



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN
DE BACTERIA INTRACELULAR Y DISEÑO DE UNA
METODOLOGÍA FLUOROMÉTRICA APLICADA AL
ESTUDIO DE *Mycobacterium tuberculosis H37Rv***

Deisy Carolina Rodríguez Lancheros

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, departamento de Química
Bogotá, Colombia

2016

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE BACTERIA INTRACELULAR Y DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA FLUOROMÉTRICA APLICADA AL ESTUDIO DE *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*

Deisy Carolina Rodríguez Lancheros

Trabajo final de maestría presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Química

Directora:

Dr.Sc. Luz Mary Salazar Pulido

Codirectora:

Ph.D. Marisol Ocampo Cifuentes

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, departamento de Química
Bogotá, Colombia
2016

Dedico este trabajo a Dios que hizo posible éste sueño, a mi esposito por su apoyo y amor incondicional que fueron indispensables para la terminación de este trabajo, a mi padres por estar pendientes de mí todo el tiempo, a mis hermanitos Lau, yu y Bryn por su amistad y ánimo.

“...Porque las cosas invisibles de Dios, su eterno poder y deidad, se hacen claramente visibles desde la creación del mundo, siendo entendidas por medio de las cosas hechas...”

Romanos 1:20 (RVR 1960)

Agradecimientos

Todos mis agradecimientos son en primer lugar para Dios que hace posibles todas las cosas, por su amor, bondad, gracia y misericordia, y especialmente por abrirme el camino al conocimiento y la ciencia, y darme la posibilidad de trabajar y estudiar en los lugares de mis sueños. A mi esposo por ayudarme a permanecer despierta mientras escribía y por apoyarme todo el tiempo con todo lo que pudo, a mi familia por estar pendiente de mí en éste y todos los momentos de mi vida.

Agradezco sinceramente a la Dra. Marisol Ocampo quien además de ser mi jefe y directora de tesis, ha sido quien me ha formado en el quehacer científico, gracias por apoyar y creer en mis ideas, sé que saldrá algo muy bueno de todo el trabajo. Agradezco enorme y profundamente al Jefe, profesor Manuel Elkin Patarroyo y a la FIDIC por financiar el presente proyecto. También agradezco a mis compañeros de trabajo de la FIDIC, Alejandra Mantilla, Diana Diaz, Christian Sanchez y Mary Carabalí por estar pendientes de mí en las largas jornadas de trabajo en el cuarto de bioseguridad-micobacterias.

Agradezco enormemente a la profe Luz Mary Salazar, mi directora en la Universidad Nacional de Colombia, por estar pendiente y velar porque fuera posible éste trabajo, por recordarme las prioridades en la vida; por darme importancia como su estudiante y por la oportunidad de trabajar en conjunto con la FIDIC que sé, ha sido constructivo para ambas partes. Muchas gracias a la profe Eliana Castillo por su valiosa asesoría.

Agradezco también al Dr. Alejandro Oyono Ondo, profesor de la Universidad del Rosario por facilitarme y ayudarme con el uso del equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader - BioTek que fue importante en la comprensión de algunos aspectos en este trabajo, y a Magda Melisa Florez, estudiante de doctorado de la Universidad Nacional por ayudarme con la disponibilidad de tiempo y el uso del fluorómetro Tecan Genios para las lecturas de muestras con Rodamina B.

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa que cobra la vida de más de un millón de personas cada año alrededor del mundo; los estudios de infección celular con *M. tuberculosis* son indispensables en el desarrollo de medicamentos y vacunas que permitan erradicar dicha enfermedad; a veces estos se ven limitados por el lento crecimiento del patógeno en ensayos cuantitativos. El presente trabajo responde a esa limitación y presenta una revisión detallada de los métodos de cuantificación de bacteria intracelular, la importancia del uso de fluoróforos en estudios de infección y plantea las condiciones experimentales que debe tener una metodología de cuantificación fluorimétrica aplicada al estudio de *M. tuberculosis*, en el acercamiento experimental se hicieron ensayos de infección cuantitativos con micobacterias marcadas con Naranja de Acridina o Rodamina B encontrando éste último como promisorio para ser usado en una metodología diferencial de cuantificación fluorimétrica de micobacterias intracelulares.

Palabras clave: Cuantificación de bacterias, microscopía, fluoróforo, fluorimetría, ensayos de invasión, patógenos intracelulares, micobacterias.

Abstract

Tuberculosis is an infectious disease that causes more than one million human deaths around the world per year. Studies of cellular infection with *M. tuberculosis* are indispensable in the development of drugs and vaccines that help us to eradicate this disease; Infection assays are sometimes limited by the slow growth of mycobacteria in quantitative experiments. The present work responds to those limitation and presents a descriptive review of methods of intracellular bacteria quantification, importance of the use of fluorophores in infection studies and raises the experimental conditions that must have on a methodology of fluorimetric quantification applied to the study of *M. tuberculosis*. In an experimental approach, quantitative infection assays were performed with Mycobacteria binding to Acridine Orange or Rhodamine B, the last one was found like a promising fluorophore to be used in a differential methodology of fluorimetric quantification of intracellular mycobacteria.

Keywords: Quantification of bacterias, microscopy, fluorophore, fluorimetry, invasion assays, intracellular pathogens, mycobacteria.

Contenido

Resumen.....	V
Abstract.....	VI
Contenido	VII
Introducción	1
1. Estado del arte: Métodos de cuantificación de bacteria intracelular, enfoque al estudio fluorimétrico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.1 Metodología para la elaboración del estado de arte.....	4
1.2 Estado del arte: Métodos de cuantificación de bacteria intracelular, enfoque al estudio fluorimétrico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.2.1 Método estándar de cuantificación de bacterias.....	8
1.2.2 Fagocitosis y cuantificación de bacteria intracelular	10
1.2.3 Infección de células no fagocíticas.....	13
1.2.4 Cuantificación de bacteria intracelular por UFC	13
1.2.5 Preparación de <i>Mycobacterium</i> y selección de MOIs.....	15
1.2.6 Métodos de cuantificación de bacteria intracelular que incluyen marcación fluorescente.....	16
1.2.7 Tinciones para detección de bacterias ácido alcohol resistentes.....	16
1.2.8 Fluorescencia y mecanismos de desactivación de fluoróforos	23
1.2.9 Fluorimetría y el fluorómetro multicanal.....	27
1.3 Conclusiones	29
2. Diseño del método fluorimétrico: Ensayos preliminares con microesferas fluorescentes YG	31
2.1 Materiales y métodos.....	31
2.1.1 Evaluación del background del ensayo	32
2.1.2 Determinación de los límites de detección y de cuantificación de microesferas fluorescentes YG	33
2.1.3 Cuantificación de microesferas fagocitadas	34
2.2 Resultados y análisis	34
2.2.1 Background del ensayo.....	34
2.2.2 Límite de detección y cuantificación de microesferas.....	36
2.2.3 Cuantificación de microesferas fagocitadas caja de 96 pozos.....	38
2.2.4 Cuantificación de microesferas fagocitadas en caja de 24 pozos.....	39
2.2.5 Microesferas en cajas de 96 pozos con $2,5 \times 10^5$ células.....	44
2.3 Conclusión.....	45
3. Marcación fluorescente de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	46
3.1 Materiales y métodos.....	46

3.1.1	Cultivo de <i>M. smegmatis</i>	46
3.1.2	Fluoromarcaje de <i>M. smegmatis</i>	46
3.2	Resultados y análisis	50
3.2.1	Fluoromarcaje con fluoresceína de sodio.....	50
3.2.2	Fluoromarcaje con Naranja de Acridina	52
3.2.3	Fluoromarcaje con Rodamina B.....	56
3.3	Conclusiones	60
4.	Fluorimetría de los ensayos de inhibición de la invasión con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	62
4.1	Metodología	62
4.1.1	Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	62
4.1.2	Ensayo de invasión con <i>M. tuberculosis</i>	62
4.2	Resultados	63
4.2.1	Ensayos de inhibición de la invasión con <i>M. tuberculosis</i> marcada con NA analizados por UFC y fluorimetría.	63
4.2.2	Citometría de flujo de los ensayos de inhibición con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv marcada con NA y Rodamina B.	68
4.2.3	Ensayos de fagocitosis de <i>M. smegmatis</i> fluoromarcada con NA y Rodamina B analizados por microscopia de fluorescencia.	70
4.2.4	Citometría de flujo de los ensayos de inhibición con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv marcada con Rodamina B.....	73
4.3	Conclusiones	74
5.	Conclusiones generales y recomendaciones	76
	Anexo A: Resultados del background y ensayo de fagocitosis en cajas de 24 pozos	78
	Bibliografía	79

Lista de figuras

Figura 1-1 Número de documentos publicados por año según el servidor SCOPUS relacionados con temas de interés en cuantificación de bacteria intracelular y el uso de fluoróforos.	7
Figura 1-2 Diagrama de Jablonski de la excitación de un fluoróforo. Modificado de [70]	24
Figura 1-3 Esquema general de un fluorómetro (tomado de [88])	27
Figura 1-4 Grafica contenida en el inserto del producto que muestra una curva de calibración para determinación de ADN con el DNA Quantitation Kit- Fluorescence Assay (SIGMA-ALDRICH)	29
Figura 2-1 Determinación del efecto del pozo vecino de la fluorometría en cajas transparentes de 96 pozos	33
Figura 2-2 Determinación del límite de detección y de cuantificación de microesferas fluorescentes.....	37
Figura 2-3 Curva de concentraciones de microesferas fluorescentes sobre células U937 en PBS 1X en caja de 96 pozos	38
Figura 2-4 Curva de concentraciones de microesferas fluorescentes sobre células U937 en PBS 1X en caja de 24 pozos.	40
Figura 2-5 Evaluación de los límites de detección y cuantificación para $2,5 \times 10^5$ células re-suspendidas en cajas de 96 pozos	44
Figura 3-1 Poblaciones para análisis en citómetro de <i>M.smegmatis</i> marcada con diferentes fluoróforos.....	50
Figura 3-2 Seguimiento por citometría de flujo del marcaje de <i>M. smegmatis</i> con fluoresceína de sodio.	51
Figura 3-3 Seguimiento por citometría de flujo del marcaje de <i>M. smegmatis</i> con Naranja de acridina.....	53
Figura 3-4 Seguimiento por citometría de flujo de la marcación con NA $6,0 \times 10^{-3}\%$ en diferentes tiempos de incubación	55

Figura 3-5 Determinación de los límites de detección y cuantificación de micobacterias fluoromarcadas con NA.....	56
Figura 3-6 Tinciones de extendidos de <i>M. smegmatis</i> con rodamina B en diferentes soluciones. Visto en microscopio de fluorescencia Olympus bx51.	57
Figura 3-7 Seguimiento por citometría de flujo del marcaje de <i>M. smegmatis</i> con Rodamina B.	58
Figura 3-8 Evaluación de la viabilidad y seguimiento fluorométrico de la marcación fluorescente de <i>M. smegmatis</i> con Rodamina B en glicerol-PBS 1X.....	59
Figura 3-9 Seguimiento en citómetro de flujo de marcación fluorescente de <i>M. smegmatis</i> con Rodamina B a 0,56mg/mL incubación 60min/37°C.....	60
Figura 4-1 Ensayo de infección celular con <i>M. tuberculosis</i> marcada con NA- correlación entre resultados obtenidos por métodos de cuantificación de URF y UFC	65
Figura 4-2 Ensayo de invasión e inhibición de la invasión analizado por método de conteo de colonias y método fluorimétrico.	66
Figura 4-3 Tinción Ziehl Neelsen normal (AB) y diferencial (CD) de controles de invasión e inhibición de la invasión con <i>M. tuberculosis</i>	68
Figura 4-4 Seguimiento de ensayos de invasión de A549	69
Figura 4-5 Análisis por microscopia de fluorescencia de la fagocitosis por células U937 de <i>M. smegmatis</i> marcada con NA o Rodamina	71
Figura 4-6 Análisis de imágenes de microscopia de fluorescencia: Fagocitosis por células U937 de <i>M. smegmatis</i> marcada con Rodamina B	72
Figura 4-7 Citometría de flujo de ensayo de invasión e inhibición con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv fluoromarcada con Rodamina B.	74

Lista de tablas

Tabla 1-1: Número de documentos obtenidos por diferentes buscadores relacionados a la cuantificación de bacterias y el uso de fluoróforos	6
Tabla 1-2 Métodos de cuantificación de bacteria intra y extra celular en ensayos de infección que incluyen fluoróforos.....	20
Tabla 2-1 Resultados de la evaluación de PBS 1X cómo blanco para ensayos con microesferas fluorescentes, Fluoroskan Ascent™ $L_{em}538nm / L_{ex}485nm$	35
Tabla 2-2 Resultados de la evaluación de la interferencia del pozo vecino, Fluoroskan Ascent™ $L_{em}538nm / L_{ex}485nm$	35
Tabla 2-3 Resultados de la evaluación de 5×10^4 células en PBS 1X cómo blanco para ensayos con microesferas fluorescentes, Fluoroskan Ascent™ $L_{em}538nm / L_{ex}485nm$..	36
Tabla 2-4 Cuantificación de microesferas fagocitadas – 96 pozos	39
Tabla 2-5 Determinación de los límites de lectura en cajas de 24 pozos.....	40
Tabla 2-6 Cuantificación de microesferas fagocitadas- 24 pozos.....	41
Tabla 2-7 Ejemplo de lectura en pozo de caja de 24 para un blanco de células PBS 1X	41
Tabla 2-8 Reporte de la mediana por pozo en cajas de 24 pozos y cálculo de los límites de detección y cuantificación.....	42
Tabla 2-9 Reporte del promedio por pozo en cajas de 24 pozos y cálculo de los límites de detección y cuantificación.....	42
Tabla 2-10 Cálculo de microesferas fagocitadas por pozo en cajas de 24 a partir de la mediana de los datos por pozo.....	43
Tabla 2-11 Cálculo de microesferas fagocitadas por pozo en cajas de 24 a partir del promedio de los datos por pozo	43
Tabla 3-1 Evaluación de los sobrenadantes de fluoresceína posteriores a la marcación a diferentes concentraciones del fluoróforo	52

Tabla 3-2 Evaluación de los sobrenadantes de NA posteriores a la marcación a diferentes concentraciones del fluoróforo.....	53
Tabla 3-3 Evaluación de los sobrenadantes de NA posteriores a la marcación con $6,0 \times 10^{-3}$ % en diferentes periodos de tiempo.....	55
Tabla 4-1: Cálculo de UFC de <i>M. tuberculosis</i> que infectaron las líneas celulares A549 y U937 a partir de datos fluorimétricos para controles.	64

Introducción

En el mundo existen diferentes patógenos que suelen clasificarse como extracelulares, intracelulares facultativos y obligatorios intracelulares de los cuales muchos corresponden a bacterias y parásitos [1]. Los patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), principal causante de la tuberculosis, parásitos como *Plasmodium falciparum*, principal causa de malaria, sumados al virus de inmunodeficiencia humana (VIH) causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) son reconocidos por la organización mundial de la salud como causantes de la tercera parte de las muertes en países en desarrollo como el nuestro [2]; razón por la cual son objeto de estudio en muchos laboratorios alrededor del mundo.

El reservorio del bacilo *M. tuberculosis*, patógeno al cual se orienta el presente estudio es principalmente humano y ha causado la muerte de millones de personas alrededor del mundo a lo largo de la historia de la humanidad. El bacilo fue descubierto en el año 1882, y se diseñaron diferentes formas de tinciones para su reconocimiento, incluso ya se podía hablar de un método diagnóstico [3]. Aproximadamente 50 años después, en 1939 se propuso el primer tratamiento antibiótico, y se podría decir que solo hasta 1965 se completó el diseño de lo que se conoce como el tratamiento moderno de la tuberculosis, que combina los antibióticos Rifampicina, Isoniazida y Estreptomina [3], desde ese entonces se logró un control y disminución apreciable de los casos de tuberculosis en el mundo y se consideró una enfermedad controlada hasta 1993 cuando se disparó una nueva alerta mundial, y la organización mundial de la salud declaró la emergencia global por tuberculosis. Éste resurgimiento se debió en gran parte a la co-infección con VIH y a la aparición de cepas resistentes y multirresistentes a tratamiento antibiótico; para el año 2015 se reportaron 10,4 millones de nuevos casos de tuberculosis alrededor del mundo, el 12% corresponde a pacientes VIH positivos, el 3.3% corresponden a casos de cepas multirresistentes a fármacos y 1 millón de casos hacen referencia a infección en niños. En 2014 se tuvo un total de 1,8 millones de muertes causadas por tuberculosis. En Colombia se reporta una tasa de hasta 4 muertes por cada 100.000 habitantes y un incremento del 80% en casos asociados a VIH en relación al año anterior y un total de 11.785 casos de tuberculosis, lo que demuestra que no es un problema ajeno a nuestra sociedad y enfatiza la urgencia en la continuación de estudios que permitan proponer una

vacuna, tratamientos y métodos de diagnóstico eficientes para el control de la tuberculosis [4].

Al día de hoy, *M. tuberculosis* ha sido ampliamente caracterizada y estudiada; el conocimiento de su envoltura es muy importante en la comprensión de las interacciones hospedero - patógeno y los mecanismos de defensa que son activados en el hospedero, así como la descripción de mecanismos de supervivencia de la micobacteria. La envoltura se encuentra conformada principalmente por lípidos y carbohidratos, los cuales le confieren resistencia haciéndola poco permeable a los antibióticos; algunos lípidos de *M. tuberculosis* ya han sido descritos como factores de virulencia, activadores o inhibidores de la respuesta inmunológica y como componentes indispensables para el crecimiento de la micobacteria en el hospedero [5]. Los ácidos micólicos son importantes en los métodos de detección de micobacterias empleados como diagnóstico, ya que éstos reaccionan formando enlaces covalentes con diferentes colorantes como la fuschina, la rodamina y la auramina. A ellos se encuentran asociadas proteínas hidrofóbicas y lipoproteínas, además existen otras tantas que se encuentran ancladas a la membrana y con orientación hacia el exterior de la envoltura [6, 7], de las cuales algunas han sido descritas como importantes en la entrada a la micobacteria y sus péptidos han sido evaluados como promisorios para el desarrollo de una vacuna sintética; en los estudios es de alta relevancia los ensayos de infección celular y la cuantificación de bacteria intracelular [8-11].

Los ensayos de invasión o infección celular han sido importantes en el estudio de muchos otros patógenos intracelulares como *Plasmodium falciparum* [12], meningococo *Neisseria meningitidis* [13], *Leishmania*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Brucella spp* entre otros [14-16], y para ello se han desarrollado diferentes técnicas que facilitan tanto la cuantificación como la diferenciación entre microorganismos intra y extracelulares; se pueden agrupar prácticamente en cuatro metodologías: 1. Cuantificación por unidades formadoras de colonia en agar, 2. Cuantificación en microscopio utilizando anticuerpos marcados con fluoróforos, 3. Cuantificación en microscopio utilizando fluoróforos y 4. Cuantificación por citometría de flujo; de las cuales, la que sirve de soporte y es aceptada alrededor del mundo es la más antigua técnica de conteo de unidades formadoras de colonia (UFC).

La aplicación de las diferentes técnicas existentes de conteo de bacterias intracelulares se dificulta o se hace inaccesible cuando se trata del estudio de *M. tuberculosis*, en gran parte debido a su lento crecimiento, patogenicidad y por ende a las medidas de bioseguridad que ésta requiere; por esta razón, en el presente trabajo se propuso evaluar los métodos de detección y cuantificación de bacteria intracelular existentes y la formulación de una metodología fluorimétrica multicanal que se pueda aplicar en estudio de *Mycobacterium tuberculosis* con la que se pueda superar muchos de los obstáculos presentados en otras metodologías. Es de resaltar que la propuesta de una metodología fluorimétrica de cuantificación intracelular de bacteria podría ser de gran interés en el estudio de otros patógenos intracelulares y se plantea gracias al conocimiento de las aplicaciones que esta metodología tiene en diferentes campos de la bioquímica, cómo cuantificación de DNA y evaluación de la viabilidad celular, además de las ventajas en cuanto tiempo y dinero que podría representar.

El gran reto que se enfrenta es el desarrollo de un método de cuantificación fluorimétrica que permita determinar en poco tiempo y con alta precisión la cantidad real de microorganismos intracelulares, y en la que sea posible diferenciarlos de aquellos que solamente se unen a la superficie del hospedero o que quedan remanentes del proceso de infección. Por esa razón, en el presente trabajo se hace una revisión detallada de los estudios relacionados a marcación fluorescente de bacterias y desactivadores de la fluorescencia teniendo como prioridad aquellos que involucran trabajo con *M. tuberculosis*, también se hace una evaluación de las ventajas y desventajas de las metodologías existentes que permiten la cuantificación de bacterias intracelulares, y que son tenidas en cuenta en la construcción del diseño de una nueva metodología fluorimétrica; además, se hacen algunos avances experimentales importantes que confirman la posibilidad de hacer análisis cuantitativo de un ensayo de infección celular con micobacterias fluoromarcadas, y donde se describe la estandarización de la marcación fluorescente de micobacterias con Naranja de acridina y rodamina B los cuales constituyen una excelente plataforma para la construcción y validación del método diseñado de cuantificación de micobacterias intracelulares por espectrometría de fluorescencia.

1. Estado del arte: Métodos de cuantificación de bacteria intracelular, enfoque al estudio fluorimétrico de *Mycobacterium tuberculosis*

1.1 Metodología para la elaboración del estado de arte

Para estructurar un estado de arte completo que realmente recopile la mayoría de información existente relacionada con la cuantificación de bacterias intracelulares y el uso de fluoróforos, y con el fin de abarcar la mayor cantidad de información existente que permita evaluar ventajas y desventajas para la formulación de una nueva metodología de cuantificación, se realizó una búsqueda inicial en los buscadores Scopus, Google académico, Science research y Microsoft academic search introduciendo los comandos “Fluorophore”, “Intracellular bacteria”, “Intracellular bacteria quantification”, “bacteria quantification”, “Fluorophore Mycobacteria”, “Fluorophore *Mycobacterium tuberculosis*”, “Fluorescence methods”, “Biochemical fluorescent methods”, “fluorometric quantification”, “fluorescence quencher”, la búsqueda se hizo en inglés ya que la mayoría de revistas con factor de impacto importantes hacen sus publicaciones en este idioma; se tuvieron en cuenta las tendencias de investigación en los últimos 50 años para cada uno de los patrones de búsqueda.

También se hizo una tabulación que permitiera determinar los buscadores con más resultados inespecíficos y reducir el número documentos escogiendo aquellos que pertenecen a resultados de búsqueda con menos cantidad de artículos y que además estuviesen realmente relacionados con el tema de interés. En algunos casos fue necesario restringir la búsqueda con opciones avanzadas de cada uno de los servidores utilizados. La selección de información relevante considerada importante para el cumplimiento de los objetivos propuestos en el presente proyecto se obtuvo después de aplicar dos grandes filtros. El primero consistió en la lectura de todos los títulos arrojados

por la búsqueda general y de los resúmenes de aquellos que se veían promisorios desde el título; del primer filtro quedaron aquellos trabajos que involucran explícitamente contenidos relacionados con uso de marcación fluorescente de bacterias, técnicas de cuantificación bacteriana que sean aplicados en estudios *in vitro* o *in vivo* de cualquier tipo de patógeno, aplicaciones de la citometría de flujo, microscopia de fluorescencia, fluorimetría y utilización de fluoróforos en marcación selectiva de bacterias o micobacterias.

El segundo filtro consistió en la lectura detenida de las metodologías de cada uno de los artículos de los cuales se seleccionaron aquellos que en su contenido aportan especificidades de la marcación fluorescente de bacterias, especialmente micobacterias; tienen resultados relevantes para el objeto de estudio a partir de la cuantificación de bacteria intracelular; aportan información acerca del uso de un fluoróforo en específico y su respectivo proceso de desactivación de la fluorescencia.

Para la estandarización de un método de cuantificación fluorométrica de bacteria intracelular se tuvo también en cuenta que las metodologías pudiesen ser reproducibles en el caso de micobacterias y la posibilidad de desarrollarlo en el laboratorio haciendo uso de los materiales y reactivos disponibles.

La organización del documento y la construcción del estado del arte se realizaron siguiendo las reglas sugeridas por Pautasso para la elaboración de un artículo de tipo revisión [17] y con las características de un artículo de revisión tipo descriptivo-analítico.

1.2 Estado del arte: Métodos de cuantificación de bacteria intracelular, enfoque al estudio fluorimétrico de *Mycobacterium tuberculosis*

Muchos estudios de patógenos intracelulares importantes [2] como *M. tuberculosis*, *Plasmodium falciparum* y el virus de VIH han estado enfocados en gran parte al reconocimiento de interacciones hospedero – patógeno [1], que permitan conocer a profundidad los mecanismos por los cuales el patógeno invade la célula y la convierte en su hospedero, y la respuesta inmunológica que se desencadena, buscando elucidar el

porqué de las enfermedades con el fin de producir conocimiento que sea útil en el desarrollo de métodos diagnósticos, vacunas o tratamientos realmente efectivos.

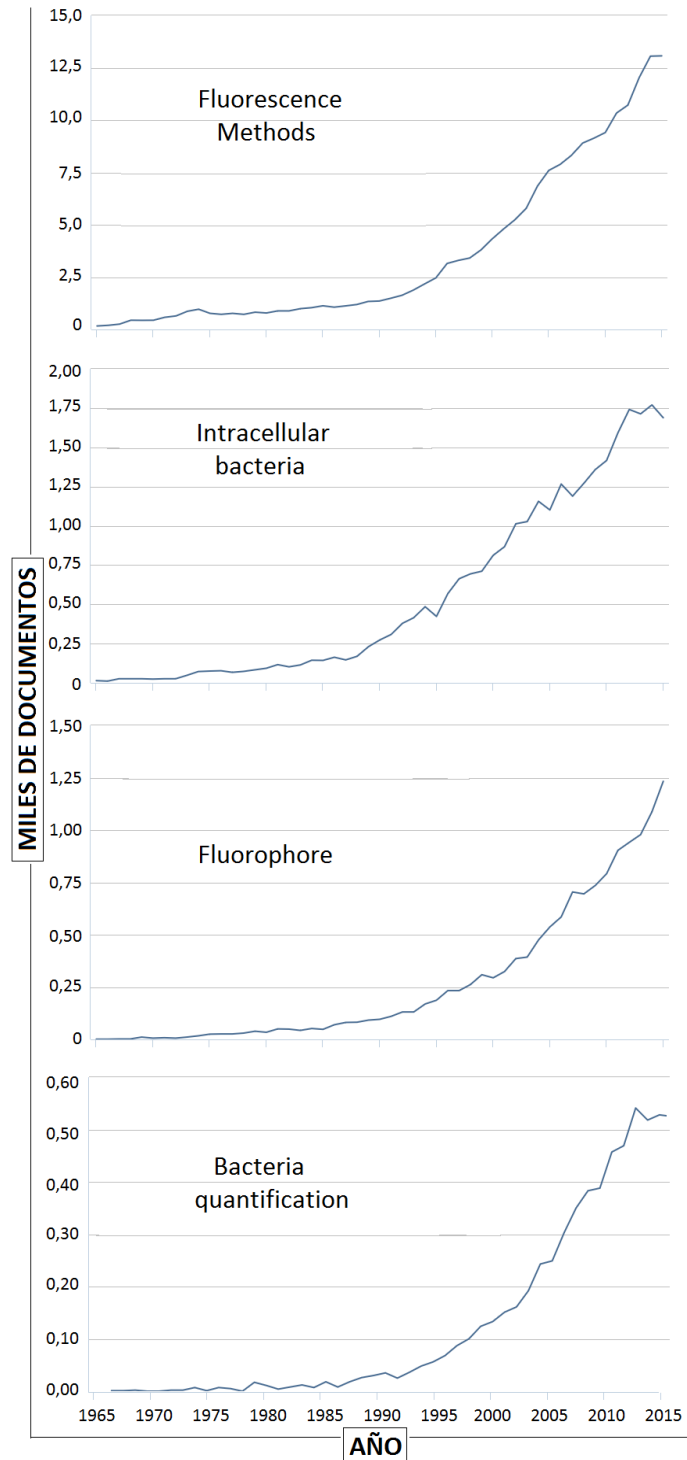
El reconocimiento y cuantificación del patógeno en el espacio intracelular o extracelular ha jugado un papel importante en ensayos in vitro en estudios de infección celular, y ha inspirado a diferentes investigadores al desarrollo de nuevas metodologías que faciliten y permitan una detección más rápida y efectiva. El desarrollo de técnicas de tinción diferencial, la implementación del uso de fluoróforos conjugados con anticuerpos, la producción de medios modificados que aceleren el crecimiento o faciliten la cuantificación en menor tiempo de bacterias, la citometría de flujo y la implementación de la fluorimetría son algunos de los resultados obtenidos. La mayoría de éstos han sido implementados en estudios de *Mycobacterium tuberculosis*, patógeno al cual se orienta ésta revisión.

