



**ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LOS
GENES *Rv1686c-Rv1687c* y *Rv3161c* DE
Mycobacterium tuberculosis EN LA
RESISTENCIA A FÁRMACOS**

ANDROMEDA CELESTE GÓMEZ CAMACHO

2013



**Departament de Genètica i de Microbiologia
Institut de Biotecnologia i de Biomedicina**



**Estudio de la implicación de los genes
Rv1686c-Rv1687c y *Rv3161c* de
Mycobacterium tuberculosis en la
resistencia a fármacos**

Tesis Doctoral presentada por
Andromeda Celeste Gómez Camacho
para optar al Grado de Doctora

Visto bueno de los Directores de la Tesis,

Dr. Isidre Gibert González

Dra. Núria Andreu Martín

A mi familia y a Gustavo

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un
esfuerzo total es una victoria completa*

Mahatma Gandhi

Índice



Índice

Resumen	vii
Abstract.....	ix
Abreviaturas	xi
1. Introducción	1
1.1. La Tuberculosis en el mundo	1
1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.2.1. Características generales del género <i>Mycobacterium</i>	4
1.2.2. Genoma de <i>M. tuberculosis</i>	6
1.2.3. Proteoma de <i>M. tuberculosis</i>	8
1.2.4. Envuelta de <i>M. tuberculosis</i>	10
1.2.4.1. Membrana celular	12
1.2.4.2. Pared celular.....	12
1.2.4.3. Cápsula.....	13
1.2.4.4. Proteínas similares a porinas	13
1.3. Patogénesis.....	14
1.4. Interacciones huésped-patógeno.....	16
1.4.1. Factores de virulencia	16
1.4.2. Respuesta inmune	17
1.4.2.1. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.....	19
1.5. Diagnóstico	21
1.6. Prevención.....	23
1.6.1. BCG.....	23

1.6.2. Nuevas vacunas	24
1.7. Tratamiento	27
1.7.1. Esquema general	27
1.7.2. Tratamiento de cepas resistentes y multirresistentes	29
1.7.3. Tratamiento de pacientes VIH positivo.....	30
1.7.4. Nuevos fármacos	31
1.8. Resistencia	32
1.8.1. Mecanismos de Resistencia.....	33
1.8.1.1. Sistemas de eflujo	34
1.8.1.1.1. Transportadores ABC	36
1.8.1.1.2. Transportadores MFS	37
1.8.1.1.3. Transportadores MATE.....	38
1.8.1.1.4. Transportadores SMR.....	38
1.8.1.1.5. Transportadores RND	39
1.8.1.2. Resistencia por modificación o degradación enzimática.....	39
1.8.1.2.1. Hidrólisis.....	40
1.8.1.2.2. Resistencia por transferencia de grupo	41
1.8.1.2.3. Otros mecanismos de resistencia enzimática.....	42
1.8.1.2.3.1. Enzimas redox.....	42
1.8.1.2.3.2. Liasas	42
1.8.1.3. Resistencia por alteración de la diana.....	43
1.8.2. Papel de los biocidas en resistencia	43
1.8.2.1. Triclosán	44
1.8.3. Mecanismos de resistencia en <i>M. tuberculosis</i>	47
1.8.3.1. Resistencia intrínseca.....	48
1.8.3.1.1 Sistemas de eflujo.....	48

1.8.3.1.2. Sistemas de modificación	53
1.8.3.2. Resistencia adquirida	54
1.8.3.3. Inducción de sistemas de detoxificación en <i>M. tuberculosis</i>	57
1.8.3.3.1. Posibles sistemas de detoxificación de <i>M. tuberculosis</i> Rv1685c-Rv1686c-Rv1687c y Rv3160c-Rv3161c	57
2. Objetivos	3
3. Materiales y métodos	63
3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.....	63
3.2. Métodos microbiológicos	65
3.2.1. Medios de cultivo, antibióticos y otras soluciones.....	65
3.2.1.1. Medios de Cultivo	65
3.2.1.2. Antibióticos	67
3.2.1.3. Otras soluciones	68
3.2.2. Condiciones de crecimiento y conservación de cepas.....	68
3.3. Métodos genéticos	69
3.3.1. Transformación	69
3.3.1.1. Transformación de <i>E. coli</i>	70
3.3.1.2. Electroporación de <i>Mycobacterium</i>	71
3.4. Métodos de manipulación de DNA.....	73
3.4.1. Miniextracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	73
3.4.2. Extracción de DNA plasmídico de <i>Mycobacterium</i>	76
3.4.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	77
3.4.4. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.....	79
3.4.5. Digestión con enzimas de restricción.....	80
3.4.6. Clonación en vectores plasmídicos.....	80

Índice

3.4.6.1 Obtención de extremos romos.....	80
3.4.6.2. Desfosforilación	81
3.4.6.3 Ligación	81
3.4.7. Amplificación y secuenciación de DNA.....	82
3.4.7.1. PCR	82
3.4.7.2. Secuenciación	84
3.4.8. Mutagénesis	85
3.5. Métodos de manipulación de RNA.....	92
3.5.1. Extracción de RNA total	92
3.5.2. Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA.....	95
3.5.2.1. Cuantificación por espectrofotometría	96
3.5.2.2. Cuantificación por Nanodrop	96
3.6. Métodos de manipulación de proteínas	96
3.6.1. Obtención de extractos proteicos.....	96
3.6.2. Determinación de la concentración de proteínas	97
3.6.3. Electroforesis de proteínas.....	98
3.6.4. Geles bidimensionales (2DE).....	101
3.6.4.1. Obtención de extractos proteicos para 2DE	102
3.6.4.2. Determinación de la concentración de proteínas para 2DE	103
3.6.4.3. Limpieza de la muestra para el IEF	104
3.6.4.4. Primera dimensión (IEF).....	105
3.6.4.5. Segunda dimensión	110
3.6.4.6. Tinción con plata.....	113
3.6.4.7. Análisis de Imágenes.....	114

3.6.4.8. Extracción de <i>spots</i>	115
3.6.4.9. Desteñido de <i>spots</i>	115
3.6.4.10. Digestión enzimática.....	115
3.6.4.11. Purificación de la muestra	116
3.6.5. Espectrometría de masas	116
3.6.6. Electroforesis en Gel Diferencial 2-D (2D-DIGE)	120
3.6.6.1. Preparación de la Muestra para 2D-DIGE.....	121
3.6.6.2. Reconstitución de los fluoróforos.....	121
3.6.6.3. Marcaje de las muestras.....	122
3.6.6.4. Preparación de las muestras para la primera dimensión (IEF)	122
3.7. Análisis de la expresión génica.....	123
3.7.1. RT-PCR.....	123
3.7.2. PCR en Tiempo Real (<i>Real time</i> -PCR).....	124
3.8. Métodos de caracterización fenotípica.....	126
3.8.1. CMI.....	126
3.8.1.1. Ensayo en microplaca de la resazurina (REMA).....	126
3.8.2. Ensayo de permeabilidad.....	129
3.9. Métodos de manipulación de cultivos celulares	130
3.9.1. Mantenimiento y manipulación de líneas celulares.....	130
3.9.1.1. Congelación de las células	130
3.9.1.2. Descongelación de las células	131
3.10. Análisis de la virulencia de <i>M. tuberculosis</i> en macrófagos	131
3.10.1. Preparación de stocks de cultivos de para la infección.....	131
3.10.2. Ensayo de infección	131

3.10.3. Ensayo de resistencia al peróxido de hidrógeno.....	133
4. Resultados	135
4.1. Estudio del efecto del triclosán sobre la expresión de los genes <i>Rv1687c</i> y <i>Rv3161c</i>	135
4.2. Construcción de los mutantes <i>Rv1686c-Rv1687c</i> y <i>Rv3161c</i> en <i>M. tuberculosis</i>	135
4.2.1. Mutante del transportador ABC (<i>Rv1686c-Rv1687c</i>).....	136
4.2.2. Mutante de la dioxigenasa (<i>Rv3161c</i>).....	138
4.3. Construcción de cepas sobreproductoras de <i>Rv1686c-Rv1687c</i> y <i>Rv3161c</i>	140
4.3.1. Comprobación de las cepas sobreproductoras.....	140
4.4. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes y sobreproductoras..	146
4.4.1. Crecimiento y morfología colonial	146
4.4.2. Análisis de susceptibilidad a compuestos	146
4.4.3. Estudio de la virulencia	148
4.4.4. Estudio de la resistencia al H ₂ O ₂	149
4.5. Estudio de la resistencia a triclosán en <i>M. tuberculosis</i>	150
4.5.1. Implicación de bombas de eflujo	150
4.5.2. Implicación de la envuelta celular	151
4.5.3. Análisis proteómico	152
5. Discusión	159
6. Conclusiones.....	167
7. Bibliografía	169

Resumen

Resumen

La tuberculosis es considerada como una de las enfermedades infecciosas más importantes del mundo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud un tercio de la población mundial ha estado expuesta al agente causal *Mycobacterium tuberculosis*, que causa cerca de dos millones de muertes al año. La complejidad y duración del tratamiento, así como la aparición de cepas resistentes, exigen mejorar el conocimiento de los mecanismos de resistencia así como desarrollar nuevos fármacos o inhibidores que sean más eficaces.

La resistencia de *M. tuberculosis* a antimicrobianos es debida a varios mecanismos operan en muchos casos simultáneamente. Entre ellos están las mutaciones en genes diana, la producción de enzimas que modifican o inactivan fármacos, la baja permeabilidad de la pared celular y las bombas de eflujo. Muchos de estos mecanismos de detoxificación son inducidos por diferentes compuestos incluidos los fármacos utilizados para el tratamiento. Estudios previos mostraron que el triclosán, un biocida con alta actividad antimicrobiana, induce en *M. tuberculosis* dos posibles sistemas de detoxificación: una posible dioxigenasa codificada por *Rv3161c* y un posible transportador tipo ABC codificado por *Rv1686c-Rv1687c*, sugiriendo que estos sistemas podrían tener un papel en el bajo efecto del triclosán en *M. tuberculosis*. También, se ha observado que el transportador ABC *Rv1686c-Rv1687c* se induce en macrófagos activados, en respuesta al H_2O_2 y a la privación de nutrientes sugiriendo que podría tener un papel en la virulencia de la bacteria.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el papel de estos sistemas en la resistencia al triclosán y otros compuestos así como en la virulencia de *M. tuberculosis*. Para ello se estudió el efecto del triclosán a nivel transcripcional en la cepa H37Rv en donde se detectaron altos niveles de expresión de los genes *Rv1687c* y *Rv3161c*, confirmando que estos sistemas se inducen en presencia del biocida tal y como había sido reportado en la literatura. Posteriormente, se obtuvieron mutantes deficientes y cepas sobreproductoras de ambos sistemas que se usaron para evaluar la CMI del triclosán y otros fármacos. Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, no se observaron diferencias en las CMIs de estas cepas y las de los controles. Así mismo, se estudió el papel de estas proteínas en la virulencia, infectando macrófagos murinos con cepas deficientes y sobreproductoras de ambos sistemas. Los resultados no mostraron ningún efecto en la virulencia ni en la proliferación del bacilo en el interior de los macrófagos.

Resumen

A continuación se estudiaron otros factores que podrían estar implicados en la resistencia intrínseca de *M. tuberculosis* al triclosán. Así se comprobó que la impermeabilidad de la envuelta celular estaría en parte implicada en la resistencia al biocida. También se estudió el papel de las bombas de eflujo utilizando inhibidores de las mismas. Los resultados no mostraron evidencia de la participación de bombas de eflujo en la resistencia al biocida. Finalmente se analizó el efecto del triclosán a nivel proteómico detectándose un aumento en la abundancia de la proteína codificada por *Rv3161c* y una disminución de las proteínas ThiC y PepQ.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que aunque la dioxigenasa *Rv3161c* y el transportador ABC *Rv1686c-Rv1687c* se inducen en presencia del triclosán, no están implicados en la resistencia de *M. tuberculosis* a este biocida ni a otros fármacos ensayados en este trabajo. La inducción de estos sistemas podría estar relacionada con algún mecanismo de detoxificación de metabolitos generados en respuesta al daño celular provocado por el triclosán.

Abstract



Abstract

Tuberculosis remains one of the most widespread infectious diseases in the world. According to the World Health Organisation, a third of the world's population has been exposed to *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent, which causes around two million deaths a year. The complexity and duration of the treatment, as well as the emergence of drug-resistant strains, require a better knowledge of the drug-resistance mechanisms and the development of new drugs or inhibitors that are more effective.

The resistance of *M. tuberculosis* to antimicrobials is due to multiple mechanisms operating simultaneously in many cases. These include mutations in the target genes, production of enzymes that modify or inactivate drugs, low cell-wall permeability and efflux pumps. Many of these detoxification mechanisms are induced by different compounds, including the drugs used in treatment. Previous studies have shown that triclosan, a biocide with high antimicrobial activity, induces two possible detoxification systems in *M. tuberculosis*: a dioxygenase encoded by *Rv3161c* and an ABC transporter encoded by *Rv1686c-Rv1687c*, suggesting that these systems could play a role in the limited effect of triclosan on *M. tuberculosis*. It has also been observed that the ABC transporter *Rv1686c-Rv1687c* is induced in response to H₂O₂ and to the lack of nutrients, suggesting that this could play a role in the virulence of the bacteria.

In this context, the objective of this work was to assess the role of these systems in the resistance to triclosan and other compounds as well as in the virulence of *M. tuberculosis*. To do this, the effect of triclosan on transcriptional activity was assessed in the strain H37Rv in which high levels of expression of the genes *Rv1687c* and *Rv3161c* were detected, confirming that these systems are induced in the presence of the biocide, as had been reported in the literature. Then, deficient mutants and overproducing strains of both systems were used to assess the MIC of triclosan and other drugs. However, contrary to what was expected, no differences were observed in the MICs between these strains and the control. The role of these proteins in the virulence was also studied by infecting murine macrophages with deficient and overproducing strains of both systems. The results did not show an effect on either the deficiency or overproduction in the virulence and proliferation of the bacillus inside the macrophages.

Abstract

In order to identify the mechanisms related to the intrinsic resistance of *M. tuberculosis* to triclosan, the role of the cell envelope was assessed, and it was confirmed that biocide resistance may be related to its impermeable nature. The role of other possible efflux pumps was studied using inhibitors, and there was no evidence of the participation of any pump mediating in the biocide resistance. The effect of triclosan on *M. tuberculosis* proteome was also assessed in which an increase in the protein encoded by *Rv3161c* and a reduction in the proteins ThiC and PepQ were detected.

The results obtained in this work suggest that although the dioxygenase *Rv3161c* and the ABC transporter *Rv1686c-Rv1687c* are induced in the presence of triclosan, they are not involved in the resistance of *M. tuberculosis* to this biocide or to other drugs tested in this work. The induction of these systems could be related to a detoxification mechanism of metabolites generated in response to the cell damage caused by triclosan.

Abreviaturas



Abreviaturas

2DE	<i>2 Dimensional electrophoresis</i> , electroforesis bidimensional
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> , <i>cassette</i> de unión a ATP
ACN	Acetonitrilo
AES	Alellic Exchange Substrate, sustrato de intercambio alélico
ASB-14	<i>Amidosulfobetaine-14</i> , amidosulfobetaina 14
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , colección americana de cultivos tipo
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albúmina de suero bovino
CCCP	<i>Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone</i> , carbonilcianuro- <i>m</i> -clorofenilhidrazona
CD	Cluster of differentiation, grupo de diferenciación
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> , centro para el control y la prevención de enfermedades
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i> , 3-[(3-cloroamido propil) dimetilamonio]-1-propanosulfato
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CTAB	<i>Cetyl trimethylammonium bromide</i> , bromuro de cetiltrimetilamonio
DIGE	<i>Difference Gel Electrophoresis</i> , electroforesis en gel diferencial
DMF	Dimetilformamida
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> : DNA de doble cadena
DTT	<i>Dithiothreitol</i> , ditiotreitól
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , suero fetal bovino
Fc	<i>Fc Receptor</i> , receptor de la fracción cristalizable
GC	Guanina y Citosina
GTC	Tiocianato de Guanidina
Hyg	Higromicina
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
IEF	<i>IsoElectric Focusing</i> , enfoque isoeléctrico
IL	Interleuquina
IFN- γ	Interferón γ
INH	Isoniacida
IPG strip	<i>Immobiline™ DryStrip gel</i> , tira de gradiente de pH inmovilizado

Abreviaturas

KM	Kanamicina
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight</i> , desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo
MATE	<i>Multidrug and toxic compound extrusión</i> , familia de extrusión de múltiples compuestos tóxicos y fármacos
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> , sitio de clonación múltiple
MDR-TB	<i>Multidrug Resistant-Tuberculosis</i> , tuberculosis multirresistente
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i> , superfamilia de facilitadores principales
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , complejo mayor de histocompatibilidad
miscRNA	<i>Miscellaneous other RNA</i> , otros ácidos ribonucleicos
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , multiplicidad de infección
MPTR	<i>Major Polymorphic Tandem Repeats</i> , principales repeticiones polimórficas en tandem
MR	<i>Mannose Receptors</i> , receptores de manosa
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , ácido ribonucleico mensajero
MSD	<i>Membrane-Spanning Domains</i> , dominio transmembranal
MSF	<i>Major Facilitator Superfamily</i> , superfamilia de facilitadores principales
MTBC	<i>M. tuberculosis complex</i> , complejo <i>M. tuberculosis</i>
MW	Masa molecular
NBD	<i>Nucleotide-Binding Domain</i> , dominio de unión a nucleótido
ncRNA	<i>Non-coding RNA</i> , ácido ribonucleico no codificante
NK	<i>Natural Killer</i> , célula asesina natural
OD	<i>Optical Density</i> , densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>Open Reading frame</i> , marco abierto de lectura
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PDIM	<i>Phthiocerol Dimycocerosates</i> , dimicocerosato de ftiocerol
PGRS	<i>Polymorphic CG rich Sequences</i> , secuencias polimórficas ricas en GC
pI	Punto isoeléctrico
PMF	<i>Peptide mass fingerprint</i> , huella peptídica
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i> , derivado proteico purificado
REMA	<i>Resazurin microtiter assay</i> , ensayo en microplaca de la resazurina
RFF	<i>Relative Final Fluorescence</i> , fluorescencia final relativa
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico
rRNA	<i>Ribosomal RNA</i> , ácido ribonucleico ribosomal

RND	<i>Resistance-Nodulation-Division</i> , superfamilia de resistencia-nodulación-división
RNI	<i>Reactive Nitrogen Intermediates</i> , intermediarios reactivos del nitrógeno
ROI	<i>Reactive Oxygen Intermediates</i> , intermediarios reactivos del oxígeno
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-PCR</i> , PCR con transcripción inversa
SBP	<i>Substrate Binding Protein</i> , proteína de unión a sustrato
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i> , familia menor de resistencia a múltiples fármacos
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TB	Tuberculosis
TE	Tris-EDTA
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> , ácido trifluoroacético
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> , receptor Toll-like
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> , factor de necrosis tumoral- α
TRC	Triclosán
tRNA	<i>Transfer RNA</i> , RNA de transferencia
XDR-TB	<i>Extensively Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis</i> , tuberculosis extremadamente resistente.

Introducción



1. Introducción

1.1. La Tuberculosis en el mundo

Aunque el impacto de la tuberculosis en el mundo ha sido muy fuerte en los dos últimos siglos, la enfermedad ha coexistido con la humanidad por milenios. Existen evidencias de la enfermedad en esqueletos del antiguo Egipto así como descripciones de enfermedades respiratorias con síntomas similares a los de la tuberculosis en la antigua Grecia, Asiria, China e India [1, 2]. Otros estudios han mostrado que contrario a lo que se pensaba, la tuberculosis existió en el nuevo mundo 500 años antes del descubrimiento; y prueba de ello fue el hallazgo de DNA bacteriano en una momia [3].

Varias hipótesis apuntan a que la tuberculosis se originó como resultado de un cuello de botella evolutivo ocurrido hace 20.000 a 35.000 años probablemente en el este africano y que posteriormente pudo haberse adaptado a animales (posiblemente ganado) para luego ser transmitido a la población humana en la medida que los animales fueron domesticados para la agricultura; sin embargo el origen preciso de la tuberculosis es desconocido [4, 5].

Con el aumento de la industrialización en los siglos XVIII y IX junto con las concentraciones urbanas en condiciones insalubres generaron un ambiente propicio para la propagación de la enfermedad que se consideraba incurable, convirtiéndose en una causa frecuente de muerte [6]. La epidemia en Europa y en los Estado Unidos alcanzó su pico a finales de 1700 y principios de 1800; incluso llegando a desplazar a enfermedades como el tifus o el cólera en Inglaterra [3]. Mucho se especulaba sobre la enfermedad pero no fue hasta 1865 que el cirujano Jean-Antoine Villemin demostró que la enfermedad era contagiosa, inoculando ratones con muestras provenientes de lesiones humanas, aunque se desconocía el agente causal [6]. El 24 de marzo de 1882 se llevó a cabo uno de los anuncios más importantes en la historia de la medicina de la época en el que Robert Koch demostró que una bacteria que tenía en cultivo, aislada de lesiones tuberculosas era capaz de infectar animales de laboratorio y reproducir la enfermedad con lo que pudo establecer que dicho microorganismo era el agente causal de la tuberculosis [3, 6].

Koch continuó sus investigaciones encaminadas a obtener una cura para la enfermedad y logró producir un extracto bacteriano al que llamó tuberculina, que utilizó sin éxito como agente inmunizante y luego como tratamiento, pero que posteriormente pudo ser usado como herramienta diagnóstica y que aún hoy es utilizada en una versión más moderna [3]. Otro avance importante fueron los rayos X descubiertos en

Introducción

1895 por Wilhelm Konrad que permitió establecer la severidad de la enfermedad y hacer un seguimiento del progreso de los pacientes [3]. A finales de 1800 se importó de Europa a Estados Unidos un modelo en el que los pacientes eran internados en sanatorios donde estaban bajo supervisión y se les brindaba cuidados en la alimentación y se mantenían en reposo, por lo que se retiraron de las ciudades las fuentes de contagio de la enfermedad. Por otro lado, a principios del siglo XX, se realizaron campañas educativas en las que se enfatizaba en la importancia de la buena higiene y los buenos hábitos de salud [3].

En los años veinte se implementó el uso de la vacuna Bacilo Calmette-Guerin (BCG), derivada de una cepa de *Mycobacterium bovis* que inicialmente fue aislada en 1908 usando un medio específico y que se atenuó mediante una serie de pases en el laboratorio. Los ensayos clínicos en India y África confirmaron su eficacia, particularmente para la tuberculosis del sistema nervioso central y miliar; pero ensayos posteriores mostraron que no era efectiva en algunas poblaciones [3, 7].

Una nueva etapa se dio con la introducción de fármacos anti-tuberculosos lo que produjo una importante disminución de la mortalidad. Las sulfamidas y penicilinas habían sido ya usadas durante varios años para tratar enfermedades infecciosas, pero éstas eran ineficaces contra la tuberculosis [3]. En 1940 el grupo de Selman A. Waksman logró aislar la actinomicina que mostró un efecto anti-tuberculoso, pero con el inconveniente de que era tóxico en animales y humanos [7]. En 1943 se obtuvo la estreptomina, que mostró una máxima inhibición de la bacteria y una baja toxicidad por lo que a finales de 1944 se implementó su uso en pacientes [8]. Aunque muchos enfermos se curaron, una proporción importante sufrió recaídas de la enfermedad y aislados de dichos pacientes mostraron resistencia al tratamiento [8]. Una sucesión de nuevos fármacos anti-tuberculosos empezaron a aparecer en los siguientes años como la tiazetazona y el ácido *p*-aminosalicílico (1948) que cuando se combinaban con estreptomina aumentaba la tasa de curación y disminuía la tasa de resistencia; la isoniacida (INH) usada en 1951 en Nueva York que mejoró los resultados clínicos y se introdujo para un uso más amplio; la pirazinamida (1952), cicloserina (1952), etionamida (1956), rifampicina (1957) y el etambutol (1962) [7, 8].

