.56	1.36	0.92	27	29.7	0.81	0.55
7	7.28	2.03	1.37	28	30.5	0.57	0.39
8	8.49	4.29	2.89	29	30.9	0.59	0.40
9	9.51	0.53	0.36	30	34.0	0.98	0.66
10	10.57	0.47	0.32	31	34.5	3.5	2.38
11	11.74	0.49	0.33	32	35.5	2.02	1.36
12	12.03	0.37	0.25	33	36.3	0.59	0.40
13	13.5	0.43	0.29	34	38.2	1.02	0.69
14	14.4	0.99	0.67	35	39.6	0.46	0.31
15	14.8	2.61	1.76	36	40.8	9.27	6.24
16	15.9	1.68	1.13	37	42.6	17.99	12.1
17	16.6	0.44	0.3	38	44.4	6.98	4.7
18	17.5	0.81	0.55	39	46.8	1.93	1.3
19	18.2	0.65	0.44	40	52.0	11.74	7.9
20	19.1	0.59	0.40	41	53.8	0.65	0.44
21	19.7	0.69	0.47	42	57.52	1.79	1.21

En la Fracción III de alacrán (figura 28) se detectaron 54 componentes (Tabla X). Se colectaron fracciones de 5 minutos para los bioensayos.



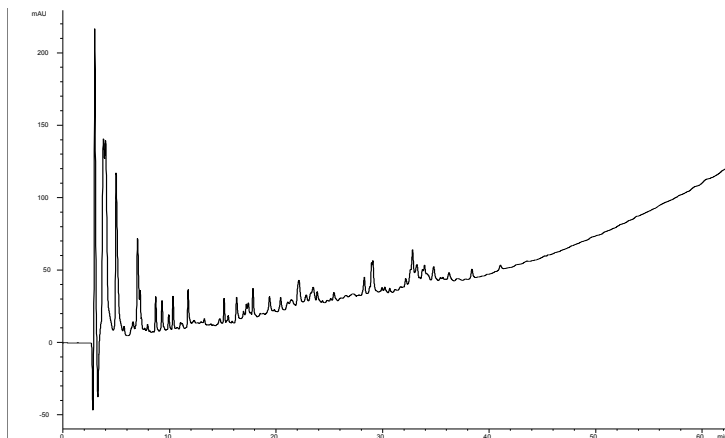
**Figura 28.** Fracción III Alacrán separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa en un gradiente 0-60 de acetonitrilo TFA 0.1%

**Tabla X.** Componentes de la Fracción III de alacrán detectados a 230 nm.

No. Comp.	Tiempo Retención Min	Cantidad (μ g)	% de la FR.	No. Comp.	Tiempo Retención min	Cantidad (μ g)	% de la FR
1	2.92	34.9	18.7	21	18.5	2.18	1.17
2	4.19	2.2	1.18	22	19.1	0.93	0.50
3	4.5	1.27	0.68	23	19.7	1.58	0.85
4	5.4	0.46	0.25	24	20.6	1.23	0.66
5	7.2	2.5	1.34	25	21	0.63	0.34
6	8.4	2.48	1.33	26	21.5	6.58	3.52
7	9.2	0.63	0.34	27	21.9	8.82	4.72
8	9.8	0.72	0.39	28	22.1	0.69	0.37
9	10.5	1.53	0.82	29	22.6	0.71	0.38
10	11.6	0.46	0.25	30	22.9	0.59	0.32
11	11.9	0.59	0.32	31	23.4	8.20	4.39
12	12.4	1.53	0.82	32	23.7	0.44	0.24
13	13.2	2.7	1.46	33	24.4	0.57	0.31
14	14.1	0.71	0.38	34	24.8	16.08	8.6
15	14.4	2.07	1.11	35	25.4	1	0.54
16	14.8	3.06	1.64	36	25.8	24.36	13.03
17	15.3	0.37	0.20	37	26.7	0.56	0.30
18	16.5	0.63	0.34	38	27.9	0.86	0.46
19	17.2	2.74	1.47	39	28.2	2.35	1.26
20	17.5	3.66	1.96	40	28.5	1.66	0.89

No. Comp.	Tiempo Retención Min	Cantidad (μ g)	% de laFR.	No. Comp.	Tiempo Retención min	Cantidad (μ g)	% de la FR
41	29.6	7.10	3.80	48	33.6	1.79	0.96
42	30.0	1.19	0.64	49	35.3	1.40	0.75
43	30.3	14.6	7.81	50	36.3	1.17	0.63
44	31.2	1.14	0.61	51	38.1	1.19	0.64
45	31.3	0.87	0.47	52	41.0	0.33	0.18
46	32.1	0.74	0.40	53	42.1	1.06	0.57
47	33.3	6.97	3.73	54	57.5	1.32	0.71

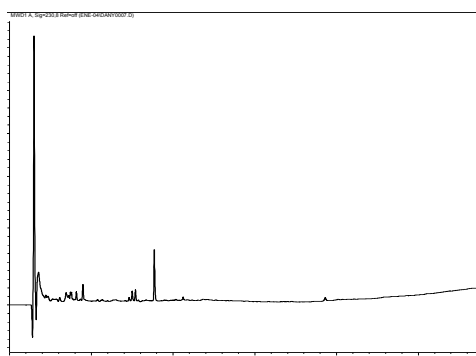
En la fracción IV y V de alacrán (Figuras 29 y 30 respectivamente) se detectaron 46 y 21 componentes respectivamente (Tablas XI y XII) a 230 nm. Como en las fracciones anteriores, la colecta y recuperación fueron hechas cada 5 minutos para la realización de los bioensayos posteriores.



**Figura 29.** Fracción IV Alacrán separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa en un gradiente 0-60 de acetonitrilo TFA 0.1%

**Tabla XI.** Componentes de la Fracción IV de alacrán detectados a 230 nm

No. Comp.	Tiempo Retención Min	Cantidad ( $\mu$ g)	% de la FR.	No. Comp.	Tiempo Retención min	Cantidad ( $\mu$ g)	% de la FR
1	2.95	26.89	19.9	24	19.3	1.43	1.06
2	3.79	6.13	4.54	25	20.4	1.12	0.83
3	3.96	20.38	15.08	26	21.4	1.51	1.12
4	4.98	23.96	17.73	27	22.1	3.04	2.25
5	6.56	0.90	0.67	28	22.8	0.56	0.42
6	6.99	9.83	7.28	29	23.4	1.98	1.47
7	7.94	0.37	0.28	30	23.8	0.62	0.46
8	8.69	2.24	1.66	31	25.4	0.82	0.61
9	9.3	1.97	1.46	32	26.5	0.55	0.41
10	9.9	0.94	0.70	33	27.2	0.51	0.38
11	10.32	1.77	1.31	34	28.2	1.44	1.07
12	11.03	0.91	0.68	35	29	4.69	3.44
13	11.74	2.18	1.62	36	29.9	0.22	0.17
14	12.30	0.22	0.17	37	30.2	0.29	0.22
15	14.71	0.47	0.35	38	30.6	0.28	0.21
16	15.12	1.17	0.87	39	32.1	0.52	0.39
17	15.50	0.44	0.33	40	32.8	2.79	2.07
18	16.29	1.86	1.38	41	32.2	0.81	0.60
19	16.94	0.22	0.17	42	33.9	2.62	1.94
20	17.21	0.29	0.22	43	34.8	1.5	1.11
21	17.38	0.35	0.26	44	36.2	0.87	0.65
22	17.83	1.5	1.11	45	36.9	0.33	0.25
23	18.8	0.33	0.25	46	38.8	0.82	0.61