La tabla 1-1 muestra el número de publicaciones obtenidas en la búsqueda de diferentes temas relevantes en la cuantificación fluorométrica de micobacterias, es evidente el alto número de documentos que incluyen el uso de fluoróforos o métodos que incluyen mediciones de la fluorescencia o desactivación de la misma.

Tabla 1-1 Número de documentos obtenidos por diferentes buscadores relacionados a la cuantificación de bacterias y el uso de fluoróforos

Comando de búsqueda	SCOPUS	Google académico	Science research	Microsoft academic search
Fluorophore	14469	119000	129	8878
Intracellular bacteria	28820	108297	238	948
Intracellular bacteria quantification	249	170000	82	16
bacteria quantification	6626	807000	113	516
Fluorophore Mycobacteria	31	10800	4	3
Fluorophore <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26	12100	54	8
Fluorescence methods	108001	3150000	153	40
Biochemical fluorescent methods	2325	1690000	141	12
fluorometric quantification	426	92600	54	249
fluorescence quencher	4541	140000	64	898

Figura 1-1 Número de documentos publicados por año según el servidor SCOPUS relacionados con temas de interés en cuantificación de bacteria intracelular y el uso de fluoróforos.



La cantidad de hallazgos inespecíficos con el servidor Google académico es mucho mayor y se hace evidente al tener 10 veces o más resultados que los demás buscadores. Es de esperarse, ya que los buscadores como SCOPUS, Microsoft academic research y Science research están restringidos a contenidos que incluyen revistas científicas indexadas; sin embargo, hay hallazgos importantes en la búsqueda google académico que no fueron registrados en otros servidores y fueron tenidos en cuenta en la presente revisión.

El análisis arrojado por el buscador SCOPUS (Figura 1-1) muestra la tendencia en publicación en los últimos 50 años donde se incluye los comandos de búsqueda seleccionados, es evidente el incremento en función del tiempo de las publicaciones que contienen uso de fluoróforos y técnicas de cuantificación que emplean fluorescencia. Se puede decir que la mayoría de los documentos relacionados con fluorescencia han sido publicados en los últimos 25 años.

Por otra parte es de notar que no se encuentra registro de artículos relacionados con cuantificación de bacteria antes del año 1968, época en el cual se desarrolló el citómetro de flujo [18]. como se ve en la figura 1-1 y es evidente el incremento en el número de documentos que involucran estudios de bacterias intracelulares y cuantificación de bacterias en los últimos 20 años anotando la importancia que tienen éstos dos temas en la comunidad científica.

En la revisión se detallan metodologías de cuantificación de bacterias, técnicas desarrolladas para el reconocimiento de células infectadas haciendo énfasis en distinción de bacterias en el espacio intra y extra celular, estudios de fagocitosis, fluoróforos empleados en la marcación de bacterias y micobacterias; mecanismos desactivadores de la fluorescencia y usos de la fluorimetría multicanal en diferentes áreas de la ciencia que pueden ser útiles para investigadores en diferentes campos del conocimiento.

1.2.1 Método estándar de cuantificación de bacterias

Realmente no existe un método estándar de cuantificación de bacterias, sin embargo se puede decir que existen básicamente tres métodos convencionales que han sido usados

para éste fin [19] y se presentan enlistados a continuación con una breve descripción del fundamento.

Método turbidimétrico: Consiste en la comparación de la turbidez de una suspensión bacteriana con una curva turbidimétrica de sulfato de bario (BaSO_4), formado a partir de la mezcla de diferentes proporciones de soluciones de cloruro de bario anhídrido (BaCl_2) al 1% y ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1% [20]. Cada valor turbidimétrico corresponde a una cantidad de microorganismos en suspensión según el estándar de *McFarland*. El método tiene dos desventajas principales: 1. Se cuenta el total de bacterias sin importar viabilidad y 2. Las propiedades ópticas de cada especie son particulares y frecuentemente no resulta ser muy acertado el uso de la escala.

Método de conteo de colonias o placas: Éste método está orientado al conteo de células viables, consiste básicamente en la dilución sucesiva de la muestra original seguida de la siembra en agar de cada una de las diluciones con sus respectivas réplicas, pasado el tiempo de incubación para la especie en estudio se van a tener un número de colonias que se asume que corresponde a un número de bacterias individuales iniciales [21], la dilución apropiada es aquella en la que sea posible diferenciar colonias aisladas y que éstas tiendan a ser del mismo tamaño; sus desventajas son sin duda el largo tiempo de crecimiento de ciertos patógenos como *M. tuberculosis* y el hecho que no tiene en cuenta las bacterias muertas.

Citometría de flujo: Las bacterias pueden ser analizadas en un citómetro de flujo para la cuantificación de bacterias viables y no viables, haciendo uso de tinción con marcadores específicos, se requiere conocer el volumen de muestra leído, las diluciones realizadas y utilización de microesferas de calibración como patrón interno [21]. La gran desventaja que presenta es que es un método demasiado costoso en comparación a otras técnicas y por lo tanto no está disponible en todos los laboratorios del mundo, y su uso se restringe por medidas de bioseguridad dependiendo del patógeno que se desee analizar.

1.2.2 Fagocitosis y cuantificación de bacteria intracelular

La fagocitosis es el proceso por el cual partículas de más de 0,5µm son internalizadas en una célula (generalmente neutrófilo o macrófago), dichas partículas pueden corresponder a bacterias, células muertas o microesferas.

El proceso de fagocitosis se da básicamente en dos etapas y está mediado por diferentes receptores expuestos en membrana que se unen a la partícula y señalizan para la reorganización de los filamentos de actina y la contracción por múltiples isoformas de miosina permitiendo una cobertura completa de la partícula [22]. El objetivo de este proceso en el sistema inmune, es el control de infecciones mediante la unión de la vacuola fagocítica (que contiene el patógeno) al lisosoma, con el fin de degradar el patógeno con especies altamente oxidantes; éste proceso resulta inútil en el control de patógenos intracelulares que se favorecen del entorno celular y lo toman como hospedero. *Mycobacterium tuberculosis* y especies del complejo *M. tuberculosis* logran modular la respuesta inmune e inhibir la formación del fagosoma- lisosoma manteniéndose viable y reproductiva en el espacio intracelular del macrófago.

El estudio de fagocitosis resulta ser útil e indispensable no sólo en micobacterias, sino para el estudio de patógenos intracelulares como *Leishmania*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Brucella spp* entre otros [14-16], para los cuales se ha utilizado como modelo celular in vitro los macrófagos derivados a partir de la línea celular de monocitos U937; ésta línea celular ha sido utilizada también en la evaluación de genes que son requeridos para la supervivencia intracelular de *M. tuberculosis* [23]. En el estudio se utilizó *M. smegmatis mc²* una cepa no patógena de la familia de micobacterias, susceptible de ser transformada, que es normalmente degradada totalmente por células fagocíticas y que además es de crecimiento rápido; esta micobacteria transformada con una librería plasmídica de *M. tuberculosis*, se usó para infectar células U937 en una multiplicidad de infección de 10 micobacterias por célula (Multiplicity of infection MOI=10) calculado por densidad óptica, durante 2 horas a 37°C. Si el gen le confiere resistencia dentro del macrófago se deberán encontrar micobacterias viables intracelulares pasado ese tiempo. La cuantificación de micobacterias intracelulares se hizo por conteo de UFC en medio 7H10 suplementado, después de un tratamiento con amikacina que garantizara la muerte de las micobacterias extracelulares

y la lisis celular con tratamiento con agua destilada, las colonias son visibles a los 3 días de incubación.

Ésta técnica de cuantificación intracelular en estudios de fagocitosis es la más común desde su aparición y se sigue utilizando incluso para la evaluación de infección en células no fagocíticas y será discutida en detalle más adelante.

Recientemente se han publicado trabajos en estudios con macrófagos que persiguen diferentes objetivos y aplican en esencia la misma técnica de cuantificación de micobacterias intracelulares, incluso utilizan *M. smegmatis* como modelo. Uno de ellos es el realizado por Viswanathan *et al.* en 2015, el cual perseguía evaluar el papel que tiene el colesterol de membrana de macrófagos THP1 en la entrada de micobacterias a estas células hospederas [24]. En el estudio, se utilizó como modelo *M. smegmatis* y para la depleción de colesterol de la membrana de las células hospederas se empleó metil β -ciclodextrina, el conteo de UFC después de la infección mostró una disminución significativa de la entrada de micobacterias al macrófago mostrando la importancia de la presencia de una cantidad óptima de colesterol en la membrana plasmática para los procesos de fagocitosis de micobacterias; en el estudio se hizo control de entrada de la micobacteria a la célula por microscopia de fluorescencia con *M. smegmatis* que expresa la proteína fluorescente *dsRed2* [25, 26].

Son cientos de estudios publicados que demuestran la importancia del estudio de la fagocitosis y por ende de la cuantificación de patógenos intracelular, un tema que trasciende incluso a células que no son consideradas normalmente fagocíticas. Por ejemplo en un estudio muy reciente de células B que pretendía entender los procesos por los cuales una célula normalmente encargada de presentación de antígenos solubles y pequeños, en algunos casos procesa antígenos particulados como eritrocitos, vesículas e incluso *M. tuberculosis*, demostró que la línea de células B Raji tiene procesos fagocíticos para la internalización de *M. tuberculosis* viable o muerta donde es crucial la opsonización, y que la presencia intracelular de la micobacteria desencadena factores de respuesta inmune como la producción de inmunoglobulina M (IgM) y moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86). Los métodos usados para descartar la presencia de micobacterias extracelulares fueron el uso de antibióticos y el paso de las células por

gradiente de albumina sérica bovina 3% (BSA) suplementada con glucosa 4,5% en PBS. El conteo de micobacteria intracelular se hizo por UFC después de lisis con SDS y también se utilizó FITC para hacer posible la visualización de la micobacteria en el espacio intracelular en un microscopio de escaneo laser confocal Olympus FV1000; se utilizó también una técnica de tinción Ziel Neelsen modificada y se realizaron cortes para ver en microscopio electrónico. En estos estudios se incluyeron ensayos de internalización de microesferas fluorescentes que también fueron fagocitadas por las células B Raji [27].

En los estudios que involucran microesferas o microesferas fluorescentes, éstas generalmente son usadas para evaluación de la capacidad fagocítica de las células [28, 29]. Se han usado también en diferenciación de células fagocíticas entre un grupo de células polimorfonucleares extraídas de muestras de sangre de pacientes [30] y son útiles en la caracterización de procesos fagocíticos de pacientes con una enfermedad en relación a un grupo de pacientes sanos, en el caso de VIH se ha visto un incremento en el número de células fagocíticas, y su capacidad (mayor número de microesferas por célula) fagocítica [31].

El uso de microesferas fluorescentes también ha permitido caracterizar los procesos de fagocitosis de diferentes grupos celulares bajo diferentes condiciones, además la descripción del papel de algunas proteínas en procesos fagocíticos, por ejemplo, la capacidad fagocítica de fibroblastos LM (una línea celular transformada con alta capacidad endocítica) se ve disminuida cuando la composición lipídica de la membrana celular es alterada [32]; se han obtenido diferencias significativas en la cantidad de células fluorescentes (evaluado por citometría) después de recubrir microesferas fluorescentes con la vimentina completa y vimentina clivada y exponerlas a las células durante una hora a 37°C, lo que permitió concluir que la proteína vimentina procesada incrementa la capacidad de quimiotaxis y de fagocitosis en células THP-1 [33]. Con el uso de perlas o microesferas fluorescentes también se ha descrito el papel de las integrinas en la regulación de la fagocitosis del colágeno en fibroblastos humanos [34].

1.2.3 Infección de células no fagocíticas

Anteriormente se expuso la fagocitosis como uno de los procesos de internalización celular de patógenos, y es el caso también de la *Salmonella* en células dendríticas y macrófagos [35] o de la *Shigella* en enterocitos [36], sin embargo es sabido que ciertos patógenos logran entrar y vivir en otros tipos de células, su ingreso se da por procesos no fagocíticos, generalmente mediados por receptores. Por ejemplo los parásitos como *Plasmodium falciparum* invaden glóbulos rojos y hepatocitos [12], o el meningococo *Neisseria meningitidis* invade células epiteliales y endoteliales [13]. También se ha demostrado que especies de género *Mycobacterium*, en los cuales se concentra ésta revisión ingresan no solo a macrófagos sino a células epiteliales, *M. smegmatis* que es no patógena no solo ingresa sino que adquiere un fenotipo patogénico en ellas, a pesar que logra ser degradada en determinado tiempo [37, 38]; *M. leprae* infecta células epiteliales, musculares y células de Schwann (neurolemocitos) [39]; así mismo *M. tuberculosis* y otras especies del complejo *M. tuberculosis* ingresan a células epiteliales, las toman de hospedero continuando su replicación [40-42].

Los métodos usados en la detección de la infección con bacterias o micobacterias en células no fagocíticas son generalmente el método de UFC mencionado brevemente para estudios de fagocitosis, y en algunos casos con verificación por diferentes técnicas de microscopia. Se hace evidente una vez más, que la cuantificación de bacterias intracelulares es indispensable para estudio de procesos infecciosos, no sólo en procesos fagocíticos sino en sistemas no fagocíticos y que la cuantificación por UFC es la técnica de cuantificación adoptada y aceptada en todo el mundo.

1.2.4 Cuantificación de bacteria intracelular por UFC

El primer reporte que se tiene de *M. tuberculosis* intracelular en células epiteliales fue publicado en 1955 [43] infectando células Hela (la primera línea celular de cultivo en laboratorio). Brevemente la metodología consistió en un cultivo de células Hela realizado en HBSS suplementado con suero de caballo o humano, las cuales fueron infectadas por una suspensión de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv realizada por pipeteo fuerte y de la cual se sembraron 50µL para conteo en medio agar sangre con el fin de determinar la cantidad de bacteria que se había puesto. Las células infectadas se dejaron en cultivo

por algunos días y luego se fijaron con formalina 10% para análisis en microscopio haciendo uso de una tinción que incluye fushina, ácido alcohol y colorante de Gimsea. La metodología, que parece sencilla sirvió de base e inspiración para estudios posteriores que dieron lugar al planteamiento de una metodología más elaborada, *la metodología de conteo de micobacterias intracelulares por UFC*, que generalmente se soporta en técnicas de microscopía.

Un estudio realizado en 1985 perseguía la evaluación de un plasmido de *Yersinia pseudotuberculosis* insertado en *E-coli* K12 en su posibilidad de habilitar las bacterias para que puedan invadir células epiteliales Hep-2, describe detalladamente la técnica de conteo por UFC, en el estudio se incubaron 8×10^5 células por pozo en cajas de 24 pozos permitiendo su adherencia, luego se infectaron con 6×10^7 bacterias transfectadas durante 3 horas a 36°C. Para eliminar las bacterias extracelulares se hicieron 10 lavados con PBS estéril y un tratamiento con gentamicina, un aminoglucosido que puede entrar a las células de mamíferos y del cual discutieron que no resultaba ser muy efectivo contra las bacterias modificadas. Después del tratamiento antibiótico, las células fueron lisadas con Triton X-100 al 1% en agua desionizada y se sembraron en agar, una réplica del experimento fue realizada sustituyendo la lisis celular por fijación con glutaraldehído 2% y preparación para visualización en microscopio electrónico [44]. Éste procedimiento describe lo que se puede decir una “metodología final” ya que no ha sufrido variaciones importantes hasta nuestros días.

Algunos autores cambian el uso de PBS 1X por HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) y realizan más o menos número de lavados, también varían las soluciones usadas para la lisis celular; se utiliza frecuentemente Tritón 100X, SDS [27] y agua destilada o desionizada [23]. Los antibióticos usados varían de acuerdo al patógeno en estudio, por ejemplo para *M. tuberculosis* se suele utilizar una concentración de 20µg/mL de amikacina y se deja en incubación por 2 horas, se hacen algunos lavados y las micobacterias intracelulares se siembran en medio de cultivo 7H10 suplementado con OADC [41, 45]. El conteo de colonias de *M. tuberculosis* puede realizarse a partir de los 20 días de cultivo, teniendo en cuenta su lento crecimiento, si no hay problemas de contaminación o deshidratación del medio.

1.2.5 Preparación de *Mycobacterium* y selección de MOIs

Uno de los factores de virulencia de *M. tuberculosis* y que es característico de las micobacterias es la formación de agregados, sobre todo en medios de cultivo, los cuales se convierten en un problema ya que dificultan la entrada a las células blanco en estudios *in vitro*, por lo que es importante garantizar que la bacteria que se pone para infectar las células esté completamente disgregada. Además se procura garantizar una multiplicidad de infección (MOI) óptima para determinados estudios, que sea real en el momento de la infección, y con el que se mantengan viables las células blanco.

El *cultivo* de las micobacterias se hace generalmente en medio Middlebrook 7H9 suplementado con ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa (OADC) al que se le adiciona glicerol y en algunos casos Tween 20 que ayuda a disgregar los agregados de micobacteria, ayudado por el hecho que el cultivo se hace en agitación constante.

Si el crecimiento se hace en medio sólido resulta mucho más difícil disgregar las colonias compactas y secas características de las micobacterias, en este caso el medio utilizado generalmente es Middlebrook 7H10 suplementado con OADC y se han reportado tres procedimientos para disgregar las micobacterias: **1.** Paso de una suspensión de pellet micobacteriano a través de agujas de un calibre muy pequeño por 5 o 6 veces, se han usado de calibre 26 ½ [13, 25] y calibres 26 y 25 usando jeringas de tuberculina [46, 47], en ocasiones el paso se hace después de la infección para tener un conteo uniforme de UFC.; **2.** Agitación rápida en un agitador de hélice (Overhead stirrer) en frío para evitar aglutinación y posterior paso por una membrana de 0,8µm que garantiza el predominio de bacterias solas en controles realizados por tinción de Ziehl Neelsen [48] ; **3.** Uso de sonicación suave durante cortos periodos de tiempo por ejemplo 30W durante 5 minutos [38, 49].

Por otra parte, existen estudios que involucran varios MOIs, pero generalmente se ve el uso de un MOI de 1:10 (10 bacterias por célula blanco) con el que se ha confirmado que se mantiene la viabilidad celular después de los periodos de infección [23]. Se reportan también MOIs inferiores de 1: 1 y 1:5 en reporte con UFC [50], y mayores, como 1:50; el máximo MOI reportado es de 1:100 y se encuentra referenciado en varios artículos generalmente asociado a aquellos que preparan muestras para microscopia, sin reportar

citotoxicidad asociada al MOI [38, 51]. Los MOIs son generalmente confirmados por siembra en cajas de agar y conteo de UFC o por medida de la densidad óptica posterior a la disgregación de bacterias.

1.2.6 Métodos de cuantificación de bacteria intracelular que incluyen marcación fluorescente

Existen diferentes metodologías que han sido desarrolladas con el fin de acelerar el proceso de cuantificación intracelular de patógenos, haciendo uso de las ventajas que ofrecen los fluoróforos, en términos de sensibilidad y las opciones que presentan equipos desarrollados para detección y análisis de los mismos. A continuación se describen brevemente los métodos, se analizan sus ventajas y desventajas y se enumeran en el orden cronológico en que fueron propuestas (tabla 1-2); es de resaltar que en prácticamente todos los estudios se utiliza el método de conteo de UFC como patrón de comparación, para estandarizar metodologías y confirmar resultados.

1.2.7 Tinciones para detección de bacterias ácido alcohol resistentes

Aunque las técnicas de coloración para la detección de bacterias ácido alcohol existentes fueron propuestas en 1882 como método diagnóstico [3], fue mucho tiempo después que fueron utilizadas para detección, cuantificación e incluso diferenciación de micobacterias intra y extracelulares. En la metodología propuesta en 2001 por Strahl y colaboradores [52] se infectan protozoos de la especie *Tetrahymena pyriformis* con diferentes cepas de micobacterias con el fin de evaluar fagocitosis y crecimiento intracelular. Los protozoos fueron cultivados inicialmente en medio ATCC broth 357, colectados por centrifugación y contados por cámara de Petroff-Hauser, se infectaron en MOIs de 1:10, 1:1 y 10:1; y como la fagocitosis ocurre muy rápido, las muestras de protozoos se centrifugaron inmediatamente después de adicionar las micobacterias, se lavaron 2 veces para remover la mayoría de micobacterias extracelulares; se prepararon extendidos en láminas de vidrio y se realizaron tinciones de Ziehl Neelsen y de O-Rodamina B siguiendo procedimientos estándar. Las láminas se observaron en un microscopio Zeiss Axiophot (L_{ex} 545nm y L_{em} 610nm). Los autores argumentan que cambiando el plano focal en la visualización del protozoo de las tinciones con rodamina, es posible determinar qué

bacterias están adentro y cuales unidas fuera de la célula, ellos analizaron de 50 a 100 protozoos sin observar agregados extracelulares de más de 15 micobacterias.

Las técnicas de detección Ziehl Neelsen y Auramina-O fueron modificadas y empleadas en 2012 para mejorar la detección de *M. tuberculosis* en fluido cerebrospinal en muestras de pacientes [53]. En la técnica, las muestras son fijadas con p-formaldehído 4% en vez de calor sobre las láminas y luego de secadas son permeabilizadas con TritónX-100 al 0,3% durante 30 min. La tinción de Ziehl Neelsen se desarrolla según el procedimiento convencional y sugerencia de la casa comercial pero utilizando ácido-alcohol en solución de tritón y dejando actuar al azul de metileno durante 5min. La observación en microscopio mostró micobacterias en el 100% de las muestras de pacientes comparado con una sensibilidad de detección del 27,6% para una tinción estándar. La tinción de las muestras permeabilizadas con Auramina-O se realizó como sugiere la casa comercial y posteriormente, para delimitar la membrana, se usó una inmunomarcación fluorescente con diferentes anticuerpos: Ratón anti-CD11b, ratón anti-ED1, conejo anti-CD3 y ratón anti-CD20 reconocidos por anticuerpos dirigidos contra inmunoglobulinas de ratón y conejo biotinados que dan marcación fluorescente con un conjugado de estreptavidina. La marcación fluorescente confirmó que la técnica Ziehl Neelsen modificada permite la tinción, diferenciación y cuantificación de micobacterias intracelulares con alta sensibilidad.

1.2.7.1 Técnicas que incluyen anticuerpos

La primera metodología en microscopio utilizando anticuerpos fluoromarcados fue diseñada en 1985 [54], a pesar que ha tenido algunas modificaciones de acuerdo con el patógeno, las células en estudio y también con la introducción de nuevos fluoróforos, el principio sigue siendo el mismo.

El protocolo de invasión se realiza como se mencionó para conteo con UFC pero para cuantificar bacterias intracelulares se hace la marcación selectiva de éstas con anticuerpos fluoromarcados. En ésta metodología, después de infectar las células, se hacen lavados con un buffer salino para retirar el exceso de bacterias extracelulares y se realiza la marcación selectiva con anticuerpos marcados, primero se adiciona un anticuerpo primario que reconoce las bacterias extracelulares (ya que estos no pueden

ingresar a la célula), luego se hacen lavados para retirar el anticuerpo que no se une y finalmente éste es reconocido por un anticuerpo secundario que está marcado con algún fluoróforo, generalmente isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC-Rojo). Después de la incubación, el anticuerpo secundario que no se une se retira haciendo lavados; posteriormente se permeabiliza la membrana celular con metanol o alguna solución detergente, y se continúa con el marcaje con anticuerpos como se describe para bacterias extracelulares, pero ésta vez se utiliza un anticuerpo secundario que se encuentra marcado con otro fluoróforo que emite en diferente región del espectro (isotiocianato de fluoresceína (FITC)-Verde).

Al final, las bacterias extracelulares se tiñen mayoritariamente con TRITC mientras que las intracelulares son fluoromarcadas únicamente con FITC. Las bacterias son cuantificadas visualmente en microscopio de fluorescencia.

1.2.7.2 Cuantificación en microscopio por tinción FBA

Las siglas FBA hacen mención a la utilización de FITC, biotina y avidina para la tinción en la detección de bacterias intracelulares que sigue la metodología planteada por Agerer *et al.* en el año 2004 [55]. En el ensayo se utilizaron células transfectadas 293T (fibroblastos de ratón) que son células adherentes y se infectaron con diferentes bacterias (*N. gonorrhoeae* NS11-B2.1 y NS11-B2.1, *Staphylococcus carbonosus*, *S. aureus*) previamente fluoromarcadas.

La marcación se hace resuspendiendo las bacterias en una solución de FITC 0.4mg/mL en un buffer de fosfatos (PBS) e incubando durante 15 minutos a 4°C, luego se adiciona una misma cantidad de solución de biotina 0.3mg/mL y se deja por otros 30 minutos, se hicieron lavados y se obtuvo la bacteria biotinada y marcada con FITC. Para la infección se pusieron 40 bacterias por célula y se incubaron durante dos horas, pasado este tiempo se fijaron las muestras con paraformaldehído 4% en PBS, se lavaron tres veces y se incubó con solución de bloqueo 5% (10% Suero fetal bovino (SFB) en PBS). La bacteria extracelular se tiñe posteriormente con estreptavidina Alexa-647 (que reacciona con la biotina). Finalmente para visualizar el citoesqueleto de las células, posterior a una permeabilización de 5 minutos con buffer permeabilizante (PBS con SFB 10% y saponina

0.2%) se hace una tinción con Alexa Fluor-546 durante 30 minutos. Las muestras se observan en un microscopio de escaneo láser confocal LSM 510.

1.2.7.3 Cuantificación de bacteria intracelular por citometría de flujo

El citómetro de flujo se puede describir brevemente como un equipo que utiliza principios físicos de difracción y reflexión de la luz para detectar células con diferentes características de tamaño y complejidad, está equipado con un láser y un set de detectores que permiten reconocer diferentes fluoróforos presentes en la muestra a estudiar. El tamaño celular es determinado por la luz reflejada al interactuar con la superficie celular, y la complejidad celular es medida por la difracción de la luz que atraviesa la célula, haciendo referencia a la cantidad de orgánulos que interfieren en el paso de la luz [56].

En 2006, Pils y colaboradores siguieron el protocolo de tinción FBA descrito anteriormente; pero ésta vez planearon paralelamente un protocolo que incluye el uso de citómetro de flujo para la cuantificación de *Neisseria gonorrhoeae* [57]. En el proceso algunas modificaciones fueron necesarias para posibilitar el conteo en el citómetro: 1. Las bacterias fueron marcadas únicamente con succimidil-éster de carboxifluoresceína (CFSE) y posteriormente incubadas con las células en proporción 20:1 durante dos horas, 2. Las células infectadas se desprendieron de la caja por tratamiento con tripsina y se lavaron dos veces con PBS 1%. 3. Las células infectadas se re suspendieron en 1mL de buffer de flujo (SFB 1% en PBS), y 4. Para discriminar las bacterias intracelulares de las extracelulares se adicionó azul de tripán (concentración final = 0.2%) inmediatamente antes de la lectura para desactivar la fluorescencia de la bacteria extracelular, el azul de tripán no puede ingresar a las células viables que contienen bacterias en su interior pero si puede rodear las bacterias que están en el exterior absorbiendo la luz emitida por éstas, por lo tanto se argumenta que el equipo recibirá señal únicamente de las bacterias intracelulares.

En el estudio se leyeron 10000 células por muestra en la selección de canal FL1 que corresponde al fluoróforo CFSE, en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson). La técnica fue posteriormente modificada y evaluada exitosamente para conteo de *M. tuberculosis* [10, 49, 58].