Con la llegada de nuevos fármacos, se produjo la selección de mutaciones que conferían resistencia y fue así como se implementó el uso de una terapia combinada [8]. La mejora de la calidad de vida, la vacunación junto con la implementación de un tratamiento hizo que algunos expertos declararan que la tuberculosis había sido eliminada como problema de salud pública y fue así como en Estados Unidos se

redujeron los fondos federales destinados a la investigación y por consiguiente se vio afectado el descubrimiento de nuevos fármacos, el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y la obtención de una vacuna más efectiva [8]. En 1985 hubo un importante incremento en la incidencia de la enfermedad y en sitios como el África subsahariana el aumento fue de hasta un 500%. Sin duda el VIH jugó un papel importante en el resurgimiento de la tuberculosis en el mundo, donde factores como la pobreza, el consumo de drogas y la falta de vivienda promovieron la co-infección con el virus, también como la aparición de cepas de tuberculosis multirresistentes (MDR-TB, *Multidrug Resistance Tuberculosis*) a fármacos por su uso inadecuado [7, 8].

En el año 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la tuberculosis como una emergencia de salud pública global por lo que en los años 1994 y 1995, se implementó un programa conocido como terapia de corta duración observada directamente (DOTS, *Directly Observed therapy Short-Course*) [8, 9]. Este programa consta de 5 componentes dirigidos al asegurar el compromiso político con una financiación adecuada y sostenida, garantizar la detección temprana de casos y el diagnóstico mediante pruebas de alta calidad, implementar una terapia estandarizada con la supervisión y apoyo al paciente, asegurar la oferta y gestión de medicamentos eficaces y hacer un seguimiento de los pacientes tratados [9]. En el año 2004 esta estrategia fue adoptada por 183 países incluyendo 22 en los cuales la incidencia de la enfermedad era muy alta. Adicionalmente, la OMS creó el programa DOTS-Plus dirigido al control de cepas MDR-TB [7, 9].

Pese a los esfuerzos hechos a nivel mundial para contrarrestar la tuberculosis, actualmente ésta permanece como una de las enfermedades infecciosas más importantes. Así en el año 2011 se presentaron cerca de 9 millones de nuevos casos y 1.4 millones de muertes (Fig. 1.1), de las cuales 990.000 fueron de pacientes VIH negativo y 430.000 pacientes VIH positivo [9]. En el año 2006 la OMS lanzó la estrategia “*Stop TB*” como parte de los objetivos de desarrollo del milenio con el fin de reducir la incidencia de la tuberculosis para el año 2015 y que la tasa de prevalencia y mortalidad disminuyan a la mitad en comparación con los niveles obtenidos en 1990. Los objetivos de esta estrategia son: el acceso a una atención de calidad, la protección de poblaciones vulnerables, el soporte al desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas, así como de fármacos y vacunas facilitando su uso oportuno y efectivo; y la promoción de la prevención y el cuidado y el control de la enfermedad [9].

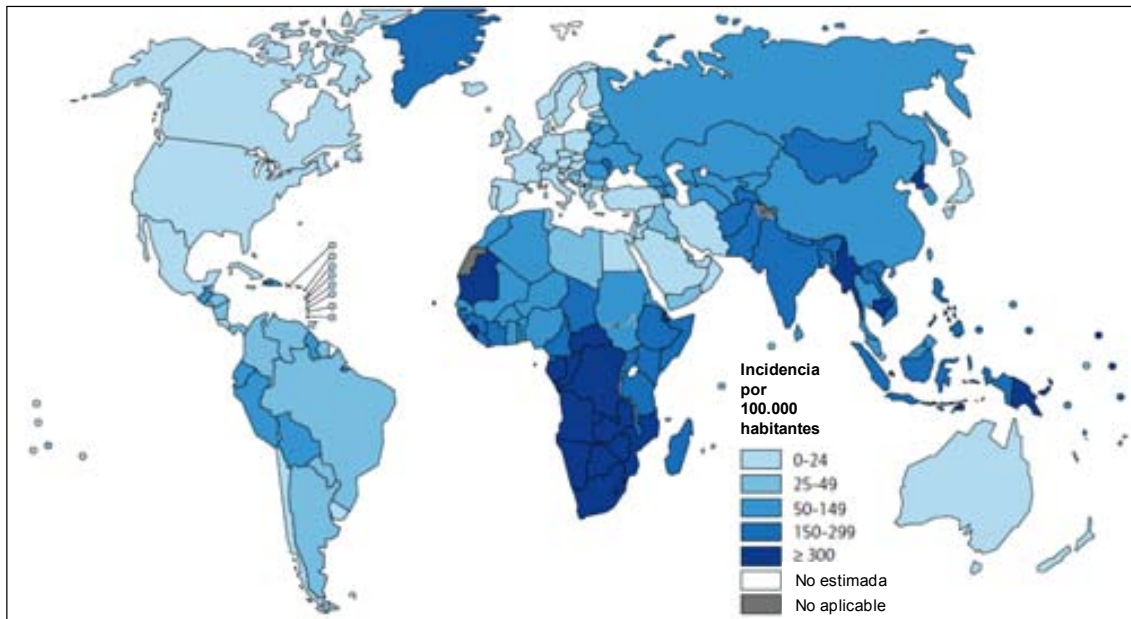


Figura 1.1. Incidencia global estimada de casos de tuberculosis en el 2011. Modificado de [9].

1.2. *Mycobacterium tuberculosis*

1.2.1. Características generales del género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* introducido por Lehmann y Neuman en 1896 es el único miembro de la familia *Mycobacteriaceae* perteneciente al orden *Actinomycetales*. Este género es el más conocido por sus dos especies patógenas *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, agentes causales de la tuberculosis y la lepra respectivamente. Existen 158 especies y 13 subespecies pertenecientes a este género, registradas en la base de datos “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*” hasta marzo de 2013 [10]. Los miembros de este género son bacilos rectos o ligeramente curvos que miden de 0.2 a 0.6 μm por 1 a 10 μm , son aerobios o microaerófilos, no móviles ni formadores de esporas, son resistentes a la decoloración por una combinación ácido-alcohol, poseen un alto contenido de guanina-citosina (GC, 58%-70%) también como una alta concentración de lípidos en su pared y ácidos micólicos de 60-90 carbonos lo que las hace muy hidrofóbicas [11, 12].

A nivel fenotípico, las especies de este género se pueden diferenciar en base a su velocidad de crecimiento, siendo de crecimiento rápido las que requieren de una semana o menos para crecer en medio sólido como por ejemplo *Mycobacterium smegmatis*, y de crecimiento lento cuando requieren de más de una semana como *M. tuberculosis*, esta diferenciación coincide con la clasificación a nivel filogenético [11] (Fig. 1.2). También se pueden diferenciar teniendo en cuenta la temperatura de

crecimiento que puede ser de 20°C a 50°C, el tiempo de duplicación (2-24 horas), la morfología de las colonias (rugosas o lisas), la producción de pigmentos en presencia o ausencia de luz en donde se denominan fotocromógenas (requieren de la luz para formar pigmentos), escotocromógenas (forman pigmento en presencia o ausencia de luz) y no cromógenas (no productoras de pigmentos) [11]. Además, son de utilidad las propiedades bioquímicas específicas como la presencia o ausencia de algunas enzimas como la ureasa, la arilsulfatasa y la catalasa, producción de niacina, reducción de nitratos y susceptibilidad a pirazinamida y hidracida del ácido tiofeno-2 carboxílico (TCH) [11].

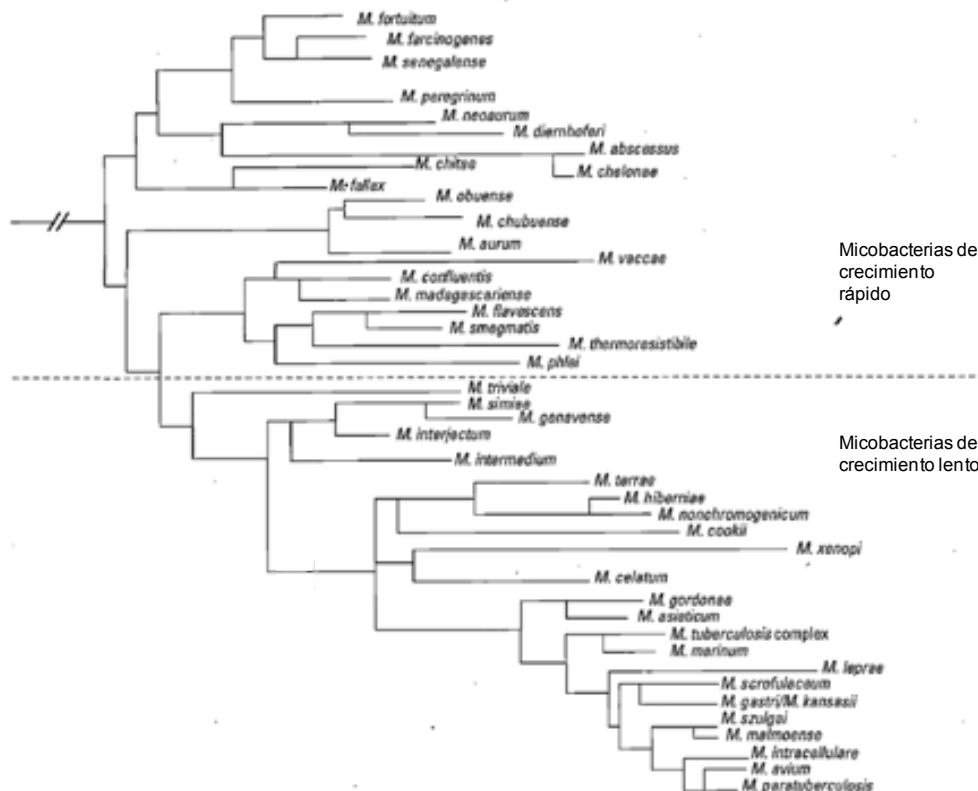


Figura 1.2. Árbol filogenético de 44 micobacterias a partir de las secuencias del rDNA 16S. Tomado de [11].

Hasta los años ochenta, las características fenotípicas eran la única herramienta disponible para clasificar las especies de micobacterias aunque éstas no permitían en muchos casos precisar la identificación. En este contexto, herramientas como la secuenciación de DNA, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) y la hibridación DNA-DNA han permitido una clasificación más adecuada así como la descripción y subsecuente adición de nuevas especies [11].

Desde el punto de vista clínico, las micobacterias se pueden clasificar en tres grupos principales: (1) patógenos estrictos, los cuales incluyen los patógenos

Introducción

humanos *M. tuberculosis* y *M. leprae*, así como el patógeno animal *M. bovis*; (2) patógenos oportunistas o potencialmente oportunistas que incluyen a *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium xenopi* y (3) patógenos raros que incluyen saprófitos tales como *M. smegmatis* y *Mycobacterium phlei* [11, 13, 14]. También las micobacterias se agrupan en complejos: complejo *M. tuberculosis* (MTBC, *M. tuberculosis complex*) que comprende siete miembros estrechamente relacionados: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium canettii*; complejo *Mycobacterium avium- Mycobacterium intracellulare* (MAC, *M. avium-M. intracellulare complex*) cuyos miembros causan infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos y complejo otras micobacterias (MOTT, *Mycobacteria other than the M. tuberculosis complex*) para micobacterias no tuberculosas que incluye el resto de las especies, algunas de las cuales han sido asociadas con enfermedades en humanos [11, 13, 14].

Los miembros del complejo *M. tuberculosis* se caracterizan por tener sus secuencias de rRNA 16s idénticas y una alta similitud genética (99.9%) aunque exhiben fenotipos, patologías y huéspedes diferentes. Se ha sugerido que los miembros de este complejo surgieron como resultado de la expansión clonal derivada de un cuello de botella evolutivo y que pueden ser vistos como ecotipos que se han adaptado a huéspedes diferentes [13]. La tuberculosis humana es causada principalmente por *M. tuberculosis* también como por *M. africanum* que ha sido principalmente aislada en países africanos, *M. bovis* que afecta también a bovinos y *M. canetti* aislado en raras ocasiones. *M. pinnipedii* afecta pinnípedos, *M. caprae* afecta cabras y cerdos y *M. microti* a roedores [13].

1.2.2. Genoma de *M. tuberculosis*

Uno de los avances más importantes en la investigación de la tuberculosis fue la secuenciación del genoma de la cepa H37Rv en 1998, ya que ha proporcionado información en cuanto a su fisiología, mecanismos de infección, patogénesis, virulencia y persistencia [15]. Aunque queda mucho por dilucidar, la disponibilidad de la secuencia completa del genoma abre nuevas perspectivas en la investigación encaminada al desarrollo de nuevos tratamientos, herramientas diagnósticas y una vacuna más eficaz [15, 16].

El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv posee 4.4 Mb que de acuerdo con la base de datos Tuberculist (versión R27 de marzo de 2013) tiene 4018 genes predichos (incluyendo 13 pseudogenes, 45 tRNA, 3 rRNA, 30 ncRNA, 2 miscRNA) que

representan un 91.2% de potencial codificante y un contenido de GC del 65.9% que es constante en todo el genoma a excepción de las regiones polimórficas ricas en GC (PGRS, *Polymorphic CG rich Sequences*) que tienen un porcentaje mayor [15, 16]. El genoma es rico en DNA repetitivo principalmente secuencias de inserción (16 copias de IS6110 y 6 de IS1081) incorporadas en regiones intergénicas o no codificantes, también tiene secuencias de repeticiones polimórficas en tándem (MPTR, *Major Polymorphic Tandem Repeats*) que junto con los PGRS codifican proteínas ricas en glicina que generan polimorfismos asociados con variación antigénica y además posee dos profagos [16, 17].

Cada ORF (*Open Reading frame*, Marco abierto de lectura) es asignado a una categoría funcional como muestra la figura 1.3. Un cuarto de las regiones codificantes tienen función desconocida, aunque su número podría reducirse a medida que más proteínas sean caracterizadas. El codón de inicio más utilizado es el ATG (61%) y sólo cerca del 59% de los genes se transcriben en la misma dirección de la replicación, lo que podría estar relacionado con el crecimiento lento y los infrecuentes ciclos de replicación [15-17].

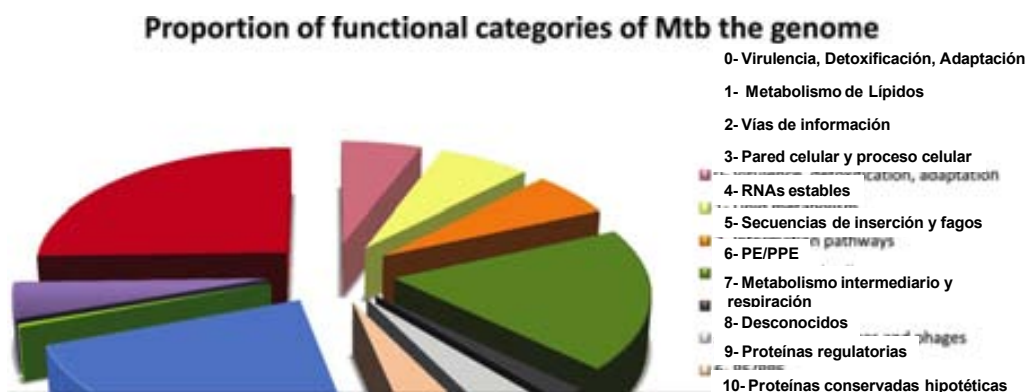


Figura 1.3. Proporción de categorías funcionales del genoma de *M. tuberculosis*. Tomado de [18].

De la información procedente del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv se deduce que éste tiene el potencial metabólico para adaptarse a ambientes aeróbicos, microaerófilos y anaerobios así como la capacidad de sintetizar todos los aminoácidos esenciales, vitaminas y co-factores enzimáticos, aunque algunas de las vías implicadas pueden diferir de las encontradas en otras bacterias. *M. tuberculosis* puede metabolizar carbohidratos, alcoholes, quetonas, ácidos carboxílicos y oxidar una amplia variedad de sustratos; igualmente posee las enzimas necesarias para la glicólisis, la vía de la pentosa fosfato, los ciclos tricarboxílico y glioxilato así como muchas funciones relacionadas con la biosíntesis y degradación de lípidos en donde el 6% de los genes conocidos y predichos están implicados en este proceso [15, 16].

En cuanto a sistemas regulación se han detectado 13 factores sigma que controlan la expresión génica, más de 100 proteínas reguladoras, 11 sistemas de dos componentes y 11 serina/treonina proteína quinasas que funcionan como sistemas de transducción de señales [16]. Por otro lado, aunque *M. tuberculosis* es naturalmente resistente a muchos antibióticos debido a la naturaleza hidrofóbica de su pared celular, muchos otros determinantes de resistencia están codificados en su genoma. Éstos incluyen enzimas hidrolíticas o que modifican fármacos como las β -lactamasas y las aminoglucósido acetil transferasas así como muchos otros sistemas potenciales de eflujo como 16 miembros de la familia de los facilitadores principales (MSF, *Major Facilitator Superfamily*) y numerosos transportadores de tipo *cassette* de unión a ATP (ABC, *ATP-binding cassette*) [16].

1.2.3. Proteoma de *M. tuberculosis*

El análisis de las proteínas de *M. tuberculosis* comenzó con la producción de la tuberculina y luego de la PPD (*Purified Protein Derivative*, derivado proteico purificado) como herramienta diagnóstica, siendo estas preparaciones los primeros extractos proteicos a los que se les evaluaron sus propiedades bioquímicas e inmunológicas [19]. Posteriormente otros estudios estuvieron dirigidos a la identificación de los principales inmunógenos de *M. tuberculosis* (antígeno 85, el antígeno 5, MPT64, GroES, GroEL y MPT32) a los que después se les quiso definir su función fisiológica, lo cual fue facilitado por la implementación de técnicas de manipulación genética. Sin embargo la disponibilidad de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* facilitó el desarrollo en el campo de la genómica funcional, la transcriptómica y la proteómica cambiando la forma en la que la investigación sobre la tuberculosis era conducida [19].

El término proteoma fue inicialmente acuñado para describir el conjunto de proteínas codificadas por un genoma, pero éste término se refiere más al conjunto de proteínas de un sistema biológico en un punto del tiempo determinado bajo unas condiciones definidas en las que las proteínas variarán en respuesta al estado funcional, fisiológico y ambiental [15, 20]. La proteómica implica la separación y análisis de mezclas complejas de proteínas derivadas de muestras biológicas y a diferencia de la transcriptómica, con la proteómica se obtiene información en cuanto a las modificaciones traduccionales y post traduccionales que determinarán la topología y función proteica [15, 20].

Como en otros sistemas, la obtención del proteoma completo de *M. tuberculosis* se ha visto dificultada por la multitud de respuestas a estímulos

fisiológicos y ambientales. Igualmente, el estudio del proteoma ha sido difícil por el hecho de que *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular, en el que su aislamiento y la obtención de proteínas es más compleja, ya que generalmente hay contaminación con proteínas del huésped, lo que limita el acceso a las proteínas micobacterianas menos abundantes. Sin embargo se cuenta con modelos de cultivo que pueden ser usados para analizar el proteoma bajo condiciones que se asemejen a las situaciones *in vivo* [20].

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios de proteómica en *M. tuberculosis* que han permitido la identificación de una variedad de proteínas del lisado total, del filtrado de cultivo, del citosol, de la pared celular, así como la caracterización de proteomas generados en respuesta a diferentes condiciones (ambientes aeróbicos, anaeróbicos/hipoxia, privación de nutrientes y tratamientos con fármacos) [15, 20]. Estas proteínas incluyen candidatos vacunales, marcadores diagnósticos putativos, factores de virulencia, dianas para fármacos, proteínas secretadas, antígenos para linfocitos T, proteínas diana de intermediarios reactivos del oxígeno y proteínas de vías de señalización (Tabla 1.1) [20]. De acuerdo con la base de datos Tuberculist cerca de 2828 proteínas han sido identificadas por estudios de proteómica y dicha identificación ha permitido validar la predicción de genes anotados en el genoma, demostrando que se expresan y se traducen [15, 20].

Además del mapeo e identificación de proteínas, la proteómica ha sido usada para evaluar las variaciones fenotípicas entre cepas, lo que es importante para entender la patogénesis del bacilo [19, 21]. Por ejemplo el análisis comparativo entre las cepas H37Rv y CDC1551 mostró que estas cepas tienen perfiles proteicos similares [22]. Igualmente el análisis comparativo entre la cepa H37Rv y dos aislados clínicos de los cuales uno de ellos pertenecía a la familia Beijing no mostraron grandes diferencias que explicaran por que la cepas Beijing son más prevalentes que otras cepas clínicas [23]. Por otro lado, también se han comparado los proteomas de *M. tuberculosis* y BCG que mostró la presencia de proteínas únicas en el proteoma de *M. tuberculosis* (60 proteínas), algunas de ellas ya identificadas a nivel genómico y otras identificadas por primera vez [24]. El análisis entre las cepas H37Rv y su contraparte atenuada H37Ra mostró una abundancia relativa similar en la mayoría de proteínas, sin embargo en H37Rv 19 proteínas asociadas a membrana y lipoproteínas fueron más abundantes sugiriendo que los sistemas de secreción y transporte transmembranal pueden ser determinantes importantes en la patogénesis [25].

Tabla 1.1. Principales estudios de proteómica en *M. tuberculosis*. Adaptado de [26-29].

Año	Cepa	Fracción Subcelular	Número de proteínas identificadas
1997	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	FC	32
1999	<i>M. tuberculosis</i> H73Rv, Erdman y <i>M. bovis</i> BCG	L, FC	107
2000	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	L, FC	167
2001	<i>M. tuberculosis</i>	FC, C	30
2003	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	M	739
2004	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv, <i>M. bovis</i> BCG	L	361
2005	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	PC, M, C	1044
2005	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	M	105
2005	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	M	349
2007	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	FC	144
2009	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	FC	41
2010	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	M	1417
2010	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	PC	234
2010	<i>M. tuberculosis</i> . Aislados clínicos del linaje Beijing	L	1668
2010	<i>M. tuberculosis</i> CDC1551 y Aislados clínicos	FC, C	238
2010	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Ex	41
2011	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv y H37Ra	M	1578
2011	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	PC, C, M, FC	1051
2011	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	L, FC	3176
2011	<i>M. bovis</i> BCG Moreau, Pasteur	FC	101
2012	<i>M. bovis</i> BCG	PC, C, M	3434

FC: Filtrado de cultivo, **L:** Lisado, **C:** Citosol, **M:** Membrana, **PC:** Pared celular, **Ex:** exosoma

En resumen, la proteómica ha permitido la identificación, localización y cuantificación relativa de una variedad de proteínas de *M. tuberculosis* y se espera que las investigaciones adelantadas en este campo respondan cuestiones acerca de la fisiopatología del bacilo en el contexto de las interacciones huésped-patógeno, aunque aún deben desarrollarse métodos que solventen las limitaciones existentes como el acceso selectivo a proteínas de menor abundancia *in vitro* e *in vivo* [18, 30].

1.2.4. Envuelta de *M. tuberculosis*

La envuelta de las micobacterias es una eficiente barrera impermeable que constituye una interfase vital entre la bacteria y el huésped, protegiéndola del ambiente, dándole forma y controlando la transferencia de sustancias fuera y dentro de la bacteria [31]. Además, la envuelta juega un papel esencial en la resistencia natural a fármacos y la modulación de la respuesta inmunológica. Sus componentes son altamente complejos y han sido objeto de numerosos estudios durante décadas en

donde se ha evidenciado que algunos tienen actividad biológica y están implicados en la patogénesis de la tuberculosis. Por ello, las enzimas implicadas en la síntesis de estos compuestos son buenas dianas para el desarrollo de nuevos fármacos [32]. La naturaleza de la envuelta hace que la bacteria requiera mecanismos especializados para que la división celular ocurra y que le permita mantener una arquitectura celular normal durante y después del proceso, así como coordinar la síntesis de los componentes de la envuelta y regular el proceso de división en respuesta a estímulos del medio ambiente. Los principales componentes estructurales de la envuelta son: membrana, pared celular y cápsula (Fig. 1.4) [31-33].