**Figura 30.** Fracción V de Alacrán separada cada 5 minutos por HPLC fase reversa en un gradiente de acetonitrilo TFA 0.1%

**Tabla XII.** Componentes de la Fracción V de alacrán detectados a 230 nm

No. Comp.	Tiempo Retención Min	Cantidad (μ g)	% de la FR.	No. Comp.	Tiempo Retención min	Cantidad (μ g)	% de la FR
1	2.98	59.38	47.2	12	11.3	0.90	0.73
2	3.53	31.8	25.7	13	12.9	1.77	1.43
3	4.4	0.42	0.34	14	14.6	0.63	0.51
4	4.6	0.65	0.53	15	14.9	1.97	1.59
5	5.7	1.59	1.29	16	15.3	1.98	1.60
6	6.1	1.01	0.82	17	16.6	0.57	0.46
7	6.9	1.79	1.45	18	17.7	9.7	7.83
8	7.4	9.17	2.26	19	20.3	0.54	0.44
9	8.1	1.66	1.34	20	21.2	0.71	0.58
10	8.9	2.92	2.36	21	38.6	1.05	0.85
11	10.7	0.52	0.42				

#### VI. 4. Evaluación de la actividad antibacteriana

Por medio del ensayo de MTT se hizo una primera evaluación de los extractos crudos de Anémona, Conus y Alacrán.

Para las fracciones I, II, y III de anémona por exclusión molecular y las Fracciones I y II de conus se emplearon las siguientes concentraciones

## Concentraciones en mg/ml

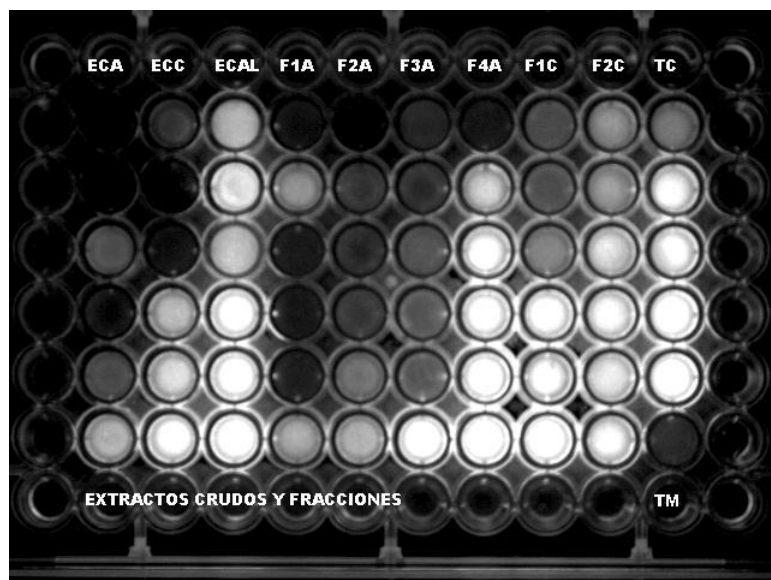
<b>ECA</b>	40-1.25
<b>ECC</b>	20-0.6
<b>ECAL</b>	5-0.15
<b>F1A</b>	0.4-0.0125
<b>F2A</b>	0.4-0.0125
<b>F3A</b>	0.4-0.0125
<b>F1C</b>	0.4-0.0125
<b>F2C</b>	0.4-0.0125

ECA= Extracto crudo de Anémona  
 ECC= Extracto crudo de Conus  
 ECAL= Extracto crudo de Alacrán  
 F1A= Fracción 1 Anémona SEC  
 F2A= Fracción 2 Anémona SEC  
 F3A= Fracción 3 Anémona SEC  
 F1C= Fracción I Conus HPLC  
 F2C= Fracción 2 Conus HPLC

Resultando la inhibición del crecimiento con:

- \* El extracto crudo de anémona a una CMI de 40 mg/ml
- \* El extracto crudo de Conus a una CMI de 20 mg/ml
- \* La Fracción I Anémona con una inhibición de crecimiento parcial a una concentración de 400 µg/ ml.
- \* La Fracción II de Conus a una CMI de 400 µg/ ml.

Por lo tanto el ensayo se repitió pero con la técnica de Azul Alamar modificando las concentraciones de cada extracto y fracción (Figuras 31, 32 y 33).



<b>ECA</b>	80-2.5
<b>ECC</b>	30-0.93
<b>ECAL</b>	3.5-0.104
<b>F1A</b>	6.76-0.21
<b>F2A</b>	47.59-1.48
<b>F3A</b>	23.25-0.726
<b>F4A</b>	0.46-0.028
<b>F1C</b>	0.18-0.0056
<b>F2C</b>	0.136-0.427

**Figura 31.** Placa de 96 pocillos en la que se realizó la prueba de toxicidad contra *M. tuberculosis*. A la derecha se encuentran las iniciales y las concentraciones de cada extracto y fracción probados, en el último carril se encuentra el control de crecimiento TC que abarca los 5 pocillos de la columna, mientras que el último pocillo de la columna marcado como TM es el control de esterilidad del medio.

La inhibición de crecimiento fue visible en:

\*Extracto Crudo de Anémoma con una CMI 40 mg/ml

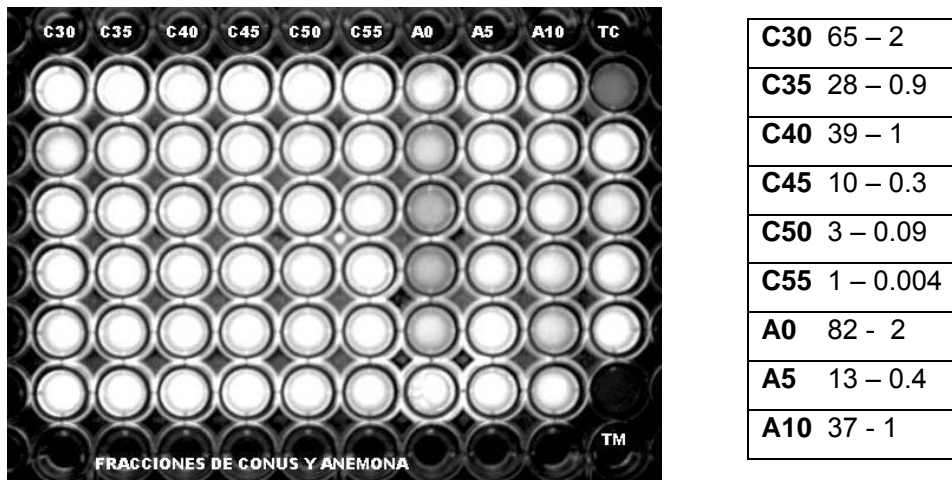
\*Extracto Crudo de Conus a una CMI de 7.5 mg/ml