Tabla 1-2 Métodos de cuantificación de bacteria intra y extra celular en ensayos de infección que incluyen fluoróforos

Fuente	Bacteria	Células	Fluoróforo(s)	Método de conteo	Ventajas	Desventajas
Heeseman J y Laufs Rainer, JCM, 1985	<i>Shigella sonnei</i> <i>Y. enterocolitica</i> serotype O:3 <i>Salmonella enteritidis</i>	HEP-2	TRITC-labeled goat anti-rabbit IgG serum FITC-labeled goat anti-rabbit IgG serum	Ver en microscopio de fluorescencia. Bacterias teñidas de color rojo y verde corresponden a las que se encuentran adheridas Bacterias teñidas de color verde corresponden a bacterias intracelulares	Diferenciar claramente bacteria intra y extracelular. Método de fluorescencia evita el uso de antibióticos.	Una unión de anti cuerpos que deje muchos sitios de unión disponibles para segundo reconocimiento puede dar resultados erróneos Largos tiempos de ensayo e incremento en costos por uso de anti-cuerpos.
Strahl et al. Applied and environmental microbiology, 2001	<i>Mycobacterium avium</i> <i>Mycobacterium intracellulare</i> <i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	NO Tinción ácido alcohol resistentes Rhodamina-Auramina	Tratamiento antibiótico. Lisis con SDS Siembra en 7H10 y conteo UFCs Ver en microscopio de fluorescencia, contraste con permanganato de potasio Diferencia bacterias intra y extracelular por cambio en el plano focal por protocolo	Se encuentra correlación de tinción con el método de UFCs Método de fluorescencia evita el uso de antibióticos.	Alta inversión de tiempo para diferenciar bacterias intra de extracelular Bacterias intra y extracelulares depende del observador. Se puede analizar un número pequeño de protocolos por muestra
Pils et al. KOPS, 2005	<i>N.gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>	Fibroblastos de embrión de ratón 293T	5-(6) carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE) Sulfo-NHS-LC-Biotin + Streptavidin-Alexa647	Citometría de flujo en solución de azul de tripan CF=0,2%. Ver en microscopio Zeiss LSM 510 de escaneo laser confocal	Permite diferenciar bacteria intra y extracelular Cuantificación de una muestra grande de células Diferenciar bacteria intra y extracelular.	Da información acerca de células infectadas y no bacterias que infectan. Se usa como control no cuantitativamente.
Bish et al. Microbes and infection, 2008	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Carcinoma epidermal de carcinoma cervical ME180 (HTB-33)	NO CCF2-AM/FA1090? (bacteria) Alexa-Fluor-546 phalloidin y Oregon Green-Anti-GC	Bacteria total. Lisis con saponina 1% y siembra en agar para conteo UFCs Bacteria internalizada: Gentamicina (200ug/mL), Lisis y conteo UFCs Citometría de flujo. Gate viable y lectura a 405nm y 488nm Ver en microscopio Zeiss LSM 510 de escaneo laser confocal	Se puede conocer cantidad de bacterias que infectan cada célula en lectura de una muestra grande. Cuenta en duda cantidad de células adheridas y remanentes. Cuantificación de una muestra grande de células. Seguimiento de viabilidad de las células durante el ensayo. Diferencia intra de extracelular. Se puede distinguir las bacterias que están dentro, adheridas o remanentes de lavados.	No se puede conocer cantidad de bacterias que infectan cada célula. Sólo células infectadas y/o con bacterias adheridas a superficie. Utiliza anticuerpos alargando tiempos de ensayo. Tamaño de muestra limitado
Chen et al. JCM, 2012	<i>M. tuberculosis</i>	Fluido cerebrospinal de pacientes	No Tinción ácido alcohol resistentes Auramina O y anticuerpos modificada Ziehl-Neelsen	Detección por crecimiento de colonias en medio MGIT 960 Ver en microscopio de escaneo laser confocal LSM 510, Carl Zeiss Ver en microscopio óptico	Muy sensible para detección de unidades de micobacteria Permite ver bacteria intra y extracelular con tinción ácido alcohol existente útil en detección.	Mucho tiempo de crecimiento Cuantificación limitada a un número pequeño de células.

Se ha reportado además una nueva propuesta basada en citometría de flujo para la cuantificación de células epiteliales de carcinoma cervical ME180 (HTB-33) infectadas con *Neisseria gonorrhoeae* [59]. En el estudio la cepa FA1090 de *Neisseria gonorrhoeae* fue modificada por estrategia de reemplazo de genes para que expresaran un gen reportero de una β lactamasa (proteína de fusión (Bla) con el -dominio β proteasa de IgA) (selección con penicilina). Las células ME180 fueron infectadas con un MOI 1:10 de bacterias modificadas por incubación durante 6 horas, se lavaron para retirar el exceso de bacterias extracelulares y se suspendieron en una solución 0,25 μ M de sustrato acetilado de β lactamasa CCF2-AM (cephalosporin core linking 7-hydroxycoumarin to fluorescein - Lex 409nm) durante aproximadamente una hora; en ese tiempo el sustrato ingresa a la célula y es procesado por las esterasas de células viables dejando como producto el CCF2 (Verde fluorescente- Lex 520nm), que es reconocido por la β lactamasa de las bacterias liberando las cumarinas (Azul fluorescente- Lex 450nm). La distinción entre lo intra y lo extracelular corresponde a cada uno de los diferentes longitudes de onda emitidas, y es evidente en microscopia confocal de fluorescencia; se puede hacer un análisis cuantitativo muy acertado aunque con el inconveniente del tamaño de la muestra. Las muestras también fueron analizadas en un citómetro CyAn ADP (Dako Cytomation, Fort Collins, CO); fue posible cuantificar la cantidad de células que estaban infectadas, cuántas tenían bacterias adheridas (extracelulares) y cuántas estaban infectadas y tenían bacteria adherida sin embargo por éste método no se puede conocer el número de bacterias. No se ha reportado ésta metodología ni modificaciones de la misma con micobacterias.

1.2.7.4 Expresión de proteínas fluorescentes

Sin lugar a dudas, el descubrimiento de la proteína verde fluorescente que hizo merecedores del Premio Nobel en química a sus investigadores en 2008 [60] ha revolucionado el estudio de interacciones hospedero-patógeno [61, 62], por ende está presente en el desarrollo y aplicación de técnicas de cuantificación de infección celular, y por lo tanto ha sustituido en gran parte el uso de fluoróforos proveyendo una variedad de ventajas. Algunas aplicaciones en la cuantificación y diferenciación de bacteria intra y extra celular con esta técnica son mencionados a continuación.

En un estudio de fagocitosis de *M. smegmatis*, las células THP-1 fueron modificadas en su membrana [24], la micobacteria se dejó fagocitar en macrófagos durante 2 horas a 37°C y 5%CO₂, se hizo control de invasión por UFC usando gentamicina para inactivar bacteria extracelular; también se realizó un control de entrada de la micobacteria a la célula por microscopia de fluorescencia. Para ello la *M. smegmatis* fue transformada por electroporación del plásmido pMSP12::dsRed2 para la expresión de la proteína roja fluorescente dsRed2 siguiendo metodologías reportadas en tres trabajos anteriores [25, 26, 63]; los núcleos de los macrófagos se tiñeron con DAPI, se fijaron en p-formaldehído 4% para ser visualizadas en un microscopio Zeiss LSM 510 Meta confocal.

En otro estudio que incluye ensayos de invasión celular, se pudo determinar que la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv inhibe la maduración fenotípica y funcional de monocitos a células dendríticas. En el estudio se trabajó con la *M. tuberculosis* H37Rv que expresa GFP, las células dendríticas fueron generadas a partir de monocitos extraídos de células polimorfonucleares (PBMCs) de pacientes, y fueron infectadas en un MOI 3, las células infectadas no solamente fueron cuantificadas sino que fueron separadas de las que no, por citometría de flujo para continuación con ensayos de caracterización celular. Se entiende que no es necesaria una diferenciación entre lo intra y extracelular ya que en un MOI tan bajito y con un periodo de incubación de 2 días, todas las bacterias están internalizadas en las células, aunque no todas las células son infectadas [64].

Otro ejemplo más reciente es el estudio *in vivo* con *M. marinum*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* que expresan constitutivamente proteínas fluorescentes GFP, Wasabi ó tdTomato para visualización en evaluación de procesos de infección en pez cebra y ratones, en el estudio es posible determinar las diferencias en el proceso de infección de una cepa nativa, y cepas modificadas que pueden ser deficientes en lípidos asociados a dimicoceroserato de tiocerol (PDIM) o en glicolípidos fenólicos, encontrando que PDIM es esencial como factor de virulencia. Las muestras fueron evaluadas en un microscopio confocal [65].

La evaluación de genes en relación a su regulación dentro de las células hospederas también ha sido posible gracias a la utilización de vectores de expresión de proteínas

fluorescentes en ensayos de invasión celular; por ejemplo, en un estudio realizado en 2007 [66] empleando el plásmido pLL192 se diseñaron vectores promotores para expresión de 6 proteínas de *M. tuberculosis* combinados con los genes reporteros GFP (*hsp60*) y *kan* de resistencia a kanamicina, que fueron obtenidos en *E-coli* y electroporados en *M. Bovis BCG* y en *M. tuberculosis*. Macrófagos alveolares de ratón de la línea celular J744 fueron infectados con un MOI de 1:4 con las bacterias transfectadas durante 2 horas, se hicieron lavados para retirar la bacteria extracelular y se dejaron en incubación 24-48 horas más en medio con kanamicina para matar las bacterias extracelulares remanentes o adheridas a la superficie. Las células fueron lisadas con una solución de SDS y se sembró una alícuota en medio Middlebrook 7H10 con antibióticos para conteo de UFC. El análisis de las bacterias por citometría de flujo mostró mayor fluorescencia en aquellas que las proteínas se ven sobre expresadas al estar sometida a estrés en el interior de los macrófagos, considerándose éstos como genes de respuesta adaptativa de la micobacteria, el gen *mceA1* es uno de ellos. Otros genes identificados por expresión de la proteína GFP han sido también evaluados en infección de diferentes líneas celulares y algunos se han determinado como factores de virulencia [67-69]

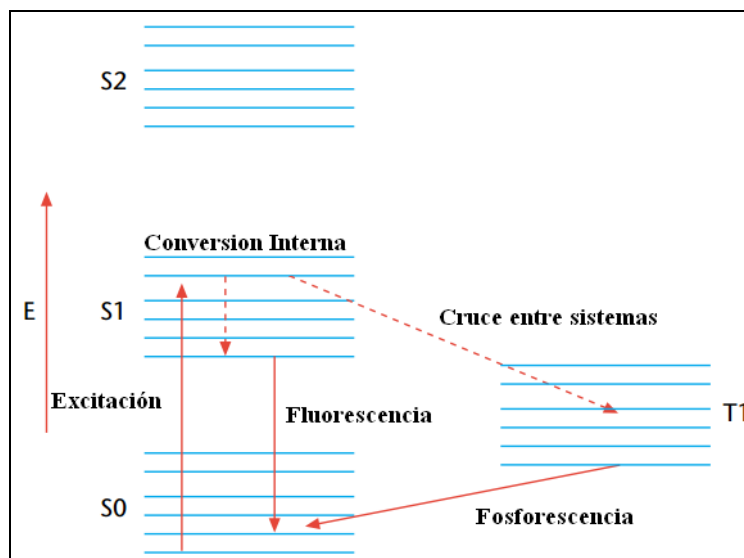
1.2.8 Fluorescencia y mecanismos de desactivación de fluoróforos

La fluorescencia es un proceso de fotoemisión que ocurre durante la relajación de un estado electrónico excitado de moléculas poli atómicas conocidas como fluoróforos, en los cuales la emisión de fotones involucra transiciones electrónicas entre estados electrónicos y vibracionales [70]. La figura 1-2 muestra un diagrama de Jablonski que representa los procesos que sufre una molécula asociados a la irradiación con luz: Absorción fotónica y excitación del estado fundamental (S₀) a un nivel energético electrónico superior de singlete (S₁) y/o triplete (T₁), y recuperación del estado fundamental S₀ a través de diferentes mecanismos que involucran emisión de fluorescencia o fosforescencia. En éste se señala con líneas horizontales consecutivas los estados vibracionales y a mayor distancia los estados electrónicos.

Después de la excitación, en cuestión de femtosegundos (1×10^{-15} s) a picosegundos (1×10^{-12} s) la molécula es relajada al nivel vibracional más bajo del estado electrónico excitado donde permanece algunos nanosegundos (1×10^{-9} s) provocando el desplazamiento de Stoke ("Stokes shift" que se refiere al aumento de la longitud de onda del fotón emitido en relación a la radiación de excitación) así la fluorescencia tiene lugar en el decaimiento de éste estado electrónico excitado a cualquier nivel vibracional del estado basal de energía, siempre y cuando no se dé un cruce electrónico entre sistemas que produciría fosforescencia [70].

En la figura 1-2 también se indican el decaimiento radiante (Flechas rojas continuas) y no radiante (Flechas rojas punteadas). S1 y S2 son estados energéticos de singlete de mayor energía y T1 es el estado de triplete de menor energía.

Figura 1-2 Diagrama de Jablonski de la excitación de un fluoróforo. Modificado de [70]



En la figura 1-2 se presentan algunos de los factores que afectan la fluorescencia contribuyendo desde diferentes mecanismos al decaimiento no radiante: 1. *Conversión interna*, que hace referencia a la conversión de energía electrónica a energía vibracional provocada generalmente por aumento de la temperatura; 2. *Conversión externa*, por la cual el fluoróforo pierde energía debido a las colisiones con otras moléculas en la

solución y donde se da el fenómeno de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) [71] 3. *El cruce entre sistemas*, que es un fenómeno no tan común de la mecánica cuántica que describe la relajación de estado excitado de singlete a un estado de triplete de menor energía [70]. Los fenómenos de conversión interna y externa han sido utilizados para alterar las longitudes de onda de emisión de un fluoróforo al ponerlo en contacto con otras moléculas como por ejemplo el indicador de fluorescencia Potassium-Binding benzo Furan Isophthalate (PBF1) que emite con mayor intensidad y a una longitud de onda diferente al formar complejos con K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} y Na^+ [72], o para desactivar totalmente la fluorescencia inespecífica en diferentes ensayos como por ejemplo con el uso de azul de tripán o azul de metileno en cuantificación de bacteria intracelular por citometría de flujo [49, 57].

En la literatura se reportan diferentes fluoróforos y estrategias que han sido usadas para la desactivación selectiva de los mismos; a continuación se describen estudios recientes relacionados con los fluoróforos fluoresceína de sodio, Naranja de acridina (NA) y Rodamina B.

Fluoresceína de sodio: La fluoresceína y sus derivados han sido ampliamente usados desde hace más de 50 años, uno de los usos en bioquímica con gran relevancia es el de control de la viabilidad utilizando di-acetato de fluoresceína (DAF) que se considera un fluoróforo latente ya que en la forma di-acetilada no es fluorescente, al ser reconocido por una esterasa presente en células viables es hidrolizada quedando la forma de la fluoresceína libre [73], por lo tanto las células viables serán fluorescentes. Otros estudios que involucran derivados de fluoresceína con sistema latente son el desactivador sintético DABCYL 3' unido a fluoresceína 5' útil para el foto control de actividad enzimática y en ensayos genéticos para control específico de hibridación útiles en técnicas de RT-PCR ultra sensibles [74], en el mismo enfoque de sistemas de encendido y apagado se han sintetizado diferentes desactivadores de la fluorescencia cuyos complejos desactivantes de fluoresceína son activados por reconocimiento de RNA [75] o de un tag de histidinas [76].

El pH es un factor determinante en la fluorescencia de la fluoresceína de sodio, a pH básicos se tiene el máximo valor de fluorescencia y a pH ácido la fluorescencia es

desactivada completamente [77], la interferencia del pH fue descrita en ensayos de fagocitosis donde utilizan un anticuerpo acoplado al derivado FITC para cuantificación por citometría de flujo [78]. Interacciones del fluoróforo con iodo (I^-) también han sido denominadas como desactivantes y su mecanismo de acción ha sido descrito como decaimiento del estado de triplete de excitación causado por acople de carga (efecto dipolo) [79].

Naranja de acridina: Sin duda alguna, el uso más conocido del NA es como marcador fluorescente de DNA y RNA en técnicas de biología molecular y por ende también ha sido utilizado en la marcación fluorescente de microorganismos. En la descripción de la fluorescencia en los complejos con esas biomoléculas se dice que hay un desplazamiento de los máximos de excitación emisión del NA de 491/ 537nm (en solución) a 502/ 527nm (NA-DNA) respectivamente, se dice que puede haber desactivación de la fluorescencia por colisiones normales entre el NA y el ADN [80].

Unos de los primeros desactivadores de fluorescencia descritos para el NA son la trietilamina, la N-N dimetilalanina, nitrobenzono y tetracianoetileno, las constantes de la forma catiónica y básica se encuentran descritas desde 1966 [81], el mecanismo de desactivación fue descrito por formación de complejos en un estudio donde se evalúa también la capacidad de desactivación de la fluorescencia del NA difenilamina, 2-naptilamina y N,N- dimetilamilina en soluciones de SDS [82]; el SDS también ha sido demostrado como un agente desactivador de la fluorescencia por sí solo; cuando se pone en contacto con una solución del NA, siempre y cuando se use a concentraciones muy bajas (menos de 1×10^{-3} M), se considera que el mecanismo de atenuación corresponde a la inducción de la formación de dímeros de NA y que a mayores concentraciones de SDS es posible restablecerse el monómero y por ende hay restablecimiento de la fluorescencia [83]. Otros compuestos químicos han sido descritos como atenuadores del NA, entre ellos se encuentra el oxígeno (O_2), compuestos tioles y ascorbato, radiosensibilizadores de nitro arilo, antibióticos como la adriamicina y la mitomicina ; y la cafeína [84].

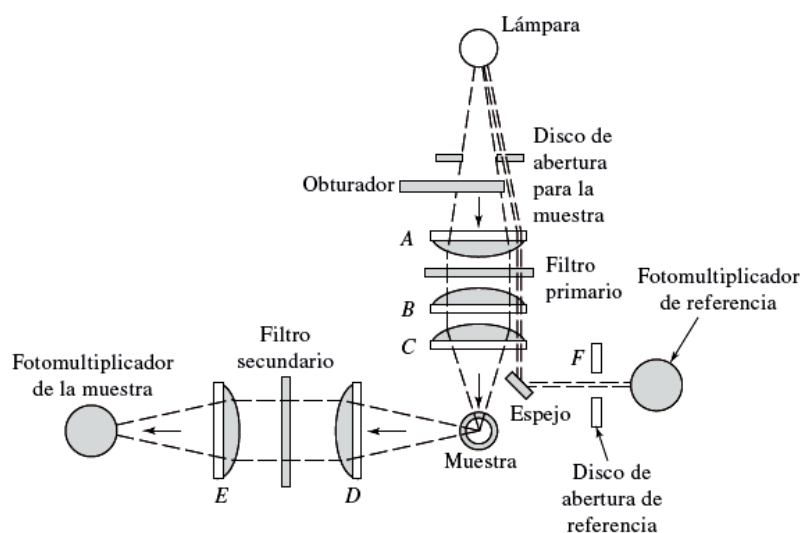
Rodamina B: Además de su uso en tinción de micobacterias, la rodamina B ha sido usada en medición de resistencia a antibióticos por parte de células cancerígenas [85].

Los mecanismos de desactivación de la fluorescencia descritos para la rodamina son generalmente por colisión y FRET (fluorescence resonance energy transfer), se han descrito algunos compuestos como desactivadores de la fluorescencia, por ejemplo el 1, 3, 5, 7 ciclooctatetraeno que induce también la conversión de energía interna [86], el grafeno del cual se ha definido una transferencia de electrones de la rodamina 6G al grafeno [87], en el presente año se hizo la síntesis de siete desactivadores de la fluorescencia de tipo antraquinonas y derivados de dipirrometano con mecanismos de desactivación también por FRET, la mayoría son solubles en dimetilformamida (DMF).

1.2.9 Fluorimetría y el fluorómetro multicanal

Los fluorómetros son instrumentos de medida de la fluorescencia muy similares a los fotómetros en su funcionamiento y generalmente se diferencian de los espectro fluorómetros en que en lugar de tener selectores de longitud de onda para absorción y emisión, éstos vienen equipados con filtros específicos que permiten impactar la muestra con una longitud de onda determinada y recibir información de emisión a otra longitud de onda fija, en la figura 1-3 se muestra un esquema general de un equipo de medición de fluorescencia.

Figura 1-3 Esquema general de un fluorómetro (tomado de [88])



La muestra es puesta generalmente en una celda de vidrio o sílice en medio de los dos filtros, uno para recibir luz monocromática que corresponde al máximo de absorción de la muestra y otro que recibirá los fotones emitidos por la muestra dejando pasar aquellos que son característicos de la misma. La lámpara, que generalmente es de mercurio, emite luz a diferentes longitudes de onda, ésta choca con filtros de interferencia o de absorción generando el haz monocromático.

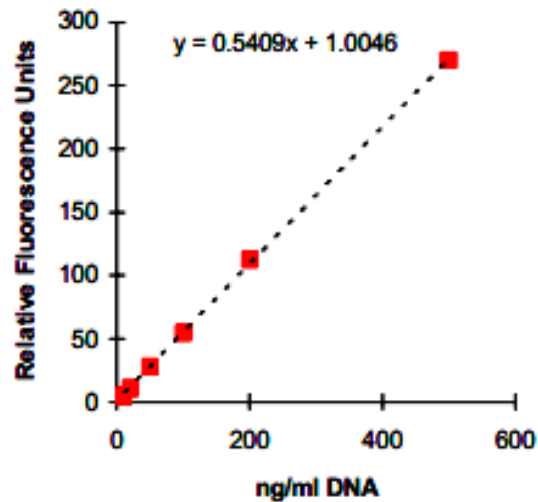
Debido a que la fluorescencia es una señal de baja intensidad, después de pasar el filtro secundario es necesario el uso de un tubo fotomultiplicador que es un transductor muy sensible y por lo tanto muy utilizado en equipos de fotoluminiscencia [88]. En fluorómetros multicanal es posible utilizar cajas de cultivo celular que dan la posibilidad de depositar hasta 96 muestras en una misma lectura ya que cuenta con un sistema mecano- eléctrico que ubica cada una de las muestras justo en medio de los dos filtros, el sistema fue diseñado y es muy utilizado para estudios bioquímicos.

Los datos obtenidos de una muestra son expresados en términos de unidades de fluorescencia y la señal obtenida es dependiente de la concentración del fluoróforo (Similar a la ley de Lambert Beer). Por esta razón, la fluorimetría es utilizada para cuantificación y es considerada como uno de los métodos más sensibles que existen donde una muestra problema puede ser conocida haciendo uso de una curva de calibración, por extrapolación en la ecuación de la recta obtenida. La figura 1-4 muestra un ejemplo de aplicación de fluorimetría a la cuantificación de ADN en la cual todas las muestras incluyendo las de análisis son preparadas siguiendo el mismo procedimiento; y para la curva se adicionan concentraciones conocidas de ADN.

Sin embargo, en fluorescencia es importante reconocer que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración sólo en un rango limitado de densidades ópticas y que hay factores que desvían la ley de Lambert Beer que interfieren también en la fluorimetría y son las siguientes: 1. Las muestras biológicas frecuentemente son turbias debido a presencia de macromoléculas o agregados que dispersan la luz, el fenómeno se puede apreciar fácilmente cuando se disminuye o se trabaja en longitudes de onda bajas ya que suele aumentar la absorción de fondo (background) 2. Cuando hay alta densidad óptica en la muestra, la emisión fluorescente puede no llegar al detector al ser capturada

por especies absorbentes, que en muchos casos puede ser el mismo fluoróforo, a este efecto se le conoce también como filtrado interno (inner filtering) y se presenta cuando se trabajan concentraciones muy altas de fluoróforo [71].

Figura 1-4 Grafica contenida en el inserto del producto que muestra una curva de calibración para determinación de ADN con el DNA Quantitation Kit- Fluorescence Assay (SIGMA-ALDRICH)



1.3 Conclusiones

La fagocitosis es un proceso muy importante en el control inmunológico de patógenos, por ésta razón ha sido ampliamente estudiada en patógenos intracelulares como *Leishmania*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Brucella spp*, los estudios se han realizado con células U937 y THP-1 en su mayoría y algunos han incluido el uso de microesferas fluorescentes para la comprensión del proceso de fagocitosis.

La cuantificación de bacterias es indispensable en el estudio de procesos infecciosos bacterianos, que pueden ser fagocíticos y no fagocíticos, para lo cual la técnica más empleada alrededor del mundo es la de conteo de unidades formadoras de colonia UFC en cajas de medio de cultivo sólido.

La desagregación de las micobacterias y la multiplicidad de infección (MOI) son factores importantes para que se den los procesos de infección *in vitro*, entre los métodos usados para éste fin se encuentran el paso de suspensiones micobacterianas por agujas de calibre muy pequeño haciendo uso de jeringas, agitadores de hélice y sonicación suave. Los MOI varían desde 1 hasta 100 micobacterias por célula pero se prefiere la proporción 10 a 1.

Los métodos de cuantificación empleados para micobacterias intracelulares son microscopia con tinción diferencial ZN, microscopia de fluorescencia usando anticuerpos, fluoróforos o GFP; la técnica de conteo de UFC y citometría de flujo.

La Fluoresceína de sodio, la Rodamina B y el NA son fluoróforos ampliamente utilizados en bioquímica y biología molecular, en la actualidad se han diseñado atenuadores de la fluorescencia para obtener sistemas de encendido y apagado sobre todo de la fluoresceína. Algunas alaninas y el SDS han sido descritos como desactivadores del NA y el grafeno y algunas antraquinonas desactivan la Rodamina B.

El amplio uso de fluoróforos en técnicas de cuantificación de micobacterias intracelulares, las aplicaciones particulares de la fluoresceína de sodio, el NA y la Rodamina B y la relación lineal entre fluorescencia y concentración a concentraciones bajas de fluoróforo sugieren que es posible una técnica de cuantificación de micobacterias intracelulares por fluorimetría multicanal.

2. Diseño del método fluorimétrico: Ensayos preliminares con microesferas fluorescentes YG

La metodología propuesta en el diseño de un método fluorométrico que pueda ser aplicado al estudio de *Mycobacterium tuberculosis* es producto del análisis contenido en el estado del arte presentado en el capítulo 1, y fue planteado tomando en consideración las posibilidades de infraestructura y acceso a reactivos y materiales de los laboratorios de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia- FIDIC donde se desarrolló este trabajo.

Teniendo en cuenta que los fluorómetros multicanal, al igual que los fotómetros o los lectores de Elisa son muy utilizados en lectura de muestras totalmente solubles, y que en un ensayo con micobacterias se tiene una suspensión de partículas grandes compuestas de células con bacterias o agregados de bacterias en una solución acuosa, se realizaron pruebas preliminares con microesferas fluorescentes Fluoresbrite^R YG de 1,0 μ m que pueden en cierta manera simular la situación mencionada (partículas grandes fluorescentes en suspensión), con la ventaja de no ser patógenos, y con las que se evaluaron una serie de parámetros que fueron considerados en la cuantificación de micobacterias y que se describen a continuación.

2.1 Materiales y métodos

Todos los ensayos preliminares con microesferas fluorescentes YG (λ_{em} 441nm / λ_{ex} 486nm) fueron realizados en un fluorómetro Fluoroskan AscentTM provisto por la FIDIC, el cual dispone de dos pares de filtros con longitudes de excitación y emisión de 485/538nm y 355/460nm. Para los ensayos se utilizó la primera pareja de filtros que arrojó mayor

número de URF con las microesferas. Las células utilizadas en todos los ensayos fueron monocitos alveolares derivados a macrófagos U937, que son fagocíticas.

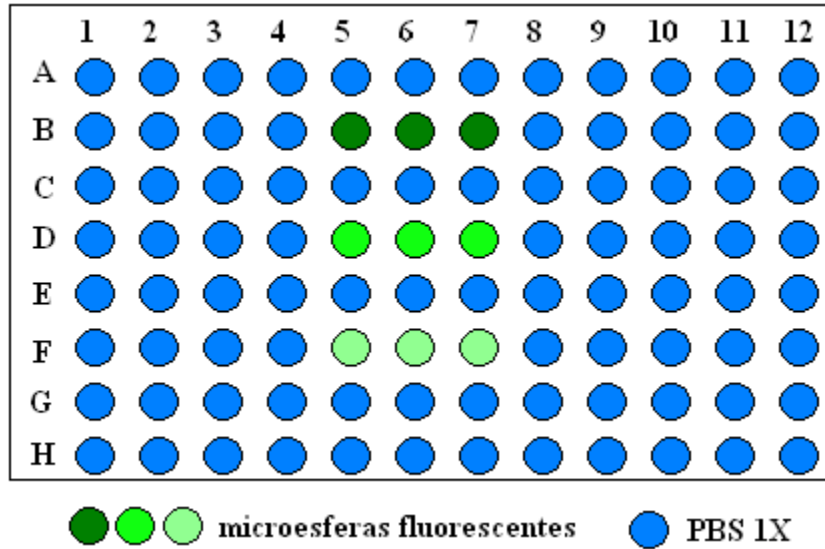
2.1.1 Evaluación del background del ensayo

Se evaluaron los parámetros de interferencia que se pueden tener en un ensayo de infección celular con el fin de definir la señal base de la técnica fluorimétrica.

Interferencia del pozo vecino: En el trabajo en fluorómetros multicanal se utiliza generalmente cajas de pozos oscuros, sin embargo no se dispone de estas cajas estériles requeridas para el trabajo con cultivo celular, por lo tanto es necesario determinar si existe alguna interferencia de pozo vecino cuando se emplean cajas transparentes y cuanta interferencia puede presentarse para ser tenido en cuenta en análisis futuros, para ello se pusieron microesferas en tres concentraciones $4,55 \times 10^7$, $3,03 \times 10^7$ y $1,52 \times 10^7$ microesferas por pozo, cada una con sus respectivos triplicados y se distribuyó en la caja como se muestra en la figura 2-1, los pozos restantes se llenaron con 200 μ L de PBS 1X. Se realizó la lectura de fluorescencia y se determinó estadísticamente el aporte significativo de fluorescencia a los pozos que no tienen microesferas fluorescentes. Todos los datos fueron analizados y procesados en hojas de cálculo de Microsoft Excel.