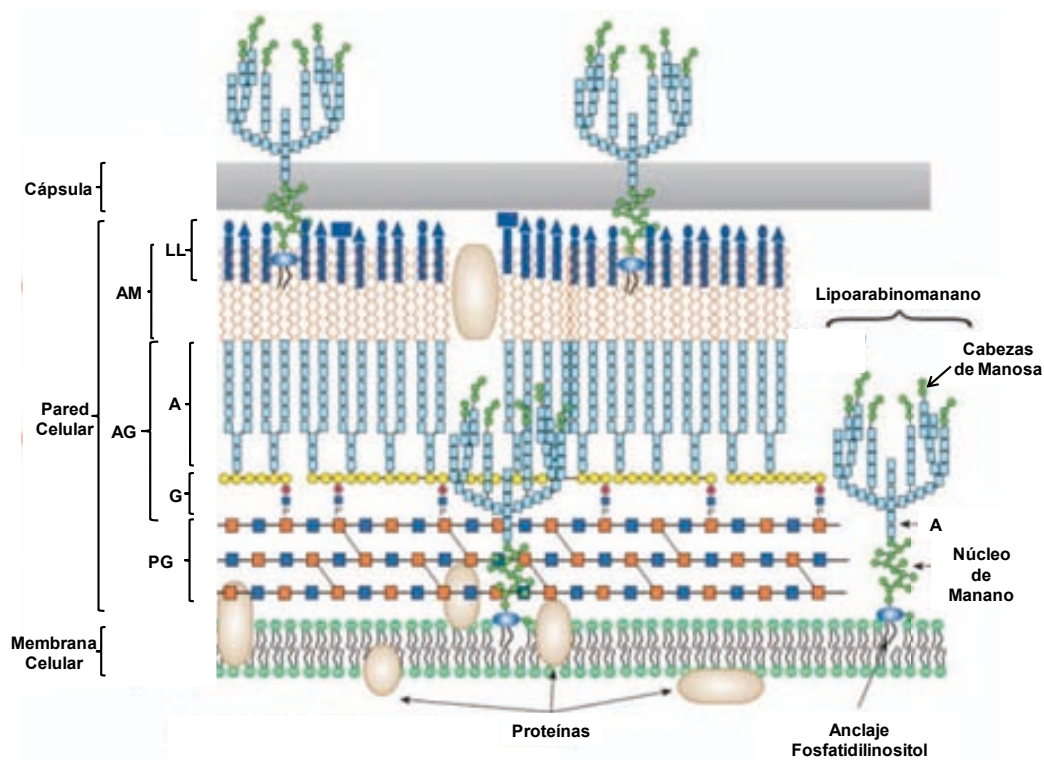


Figura 1.4. Esquema de la envuelta de *M. tuberculosis*. **AM:** ácidos micólicos, **AG:** arabinogalactano, **LL:** lípidos libres, **A:** arabinano, **G:** galactano. Modificado de [34, 35].

Taxonómicamente las micobacterias se clasifican como gram positivas, sin embargo su envuelta celular tiene diferencias a nivel funcional por lo que también comparte características con las gram negativas como el hecho de que no retienen el complejo lugol-cristal violeta de la tinción del gram [33]. Por otro lado, el contenido lipídico de la envuelta celular de las micobacterias es mucho mayor (40% del peso seco) comparado con el de las gram positivas (5%) y las gram negativas (10%). El alto contenido de lípidos puede explicar la tendencia de las micobacterias a crecer en agregados y su baja permeabilidad [33, 36].

1.2.4.1. Membrana celular

La membrana celular está compuesta de lípidos polares, principalmente fosfolípidos que se asocian entre ellos formando una bicapa lipídica junto con proteínas que pueden estar implicadas en el transporte de aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos [12]. Los lípidos polares están compuestos de cabezas hidrofílicas unidas a cadenas de ácidos grasos rectas insaturadas y monometil ramificadas con menos de 20 carbonos. Los principales ácidos grasos aislados de la membrana celular son: el ácido palmítico (C_{16:0}), el ácido octadecenoico (C_{18:1}) y el ácido metiloctadecanoico (C_{19r}). Los fosfolípidos más importantes son el fosfatidilinositol manosa (PIM), el fosfatidilglicerol, la cardiolipina y el fosfatidiletanolamina. El fosfatidilinositol se encuentra en pequeñas cantidades [36]. Además de los fosfolípidos, otros lípidos pueden estar presentes, entre ellos se encuentran las menaquinonas que son parte esencial del sistema respiratorio en membranas bacterianas, los lípidos de ornitina y los carotenoides. Otro lipopolisacárido que puede estar unido a la membrana celular es el lipomanano (LM) también como el lipoarabinomanano (LAM) que está compuesto de un grupo fosfatidilinositol unido covalentemente al arabinomanano y del que se desconoce su posición exacta en la envoltura [12, 36].

1.2.4.2. Pared celular

El esqueleto de la pared celular puede ser descrito como peptidoglicano que está unido covalentemente a cadenas de arabinogalactano esterificadas en su extremo distal con ácidos micólicos [12]. Este complejo se organiza para formar una capa hidrofóbica con otros lípidos. El peptidoglicano es una estructura común en bacterias y es la responsable de darles el tamaño y la forma. En las micobacterias, el peptidoglicano está compuesto por unidades repetitivas de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilglicililmurámico conectadas por péptidos cortos [12, 33]. El arabinogalactano es el mayor heteropolisacárido de la pared celular, contiene arabinano y galactano en forma furanosa siendo estos dos azúcares poco comunes. Las micobacterias de crecimiento lento contienen un residuo de galactosamina por unidad de arabinogalactano [33]. Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga que contienen hasta 90 carbonos α y β hidroxilados que se unen al arabinogalactano por enlaces de tipo éster, siendo el determinante primario de la permeabilidad de las micobacterias [12, 36].

Otros lípidos que se encuentran asociados a la pared pero no covalentemente son el dimicocerosato de ftiocerol (PDIM, *Phthiocerol Dimycocerosates*), dimicolato de trealosa (TDM, *Trehalose Dimycolate*), glicolípidos fenólicos (PGL, *Phenolic Glycolipid*), sulfolípidos (SL), poliaciltrealosas (PAT), triaciltrealosas (TAT), monomicolatos de trealosa (TMM, *Trehalose Monomycolate*) y diaciltrealosas (DAT); adicionalmente, algunas cepas de *M. tuberculosis* producen lipooligosacáridos (LOS) especie específicos de alta polaridad. Muchos componentes de la membrana celular son considerados factores de virulencia [12, 37].

1.2.4.3. Cápsula

La cápsula está compuesta por proteínas y polisacáridos (~97% del material total) con pequeñas cantidades de lípidos (2-3%). La cápsula constituye la interfase entre la bacteria y su medio ambiente y probablemente tiene una función protectora [38].

Tres tipos de polisacáridos se encuentran en el material capsular: α -D-glucano, D-arabino-D-manano (AM) y D-manano. El α -D-glucano es el principal carbohidrato presente en la capsula y representa cerca del 80% de los polisacáridos extracelulares. Varias funciones biológicas se han asociado a los polisacáridos de la cápsula sugiriendo un posible papel en la inmunopatogénesis [38].

1.2.4.4. Proteínas similares a porinas

Dada la impermeabilidad de la pared y la falta de proteínas homólogas a las presentes en gram negativos, surge el interrogante de cómo las micobacterias toman nutrientes y exportan sus productos de desecho. La respuesta a este interrogante está dada por la presencia de proteínas similares a porinas que forman canales no específicos que permiten el paso de compuestos hidrofílicos y que han sido detectadas en extractos de *M. tuberculosis* y de *M. smegmatis* [39]. Una de estas proteínas es la MspA que fue purificada y su gen identificado en *M. smegmatis* y cuya delección reduce la permeabilidad a glucosa, fosfatos, iones metales y aminoácidos lo que indica que esta porina es la principal vía de difusión en *M. smegmatis* [32, 39]. La pérdida de las porinas tipo Msp reduce la tasa de crecimiento indicando que el influjo de nutrientes hidrofílicos a través de las porinas es requerido para su crecimiento normal [32]. *M. tuberculosis* no tiene un homólogo de MspA y esta carencia ha sido relacionada con el tiempo de generación más lento comparado con el de *M. smegmatis*; sin embargo se ha detectado la proteína OmpATb que forma canales y

que tiene una cierta similitud con la familia de proteínas de membrana externa OmpA de gram negativos como *E. coli* [32, 39].

1.3. Patogénesis

La ruta más común de infección de la tuberculosis es por la inhalación del bacilo presente en los aerosoles producidos por pacientes con tuberculosis pulmonar activa al toser, estornudar o hablar. Las pequeñas gotitas generadas pueden permanecer en el aire por minutos u horas después de la expectoración. El número de bacilos en las gotitas, su virulencia, la exposición a luz UV y grado de ventilación influyen en la transmisión de la enfermedad [40, 41].

Una vez las bacterias son inhaladas, éstas pueden establecer una infección primaria en el pulmón en donde los bacilos son fagocitados por macrófagos alveolares [40, 41]. La infección primaria puede: (1) convertirse en enfermedad activa, (2) convertirse en infección latente o (3) ser erradicada por el sistema inmune [42]. Se estima que cerca del 5-10% de los pacientes infectados progresan a enfermedad activa mientras que cerca del 90-95% de los casos pueden resolver la infección primaria por medio de la inmunidad innata y adquirida o permanecer en un estado de latencia con el riesgo de una reactivación a lo largo de sus vidas, lo que se conoce como tuberculosis post primaria [40, 41] (Fig. 1.5). Los mecanismos por los que el sistema inmunológico controla la enfermedad, no están completamente definidos, pero en general se cree que la inmunidad celular juega un papel crítico [40, 41].

M. tuberculosis es capaz de sobrevivir a la destrucción de los macrófagos alveolares y multiplicarse en su interior gracias a que es capaz de inhibir la fusión de la vacuola fagocítica con los lisosomas [43]. Cuando la infección se localiza en el pulmón, se forma un foco inflamatorio que atrae células mononucleares y linfocitos T, formando una la lesión primaria que madura a granuloma cuya función es segregar la infección para evitar su diseminación por otras partes del pulmón u otros órganos, también como concentrar la respuesta inmune en el sitio de la infección. En este punto, el sistema inmunológico controla el patógeno evitando su diseminación y produciendo la infección latente en la mayoría de infectados [43, 44]. El riesgo de activar una infección latente varía dependiendo de factores como la genética del huésped, la edad, estado nutricional, hábitos como fumar, drogarse o abusar del alcohol, presencia de otras infecciones y estados de inmunosupresión como el VIH [40].

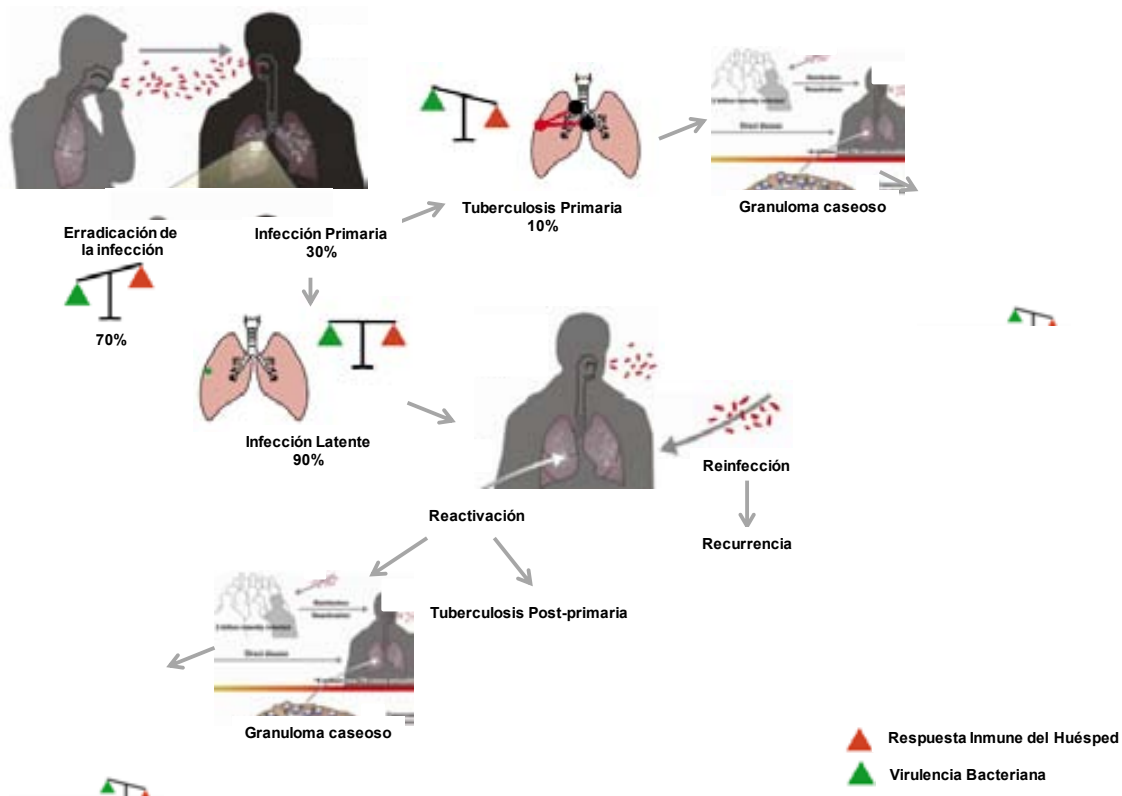


Figura 1.5. Infección por *M. tuberculosis*. Adaptado de [42, 45].

La maduración del granuloma (sólido, necrótico y caseoso) ocurre a diferentes velocidades y puede culminar en la coexistencia de todas las formas de las lesiones durante la tuberculosis activa [42]. Los granulomas sólidos prevalecen durante la infección latente y son reacciones tisulares altamente estructuradas que comprometen fagocitos mononucleares en diferentes estadios de desarrollo, células dendríticas, linfocitos T y B. En estos granulomas, los linfocitos forman un anillo externo mientras que en la parte central se encuentran los fagocitos, fibroblastos y las células dendríticas principalmente [42]. La carga del bacilo dentro de estos granulomas es baja y su actividad metabólica es reducida con una persistencia no replicativa. Al igual que los granulomas sólidos, los necróticos son bien estructurados pero con una mayor necrosis en el centro, compuesto por detritos celulares mayoritariamente, y con bacilos que pueden empezar a replicarse y ser metabólicamente activos. Se ha postulado que la necrosis sirve para eliminar los macrófagos infectados y brindar un ambiente anóxico en el cual el bacilo tenga más dificultades para dividirse, por lo que el daño tisular generado puede servir como mecanismo protector [42]. Los granulomas caseificantes presentan un centro que ha sufrido un proceso de licuefacción que da paso a la formación de una cavidad, disminuyendo su estructura y aumentando el contenido de oxígeno. Las lesiones cavitarias pueden proporcionarle al bacilo nutrientes que le permitan crecer ampliamente. Finalmente, el bacilo puede tener

acceso a los capilares sanguíneos y al espacio alveolar pudiéndose diseminar a otros órganos y transmitirse a otros individuos [42, 43].

La tuberculosis que ocurre en cualquier sitio del cuerpo puede provocar síntomas que no siempre están relacionados específicamente con el órgano o tejido implicado [46]. Las manifestaciones sistémicas de la enfermedad incluyen fiebre, escalofrío, sudoración, malestar general y pérdida de peso. La tos puede desarrollarse en muchos pacientes, inicialmente ésta puede ser no productiva pero luego avanzará a serlo en donde el esputo estará acompañado de sangre [41, 46]. En la tuberculosis extrapulmonar, una de las localizaciones más graves es en el sistema nervioso central ya que puede provocar meningitis con la sintomatología que ésta conlleva, así como la diseminación sanguínea o tuberculosis miliar ya que el bacilo puede diseminarse por todo el organismo [41, 46].

1.4. Interacciones huésped-patógeno

El resultado de la infección con *M. tuberculosis* es determinado por la interacción dinámica y compleja entre el sistema inmune del huésped y las propiedades del patógeno [47]. *M. tuberculosis* ha desarrollado diversas estrategias para asegurar su crecimiento y supervivencia en el huésped atenuando varios procesos celulares que incluyen la fusión de los fagosomas con los lisosomas, la presentación de antígeno, la apoptosis y la respuesta bactericida iniciada por los macrófagos [48, 49]. Esta atenuación es el resultado de un proceso en el que moléculas bacterianas interfieren con la maquinaria de señalización celular del huésped reorientando su respuesta. Aunque no se conocen completamente estos mecanismos, se han identificado muchos mediadores de virulencia bacterianos cuyas estrategias están siendo estudiadas [47, 48].

1.4.1. Factores de virulencia

M. tuberculosis no posee factores de virulencia clásicos como las toxinas presentes en otros patógenos bacterianos; su virulencia parece ser un fenómeno multifactorial que puede estar relacionado con su estructura y complejidad [50]. La variedad de lípidos únicos que posee como el LAM, TDM y PDIM parecen jugar un papel importante pero ninguno es un factor de virulencia esencial. El LAM, uno de los principales constituyentes de la pared celular, induce la producción de factor de necrosis tumoral (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor- α*) por parte de los macrófagos, tiene un efecto sobre los radicales libres de oxígeno, inhibe la proteína C quinasa y bloquea la activación de la transcripción del IFN- γ de los macrófagos contribuyendo de esta

forma a la persistencia de la micobacteria [51, 52]. El TDM tiene un efecto tóxico en células de mamífero y es un inhibidor de la migración de células polimorfonucleares. Los PDIMs parecen estar implicados en la entrada de *M. leprae* a las células nerviosas periféricas por unión a la laminina. Los SL están relacionados con la inhibición de la estimulación de los macrófagos. Las DAT inhiben la linfoproliferación y los PGL inhiben la respuesta proinflamatoria [51, 52].

Entre los factores de virulencia proteicos más importantes se encuentra la proteína Hsp α que es considerada como un elemento controlador de la latencia de *M. tuberculosis*, las proteínas de filtrado celular ESAT6/CFP-10 que son inmunodominantes en pacientes infectados aunque su papel biológico es debatido [51, 53]. El antígeno 85 que está compuesto por un grupo de proteínas secretadas, que se unen a la fibronectina y fomentan la formación del granuloma; por su parte, la lipoproteína de 19 kDa que es reconocida por linfocitos T de pacientes infectados con tuberculosis y parece inhibir ciertas respuestas del macrófago al IFN- γ , especialmente las relacionadas al Complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II, *Major Histocompatibility Complex class II*). Por otro lado, la proteína OmpA que hace parte de la familia de las porinas, está relacionada con la respuesta bacteriana en condiciones de estrés por pH ácido [51, 53].

En cuanto a los factores de virulencia relacionados con el estrés oxidativo, *M. tuberculosis* codifica enzimas como SodA, SodC, KatG y AhpC que combaten los radicales de oxígeno liberados durante la respiración anaeróbica y los generados dentro del macrófago. También posee factores de virulencia relacionados con la captura de iones metal que pueden exacerbar la progresión de la enfermedad y sistemas de regulación transcripcional (PhoP, factores sigma alternativos) que controlan la expresión de genes de virulencia, entre otros [53].

1.4.2. Respuesta inmune

Durante la infección *M. tuberculosis* interacciona con macrófagos, células epiteliales y células dendríticas. Esta interacción involucra componentes de la pared bacteriana (ácidos micólicos, peptidoglicano, arabinogalactano, PIM, LAM, LM y glicoproteínas) y múltiples receptores de las células fagocíticas como el receptor de la fracción cristizable (FcR, *Fc Receptor*), receptores del complemento (CRs, *Complement Receptors*), receptores de manosa (MR, *Mannose Receptors*), receptores *scavenger* tipo A, la lectina tipo C DC-SIGN y los receptores Toll-like (TLR, *Toll-like Receptor*) [42, 51, 54]. Esta interacción produce la activación de diversos mediadores

Introducción

de la inmunidad innata implicados en la fagocitosis y las vías de señalización. No es completamente claro cómo *M. tuberculosis* usa la selección de receptores como una estrategia patogénica; posiblemente las rutas de entrada produzcan diferentes respuestas en cuanto a la secreción de citoquinas o diferentes señales de activación de los macrófagos lo cual podría ser usado por la bacteria para su supervivencia [42, 51, 54].

Algunos receptores permiten la entrada silente del bacilo, como es el caso del receptor CR que no induce una respuesta tóxica por parte de la célula huésped y suprime selectivamente la producción de IL-12 que es un importante mediador de la respuesta inmune celular frente a *M. tuberculosis*. Por otro lado, la interacción con los TLR juega un papel importante en la inmunidad innata contra *M. tuberculosis*; modulando la fagocitosis, la formación del fagolisosoma y la producción de citoquinas proinflamatorias y el TNF- α . Los TLR reconocen el LAM, LM y los PIMs de *M. tuberculosis* entre otros [42, 54].

Una vez los macrófagos alveolares fagocitan a *M. tuberculosis*, en el fagosoma se generan intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI, *Reactive Nitrogen Intermediates*), intermediarios reactivos del oxígeno (ROI, *Reactive Oxygen Intermediates*), enzimas hidrolíticas, péptidos antimicrobianos y se acidifica el medio, lo que produce la degradación de lípidos y proteínas bacterianas [42, 55]. Posteriormente el fagosoma se fusiona con el lisosoma formando el fagolisosoma cuyo contenido puede ser procesado hacia la presentación de antígenos por el MHC a los linfocitos T para la activación de la respuesta inmune adaptativa. La eficacia de estos mecanismos depende de la capacidad intrínseca microbicida de los macrófagos alveolares, las características de la cepa de *M. tuberculosis* y el microambiente inflamatorio en el sitio de infección [42, 55].

Los bacilos que sobreviven al ataque, proliferan logarítmicamente dentro de los macrófagos alveolares y las células dendríticas, lo que induce la producción de TNF- α , IL-6, IL-12p80, IL-1 α y IL-1 β que activan los macrófagos e inducen la muerte bacteriana. El IFN- γ es una citoquina proinflamatoria producida por los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ también como por las células NK (*Natural killer*) activadas, en respuesta a la IL-12 y la IL-18 producida por los macrófagos alveolares y las células dendríticas [54, 55]. Esta citoquina es esencial en la activación de los fagocitos y en la presentación de antígenos. Por otro lado, promueve la proliferación celular, la adhesión celular y la apoptosis así como la producción de RNIs y ROIs. Por su parte el TNF- α media la

respuesta inflamatoria primaria estimulando la producción de IL-1 e IL-6 y también contribuye a la inducción de RNIs y ROIs [54, 55].

Los linfocitos T ($CD4^+$, $CD8^+$ y $\gamma\delta$) son críticos en el control de la tuberculosis y su falla puede promover la reactivación de la tuberculosis latente. El desarrollo de la respuesta T dependiente requiere de la diseminación de la bacteria viva o de antígenos presentados por células dendríticas que migran a los nódulos linfáticos en donde proliferarán linfocitos T específicos para luego migrar al área de infección [55]. Los $CD4^+$ producen mediadores inmunes (IFN- γ , IL-2 y linfotoxina α), mientras que los $CD8^+$ y $\gamma\delta$ liberan enzimas y perforinas que ejercen un efecto directo sobre la micobacteria y las células infectadas. Por otro lado, las células NK pueden reconocer y lisar macrófagos infectados y producir cantidades significativas de IFN- γ , IL-22 y otras citoquinas [55].

La respuesta inmune humoral frente a la tuberculosis está relacionada con la opsonización, la neutralización de toxinas y la lisis mediada por el complemento. Se han propuesto varios mecanismos por los que la inmunidad humoral podría tener efectos protectivos. Estos mecanismos incluyen la interferencia en la adhesión a células mediada por anticuerpos específicos a antígenos estructurales de *M. tuberculosis*, limitando así el establecimiento de la infección o la diseminación a otras células o tejidos. Otros ejemplos incluyen la potenciación de la formación del fagolisosoma y la lisis mediada por células o complemento [55].

1.4.2.1. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

M. tuberculosis es un patógeno intracelular capaz de sobrevivir y crecer dentro del fagosoma de los macrófagos. Para muchas bacterias el fagosoma es un ambiente hostil como resultado de una variedad de estrés tóxico; sin embargo *M. tuberculosis* se adapta a ese ambiente evitando la maduración del fagosoma y multiplicándose [56]. La micobacteria que sobrevive en los fagosomas lo hace a un pH de ~ 6.4 , sin embargo en los fagolisosomas de macrófagos activados con IFN- γ la bacteria tolera un pH menor (4.5-5.4), por lo que su capacidad para censar el pH fagosomal es un mecanismo por el que la micobacteria definiría su localización intracelular y modula su fisiología [42, 56]. La adaptación a ambientes de bajo pH está mediada por una variedad de mecanismos que incluyen la extrusión protónica, la secreción de ureasa, la descarboxilación de aminoácidos, la modificación de la envuelta celular y la protección de macromoléculas. Estudios recientes mostraron que el locus *aprABC* está

Introducción

implicado en la adaptación de la bacteria al ambiente ácido al igual que la proteína de membrana OmpATb [42, 48, 56].