\*Fracción I de anémoma SEC a una CMI de 0.42 mg/ml

\*Fracción II de anémoma SEC a una CMI de 47.59 mg/ml

Concentraciones en  $\mu\text{g/ml}$





**Figura 32.** Placa de 96 pocillos en la que se hizo la prueba de toxicidad contra *M. tuberculosis*. A la derecha se encuentran las iniciales y las concentraciones de cada fracción tanto de Conus como de Anémoma probados. En el último carril se encuentra el control de crecimiento TC que abarca los 5 pocillos de la columna mientras que último pocillo de la columna marcado como TM es el control de esterilidad del medio

C30= Fracción por HPLC de Conus del minuto 30-35

C35= Fracción por HPLC de Conus del minuto 35-40

C40= Fracción por HPLC de Conus del minuto 40-45

C45= Fracción por HPLC de Conus del minuto 45-50

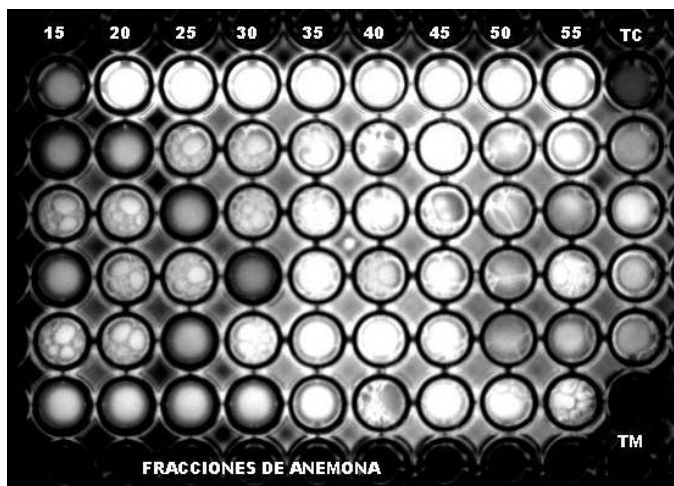
C50= Fracción por HPLC de Conus del minuto 50-55

C55= Fracción por HPLC de Conus del minuto 55-60

A0 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 0-5

A5 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 5-10

A10 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 10-15



<b>A15</b>	2.9 - 0.09 $\mu\text{g/ml}$
<b>A20</b>	7 - 0.22 $\mu\text{g/ml}$
<b>A25</b>	11 - 0.3 $\mu\text{g/ml}$
<b>A30</b>	10 - 0.3 $\mu\text{g/ml}$
<b>A35</b>	209 - 6 $\mu\text{g/ml}$
<b>A40</b>	82 - 2.5 $\mu\text{g/ml}$
<b>A45</b>	37 - 1 $\mu\text{g/ml}$
<b>A50</b>	16 - 0.2 $\mu\text{g/ml}$
<b>A55</b>	22 - 0.3 $\mu\text{g/ml}$

**Figura 33.** Placa de 96 pocillos en la que se hizo la prueba de toxicidad contra *M. tuberculosis*. A la derecha se encuentran las iniciales y las concentraciones de cada fracción de Anémoma probados. En el último carril se encuentra el control de crecimiento TC que abarca los 5 pocillos de la columna mientras que último pocillo de la columna marcado como TM es el control de esterilidad del medio.

A15 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 15-20

A20 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 20-25

A25 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 25-30

A30 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 30-35

A35 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 35-40

A40 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 40-45

A45 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 45-50

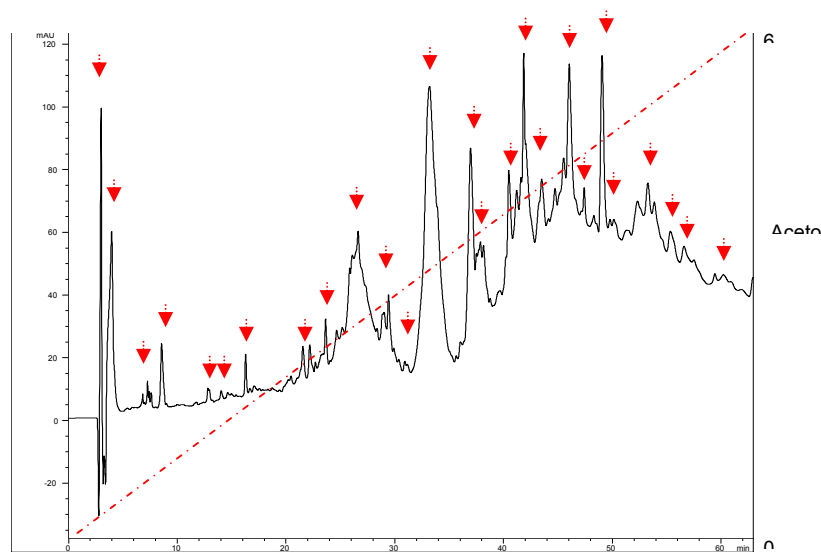
A50 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 50-55

A55 =Fracción por HPLC de la Fracción I SEC del min. 55-60

En las fracciones de HPLC tanto de Conus como de la Fracción I de anémoma SEC no se observó una inhibición de crecimiento total, únicamente

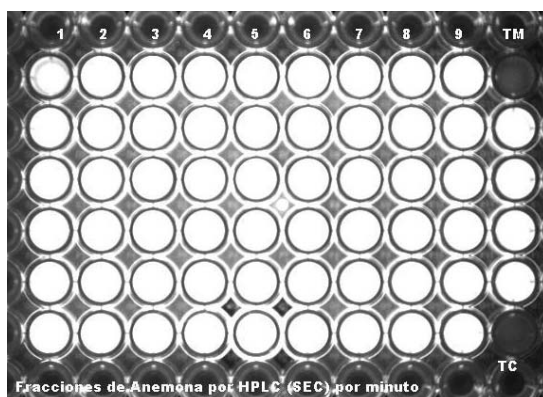
se observó una inhibición parcial en la F1 de Anémona en la fracción 15-20 con una MIC de 1.45  $\mu\text{g/ml}$ .

Para evaluar si este resultado era debido algún antagonismo o enmascaramiento por otras moléculas presentes en las mismas fracciones, se realizó un tercer ensayo donde se evaluaron fracciones por minuto, únicamente las que contenían algún pico dentro del cromatograma de la Fracción I de Anémona SEC. (Figura 34), bioensayos realizados por la técnica Azul alamar (Figuras 35, 36 y 37)

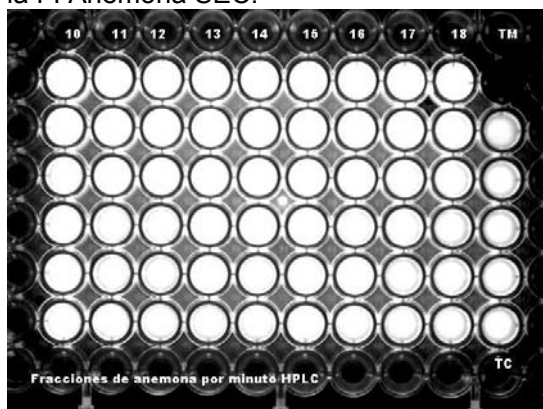


**Figura 34.** Fracciones de cada minuto que fueron tomadas para los ensayos de acuerdo a la presencia de picos en el cromatograma el cual esquematiza la condiciones a las que se hizo el HPLC para la purificación de la Fracción I de Anémoma SEC con un gradiente de 0-60% de acetonitrilo TFA 0.12%.