Background del ensayo: Teniendo en cuenta que es posible que las células tengan un grado de fluorescencia por la presencia de triptófano en secuencias proteicas propias de su estructura, que podría interferir y ser considerada como fluorescencia inespecífica en un ensayo infección celular o estudios de fagocitosis con microesferas fluorescentes, se determinó el promedio de fluorescencia y la desviación estándar de los rangos de valores en unidades de fluorescencia correspondiente al sistema de 5×10^5 células en 200 μ L de PBS 1X que corresponde a un blanco verdadero del ensayo, se hizo la lectura de una caja de 96 pozos, es decir de 96 blancos simulando una lectura real de ensayo. Los datos fueron procesados y analizados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel.

Figura 2-1 Determinación del efecto del pozo vecino de la fluorometría en cajas transparentes de 96 pozos



2.1.2 Determinación de los límites de detección y de cuantificación de microesferas fluorescentes YG

El límite de detección de microesferas en el equipo Fluoroskan Ascent™ de la FIDIC fue evaluada poniendo diferentes concentraciones de microesferas YG por pozo, por triplicado en diluciones sucesivas con factor de dilución de 2 ($Fd=2$) partiendo de 1×10^6 microesferas por pozo, que correspondería a un MOI de 10 para un millón de células que es el máximo que se puede manipular en ensayos celulares por el consumo de reactivos y volumen de trabajo y de la muestra, o a un MOI de 200 para 5×10^4 células que es la cantidad mínima de células que se adhieren llenando la totalidad del pozo de una caja de 96 pozos.

La cantidad mínima de microesferas que es detectada por el equipo, que supere diferencialmente los valores obtenidos como background según la ecuación $\bar{y}_B + 3s_B$ (\bar{y}_B es el promedio de la lectura de blancos y s_B es la desviación estándar de los blancos) será la cantidad correspondiente al límite de detección, y el límite de cuantificación fue obtenido según $\bar{y}_B + 10s_B$ [89]. Los datos fueron procesados y analizados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel.

2.1.3 Cuantificación de microesferas fagocitadas

Los ensayos de cuantificación de microesferas fagocitadas que busca evaluar la posibilidad de detección de esferas internalizadas en las células y diferenciación de grupos celulares con distintas cantidades de microesferas fagocitadas se llevaron a cabo en cajas de 96 pozos. En cada pozo se pusieron 5×10^4 células U937 y se incubaron toda la noche a 37°C con 5% CO_2 para permitir su adhesión. Posteriormente se retiró el medio sobrenadante y se adicionaron cantidades crecientes de microesferas que corresponden a la relaciones células: microesferas de 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:100, por sextuplicado de cada uno. Se incubaron durante 2 horas a 37°C con 5% CO_2 en las cuales se llevó a cabo la fagocitosis. Pasado éste tiempo se realizaron tres lavados con $200\mu\text{L}$ de PBS 1X haciendo uso de una micro-pipeta multicanal para eliminar las microesferas que no fueron fagocitadas en un triplicado, el otro se deja sin lavar como curva de calibración para la cuantificación de microesferas, de esta manera se garantiza que la pérdida de la fluorescencia por temperatura o por colisión con otras microesferas o células en el tiempo de incubación sea el mismo, en el ensayo y en la curva de análisis.

Se realizaron pruebas también en cajas de 24 pozos con cantidades superiores de células ($2,5 \times 10^5$).

2.2 Resultados y análisis

2.2.1 Background del ensayo

Blanco de PBS 1X: Al hacer la lectura de los 96 blancos de PBS se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 2-1

Interferencia del pozo vecino En la Tabla 2-2 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la interferencia del pozo vecino, se calcularon los promedios y las desviaciones estándar por columna de los resultados obtenidos para PBS 1X que rodea las microesferas, los cálculos señalados con el color según la concentración de microesferas corresponde al promedio de los 6 datos obtenidos de los pozos que rodean (pozos inmediatamente superiores e inferiores) a los que contienen las microesferas.

Tabla 2-1 Resultados de la evaluación de PBS 1X cómo blanco para ensayos con microesferas fluorescentes, Fluoroskan Ascent™ $\lambda_{em}538nm / \lambda_{ex}485nm$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1601	0,1482	0,1558	0,1520	0,1626	0,1347	0,1552	0,1582	0,1475	0,1448	0,1407	0,1371
B	0,1514	0,1458	0,1470	0,1336	0,1405	0,1291	0,1435	0,1472	0,1447	0,1362	0,1357	0,1320
C	0,1370	0,1531	0,1457	0,1557	0,1358	0,1280	0,1636	0,1507	0,1663	0,1586	0,1681	0,1443
D	0,1379	0,1512	0,3467	0,1439	0,1359	0,1312	0,1401	0,1546	0,1628	0,1535	0,1570	0,1398
E	0,1383	0,1511	0,1370	0,1404	0,1370	0,1343	0,1356	0,1444	0,1334	0,1372	0,1380	0,1327
F	0,1364	0,1587	0,1469	0,1550	0,1384	0,1647	0,1458	0,1534	0,1461	0,1432	0,1682	0,1340
G	0,1403	0,1499	0,1398	0,1381	0,1350	0,1359	0,1317	0,1345	0,1348	0,1333	0,1386	0,1356
H	0,1430	0,1615	0,1399	0,1490	0,1400	0,1355	0,1349	0,1648	0,1387	0,1416	0,1603	0,1383
Promedio					0,1468	Desviación estándar					0,0230	

Tabla 2-2 Resultados de la evaluación de la interferencia del pozo vecino, Fluoroskan Ascent™ $\lambda_{em}538nm / \lambda_{ex}485nm$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1512	0,1671	0,1547	0,1392	0,1566	0,1589	0,1433	0,1535	0,1496	0,1505	0,1607	0,1406
B	0,1399	0,1601	0,1663	0,1635	63,1300	62,1800	95,5300	0,1462	0,1622	0,1550	0,1604	0,1421
C	0,1452	0,1689	0,1728	0,1733	0,1570	0,1685	0,1708	0,1487	0,1712	0,1586	0,1623	0,1414
D	0,1376	0,1554	0,1574	0,1624	49,9100	58,4900	71,2900	0,1526	0,1683	0,1611	0,1448	0,1371
E	0,1402	0,1559	0,1607	0,1643	0,1596	0,1644	0,1562	0,1543	0,1584	0,1564	0,1559	0,1470
F	0,1496	0,1661	0,1639	0,1772	29,6500	28,6600	30,2200	0,1498	0,1872	0,1525	0,1465	0,1457
G	0,1423	0,1515	0,1442	0,1509	0,1417	0,1396	0,1482	0,1437	0,1414	0,1460	0,1384	0,1472
H	0,1470	0,1607	0,1518	0,1527	0,1533	0,1512	0,2177	0,1820	0,1448	0,1580	0,1564	0,1458
±												
X	0,1441	0,1607	0,1590	0,1604	0,1592	0,1628	0,1516	0,1539	0,1604	0,1548	0,1532	0,1434
S	0,0049	0,0063	0,009	0,0124	0,0099	0,0061	0,0087	0,0119	0,0152	0,0049	0,0088	0,0036

Tomando en cuenta el límite de detección calculado a partir de los datos reportados en la tabla 2-1 para PBS 1X de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección PBS 1X} = 0,1468 + 3(0,0230) = \mathbf{0,2158}$$

Se puede decir que no hay diferencias significativas entre los datos obtenidos para los blancos que rodean los pozos de alta concentración de microesferas fluorescentes con los obtenidos de los blancos (tabla 2-1) que pueda ser considerado como interferencia ya que como se muestra en la Tabla 2-2 ningún promedio por columna ni de los datos de los

pozos inmediatamente continuos a las microesferas alcanza el valor del límite de detección y se comporta más bien como el promedio de los blancos obtenido a partir de la lectura de 96 blancos independientes reportados en la tabla 2-1.

Background del ensayo. Al hacer la lectura de los 96 blancos de células U937+ PBS 1X se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 2-3. El promedio obtenido se encuentran aproximadamente una desviación estándar por debajo a los reportados para el PBS 1X lo que sugiere que a las longitudes de onda de análisis no hay interferencia en un aumento de fluorescencia aportada por las células. Los límites de detección y cuantificación a partir del blanco del ensayo son discutidos en el numeral 2.2.2.

Tabla 2-3 Resultados de la evaluación de 5×10^4 células en PBS 1X como blanco para ensayos con microesferas fluorescentes, Fluoroskan Ascent™ $\lambda_{em} 538nm / \lambda_{ex} 485nm$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1343	0,1283	0,1262	0,1204	0,1305	0,1686	0,1271	0,1302	0,1243	0,1320	0,1247	0,1329
B	0,1246	0,1200	0,1247	0,1194	0,1249	0,1514	0,1250	0,1254	0,1250	0,1278	0,1275	0,1547
C	0,1252	0,1258	0,1230	0,1266	0,1217	0,1427	0,1277	0,1238	0,1270	0,1220	0,1371	0,1275
D	0,1273	0,1228	0,1252	0,1216	0,1202	0,1219	0,1213	0,1247	0,1201	0,1763	0,1245	0,1298
E	0,1231	0,1277	0,1221	0,1238	0,1201	0,1213	0,1199	0,1218	0,1242	0,1266	0,1298	0,1292
F	0,1262	0,1253	0,1216	0,1259	0,1217	0,1284	0,1241	0,1231	0,1255	0,1273	0,1300	0,1312
G	0,1274	0,1248	0,1235	0,1209	0,1198	0,1256	0,1186	0,1230	0,1267	0,1248	0,1260	0,1361
H	0,1287	0,1269	0,2643	0,1227	0,1249	0,1251	0,1252	0,1301	0,1231	0,1332	0,1300	0,1294
Promedio				0,1287				Desviación estándar	0,0165			

2.2.2 Límite de detección y cuantificación de microesferas

El cálculo del límite de detección y cuantificación (Q) se hizo de la siguiente manera a partir de los datos presentados en la Tabla 2-3

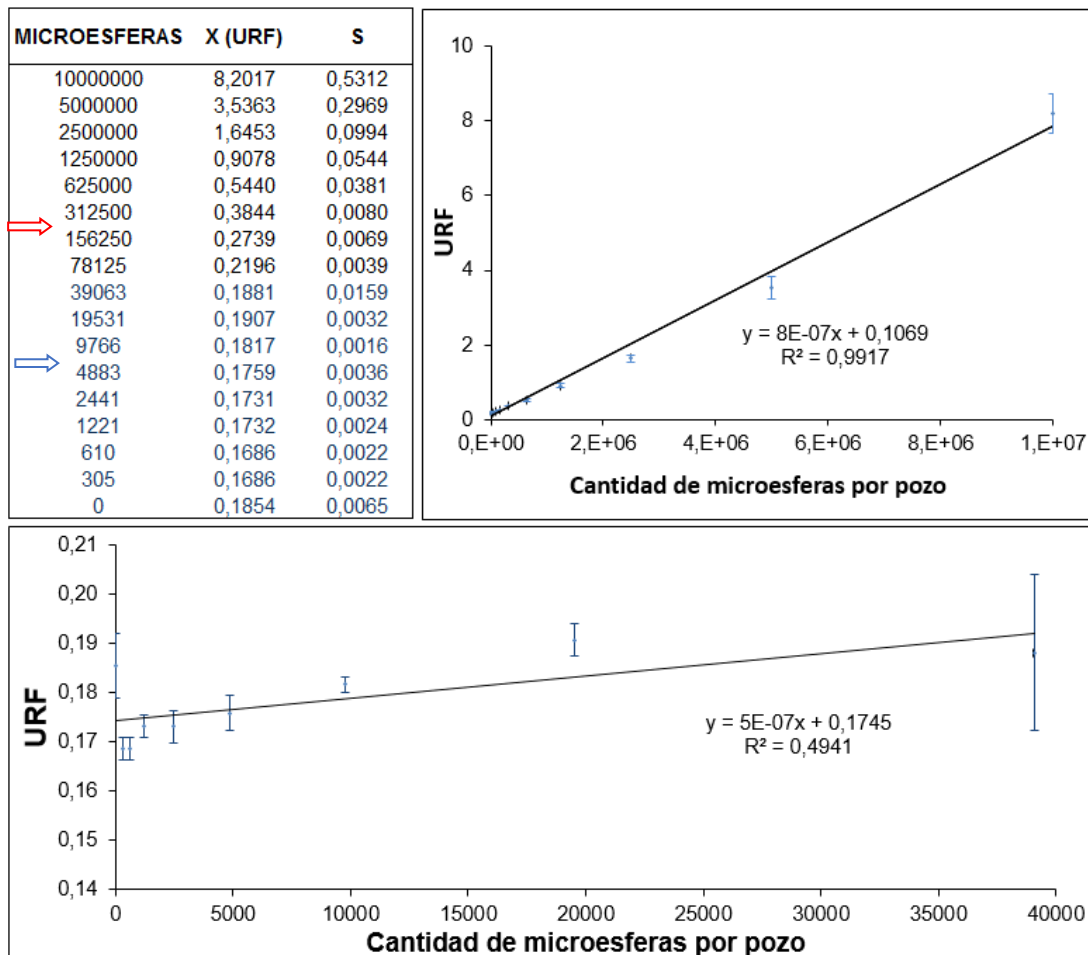
$$\text{Límite de detección BLANCO} = 0,1287 + 3(0,0165) = \mathbf{0,1780}$$

$$\text{Límite de cuantificación BLANCO} = 0,1287 + 10(0,0165) = \mathbf{0,2940}$$

Los resultados obtenidos para la curva de microesferas en el rango de trabajo para ensayos de internalización se presentan en la figura 2-2. La gráfica del total de los datos (superior derecha) muestra una tendencia lineal con un factor de correlación de 0,99 para

su regresión lineal, para ampliar la tendencia de la recta en cantidades menores a 5×10^5 de microesferas, se hizo la gráfica correspondiente a los valores inferiores y que se muestran en la tabla de la figura en color azul. El límite de detección corresponde a aproximadamente 10.000 microesferas (flecha azul) y el de cuantificación a aproximadamente 200.000 microesferas (flecha roja) lo que sugiere que en un ensayo con 50.000 células cada una debe internalizar por lo menos 4 microesferas para poder tener un dato válido de X (Unidades relativas de fluorescencia, URF) en el límite de cuantificación, es decir, que puede ser necesaria una cantidad mayor de células para el ensayo. En la figura es evidente también que las desviaciones estándar (S) aumentan a medida que aumenta el número de microesferas.

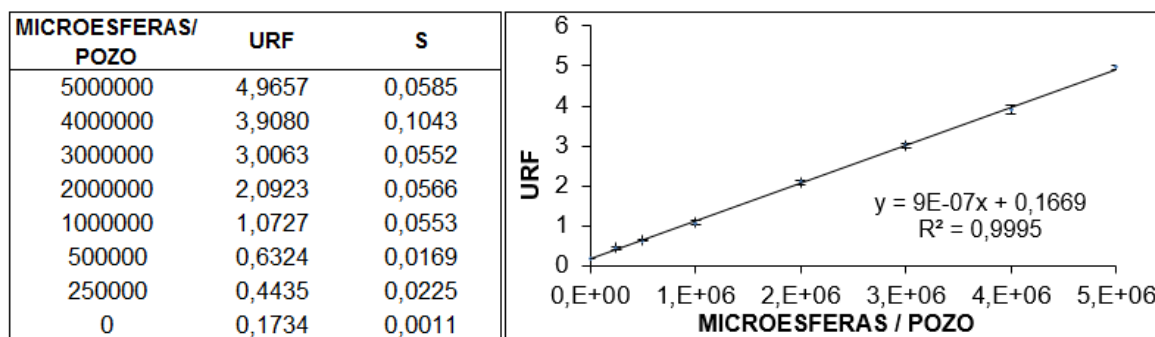
Figura 2-2 Determinación del límite de detección y de cuantificación de microesferas fluorescentes



2.2.3 Cuantificación de microesferas fagocitadas caja de 96 pozos

El ensayo de microesferas fagocitadas fue realizado en cajas de 96 pozos con 5×10^4 células adheridas por pozo, conociendo la probabilidad de fagocitosis de hasta 16 microesferas por célula según reporte del fabricante [90] La curva de concentraciones obtenidas se presenta en la figura 2-3, corresponde a una línea con un excelente índice de correlación de 0,9995

Figura 2-3 Curva de concentraciones de microesferas fluorescentes sobre células U937 en PBS 1X en caja de 96 pozos



La ecuación de la recta mostrada en la figura 2-3 fue utilizada para medir la cantidad de perlas que habían entrado a las células despejando en la ecuación los datos obtenidos de fluorescencia. En la Tabla 2-4 se reportan los promedios de lectura después de los lavados de las células en relación a las microesferas que se pusieron inicialmente, el MOI al que corresponde y el cálculo de microesferas fagocitadas:

$$\text{Perlas fagocitadas}(X) = (\text{URF} - 0,1669) / 9 \times 10^{-7}$$

Desafortunadamente los valores de fluorescencia son muy bajos y pasan con dificultad el límite de detección (señalado con flecha azul), además se ubican entre los valores dados para 0 y la primera concentración de microesferas lo que no es deseable en la confianza de los datos que puedan ser obtenidos a partir de allí, se prefiere que los datos se ubiquen hacia el centro de la línea de regresión lineal. Sin embargo es evidente un

incremento de la fluorescencia y por ende de la cantidad de microesferas fagocitadas haciendo posible diferenciar cuantitativamente un ensayo de otro para los MOI 40 a 100.

La caja de ensayo fue observada en el microscopio óptico posterior a la lectura y se ven células desprendidas (muertas) a las tres concentraciones más altas. Definitivamente es necesario trabajar con un mayor número de células y mantener un MOI menor a 60 microesferas por célula.

Tabla 2-4 Cuantificación de microesferas fagocitadas – 96 pozos

Microesferas / pozo	MOI	Microesferas fagocitadas		
		URF	S	(URF-0,1669)/9E-07
→ 5000000	100	0,3076	0,0446	157370
4000000	80	0,2628	0,0179	107593
3000000	60	0,2282	0,0388	69111
→ 2000000	40	0,2078	0,0137	46407
1000000	20	0,1802	0,0137	15741
500000	10	0,1529	0,0119	-14556
250000	5	0,1828	0,0162	18611
0	0	0,1507	0,0038	-16963

2.2.4 Cuantificación de microesferas fagocitadas en caja de 24 pozos

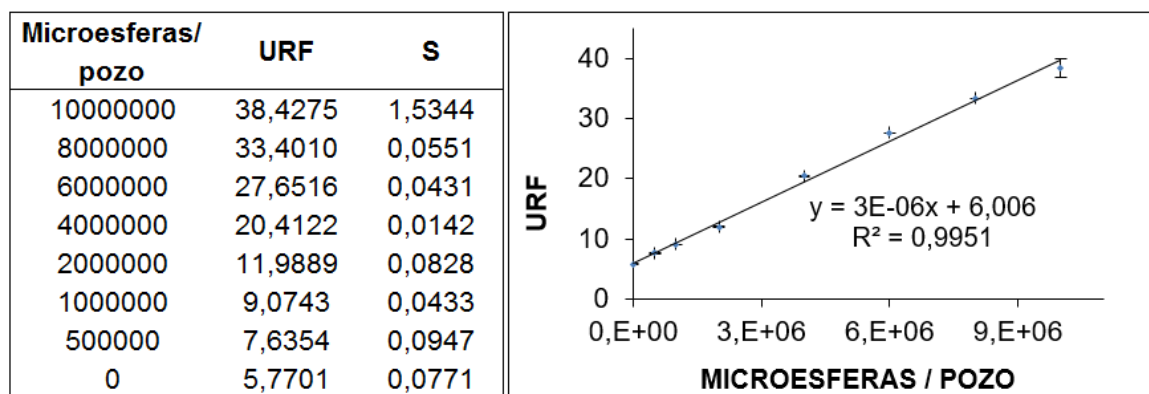
Se adhirieron $2,5 \times 10^5$ células por pozo, se hizo el cálculo del límite de detección y cuantificación del sistema células PBS1X. El equipo hace 37 lecturas por pozo cubriendo el área superficial de éste; los datos obtenidos se registran en el anexo A, un ejemplo se muestra en la tabla 2-7.

La Tabla 2-5 muestra la suma de los resultados por pozo para la evaluación de background con especificaciones de límite de detección y cuantificación calculado como se describió para caja de 98 pozos.

Tabla 2-5 Determinación de los límites de lectura en cajas de 24 pozos

	1	2	3	4	5	6
A	5,9352	5,9714	5,9977	5,8699	5,9602	6,0353
B	5,8872	5,8886	5,7925	5,8773	5,8209	5,9060
C	5,9102	5,8243	5,8731	5,7967	5,8997	5,9859
D	5,9253	5,9307	5,9038	5,9150	5,8457	5,9996
Promedio				5,9063		
Desviación estándar				0,0645		
Límite de detección				6,0999		
Límite de cuantificación				6,5514		

Se adicionaron los MOI correspondientes como se especifica en la Tabla 2-6 y se dejó en incubación durante 2 horas para que las células fagocitaran las microesferas, pasado ése tiempo se hizo la lectura en el fluorómetro y se obtuvieron los datos para la curva de concentraciones con la que se obtuvo la ecuación de la recta mostrada en la figura 2-4

Figura 2-4 Curva de concentraciones de microesferas fluorescentes sobre células U937 en PBS 1X en caja de 24 pozos.

Después de hacer lavados para retirar las microesferas que quedan sin fagocitar se hicieron los cálculos para determinar el número de microesferas fagocitadas. Los datos se presentan en la Tabla 2-5. La cantidad de microesferas fagocitadas por pozo que corresponden al límite de detección aproximado es de 47000, resultado de poner 1×10^6 microesferas (flecha azul) y el de cuantificación es 200.000, resultado de poner 2×10^6 de microesferas (flecha roja). Los datos obtenidos en URF para microesferas fagocitadas quedan mejor distribuidos en relación a la curva de concentraciones de microesferas y

los valores son válidos cuantitativamente. Con una mayor cantidad de células es posible trabajar un MOI que no sea letal para las células.

Tabla 2-6 Cuantificación de microesferas fagocitadas- 24 pozos

Microesferas/ pozo	MOI	Microesferas fagocitadas		
		URF	S	(URF-0,6006)/3E-06
10000000	40	10,9702	0,3106	1654722
8000000	32	9,6502	0,1941	1214744
6000000	24	8,6442	0,4523	879389
4000000	16	7,8507	0,1583	614900
→ 2000000	8	6,6077	0,0779	200567
→ 1000000	4	6,1492	0,0581	47722
500000	2	5,8917	0,1034	-38111
0	0	5,6827	0,0587	-107767

Sin embargo hay algunos aspectos de los resultados obtenidos por pozo en las cajas de 24 pozos que se deben considerar:

- Los valores obtenidos para 0 y 50.000 microesferas están significativamente por debajo de los obtenidos en la caja control del background quizá debido a que en la sumatoria de los 37 datos por pozo no se tiene en cuenta las desviaciones dadas de entre éstos.

Tabla 2-7 Ejemplo de lectura en pozo de caja de 24 para un blanco de células PBS 1X

0,1485	0,1475	0,1459				
0,1515	0,1588	0,1605	0,1573	0,1549		
0,1456	0,1571	0,1652	0,1641	0,1618	0,1588	0,1498
0,1515	0,1668	0,1644	0,1652	0,1624	0,1596	0,1561
0,1499	0,1546	0,1569	0,1589	0,1588	0,1585	0,1536
0,1513	0,1501	0,1522	0,1534	0,152		
0,1485	0,1493	0,1491				
Promedio				0,1554		
Desviación estándar				0,0059		

- Los valores negativos en cantidad de microesferas calculadas a partir de la ecuación de la recta corresponden a que el punto de corte con el eje y en la curva de concentraciones de microesferas es mayor al blanco obtenido en esa lectura, lo que no se espera es que ese valor supere el valor del límite de detección, y está ocurriendo.
- Los valores de URF obtenidos por cada lectura de las 37 que se hace en cada pozo son muy similares a los obtenidos en 96 pozos cuando se trabaja con 5×10^4 células como se muestra en la Tabla 2-6 y dan como resultado también muy bajos valores de URF.
- Si se procesan los datos teniendo en cuenta el promedio o la mediana de cada pozo en vez de la sumatoria de los datos por pozo, se obtienen los resultados de límite de detección y cuantificación como se muestran en las tablas 2-8 y 2-9.

Tabla 2-8 Reporte de la mediana por pozo en cajas de 24 pozos y cálculo de los límites de detección y cuantificación

	1	2	3	4	5	6
A	0,1602	0,1608	0,1624	0,1584	0,1609	0,1627
B	0,1587	0,1584	0,1552	0,1595	0,1568	0,1601
C	0,1595	0,1569	0,1581	0,1558	0,1598	0,1610
D	0,1609	0,1601	0,1594	0,1594	0,1585	0,1610
Promedio				0,1594		
Desviación estándar				0,0019		
Límite de detección				0,1650		
Límite de cuantificación				0,1782		

Tabla 2-9 Reporte del promedio por pozo en cajas de 24 pozos y cálculo de los límites de detección y cuantificación

	1	2	3	4	5	6
A	0,1604	0,1614	0,1621	0,1586	0,1611	0,1631
B	0,1604	0,1614	0,1621	0,1586	0,1611	0,1631
C	0,1597	0,1574	0,1587	0,1567	0,1595	0,1618
D	0,1604	0,1614	0,1621	0,1586	0,1611	0,1631
Promedio				0,1606		
Desviación estándar				0,0018		
Límite de detección				0,1659		
Límite de cuantificación				0,1783		

- La cantidad de microesferas fagocitadas por pozo que corresponden al límite de detección aproximado es de 47000 después de poner un 1×10^6 microesferas (flecha azul) y el de cuantificación es 200.000 luego de poner 2×10^6 microesferas (flecha roja) como se obtuvo para el caso de análisis de la suma de los resultados (tablas 2-10 y 2-11) según las ecuaciones de la regresión lineal dadas:

A partir de la media del pozo: $y = 9E-08x + 0,1618$ con $R^2 = 0,9944$

A partir del promedio del pozo: $y = 9E-08x + 0,1623$ con $R^2 = 0,9951$

Tabla 2-10 Cálculo de microesferas fagocitadas por pozo en cajas de 24 a partir de la mediana de los datos por pozo

Microesferas/pozo	MOI	Microesferas fagocitadas		
		URF	S	(URF-0,1618)/9E-08
10000000	40	0,2969	0,0130	1501111
8000000	32	0,2624	0,0083	1118148
6000000	24	0,2350	0,0119	813704
4000000	16	0,2165	0,0058	608148
2000000	8	0,1798	0,0084	199630
1000000	4	0,1660	0,0052	47037
500000	2	0,1589	0,0122	-32593
0	0	0,1533	0,0043	-94074

Tabla 2-11 Cálculo de microesferas fagocitadas por pozo en cajas de 24 a partir del promedio de los datos por pozo

Microesferas/pozo	MOI	Microesferas fagocitadas		
		URF	S	(URF-0,1623)/9E-08
10000000	40	0,2965	0,0084	1491011
8000000	32	0,2608	0,0052	1094635
6000000	24	0,2336	0,0122	792513
4000000	16	0,2122	0,0043	554234
2000000	8	0,1786	0,0021	180961
1000000	4	0,1662	0,0016	43263
500000	2	0,1592	0,0028	-34064
0	0	0,1536	0,0016	-96817

- Pero, a pesar que el número de microesferas sea mucho mayor en cajas de 24 pozos comparado con el de las cajas de 96 pozos, los valores de cada lectura por pozo obtenidos se encuentran muy cerca del blanco de células y el límite de detección es mucho mayor que en las cajas de 96 pozos.
- En cajas de 24 pozos se maneja un volumen muy grande de datos comparado con cajas de 96 pozos, se propone trabajar las muestras en cajas de 24 pozos con $2,5 \times 10^5$ y desprender las células-microesferas para ser leídas en cajas de 96 pozos.

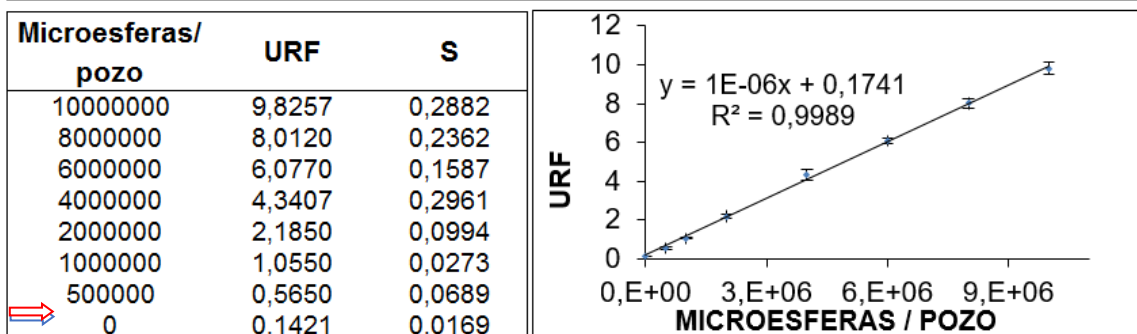
2.2.5 Microesferas en cajas de 96 pozos con $2,5 \times 10^5$ células

Se hizo la lectura de una caja de 96 pozos con $2,5 \times 10^5$ células por pozo en PBS 1X sin adherir para evaluar si se cambian los límites de detección y cuantificación con respecto a 5×10^4 células adheridas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2-5.