Parte del efecto antimicrobiano que ejercen los macrófagos está dado por la generación de ROI y RNI, los cuales tienen un efecto en las funciones inmunoregulatoras y en la viabilidad bacteriana por daños en los lípidos y el DNA. *M. tuberculosis* ha desarrollado estrategias para contrarrestar dichos efectos detoxificando, limitando la producción de ROI y RNI y reparando el daño causado por estos [48, 50]. Los mecanismos de resistencia están relacionados con la presencia de enzimas como la catalasa-peroxidasa codificada por *KatG*, que descompone el H_2O_2 y ayuda a neutralizar a RNI; la superóxido dismutasa codificadas por *SodA* y *SodC*, que cataliza la conversión de aniones superóxido a H_2O_2 protegiéndola del daño mediado por los ROI, la peroxidasa dependiente de NADH y la peroxinitrato reductasa que confieren resistencia a RNI. Por otro lado, *M. tuberculosis* posee micotioles que sirven como antioxidantes y ayudan a preservar el ambiente reductor en el citoplasma [48, 50]. En cuanto a los mecanismos de reparación, posee dos factores accesorios (*PafA* y *Mpa*) que evitan la proteólisis, una metionina sulfóxido reductasa (*Msr*) que evita la generación de sulfóxido de metionina que interfiere en la función proteica, una proteína de unión similar a histonas (*Lsr2*) que se une al DNA con el fin de protegerlo de los ROI, una enzima (*UvrB*) que repara el DNA, la polimerasa *DnaE2* que también repara el DNA. Igualmente, el antígeno 85, la reductasa NADPH-quinona, *CysH* (implicada en la asimilación de sulfuro) y componentes de la pared celular como el LAM participan en la defensa contra el estrés oxidativo [48, 50].

M. tuberculosis también posee otras proteínas que indirectamente inhiben la producción de ROI y RNI y evitan la activación de los macrófagos; entre estas proteínas están la ESAT-6 que interacciona con TLR-2 evitando la activación del factor nuclear κB implicado en la transcripción de genes de la respuesta innata y adaptativa. Así mismo, las proteínas PPE18 y Hsp60 inhiben la producción de IL-12 y otros componentes como la pared celular y la lipoproteína de 19-kDa inhiben las vías de señalización dependiente del IFN- γ [50].

Otro de los mecanismos implicados en la supervivencia de *M. tuberculosis* en el macrófago es la inhibición de la maduración del fagosoma y su fusión con el lisosoma. La expresión aberrante de la GTPasa Rab5 limita la adquisición del marcador endosomal tardío Rab7 lo que detiene la maduración del fagosoma [51, 55]. Por otro lado, la retención de la proteína TACO en la superficie de los fagosomas que contienen la micobacteria evita la fusión con el lisosoma. Además, *M. tuberculosis* de

interferir sobre el proceso de la autofagia, un mecanismo homeostático que implica la autodigestión y remplazo de organelos y macromoléculas citoplasmáticas, mediante el producto del gen *eis* [51, 55].

La inducción de la muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo importante en la respuesta inmune innata en donde las células infectadas son eliminadas. En el caso de la infección por *M. tuberculosis*, se ha observado que la inducción de apoptosis es menor y se han identificado genes implicados como *e nouG*, *secA2* y *pknE*. Además, *M. tuberculosis* es capaz de inducir la expresión de genes anti apoptóticos por parte del huésped, como el gen *mcl-1* y el *A1* así como disminuir la expresión de receptores como el Fas [50].

Otra estrategia de supervivencia consiste en evitar el reconocimiento de los macrófagos infectados por parte de los linfocitos T CD4⁺, inhibiendo el procesamiento y presentación antigénica por el MHC-II, en donde se ha descrito que la lipoproteína de 19kDa induce la disminución de la expresión de esta molécula posiblemente por la excesiva estimulación de los TLR, teniendo en cuenta que éste receptor también se encuentra a nivel intrafagosomal [55].

1.5. Diagnóstico

La tuberculosis es una enfermedad de diagnóstico y tratamiento complejos debido a su cronicidad, la naturaleza de la relación huésped-patógeno y la diversidad de manifestaciones clínicas. El diagnóstico oportuno es esencial para el control de la enfermedad, en donde la correlación clínica es necesaria para determinar la importancia de los resultados del laboratorio [7, 57, 58]. El método diagnóstico más comúnmente utilizado es la observación microscópica del esputo teñido con Ziehl-Neelsen. Esta técnica es útil en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar pero ineficaz en la detección de la tuberculosis extra pulmonar así como en pacientes coinfectados con VIH y niños debido a su reducida carga bacilar. La una sensibilidad de este método es del 50% mientras que su especificidad se ve afectada por la prevalencia local de micobacterias no tuberculosas pudiendo variar entre el 20% y el 70% [57]. En países más desarrollados, el diagnóstico de la tuberculosis por microscopía, es confirmado mediante cultivo seguido de la identificación de la cepa y la susceptibilidad a fármacos. Estos métodos requieren tiempos de incubación largos, equipamiento especializado, personal altamente entrenado y son más costosos, condiciones que en muchos casos pueden no estar disponibles en lugares con escasez de recursos humanos y financieros [7, 57, 58].

Introducción

La identificación de la micobacteria tradicionalmente se hace mediante cultivo en medio sólido ya que éste es más sensible que la microscopía (80%-85%) y tiene una especificidad del 98% [59]. El principal inconveniente es el tiempo de incubación que puede variar entre 4-6 semanas en micobacterias de crecimiento lento y una semana en las de crecimiento rápido. Por ello se prefiere hacer cultivos en medio líquido en donde el tiempo de incubación disminuye y sólo requieren de 10 a 100 bacterias/mL lo que lo hace de gran utilidad en los casos de carga bacilar baja. Sin embargo algunas cepas crecen mejor en medio sólido por lo que se recomienda sembrar en los dos tipos de medio [58, 59].

En la infección latente, las muestras de esputo son negativas y las radiografías de tórax son típicamente normales [41]. La prueba de la tuberculina es el método más comúnmente usado para este tipo de infección. Esta prueba es cutánea y se hace inyectando intradérmicamente 0.1 mL de PPD; después de 48-72 horas se examina el sitio de la inyección con el fin de detectar la induración producida como una reacción de hipersensibilidad retardada, que debe ser ≥ 10 mm de diámetro para ser considerada como positiva [60]. Aunque la utilidad de este test es amplia, presenta fallos fundamentales como el elevado número de falsos positivos obtenidos por su inhabilidad de distinguir entre una infección de *M. tuberculosis* y la exposición a otras micobacterias no tuberculosas o la vacunación con BCG. Por otro lado, los falsos negativos son también un inconveniente particularmente en niños y personas inmunocomprometidas [41]. Por ello se ha impulsado la identificación de nuevos antígenos que puedan mejorar la sensibilidad y la especificidad de la prueba cutánea [41, 60].

La tuberculina era la única prueba existente para la detección de la infección latente hasta que se desarrolló un ensayo basado en la detección del IFN- γ , en el cual se determina la inmunidad mediada por células [41]. Los resultados con el uso de este test pueden obtenerse en menos de 24 horas e igualmente puede ser usado para detectar la tuberculosis activa aunque es poco efectivo en la diferenciación con el estado de latencia [41].

En países industrializados, las radiografías y otras técnicas de imagen avanzadas así como métodos de cultivo más rápidos y la implementación de métodos moleculares como sistemas de amplificación de genes específicos y sistemas de amplificación con sondas son utilizados para suplementar los métodos microscópicos [57]. Por ejemplo se usan sistemas de cultivo líquido como el BACTEC que permite la detección radiométrica del crecimiento o el sistema MGIT que permite la detección

fluorométrica; igualmente se han desarrollado métodos de hibridación de ácidos nucleicos que permite tener resultados en dos horas a partir de cultivos o ensayos basados en la detección por inmunocromatografía de la proteína MPT64 del complejo *M. tuberculosis*. También se está explorando el uso de los microscopios LED (*light-emitting diode*) que remplazarían los microscopios de luz convencionales [58].

La sensibilidad en el diagnóstico se puede potenciar combinando estas pruebas junto con técnicas invasivas tales como la broncoscopia o biopsias tisulares y la inducción de esputo. Infortunadamente, estas técnicas están fuera del alcance de muchos países donde la tuberculosis es prevalente y estas limitaciones tienen consecuencias para el control de la enfermedad. [57, 59].

Las pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos tienen una sensibilidad que va del 1% al 60% y una especificidad del 53% al 98.7%. El principal problema de este tipo de pruebas es la heterogeneidad de las respuestas inmunológicas frente a los antígenos micobacterianos por lo que ninguna de las pruebas ensayadas han sido lo suficientemente efectivas para remplazar la microscopía [58].

Se ha estimado que cerca de 400.000 vidas podrían salvarse cada año con la introducción de un sistema diagnóstico más exacto, rápido, económico y ampliamente disponible que tuviera idealmente una sensibilidad mayor al 85% y una especificidad del 97% [58]. En general, la implementación de nuevas herramientas diagnósticas requiere de una evaluación cuidadosa que tenga en cuenta estudios de campo en cada país también como la generación de políticas de estado que fomenten su desarrollo [57, 58].

1.6. Prevención

1.6.1. BCG

La vacuna BCG usada para prevenir la tuberculosis tiene casi 100 años de antigüedad y ha sido usada por miles de millones de personas en el mundo, incluyendo niños, adultos y varios grupos étnicos [9, 28, 61]. La BCG tiene una actividad protectora contra las formas severas de la tuberculosis (meningitis y TB miliar) en niños, pero su eficacia en la prevención de TB pulmonar en adultos es variable (0-80%) [9, 28]. Esta vacuna es reconocida como segura y sigue siendo una herramienta importante en la prevención de la enfermedad por lo que la OMS recomienda que los niños deben ser inmunizados al nacer en países con alto riesgo de

infección [28]. Sin embargo, el uso de esta vacuna no es recomendada en niños y adultos infectados con VIH debido al riesgo de aparición de enfermedad BCG generalizada [9, 28].

La BCG deriva de una cepa virulenta de *M. bovis* que se atenuó tras realizar 231 pases en medio de cultivo [62]. Los primeros estudios clínicos se hicieron en Francia y Bélgica con resultados que mostraron un efecto protector en niños. Una vez aprobado su uso, la cepa original fue distribuida por el Instituto Pasteur a diferentes países en donde se utilizaron condiciones diferentes de cultivo no estandarizadas, lo que dio lugar al establecimiento de cepas locales con diferencias en la composición genética y antigénica; lo que para muchos ha contribuido a la variabilidad en su eficacia [62]. Esto ha sido corroborado por estudios de genómica y proteómica comparativa que han mostrado que las cepas vacunales usadas difieren de la cepa original afectando proteínas antigénicas, aunque no hay suficiente evidencia directa de que estas variaciones puedan tener un efecto en la eficacia protectora de la BCG en humanos. Otras hipótesis que se manejan en cuanto a la variación en la efectividad están relacionadas con una manipulación inadecuada de la vacuna como la incorrecta reconstitución de los liofilizados, la exposición a calor o a la luz solar, la exposición a micobacterias ambientales y la presencia de genes de resistencia o de susceptibilidad en las personas vacunadas [63, 64].

1.6.2. Nuevas vacunas

El desarrollo de nuevas vacunas empezó en los años noventa gracias a la implementación de técnicas de manipulación genética en micobacterias y a la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*. Existen dos enfoques principales para su desarrollo: (1) desarrollar vacunas que puedan ser mejores que la BCG y reemplazarla ya sea haciendo una versión mejorada o una nueva usando por ejemplo *M. tuberculosis* atenuado; (2) desarrollar una estrategia “inducción-refuerzo” en la cual la BCG se administraría en neonatos (como se hace ahora) y luego administrar una vacuna nueva como refuerzo [9]. Alternativamente, la nueva vacuna podría ser administrada junto con otras vacunas a los 3-9 meses de edad y como un refuerzo separado en adultos jóvenes. Los candidatos a vacuna en desarrollo podrían ser usados para prevenir la infección o para prevenir la progresión primaria a enfermedad y la reactivación de la tuberculosis latente. Además, se están llevando a cabo estudios con el fin de desarrollar vacunas que puedan ser usadas como agentes inmunoterapéuticos [9].

Las propiedades que debería tener una nueva vacuna son: estar compuesta del microorganismo muerto o subunidades de éste, tener varios antígenos del microorganismo incluyendo proteínas esenciales, su vía de administración (preferiblemente oral o nasal) debe inducir una respuesta inmune celular (Th1) y humoral y debe ser eficiente no sólo como vacuna primaria si no también como refuerzo en caso de haber recibido la BCG [9, 40]. Actualmente hay 12 candidatos en ensayos clínicos, 11 son para la prevención de la tuberculosis y uno es una vacuna inmunoterapéutica (Fig. 1.6). Estos candidatos incluyen mutantes atenuados de *M. tuberculosis*, cepas de BCG recombinante, subunidades antigénicas administradas con o sin adyuvantes, vacunas de DNA y antígenos expresados en vectores bacterianos o víricos [9, 40].

Las vacunas atenuadas tienen la ventaja de contener un amplio espectro de antígenos y por tanto estimulan diferentes poblaciones de linfocitos T; su principal desventaja está relacionada con la seguridad en personas no inmunocompetentes [65]. Por su parte, las vacunas compuestas de subunidades de antígenos micobacterianos deben inducir una respuesta inmune protectora sólo con uno o pocos antígenos. En cuanto a las vacunas recombinantes, las cepas suelen tener antígenos sobreexpresados como el caso de la rBCG30 que sobreexpresa el antígeno 85 para incrementar su antigenicidad [65].

El candidato más avanzado en pruebas clínicas es el MVA85A, que usa un vector viral para expresar un antígeno micobacteriano y ha sido diseñado para ser utilizado como refuerzo en niños, adolescentes y adultos; los primeros ensayos de la fase IIb se hicieron en Sudáfrica pero resultados recientes mostraron una efectividad de sólo el 17% en niños [9, 40]. Actualmente se está adelantando un ensayo de fase IIb en adultos VIH positivos en Senegal y Sudáfrica con 1400 voluntarios. En cuanto al candidato AERAS-402/Crucell Ad35, está basado igualmente en un vector viral y también fue diseñado como refuerzo en niños, adolescentes y adultos; éste se encuentra en fase IIb siendo ensayado en niños de Kenia, Mozambique y Sudáfrica [9, 40].

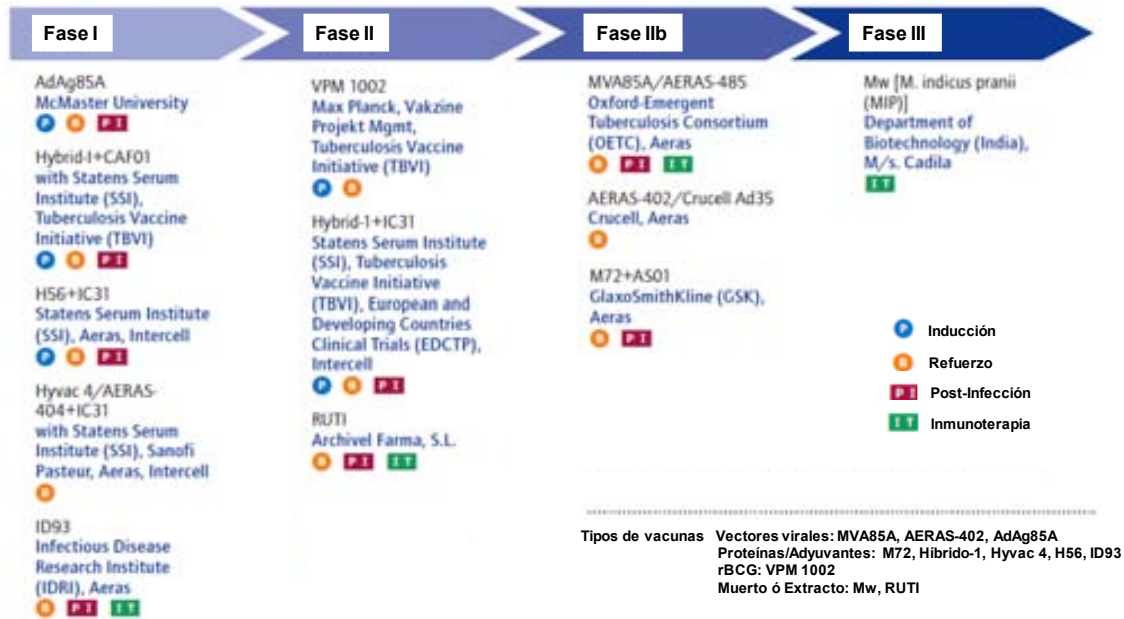


Figura 1.6. Nuevas vacunas en desarrollo. Modificado de [9, 66].

Los candidatos M72 y el Híbrido-1 son dos vacunas que contienen subunidades proteicas diseñadas para que sirvan como adyuvantes que potencian la respuesta inmune en combinación con los antígenos inmuno-dominantes de *M. tuberculosis*: Rv1196 y Rv0125 en M72, Ag85B y TB10.4 en Híbrido-1; el candidato M72 se encuentra en la fase IIb mientras que el Híbrido-1 en fase IIa. El candidato VPM 1002 es una vacuna recombinante viva derivada de la cepa vacunal BCG y deficiente en ureasa, en la que se ha clonado el gen de la listerolisina de *Listeria monocytogenes* con el fin de potenciar la respuesta inmune [9, 40]. Los datos preclínicos han mostrado que este candidato tiene un efecto protector más eficaz que la BCG tradicional y actualmente se encuentra en fase IIa en Sudáfrica [9, 40]. Por otro lado, el candidato RUTI, basado en fragmentos detoxificados de *M. tuberculosis* incorporados en liposomas, ha sido diseñado con el fin de complementar la quimioterapia y acortar el tratamiento; este candidato ha mostrado ser efectivo en la tuberculosis latente y se encuentra actualmente en fase IIa [9, 67]. Otro candidato es MTBVAC Δ *phoP* Δ *fad26*, basado en una cepa atenuada de *M. tuberculosis*; éste candidato que se encuentra en fase I ha mostrado buenos resultados en modelo murino y en primates con una protección superior a BCG [68].

El desarrollo de una vacuna más efectiva que la actualmente utilizada, es un punto crucial en la prevención y el control de la enfermedad; en los últimos años el enfoque estaba dirigido al descubrimiento de nuevos candidatos vacunales y al inicio de ensayos clínicos, pero se ha proyectado que en los siguientes años se consolide su progreso [9].

1.7. Tratamiento

1.7.1. Esquema general

Un tratamiento eficaz reduce el riesgo de transmisión de la tuberculosis y la generación de cepas resistentes, sin embargo el éxito del tratamiento se ve dificultado por problemas como la sensibilidad de los bacilos a los fármacos bactericidas sólo cuando están activos metabólicamente y en replicación, la presencia de subpoblaciones que sólo se activan de modo transitorio durante lapsos de tiempo muy cortos o la presencia de bacilos resistentes incluso en poblaciones que nunca han estado previamente expuestos a los fármacos [69]. Por ello, la quimioterapia se basa en el uso simultáneo de varios fármacos con un elevado poder bactericida contra bacilos metabólicamente activos y una actividad esterilizante contra bacilos en estado semilaciente. La duración del tratamiento debe ser el suficiente para evitar la aparición de cepas resistentes así como las recaídas de la enfermedad [69].

Los fármacos utilizados en el tratamiento se clasifican en: fármacos de primera, segunda y tercera línea (Tabla 1.2). Los fármacos clasificados como de primera línea son más eficaces y tolerables; los de segunda línea son menos efectivos que los de primera línea y algunos pueden tener algún efecto secundario; mientras que la mayoría de los fármacos de tercera línea no tienen bien establecida su efectividad [69, 70]. El programa estándar DOTS en el que se suministra los fármacos al paciente y se observa como los toma, garantizando el cumplimiento de la terapia, contempla un tratamiento por 6 meses de duración que incluye los dos primeros meses de fase intensiva con el uso de isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol seguidos de una fase de continuación con el uso de isoniacida y rifampicina durante cuatro meses [69, 70].

Para casos individuales donde haya una baja conversión hacia negatividad del esputo, se recomienda administrar pirazinamida con o sin etambutol por más de dos meses, aunque esta prolongación no está aprobada por la OMS [71, 72]. Por otro lado, se ha observado que el uso de rifampicina, isoniacida y etambutol en vez de rifampicina e isoniacida solamente, en la fase de continuación puede llegar a ser ventajosa en poblaciones con altos niveles de resistencia a la isoniacida [71, 72].

La obtención de un cultivo positivo después de dos meses de tratamiento puede estar asociada a un fallo en el tratamiento o recaída lo que justifica la prolongación de la fase de continuación hasta un total de 9 meses [71, 72]. La tasa de recaída durante los 6-30 meses después de la finalización del tratamiento es <5%. El

Introducción

78% de las recaídas ocurren dentro de los 6 meses siguientes a la finalización del tratamiento y el 91% dentro de los 12 meses posteriores [71, 72].

Tabla 1.2. Clasificación y mecanismo de acción de los fármacos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis [69-71, 73-75].

	Actividad/Mecanismo de acción	Comentarios
Fármacos de primera línea		
Isoniacida	Bactericida. Inhibición síntesis de ácidos micólicos	Bacteriostático en bacilos no replicativos
Rifampicina	Bactericida. Inhibición de la RNA polimerasa	
Etambutol	Bacteriostático. Inhibición de la síntesis de la pared	Bactericida a dosis muy altas
Pirazinamida	Bactericida. Posible inhibición síntesis de ácidos micólicos	
Estreptomina (Iny.)	Bactericida. Inhibe la síntesis de proteínas.	
Fármacos de segunda línea		
1. Aminoglucósidos		
-Amikacina (Iny.)	Bactericida. Inhibe la síntesis de proteínas	
-Kanamicina (Iny.)	Bactericida. Inhibe síntesis de proteínas	
2. Polipéptidos		
-Capreomicina (Iny.)	Bactericida. Inhibe síntesis de proteínas	
-Viomicina	Bactericida. Inhibe síntesis de proteínas	
-Enviomicina	Bactericida. Inhibe síntesis de proteínas	
3. Fluoroquinolonas		
-Ciprofloxacina	Bactericida. Inhibe la DNA girasa	
-Moxifloxacina	Bactericida. Inhibe la DNA girasa	
-Levofloxacina	Bactericida. Inhibe la DNA girasa	
4. Tionamidas		
-Protionamida	Bactericida. Inhibe la síntesis de la pared celular	
-Etionamida	Bacteriostático débil. Bloquea la síntesis de ácidos micólicos	Bactericida en altas dosis
5. Cicloserina	Bacteriostático. Inhibe la síntesis de la pared celular	
6. Acido <i>p</i> -aminosalicílico	Bacteriostático. Inhibe la síntesis de folatos	
Fármacos de tercera línea		
Linezoide	Bactericida <i>in vitro</i> . Inhibe la síntesis de proteínas	
Rifabutina	Bactericida. Inhibe RNA polimerasa	
Macrólidos		
-Clarithromicina	Inhibe la síntesis de proteínas	
Vitamina D		
Tioacetazona	Bacteriostático. Inhibe la síntesis de ácidos micólicos	
Tioridazina	Bactericida. Inhibe bombas de eflujo específicas	Tratamiento de cepas resistentes
Arginina		

Iny: Inyectable.

Se ha estimado que entre un 20-50% de los pacientes toman de forma incorrecta o no completan el régimen prescrito, en donde el riesgo de incumplimiento es mayor después de la fase inicial, transcurridas las primeras 6-8 semanas [69]. El incumplimiento del tratamiento está relacionado con la duración, los efectos secundarios y las interacciones con otros fármacos, especialmente en los administrados a pacientes VIH positivos [71, 72]. Existe un perfil de pacientes característico asociados a la no adherencia al tratamiento: personas sin techo, alcohólicos y drogo dependientes, personas con problemas de comportamiento, retardo mental y la falta de apoyo social y familiar. Las razones de estas conductas son múltiples y complejas y a ellas hay que sumarles el entorno social y económico en el que se encuentran; por ello es importante que los pacientes cuenten con el apoyo familiar y de los profesionales de la salud para garantizar el éxito del programa de tratamiento [71, 72].