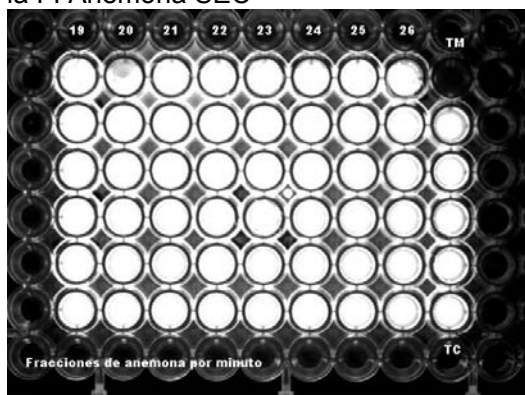
**Tabla XIII.** Fracciones probadas en los Bioensayos y concentraciones



**Figura 35.** Ensayo de toxicidad contra *M. tuberculosis* con Fracciones por HPLC a partir de la FI Anémoma SEC.



**Figura 36.** Ensayo de toxicidad contra *M. tuberculosis* con Fracciones por HPLC a partir de la FI Anémoma SEC



**Figura 37.** Ensayo de toxicidad contra *M. tuberculosis* con Fracciones por HPLC a partir de la FI Anémoma SEC.

No. De Fracción	Minuto de colecta	Máxima Concentración Probada
1	3	0.478 µg/µl
2	4	0.01185 µg/µl
3	5	0.0794 µg/µl
4	8	0.021 µg/µl
5	10	0.0902 µg/µl
6	11	0.0025 µg/µl
7	14	0.01285 µg/µl
8	16	0.0184 µg/µl
9	18	0.039 µg/µl
10	22	0.0262 µg/µl
11	24	0.01445 µg/µl
12	25	0.00675 µg/µl
13	26	0.0042 µg/µl
14	28	0.050 µg/µl
15	30	0.04715 µg/µl
16	32	0.05655 µg/µl
17	35	1.165 µg/µl
18	38	0.1985 µg/µl
19	39	0.184 µg/µl
20	42	0.0767 µg/µl
21	43	0.0069 µg/µl
22	46	0.0011 µg/µl
23	47	0.082 µg/µl
24	49	0.025 µg/µl
25	51	0.0141 µg/µl
26	52	0.0165 µg/µl

Se realizó un ensayo más, modificando las concentraciones y tomando en cuenta las fracciones por minuto en las que no se observaba algún pico de detección a 230 nm combinándolos (Tabla XIV), también se realizaron combinaciones de los minutos que en el ensayo anterior (fracciones de anémona colectadas cada 5 min.) mostraron actividad y probándolos bajo las mismas condiciones descritas anteriormente con ambas pruebas colorimétricas Azul Alamar y MTT.

**Tabla XIV.** Fracciones de Anémona, minuto de colecta y max. Concentración, probadas en bioensayos contra micobacterias

No. De Fracción	Minuto de colecta	Máxima Concentración Probada
I.1	2.7	80 µg/µl
I.2	3.9	328 µg/µl
I.3	6.9	23.2 µg/µl
I.4	8.1	104 µg/µl
I.5	15.5	26.4 µg/µl
I.6	16.2	44 µg/µl
I.7	22	47.2 µg/µl
I.8	23	56 µg/µl
I.9	26.6	2048 µg/µl
I.10	28.8	87.2 µg/µl
I.11	29.61	64 µg/µl
I.12	Σ	23 µg/µl
I.13	30-40	5120 µg/µl
I.14	40-50	976 µg/µl
I.15	50-60	1928 µg/µl
I.16	Σ 15+16	45.2 µg/µl
I.17	Σ 15+17	48.9 µg/µl
I.18	Σ 15+18	63.2 µg/µl
I.19	Σ 15+19	38.7 µg/µl
I.20	Σ 15+20	42 µg/µl
I.21	Σ 16+17	25.8 µg/µl
I.22	Σ 16+18	35 µg/µl
I.23	Σ 16+19	31 µg/µl
I.24	Σ 16+20	38 µg/µl
I.25	Σ 17+18	13.7 µg/µl
I.26	Σ 17+19	14.9 µg/µl
I.27	Σ 17+20	10 µg/µl
I.28	Σ 18+19	18.6 µg/µl
I.29	Σ 18+20	22 µg/µl
I.30	Σ 19+20	19 µg/µl

En donde  $\Sigma$  es la combinación de las fracciones en las que no se detectaron presencia de picos bajo la lectura de 230 nm. Mientras que  $\Sigma$  Num+Num. Es la combinación de dos fracciones de minutos de retención determinados.

**Tabla XV.** Fracciones de conus, minuto de colecta y máxima concentración probadas en los bioensayos

No. De Fracción	Minuto de colecta	Máxima Concentración Probada
II.1	0-30	19200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
II.2	31.7	240 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
II.3	34.7	9136 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
II.4	36.2	464 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
II.5	38	1088 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
II.6	39	272 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
II.7	$\Sigma$	114 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

No se encontró actividad antifúngica en las fracciones obtenidas y repurificadas tanto de anémona como de conus (Tabla XV), así como las combinaciones de las fracciones por minuto para desechar un posible sinergismo con los componentes purificados, aun incrementando las concentraciones y probando ambos métodos colorimétricos para los ensayos que involucraban extractos y fracciones de conus (dato no mostrado).

## VII. DISCUSIONES.

### VII. 1. Caracterización de Cepas.

#### PCRs

Las pruebas de detección rápidas por medio de la amplificación de secuencias para la detección directa de cepas clínicas de Mycobacterias, se ha desarrollado en las últimas décadas, para su accesibilidad, el mejoramiento de sensibilidad, simplicidad y costo razonable. La prueba bajo esta técnica más conocida es el ensayo de PCR, el cual fue usado por primera vez en 1989 para detectar *M. tuberculosis* con el uso del gen encargado de la expresión de la proteína de 65 kDa. De hecho se han realizado pruebas que mejoren su sensibilidad, ya que en algunos pacientes como es el caso de la tuberculosis en infantes, es difícil de detectar la presencia bacteriana, para esto se ha utilizado con gran eficacia la amplificación de IS6110 (Montenegro *et al.*, 2003).

Se emplearon oligonucleótidos anteriormente reportados para la amplificación de secuencias específicas para el género y especies de mycobacterias (Cobos *et al.*, 2003) por medio del cual fue posible la identificación de las 98 cepas, por medio de los cuatro oligonucleótidos descritos, MTB, Mtp40, RAC y RD4 indicando que pertenecen al género *Mycobacterium* debido a la amplificación del fragmento de RAC, y especie *Mycobacterium tuberculosis* dado el resultado con Mtp40, con ningún resultado negativo para RD4 indicando que ninguna de ellas pertenece a la especie *M. bovis*, sin embargo, en contraste se encontraron resultados negativos en cuatro cepas para la amplificación con los oligonucleótidos MTB. Estos amplifican solo en miembros del complejo *M. tuberculosis* el cuál también incluye *M. canettii*, *M.*

*tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis*, la explicación a este resultado es el probable aumento en la tasa de mutación del gen que sirve como blanco para su amplificación en algunas de las cepas. Sin embargo, esto solo se puede comprobar mediante la secuenciación del gen.

### **RFLPs**

El análisis por medio de la técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), con la secuencia de inserción IS6110, frecuentemente se ha empleado para el análisis y estudios de tipo epidemiológico a nivel mundial, debido a la estandarización del método y bases de datos generadas por diferentes laboratorios, para ayudar a relacionar el origen de infección en comunidades urbanas y rurales.