Figura 2-5 Evaluación de los límites de detección y cuantificación para $2,5 \times 10^5$ células re-suspendidas en cajas de 96 pozos

Datos del background para $2,5 \times 10^5$ células en PBS 1X

Promedio	0,1365583
Desvest	0,0105216
Limite cuantificacion	0,3015583
Limite detección	0,1860583



Es evidente que los valores del background no son significativamente superiores para $2,5 \times 10^5$ células con relación a los presentados en la figura 2-2 5×10^4 células, y que guiados por esa misma figura se podría decir que los límites de detección cambian de 10.000 microesferas (flecha azul) a 40.000, pero el límite de cuantificación en cajas de 96 pozos es aproximadamente 200.000 microesferas (flecha roja) independiente del número de células con que se trabaje. Los límites están indicados en la figura 2-5 con

las flechas roja y azul según corresponde. Se puede deducir que con éste sistema es posible detectar y cuantificar microesferas fagocitadas hasta del orden de una microesfera por célula.

2.3 Conclusión

Es posible cuantificar microesferas fagocitadas a partir de 200000 microesferas por pozo, por esta razón es necesario trabajar con un número de células superior, los resultados obtenidos sugieren que los ensayos se realicen en cajas de 24 pozos que permiten la adhesión de hasta $2,5 \times 10^5$ células por pozo y para facilitar el proceso de análisis y mantener los límites de detección y cuantificación, las células sean desprendidas y puestas en cajas de 96 pozos.

3. Marcación fluorescente de *Mycobacterium smegmatis*

Para el desarrollo y estandarización del método fluorométrico se propuso la evaluación de tres fluoróforos reconocidos y utilizados en marcación de micobacterias: 1. Naranja de acridina (NA) utilizado como colorante catiónico selectivo para los ácidos nucleicos [91], anteriormente evaluado análisis por citometría de flujo [49] , 2. fluoresceína de sodio de unión a proteínas de citosol y cuyos derivados han sido utilizados para evaluación de viabilidad celular de micobacterias [92, 93]; y 3. rodamina B de unión a ácidos micólicos de la envoltura celular micobacteriana [94] que ha sido ampliamente reportada en tinciones de muestras fijadas en lámina y en estudios enfocados en el reconocimiento de micobacterias generalmente en muestras de pacientes. Se propone que el proceso de estandarización del fluoromarcaje se haga con *M. smegmatis* (no patogénica, de rápido crecimiento) como modelo con el fin de reducir la manipulación del patógeno *M. tuberculosis* H37Rv. Los fluoróforos, equipos y cepas micobacterianas, así como todas las condiciones de bioseguridad requeridas para la manipulación de micobacterias fueron financiados y disponibles en la FIDIC. Se evaluaron concentraciones de los diferentes fluoróforos, tiempos de incubación, temperatura y viabilidad celular.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Cultivo de *M. smegmatis*

M. smegmatis ATCC 14468 se cultivó a 37°C con agitación constante en medio líquido Middlebrook 7H9 y agar Middlebrook 7H10 (Difco), ambos suplementados con albumina, dextrosa y catalasa (ADC). Se realizaron tinciones Ziehl Neelsen y Gram como control.

3.1.2 Fluoromarcaje de *M. smegmatis*

Se realizaron diferentes experimentos que permitieron diseñar una metodología para la necesaria estandarización del marcate de las micobacterias en soluciones de Naranja de

Acridina, fluoresceína de sodio y rodamina B, en búsqueda de las concentraciones de los fluoróforos y tiempos de incubación óptimos para la marcación teniendo en cuenta la viabilidad de la micobacteria. Todas las soluciones fueron homogenizadas haciendo 4-5 pases por aguja de calibre 30 en jeringa de insulina.

Para la cuantificación fluorométrica o por citometría de flujo, las micobacterias fluoromarcadas fueron centrifugadas durante 15min a 13000rpm, re suspendidas agitando vigorosamente en 200 μ L de solución de fijación (p- formaldehido 4%, glutaraldehido 0,5% pH 7,2), finalmente incubadas a 4°C durante toda la noche. El volumen total fue transferido a un pozo de cajas de 96 pozos y se hizo la lectura en los respectivos fluorómetros. Se definió la mejor concentración de cada fluoróforo como la concentración donde se obtiene mayor viabilidad celular y mayor cantidad de micobacteria fluoromarcada según análisis en citómetro de flujo en un BD FACSCanto II. Los tiempos necesarios para el fluoromarcaje también fueron optimizados.

Los procedimientos llevados a cabo para los diferentes fluoróforos se especifican a continuación:

3.1.2.1 Fluoromarcaje con fluoresceína de sodio

Generalmente se usan derivados de fluoresceína de baja polaridad como el diacetato de fluoresceína (FDA) [73], Isotiocianato de fluoresceína (FITC) [51, 95] y 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA/SE) [92] para tinción de micobacterias, sin embargo se propone el uso de la sal sódica de fluoresceína debido a que su costo es significativamente inferior a sus derivados.

Se preparó un stock de fluoresceína de sodio a 1mg/mL en PBS 1X y se esterilizó por microfiltración a través de membranas de 0,2 μ m. Se hicieron diluciones a 100 μ g/mL en PBS 1X y se pusieron 1x10⁶ UFC de *M. smegmatis* por tubo eppendorf de 1,5mL, se dejaron en incubación a temperatura ambiente y se evaluó la tinción por coloración verde visible del pellet micobacteriano, se hicieron observaciones cada 6 horas, la tinción de la micobacteria fue visible a partir de 48 horas de incubación; al realizar los lavados para retirar el fluoróforo sobrenadante, la micobacteria pierde visiblemente la coloración

entonces se propone hacer el mismo procedimiento pero en solución de glicerol al 50% en PBS 1X para intentar ayudar a la entrada del fluoróforo con un ambiente hidrofóbico.

El fluoromarcaje fue analizado por citometría de flujo después de 24 horas de incubación a temperatura ambiente de las muestras lavadas y fijadas en p-formaldehído-glutaraldehído, se leyeron en citómetro de flujo BD FACSCanto II canal de fluorescencia FITC.

3.1.2.2 Fluoromarcaje con naranja de acridina

La marcación de la bacteria se hizo en 7 diluciones del fluoróforo (en PBS 1X) teniendo en cuenta las condiciones de concentración (3×10^{-4} %), tiempo (10 minutos) y temperatura (37°C) reportadas para N.A [49]. Se ensayaron 3 concentraciones sucesivas 3 veces mayores y menores del valor de referencia del fluoróforo manteniendo constante la cantidad de bacteria (1×10^6 UFC/ mL) y el periodo de incubación fue de 10 min a 37°C. Se dejó un control de bacteria sin NA considerando la pérdida de material celular por causa de las centrifugaciones y lavados, que fue tomado como referencia de viabilidad celular.

Se hicieron lavados con PBS 1X con centrifugaciones de 10min a 13000 rpm y 4°C, teniendo cuidado de descartar cada vez la totalidad del sobrenadante haciendo uso de una micro pipeta hasta garantizar que no queda fluoróforo sobrenadante que pueda interferir haciendo tinción de las células blanco. Se realizaron los lavados suficientes para tener sobrenadantes translúcidos, éstos fueron filtrados por membrana de 0,2µm para ser evaluados por fluorometría. Las lecturas de fluorescencia se realizaron en el fluorómetro Fluoroskan Ascent™ λ_{em} 538nm / λ_{ex} 485nm para el NA, y se determinó la cantidad de lavados suficientes para eliminar el fluoróforo completamente de los sobrenadantes.

Los pellet de micobacterias marcadas fueron resuspendidos en PBS 1X a una concentración final de 100UFC /50µL partiendo de la concentración inicial, calculando pérdida de masa celular del 25% por lavados (demostrado por siembra de sobrenadantes en 7H10-ADC). Se sembraron 50µL de cada una de las suspensiones micobacterianas en medio 7H10 suplementado con ADC y se incubaron a 37°C. El conteo de colonias se hizo a partir de los 4 días. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Se evaluaron diferentes tiempos de marcación con el fin de optimizar la tinción, para ésta se puso la misma cantidad de *M. smegmatis* (en tubos cónicos de 1,5mL con la concentración constante de fluoróforo que se determinó como la mejor en el experimento anterior en un volumen final de 1mL. Esta vez se llevaron a cabo incubaciones de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos a 37°C, se dejó un control sin marcar para comparar viabilidad. Las muestras fueron sembradas en medio 7H10 y fijadas como se describe en el numeral anterior.

3.1.2.3 Fluoromarcaje con Rodamina B

Se prepararon soluciones de Rodamina B en 55% Glicerol en agua destilada, con 1,1g Auramina, 0,56g Rodamina y 7,4mL de fenol 10% en un volumen final de 100mL y se hicieron las siguientes variaciones: A. Solución completa. B. Solución sin fenol C. Solución sin Auramina, D. Solución sin Auramina ni fenol con el fin de evaluar si es posible una marcación fluorescente sin el uso de fenol ni auramina que son compuestos presentes en las soluciones usadas para tinción fluorescente de extendidos de micobacterias.

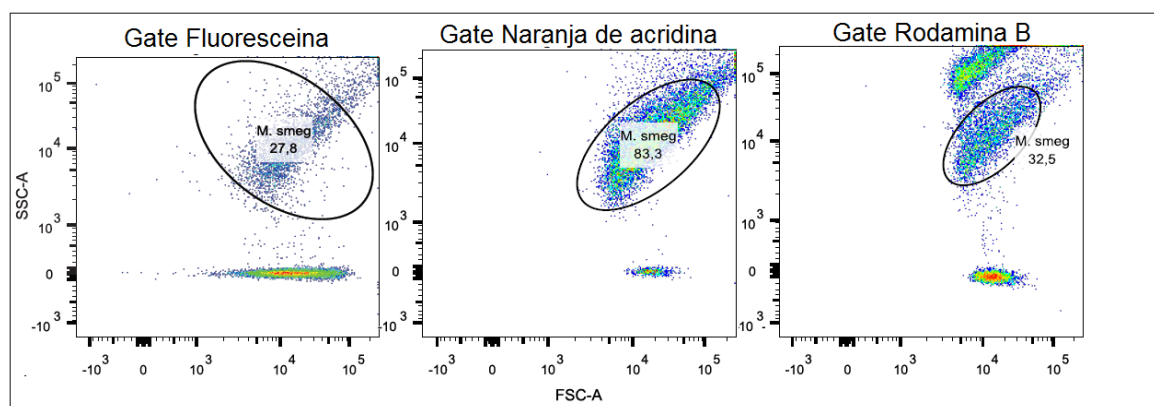
Se hicieron tinciones de extendidos de *M. smegmatis* utilizando permanganato de potasio como contraste siguiendo la metodología descrita [96, 97], las muestras se vieron en un microscopio de fluorescencia Olympus bx51.

La solución D fue usada en marcación de micobacterias viables en diluciones con factor de dilución (Fd) de 1:0, 1:1, 1:2, 1:9 y 1:99 en agua destilada, se pusieron 1×10^6 UFC de *M. smegmatis* en cada solución y se incubaron a 37°C durante 40min. Se hicieron lavados con PBS 1x, evaluación de los sobrenadantes por fluorimetría y se sembró en medio Middlebrook 7H10 suplementado con ADC. Para estandarizar tiempos de incubación se llevaron a cabo incubaciones de 30, 60, 90, 120 y 150 minutos a 37°C. Las muestras fueron leídas en fluorómetro multi- canal (Tecan Genios) y citómetro de flujo BD FACSCanto II canal de fluorescencia PE.

3.2 Resultados y análisis

La figura 3-1 muestra las poblaciones seleccionadas para los análisis por citometría de flujo correspondiente a *M. smegmatis* marcada con los diferentes fluoróforos, se leyeron un total de 30000 eventos por muestra y se determinaron las condiciones de tiempo y concentraciones de los fluoróforos para una buena marcación, haciendo seguimiento en citómetro de flujo.

Figura 3-1 Poblaciones para análisis en citómetro de *M. smegmatis* marcada con diferentes fluoróforos



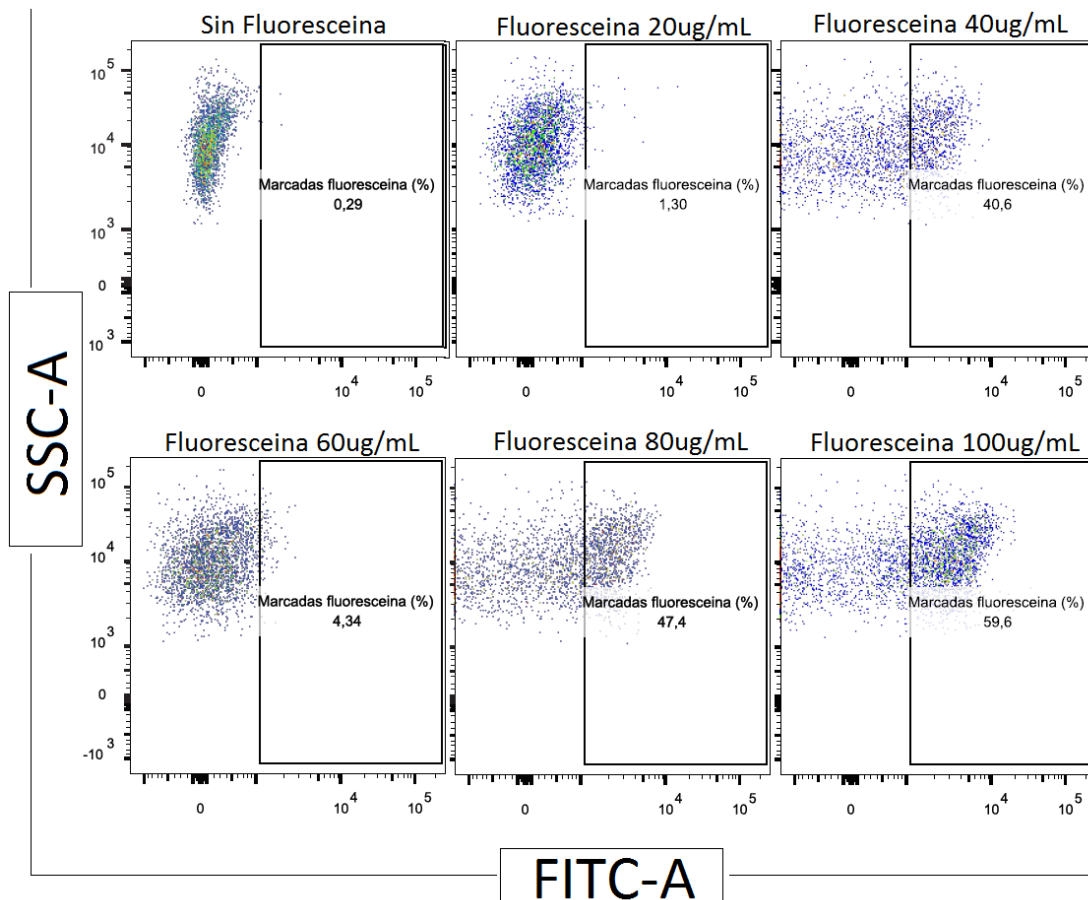
3.2.1 Fluoromarcaje con fluoresceína de sodio

El marcaje con diferentes concentraciones de fluoresceína de sodio fue más exitoso al utilizar una solución de glicerol al 50% en PBS1X, los resultados se muestran en la figura 3-2. El recuadro correspondiente al porcentaje de micobacterias marcadas fue seleccionado a partir de un control de micobacterias no marcadas como se muestra en la figura y hay un porcentaje creciente de micobacterias fluoro-marcadas a medida que aumenta la concentración de fluoresceína, sin embargo no se logra un porcentaje cercano al 100%. Fueron necesarios 3 lavados con PBS 1X para retirar el exceso de fluoresceína hasta tener una solución visiblemente translúcida.

Se tomaron 600 μ L de los sobrenadantes micro-filtrados por membrana de 0,2 μ m del último lavado previo a la fijación de las micobacterias con el p-formaldehído y fueron

distribuidos en 3 pozos en cajas de 96 pozos para cada concentración y por bioseguridad se adicionaron 100 μ L de la solución fijadora por pozo; en la lectura obtenida en el fluorómetro Fluoroskan Ascent™ $\lambda_{em}538nm / \lambda_{ex} 485nm$ se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 3-1. Los valores de fluorescencia obtenidos (URF) para los sobrenadantes reflejan todavía la presencia del fluoróforo teniendo hasta 9 URF en la máxima concentración ensayada, lo que sugiere que es necesario hacer uno o dos lavados adicionales y que deben ser incrementados a medida que se aumenta la concentración de fluoresceína para el marcaje si se quiere evaluar la posibilidad de un marcaje del 100% de las micobacterias, lo que no resulta favorable en costos de tiempo de ensayo, considerando que cada lavado adicional son por lo menos 15 minutos más de ensayo y que cada lavado involucra pérdida de masa micobacteriana.

Figura 3-2 Seguimiento por citometría de flujo del marcaje de *M. smegmatis* con fluoresceína de sodio.



En el conteo de colonias realizado para cada una de las concentraciones ensayadas, no se observó pérdida de viabilidad debida a la concentración de fluoresceína con relación al control ya que se obtienen valores aproximados de 2 o 3 UFC por caja de cultivo en todos los casos. Teniendo en cuenta que se esperaba un conteo aproximado de 100 UFC por caja de cultivo, se puede pensar que el largo periodo de marcaje a temperatura ambiente en un buffer sin nutrientes puede provocar la muerte de las micobacterias.

Tabla 3-1 Evaluación de los sobrenadantes de fluoresceína posteriores a la marcación a diferentes concentraciones del fluoróforo

Fluoresceína Inicial (ug/mL)	URF medidas después de los lavados			Promedio (URF)	S
0	0,2234	0,2565	0,2760	0,2520	0,0266
20	0,4036	0,4242	0,3623	0,3967	0,0315
40	2,7220	3,5300	3,0130	3,0883	0,4092
60	0,5973	0,6311	0,4752	0,5679	0,0820
80	3,7180	5,3840	5,7530	4,9517	1,0842
100	9,0520	9,3090	9,6120	9,3243	0,2803

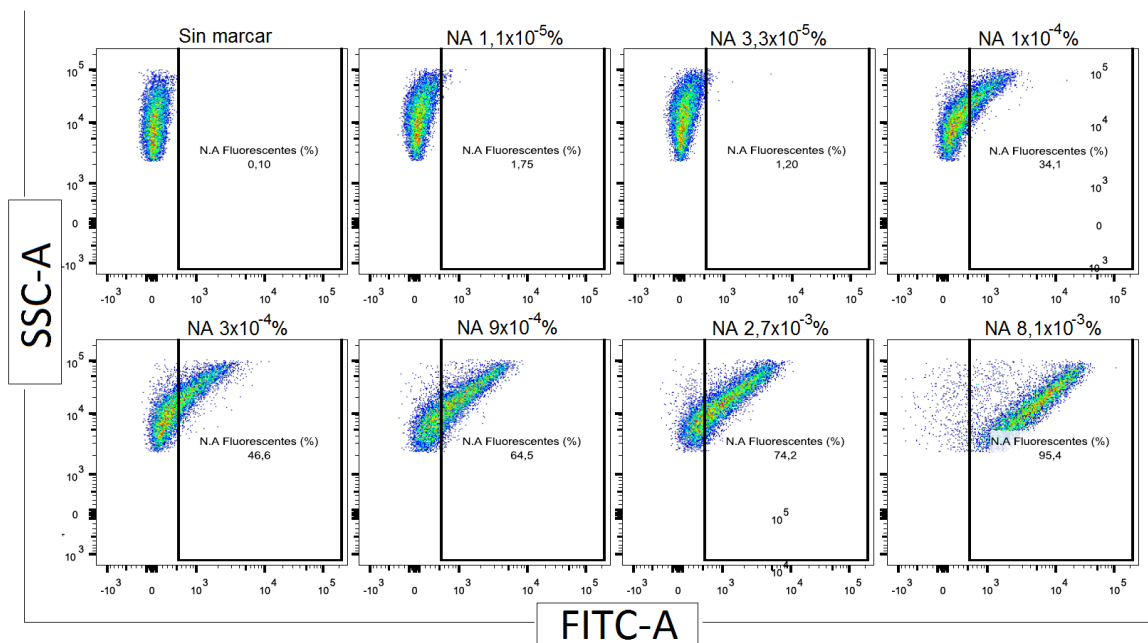
3.2.2 Fluoromarcaje con Naranja de Acridina

Los resultados obtenidos por citometría de flujo para el marcaje fluorescente con soluciones a diferentes concentraciones (%p/p) de NA en un periodo de incubación de 10 min a 37°C se muestran en la figura 3-3, los resultados obtenidos para $3 \times 10^{-4}\%$ coinciden con los reportados anteriormente bajo las mismas condiciones [49], no hay marcación a concentraciones menores de $3 \times 10^{-4}\%$ y se tiene una marcación del 95,4% cuando se usa a la mayor concentración ensayada.

Para la evaluación de los sobrenadantes del último lavado previo a la fijación de las micobacterias (se hicieron 3 lavados con 1,5mL), se tomaron 600µL y se micro-filtraron por membrana de 0,2µm, el volumen fue distribuido en 3 pozos en cajas de 96 pozos para cada concentración y por bioseguridad se adicionaron 100 µL de la solución fijadora por pozo; los resultados obtenidos del análisis en el fluorómetro son presentados en la tabla 3-2; también se incluye la lectura en fluorómetro de 100 µL que corresponden a la

mitad del total de micobacterias marcadas en cada concentración y las aproximaciones de UFC obtenidas en las placas de medio Middlebrook 7H10, las cajas se llenaron demasiado y fue difícil definir exactamente las colonias, sin embargo se hizo una aproximación con símbolos que permite evaluar la viabilidad dependiendo de la concentración de fluoróforo utilizado de la siguiente manera “+” representa una caja llena pero con bordes de colonias bien definidos y algunos espacios; “++” caja llena pero con bordes de colonias bien definidos y “+++” caja totalmente llena y se dificulta ver las uniones entre colonias. No se considera citotóxica ninguna de las concentraciones evaluadas.

Figura 3-3 Seguimiento por citometría de flujo del marcaje de *M. smegmatis* con Naranja de acridina.



Con el fin de optimizar el tiempo de marcación utilizando una concentración ligeramente menor a la máxima ensayada que corresponde a una dilución práctica de 1/10 del stock se hizo la marcación con NA $6,0 \times 10^{-3}$ % con periodos de incubación de 10min hasta 60min. Los resultados obtenidos por citometría de flujo se muestran en la figura 3-4, el tiempo óptimo para la marcación es de 10min y el porcentaje obtenido es ligeramente mayor que el reportado para $8,1 \times 10^{-3}$ %, a mayores tiempos se tienen menores

porcentajes de marcación puede ser porque el fluoróforo está expuesto a la temperatura de 37°C durante más tiempo y éste es un aspecto de desactivación de la fluorescencia por conversión interna [70], sería bueno evaluar éste fenómeno en investigaciones futuras.

Tabla 3-2 Evaluación de viabilidad y sobrenadantes de NA posteriores a la marcación a diferentes concentraciones del fluoróforo

NA puesta (%P/P)	URF micobacterias marcadas	URF sobrenadantes			Promedio (URF)	S	UFC
0,0,E+00	0,1094	0,1617	0,1527	0,1636	0,1593	0,0058	+
1,1,E-05	5,7690	0,1387	0,1565	0,1552	0,1501	0,0099	++
3,3,E-05	2,3910	0,1410	0,1439	0,1437	0,1429	0,0016	+++
1,0,E-04	13,2700	0,1555	0,1448	0,1539	0,1514	0,0058	++
3,0,E-04	22,2100	0,1579	0,1444	0,1442	0,1488	0,0079	+++
9,0,E-04	27,3000	0,1541	0,1541	0,1432	0,1505	0,0063	++
2,7,E-03	35,3000	0,1489	0,1426	0,1610	0,1508	0,0094	+
8,1,E-03	46,3800	0,1441	0,1445	0,1547	0,1478	0,0060	+++

Ya que fue posible obtener una marcación de fluorescencia de casi 100% en un corto periodo de tiempo y sobrenadantes libres de fluoróforo con sólo 3 lavados, como se demuestra en los resultados de fluorimetría de los sobrenadantes (tabla 3-3), se hizo la determinación de los límites de detección y cuantificación para la micobacteria marcada, y fueron determinados a partir de la lectura de una caja de 96 pozos con solución de fijación en PBS 1X y $2,5 \times 10^5$ células. Los resultados se muestran en la figura 3-5, los límites de cuantificación y detección se señalan con una flecha roja y azul respectivamente, según éste resultado es posible cuantificar a partir de 1×10^6 micobacterias y detección desde aproximadamente 150.000 UFC..

Figura 3-4 Seguimiento por citometría de flujo de la marcación con NA $6,0 \times 10^{-3}\%$ en diferentes tiempos de incubación

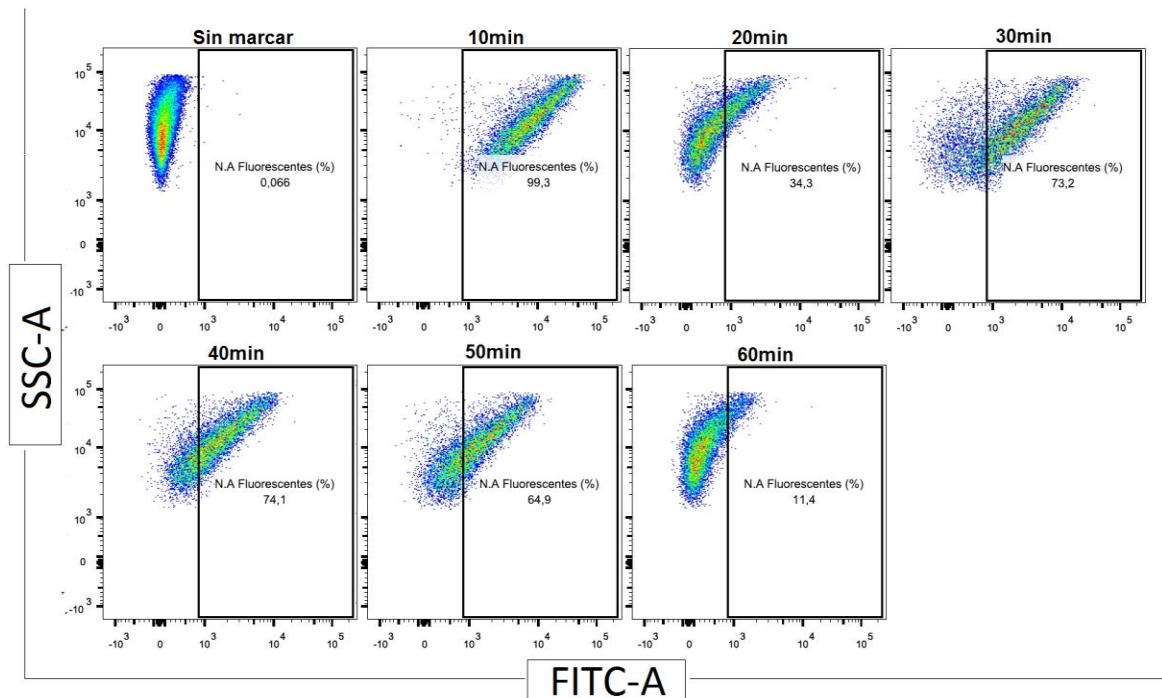
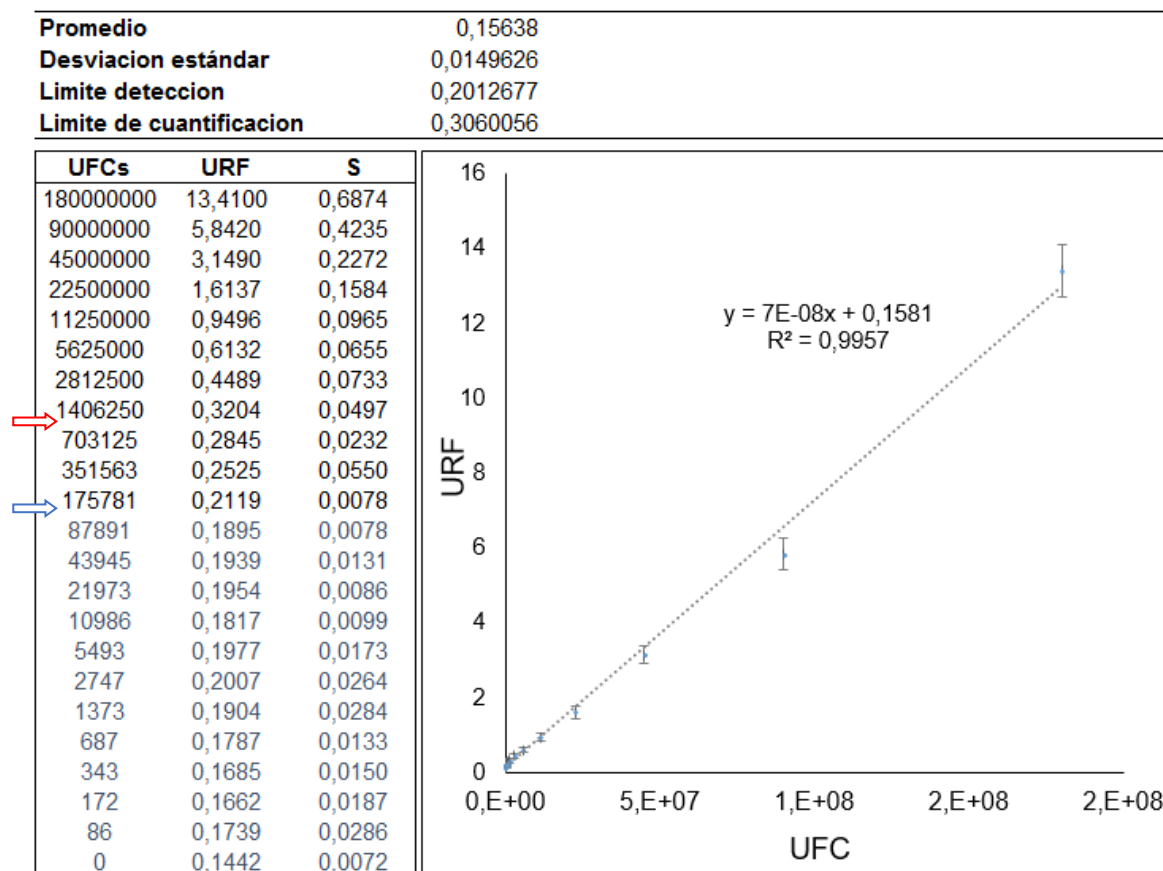


Tabla 3-3 Evaluación de los sobrenadantes de NA posteriores a la marcación con $6,0 \times 10^{-3}\%$ en diferentes periodos de tiempo.