El tratamiento de la tuberculosis latente consistía en administrar únicamente isoniacida durante 6-12 meses o durante 9-12 meses en el caso de los pacientes VIH positivos, pero estudios posteriores en estos pacientes han mostrado la posibilidad de acompañar este esquema de tratamiento con rifampicina más pirazinamida por dos meses [69].

1.7.2. Tratamiento de cepas resistentes y multirresistentes

Los casos de resistencia son más difíciles y costosos de tratar que los casos de tuberculosis sensible y en la mayoría no son tratados adecuadamente aumentando la tasa de transmisión y muerte [74, 76]. El régimen de tratamiento para cepas resistentes debe ser diseñado e iniciado basándose en los resultados de los test de susceptibilidad para cada paciente, teniendo en cuenta la medicación administrada previamente y la presencia de enfermedades subyacentes; es importante que se haga un seguimiento de la respuesta del paciente al tratamiento y que se cuente con un experto en el manejo de resistencias [74, 76].

Los pacientes con MDR-TB son aquellos que presentan resistencia a por lo menos isoniacida y rifampicina [74]. El tratamiento se hace utilizando como mínimo 4 o más fármacos para los que sea susceptible, empezando con fármacos de primera línea, adicionando una fluoroquinolona y un inyectable. Se debe adicionar un fármaco oral de segunda línea para sumar un total de 4 a 6 fármacos. Este esquema debe ser consultado con un experto en el uso de fármacos para el tratamiento de MDR-TB [74].

La tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB, *Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*) se define como la resistencia a por lo menos isoniacida, rifampicina, una fluoroquinolona y uno de los tres inyectables (amikacina, kanamicina o capreomicina) [74]. El tratamiento en estos casos es todo un reto dada la falta de fármacos potentes, sin embargo el enfoque es el mismo que el utilizado en los casos de MDR-TB. Se deben administrar un total de 4 a 6 fármacos escogiendo primero aquellos de primera línea que hayan mostrado actividad *in vitro*, seguido de fármacos de segunda y tercera línea [74].

1.7.3. Tratamiento de pacientes VIH positivo

Los pacientes infectados con tuberculosis y coinfectados con VIH tienen una probabilidad mayor (21-34 veces) de desarrollar la enfermedad tuberculosa que quienes son VIH negativo. La coinfección con VIH debe ser controlada por expertos tanto en tuberculosis como en VIH [9, 77]. Los principales inconvenientes del tratamiento están relacionados con la mayor prevalencia de MDR-TB, la gravedad y el momento clínico de ambas infecciones y la interacción farmacológica entre los fármacos utilizados para tratar la tuberculosis y el VIH (inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleosídicos e inhibidores de proteasas) [77]. La rifampicina puede reducir de manera significativa la concentración sanguínea de los inhibidores de proteasas ya que éste fármaco es un inductor de las enzimas que los metabolizan (citocromos P450 A3), mientras que la rifabutina tiene el mismo efecto pero en menor grado. Se recomienda tratar primero la tuberculosis para evitar lo que se conoce como síndrome de reconstitución inmunológica [69, 77]. En pacientes que no hayan iniciado el tratamiento antirretroviral se recomienda un esquema de 9 meses (dos con isoniacida, rifampicina y pirazinamida y siete con isoniacida y rifampicina) y pasados los dos meses del inicio del tratamiento, se puede sustituir la rifampicina por rifabutina y utilizar como inhibidor de proteasas el nelfinavir o indinavir. Opcionalmente, se puede mantener la isoniacida y la rifampicina hasta el noveno mes y seleccionar ritonavir como inhibidor de proteasa o efavirenz como inhibidor no nucleosídico [69, 77]. Se debe monitorizar la carga viral y los CD4. Por otro lado, los pacientes que ya reciben tratamiento antirretroviral no deben interrumpirlo y el tratamiento debe ser ajustado con el fin de adecuarlo al esquema anteriormente mencionado. En caso de resistencia a rifampicina, se recomienda el uso de rifabutina con un prolongamiento de la fase de continuación con isoniacida y etambutol hasta 18 meses [69, 77].

1.7.4. Nuevos fármacos

El tratamiento de la tuberculosis es un área en continuo desarrollo en donde nuevos fármacos están siendo estudiados con el fin de mejorar los regímenes para que sean más cortos, simples, económicos, efectivos y menos tóxicos tanto para el tratamiento de cepas resistentes como para las que no lo son. Otro de los objetivos es disminuir la interacción con los fármacos usados para el tratamiento del VIH [7, 76]. Actualmente hay cerca de 13 fármacos en diversos estadios de evaluación clínica para el tratamiento de la tuberculosis (Tabla 1.3); éstos pueden dividirse en varias categorías: (1) nuevos fármacos desarrollados para el tratamiento de la tuberculosis (TMC207, SQ109, LL3858), (2) reevaluación de fármacos de primera línea con el fin de optimizar su eficacia (rifampicina, rifapentina) y (3) fármacos utilizados actualmente para otras indicaciones y compuestos de siguiente generación re-propuestos para el tratamiento de la tuberculosis (gotifloxacina y moxifloxacina; linezolid, PNU100480 y AZD5847; metronidazol, OPC-67683 y PA-824) [7, 76].

Tabla 1.3. Fármacos en evaluación clínica para TB. Tomado de [76].

Fármaco	Categoría	Diana	Fase Clínica
TMC207 para MDR-TB	Nuevo	ATP sintasa	II-III
TMC207 para DS-TB	Nuevo	ATP sintasa	II
Sudoterb (LL3858)	Nuevo	Desconocido	II
SQ109	Nuevo	Desconocido	I
Rifapentina	Fármaco corriente	RNA polimerasa	I-II
Rifampicina	Fármaco corriente	RNA polimerasa	I
Garifloxacina	Repropuesto	DNA girasa	III
Moxifloxacina	Repropuesto	DNA girasa	III
Linezolid	Repropuesto	Complejo de iniciación de la síntesis de proteínas	II
PNU100480	Siguiente generación repropuesta	Complejo de iniciación de la síntesis de proteínas	I
AZD5847	Siguiente generación repropuesta	Complejo de iniciación de la síntesis de proteínas	I
Metronidazol	Repropuesto	No determinado para TB	II
OPC-67683	Siguiente generación repropuesta	Múltiple, incluyendo la biosíntesis de lípidos y Proteínas	II-III

ATP: Adenosin trifosfato, **DS-TB:** Tuberculosis sensible, **MDR-TB:** Tuberculosis Multirresistente

Así mismo, se está explorando el uso de inhibidores de bombas de eflujo que administrados junto con antibióticos, potencien su actividad [78].

1.8. Resistencia

Desde la producción de la penicilina en los años cuarenta, se han desarrollado numerosos fármacos que ha permitido disminuir la mortalidad asociada a infecciones bacterianas. Sin embargo el uso intensivo e inadecuado de antibióticos ha provocado la selección e incremento de bacterias resistentes en poblaciones de patógenos humanos [79, 80]. Los mecanismos de resistencia probablemente existieron antes del descubrimiento y uso de la quimioterapia antimicrobiana y prueba de ello es el aislamiento de una bacteria resistente con 2000 años de antigüedad proveniente de un glaciar canadiense. Así mismo se identificaron genes de resistencia a β -lactámicos en una librería metagenómica de sedimentos marinos a los que se les estimó 10000 años de antigüedad, mientras que otros estudios han identificado microorganismos resistentes en cepas de *Citrobacter freundii* y *E. coli* aisladas antes de 1920 y 1950 respectivamente [79]. También, se ha estimado que la las vías biosintéticas de la eritromicina, la estreptomicina y la vancomicina tienen una antigüedad de 880, 610 y 240 millones de años respectivamente y la producción de β -lactamasas una antigüedad de 2 mil millones de años, lo que precede la divergencia de gram negativos y gram positivos [81]. Por otro lado, también se cree que la resistencia surgió en los microorganismos productores de antibióticos como mecanismo de autoprotección contra la acción de sus propios antibióticos lo que está respaldado por el hecho de que exista una alta homología entre las enzimas que modifican antibióticos de microorganismos productores y las de microorganismos resistentes. Igualmente los vecinos microbianos (en nichos específicos) de los microorganismos productores de antibióticos deben co-evolucionar para desarrollar estrategias de resistencia que les permitan sobrevivir [81].

La exposición a los antibióticos ha sido el factor más importante que ha influenciado la aparición y difusión de la resistencia, de hecho muchos estudios han mostrado una relación directa entre la frecuencia de la resistencia y el uso de antimicrobianos, por lo que se cree que éstos actúan ejerciendo una presión selectiva que dirige la evolución de la resistencia [82, 83]. Dicha presión probablemente es ejercida sobre un grupo de genes existentes conocidos como genes de pre-resistencia con funciones bioquímicas alternativas que podrían tener una resistencia baja o fortuita u otro tipo de afinidad por el antibiótico y que bajo presión se convertirán en genes de resistencia y pasarían a formar parte del resistoma bacteriano [81-83].

Desde el punto de vista clínico, la resistencia se define como el estado en el cual un paciente infectado con un patógeno determinado es tratado con una dosis

específica de un antimicrobiano y una vez finalizado el tratamiento no alcanza una cura clínica [83]. Desde el punto de vista microbiológico, la resistencia se define usando la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) en la que se establece la concentración mínima a la que un antimicrobiano inhibe el crecimiento *in vitro* de un microorganismo clasificando los aislados en susceptibles (con una alta probabilidad de éxito terapéutico) y resistentes (asociados a una alta probabilidad de fallo terapéutico) [83].

1.8.1. Mecanismos de Resistencia

La resistencia antimicrobiana puede ser intrínseca, adquirida o adaptativa. La resistencia intrínseca se puede describir como un fenómeno natural que muestran todos los miembros de una especie y está relacionada con la función de componentes fisiológicos o bioquímicos de dichos microorganismos, como por ejemplo la barrera ofrecida por la pared celular de algunas bacterias y la expresión constitutiva o inducible de sistemas activos de eflujo [79, 84]. La resistencia adquirida es el resultado de una presión evolutiva específica que permite contrarrestar el efecto de un antibiótico o una clase de antibióticos y se presenta en ciertos linajes derivados de un ancestro susceptible [85]. Entre los mecanismos de resistencia adquirida están las mutaciones puntuales en genes cuyo producto es la diana de los antibióticos, las mutaciones en reguladores transcripcionales, la adquisición de genes de resistencia exógenos (por transformación, conjugación o transducción) y la producción de enzimas que modifican y destruyen la actividad del antibiótico (Fig. 1.7) [79, 85, 86].

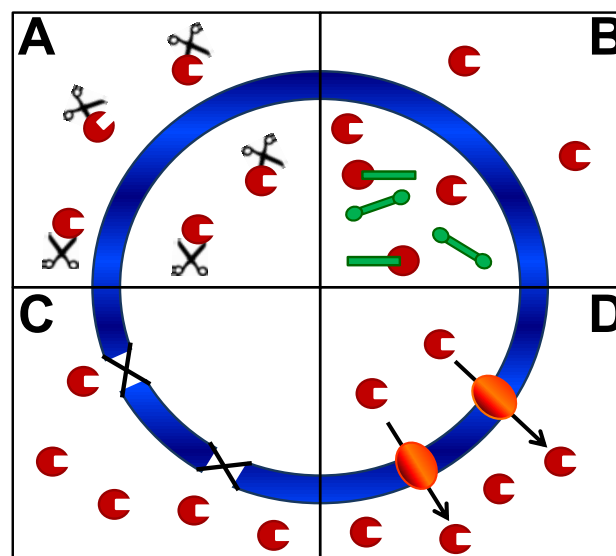


Figura 1.7. Mecanismos de resistencia en bacterias. A) Inactivación del compuesto. B) Alteración de la diana. C) Inhibición de la entrada del compuesto a la célula. D) Eflujo activo del compuesto. Modificado de [86].

Los mecanismos de resistencia adquirida requieren una nueva programación genética en respuesta a la presencia del antibiótico [85]. De hecho en varios casos, los antibióticos o su acción pueden regular la expresión de genes de resistencia haciendo que la bacteria invierta una considerable cantidad de energía y espacio genético para resistir activamente a los antibióticos [85].

La resistencia adaptativa es un área relativamente inexplorada, que implica un incremento temporal en la habilidad de la bacteria a sobrevivir a la presión ejercida por un antibiótico y que se da gracias a la alteración en la expresión de genes y/o proteínas como resultado de la exposición a determinadas condiciones ambientales como el estrés, disponibilidad de nutrientes, fase de crecimiento o niveles sub inhibitorios de compuestos [87]. A diferencia de la resistencia intrínseca o adquirida que son estables y pueden transmitirse, la resistencia adaptativa es transitoria y puede ser revertida por la remoción de la condición inductora [87].

1.8.1.1. Sistemas de eflujo

Uno de los mecanismos de resistencia antimicrobiana más ampliamente distribuidos entre los microorganismos son los sistemas de eflujo. Estos están presentes tanto en gram positivos como en gram negativos y le permiten a las bacterias limitar el acceso de agentes antimicrobianos a sus dianas [88]. Los genes que los codifican pueden estar presentes a nivel cromosómico o en elementos móviles como los plásmidos [89]. Estos sistemas pueden actuar en sinergia con otros mecanismos de resistencia produciendo un nivel elevado de resistencia de importancia clínica [90].

Las primeras evidencias de que los sistemas de eflujo estaban implicados en la resistencia a antimicrobianos fueron obtenidas a finales de los años setenta y desde entonces estos mecanismos han sido reconocidos como los principales causantes de la aparición de fenotipos MDR. Algunas bombas de eflujo muestran una marcada especificidad de sustrato pero otras son inespecíficas y pueden expulsar múltiples compuestos no relacionados estructuralmente [84, 90].

La resistencia puede ser conferida por niveles basales de eflujo o puede surgir como resultado del incremento constitutivo en la expresión del transportador en bacterias que usualmente son susceptibles [89]. Este incremento puede ocurrir por la mutación en el represor local del gen, la mutación de un regulador global, la mutación en la región promotora o una mutación en elementos de inserción localizados corriente arriba del gen codificante para la bomba de eflujo [89].

También, ciertas condiciones ambientales, incluyendo la exposición a diversos compuestos entre ellos los antimicrobianos, tienen un impacto en la expresión de los sistemas de eflujo y es así como la expresión diferencial de genes que los codifican se deben a cambios a nivel extracelular lo que refleja la importancia de estos sistemas en la adaptación de los microorganismos a su entorno [39, 87]. Los antimicrobianos juegan un papel muy importante en la inducción de resistencia adaptativa por sobreexpresión de los sistemas de eflujo. Así cuando la bacteria es expuesta a concentraciones sub-inhedorias de un antimicrobiano en un tratamiento que es abandonado, las bacterias no serán eliminadas si no que llegarán a ser más resistentes y se cree que la exposición a estas concentraciones induce la expresión del 5 al 20% de todos los genes cromosómicos [39, 87].

Los sistemas de eflujo son transportadores que no solamente están implicados en la resistencia, si no que también se encargan de la captación de nutrientes esenciales y iones, de la excreción de productos finales del metabolismo y sustancias nocivas, de la comunicación entre las células y el ambiente e incluso algunos exportan colorantes y detergentes [89]. También, algunos exportan determinantes de virulencia como adhesinas, toxinas y otras proteínas implicadas en la colonización e infección de células humanas y animales. Es así como varios estudios han mostrado que la falta de expresión de algunas bombas de eflujo en gram negativos tiene un efecto deletéreo en la capacidad patogénica de la bacteria lo que sugiere un posible papel fisiológico que le permite sobrevivir en el huésped y causar la patología [89].

Los transportadores se clasifican en cinco familias: la superfamilia de transportadores ABC, la superfamilia de facilitadores principales, la familia de extrusión de múltiples compuestos tóxicos y fármacos (MATE, *Multidrug and toxic compound extrusión*), la familia menor de resistencia a múltiples fármacos (SMR, *Small Multidrug Resistance*) y la superfamilia de resistencia-nodulación-división (RND, *Resistance-Nodulation-Division*) (Fig. 1.8). También, se pueden clasificar en función de la fuente de energía que utilizan en: transportadores primarios si utilizan la energía libre proveniente de la hidrólisis del ATP y transportadores secundarios si utilizan el gradiente electroquímico transmembranal [86, 90]. Finalmente el transporte puede ser de tipo simporte, antiporte o uniporte. El proceso de simporte corresponde al transporte de dos o más tipos de sustratos en la misma dirección simultáneamente, en el antiporte se transporta dos o más tipos de sustratos en direcciones contrarias simultáneamente y el uniporte es el transporte de un solo tipo de sustrato a través de la membrana en una dirección [91].

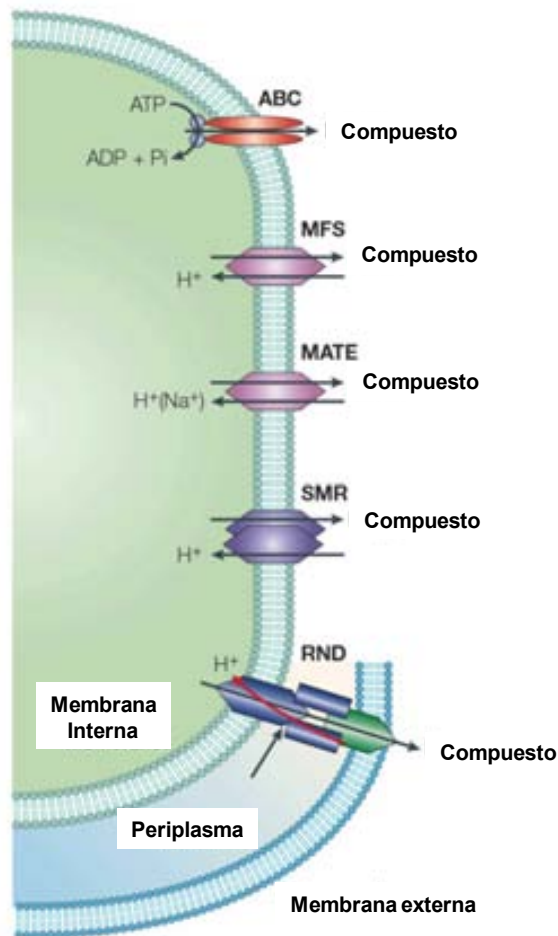


Figura 1.8. Tipos de bombas de eflujo. Tomado de [92].

1.8.1.1.1. Transportadores ABC

Los transportadores ABC son permeasas multiméricas que se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas. Estos transportadores acoplan la energía liberada de la hidrólisis del ATP a la translocación de una amplia variedad de sustancias (aminoácidos, iones, péptidos, fármacos, lípidos, polisacáridos, proteínas, etc) y son importantes factores de virulencia en bacterias ya que están implicados en la captación de nutrientes y en la secreción de toxinas y antimicrobianos [93, 94].

El primer transportador ABC descrito fue la glicoproteína P humana, la cual está implicada en la multiresistencia a fármacos en células tumorales. También se han descrito en actinomicetos productores de antibióticos en los que están implicados en la autorresistencia al antibiótico sintetizado [89, 94, 95].

Los transportadores ABC están compuestos de cuatro dominios: dos dominios transmembranales (MSD, *Membrane-Spanning Domains*) y dos dominios de unión a nucleótido (NBD, *Nucleotide-Binding domain*), sin embargo algunas bacterias pueden tener uno de cada o sólo un NBD. En muchas bacterias estos cuatro dominios se

expresan como polipéptidos independientes codificados por genes organizados en un operón o agrupados en una región de DNA, mientras que en eucariotas estos transportadores son codificados por un solo gen [93]. Por otro lado, estos transportadores se clasifican en importadores y exportadores de acuerdo con el sentido de la translocación del sustrato. Los importadores se encuentran exclusivamente en procariotas y usualmente están asociados a una proteína de unión a sustrato extra citoplasmática (SBP, *Substrate Binding Protein*) localizada en el periplasma de gram negativos o asociada a la membrana de gram positivos mediante un anclaje lipo-aminoácido contiguo. Por su parte los exportadores se encuentran tanto en eucariotas como en procariotas y en estos últimos algunos necesitan proteínas adicionales presentes en la membrana externa [93].

Los NBDs son los encargados de acoplar la hidrólisis del ATP en el proceso de transporte. Estos dominios son los más conservados entre este tipo de transportadores con un 30-40% de homología independientemente de su especificidad de sustrato u origen. Poseen secuencias altamente conservadas: los motivos *Walker_A* y *Walker_B* que forman un bolsillo de unión de ATP típico de los transportadores ABC, las secuencias de la marca de la familia de transportadores ABC que son un patrón característico localizado entre los motivos *Walker_A* y *Walker_B* y por último un motivo de seis aminoácidos corriente abajo del motivo *Walker_B* [93]. Por su parte los MSDs contienen de 4 a 8 α -hélices transmembrana (usualmente 6) que forman el canal que permite la translocación del sustrato a través de la membrana. Estos dominios son menos conservados que los NBDs pero algunos tienen patrones característicos como el bucle EAA que se encuentra entre la última y penúltima α -hélice y que probablemente constituye el sitio de interacción con los NBDs [93]. Otro patrón es la marca de las proteínas integrales de membrana del sistema de transporte tipo ABC-2 que es un motivo que se encuentra en el extremo C-terminal de algunos MSDs. Los SBP presentan una baja similitud en su secuencia de aminoácidos y en gram positivos tienen un sitio de unión a lipoproteínas próxima a una secuencia señal hidrofóbica [93].

1.8.1.1.2. Transportadores MFS

Los transportadores MFS son proteínas de membrana que se encuentran en procariotas y eucariotas. Estos transportadores están implicados en el transporte de varios sustratos como azúcares, intermediarios del ciclo de krebs, ésteres fosfato, oligosacáridos, inositoles, antibióticos y una amplia variedad de aniones y cationes inorgánicos. El transporte de estos sustratos se puede llevar a cabo por simporte, antiporte o uniporte [86]. Se cree que los transportadores MFS funcionan como

monómeros, sin embargo en gram negativos pueden formar parte de sistemas tripartita junto con proteínas del periplasma y canales de la membrana externa [90]. El análisis de hidropatía y el alineamiento de motivos conservados ha revelado que algunas proteínas MSF pueden agruparse en dos familias con 12 o 14 segmentos transmembranales. Además, estos transportadores tienen secuencias conservadas llamadas motivos A a H. Los motivos A y B se encuentran ampliamente distribuidos entre los miembros de esta superfamilia, mientras que el motivo C a G sólo está presente en las familias de 12 y 14 segmentos transmembranales [86]. Por otro lado, muchos de los transportadores que pertenecen a esta superfamilia han mostrado similitud en las regiones N y C-terminal de sus secuencias y dado el amplio rango de sustratos reconocidos se ha sugerido que las regiones C-terminal de estos transportadores son los que determinan la especificidad de sustrato y la región N-terminal estaría implicada en la translocación de protones [86]. Se han descrito varias bombas de eflujo pertenecientes a esta superfamilia implicadas en la resistencia a antibióticos tanto en gram negativos como en gram positivos, siendo uno de los mejores caracterizados TetB de *E. coli* el cual confiere resistencia a tetraciclina [91, 92].

1.8.1.1.3. Transportadores MATE

Los transportadores MATE están implicados en la resistencia a múltiples agentes tóxicos incluyendo colorantes catiónicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas aunque su perfil de sustrato es menor comparado con los de otros transportadores. Estos transportadores están compuestos por una sola proteína de membrana con 12 dominios transmembrana y utilizan el gradiente electroquímico, con frecuencia el gradiente de Na^+ o H^+ para el transporte [90, 91]. Aunque hay pocos transportadores de este tipo caracterizados, muchos genomas bacterianos contienen proteínas MATE hipotéticas, incluso se han identificado dos genes en el cromosoma 17 humano [90, 91]. El primer transportador caracterizado de este tipo fue NorM de *Vibrio parahaemolyticus* y posteriormente se identificaron otros tanto en gram negativos como en gram positivos [96].