La identificación acertada de especies de micobacterias, se ha demostrado en el estudio realizado por Viana-Nero y colaboradores en Enero del 2001, por medio del cual se logró la identificación y el análisis de diversidad genética de *Mycobacterium africanum*, realizando una combinación de las técnicas de RFLPs, VNTR (Variable Number of Tandem ADN Repeats) y Spoligotyping haciendo posible la identificación de tres grupos en 81 cepas diferentes y así como la identificación de cepas de Cannedetti en cultivos secundarios.

Bifani y colaboradores (Sept 2000), también lograron identificar la contaminación cruzada por cepas no patogénicas (H37Ra) en cultivos clínicos, por medio de RFLPs con IS6110.

Las cepas que fueron negativas para la amplificación de MTB fueron las cepas 821, 676, 728 y 616, para la última de ellas no se logró el crecimiento



necesario para la extracción de ADN y su análisis por RFLPs, las cepas 821 y 728 debido a su patrón de bandeo no fue posible agruparlas, por lo cual no presentan ninguna correlación con el resultado negativo en la amplificación con los oligonucleótidos MTB. La cepa 676 presentó un patrón similar a las cepas 100 y 256 integrando así el grupo C, aunque dentro de este mismo grupo se comparte la mayoría de las bandas, indicando que pertenecen a orígenes similares.

La caracterización por medio de RFLPs con la secuencia de inserción IS6110 logró la identificación de 10 grupos, en los cuales se observa un origen en común, sin embargo estos solo representan 29 cepas (32.2%), en tanto que las 61 cepas restantes (67.7%) presentan patrones de bandeo aislados, lo cual indica que estas cepas pertenecen a diferente origen de infección por parte de los pacientes, o a un alto índice de mutaciones de las cepas que se están analizando. Estos datos se deben evaluar en futuros estudios epidemiológicos, en los cuales se deben correlacionar los hábitos de cada paciente, así como raza, sexo y edad, para tratar de correlacionar el origen de infección, así como la realización de bioensayos de multidrogo-resistencia a cada uno.

El análisis aquí realizado, de las cepas clínicas, demuestra que en la región de Baja California, existe una gran variabilidad de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, así como diferentes focos de infección en el estado, En este sentido, el porcentaje de agrupamiento de los patrones genéticos en una determinada población ha sido empleado para estimar el grado de transmisión activa (Baldeviano *et al.*, 2003). Lo anteriormente descrito esta sustentado en que pacientes con una infección reciente, y relacionada

epidemiológicamente, presentan cepas de un mismo origen clonal y, por ende, proporcionan un patrón genético de RFLP muy similar. Mientras que, en pacientes con tuberculosis, procedentes de una reactivación endógena o de un origen de infección diferente, son independientes y por lo tanto presentan patrones genéticos de RFLPs distintos entre sí.

## VII.2. Extractos y Fracciones

La obtención de los extractos crudos se llevó a cabo, en base a las investigaciones realizadas para la purificación de péptidos con actividad en canales iónicos, así como pruebas de toxicidad en varios tipos celulares (Prior Mier, 2002; Schweiz *et al.*, 1981). Posterior a la obtención del extracto crudo, se realizó la liofilización, y las cromatografías de exclusión molecular de anémona y alacrán, en las cuales, se obtuvieron 3 y 5 fracciones respectivamente, donde se esperaba que los componentes, o péptidos con actividad en canales iónicos, se ubicaran en las fracciones II y III del extracto de anémona, tomando como referencia investigaciones previas (Prior Mier, 2002), en donde se encontró efectos en la actividad de canales iónicos en células de *Helix aspersa*, efectos en líneas celulares de cáncer, y efectos paralizantes en bioensayos con algunas especies de artrópodos, así como algunas propiedades farmacológicas encontradas en péptidos purificados en las fracciones II y III por SEC a partir de 8 anémonas distintas (Schweitz *et al.*, 1981), y la presencia de péptidos con aminoácidos con carga positiva tóxicos en ratones, obtenidas a partir del veneno de alacrán y anémona (Loret *et al.*, 1994). Sin embargo, no se descartó la existencia de algún otro componente

que afectara en el crecimiento de *M. tuberculosis*, por lo cual se repurificaron cada una de estas fracciones por HPLC fase reversa con una columna C18 a un gradiente de 0-60%, metodología también utilizada para fraccionar el extracto crudo de conus por HPLC, cabe mencionar que esta ultima técnica ha sido utilizada por varios autores que han logrado encontrar actividad de péptidos de conus contra canales ionicos de caracoles y en langostas, así como péptidos y moléculas de fracciones de alacranes y anémonas con actividad en mamíferos e insectos (Hillyard *et al.*, 1988; Prior Mier, 2002; Valdez, 199; Rigby *et al.*,1999). Sin embargo también se han realizado otras técnicas de purificación que pueden aumentar la concentración y purificación de moléculas con actividad, esto implica la obtención de extracto suficiente para la obtención de fracciones por exclusión molecular, por intercambio iónico y diálisis, y posteriormente con HPLC en fase reversa, así como una técnica diferente de la obtención del extracto crudo en anémonas, el cual consiste en la homogenización del tejido en metanol al 95% y calentamiento a 60 °C (Schweitz *et al.*, 1981), lo cual puede afectar la estructura de péptidos que no sean muy resistentes y provocar su desnaturalización, sin embargo algunas moléculas de otro origen podrían ser analizadas.

### **VII.3. Evaluación de actividad antifímica.**

En las últimas décadas se han desarrollado métodos para la evaluación de cepas resistentes, por medio de técnicas que aminoran gastos y tiempo. De esta manera, el método seleccionado para la evaluación de los extractos crudos y las fracciones purificadas por exclusión molecular y HPLC fue el de

Azul Alamar y MTT, empleado en estudios anteriores para determinar el patrón de resistencia de cepas multidrogo-resistentes de *M. tuberculosis* con antifímicos de primera y segunda línea (Franzblau *et al.*, 1998). Estos son métodos relativamente rápidos, ya que solo requiere de 5 a 8 días máximos para su evaluación con un costo accesible comparado con otros métodos como el de Bactec, el cual es poco accesible al material tanto para medios de crecimiento, aparatos y sin olvidar el empleo de radioactividad.

La búsqueda de toxinas y péptidos con uso terapéutico y como nuevos agentes antibacterianos y antifímicos, se ha remontado desde siglos anteriores. Recientemente (Xie *et al.*, 2003) encontraron un péptido purificado a partir de una serpiente asiática *Naja atra*, el cual tuvo actividad deteniendo el crecimiento de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* probado por medio del método de Bactec, encontrando una MIC de 8.5mg/l. El péptido contiene enlaces disulfuro y es de un peso molecular pequeño, con características similares a las presentes en escorpiones, anémonas y caracoles.