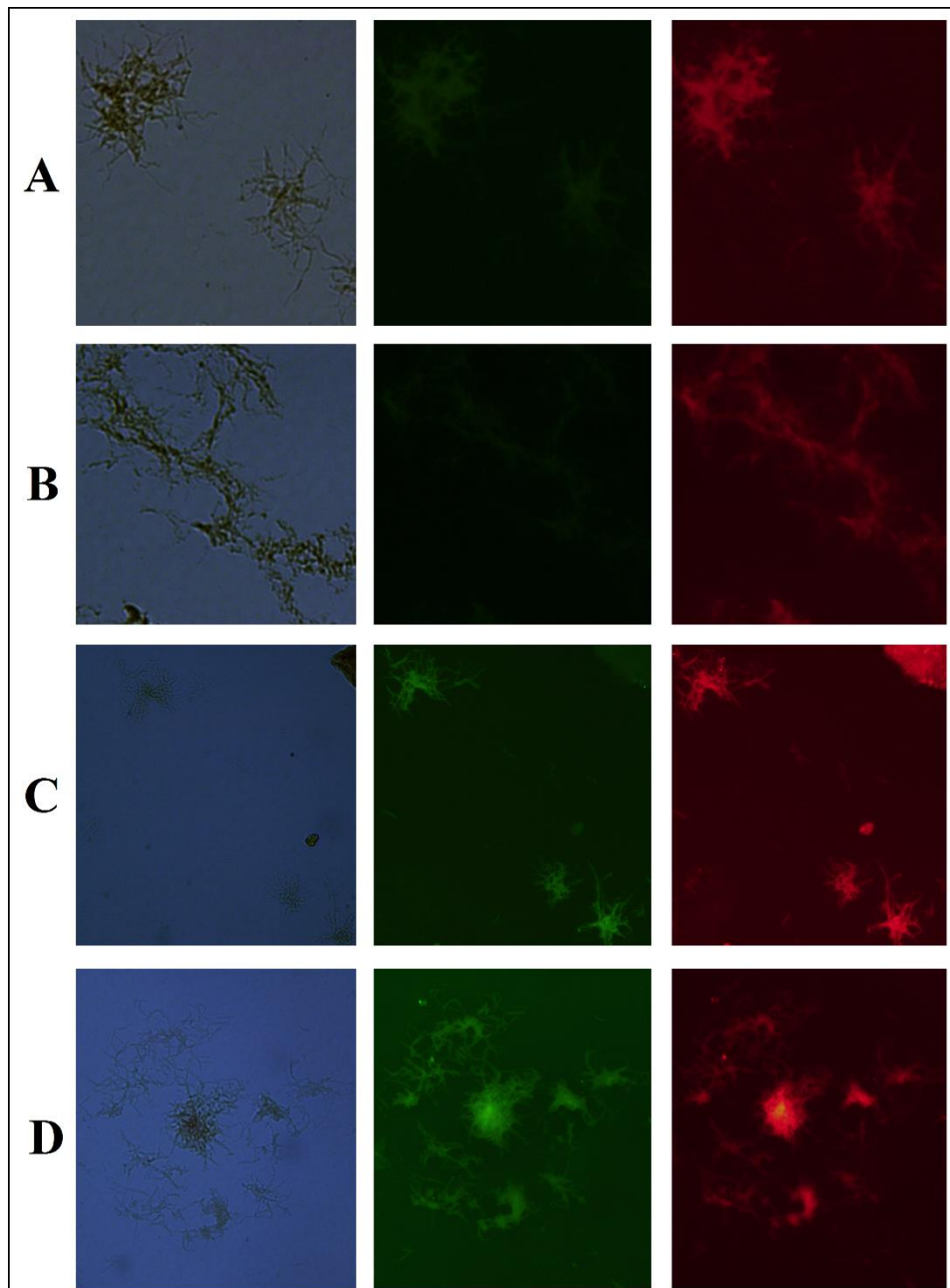
Tiempo (min)	URF Sobrenadantes			Promedio (URF)	S
Sin marcar	0,1463	0,1455	0,1500	0,1473	0,0024
10	0,1504	0,1875	0,1399	0,1593	0,0250
20	0,1399	0,1459	0,1549	0,1469	0,0075
30	0,156	0,1529	0,1532	0,1540	0,0017
40	0,1478	0,15	0,1579	0,1519	0,0053
50	0,1476	0,1615	0,1561	0,1551	0,0070
60	0,1677	0,1621	0,1732	0,1677	0,0056

Figura 3-5 Determinación de los límites de detección y cuantificación de micobacterias fluoromarcadas con NA

3.2.3 Fluoromarcaje con Rodamina B

Se evaluaron las diferentes soluciones que contenían rodamina haciendo tinción de extendidos de *M. smegmatis* con soluciones en 55% Glicerol en agua destilada, los resultados se muestran en la figura 3-6. Donde A corresponde a solución completa. B. Solución sin fenol C. Solución sin Auramina, D. Solución sin Auramina ni fenol. No se ven diferencias significativas en la tinción cuando se utilizaron soluciones sin fenol (B y D), lo que sugiere una posibilidad de ser usadas en tinción de *M. smegmatis* viable para ensayos biológicos, por esa razón la estandarización del fluoromarcaje se hizo con diluciones de la solución D.

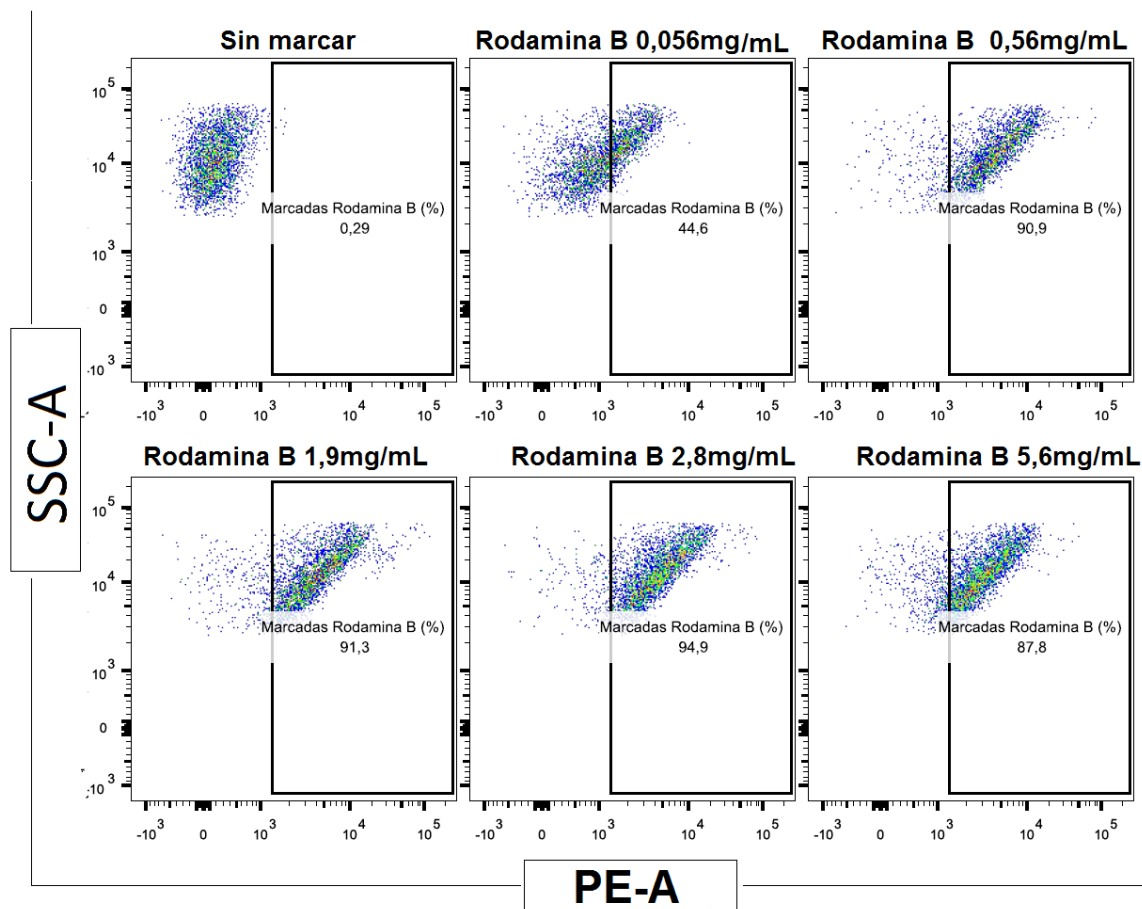
Figura 3-6 Tinciones de extendidos de *M. smegmatis* con rodamina B en diferentes soluciones. Visto en microscopio de fluorescencia Olympus bx51.



Las diluciones utilizadas de la solución empleada en la tinción D para la estandarización del fluoromarcaje de *M. smegmatis* en un periodo de incubación de 40min arrojaron los resultados de marcación mostrados en la figura 3-7, a todas las concentraciones se

obtuvo buenos porcentajes de marcación, y de más de un 90% a partir de 0,56mg/mL de Rodamina B.

Figura 3-7 Seguimiento por citometría de flujo del marcaje de *M. smegmatis* con Rodamina B.

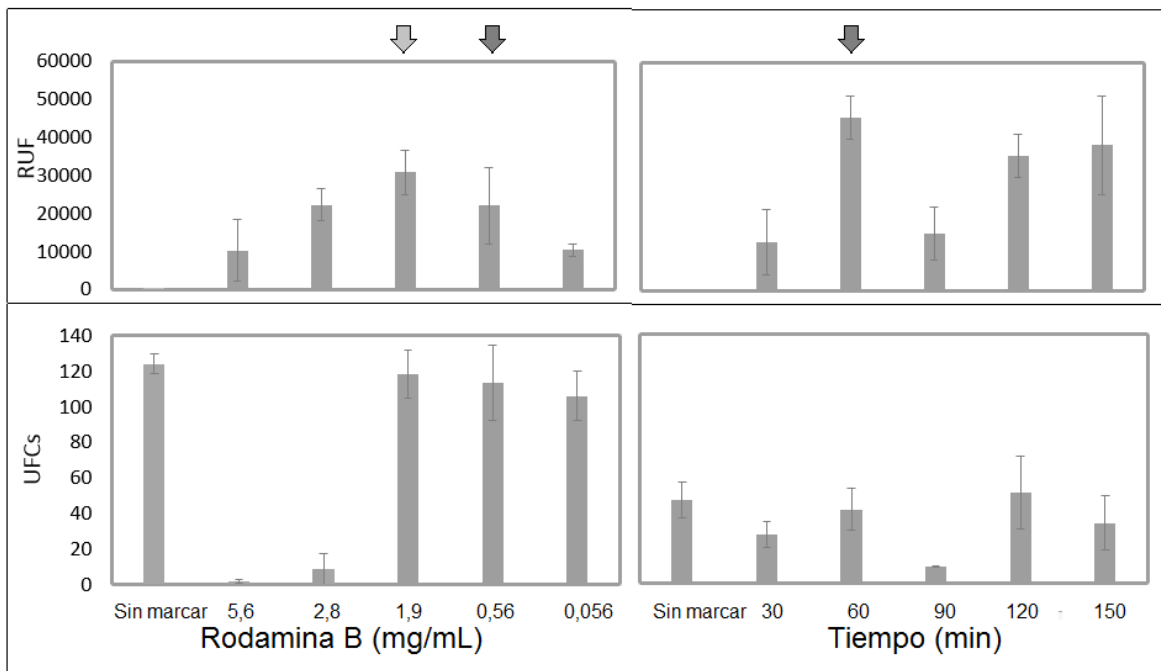


La evaluación de viabilidad por el conteo de colonias dio como resultado que las concentraciones 5,6 y 2,8 mg/mL de Rodamina B correspondientes a la solución de la tinción D sin diluir y con $F_d = 1:1$ respectivamente, son citotóxicas; esto se ve reflejado en la drástica disminución del número de UFC en comparación al control sin marcar mostrado en la figura 3-8. Por ésta razón se seleccionó la concentración de 1,9mg/ml (señalada con flecha gris claro en la figura) para evaluar el tiempo óptimo de marcaje a 37°C y no se obtuvo crecimiento de colonias para ningún tiempo de incubación (no se muestran éstos resultados) entonces se probó con la dilución a 0,56mg/mL de Rodamina en un periodo de máximo 150min tomando en cuenta intervalos de 30 min y las

marcaciones fueron evaluadas en el fluorómetro Tecan Genios de la Universidad Nacional. Los resultados analizados en Microsoft Excel se muestran también en la figura 3-8.

Se determinó que la solución que tiene una concentración final de rodamina B de 0,56mg/mL es la óptima para la marcación con excelentes resultados a 60 minutos de incubación a 37°C. Fueron necesarios 6 ciclos de lavado con 1,5mL de PBS 1X para retirar la mayoría del fluoróforo sobrenadante. Los resultados de fluorescencia presentados corresponden a la diferencia entre las unidades relativas de fluorescencia obtenidas de la suspensión de micobacterias y los sobrenadantes micro-filtrados del último ciclo de lavado.

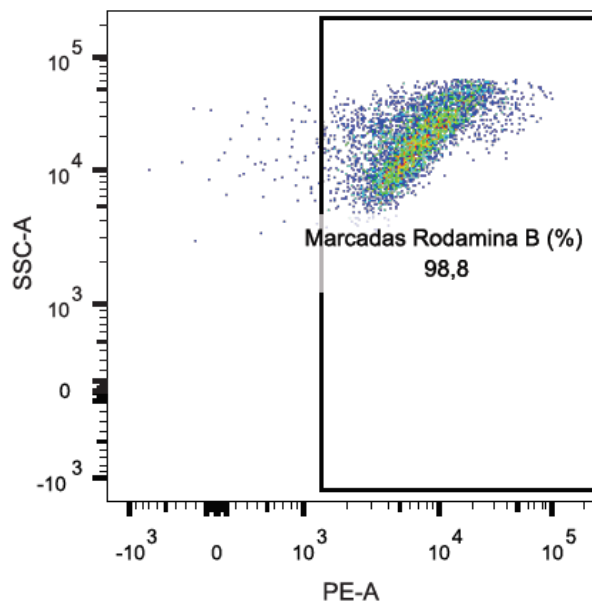
Figura 3-8 Evaluación de la viabilidad y seguimiento fluorométrico de la marcación fluorescente de *M. smegmatis* con Rodamina B en glicerol-PBS 1X



Los resultados obtenidos por fluorimetría de la marcación fluorescente con la solución de Rodamina B a 0,56mg/mL durante 60min/37°C fueron confirmados por lectura en

citómetro de flujo obteniendo un porcentaje de marcación del 98,8% como se muestra en la figura 3-9.

Figura 3-9 Seguimiento en citómetro de flujo de marcación fluorescente de *M. smegmatis* con Rodamina B a 0,56mg/mL incubación 60min/37°C.



3.3 Conclusiones

Es posible una marcación fluorescente de *M. smegmatis* con los tres fluoróforos ensayados; fluoresceína de sodio, NA y Rodamina B. Sin embargo se tienen resultados de casi 100% de fluoromarcaje sólo con NA y Rodamina B, las cuales también mostraron bajos niveles de fluorescencia en los sobrenadantes microfiltrados del último ciclo de lavado, es decir baja interferencia de señal por ésta razón.

Se obtuvo casi el 60% de marcación fluorescente de *M. smegmatis* con fluoresceína de sodio 100µg/mL en glicerol 50%, a las 24 horas de incubación a temperatura ambiente, es posible que el largo periodo de incubación cause la muerte de las micobacterias.

Se determinó que para el NA la concentración óptima de fluoromarcaje sin pérdida de viabilidad celular es de $6,0 \times 10^{-3}$ % (p/p) y que se debe llevar a cabo por incubación a

37°C durante 10min; 3 lavados con 1,5mL de PBS 1X fueron suficientes para retirar el exceso de fluoróforo.

Se determinó que la solución en glicerol-PBS 1X que tiene una concentración final de rodamina B de 0,56mg/mL es la óptima para la marcación con excelentes resultados a 60 minutos de incubación a 37°C; 6 lavados con 1,5mL de PBS 1X fueron suficientes para retirar el exceso de fluoróforo.

4. Fluorimetría de los ensayos de inhibición de la invasión con *Mycobacterium tuberculosis*

4.1 Metodología

4.1.1 Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

M. tuberculosis H37Rv se cultivó a 37°C con agitación constante en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa (OADC). Se realizaron tinciones Ziehl Neelsen y Gram como control, las micobacterias fueron colectadas por centrifugación a 13000 RPM en una centrifuga intermedia y conservadas en PBS 1X a -20°C.

4.1.2 Ensayo de invasión con *M. tuberculosis*

Se desprendieron células A549 y U937 con tripsina 0,03%, se resuspendieron en RPMI 5% SFB, se contaron en cámara de Neubauer y se pusieron $2,5 \times 10^5$ células por pozo en cajas de 24 pozos y permitiendo su adhesión durante toda la noche. Se retiró el medio sobrenadante y se adicionaron los diferentes tratamientos en PBS1X para evitar interferencia del indicador de pH que tienen otros buffer de células como el HBSS. Se pusieron triplicados de citocalasina D a 30µM como control positivo de inhibición, se incubó durante 2 horas a 37°C (para las células A549) o 4°C (para las células U937). Se dejó un triplicado sin tratar como control positivo de la invasión.

Terminado el tiempo de incubación se retiraron los sobrenadantes de las soluciones de tratamiento y las células se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv en un MOI 1:10, se hizo un ensayo con micobacterias marcadas con NA siguiendo el protocolo definido para

M. smegmatis, y otro con micobacterias sin marcar. La infección se llevó a cabo toda la noche a 37 °C y 5%CO₂.

Se realizaron 3 lavados con 500µL de PBS 1X por cada pozo y las células infectadas se desprendieron con 150µL de tripsina 0,03% y fueron re suspendidas en PBS 1X con 10% SFB, se hicieron pipeteos fuertes para garantizar la obtención del total del pellet celular y se transfirió todo el volumen de cada pozo a tubos Ependorff de 1,5mL.

Los tubos debidamente marcados se centrifugaron a 2500rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante, el pellet fue disgregado con golpes fuertes y las células infectadas se resuspendieron por pipeteo en 100 µL de PBS 1X, se sembraron 50µL de este pellet en medio Middlebrook 7H10 suplementado con 10% OADC como control y los 50µL restantes fueron inactivados con 100µL de solución de p-formaldehido 8% + glutaraldehido 1% para tener las concentraciones finales de la solución de fijación. Las muestras se agitaron vigorosa pero cuidadosamente en un vortex y se dejaron toda la noche a 4°C. Finalmente, las muestras fueron transferidas a cajas de 96 pozos para ser leídas en el fluorómetro Fluoroskan Ascent™ $\lambda_{em}538nm / \lambda_{ex}485nm$.

Algunas modificaciones del método como la inclusión de ensayos para evaluación por citometría de flujo y algunos ensayos de fagocitosis de *M.smegmatis* fueron necesarias para la validación y comprensión de algunos resultados; dichas modificaciones a las metodologías se especifican en resultados en la medida que fueron requeridos. No fue posible el análisis de ensayos de infección con *M.tuberculosis* H37Rv fluoromarcada con Rodamina B debido a restricción del uso del fluorómetro en la UN con éste patógeno.

4.2 Resultados

4.2.1 Ensayos de inhibición de la invasión con *M. tuberculosis* marcada con NA analizados por UFC y fluorimetría.

Las tendencias de los resultados obtenidos para conteo de colonias de bacteria marcada y no marcada en los controles de invasión e inhibición (Citocalasina D) se resumen en la figura 4-1, no fue posible hacer una relación real de UFC calculadas a partir de la fluorimetría en relación a UFC contadas en las cajas de cultivo ya que los valores

obtenidos al aplicar la fórmula de la curva de calibración obtenida para ese ensayo $UFC=(URF-0,604)/1 \times 10^{-5}$ con $R^2=0,98$ son incluso mayores a las UFC consideradas en el MOI de 10 micobacterias por célula (Tabla 4-1), esto puede deberse a: 1. Presencia de exceso de fluoróforo en solución a pesar de los controles de lavados y sobrenadantes que se hicieron en pruebas preliminares con *M. smegmatis* ; 2. Que haya muchas micobacterias muertas y el método de conteo de colonias por UFC sólo me permite conocer micobacterias viables.

Tabla 4-1: Cálculo de UFC de *M. tuberculosis* que infectaron las líneas celulares A549 y U937 a partir de datos fluorimétricos para controles.

Línea celular	Control	URF			Promedio	S	UFC Calculado
A549	Invasión*	9,1230	8,7075	8,2920	8,7075	0,4155	810350
	Citocalasina**	18,1900	16,3350	14,4800	16,3350	1,8550	1573100
U937	Invasión*	55,7100	61,2700	66,8300	61,2700	5,5600	6066600
	Citocalasina**	31,3100	32,3400	31,8250	31,8250	0,5150	3122100

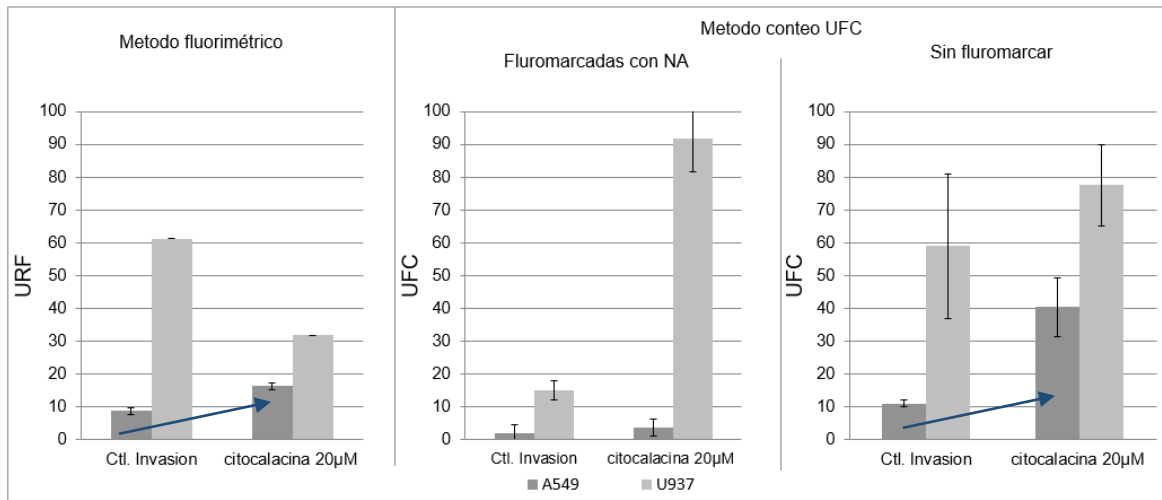
*Control de invasión: células si tratamiento + *M. tuberculosis* H37Rv

** Células tratadas con Citocalasina 30µM + *M. tuberculosis* H37Rv

Los resultados obtenidos para los controles del conteo de UFC sin fluoromarcarse (figura 4-1) en infección de células A549 muestra menor número de colonias en el control de invasión en relación al control de Citocalasina, de la misma manera se ve la tendencia en conteo por fluorimetría en relación a URF (flechas azules); pero no sucede así con el conteo de UFC de los controles en que se usó micobacteria fluoromarcada, que además tuvo conteos muy bajos con respecto en los que se usó micobacteria sin marcar.

En el análisis fluorimétrico de la infección de células U937 se ve una disminución del número de URF cuando las células son tratadas con Citocalasina en relación al control de invasión; la tendencia es contraria en los ensayos por UFC para micobacterias marcadas y no marcadas.

Figura 4-1 Ensayo de infección celular con *M. tuberculosis* marcada con NA- correlación entre resultados obtenidos por métodos de cuantificación de URF y UFC

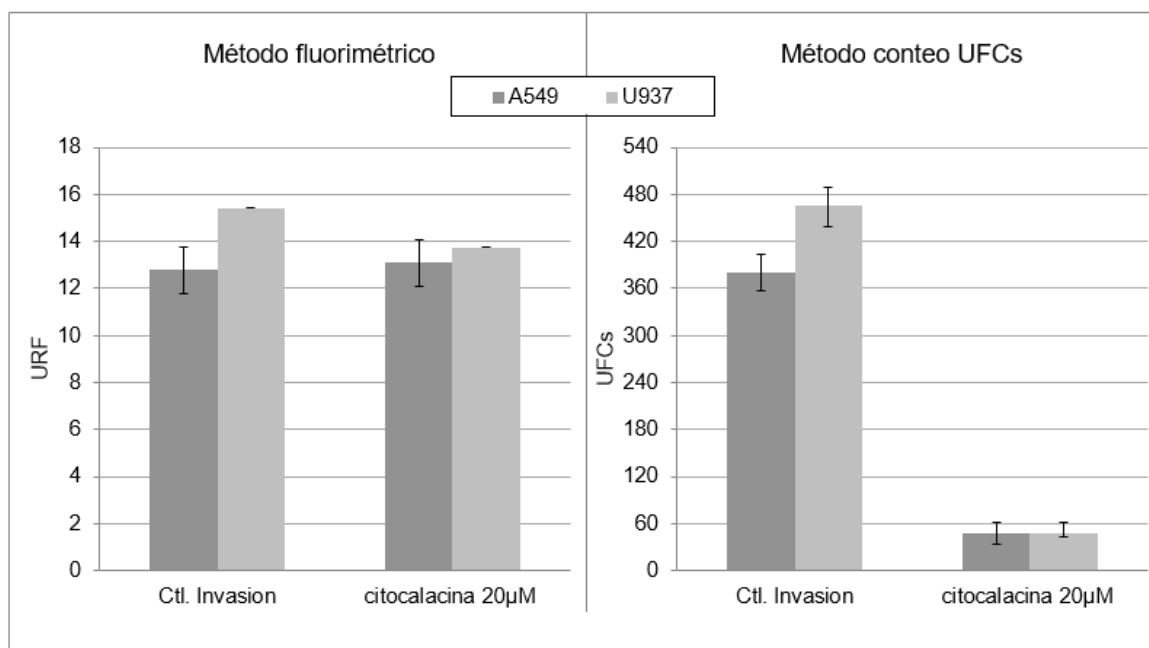


La repetición del ensayo con micobacterias marcadas se llevó a cabo de la misma manera que se describe en la metodología, sólo que ésta vez no se tuvo en cuenta un control con micobacterias sin marcar, ya que no se considera necesario después de asegurar que la viabilidad de las micobacterias no se ve afectada por las concentraciones de fluoróforos. Además, luego de infectar las dos líneas celulares con *M. tuberculosis* H37Rv cosechada recientemente, marcada con NA y posterior a realizar los lavados para retirar el exceso de bacterias extra celulares, las células fueron lisadas por tratamiento con 200µL/pozo de agua destilada estéril durante 10min a temperatura ambiente. Las células fueron desprendidas y lisadas totalmente ayudado de fricción de una punta de micropipeta contra la caja y pipeteos fuertes; del volumen obtenido se sembraron 50µL en cajas de Middlebrook 7H10 y los 150µL fueron inactivados con solución de p-formaldehído-glutaraldehído para ser leídos en el fluorómetro. Las colonias de micobacterias fueron visibles para el conteo a partir de los 25 días de incubación a 37°C.