1.8.1.1.4. Transportadores SMR

Los SMR son una familia de transportadores relativamente pequeña restringida a procariontes [97]. Ellos además son los transportadores multifármaco más pequeños ya que contienen solo cerca de 110 aminoácidos y cuatro segmentos transmembranales y posiblemente dado su tamaño, funcionan como complejos

oligoméricos con tres motivos conservados (A, B y C) [96, 98]. Utilizan la fuerza protónica motriz para translocar sus sustratos usando el mecanismo antiporte. Aunque son bombas multifármaco, sus sustratos incluyen antisépticos y desinfectantes. Los miembros de esta familia mejor caracterizados son Smr de *Staphylococcus aureus* y EmrE de *E. coli* [98].

1.8.1.1.5. Transportadores RND

Estos transportadores se encuentran tanto en eucariotas como en procariontes, generalmente en gram negativos donde son altamente conservados. Funcionan como un sistema tripartita formado por una proteína transportadora ubicada en la membrana interna, una proteína accesoria periplásmica o proteína de fusión de membrana y una proteína de membrana externa o porina [91, 99]. Estos transportadores son antiporte con 12 dominios transmembrana y pueden dividirse en dos subfamilias: la del eflujo de compuestos hidrófobos y anfipáticos y la subfamilia del eflujo de metales pesados [86]. Estos transportadores poseen un amplio rango de sustratos siendo capaces de contribuir a la resistencia de una gran cantidad de antimicrobianos no relacionados estructuralmente por lo que se conocen como sistemas multifármacos inespecíficos [91]. También juegan un papel a nivel fisiológico, protegiendo a bacterias como *E. coli* de sales biliares y detergentes y a *Pseudomonas aeruginosa* de compuestos tóxicos producidos por otros microorganismos en suelos. Estos transportadores pueden capturar compuestos que se encuentran en el espacio periplásmico y expulsarlos al exterior [100]. Los sistemas más estudiados son el AcrAB-TolC de *E. coli* y MexAB-OprM de *P. aeruginosa* [99, 100].

1.8.1.2. Resistencia por modificación o degradación enzimática del antibiótico

Este es un mecanismo específico utilizado por las bacterias con el fin de inactivar el antibiótico mediante la ruptura de enlaces o la modificación química por adición o sustitución de radicales. Se cree que reacciones como la hidrólisis, la transferencia de grupo y las enzimas redox implicadas en el metabolismo primario e intermediario de los microorganismos posiblemente fueron el origen de este tipo de resistencia (Tabla 1.4) [85, 100].

Tabla 1.4. Estrategias enzimáticas de inactivación de antibióticos. Tomado de [85].

Estrategia	Tipo	Antibióticos afectados	
Hidrólisis		β -lactámicos Macrólidos	
Transferencia de grupo	Acil	Aminoglucósidos Cloranfenicol Estreptogramina A	
	Fosforil	Aminoglucósidos Macrólidos Rifamicinas Péptidos	
	Tiol	Fosfomicina	
	Nucleotidil	Aminoglucósidos Lincosamina	
	ADP-ribosil	Rifamicina	
	Glicosil	Macrólidos Rifamicina	
	Otros	Redox	Tetraciclina Rifamicina Estreptogramina A
			Liasa

1.8.1.2.1. Hidrólisis

Muchos antibióticos tienen enlaces químicos hidrolíticamente susceptibles, cuya integridad es importante para su actividad biológica. Existen varios ejemplos de enzimas que han evolucionado para romper estos enlaces y así destruir la actividad del antibiótico [85]. El ejemplo mejor conocido son las β -lactamasas, amidasas que clivan el anillo β -lactámico de las penicilinas y la cefalosporinas. Otros ejemplos incluyen las esterasas que se han relacionado con la resistencia a macrólidos y fosfomicina. Estas enzimas requieren agua como co-sustrato por lo que las bacterias las excretan e interceptan el antibiótico antes de que esté en contacto con la célula [85].

Las β -lactamasas fueron uno de los primeros mecanismos de resistencia reportados en la literatura. Han sido detectadas en gram positivos y gram negativos tanto en plásmidos como a nivel cromosómico. Estas enzimas pueden ser metalo- β -lactamasas o Ser- β -lactamasas según la estrategia empleada para clivar el anillo β -lactámico [85]. Por su parte las esterasas, actúan catalizando la hidrólisis del anillo lactona de los macrólidos, estas enzimas también han sido detectadas tanto en gram

positivos como en gram negativos. Se describieron por primera vez en 1984 en un aislado resistente de *E. coli*; esta resistencia se ha relacionado con la presencia de los genes *ereA* y *ereB*. Las epoxidasas actúan sobre el anillo epóxido de la fosfomicina [85]. Este proceso es catalizado por la enzima FosX de *Mesorhizobium loti* que además tiene ortólogos en otras bacterias y cuya estructura es similar a la de la enzima FosA implicada en resistencia en gram negativos [85].

1.8.1.2.2. Resistencia por transferencia de grupo

Este tipo de resistencia abarca un grupo muy diverso y amplio de enzimas cuya función es modificar covalentemente los antibióticos, lo que produce una alteración estructural que impide la unión a su diana. Las estrategias químicas incluyen la O-acilación y N-acilación, la O-fosforilación, la O-nucleotidilación, la O-ribosilación, la O-glicosilación y la transferencia de tiol. Las enzimas de este grupo son activas solo en el citosol ya que requieren un co-sustrato como el ATP, el acetil-CoA, NAD⁺, UDP glucosa o el glutatión [85].

Dentro de este grupo se encuentran las aciltransferasas que son bastante comunes en bacterias. La modificación covalente de los grupos hidroxil o amino produce una pérdida en la capacidad del antibiótico para unirse a su diana y por lo tanto se vuelven inactivos. El éster (por O-acetilación) o la amida (por N-acetilación) resultante es biológicamente estable e irreversible sin la acción de una esterasa o una amidasa. Dentro de las aciltransferasas se encuentran las aminoglucósido acetiltransferasas, las cloranfenicol acetiltransferasas y las estreptogramina acetiltransferasas [85]. Las aminoglucósido acetiltransferasas actúan sobre los grupos amino e hidroxilo de los aminoglucósidos impidiendo su interacción con el rRNA, los genes que los codifican se encuentran distribuidos en bacterias de importancia clínica y en bacterias ambientales. Las cloranfenicol acetiltransferasas son enzimas triméricas que acetilan los dos grupos hidroxilo del cloranfenicol evitando su unión a la subunidad 50S del ribosoma. Las estreptogramina acetiltransferasas, identificadas en varios gram positivos, acetilan el grupo hidroxilo libre de la estreptogramina A [85].

Las fosfotransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de fosfatos a diversos sustratos. La O-fosfotransferasas están implicadas en la resistencia a antibióticos y muchas comparten similitudes estructurales con otras quinasas como las proteinquinasas [85]. Dentro de este grupo se encuentran las aminoglucósido quinasas, ampliamente distribuidas entre patógenos bacterianos y que impiden la unión del antibiótico al ribosoma, los genes que las codifican se han encontrado en plásmidos, transposones e integrones. También existen otras quinasas como las

macrólido quinasas y las viomicina quinasas que confieren resistencia a la eritromicina y a la viomicina respectivamente y que han sido detectadas en gram positivos y gram negativos [85].

Las tioltransferasas están implicadas en la resistencia a la fosfomicina por acción sobre su anillo epóxido. En gram negativos se ha detectado la enzima de resistencia a la fosmidomicina FosA (en plásmidos y en el cromosoma) y un gen equivalente (*fosB*) en gram positivos. Las nucleotidiltransferasas modifican los aminoglucósidos y las lincosamidas transfiriendo nucleósidos a un grupo hidroxilo de estos antibióticos [85]. Estas enzimas han sido detectadas en gram negativos y gram positivos. Por su parte las ADP-ribosiltransferasas transfieren ADP-ribosa proveniente del NAD^+ a un hidroxilo del antibiótico. El caso mejor documentado es el de la resistencia a las rifamicinas en micobacterias aunque se han detectado enzimas similares en gram negativos. Las glicosiltransferasas catalizan la glicosilación de la eritromicina y otros macrólidos en la posición 2' del azúcar desosamina, estas enzimas están presentes en bacterias productoras de antibióticos como *Streptomyces* que las utilizan como mecanismo de protección [85].

1.8.1.2.3. Otros mecanismos de resistencia enzimática

La mayor parte de los mecanismos enzimáticos de resistencia a antibióticos se dan por transferencia de grupo e hidrólisis, pero las bacterias han desarrollado otros mecanismos de detoxificación como son las enzimas redox y las liasas.

1.8.1.2.3.1. Enzimas redox

La oxidación es uno de los principales mecanismos utilizados por mamíferos para detoxificar xenobióticos, pero no es demasiado frecuente en bacterias patógenas. Uno de los mecanismos más conocidos es la oxidación de la tetraciclina por la enzima TetX de *Bacteroides fragilis* que cataliza la monohidroxilación del antibiótico en la posición 11a afectando el sitio de unión a Mg^{2+} , necesario para su actividad antimicrobiana. También, se ha visto que una posible monooxigenasa de *Rhodococcus equi* confiere resistencia a la rifampicina aunque no se conoce el mecanismo exacto [85].

1.8.1.2.3.2. Liasas

Las liasas son enzimas que rompen los puentes carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno, carbono-sulfuro por rutas no hidrolíticas o no oxidativas.

Una de las liasas mejor caracterizadas es la Vgb de estafilococos, la cual es responsable de la resistencia a estreptogramina B [85].

1.8.1.3. Resistencia por alteración de la diana

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a través de alteraciones que hacen que la proteína diana sea menos susceptible al fármaco. Por ejemplo la resistencia a fluoroquinolonas se debe principalmente a mutaciones en la enzima diana DNA topoisomerasa [100]. Otro ejemplo es la metilación de la adenina en la posición 2058 del la subunidad 50S de rRNA conferida por el producto del gen *erm*, usualmente codificado en un plásmido provocando la resistencia a macrólidos, lincosamida y estreptomicina [100].

1.8.2. Papel de los biocidas en resistencia

Los biocidas (antisépticos, desinfectantes y preservantes) han sido usados empíricamente de varias formas durante siglos con el fin de preservar alimentos, especias e incluso bálsamos usados en los procesos de momificación. Cuando se descubrieron las bacterias, se desarrollaron métodos de preservación química y desinfección en donde se emplearon sustancias como el iodo, el cloro, el fenol y el cloruro de mercurio [101]. Posteriormente otros compuestos fueron desarrollados y utilizados satisfactoriamente para prevenir dolencias infecciosas, particularmente en hospitales. Los desinfectantes contienen uno o más compuestos químicos a una concentración suficiente para afectar múltiples dianas celulares (proteínas, DNA, RNA, componentes de la pared celular) y pueden ser bactericidas, esporicidas, fungicidas, viricidas o una combinación de ellos [101]. La respuesta bacteriana a los biocidas es determinada por la naturaleza del agente químico y el tipo de microorganismo implicado. Factores como la temperatura, el pH ambiental y la presencia de materia orgánica pueden tener un efecto considerable sobre la actividad de un agente antibacteriano [101].

Los biocidas juegan un papel importante en el control de las fuentes de infección. Su uso ha aumentado cerca de seis veces en los últimos años lo que ha producido una reducción significativa en la transmisión de agentes infecciosos. Sin embargo actualmente existe una creciente preocupación acerca del uso de biocidas y su relación con el desarrollo de resistencias que puedan afectar a fármacos clínicamente relevantes [80, 87]. Se ha observado que las bacterias pueden desarrollar respuestas comunes para contrarrestar los efectos de los biocidas y los antibióticos, un fenómeno que se conoce como resistencia o tolerancia cruzada

biocida-antibiótico, posiblemente generada por una presión que favorece la selección de cepas resistentes [80, 101]. La resistencia cruzada puede ocurrir en microorganismos con un número elevado mecanismos inespecíficos de resistencia tales como sistemas de eflujo y cambios en la permeabilidad de la membrana. Por otro lado, se ha sugerido que la tolerancia a los biocidas puede surgir al igual que en el caso de los antibióticos, por el uso incorrecto del compuesto [80, 101].

La actividad de los biocidas varía enormemente en diferentes tipos de microorganismos y sus cepas, algunos de los cuales pueden ser intrínsecamente resistentes. Al igual que en la resistencia a fármacos, la resistencia intrínseca a los biocidas está relacionada con determinantes genéticos y características fisiológicas y estructurales de la bacteria [101]. Las micobacterias son probablemente las bacterias más resistentes a la desinfección, seguidas de las gram negativas y las gram positivas. En cuanto a la resistencia adquirida, está dada por mutaciones o por la adquisición de determinantes genéticos presentes en elementos extra cromosómicos como los plásmidos y los transposones [101].

La resistencia bacteriana a los biocidas fue descrita por primera vez en los años cincuenta y sesenta [101]. A la fecha se han descrito varios sistemas de eflujo, pertenecientes a las principales familias de transportadores implicados en la detoxificación de biocidas y antibióticos tanto en gram positivos como en gram negativos. Éstos incluyen transportadores codificados en plásmidos y determinantes cromosómicos implicados en la resistencia a compuestos del amonio cuaternario, el triclosán (TRC) y la plata, entre otros [102]. Dichos mecanismos muestran una amplia especificidad de sustrato, siendo capaces de expulsar una variedad de compuestos no relacionados estructuralmente incluidos los antibióticos [103]. Estos sistemas de eflujo incluyen NorA, NorB, MepA y MdeA de *S. aureus*, el sistema Mex de *P. aeruginosa*, AcrAB-TolC de *E. coli*, SdeXY de *Serratia marcescens* y SmeDEF de *Stenotrophomonas maltophilia*, entre otros [101-103].

1.8.2.1. Triclosán

El triclosán (5-cloro-2-(2,4-dicloro-fenoxi)-fenol), también conocido como Irgasán es un bisfenol que tiene una alta actividad antibacteriana. Desde los años setenta se ha usado en un extenso rango de productos del cuidado personal, en la industria textil, en suministros de limpieza, en la fabricación de juguetes, contenedores para el almacenaje de alimentos y bolsas de basura, entre otros [104]. Su extenso uso se debe a que tiene un amplio espectro de acción y es un compuesto seguro. El TRC es activo contra bacterias gram positivas, algunas gram negativas, hongos y virus; su

uso ha sido implementado en hospitales para la prevención de infecciones nosocomiales [104].

Como en el caso de otros biocidas, el TRC tiene múltiples mecanismos de acción y numerosas dianas celulares a concentraciones superiores a la CMI [105]. Aunque varios estudios han mostrado que a concentraciones sub letales inhibe dianas bacterianas específicas como la vía biosintética de los ácidos grasos, en concreto la enoil-ACP reductasa [104] conocida como FabI en *E. coli* [106], *P. aeruginosa* [107] y *S. aureus* [108] o su homóloga InhA en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* que también es la diana de la isoniacida y la etionamida [109, 110]. Sin embargo *Streptococcus pneumoniae* no contiene un homólogo de FabI, en su lugar posee FabK, una enoil reductasa que es resistente al TRC por lo que se sugiere que en esta bacteria el TRC podría tener otros blancos responsables de la sensibilidad a este compuesto [111]. Los efectos observados del TRC sobre la estructura y función de la membrana bacteriana son una consecuencia de la inhibición de la síntesis de ácidos grasos que a su vez afecta la síntesis de lípidos como fosfolípidos, lipopolisacáridos, lipoproteínas y ácidos micólicos [101].

Por otro lado, los efectos del TRC pueden variar dependiendo de la concentración utilizada, su biodisponibilidad, el tiempo de exposición, la fisiología de la diana y el microorganismo sobre el cual actúa. Se ha observado que su actividad es menor cuando la bacteria se encuentra en fase estacionaria posiblemente debido a un metabolismo reducido y a la presencia de restos celulares y células muertas que pueden reducir su biodisponibilidad [105]. Las concentraciones a las que normalmente se usa el TRC son más altas que las requeridas para inhibir la mayoría de bacterias, por lo que bajo condiciones normales de uso es poco probable que se produzca resistencia. Sin embargo los productos que contienen TRC dejan residuos en cocinas, baños y superficies donde son inevitablemente diluidos a concentraciones subletales que posiblemente permitan la selección de bacterias con resistencia intrínseca o adquirida al TRC o a otros compuestos no relacionados. Estas bacterias constituyen una fuente de determinantes de resistencia que pueden ser transmitidos a patógenos humanos con la posible generación de resistencias cruzadas, cuya aparición ha sido también atribuida al hecho de que este compuesto inhibe una diana bacteriana específica como ocurre con otros antibióticos de importancia clínica [104].

En general, los mecanismos por los cuales las bacterias son resistentes al TRC incluyen mutaciones, modificación enzimática y bombas de eflujo que se expresan en respuesta al estrés ejercido por el biocida. Varios estudios han mostrado que las

Introducción

mutaciones en el gen *fabI* están relacionadas con la resistencia a TRC en *E. coli* [106, 112] y subsecuentes estudios genéticos revelaron que la mutación de su homólogo *inhA* en *M. smegmatis* produce igualmente resistencia al TRC y a la isoniacida [109]. Sin embargo las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la isoniacida son susceptibles al TRC por lo que el diseño de inhibidores dirigidos al sitio de unión del TRC podría ser útil en el tratamiento de las cepas resistentes [110].

Se han descrito mecanismos de eflujo implicados en la resistencia al TRC, en muchas bacterias, incluyendo *E. coli* (AcrAB-TolC) [113], *S. maltophilia* (SmeDEF) [114], *Salmonella enterica* (AcrAB-TolC) [115, 116], *Campylobacter jejuni* (CmeABC) [117], *B. fragilis* (BmeABC) [118], *P. aeruginosa* (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexEF-OmpH y TriABC-OpmH) [119, 120] *Serratia marcescens* (SdeXY) [121], entre otros. Muchas de estas bombas han mostrado resistencia cruzada con antibióticos [104], como es el caso de las quinolonas en *E. coli* y *P. aeruginosa* [113, 122, 123] y los β -lactámicos, el cloranfenicol, las fluoroquinolonas y tetraciclinas en *S. enterica* [101], entre otros.

La degradación enzimática del TRC ha sido demostrada en dos bacterias del suelo, *Pseudomonas putida* y *Alcaligenes xylosoxidans* que tienen niveles de resistencia al TRC altos y pueden utilizarlo como fuente de carbono [124]. La degradación del TRC ha sido también reportada en *Sphingomonas sp* donde la pérdida de la habilidad para mineralizar este compuesto provoca susceptibilidad al TRC y en la bacteria nitrificante *Nitrosomonas europaea* en la que una monooxigenasa cataliza la degradación de este compuesto [124]. También, se ha descrito la O-glicosilación y O-xilosilación del TRC en dos hongos, *Trametes versicolor* y *Pycnoporus cinnabarinus* [125].

El efecto del TRC en micobacterias ha sido ampliamente estudiado y se ha observado que es un inhibidor sub-micromolar de InhA, representando una inhibición 10000 veces menos eficiente comparada con su equivalente FabI de *E. coli*, esto posiblemente debido a que InhA tiene una hendidura de unión más profunda que FabI [110, 126, 127], lo que se refleja en la mayor resistencia de *M. tuberculosis* al TRC comparada con *E. coli*. El hecho de que InhA también sea la diana de la isoniacida y la etionamida, la convierte en un excelente objetivo para el desarrollo de nuevos fármacos anti-tuberculosos. La isoniacida y la etionamida son pre-fármacos cuya actividad depende de la activación en *M. tuberculosis* por parte de la enzima KatG (catalasa-peroxidasa) y EthA (flavin monooxigenasa) respectivamente. Como pre-fármacos la isoniacida y la etionamida son altamente específicos y efectivos, sin

embargo mutaciones en sus enzimas activadoras se han relacionado con resistencia clínica. El TRC que no requiere activación ya que inhibe InhA directamente en cepas resistentes, representa un candidato prometedor en el diseño de nuevos fármacos y de hecho se han obtenido derivados con una potencia optimizada de hasta 50 veces su capacidad inhibitoria frente a InhA y 10 veces su actividad bactericida. Además estos derivados mostraron eficacia frente a cepas de laboratorio resistentes a isoniacida y aislados clínicos de *M. tuberculosis* [128-130]. También se han obtenido derivados que han sido ensayados en *E. coli*, *S. aureus*, *Enterobacter cloacae* [131] así como en parásitos como *Toxoplasma gondii* [132].

1.8.3. Mecanismos de resistencia en *M. tuberculosis*

Los primeros casos de resistencia en *M. tuberculosis* se identificaron en la década de los cuarenta cuando la estreptomina empezó a usarse en el tratamiento de la tuberculosis. A medida que la era de la quimioterapia contra la tuberculosis avanzaba los casos de resistencia continuaron ocurriendo, principalmente como consecuencia de una terapia inadecuada o la no adherencia a ella. Los investigadores inicialmente pensaron que las cepas monorresistentes podían tener un *fitness* reducido y por tanto ser menos virulentas, sin embargo esta hipótesis fue refutada en los noventa, época en la que aumentó el número de casos con cepas MDR y la coinfección con el VIH [133, 134]. Posteriormente en el año 2000 el *Stop TB Partnership's Green Light Committee* creado para proporcionar el acceso a medicamentos con precios preferenciales, encontró varios casos de resistencia que eran consistentes con el fenotipo XDR y para determinar su tasa el Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) de los Estados Unidos y la OMS realizaron un seguimiento durante los años 2000 a 2004 en el que encontraron que el 20% de los aislados eran MDR y el 2% XDR. El término tuberculosis XDR fue introducido en el año 2005 en la conferencia mundial sobre la salud del pulmón en París y en el año 2006 el CDC publicó su definición que fue revisada el mismo año por la OMS [133, 134].

Pese a los esfuerzos dirigidos al control y la prevención de la resistencia, los niveles de casos MDR continúan siendo altos en algunas regiones en las que los sistemas de salud pública no detectan ni tratan la tuberculosis de manera adecuada. Actualmente, se estima que el 5% de los casos de tuberculosis reportados corresponden a cepas MDR [76, 135, 136]. En el año 2011 la OMS estimó 310.000 casos de cepas MDR en pacientes con tuberculosis pulmonar. Una de las regiones más afectadas corresponde a países de Europa oriental y Asia central donde del 9 al

Introducción

32% de los casos nuevos de tuberculosis son MDR y más del 50% de casos previamente tratados tienen este fenotipo. Por su parte el fenotipo XDR se ha detectado en 84 países con una proporción de casos XDR del 9% y se estima que cerca de 40.000 casos de este fenotipo pueden producirse cada año [9].

La resistencia en *M. tuberculosis* es el resultado de múltiples mecanismos que operan simultáneamente, entre ellos están la resistencia intrínseca dada por la impermeabilidad de la envuelta celular y el eflujo de antibióticos mediado por bombas. La resistencia adquirida no ocurre por transferencia horizontal como en otras bacterias, si no que está dada por la acumulación de mutaciones en genes diana y reguladores o promotores así como la modificación y degradación de antibióticos por enzimas [137, 138].

1.8.3.1. Resistencia intrínseca

M. tuberculosis es intrínsecamente resistente a una variedad de antimicrobianos en gran parte debido a la estructura y composición de su envuelta celular altamente rica en lípidos [39]. La reducida permeabilidad de la envuelta permite que haya una disminución del influjo de antimicrobianos y por tanto una reducción en la acumulación intracelular de éstos [96, 139]. Sin embargo antimicrobianos como las fluoroquinolonas y las rifamicinas pueden pasar más fácilmente a través de la pared celular a diferencia de otros fármacos que tienen un paso limitado. Evidencia genética y bioquímica ha demostrado el papel de la envuelta como barrera y su implicación en la resistencia [39, 96, 139].

Otro factor importante en la resistencia intrínseca es que aparentemente *M. tuberculosis* no posee muchas porinas, esto ha sido evidenciado en ensayos en los que la expresión de la porina MspA de *M. smegmatis* en *M. bovis* BCG y en *M. tuberculosis* produce una mayor susceptibilidad a antibióticos β -lactámicos, isoniacida, etambutol y estreptomina [32].

La envuelta celular por sí sola no explica la amplia resistencia intrínseca de las micobacterias a los antimicrobianos, si no que cuenta con otros mecanismos como son los sistemas de eflujo y las enzimas de modificación de antibióticos o de sus dianas.