La técnica de Azul Alamar ha sido empleada de manera efectiva, fue aplicada (Franzblau *et al.*, 1998) para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de isoniacida, rifampicina, estreptomina y etambutol. Este ensayo se comparó con la técnica más empleada por los laboratorios, llamada el método de proporciones. Collins y Franzblau en 1997 realizaron un estudio, con 30 diferentes antifímicos en *M. tuberculosis* H37Rv, H37Ra y *M. avium* y comparándolo con el método de Bactec. Estas investigaciones demostraron que esta técnica es confiable para la determinación de cepas multirresistentes,

así como, la obtención de MIC de nuevos fármacos contra tuberculosis. De la misma manera, facilita la obtención de estos datos, en ensayos donde se manejan un número elevado de muestras, así como la eficiencia en el tiempo de obtención de datos.

Morcillo (2004) reportó otra técnica similar a Azul Alamar, en la cual se cambia el reactivo por MTT para la evaluación de fármacos antifímicos de segunda línea, obteniendo por medio de análisis estadísticos resultados favorables en comparación al método de proporciones.

De esta manera en este trabajo se realizó una comparación entre ambas técnicas para evaluar los extractos crudos y la fracciones de exclusión molecular de *Anthopleura elegantissima* (anémona), y *Auronoctonus phaiodactylus* (alacrán) así como las fracciones de HPLC obtenidas de *Conus californicus* (conus). En donde para el extracto crudo de anémona se obtuvo una MIC de 40 mg/ml, y en la fracción I de anémona, por exclusión molecular (SEC) de 400 µg/ml. Sin embargo, a diferencia de Azul Alamar, por medio de MTT, la FII de conus dió un resultado positivo, a una MIC de 400 µg/ml. Asimismo Azul Alamar (AA) dio un resultado más sensible en cuanto a las concentraciones de el extracto crudo de conus, ya que por MTT, la MIC fue de 20 mg/ml, y en AA, fue de 7.5 mg/ml. Asimismo, se encontró una actividad parcial, de la FII de anémona por SEC, a una MIC de 47.59 mg/ml.

A partir del extracto crudo del veneno de alacrán, no se obtuvo actividad en ninguno de los métodos antes mencionados, esto debido probablemente, a las bajas concentraciones obtenidas del veneno, dado la dificultad de la obtención

del mismo, ya que la producción de veneno por organismo fue de un promedio de 1 a 2  $\mu$ l.

Debido a que Azul Alamar mostró mayor sensibilidad en el análisis de los extractos y fracciones, se decidió utilizarlo también para probar la purificaciones por HPLC de las fracciones de exclusión molecular en las que se observó actividad contra *M. tuberculosis* cepa H37 Rv (sensible a antibióticos).

En los siguientes ensayos solo se observó, una actividad antifúngica en la fracción de 15 a 20 minutos, obtenida por HPLC de la Fracción I de anémona por SEC. Sin embargo, por medio de las purificaciones por minuto se perdió la actividad, para descartar un probable efecto de sinergismo de los componentes purificados, o la falta de concentración adecuada para los ensayos.

Debido a esto, se realizaron combinaciones entre varias de las fracciones por minuto, así como de aquellas que no detectaban un compuesto a una  $\lambda=230$  nm, desechando así un compuesto de origen no peptídico. Sin embargo, no se observó actividad aparente para ninguno de los últimos ensayos realizados aun cuando se elevó la concentración de cada fracción. Una probable explicación, es que no se haya probado una combinación adecuada entre varias fracciones, si es que existe un probable sinergismo. También es posible que a pesar de que las concentraciones se aumentaron en los últimos ensayos, estas no fueran suficientes como para actuar en los bioensayos. Esto sin embargo es menos probable ya que en la fracción de 15 a 20 minutos la MIC fue de 1.45  $\mu$ g/ml, mucho menor a las probadas en el segundo ensayo. Asimismo, no debemos descartar algún tipo de inhibición en el empleo de los

componentes utilizados en los métodos colorimétricos, reportado anteriormente por Morcillo *et al.*, (2004).

Aunque nos se han reportado trabajos anteriores de péptidos o toxinas de anémonas, conus y alacranes contra *Mycobacterium tuberculosis*, en el 2003 Xie y colaboradores encontraron un péptido purificado a partir de *Naja atra* que presenta actividad contra cepas clínicas, aunque no fue reportado cuales fueron las MIC de las fracciones obtenidas previamente de las cuales se purificó el péptido, la concentración del péptido puro fue de 8.5 mg/l, dato que no contrasta con la MIC encontrada en la fracción del min. 15-20 obtenida a partir de la fracción I SEC de anémona de 1.45 mg/l.

No se realizaron ensayos con veneno de alacrán fraccionado debido a lo complejo de obtener una cantidad de veneno adecuada y una alta concentración para hacer una búsqueda de algún compuesto activo por medio de los bioensayos. Esto refiriéndose a la cantidad necesaria para las purificaciones que se deben realizar y las concentraciones necesarias para encontrar un CMI. Para este ensayo se utilizó la concentración máxima de extracto crudo a partir de veneno de 180 alacranes sin encontrar ningún registro de inhibición.

## VIII. CONCLUSIONES.

- La caracterización de las cepas por PCR, indicó que las 98 cepas, pertenecen a la especie *Mycobacterium tuberculosis*.
- Los resultados negativos obtenidos por parte de la secuencia MTB, sugiere que existen mutaciones generadas en las cepas, en parte del gen *murA*, la región promotora del operon *rrnA* y el extremo 5' del gen 16S RNAr.
- La caracterización por medio de la técnica de RFLP, con la secuencia de inserción IS6110, muestra una gran diversidad en las cepas evaluadas, ya que sólo fue posible agrupar al 32% en 10 grupos, mientras que el 67.7% presentó patrones de bandeo aislados
- Fue posible la obtención de actividad antifúngica de los extractos crudos de anémona y conus. Purificaciones posteriores por exclusión molecular y HPLC, respectivamente mostraron actividad, en la fracción I de anémona por SEC y en la fracción II de Conus (30-60).
- En la segunda purificación por HPLC de ambas, solo se obtuvo actividad en la fracción por HPLC del minuto 15 al 20 de la Fracción I de anémona y no fue posible detectar ninguna actividad antifúngica en las fracciones de conus.
- Al probarse las fracciones por minuto de HPLC de la fracción I de anémona, la actividad se perdió inclusive cuando se hicieron combinaciones entre fracciones por minuto para desechar un posible sinergismo.



## IX. BIBLIOGRAFIA

Ajouz, B., C. Berrier, A. Garrigues, M. Besnard, y A. Ghazi. 1998. Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 273: 26670–26674 p.

Ajouz, B., C. Berrier, M. Besnard, B. Martinac, y A. Ghazi. 2000. Contributions of the different extramembranous domains of the mechanosensitive ion channel MscL to its response to membrane tension. *J. Biol. Chem.* 275:1015–1022 p.

Alberts B., A. Johson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. 2001. Molecular Biology of The Cell. 4ta edición. Garland Science. New York U.S.A.1463 pp.

Anderluh G, A. Barlic, Z. Podlesek, Z. Macek, P. Pungercar, F. Gubensek, M. Zecchini, M. Serra, y M. Menestrina. 1999. Equinatoxins, Pore-Forming Proteins from the Sea Anemone *Actinia ekina* belong to a multigene family. *Toxicon* 37:1391-1401 p.

Baldeviano C.V., N.T. Quispe, C.A. Bonilla, D. Gastiaburu, J.C. Pro y F.L. Llanos. 2003. Perfiles Genéticos (RFLP-IS6110) y Resistencia a Drogas 'en Aislamientos de M. tuberculosis de Pacientes Internados en una hospital referencial del Callao, Peru. *Rev Peru Med. Exp. Salud Publica.* 20(2):72-77p.

