

HIBRIDACIÓN SUBTRACTIVA PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PATÓGENO-HOSPEDERO EN LA INFECCIÓN *IN VIVO* POR *M. tuberculosis*.

Fernanda Cornejo-Granados¹, Brenda Marquina², Dulce Mata², Jorge Barrios², Filiberto Sánchez¹, Rogelio Hernández-Pando², Adrián Ochoa-Leyva¹

¹ Instituto de Biotecnología, UNAM. Depto. Microbiología Molecular, Cuernavaca, 62210

² Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Depto Patología Experimental, Cd de México, 14080. Responsable Dr. Adrián Ochoa Leyva aochoa@ibt.unam.mx

Palabras clave: transcriptoma, tuberculosis, infección in vivo.

Introducción. El uso de la secuenciación masiva para estudiar la expresión de genes durante una infección promete ayudar a aclarar los mecanismos que ocurren tanto en el patógeno como en el hospedero durante el proceso de una enfermedad (1). Sin embargo, estos estudios en patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* (Mtb) implica varias limitaciones técnicas que hasta ahora sólo han permitido el estudio del patógeno en cultivos bacterianos (2) o modelos *in vitro* (3), lo que deja de lado la gran cantidad de factores que ocurren en una infección *in vivo*. Dos de las limitantes más importantes son 1) la obtención de ARN del patógeno con buena calidad y en cantidades suficientes para la construcción de las librerías y 2) la gran proporción de secuencias ribosomales que obligan a secuenciar a muy altas profundidades para poder observar secuencias de otros genes. En este sentido, el uso de sondas capaces de capturar y separar el material genético de manera selectiva, ha probado ser útil, por ejemplo, en casos con ADN antiguo (4).

En este contexto y dada la ausencia de trabajos detallados en modelos *in vivo*, el objetivo de este trabajo es usar sondas de captura para enriquecer el ARN de Mtb además de desarrollar la estrategia bioinformática para poder estudiar el comportamiento de la bacteria durante la infección en los pulmones de un ratón.

Metodología. Para el enriquecer el ARN de Mtb se desarrolló un protocolo en dos etapas. La primera basada en la centrifugación diferencial del homogenizado de pulmón de ratón infectado con la cepa H37Rv de Mtb, lo que permitió la formación de un pellet enriquecido en bacteria del que posteriormente se extrajo el ARN total (5). En la segunda etapa se construyeron sondas de captura para separar la mayor parte de secuencias ribosomales y así enriquecer los transcritos de otros genes. Finalmente, se estableció el "pipeline" bioinformático para el análisis de los genes.

Resultados. Al realizar una tinción Zihel-Neelsen del homogenizado de un pulmón antes y después de usar la centrifugación diferencial (**Fig. 1**) observamos un enriquecimiento de bacterias (bacilos rosas) en el pellet.

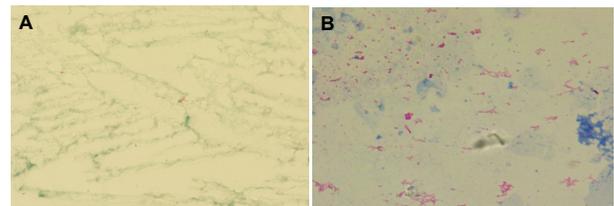


Fig. 1. Tinción Zihel-Neelsen del homogenizado de un pulmón infectado con Mtb A) antes y B) después de la centrifugación diferencial.

Después de extraer el ARN del pellet y usar las sondas de captura observamos que el número de genes diferentes a ribosomales, aumenta (**Tabla 1**).

Tabla 1. Número promedio de genes de *M. tuberculosis* observados.

	No. genes con ≥ 2 reads
SIN SONDAS	19
CON SONDAS	333

Finalmente, al analizar el 10% de los genes más expresados observamos varios genes del sistema de secreción ESX-1, genes de la familia PE-PGRS y el gen de isocitrato liasa, todos ellos, reportados previamente en un contexto general para el funcionamiento de la bacteria, sin embargo, ahora observamos que son de los genes más expresados durante la fase aguda de la infección en un modelo murino. Además, en los genes más expresados hay varios genes no reportados previamente y genes no identificados.

Conclusiones. El uso de la centrifugación diferencial y de sondas de captura permite conocer los genes expresados durante una infección *in vivo* de *M. tuberculosis*, entre ellos, genes aún no identificados que podrían ser nuevos blancos terapéuticos o marcadores de diagnóstico.

Agradecimientos. CB-CONACYT 223279.

Bibliografía.

1. Waddell S, et al., 2007. *Curr Opin Microbiol* 10:297-302.
2. Duncan C, et al., 2017 *PLoS ONE* 12(6): e0179996.
3. Du P, Sohaskey C, Shi L. 2016. *Front Microbiol* 7: 1346.
4. Carpenter M, et al., 2013 *Am J Hum Genet* 93(5):852-864.
5. Depner H, et al., 2014 *Nature* 9(12): 2796-808.