1.8.3.1.1 Sistemas de eflujo

El genoma de *M. tuberculosis* contiene un alto número de bombas de eflujo pertenecientes a las principales familias de transportadores, muchas de las cuales están por caracterizar [16]. Los sistemas hasta ahora caracterizados han mostrado

que *M. tuberculosis* tiene bombas sustrato-específicas y otras que expulsan compuestos no relacionados a nivel estructural y funcional y por tanto son bombas de eflujo MDR. Este fenómeno es considerado como un efecto secundario, accidental y oportunista del transporte de sustratos fisiológicamente no definidos. Los mecanismos de inducción y regulación de este tipo de bombas no se entienden completamente, aunque se sabe que su expresión está muy regulada lo que asegura que los genes que las codifican estarán disponibles cuando sea necesario para cumplir su función fisiológica [39, 138].

Aunque los sistemas de eflujo han sido estudiados en varias especies de micobacterias, en muchos casos se ha usado *M. smegmatis* como modelo para la expresión heteróloga y caracterización de estas bombas de eflujo. La primera bomba caracterizada en micobacterias fue LfrA de *M. smegmatis* que expresada en plásmidos multicopia confiere un bajo nivel de resistencia a fluoroquinolonas, bromuro de etidio, acridina y algunos compuestos del amonio cuaternario [140]. Posteriormente se caracterizó TetV también en *M. smegmatis*, que confiere resistencia a tetraciclina [141] y Tap (Rv1258c) presente en *Mycobacterium fortuitum* y *M. tuberculosis*, cuya expresión en *M. smegmatis* resulta en una baja resistencia a aminoglucósidos y tetraciclina [88, 142]. Las proteínas Tap y LfrA hacen parte de la familia de transportadores MSF. En *M. smegmatis* el transportador PstB, responsable de la captación de fosfato, está implicado también en la resistencia a fluoroquinolonas [84]. Estos estudios fueron los precursores de diferentes estudios del eflujo de compuestos en *M. tuberculosis* [138, 140-142].

Los genes codificantes de transportadores tipo ABC ocupan aproximadamente el 2.5% del genoma de *M. tuberculosis*. El análisis de similitud con transportadores conocidos y la detección de operones han permitido identificar 26 transportadores completos y 11 incompletos, de los cuales 16 son importadores y 21 presumiblemente exportadores [93]. La clasificación de los transportadores según análisis filogenético de sus NBD y el análisis de homología con transportadores de sustrato conocido predice que al menos 10 de los exportadores están implicados en la translocación de fármacos [93].

Experimentalmente se han caracterizado 4 transportadores ABC de *M. tuberculosis* asociados a la resistencia a antimicrobianos. El primero es el codificado por los genes *drrABC* cuya sobreexpresión en *M. smegmatis* confiere resistencia a un amplio rango de antibióticos incluyendo tetraciclina, eritromicina, etambutol, norfloxacin, cloranfenicol, estreptomycin y antraciclinas [143]. Estudios de

Introducción

mutagénesis han mostrado que el papel fisiológico de estas proteínas en *M. tuberculosis* sería el transporte de los lípidos PDIM a la pared celular. También se ha mostrado que el operón de *M. tuberculosis* Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c confiere resistencia a fluoroquinolonas cuando se sobreexpresa en *M. smegmatis* [144]. Otro de los transportadores identificados es el Rv0194 que está implicado en la resistencia a β -lactámicos, también cuando se sobreexpresa en *M. smegmatis* y *M. bovis* BCG [145]. Por último, se ha demostrado que el transportador Rv1218c media el eflujo de una amplia variedad de sustratos como novobiocina, pirazolonas, biarilpiperacinas, bis-anilino pirimidinas, pirroles y piridonas en *M. tuberculosis* [146] (Tabla 1.5).

El genoma de *M. tuberculosis* contiene 15 genes que codifican transportadores de tipo RND, 13 de los cuales han sido designados como MmpL (*Mycobacterial membrane proteins, Large*) [84, 147]. La inactivación de 11 de estos genes no altera la susceptibilidad a fármacos. Los genes *mmpL4*, *mmpL7*, *mmpL8* y *mmpL11* están implicados en virulencia en ratón y cuando la proteína MmpL7, que forma parte del complejo de exportación de los PDIMs, se sobreexpresa en *M. smegmatis* produce una alta resistencia a la isoniácida [148-150]. Por su parte la proteína MmpL8 exporta el precursor del sulfolípidosulfátido 2,3-diacil- α,α' -trealosa-2' sulfato [151]. Finalmente, otros estudios han mostrado que el incremento en la transcripción de los genes *mmpS5-mmpL5* está relacionado con el eflujo de econazol en *M. tuberculosis* y *M. bovis* [152] (Tabla 1.5).

Por otro lado, se han predicho cerca de 16 proteínas MSF en el genoma de *M. tuberculosis* [88]. Entre ellas está la proteína P55 (Rv1410c), implicada en la resistencia a aminoglucósidos y tetraciclina en *M. tuberculosis* y *M. bovis* [153]. La proteína Tap (Rv1258c), sobreexpresada en un aislado clínico MDR de *M. tuberculosis* [154]; la proteína Stp (Rv2333c) que confiere resistencia a espectinomicina y tetraciclina [155]; la proteína Rv1634 que media la resistencia fluoroquinolonas cuando es sobreexpresada en *M. smegmatis* [88], la proteína JefA (Rv2459) implicada en la resistencia a isoniácida y etambutol en *M. tuberculosis* [156] y finalmente la proteína Rv0849 implicada en el transporte de pirroles [137].

En la familia SMR se ha descrito la bomba MDR Mmr o TBsmr (Rv3065) de *M. tuberculosis* que se induce en presencia de isoniácida y que media el eflujo de la acriflavina, la eritromicina y el bromuro de etidio cuando se expresa en *M. smegmatis* [157]. Sin embargo su delección y sobreexpresión en *M. tuberculosis* no tiene ningún efecto sobre la susceptibilidad a la isoniácida, aunque su delección sí mostró susceptibilidad al bromuro de etidio, tetra-fenilfosfonio, safranina O y CTAB [158].

En cuanto a la familia MATE, un estudio reciente mostró que la bomba Mmp en *M. smegmatis* contribuye a la resistencia frente a fleomicina, bleomicina, capreomicina, amikacina, kanamicina y cloruro de cetilpiridinio [159]. Esta bomba hace parte de un operón junto con otros genes que codifican proteínas con funciones aparentemente no relacionadas, incluyendo la EfpA cuya expresión se induce en presencia de isoniacida y etionamida [159].

Por otro lado, *M. tuberculosis* tiene otras proteínas de membrana que no se clasifican dentro de las familias de transportadores anteriormente descritas, pero que están implicadas en resistencia. Una de estas proteínas es IniA implicada en la resistencia a isoniacida, etambutol y bromuro de etidio cuando se sobreexpresa en *M. bovis* BCG y cuya delección en *M. tuberculosis* genera una alta susceptibilidad a isoniacida [160]. Se cree que esta proteína puede ser un transportador tipo MDR (Tabla 1.5).

Los reguladores transcripcionales juegan un papel importante en muchos de los mecanismos de resistencia de las micobacterias ya que se inducen en presencia de algunos antibióticos y otros compuestos. El gen *whiB7* es un regulador cuya expresión aumenta en presencia de eritromicina, tetraciclina y estreptomina. La delección de este gen produce hipersensibilidad a claritromicina, eritromicina, lincomicina, espectinomicina y estreptomina. Su inducción se ha correlacionado con la expresión de los genes *Rv1258c (tap)*, *Rv1473* que codifica un posible transportador ABC de macrólidos y *Rv1988 (erm)* homólogo a una metil transferasa ribosomal [90]. MarA es un regulador transcripcional que inducido por el salicilato a bajas concentraciones, produce un fenotipo MDR en *E. coli* y que cuando se sobreexpresa en *M. smegmatis* produce un incremento en la resistencia a isoniacida, rifampicina, etambutol, tetraciclina y cloranfenicol [161]. En *M. tuberculosis* también a bajas concentraciones de salicilato inducen resistencia a rifampicina, isoniacida, etambutol y estreptomina, aunque se desconoce el mecanismo por el que se produce este fenotipo [162].

Otro ejemplo lo constituye LfrR, un represor de *M. smegmatis* que controla la expresión de la bomba LfrA, cuya expresión se induce en presencia de acriflavina, bromuro de etidio o la rodamina 123. La delección de este regulador produce un aumento en la expresión de LfrA y por tanto un incremento en la resistencia a estos compuestos y a las fluoroquinolonas [138].

Tabla 1.5. Bombas de eflujo de *M. tuberculosis* asociadas a resistencia a antimicrobianos. Modificado de [139, 163].

Tipo de transportador	Gen	Producto proteico	Función	Fármaco expulsado	Referencias
ABC	<i>Rv2686c</i>	Proteína integral de membrana	Transporte activo de fármacos	FQ	[144]
	<i>Rv2687c</i>	Proteína integral de membrana	Transporte activo de fármacos	FQ	[144]
	<i>Rv2688c</i>	Proteína de unión de ATP	Transporte activo de fármacos	FQ	[144]
	<i>drrA</i> (<i>Rv2936</i>)	Proteína de unión a ATP	Transporte de fármacos y PDIMs	TC, SM,ETB, ERM, NOR,CM, ANT	[143, 150]
	<i>drrB</i> (<i>Rv2937</i>)	Proteína integral de membrana	Transporte de fármacos y PDIMs	TC, SM,ETB, ERM, NOR,CM, ANT	[143, 150]
	<i>drrC</i> (<i>Rv2938</i>)	Proteína integral de membrana	Transporte de fármacos y PDIMs	TC, SM,ETB, ERM, NOR,CM, ANT	[143, 150]
	<i>Rv0194</i>	Proteína tipo ABC	Transporte de fármacos	β-lactámicos, CM, SM, NOV	[145]
	<i>Rv1218c</i>	Proteína tipo ABC	Transporte de fármacos	NOV, PIR, PIRZ	[146]
MFS	<i>Tap</i> (<i>Rv1258c</i>)	Proteína de membrana	Transporte de fármacos. Posible factor de virulencia	TC, RIF, AMG	[88, 142, 164]
	<i>Rv1634</i>	Proteína de membrana	Transporte de fármacos	FQ	[88]
	<i>stp</i> (<i>Rv2333c</i>)	Proteína integral de membrana	Transporte de fármacos	TET, ESP	[155]
	<i>jefA</i> (<i>Rv2459</i>)	Proteína integral de membrana	Transporte de fármacos	INH, ETB	[156]
	<i>Rv0849</i>	Proteína integral de membrana	Transporte de fármacos	PIR	[137]
	<i>P55</i> (<i>Rv1410c</i>)	Proteína integral de membrana	Transporte de fármacos. Necesaria para mantener las características de crecimiento normal en medio sólido y líquido	TET, AMG	[153, 165]
RND	<i>mmpL7</i>	Proteína transmembranal	Transporte de fármacos y PDIMs. Posible factor de virulencia	INH	[148-150]
	<i>mmpL5</i>	Proteína transmembranal	Transporte de fármacos	ECZ	[152]
SMR	<i>mmr</i> (<i>Rv3065</i>)	Proteína integral de membrana de eflujo	Transporte de fármacos	ACF, ERM	[157]
Proteína de membrana	<i>iniA</i>	Proteína IniA INH-inducible	Transporte de fármacos	INH, EMB	[160]

AMG: Aminoglucósidos, **ANT:** Antraciclinas, **BrEt:** Bromuro de Etidio, **CIP:** Ciprofloxacina, **CM:** Cloranfenicol, **CLZ:** Clofazimina, **ECZ:** Econazol, **ESP:** Espectinomicina, **ERM:** Eritromicina, **ETB:** Etambutol, **FQ:** Fluoroquinolonas, **INH:** Isoniacida, **NOR:** Norfloxacin, **NOV:** Novobiocina, **OFX:** Ofloxacin, **PIR:** Pirroles, **PIRZ:** Pirazolonas, **PIZ:** Pirazinamida, **RIF:** Rifampicina, **SM:** Streptomycin, **TC:** Tetraciclina, **THZ:** Tioridazina.

1.8.3.1.2. Sistemas de modificación

La producción de enzimas que inactivan los antibióticos y otros compuestos es uno de los mecanismos usados por las micobacterias con el fin de resistir sus efectos tóxicos. El genoma de *M. tuberculosis* contiene unas 200 oxidorreductasas, deshidrogenasas y oxidasas, incluyendo 20 citocromo P450 monooxigenasas [16] muchas de las cuales podrían evolucionar y convertirse en mecanismos de detoxificación, aunque actualmente el número de enzimas caracterizadas que están implicadas en ello son pocas.

M. tuberculosis y otras micobacterias son resistentes naturales a los antibióticos β -lactámicos gracias a la producción de β -lactamasas codificadas por el gen *blaC* en *M. tuberculosis* y por los genes *blaS* y *blaE* en *M. smegmatis* [39, 166, 167]. Así mismo la cepa de *M. smegmatis* DSM43756 es resistente natural a la rifampicina gracias a una ADP-ribosiltransferasa que inactiva la rifampicina por ribosilación [168]. También se han descrito aminoglucósido *N*-acetiltransferasas y fosfotransferasas en varias micobacterias incluyendo *M. tuberculosis* [169-171]. Se cree que la función fisiológica de la aminoglucósido acetiltransferasa (2')-Ic de *M. tuberculosis* podría ser la acetilación de un intermediario de la vía biosintética del micotiol, el principal agente reductor de las micobacterias, participando así en la regulación del potencial redox celular. Así mismo, se ha caracterizado una arilamina *N*-acetiltransferasa en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* cuya sobreproducción resulta en resistencia a la isoniacida [172].

Los macrólidos son comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por el complejo *M. avium* y otras micobacterias no tuberculosas. Sin embargo estos antibióticos tienen muy poco o ningún efecto frente las bacterias del complejo *M. tuberculosis* [39]. El mecanismo de acción de estos antibióticos es la inhibición de la traducción mediante la unión específica a la subunidad 23S del rRNA. La resistencia a los macrólidos en micobacterias está mediada por el gen *erm37* que codifica una enzima que metila la subunidad 23S inhibiendo la unión del antibiótico. Este gen está presente en todos los miembros del complejo *M. tuberculosis* (excepto *M. bovis* BCG). Adicionalmente, *M. smegmatis* y *M. fortuitum*, también resistentes naturales a los macrólidos, codifican metiltransferasas (Erm38 y Erm39, respectivamente) cuya expresión es inducida por macrólidos [39].

Otro sistema de detoxificación es el mediado por el agente reductor micotiol que interacciona con varios antibióticos como la eritromicina, vancomicina o la rifampicina contribuyendo así a la resistencia intrínseca en micobacterias. La

modulación en la síntesis del micotiol puede afectar indirectamente la resistencia a antibióticos. Así, la transcripción de *mshB* (*Rv1170*), una acetilasa que cataliza la biosíntesis de micotioles se induce en presencia de isoniacida [173].

Las enzimas que participan en la inactivación de antibióticos comparten muchas similitudes con enzimas bien caracterizadas del metabolismo primario e intermediario, de las que probablemente derivan y que constituyen una fuente potencial de nuevos mecanismos de resistencia [174]. Un ejemplo sería la asparagina sintasa *AsnB* implicada en la biosíntesis del aspartato y que se ha relacionado con la resistencia a múltiples fármacos en *M. smegmatis*. La inactivación de este gen confiere hipersensibilidad a rifampicina, eritromicina, novobiocina y ácido fusídico [174].

1.8.3.2. Resistencia adquirida

A diferencia de otros microorganismos, la resistencia adquirida de *M. tuberculosis* no viene dada por elementos genéticos transmisibles como los plásmidos y transposones, si no que está relacionada con la acumulación de mutaciones que inducen variaciones a nivel fenotípico, las cuales dirigen la evolución del bacilo con el fin de adaptarse a las presiones ambientales [39, 87].

M. tuberculosis tiene una baja tasa de mutación (10^{-6} a 10^{-8}), sin embargo las mutaciones pueden ser seleccionadas, por ejemplo tras un tratamiento mal administrado con el antibiótico para el cual dichas mutaciones confieren resistencia, de manera que los mutantes resistentes gradualmente superarán en número a las cepas susceptibles y emergerán como cepas dominantes que podrán ser transmitidas a la comunidad [133, 135, 139].

La resistencia por mutaciones se puede clasificar en:

- Resistencia natural: es el resultado de una mutación natural independientemente de la exposición previa al antibiótico.
- Resistencia primaria: son los casos de resistencia en pacientes que no han estado expuestos a antibióticos.
- Resistencia adquirida: son los casos de resistencia en los que los pacientes estuvieron bajo un régimen de tratamiento, generalmente inadecuado [136].

Las bases moleculares de este tipo de resistencia, incluyen una variedad de mutaciones como inserciones, deleciones y mutaciones puntuales en diversos genes. Por ejemplo, mutaciones en el gen *katG* que codifica la enzima catalasa-peroxidasa

que activa a la isoniacida. Esta mutación es la responsable de cerca del 60% de los casos de resistencia a isoniacida; sin embargo, se han identificado otras mutaciones en otros genes que están igualmente relacionadas con resistencia a este fármaco, como por ejemplo mutaciones en el gen *inhA* que codifica una enoil reductasa y mutaciones en el gen *kasA* que codifica una cetoacil sintasa, ambas implicadas en la síntesis de los ácidos micólicos [136, 175, 176]. Otros ejemplos incluyen mutaciones en el promotor del gen *ahpC* que codifica una alquil hidroxperoxidasa, así como las mutaciones en el gen *ndh* que codifica una NADH deshidrogenasa que produce un incremento en el ratio NADH/NAD inhibiendo competitivamente la unión isoniacida-InhA y las mutaciones en los genes *ceoA* (UDP galactopiranosina reductasa), *mabA* (3-cetoacil reductasa), *oxyR*, *acpM* y en el gen *furA*. Por otro lado, las mutaciones en el gen *rpoB* están relacionadas con resistencia a rifampicina. Este gen codifica la subunidad β de la RNA polimerasa que es la diana de este antibiótico. El 90-98% de las cepas resistentes a rifampicina presentan mutaciones en este gen [136, 175, 176] (Tabla 1.6).

La resistencia a pirazinamida se ha atribuido a mutaciones en el gen *pncA* que codifica la enzima pirazinaminidasa, que se encarga de activar el antibiótico convirtiéndolo en ácido pirazinoico. Cerca del 70% de los aislados clínicos resistentes a este antibiótico presentan mutaciones en este gen. Además este gen puede inactivarse por la inserción de la secuencia IS6110, que es específica y repetida de forma variable entre las cepas del bacilo. Las mutaciones relacionadas con resistencia a fluoroquinolonas se dan principalmente en los genes *gyrA* y *gyrB* que codifican la DNA girasa y la DNA topoisomerasa II respectivamente, siendo estas las dianas de este grupo de antibióticos. En cuanto a los aminoglucósidos, se ha observado que mutaciones en los genes *rrs* y *rpsL* que codifican la subunidad 16s del rRNA y la proteína S12 respectivamente, confieren resistencia a la estreptomina en aproximadamente el 65 al 67% de aislados clínicos resistentes. Adicionalmente, se ha encontrado que mutaciones en el gen *gidB* (que codifica una rRNA metiltransferasa) también contribuyen a la resistencia a la estreptomina pero a un nivel más bajo, representando cerca del 33% de los casos [139, 177]. Al igual que en el caso de la estreptomina, las mutaciones en el gen *rrs* están implicadas en la resistencia a kanamicina, amikacina, viomicina y capreomicina. La resistencia a capreomicina también puede ser debida a mutaciones en el gen *tlyA*, una metiltransferasa que también está relacionada con la resistencia al ácido *p*-aminosalicílico [178-181] (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Genes asociados con resistencia adquirida por mutación en *M. tuberculosis*. Modificado de [139].

Fármaco	Gen	Producto génico	Frecuencia de mutación (%) asociada con resistencia
Isoniacida	<i>katG</i>	Catalasa- peroxidasa	30-60
	<i>inhA</i>	Enoil reductasa A	70-80
	<i>ahpC</i>	Alquil hidroperoxidasa reductasa	Desconocida
	<i>kasA</i>	β -cetoacil ACP sintasa	Desconocida
	<i>ndh</i>	NADH deshidrogenasa	9.5
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Subunidad β de la RNA polimerasa	95
Estreptomycinina	<i>rpsL</i>	Proteína ribosomal S12	65-67
	<i>rrs</i>	rRNA 16S	
	<i>gidB</i>	7- metilguanosina metiltransferasa	33
Etambutol	<i>embCAB</i>	Arabinosil transferasa	70-90
Pirazinamida	<i>pncA</i>	Pirazinamidasa	>70
Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>	DNA girasa	42-85
	<i>gyrB</i>		
Kanamicina y Amikacina	<i>rrs</i>	rRNA 16S	>60
Capreomicina y Viomicina	<i>rrs</i>	rRNA 16S	40-100
	<i>tlyA</i>	rRNA metil transferasa	80%
Etionamida	<i>inhA</i>	Enoil reductasa A	>60%
	<i>ethA</i>	Flavin mono oxigenasa	>60%
	<i>ethR</i>	Represor transcripcional	Desconocida
Ácido <i>p</i> -amino salicílico	<i>tlyA</i>	rRNA metil transferasa	Desconocida

Las mutaciones en el operón *embCAB* están relacionadas con la resistencia al etambutol. Estos genes codifican arabinosiltransferasas implicadas en la biosíntesis del arabinogalactano de la pared celular. Aproximadamente el 65% de los aislados clínicos resistentes a etambutol presentan mutaciones en estos genes [182]. Al igual que la isoniacida, la etionamida es un pro-fármaco, que en este caso es activado por la monooxigenasa EthA cuya mutación está relacionada con la resistencia a este fármaco. Adicionalmente, esta resistencia también se ha asociado con mutaciones en el gen *inhA* [183] (Tabla 1.6).

También se han descrito resistencias por mutaciones a los fármacos de nueva generación como PA-824 y OPC-67683, unos pro-fármacos cuya resistencia está relacionada con mutaciones en el gen *Rv3547* implicado en el proceso de activación

de estos compuestos. También se han aislado cepas resistentes al fármaco TMC207, que presentaban mutaciones en su gen diana *atpE*, que codifica para una ATP sintasa [184] (Tabla 1.6).

1.8.3.3. Inducción de sistemas de detoxificación en *M. tuberculosis*

Los microorganismos pueden alterar su transcriptoma y su proteoma rápidamente en respuesta a cambios del ambiente con el fin de adaptarse. Algunas de estas alteraciones afectan a sistemas de detoxificación lo que les permite resistir condiciones adversas. En *M. tuberculosis* muchos sistemas de detoxificación se inducen en presencia de diferentes compuestos, incluidos fármacos utilizados en el tratamiento. Por ello se han impulsado varios estudios a nivel transcriptómico y proteómico que pretenden definir el mecanismo de acción y de resistencia a fármacos conocidos así como identificar nuevas dianas terapéuticas con el fin de validar y optimizar nuevos compuestos más eficaces.

Uno de los primeros estudios a nivel transcriptómico fue realizado por Wilson y colaboradores, quienes mostraron con microarreglos de DNA que la isoniacida y la etionamida inducen la expresión de *efpA*, una bomba putativa de la familia MSF [185]. Igualmente en otro estudio con microarreglos se mostró la inducción de 10 bombas de eflujo (Mmr, DrrC, Rv1819c, Rv2209, Rv2459, Rv2477c, Rv2688, Rv2846, Rv2994 y Rv3728) tras la exposición a rifampicina, isoniacida, etambutol, estreptomina y ofloxacina [186] dos de ellas (Mmr, DrrC) ya caracterizadas experimentalmente como bombas de eflujo; además el gen *iniA* es fuertemente inducido por el tratamiento con isoniacida y etambutol [160]. La expresión del gen *pstB* también es inducida en presencia de isoniacida [187], por su parte el gen *Rv1258c (tap)* es inducido tras el tratamiento con rifampicina e isoniacida [154] y se obtuvieron resultados similares en un aislado clínico MDR en el que la expresión de *Rv1258c* y *Rv1410c* estaba incrementada en presencia de los mismos antibióticos [188].