La comparación entre los resultados obtenidos por fluorimetría y por UFC del ensayo se muestra en la figura 4-2. Se obtuvieron excelentes desviaciones del triplicado de los experimentos y es evidente el efecto de la Citocalasina para inhibir la entrada de la micobacteria en ambas líneas celulares teniendo en cuenta los valores de UFC, además es evidente que al trabajar con micobacterias cosechadas recientemente se tiene un

mayor número de UFC comparado con el primer ensayo. Por otra parte, los valores obtenidos de fluorescencia se ubican dentro del rango de cuantificación y no varían entre controles.

Figura 4-2 Ensayo de invasión e inhibición de la invasión analizado por método de conteo de colonias y método fluorimétrico.



Mientras el porcentaje de inhibición obtenido para la Citocalasina por análisis de cuantificación del método de conteo de UFC es superior al 86% en las dos líneas celulares de acuerdo con el siguiente cálculo:

$$((380-50) \times 100 / 380) = \mathbf{86,8\%}$$
 en A549 y

$$((466-50) \times 100 / 466) = \mathbf{89,3\%}$$
 en U937

En el análisis por método fluorométrico del mismo ensayo no se detecta inhibición en la línea celular A549 y una bajísima inhibición del 10%, de acuerdo con la ecuación:

$$((15,40 - 13,73) \times 100 / 15,5) = \mathbf{10,84\%}$$
 en U937

Para comprender las posibles razones de las grandes diferencias obtenidas entre los métodos y hacer un seguimiento de micobacterias intra y extracelulares, se hizo nuevamente el ensayo, esta vez desprendiendo con tripsina para no romper las células.

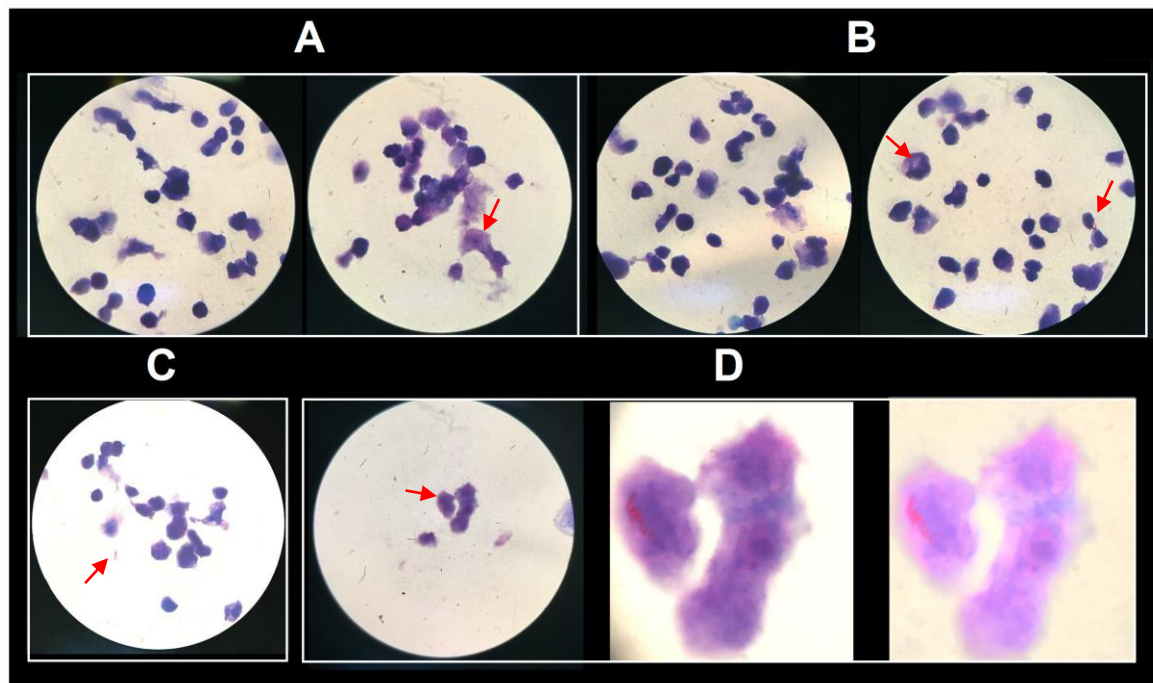
Los resultados obtenidos por fluorimetría muestran unos valores de fluorescencia similares para los controles de inhibición y de invasión mientras que el conteo de colonias (UFC) arroja porcentajes de inhibición de más del 50%, entonces se hizo la fijación con p-formaldehído en láminas y una posterior tinción normal y diferencial de Ziehl Neelsen (ZN), se hicieron 3 réplicas de cada muestra, algunos de los resultados obtenidos se muestran en la figura 4-3.

El panel A de la figura 4-3 que corresponde a tinción normal ZN del control de invasión, representa el análisis de todos los campos en microscopio, prácticamente no se ven micobacterias en el espacio extracelular ni asociadas a las células; la tinción es muy oscura en las células y no se distingue bacteria intracelular. En el panel B se muestran tinciones normales correspondientes al ensayo de inhibición con Citocalasina, al analizar todos los campos, algunos tienen uno o dos bacilos en espacio extracelular, y esto es comprensible ya que son menos micobacterias las que ingresan por lo tanto quedan muchísimas más micobacterias extracelulares comparadas con el control de invasión. Al hacer las tinciones diferenciales, resulta difícil encontrar campos con micobacterias intracelulares para el control de Citocalasina (C) mientras que en el control de invasión se ven células con hasta 5 bacilos intracelulares (D).

Lo observado en microscopía confirma la inhibición de la invasión por parte de la Citocalasina, además se demuestra que no hay ruido del procedimiento que haga que se vean en fluorimetría tan bajos porcentajes de inhibición comparados con el método de UFC y que el número de lavados realizados después de la infección logra retirar prácticamente el total de las micobacterias excedentes, además se demuestra que los pases en jeringa ayudan enormemente a disgregar las micobacterias, evidenciando incluso un sólo bacilo como se muestra con flecha roja en la figura 4-3 C.

Sin embargo no se logra conocer el factor que interfiere en las lecturas fluorométricas, por esa razón se propone hacer ensayos de citometría de flujo, que si bien no permite obtener un número de micobacterias total que infecta las células, si permite diferenciar por fluorescencia las células que tienen micobacterias dentro o asociadas de las que no.

Figura 4-3 Tinción Ziehl Neelsen normal (AB) y diferencial (CD) de controles de invasión e inhibición de la invasión con *M. tuberculosis*

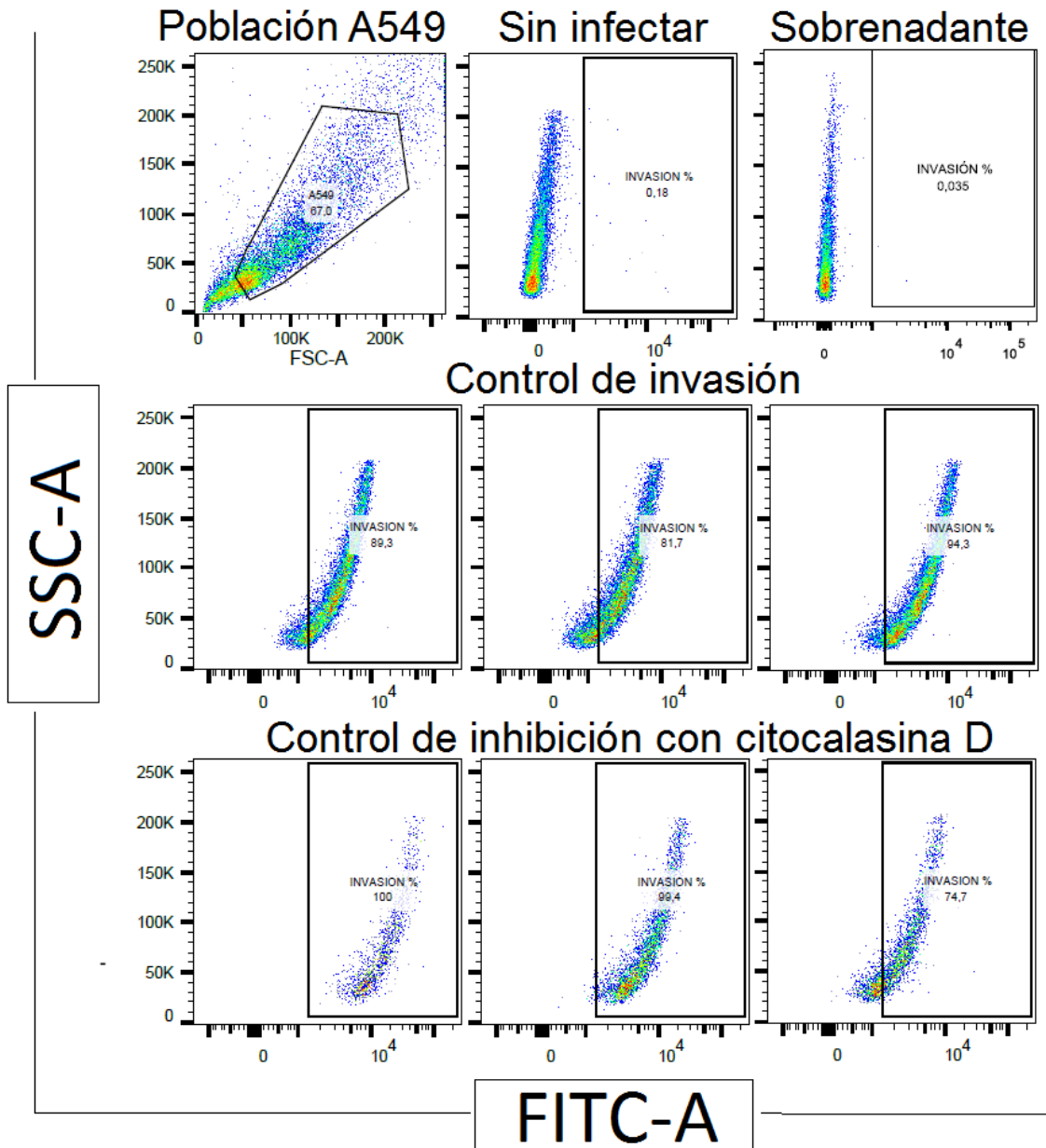


4.2.2 Citometría de flujo de los ensayos de inhibición con *M. tuberculosis* H37Rv marcada con NA y Rodamina B.

Se realizaron ensayos de invasión e inhibición de la invasión de la entrada de *M. tuberculosis* H37Rv (marcada con NA) a células A549, desprendiendo con tripsina y fijando con p-formaldehído glutaraldehído como se describe en la metodología; se hicieron controles de invasión, de inhibición y de sobrenadantes. Para el control de sobrenadantes, se centrifugó la suspensión de bacteria posterior a los lavados para retirar el fluoróforo y se dejó el 50% del volumen sobrenadante para resuspender en RPMI e infectar las células; el otro 50% de sobrenadante fue filtrado por membrana de 0,2 μ m y resuspendido en el mismo volumen de RPMI usado para la infección poniendolo con las células. Se hizo la lectura en el citometro BD FACSCanto II de 5000 eventos (células) por experimento, los resultados se muestran en la figura 4-4, los resultados obtenidos para los controles no dan evidencia de inhibición de la invasión por parte de la Citocalasina, se descarta la posibilidad de fluorescencia inespecífica por presencia de NA

remanente del fluoromarcaje de las micobacterias ya que es evidente que no hay fluorescencia detectable por citometría en las células tratadas con el sobrenadante.

Figura 4-4 Seguimiento de ensayos de invasión de A549



Los resultados por citometría coinciden con los obtenidos para controles y sobrenadante analizados por fluorimetría en ensayos anteriores pero son diferentes de los obtenidos

por UFC y los resultados del análisis de las muestras en microscopio por tinción ZN diferencial. Se propone la evaluación en microscopia de fluorescencia que permita ver con exactitud el sistema celular y micobacteriano para determinar los factores que están interfiriendo en el análisis fluorométrico de la infección.

4.2.3 Ensayos de fagocitosis de *M. smegmatis* fluoromarcada con NA y Rodamina B analizados por microscopia de fluorescencia.

Se propuso la evaluación de ensayos de invasión por microscopia de fluorescencia en el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader - BioTek propiedad de la Universidad del Rosario, disponible para la FIDIC por convenios académicos, el cual permite la toma de fotografías y lectura fluorimétrica sobre superficie de los pozos de ensayo, sin necesidad de desprender las células, pero no se permite llevar muestras que tengan el patógeno *M. tuberculosis* H37Rv (al igual que en la UN) por razones de bioseguridad; entonces se hacen ensayos de fagocitosis de *M. smegmatis* marcada con NA o rodamina B que son los dos fluoróforos que dieron mejor resultado de marcación y con condiciones estandarizadas en el presente trabajo.

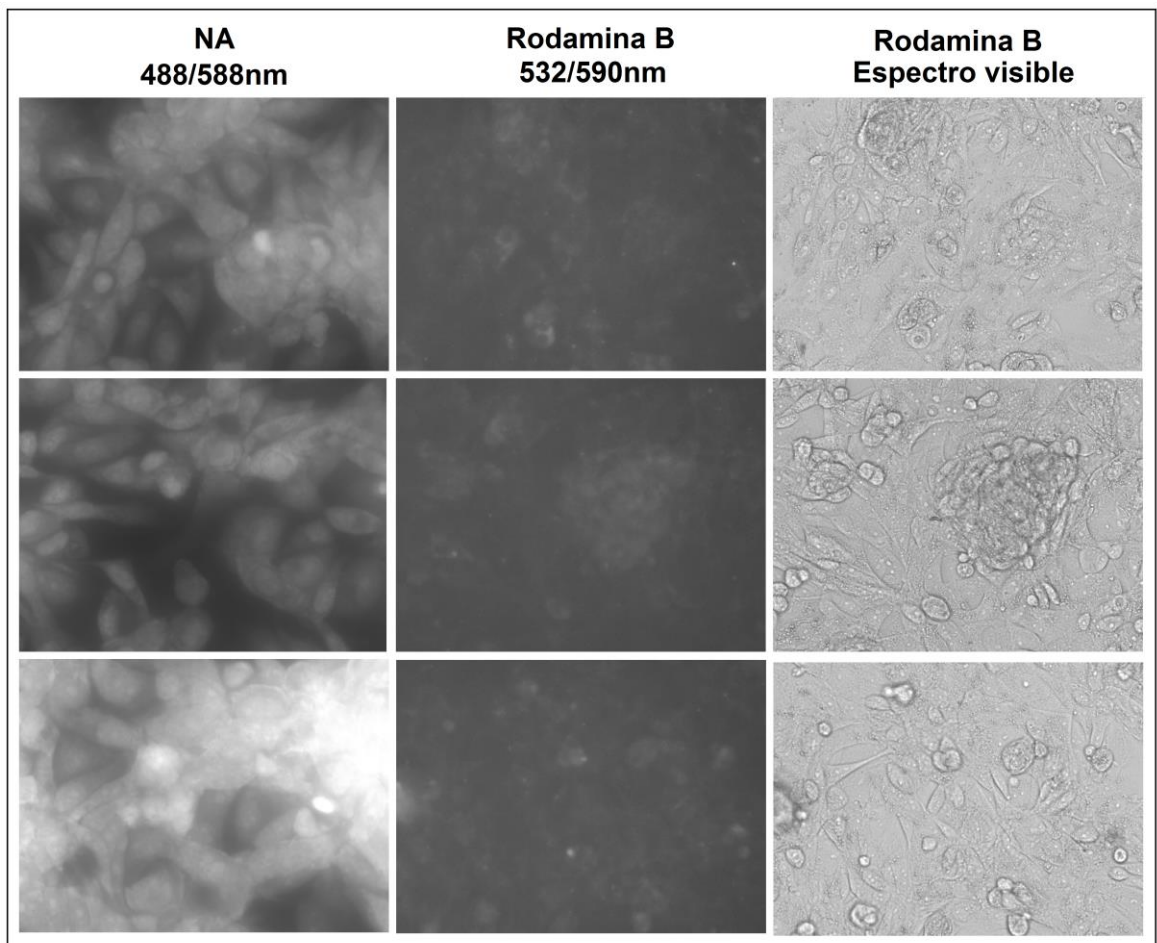
La infección se llevó a cabo en células fagocíticas U937 a 4°C, se usó un MOI de 10 micobacterias fluoromarcadas por célula, se dejaron un periodo de incubación muy corto (10min) 37°C para evitar la degradación de las micobacterias por parte de los macrófagos, se hicieron 3 lavados con 500µL/pozo de PBS 1X a 4°C para detener la acción fagocítica que pudiera presentarse. Los resultados se muestran en la figura 4-5, es evidente la marcación del núcleo y fluorescencia de las células completas en NA correspondiente a las tres fotografías de la columna izquierda; mientras que en Rodamina no se definen sino concentraciones de fluorescencia que se ven como puntos blancos en fondo oscuro que corresponden a las micobacterias (Columna del medio). Para facilitar la observación de las formas celulares se muestra en la figura, la fotografía de las células sin filtros (espectro visible) en la columna a la derecha.

Los resultados demuestran una marcación inespecífica de las células blanco de ensayo con NA, lo que explica los resultados obtenidos por espectrometría de fluorescencia;

posiblemente la fluorimetría y citometría de sobrenadantes den resultados negativos para fluorescencia debido a que el NA queda atrapado en la membrana del filtro de 2 μ m, es una hipótesis que queda por confirmar, lo que es claro es que el NA se une al ADN o proteínas de cualquier sistema celular y que eso representa una interferencia significativa si se plantea la cuantificación por fluorimetría de los ensayos de invasión.

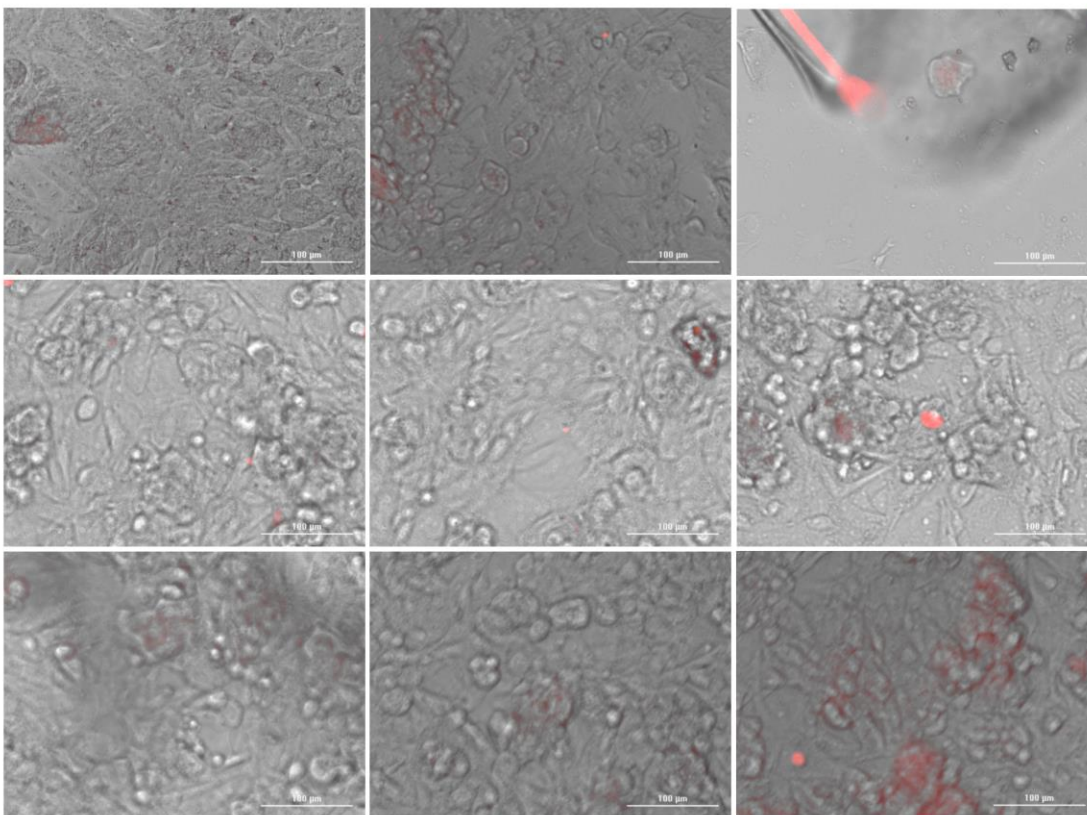
También queda demostrada una marcación más específica con Rodamina B, que corresponde al hecho que, mientras que la rodamina B se une más específicamente a los ácidos grasos, en lo que tiene una ventaja la micobacteria por su gran contenido lipídico en la envoltura celular.

Figura 4-5 Análisis por microscopia de fluorescencia de la fagocitosis por células U937 de *M. smegmatis* marcada con NA o Rodamina



Algunas imágenes de Rodamina B fueron analizadas solapando los resultados obtenidos por microscopia de fluorescencia del espectro visible con los analizados a λ_{ex} 486nm/ λ_{em} 590nm y se muestran en la figura 4-6, es posible definir algunos bacilos dentro de las células (fotografías de la columna central y superior derecha), en otras se ven puntos que pueden corresponder a pedazos de micobacteria que ya ha sido degradada (fotografías central y superior derecha) y hay una tendencia a la agregación celular en las regiones donde hay fluorescencia, no todas las células fagocitaron micobacterias.

Figura 4-6 Análisis de imágenes de microscopia de fluorescencia: Fagocitosis por células U937 de *M. smegmatis* marcada con Rodamina B



4.2.4 Citometría de flujo de los ensayos de inhibición con *M. tuberculosis* H37Rv marcada con Rodamina B

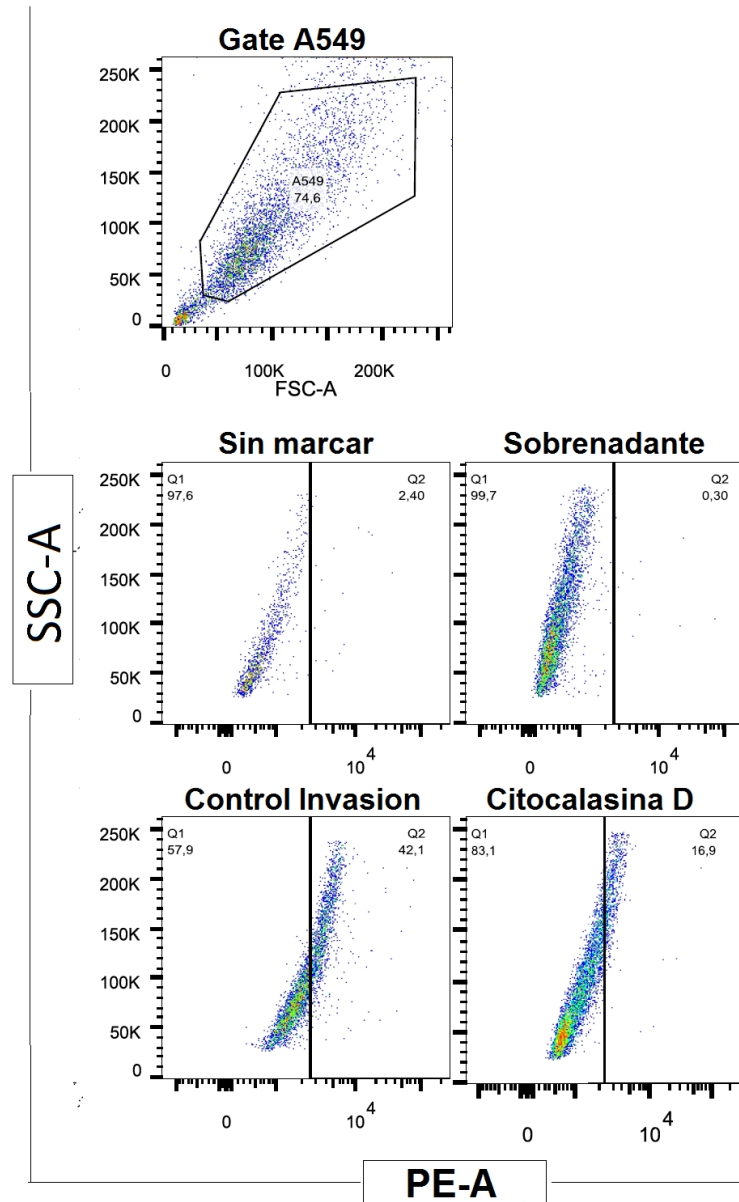
Ya que no es posible el uso del fluorómetro multicanal para analizar ensayos de invasión con *M. tuberculosis* H37Rv fluoromarcada con Rodamina B, se hace un acercamiento por citometría de flujo de un ensayo de invasión en células A549 para ser comparado con los resultados obtenidos para NA que puedan servir como base de futuros estudios en fluorimetría, los resultados se muestran en la figura 4-7. Es evidente un corrimiento de la población a lo largo del canal de fluorescencia (PE-A) para el caso de los controles, según el número de células positivas para fluorescencia, se puede decir que el 42,1% de las células están infectadas en el control de invasión y 16,9% en el control de Citocalasina D, para un cálculo de inhibición de la invasión de casi un 60% de acuerdo con la ecuación:

$$((42,1 - 16,9) \times 100 / 42,1) = \mathbf{59,86\%}.$$

Se puede decir que la Rodamina B es un fluoróforo de marcación específica de las micobacterias y se ve como promisorio para la estandarización de un método fluorimétrico para invasión con *M. tuberculosis* H37Rv ya que es posible diferenciar entre controles.

Se hizo un ensayo de infección de células A549 y U937 con el fin de poder comparar los resultados obtenidos por análisis con el citómetro en relación a UFC, incluyendo ensayo con micobacterias no marcadas, pero pasaron 40 días de incubación a 37°C y no hubo crecimiento de colonias de micobacterias incluso en los controles sin rodamina, las cajas de medio sólido Middlebrook 7H10 se secaron. Se considera necesario ensayar con cultivo más fresco ya que puede ser que haya muchas micobacterias muertas o que hayan perdido su capacidad de invadir las líneas celulares.

Figura 4-7 Citometría de flujo de ensayo de invasión e inhibición con *M. tuberculosis* H37Rv fluoromarcada con Rodamina B.



4.3 Conclusiones

En la evaluación de ensayos de invasión con *M. tuberculosis* H37Rv fluoromarcada con NA, se encontraron inconsistencias entre los resultados obtenidos por el método UFC (confirmado por microscopía de tinción ZNn diferencial) y la fluorimetría (confirmado por

citometría). Por análisis en microscopia de fluorescencia finalmente se encuentra que el fluoromarcaje con NA no es específico de las micobacterias y hay marcación inespecífica de las células blanco.

Se propone la Rodamina B como promisorio para la cuantificación de ensayos de invasión por fluorimetría ya que es específica de las micobacterias y permite diferenciar controles de invasión e inhibición por citometría de flujo.

5. Conclusiones generales y recomendaciones

La revisión titulada métodos de cuantificación de bacteria intracelular, enfoque al estudio fluorimétrico de *Mycobacterium tuberculosis* principal producto de este trabajo, destaca la importancia y posibilidad de proponer un método fluorimétrico con el que sea factible la cuantificación de patógenos intracelulares, éste permitiría conocer el número de patógenos que infectan las células como sucede con la microscopia de fluorescencia pero aplicado en volúmenes grandes de muestra; y no solamente el número de células infectadas como sucede en la citometría de flujo.

En la revisión se resalta el uso de la técnica de UFC como avalada en todo el mundo para cuantificación de bacterias en estudios de procesos infecciosos fagocíticos y no fagocíticos, por lo tanto el método de cuantificación fluorimétrica de micobacterias intracelulares debe ser totalmente validado por ésta técnica, para ello se sugiere el uso de micobacterias que estén recién colectadas o en cultivo.

Este trabajo también proporciona un marco teórico y del estado del arte que sirve de soporte para futuros estudios de desactivación de la fluorescencia que haga posible la diferenciación entre micobacterias intra y extracelulares por fluorimetría; dónde se describen desactivadores de fluorescencia para la Fluoresceína de sodio como soluciones a pH bajo y di-acetilacion; algunas alaninas y el SDS como desactivadores del NA y el grafeno y algunas antraquinonas que desactivan la Rodamina B entre otros, de los cuales se deberán escoger aquellos que no permeen o destruyan la membrana de las células blanco.