Banerjee A., E. Dubnau, y A. Quernard. 1994. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and etionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 263:227-230 p.

Béress L., T. Bruhn, J. Sanchez, E. Wachter y H. Schweitz. 2000. Animal Toxins. 1er edition. Herve Rochat ed. Berlin, Alemania. 175 pp.

Bermudez L.E. y J. Goodman. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *San Francisco. U.S.A.* 64: 1400-1406 p.

Bifani P., S. Moghazeh, B. Shopsis, J. Driscoll, A. Ravikovitch y B.N. Kreiswirth. 2000. Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra Variants: Distinguishing the Mycobacterial Laboratory Strain. *Journal of Clinical Microbiology.* 38:9:3200-3204 p.

Blount, P., M. J. Schroeder, y C. Kung. 1997. Mutations in a bacterial mechanosensitive channel change the cellular response to osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 272:32150 –32157. *Chem.* 274:1381–1387 p.

Caminero L.J.A. 2001. Origen, presente y futuro de las resistencias en tuberculosis. *Archivos de bronconeumonia.* 37:35-42 p.

- Castañeda P.O. 2000. Toxinas Animales: Acciones facilitadoras de la Transmisión Colinérgica. Revista Biológica. La Habana, Cuba. 14(1):1-10 p.
- Castro G. J., V.M.A. Hernández, G.H. Barrios G, V.J. Vargas, S. Said-Fernández, O. Welsh, L. Vera-Cabrera. 2002. Evaluación De Los Genes De Fosfolipasa C De *Mycobacterium tuberculosis* Como Factor De Virulencia. RESPYN edición especial No.5 Monterrey N.L. México. 45:98-112 p.
- Cobos L., J. Montes, S. Rivera, A. Licea, J. Gonzalez, y I. Estrada. 2003. A novel multiplex-PCR for the rapid identification of *Mycobacterium bovis* in clinical isolates of both veterinary and human origin. *Epidemiology and Infection*. 130:485-490 p.
- Cole S.T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barr, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels y B.G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. Hinxton. U.K. 393(6685):537-44 p.
- Collins L.A., y S.C. Franzblau. 1997. Microplate Alamar Blue Assay versus Bactec 460 System for High-Throughput Screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1004-1009 p.
- Cortinas M.N., M. Fernandez, M.I. Valeta, N.R. Uriarte, y M.C. Mogdasy. 2002. Caracterización genotípica de 80 cepas del género *Mycobacterium* en Uruguay. *Rev Med. Uruguay*. 18:230-238 p.
- Chang, G., R. H. Spencer, A. T. Lee, M. T. Barclay, y D. C. Rees. 1998. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science*. 282:2220 –2226 p.
- Ferber M., A. Sporning, G. Jeserich, R. De la Cruz, M.Watking, B.M.Olivera y H. Terlau. 2002. A novel Conus peptide ligand for K<sup>+</sup> Channels. *The Journal of Biological Chemistry*. 278:4:2177-2183 p.
- Finney A.B., M.K. Meng-Chiang, K. Yoshimura y C. Kung. 2002. Gating the Bacterial Mechanosensitive channel MscL in vivo. *PNAS*. 99(8) 5643-5648 p.
- Franzblau S.G., R.S. Witzing, J.C. McLaughlin, P. Torres, G. Madico, A. Hernandez, M. Degnan, M.B. Cook, V.K. Quenzer, R.M. Ferguson y R.H. Guilman. 1998. Rapid Low-Technology MIC Determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay *Journal of Clinical Microbiology*. 362-366 p.

García-García M.L. 2003. Epidemiología Molecular en México. Gaceta Médica México. 139:472-476 p.

García G. M., G.J.L. Valdespino, M.M. Palacios, E. Mayar, S.C. García y A.J. Sepúlveda. 1995. Tuberculosis y Sida en México. Salud Publica de México. 37: 539-548 p.

Gullingsrud J., D. Kosztin y K. Schulten. 2001. Structural Determination of MscL Gating Studied by Molecular Dynamics Simulation. Biophysical Journal. 80:2074-2081 p.

Gutierrez M.C., J.V. Gala, J. Blázquez, E. Bouvet y V. Vicente. 1999. Molecular Markers Demonstrate that the First Described Multidrug-Resistant *Mycobacterium bovis* Outbreak was due to *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology. 37:4:971-975 p.

Heinz C, H. Engelhardt, y M. Niederweis. 2003. The core of the tetrameric mycobacterial porin MspA is an extremely stable beta-sheet domain. J Biol Chem. 278(10):8678-85 p.

Hermans P.W.M., D. van Soolingen, y D.A. van Embden. 1992. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae*. J. Bact. 174:4157-4165 p.

Herrera E.A. y M. Segovia. 1996. Evaluation of *mtp40* Genomic Fragment Amplification for Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens. Journal of Clinical Microbiology. 34:5:1108-1113 p.

Hillyard D.R., B.M. Olivera, S. Woodward, G.P. Corpuz, W.R. Gray, C.A. Ramilo y L.J. Cruz. 1988. A Molluscivorous *Conus* Toxin: Conserved Frameworks in Conotoxins. Biochemistry. 28:358-361 p.

Kartmann B., S. Stengler, y M. Niederweis. 1999. Porins in the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology, 181:20: 6543-6546 p.

Kelso G. y K. Blumenthal. 1998. Identification and Characterization of novel Sodium Channel Toxins from the Sea Anemone *Anthopleura xanogramma*. Toxicon. 36(1):41-51p.

Landeros Bertha. 2000. Desarrollo de un ensayo de diagnostico para la detección de M. tuberculosis utilizando Nested-PCR. (Tesis de maestria) UABC, Tijuana Baja California Mexico.

Lambert P.A. 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol.* 92 Suppl:46S-54S p.

Laniado L.R., V.N. Cabrales, E.G. López, Z.J.L. Lepe, M.S. Quiñónez, V.C. Rico. 1998. Prevalencia de Infección Tuberculosa en Escolares de la Ciudad de Tijuana, México. *Salud Publica de México.* 40:47-52 p.

Le Dain, A. C., N. Saint, A. Kloda, A. Ghazi, y B. Martinac. 1998. Mechanosensitive ion channels of the archaeon *Haloflex volcanii*. *J. Biol. Chem.* 273:12116 –12119 p.

Loret E.P. R.S. Menendez, P. Mansuelle, F. Sampieri y H. Rochat. 1994. positively Charged Amino Acid Residues Located Similarly in Sea Anemone and Scorpion Toxins. *The Journal of Biological Chemistry.* U.S.A. 269(24):16785-16788 p.

Madigan M.T., M. Martinko y J. Parker. 1999. Brock, *Biología de los Microorganismos.* Octava edición. Prentice may. Madrid España. pp 966.

Magdalena J., A. Vachee, P. Supply y C. Locht. 1998. Identification of a New DNA Region Specific for Members of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Clinical Microbiology.* Francia. 36:4:937-943 p.

Maingret F., M. Fosset, F. Lesage, M. Mazdunski, y E. Honore. 1999. TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K1 channel. *J. Biol. Chem.* 274:1381–1387 p.