Es posible la cuantificación fluorimétrica de ensayos de inhibición de la invasión de células blanco A549 y U937 con *M. tuberculosis* H37Rv fluoromarcada en condiciones de

ensayo con mínimo $2,5 \times 10^5$ células y un MOI de 10 bacterias por célula según los límites de detección y cuantificación calculados para curva de calibración de *M. smegmatis* sobre células en un sistema fijado con p-formaldehído 4%-Glutaraldehído 0,5% en PBS 1X analizado en cajas de 96 pozos en los equipos Fluoroskan Ascent™ de la FIDIC y Tecan Genios de la Universidad Nacional-Departamento de farmacia.

Las condiciones, tiempos y concentraciones óptimas de fluoromarcaje con NA y Rodamina B de micobacterias quedaron bien definidas en el presente trabajo y se demostró que los lavados con PBS 1X posteriores a la infección son bastante eficientes para retirar las micobacterias extracelulares, sin embargo, un estudio detallado de los desactivadores de la fluorescencia descritos en el producto de revisión del presente trabajo debe ser realizado para tener una técnica completa que permita diferenciar entre micobacterias intracelulares de las que están adheridas a la superficie de las células, quizá éstos podrían resolver el problema de tinción inespecífica del NA para no descartarlo por completo como fluoróforo para ensayos de invasión.

Se recomienda continuar los estudios con Rodamina B como fluoróforo diferencial en los ensayos de invasión con la inclusión de desactivadores de su fluorescencia u otros métodos que permitan asegurar que la cuantificación es realmente de micobacterias intracelulares y no adheridas, para ello se aconseja la adquisición del par de filtros que permita la lectura de *M. tuberculosis* fluoromarcada con Rodamina B en el fluorómetro Fluoroskan Ascent™.

Anexo A: Resultados del background y ensayo de fagocitosis en cajas de 24 pozos

Measurement count: 1		Ex: 485 Em: 538 Scaling Factor : 0.375/0.403																											
		1								2								3											
		0,1592	0,1602	0,1588						0,1572	0,1579	0,1567								0,1557	0,1597	0,1571							
		0,1646	0,1672	0,1666	0,1654	0,1603				0,1608	0,1644	0,163	0,1621	0,1605						0,1572	0,1649	0,1635	0,1649						
		0,1603	0,1655	0,1689	0,1703	0,1676	0,1653	0,156	0,1572	0,1597	0,1649	0,1679	0,1637	0,1616	0,1547	0,1552	0,1651	0,1657	0,1676	0,1653	0,1607	0,1558							
A		0,1606	0,168	0,1695	0,1716	0,167	0,1652	0,157	0,1564	0,1647	0,1636	0,1674	0,166	0,1643	0,1589	0,1562	0,1651	0,1636	0,1703	0,1669	0,1615	0,158							
		0,1596	0,164	0,169	0,1693	0,166	0,1647	0,1569	0,1553	0,1609	0,1651	0,1685	0,1651	0,1625	0,1598	0,1566	0,1601	0,162	0,165	0,1665	0,1598	0,1535							
		0,1613	0,1679	0,1639	0,163	0,1602				0,16	0,1646	0,1618	0,1618	0,1557						0,1593	0,1602	0,1615	0,1601	0,158					
		0,1573	0,1614	0,1573						0,1544	0,1554	0,1543								0,1556	0,1564	0,1543							
		0,1573	0,1565	0,1557						0,155	0,1561	0,1535								0,1551	0,1577	0,1527							
		0,1605	0,1609	0,1638	0,1625	0,1578				0,1566	0,1582	0,1603	0,1606	0,1574						0,1571	0,1596	0,1599	0,162	0,1553					
		0,1557	0,16	0,168	0,1629	0,1632	0,163	0,1524	0,1531	0,1642	0,162	0,1626	0,1629	0,1597	0,1475	0,1528	0,16	0,1638	0,1646	0,1625	0,1601	0,1516							
B		0,1584	0,1605	0,1685	0,1671	0,1672	0,1625	0,1544	0,1579	0,1627	0,1644	0,1667	0,1619	0,1618	0,1531	0,1568	0,1595	0,1655	0,1626	0,1653	0,1582	0,1547							
		0,1572	0,1588	0,1639	0,1658	0,1667	0,1624	0,1538	0,1511	0,1579	0,163	0,1633	0,1638	0,1598	0,1527	0,1526	0,1613	0,1608	0,1627	0,1625	0,1614	0,1549							
		0,1588	0,1588	0,1613	0,1636	0,1602				0,1585	0,1602	0,1613	0,1558	0,157						0,1583	0,1605	0,1609	0,1577	0,1553					
		0,1561	0,1563	0,1542						0,1526	0,155	0,1528								0,1538	0,1548	0,1522							
		0,1548	0,1645	0,1602						0,1521	0,1569	0,1541								0,1537	0,1544	0,1501							
		0,156	0,1617	0,1653	0,1627	0,1562				0,1554	0,1615	0,1625	0,1601	0,1579						0,1545	0,1585	0,1599	0,1611	0,1557					
		0,1548	0,161	0,1643	0,1656	0,1628	0,1595	0,1541	0,1533	0,1614	0,1634	0,1599	0,164	0,1606	0,1519	0,1515	0,1597	0,1645	0,1688	0,1641	0,1575	0,1498							
C		0,1552	0,1672	0,1646	0,1649	0,1628	0,1645	0,1556	0,154	0,1615	0,1606	0,1656	0,1611	0,1603	0,1546	0,1521	0,1623	0,1637	0,1613	0,1627	0,1591	0,1512							
		0,1557	0,1629	0,1625	0,1643	0,1622	0,1578	0,1539	0,1533	0,1567	0,1621	0,1644	0,1627	0,1602	0,1511	0,1541	0,1592	0,1615	0,1652	0,1636	0,1575	0,1507							
		0,1557	0,1602	0,1603	0,1586	0,1564				0,1571	0,165	0,1612	0,1604	0,1531						0,1562	0,1578	0,1598	0,1581	0,1555					
		0,1519	0,1557	0,1544						0,1519	0,1552	0,1526								0,1549	0,1577	0,1544							
		0,1542	0,1533	0,1526						0,1531	0,1665	0,1518								0,1537	0,1571	0,1525							
		0,1577	0,1627	0,1629	0,1585	0,155				0,157	0,1602	0,1619	0,1611	0,1588						0,1582	0,1606	0,1598	0,1597	0,157					
		0,1555	0,1603	0,1648	0,1625	0,1598	0,1607	0,1516	0,1549	0,1603	0,1658	0,164	0,1662	0,1599	0,1524	0,1552	0,1623	0,1662	0,161	0,1644	0,1583	0,1554							
D		0,1558	0,1589	0,1657	0,1667	0,1642	0,1582	0,155	0,1563	0,1638	0,163	0,1672	0,1654	0,1613	0,1563	0,1554	0,162	0,1656	0,1655	0,1659	0,1624	0,1561							
		0,1552	0,1608	0,1654	0,1652	0,1632	0,1596	0,1516	0,1549	0,1578	0,1633	0,1651	0,163	0,1619	0,1529	0,1569	0,1597	0,1655	0,1651	0,1639	0,159	0,1522							
		0,1603	0,1633	0,1628	0,1634	0,156				0,1615	0,1598	0,1634	0,1592	0,1603						0,1568	0,161	0,1596	0,1595	0,1562					
		0,1562	0,1536	0,1555						0,1572	0,1569	0,1565								0,158	0,1544	0,1563							
		4								5								6											
		0,1574	0,1605	0,1552						0,1591	0,1594	0,1566								0,1572	0,1557	0,1561							
		0,1621	0,1658	0,1662	0,1622	0,1589				0,1563	0,1624	0,1619	0,1624	0,1586						0,1587	0,1615	0,1597	0,1613	0,162					
A		0,1578	0,164	0,1691	0,1661	0,1646	0,161	0,1543	0,1531	0,1593	0,1667	0,163	0,1667	0,1658	0,1546	0,1533	0,16	0,1675	0,1632	0,1646	0,1613	0,1548							
		0,157	0,1622	0,1662	0,1664	0,165	0,1632	0,156	0,1563	0,1615	0,1621	0,1648	0,1641	0,1637	0,1594	0,1541	0,1585	0,1625	0,1641	0,165	0,1621	0,1576							
		0,1541	0,1593	0,1663	0,1657	0,1656	0,1619	0,1537	0,1558	0,1611	0,1639	0,1663	0,1622	0,1649	0,155	0,1543	0,1587	0,1626	0,1661	0,1619	0,1622	0,1553							
		0,1568	0,1592	0,1645	0,1612	0,1573				0,1573	0,158	0,1624	0,1627	0,1573						0,1555	0,1589	0,1612	0,1624	0,1587					
		0,1563	0,1554	0,1551						0,1565	0,1537	0,1521								0,1553	0,1577	0,1562							
		0,1556	0,1548	0,1632						0,15	0,1568	0,1554								0,1533	0,1575	0,1568							
		0,157	0,1615	0,1618	0,1587	0,1571				0,159	0,1611	0,1601	0,163	0,1556						0,1595	0,1596	0,1637	0,1616	0,1585					
		0,1513	0,161	0,16	0,1602	0,1622	0,1575	0,1542	0,153	0,1597	0,163	0,1622	0,1634	0,1634	0,1547	0,1524	0,1615	0,1669	0,1652	0,166	0,1611	0,1558							
B		0,1555	0,1576	0,1619	0,1647	0,1627	0,1602	0,1532	0,1536	0,1605	0,1628	0,1655	0,1673	0,1592	0,1559	0,1513	0,1609	0,1647	0,1675	0,1617	0,1596	0,1583							
		0,15	0,1571	0,1575	0,1636	0,1622	0,1604	0,1521	0,1525	0,1579	0,1618	0,1646	0,1623	0,1595	0,1524	0,1539	0,1606	0,1641	0,1666	0,1604	0,1612	0,1539							
		0,1554	0,1575	0,158	0,1587	0,1569				0,1557	0,1604	0,1612	0,1577	0,1589						0,1571	0,1576	0,1616	0,1597	0,1568					
		0,1523	0,1495	0,1535						0,152	0,1535	0,1504								0,1548	0,1559	0,1525							
		0,1526	0,1542	0,152						0,1528	0,1549	0,152								0,151	0,1573	0,1526							
		0,1527	0,1604	0,16	0,1607	0,1582				0,1537	0,1624	0,1608	0,1618	0,1573						0,1552	0,1578	0,1609	0,1596	0,1594					
		0,1516	0,1617	0,1647	0,164	0,1633	0,161	0,1515	0,153	0,1607	0,164	0,1624	0,1626	0,1583	0,1551	0,1504	0,1592	0,1615	0,1622	0,1639	0,1578	0,1525							
C		0,1534	0,1576	0,1648	0,1673	0,1649	0,1604	0,1563	0,1555	0,1588	0,1613	0,1669	0,1638	0,161	0,1584	0,1564	0,1572	0,1627	0,1639	0,1662	0,161	0,1586							
		0,1548	0,16	0,1619	0,1659	0,1595	0,1626	0,1512	0,1565	0,1573	0,1606	0,1665	0,1607	0,161	0,1549	0,1527	0,1583	0,1638	0,1617	0,1618	0,1624	0,1535							
		0,1576	0,1562	0,1619	0,1557	0,1568				0,1564	0,1597	0,1618	0,158	0,1568						0,157	0,1575	0,16	0,1596	0,1572					
		0,1575	0,1574	0,1561						0,1555	0,1567	0,155								0,1542	0,1557	0,1548							
		0,1521	0,1547	0,1532						0,153	0,1594	0,156								0,1545	0,1585	0,1569							
		0,1558	0,1606																										

Bibliografía

1. Silva, M.T., *Classical labeling of bacterial pathogens according to their lifestyle in the host: inconsistencies and alternatives*. Front Microbiol, 2012. **3**(71): p. b146.
2. WHO. *The top 10 causes of death*. [cited 2016 07 June].
3. Monir, M.M., *Tuberculosis*, A.A. Saif, et al., Editors. 2003, Springer. p. 15-25.
4. WHO, *Global Tuberculosis Report 2016*, 2016, World Health Organization-WHO: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1>.
5. Riley, L.W., *Of mice, men, and elephants: Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and pathogenesis*. Journal of clinical investigation, 2006. **116**(6): p. 1475.
6. Cole, S.T., et al., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 537-44.
7. Song, H., et al., *Identification of outer membrane proteins of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2008. **88**(6): p. 526-44.
8. Rodríguez, D.C., et al., *Mce4F Mycobacterium tuberculosis protein peptides are able to inhibit invasion of human cell lines*. FEMS Pathogens and Disease, 2015. **73**: p. 1-10.
9. Rodríguez, D.C., et al., *Cell-Peptide Specific Interaction Can Inhibit Mycobacterium tuberculosis H37Rv Infection*. Journal of cellular biochemistry, 2015.
10. Ocampo, M., et al., *Specific Interaction between Mycobacterium tuberculosis Lipoprotein-derived Peptides and Target Cells Inhibits Mycobacterial Entry In Vitro*. Chemical biology & drug design, 2014. **84**(6): p. 626-641.
11. Ocampo, M., et al., *Functional, biochemical and 3D studies of Mycobacterium tuberculosis protein peptides for an effective anti-tuberculosis vaccine*. Critical reviews in microbiology, 2014. **40**(2): p. 117-145.

12. Ginsburg, H., et al., *Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of Plasmodium falciparum infected red blood cells*. Molecular and biochemical parasitology, 1985. **14**(3): p. 313-322.
13. Virji, M., et al., *Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells*. Molecular microbiology, 1993. **10**(3): p. 499-510.
14. Bosque, F., et al., *Permissiveness of human monocytes and monocyte-derived macrophages to infection by promastigotes of Leishmania (Viannia) panamensis*. The Journal of parasitology, 1998: p. 1250-1256.
15. Numazaki, K., K. Suzuki, and S. Chiba, *Replication of Chlamydia trachomatis and C. pneumoniae in the human monocytic cell line U-937*. Journal of medical microbiology, 1995. **42**(3): p. 191-195.
16. Pearlman, E., et al., *Growth of Legionella pneumophila in a human macrophage-like (U937) cell line*. Microbial pathogenesis, 1988. **5**(2): p. 87-95.
17. Pautasso, M., *Ten simple rules for writing a literature review*. PLoS Comput Biol, 2013. **9**(7): p. e1003149.
18. Herzenberg, L.A., et al., *The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford*. Clinical chemistry, 2002. **48**(10): p. 1819-1827.
19. Pan, H., et al., *A comparison of conventional methods for the quantification of bacterial cells after exposure to metal oxide nanoparticles*. BMC microbiology, 2014. **14**(1): p. 1.
20. Heritage, J., E.G.V. Evans, and R. Killington, *Introductory microbiology*1996: Cambridge University Press.
21. Goldman, E. and L.H. Green, *Practical handbook of microbiology*2015: CRC Press.
22. Richards, D.M. and R.G. Endres, *The mechanism of phagocytosis: two stages of engulfment*. Biophysical journal, 2014. **107**(7): p. 1542-1553.
23. Webi, J., et al., *Identification of a Mycobacterium tuberculosis gene that enhances mycobacterial survival in macrophages*. Journal of bacteriology, 2000. **182**(2): p. 377-384.

24. Viswanathan, G., et al., *Dissecting the membrane cholesterol requirement for mycobacterial entry into host cells*. Chemistry and physics of lipids, 2015. **189**: p. 19-27.
25. Tiwari, B.M., et al., *The Mycobacterium tuberculosis PE proteins Rv0285 and Rv1386 modulate innate immunity and mediate bacillary survival in macrophages*. PloS one, 2012. **7**(12): p. e51686.
26. Tiwari, B., A. Soory, and T.R. Raghunand, *An immunomodulatory role for the Mycobacterium tuberculosis region of difference 1 locus proteins PE35 (Rv3872) and PPE68 (Rv3873)*. FEBS Journal, 2014. **281**(6): p. 1556-1570.
27. Zhu, Q., et al., *Human B cells have an active phagocytic capability and undergo immune activation upon phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis*. Immunobiology, 2016. **221**(4): p. 558-567.
28. Schroeder, F. and D.A. Kinden, *Measurement of phagocytosis using fluorescent latex beads*. Journal of biochemical and biophysical methods, 1983. **8**(1): p. 15-27.
29. Liu, Y.-Q., et al., *Oridonin enhances phagocytosis of UV-irradiated apoptotic U937 cells*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2005. **28**(3): p. 461-467.
30. Dunn, P.A. and H.W. Tyrer, *Quantitation of neutrophil phagocytosis, using fluorescent latex beads. Correlation of microscopy and flow cytometry*. The Journal of laboratory and clinical medicine, 1981. **98**(3): p. 374-381.
31. Ryder, M., J. Winkler, and R. Weinreb, *Elevated phagocytosis, oxidative burst, and F-actin formation in PMNs from individuals with intraoral manifestations of HIV infection*. JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 1988. **1**(4): p. 346-353.
32. Schroeder, F. and A.B. Kier, *Lipid composition alters phagocytosis of fluorescent latex beads*. Journal of immunological methods, 1983. **57**(1-3): p. 363-371.
33. Starr, A.E., et al., *Biochemical characterization and N-terminomics analysis of leukolysin, the membrane-type 6 matrix metalloprotease (MMP25) chemokine and vimentin cleavages enhance cell migration and macrophage phagocytic activities*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(16): p. 13382-13395.
34. Lee, W., J. Sodek, and C. McCulloch, *Role of integrins in regulation of collagen phagocytosis by human fibroblasts*. Journal of cellular physiology, 1996. **168**(3): p. 695-704.

35. Marriott, I., et al., *Salmonella efficiently enter and survive within cultured CD11c+ dendritic cells initiating cytokine expression*. European journal of immunology, 1999. **29**(4): p. 1107-1115.
36. Zychlinsky, A., M.C. Prevost, and P.J. Sansonetti, *Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages*. Nature, 1992. **358**(6382): p. 167-169.
37. García-Pérez, B.E., et al., *Internalization of a non-pathogenic mycobacteria by macropinocytosis in human alveolar epithelial A549 cells*. Microbial pathogenesis, 2008. **45**(1): p. 1-6.
38. Kim, S.-Y., et al., *Conversion of Mycobacterium smegmatis to a pathogenic phenotype via passage of epithelial cells during macrophage infection*. Medical microbiology and immunology, 2011. **200**(3): p. 177-191.
39. Schorey, J.S., et al., *A Mycobacterium leprae gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells*. Infection and immunity, 1995. **63**(7): p. 2652-2657.
40. Shepard, C.C., *Phagocytosis by HeLa cells and their susceptibility to infection by human tubercle bacilli*. Experimental Biology and Medicine, 1955. **90**(2): p. 392-396.
41. Bermudez, L.E. and J. Goodman, *Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells*. Infection and immunity, 1996. **64**(4): p. 1400-1406.
42. Bermudez, L., K. Shelton, and L. Young, *Comparison of the ability of Mycobacterium avium, M. smegmatis and M. tuberculosis to invade and replicate within HEP-2 epithelial cells*. Tubercle and Lung Disease, 1995. **76**(3): p. 240-247.
43. Shepard, C.C., *Phagocytosis by HeLa cells and their susceptibility to infection by human tubercle bacilli*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1955. **90**(2): p. 392-6.
44. Isberg, R.R. and S. Falkow, *A single genetic locus encoded by Yersinia pseudotuberculosis permits invasion of cultured animal cells by Escherichia coli K-12*. Nature, 1985. **317**(6034): p. 262-264.
45. Bermudez, L.E. and L.S. Young, *Factors affecting invasion of HT-29 and HEP-2 epithelial cells by organisms of the Mycobacterium avium complex*. Infection and immunity, 1994. **62**(5): p. 2021-2026.

46. Sattler, N., R. Monroy, and T. Soldati, *Quantitative analysis of phagocytosis and phagosome maturation*. Dictyostelium discoideum Protocols, 2013: p. 383-402.
47. Schaible, U.E., et al., *Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages*. The Journal of Immunology, 1998. **160**(3): p. 1290-1296.
48. Shin, S.J., et al., *Rapid and reliable method for quantification of Mycobacterium paratuberculosis by use of the BACTEC MGIT 960 system*. Journal of clinical microbiology, 2007. **45**(6): p. 1941-1948.
49. Chapeton-Montes, J.A., et al., *Quantitative flow cytometric monitoring of invasion of epithelial cells by Mycobacterium tuberculosis*. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 2007. **13**: p. 650-656.
50. Sethi, D., et al., *Lipoprotein LprI of Mycobacterium tuberculosis Acts as a Lysozyme Inhibitor*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(6): p. 2938-2953.
51. Geijtenbeek, T.B., et al., *Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function*. The Journal of experimental medicine, 2003. **197**(1): p. 7-17.
52. Strahl, E.D., G.E. Gillaspay, and J.O. Falkinham, *Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and Mycobacterium scrofulaceum by Tetrahymena pyriformis and their intracellular growth*. Applied and environmental microbiology, 2001. **67**(10): p. 4432-4439.
53. Chen, P., et al., *A highly efficient Ziehl-Neelsen stain: identifying de novo intracellular Mycobacterium tuberculosis and improving detection of extracellular M. tuberculosis in cerebrospinal fluid*. Journal of clinical microbiology, 2012. **50**(4): p. 1166-1170.
54. Heesemann, J. and R. Laufs, *Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture*. Journal of clinical microbiology, 1985. **22**(2): p. 168-175.
55. Agerer, F., S. Waeckerle, and C.R. Hauck, *Microscopic quantification of bacterial invasion by a novel antibody-independent staining method*. Journal of Microbiological Methods, 2004. **59**(1): p. 23-32.
56. Shapiro, H.M., *Practical flow cytometry* 2005: John Wiley & Sons.

57. Pils, S., et al., *Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry*. Journal of Microbiological Methods, 2006. **65**(2): p. 301-310.
58. Ocampo, M., et al., *The role of Mycobacterium tuberculosis Rv3166c protein-derived high-activity binding peptides in inhibiting invasion of human cell lines*. Protein Engineering Design and Selection, 2012. **25**(5): p. 235-242.
59. Bish, S.E., W. Song, and D.C. Stein, *Quantification of bacterial internalization by host cells using a β -lactamase reporter strain: Neisseria gonorrhoeae invasion into cervical epithelial cells requires bacterial viability*. Microbes and Infection, 2008. **10**(10): p. 1182-1191.
60. Foundation, N., *The Nobel Prize in Chemistry 2008*, in NOBEL LAUREATES2008, Nobelprize: www.nobelprize.org. p. 1-6.
61. Valdivia, R.H., et al., *Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of hostpathogen interactions*. Gene, 1996. **173**(1): p. 47-52.
62. Dhandayuthapani, S., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression and cell biology of mycobacterial interactions with macrophages*. Molecular microbiology, 1995. **17**(5): p. 901-912.
63. Cosma, C.L., O. Humbert, and L. Ramakrishnan, *Superinfecting mycobacteria home to established tuberculous granulomas*. Nature immunology, 2004. **5**(8): p. 828-835.
64. Hanekom, W.A., et al., *Mycobacterium tuberculosis inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro*. Journal of Infectious Diseases, 2003. **188**(2): p. 257-266.
65. Cambier, C., et al., *Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids*. Nature, 2014. **505**(7482): p. 218-222.
66. Srivastava, V., et al., *Macrophage-specific Mycobacterium tuberculosis genes: identification by green fluorescent protein and kanamycin resistance selection*. Microbiology, 2007. **153**(3): p. 659-666.
67. Zahrt, T.C. and V. Deretic, *An essential two-component signal transduction system in Mycobacterium tuberculosis*. Journal of bacteriology, 2000. **182**(13): p. 3832-3838.

68. Zahrt, T.C. and V. Deretic, *Mycobacterium tuberculosis signal transduction system required for persistent infections*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(22): p. 12706-12711.
69. Velmurugan, K., et al., *Mycobacterium tuberculosis nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells*. PLoS Pathog, 2007. **3**(7): p. e110.
70. So, P.T. and C.Y. Dong, *Fluorescence Spectrophotometry*. ENCICLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, 2002: p. 1-4.
71. Lakowicz, J.R. and B.R. Masters, *Principles of fluorescence spectroscopy*. Journal of Biomedical Optics, 2008. **13**(2): p. 80-143.
72. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2th ed1999: Springer science + business media. 679.
73. Jones, K.H. and J.A. Senft, *An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1985. **33**(1): p. 77-79.
74. Kovaliov, M., et al., *Synthesis and evaluation of a photoresponsive quencher for fluorescent hybridization probes*. Organic & biomolecular chemistry, 2014. **12**(39): p. 7844-7858.
75. Arora, A., M. Sunbul, and A. Jäschke, *Dual-colour imaging of RNAs using quencher- and fluorophore-binding aptamers*. Nucleic acids research, 2015. **43**(21): p. e144-e144.
76. Arai, S., et al., *Fluorescent "Turn-on" system utilizing a quencher-conjugated peptide for specific protein labeling of living cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2011. **404**(1): p. 211-216.
77. Liu, M., et al., *Instrument response standard in time-resolved fluorescence spectroscopy at visible wavelength: quenched fluorescein sodium*. Applied spectroscopy, 2014. **68**(5): p. 577-583.
78. Santos, E.O., A.E.C. Azzolini, and Y.M. Lucisano-Valim, *Optimization of a flow cytometric assay to evaluate the human neutrophil ability to phagocytose immune complexes via Fcγ and complement receptors*. Journal of pharmacological and toxicological methods, 2015. **72**: p. 67-71.

79. Chmyrov, A., T. Sandén, and J. Widengren, *Iodide as a Fluorescence Quencher and Promoter • Mechanisms and Possible Implications*. The Journal of Physical Chemistry B, 2010. **114**(34): p. 11282-11291.
80. Parker, C. and T.A. Joyce, *Prompt and delayed fluorescence of some DNA adsorbates*. Photochemistry and photobiology, 1973. **18**(6): p. 467-474.
81. Komiyama, T., T. Miwa, and M. Koizumi, *Studies of the quenching of the fluorescence of acridine orange from the standpoint of charge-transfer*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1966. **39**(12): p. 2597-2602.
82. Gehlen, M.H., P.B. Fo, and M.G. Neumann, *Fluorescence quenching of acridine orange by aromatic amines in cationic, anionic and non-ionic micelles*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 1991. **59**(3): p. 335-340.
83. Feng, X.-Z., et al., *Investigation of the interaction between acridine orange and bovine serum albumin*. Talanta, 1998. **47**(5): p. 1223-1229.
84. Lyles, M.B. and I.L. Cameron, *Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA*. Biophysical chemistry, 2002. **96**(1): p. 53-76.
85. Reungpatthanaphong, P., et al., *Rhodamine B as a mitochondrial probe for measurement and monitoring of mitochondrial membrane potential in drug-sensitive and-resistant cells*. Journal of biochemical and biophysical methods, 2003. **57**(1): p. 1-16.
86. Targowski, P., B. Ziętek, and A. Bączyński, *Luminescence quenching of rhodamines by cyclooctatetraene*. Zeitschrift für Naturforschung A, 1987. **42**(9): p. 1009-1013.
87. Pang, Y., et al., *Fluorescence quenching of cationic organic dye by graphene: interaction and its mechanism*. IET Micro & Nano Letters, 2012. **7**(7): p. 608-612.
88. Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Principios de analisis instrumental*. Sexta edición 2008, Santa fe-Mexico D,F: Cengage Learning.
89. Miller, J. and J. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 2010.
90. Polysciences, I., *Phagocytosis and microparticles*, in *Data sheet #430*, Polysciences, Inc.: www.polysciences.com. p. 1-4.

91. Katila, M. and R. Mäntyjärvi, *Acridine orange staining of smears for demonstration of Mycobacterium tuberculosis*. European journal of clinical microbiology, 1982. **1**(6): p. 351-353.
92. Aodongeri, K.Y., et al., *Fluorescent Viability Assay of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis by carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester and carboxyfluorescein diacetate*. Intern J Appl Res Vet Med, 2009. **7**.
93. Jarnagin, J. and D. Luchsinger, *The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria*. Stain Technology, 1980. **55**(4): p. 253-258.
94. Selvaraju, S., I. Khan, and J. Yadav, *Specific detection and quantification of culturable and non-culturable mycobacteria in metalworking fluids by fluorescence-based methods*. Letters in applied microbiology, 2008. **47**(5): p. 451-456.
95. Peyron, P., et al., *Nonopsonic phagocytosis of Mycobacterium kansasii by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(9): p. 5186-5191.
96. Wellmann, K.F. and K.P. Teng, *Demonstration of acid-fast bacilli in tissue sections by fluorescence microscopy: a study with clinical and histopathological correlations*. Canadian Medical Association Journal, 1962. **87**(16): p. 837.
97. McCLURE, D., *The development of fluorescence microscopy for tubercle bacilli and its use as an adjunct to histological routine*. Journal of clinical pathology, 1953. **6**(4): p. 273.