Marchetti G., A. Gori, L. Catozzi, L. Vago, M. Nebuloni, M.C. Rossi, A. Degli, A. Bandera y L. Franzett. 1998. Evaluation of PCR in Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues: Comparison of Four Amplification Assays. *Journal of Clinical Microbiology.* 36:6:1512-1517 p.

Mercado F.J., S. Gloyd, J. Durnin, J.L. López y S.J. Barrera. 1992. Riesgos de infección por Tuberculosis en las Jurisdicciones Sanitarias de Jalisco, México. *Salud Publica de México.* 34:499-505 p.

Montenegro S., R.H. Gilman, P. Sheen, R. Cama, L. Caviedes, T. Hopper, R. Chambers y R.A. Oberhelman. 2003. Improved Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Peruvian Children by use of a Heminested IS6110 Polymerase Chain Reaction Assay. *Clinical Infection Diseases.* U.S.A. 36:16-23 p.

Morcillo N, B. Giulio, B. Testani, M. Portino, C. Chirico y A. Dolman A. 2004. A microplate indicator-based method for determining the susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents. *International Journal of Tuberculosis Lung Diseases* 8(2); 253-259 p.

Niederweis M. 2003. Mycobacterial porins – new channel proteins in unique outer membranes. *Molecular Microbiology*. 49:1167-1177 p.

Norton T.R. 1981. Cardiotoxic Polypeptides from *Anthopleura xanthogramica* (Brandt) and *A. elegantissima*. *Fed. Proc.* 40:21-25 p.

Norton T.R., S. Shibata, M. Kashiwagi y J. Bentley. 1976. Isolation and Characterization of Cardiotoxic Polypeptide Anthopleurina-A from the Sea Anemone *Anthopleura xanthogramica*. *J. of Pharm. Sci.* 65(9) 1368-1374 p.

Olivera B.M. 1997. Conus Venom peptides, receptor and ion channel targets and drug design: 50 million year of neuropharmacology. *Mol. Biol. Cell.* 8:2101-2109 p.

Ou, X., P. Blount, R. J. Hoffman, y C. Kung. 1998. One face of a transmembrane helix is crucial in mechanosensitive channel gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:11471–11475 p.

Patel, A. J., E. Honore, F. Maingret, F. Lesage, M. Fink, F. Duprat, y M. Lazdunski. 1998. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K1 channel. *EMBO J.* 17:4283– 4290 p.

Possani, L.D. 1984. Structure of the Scorpion Toxin. *Handbook of Natural Toxins* ( To.A.T.Ed), Marcel Dekker, Inc; New York. 2:513-550 p.

Prior Mier y Teran A.G. 2002. Aislamiento y Caracterización de Toxinas Peptídicas de la Anémone *Anthopleura xanthogramica*. (Tesis de maestría). CICESE. Ensenada, Baja California Mexico.

Raynaud C., K.G. Papavinasasundaram, R.A. Speight, B. Springer, P. Sander, C.E. Böttger, M.J. Colston y P. Draper. 2002. The functions of OmpATb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*. 46: 1365-2958 p.

Rigby A.C., E.L. Meunier, D.E. Klaume, E. Czerwiec, B. Hambe, I. Dahlqvist, P. Fossier, G. Baux, P. Roepstorff, J.D. Baleja, B.C. Furie, B. Furie y J. Stenflo. 1999. A conotoxin from *Conus textile*. With unusual posttranslational modifications reduces presynaptic  $Ca^{2+}$  influx. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:5758-5763 p.

Rogers J.C., Y. Qu, T.N. Tanada, T. Scheuer y W.A. Catterall. 1996. Molecular Determinants of the High Affinity Binding of  $\alpha$ -Scorpion Toxin y Sea Anemone Toxin in the S3-S4 Extracellular Loop in Domain IV of the  $Na^+$  Channel  $\alpha$  Subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 271:27:15950-15962 p.

Samejima Y., M. Yanagisawa, A. Tomomatsun, E. Iwasaki, J. Ando y D. Mebs. 2000. Amino acid sequence studies on cytolytic toxins from Sea Anemone

*Heteractis magnifica*, *Entacmaea quadricolor* and *Stichodactyla mertencii*. (Anthozoa). *Toxicon*. 38:259-264 p.

Schweitz H, J.P. Vincent, J. Barhanin, C. Frelin, G. Linden, M. Hugues y M. Lazdunski. 1981. Purification and pharmacological properties of eight sea anemone toxins from *Anemonia sulcata*, *Anthopleura xanthogrammica*, *Stoichactis giganteus*, and *Actinodendron plumosum*. *Biochemistry*. Sep 1;20(18):5245-52 p.

Sifuentes O.J. 1998. Epidemiología de la resistencia antimicrobiana en *Mycobacterium tuberculosis* en México. *Gaceta Médica México*. 139:477-480 p.

Soolingen D.V., P. Hass, J. Pijnenburg, K. Kremer, P. Hermans y J.V. Embden. 1995. Manual for Fingerprinting of *M. tuberculosis* Strains. National Institute of public health and environmental protection. Netherlands. pp. 55

Sukharev, S. I., P. Blount, B. Martinac, F. R. Blattner, y C. Kung. 1994. A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature*. 368:265-268 p.

Takayama K. y J.O. Kilburn. 1989. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 33:1495-1499 p.

Trials, J., V. Jarlier y R. Benz. 1992. Porins in the Cell Wall of Mycobacteria, *Science* 258: 1479-1481p.

Valdez N.A. 1998. Analisis Morfológico de Alacrán Centruroides exilicauda y Caracterización de Algunas de sus Toxinas. (Tesis de licenciatura).UABC, Tijuana Baja California Mexico.

Vera-Cabrera L., S.T. Howard, A. Laszlo y W.M. Jonhson. 1997. Analysis of Genetic Polymorphism in the Phospholipase Region of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 35:5:1190-1195 p.

Verdonck F., J. Tytgat, E. Van Kerkhove y G. Müller. 2000. Amphipatic peptides with antibacterial and neurotoxic actions in the venom of scorpions. *Fthound*. 58:12-15 p.

Viana-Nero C., C. Gutierrez, C. Sola, I. Filliol, F. Boulahbal, V. Vincent y N. Rastogi. 2001. Genetic Diversity of *Mycobacterium africanum* Clinical Isolates Based on IS6110-Restriction Fragment Polymorphism Analysis, spoligotyping, and Variable Number of Tandem DNA Repeats. *Journal of clinical Microbiology*. U.S.A. 57-65 p.

Villalba-Caloca J. 2003. Tuberculosis: un problema de actualidad. *Gaceta Médica México*. 139: 471-472 p.

Weil A., B.B. Plikaytis, W.R. Butler, C.L. Woodley y T.M. Shinnick. 1996. The *mtp40* Gene Is Not Present in All Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology. U.S.A. 34:9:2309-2311 p.

Xie J.P., J. Yue, Y.L. Xiong, W.Y. Wang, S.Q. Yu y H.H. Wang. 2003. In vitro activities of small peptides from snake venom against clinical isolates of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents. 22:172-174 p.

Zhang Y., B. Heym y B. Allen. 1992. The catalase-peroxidase and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature. 358:591-593 p.

Zumbala P., S.B. Mwaba, B. Squire and J.M. Grange. 1999. The tuberculosis Pandemic. Journal of infection. 38: 74-79 p.

<http://www.iladiba.com>

<http://www.medlineplus.com>