1.8.3.3.1. Posibles sistemas de detoxificación de *M. tuberculosis* Rv1685c-Rv1686c-Rv1687c y Rv3160c-Rv3161c

En un estudio realizado por Betts y colaboradores se evaluó la respuesta a nivel transcripcional de *M. tuberculosis* a tres compuestos que inhiben la síntesis de los ácidos micólicos: la isoniacida, la tiolactomicina y el TRC [189]. Se identificaron alrededor de 100 genes cuya expresión variaba en respuesta a cada uno de los tratamientos ensayados y un número mucho mayor cuando se usó el TRC a una concentración más alta (5 veces la CMI). Entre los genes inducidos por el TRC el

Introducción

operón *Rv1685c-Rv1686c-Rv1687c* y el operón *Rv3160c-Rv3161c* mostraron una fuerte inducción [189]. Los genes *Rv1686c-Rv1687c* codifican un posible transportador ABC que podría estar implicado en la translocación de fármacos mientras que el gen *Rv1685c* codifica una proteína hipotética conservada que contiene un dominio TetR, por lo que podría intervenir en la regulación del transportador en respuesta a antibióticos. Por su parte el gen *Rv3161c* codifica una posible dioxigenasa, una enzima capaz de hidrolizar compuestos aromáticos por hidroxilación, mientras que el gen *Rv3160c* codifica un posible regulador transcripcional de la familia TetR por lo que igualmente podría intervenir en la regulación de la dioxigenasa. Por lo tanto, los autores sugirieron que la baja eficacia del TRC frente a *M. tuberculosis* podría estar relacionada con el transportador ABC *Rv1686c-Rv1687c* y la dioxigenasa *Rv3161c* que actuarían como mecanismos de detoxificación limitando el efecto del TRC.

Posteriormente, otro estudio evaluó la respuesta transcripcional de *M. tuberculosis* frente a 6 fármacos incluyendo tres de desarrollo reciente: isoniacida, isoxil (anteriormente usada en el tratamiento, inhibe la síntesis de los ácidos micólicos), tetrahidrolipstatina (inhibidor de lipasa también usado en el tratamiento de la obesidad), SRI#221, SRI#967 y SRI#9190 [190]. Este estudio mostró que todos los fármacos inducían una respuesta común de genes relacionados con el estrés también como una respuesta específica para cada fármaco ensayado. Los genes *Rv3160c-Rv3161c* se indujeron fuertemente en respuesta a dos de los nuevos compuestos, SRI#967 y SRI#9190. Puesto que tanto estos compuestos como el TRC son bencenos halogenados, los autores sugirieron que la dioxigenasa *Rv3161c* se induciría en respuesta a este tipo de compuestos contribuyendo a la resistencia natural de *M. tuberculosis* a este tipo de agentes antimicrobianos [190].

Boshoff y colaboradores analizaron la respuesta de *M. tuberculosis* frente a 75 fármacos y condiciones inhibitoras del crecimiento, con el fin de establecer los mecanismos de adaptación del bacilo a la interrupción de diferentes funciones metabólicas identificando grupos de genes co-rregulados. Los resultados obtenidos mostraron la inducción de los operones *Rv1685c-Rv1686c-Rv1687c* y *Rv3160c-Rv3161c* en respuesta a los protonóforos carbonilcianuro-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) y 2,4 Dinitrofenol (DNP) también como un compuesto antituberculoso llamado ARP4. Así mismo, la dioxigenasa fue clasificada dentro de un grupo que incluye posibles mecanismos de detoxificación inducidos en respuesta a diferentes compuestos aromáticos incluyendo el TRC y la clofazimina [191]. La inducción de estos sistemas por parte del TRC fue obtenida en otro trabajo realizado por Sullivan y colaboradores en donde también evaluaron el efecto de nuevos fármacos derivados

del TRC, de los cuales dos de ellos (6PP y 8PP) mostraron una alta inhibición de InhA pero no indujeron la expresión ni del transportador y ni de la dioxigenasa validándolos como dos nuevos compuestos líderes en el desarrollo de nuevos fármacos [129]. Otro compuesto aromático que induce también la expresión del operón *Rv3160c- Rv3161c* es la tioridazina, una fenotiazina que está siendo evaluada en el tratamiento de la tuberculosis MDR y XDR [192].

En conjunto, estas observaciones apuntan a que los genes *Rv1686c-Rv1687c* y *Rv3161c* podrían ser sistemas de detoxificación de *M. tuberculosis* que contribuirían a la resistencia al TRC y otros fármacos. Así mismo, la localización de estos genes junto a reguladores transcripcionales y el hecho de que en todos los trabajos anteriormente citados se induzcan conjuntamente, apoya también la hipótesis de que estos reguladores responden a la presencia de ciertos compuestos tóxicos regulando la expresión del operón.

También, otros estudios han mostrado que el transportador ABC se induce en respuesta al H₂O₂ y a la privación de nutrientes, condiciones que simulan la situación que encuentra la bacteria en el fagosoma. Así mismo, este transportador se induce cuando *M. tuberculosis* infecta macrófagos activados con IFN- γ pero no en macrófagos no activados o provenientes de ratones deficientes de la óxido nítrico sintetasa, sugiriendo que el transportador ABC podría tener un papel en la virulencia de la bacteria [193, 194].

El transportador ABC codificado por los genes *Rv1686c-Rv1687c*, está incluido en los posibles transportadores de fármacos identificados por Braibant y colaboradores de acuerdo con la filogenia de sus NBD y el análisis de homología con transportadores de sustrato conocido [93]. Como se mencionó anteriormente, el gen *Rv1685c* codifica una proteína que podría intervenir en la regulación del posible transportador ABC. Además, este gen es similar a otros reguladores hipotéticos de *M. tuberculosis* (*Rv1556*, *Rv0258c*) y a un regulador transcripcional putativo de *Streptomyces coelicolor*. Por su parte el gen *Rv1686c* codifica una probable proteína integral de membrana tipo ABC que sería la responsable de la translocación del sustrato a través de la membrana y que contiene 6 hélices transmembranales y el bucle EAA conservado. *Rv1686c* es similar a una posible proteína integral de membrana de *Streptomyces coelicolor* y una proteína de membrana implicada en la resistencia a mitramicina en *Streptomyces argillaceus*. Finalmente, el gen *Rv1687c* codificaría el NBD del transportador y contiene todos los patrones conservados de estos dominios. Además es similar a la proteína NodI de *Rhizobium* sp que está implicada en el

Introducción

exporte de oligosacáridos, esenciales en la nodulación y a otros transportadores de tipo ABC de *M. tuberculosis* como DrrA (Rv2936) [15].

Por su parte el gen *Rv3161c* codifica una posible dioxigenasa que sería capaz de hidrolizar compuestos aromáticos por hidroxilación y es similar a subunidades de varias dioxigenasas y proteínas relacionadas de *Rhizobium loti*, *Caulobacter crescentus*, *P. aeruginosa*, *Arthrobacter keyseri* y *E.coli* [15]. Esta proteína ha sido detectada en la fracción de membrana de H37Rv por espectrometría de masas a partir de geles monodimensionales [195] también como en los extractos obtenidos con tritón X-114 en H37Rv [196]. En cuanto a *Rv3160c*, como se mencionó anteriormente codifica un posible regulador de la familia TetR que podría co-transcribirse con *Rv3161c* ya que la distancia intergénica es de tan sólo 11 pb. Adicionalmente, muestra similitud con otros reguladores de *S. coelicolor* y *R. loti* [15] y ha sido detectada entre las proteínas secretadas de *M. tuberculosis* K pero no en H37Rv ni CDC1551 [197].

Objetivos

2. Objetivos

El marco conceptual y experimental de este trabajo se basa en el estudio de los mecanismos de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a antibióticos y otros compuestos; en concreto el objetivo planteado fue evaluar el papel en la resistencia de dos posibles sistemas de detoxificación: el transportador ABC *Rv1686c- Rv1687c* y la dioxigenasa *Rv3161c*, los cuales se inducen en presencia del triclosán y otros compuestos.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Obtención de mutantes de *M. tuberculosis* deficientes en los genes *Rv1686c-Rv1687c* y *Rv3161c*.
- Sobreproducción de las proteínas codificadas por *Rv1686c-Rv1687c* y *Rv3161c* en *M. tuberculosis*.
- Caracterización fenotípica de las cepas que sobreproducen las proteínas y las cepas mutantes.
- Análisis de la virulencia en macrófagos de las cepas de *M. tuberculosis* mutantes y que sobreproducen las proteínas codificadas por *Rv1686c-Rv1687c* y *Rv3161c*.
- Evaluación del efecto del triclosán en el proteoma de *M. tuberculosis*.

Materiales y Métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas y plásmidos utilizados se muestran en las tablas 3.1 y 3.2 respectivamente. Los oligonucleótidos se listan en la tabla 3.3.

Tabla 3.1. Principales cepas utilizadas en este trabajo.

Nombre	Genotipo/Característica	Fuente/Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>recA1 endA1 hsdR17 gyrA96 supE44 thi-1 relA1</i> $\Delta(lacZYA-argF)U169 deoR \Phi 80lacZ\Delta M15$	Clontech
HB101	<i>F-supE44</i> $\Delta(mcrC-mrr)$ <i>recA13 ara-14 proA2</i> <i>leuB6 lacY1 galk2 rps120(Str^R) xyl-5 mtl-1 thi-1</i>	Stock laboratorio
<i>M. smegmatis</i>		
mc ² 155		[198]
<i>M. tuberculosis</i>		
H37Rv	$\Delta pks15/1$	ATCC 27294
(pMV261)	H37Rv (pMV261)	Este trabajo
(8687)	H37Rv (pMV261+8687)	Este trabajo
(3161)	H37Rv (pMV261+3161)	Este trabajo
$\Delta 8687$	H37Rv $\Delta Rv1686c-Rv1687c::HygR$	Este trabajo
$\Delta 3161$	H37Rv $\Delta Rv3161c::HygR$	Este trabajo

Tabla 3.2. Principales plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Característica	Fuente/Referencia
pGEM®-T easy	Vector de clonación A/T	Promega
pMV261	Vector de expresión replicativo para <i>Mycobacterium</i> Km ^R , OriE, OriM, P _{hsp60}	[199]
pYUB854	Vector de clonación para la obtención de mutantes en <i>Mycobacterium</i> Hyg ^R , OriE, λ -cos, MCS:: $\gamma\delta$ res- <i>hyg</i> - $\gamma\delta$ res::MCS	[200]
pYUB870	Vector con resolvasa para eliminar <i>cassette</i> de higromicina de mutantes construidos con pYUB854 Km ^R , Ori-E, OriM, $\gamma\delta$ - <i>tnpR</i> , <i>sacB</i> , P _{hsp60}	[200]
phAE159	Fásmido para <i>Mycobacterium</i> sensible a temperatura, derivado de TM4, Km ^R , Pacl	[201]
pMV261+8687	pMV261 que contiene los ORF <i>Rv1686c-Rv1687c</i>	Este trabajo
pMV261+3161	pMV261 que contiene el ORF <i>Rv3161c</i>	Este trabajo

Nombre	Característica	Fuente/Referencia
pYUB854Mut1	pYUB854 con un fragmento de 815 pb que incluyen el ORF de <i>Rv1685c</i> y las últimas 73 pb del gen <i>Rv1686c</i>	Este trabajo
pYUB854Δ8687	pYUB854Mut1 con un fragmento de 746 pb que incluye el ORF de <i>mpg</i> y las primeras 38 pb del gen <i>Rv1687c</i>	Este trabajo
pYUB854Mut61-2	pYUB854 con un fragmento de 767 pb que incluye el ORF de <i>Rv3162c</i> y las primeras 59 pb del gen <i>Rv3161c</i>	Este trabajo
pYUB854Δ3161	pYUB854Mut61-2 con un fragmento de 788 pb que incluye el ORF <i>Rv3160c</i> y las últimas 99 pb del gen <i>Rv3161c</i>	Este trabajo
phAE159Δ8687	phAE159 con pYUB854Δ8687	Este trabajo
phAE159Δ3161	phAE159 con pYUB854Δ3161	Este trabajo

OriE: replicón de *E. coli*. OriM: replicón de *Mycobacterium*.

Tabla 3.3. Principales oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia* 5'-3'	Aplicación
86Up	<u>TGCCCATGATCTTGCTGGTACCC</u>	Oligo. directo utilizado en la amplificación de <i>Rv1686c</i>
86Lw	CAAAGCCAAGGAACCAGAAC	Oligo. reverso utilizado en la amplificación de <i>Rv1686c</i>
86MidUp	TCTGGTTCCTTGGCTTTGAC	Oligo. directo utilizado en la comprobación de clonaciones de <i>Rv1686c</i>
87Lw	<u>GAATTCTGCAGCGTTAGCC</u>	Oligo. directo utilizado en la clonación de <i>Rv1687c</i>
8687Up	<u>TGCCCATGATGATTTTCATCAAGTG</u>	Oligo. directo utilizado en la clonación de <i>Rv1686c -Rv1687c</i>
8687Lw	<u>GAATTCTATGACGTCCGTCGCCG</u>	Oligo. reverso utilizado en la clonación de <i>Rv1686c -Rv1687c</i>
MutUp1Bgl	<u>AGATCTGCGACATCCAGGTGCTCTAT</u>	Oligo. directo utilizado en la construcción del Δ8687 (extremo 5')
MutLw1Hin	<u>AAGCTTCGTCGTCGTGCTGAGTTTC</u>	Oligo. reverso utilizado en la construcción del mutante 8687 (extremo 5')
MutUp2Xba	<u>TCTAGACCGTCGCGAAGTAATTCAT</u>	Oligo. directo utilizado en la construcción del Δ8687 (extremo 3')
MutLw2Stu	<u>AGGCCTGGAGCTCATCGAGGATCATGC</u>	Oligo. reverso utilizado en la construcción del Δ8687 (extremo 3')
3160Up	GAACGGGGTCACCTTAGCTC	Oligo. directo utilizado en la amplificación de <i>Rv3160c</i>
3160Lw	GAAAATTCTGGTTCCCGTCA	Oligo. reverso utilizado en la amplificación de <i>Rv3160c</i>

Nombre	Secuencia* 5'-3'	Aplicación
3161UpBam	<u>GGATCC</u> GATGTTATCAACTGATAAC	Oligo directo utilizado en la clonación de <i>Rv3161c</i>
3161LwHin	AAGCTTCTAGCTGGCACCTGGGTG	Oligo. reverso utilizado en la clonación de <i>Rv3161c</i>
Mut61Up1Bgl	AGATCTGAACGGGGTCACCTTAGCTC	Oligo. directo utilizado en la construcción del $\Delta 3161$ (extremo 5')
Mut61Lw1Hin	AAGCTTGAAAATTCTGGTTCCCGTCA	Oligo. reverso utilizado en la construcción del $\Delta 3161$ (extremo 5')
Mut61Up2Stu	<u>AGGCCTG</u> TTGCTGTCGACGTTCTTGA	Oligo. directo utilizado en la construcción del $\Delta 3161$ (extremo 3')
Mut61Lw2Xba	<u>TCTAGATAAT</u> CCCCGATGTCGGTAAG	Oligo. reverso utilizado en la construcción del $\Delta 3161$ (extremo 3')
pMV261Rev	AAAGGCCAGTCTTTTCG	Oligo. directo utilizado en la comprobación de las clonaciones en pMV261
Phsp60	GGCATAGGCGAGTGCTAAGA	Oligo. directo utilizado en la comprobación de las clonaciones en pMV261
HygOut1	GCATGCAAGCTCAGGATGTC	Oligo. utilizado en la comprobación de las clonaciones pYUB854 y pYUB870
HygOut2	TTCGAGGTGTTTCGAGGAGAC	Oligo. utilizado en la comprobación de las clonaciones pYUB854 y pYUB870
SigADir	TTCGCGCCTACCTCAAACAG	Oligo. directo utilizado en la comprobación de las extracciones RNA
SigARev	GCTAGCTCGACCTCTTCCTCG	Oligo. directo utilizado en la comprobación de las extracciones RNA

*Las dianas de restricción se muestran subrayadas.

3.2. Métodos microbiológicos

3.2.1. Medios de cultivo, antibióticos y otras soluciones

3.2.1.1. Medios de Cultivo

Medio LB (Luria Bertani) [202]

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar (Sólo medios sólidos)	17 g

Añadir 1 L de agua destilada y esterilizar en el autoclave durante 15 min a 121°C. Dispensar en placas de petri, esperar a que se solidifique y guardar a 4°C. En el caso

Materiales y Métodos

de medio LB líquido (sin agar), disolver completamente el medio y dispensarlo antes de esterilizarlo; guardar a temperatura ambiente.

Medio TB (Terrific Broth)[203]

Triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 mL

Añadir 900 mL de agua destilada y esterilizar en el autoclave (15 min a 121°C). Dejar enfriar hasta 50°C-60°C y añadir 100 mL de la siguiente solución salina previamente autoclavada:

KH ₂ PO ₄	0.17 M
K ₂ HPO ₄	0.72 M

Dispensar en botellas (de 100 mL) en condiciones de esterilidad. Incubar 24 h a 37°C para comprobar que no se ha contaminado el medio. Desechar aquellas botellas en las que se observe crecimiento y guardar el resto a temperatura ambiente.

Medio Middlebrook 7H9+Tween

Middlebrook 7H9 broth (Difco)	4.7 g
Tween 80	0.5 mL

Medio Middlebrook 7H9+Glicerol

Middlebrook 7H9 broth (Difco)	4.7 g
Glicerol	2 mL

Añadir 900 mL de agua destilada y disolver con agitación y temperatura. Esterilizar en el autoclave a 121°C durante 10 min. Dejar enfriar hasta 50°C-60°C y añadir 100 mL de suplemento ADC estéril. Para cultivos de menor volumen, preparar alícuotas de 90 mL de medio en botellas de 100 mL y autoclavar por separado, para evitar contaminaciones.

Suplemento ADC (Albumina-Dextrosa-Catalasa):

BSA (Albúmina sérica bovina) fracción V	5 g
Glucosa	2 g
Catalasa	3 mg

Disolver completamente en 70 mL de agua destilada. Ajustar el volumen a 100 mL con agua destilada y esterilizar mediante filtración con filtros de 0.22 μm de diámetro de poro. Para cultivos de menor volumen recoger el filtrado en alícuotas de 10 mL. Incubar 24 h a 37°C para descartar contaminaciones. Guardar a 4°C.

Medio Middlebrook 7H10

Middlebrook 7H10 agar (Difco)	19 g
Glicerol	5 mL

Añadir 895 mL de agua destilada y disolver con agitación y temperatura. Esterilizar en el autoclave a 121°C durante 10 min. Dejar enfriar hasta 50°C-60°C y añadir 100 mL del suplemento OADC estéril. Dispensar en placas de Petri y guardar a 4°C.

Suplemento OADC (Oleico-Albumina-Dextrosa-Catalasa):

BSA fracción V	5 g
Glucosa	2 g
Catalasa	4 mg
Ácido oleico	0.056 mL
NaCl	0.85 g

Disolver completamente en 70 mL de agua destilada. Ajustar el volumen a 100 mL con agua destilada y esterilizar mediante filtración con filtros de 0.22 μm de diámetro de poro. Incubar 24 h a 37°C para detectar posibles contaminaciones. Guardar a 4°C.

3.2.1.2. Antibióticos

La tabla 3.4 muestra la concentración de los antibióticos y los disolventes utilizados para los cultivos de *E. coli*, *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*. Se prepararon soluciones stocks 1000 veces concentradas que fueron esterilizadas con filtros de 0.22 μm y almacenadas a -20°C, excepto la higromicina que se compraba en solución estéril (Roche). Los stocks 1000X se utilizaron en la preparación de medios de cultivos sólidos y para preparar las soluciones de trabajo 10 veces diluidas (100X) que se conservaron a 4°C y se utilizaron para los medios líquidos.

Tabla 3.4. Concentraciones de los antibióticos para los cultivos de *E. coli*, *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*.

Antibiótico	Disolvente	Concentración Stock mg/mL	Concentración final (µg/mL)	
			<i>E. coli</i>	<i>Mycobacterium</i>
Ampicilina	Agua	50	50	
Kanamicina	Agua	50	50	25
Higromicina B	PBS 1X	50	100	100

3.2.1.3. Otras soluciones

5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal)

Este producto se utilizó para suplementar placas de LB a partir de una solución de trabajo de 40 µg/mL preparada de un stock a 40 mg/mL en *N,N* dimetil formamida.

3.2.2. Condiciones de crecimiento y conservación de cepas

***E. coli*:** Los cultivos de las diferentes cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se hicieron en medio LB suplementados con antibióticos listados en la tabla 3.4, si era requerido e incubados a 37°C con agitación en el caso de los medios líquidos. Así mismo, se utilizó medio TB para extracciones de plasmídico.

Las cepas de *E. coli* se conservaban en placas de LB suplementadas según se requirió y almacenadas a 4°C, resembradas mensualmente. También se congelaron a -20°C con glicerol al 50% (glicerol a una concentración final de 20% v/v).

***Mycobacterium*:** Los cultivos líquidos de las cepas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* se hicieron en Middlebrook 7H9+Tween suplementados según se requirió e incubados 37°C. Los cultivos de *M. smegmatis* se incubaron durante tres días con agitación; en el caso de *M. tuberculosis*, los cultivos se hicieron en frascos de 25 cm² (TPP) que se incubaron durante 1-2 semanas y que se usaron como inóculo para otros cultivos haciendo una dilución 1/100 e incubándolos durante 1 semana y 24-48h en el caso de *M. smegmatis*.

Los cultivos en placa se hicieron con Middlebrook 7H10 suplementado según el caso. Las placas de *M. smegmatis* se incubaron a 37°C durante 3 días y las de *M. tuberculosis* durante 3-4 semanas, selladas con Parafilm® y en bolsas para evitar desecación.

Las cepas de *M. smegmatis* se conservaron en placas de 7H10 suplementadas según se requirió y almacenadas a 4°C, haciendo pases mensuales. También se

congelaron a -20°C con glicerol al 50% (glicerol a una concentración final de 20% v/v). En cuanto a *M. tuberculosis*, las placas se conservaron a 37°C y se hicieron pases cada 4-6 semanas. Igualmente, se congelaron a -20°C con leche descremada al 20% (p/v).

Todos los procedimientos realizados con *M. tuberculosis*, se hicieron en el laboratorio de Nivel de Seguridad Biológica 3 (NSB-3) ubicado en el Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB) de la UAB (IBF/014.2), el cual dispone de las todas las condiciones requeridas para garantizar la seguridad al trabajar con microorganismos de nivel 3 como lo es *M. tuberculosis*, siguiendo las especificaciones del “Manual de seguridad y procedimientos normalizados de trabajo” del laboratorio, con el fin de garantizar seguridad del personal investigador, de la comunidad y del ambiente. El manual del laboratorio contempla la legislación vigente en España y Europa, así como la normativa de la OMS, el CDC y el “*National Institutes of Health*” (NIH) de los EEUU.

3.3. Métodos genéticos

3.3.1. Transformación

La transformación es un procedimiento por el cual se introduce material genético exógeno a una bacteria. Este proceso depende del estado de competencia bacteriano, el cual se refiere a su capacidad de incorporar material genético. La transformación se puede llevar a cabo de dos formas: química y física.

La transformación química implica la exposición del cultivo bacteriano en fase exponencial a una solución de CaCl_2 100 mM a 0°C el cual le proporciona a la bacteria cationes divalentes que forman un complejo DNA-calcio que se adhiere a la pared celular y que es DNasa resistente. Este complejo puede deshacerse poniendo las células a 42°C en un baño durante 90 segundos (choque térmico) en donde se formarán poros en la membrana por donde se introducirá el DNA. Después de poco tiempo de crecimiento en medio rico, las células se recuperan y los genes transformantes se expresan, de manera que se pueden aislar las colonias transformantes en medio selectivo.

La transformación física también conocida como electroporación implica el uso de cargas eléctricas que desestabilizan la membrana bacteriana e inducen la formación de poros a través de los cuales las moléculas de DNA pueden pasar. El cierre de los poros formados parece ser un proceso estocástico que puede ser

retardado manteniendo las células a baja temperatura. Este método es más fácil, eficiente y reproducible. Para la electroporación se utilizó un electroporador GenePulser XCell de BioRad y cubetas 0.2 cm.

3.3.1.1. Transformación de *E. coli*

Preparación de células competentes

Procedimiento:

Día 1

- Preparar un cultivo de la cepa de *E. coli* DH5 α en medio LB e incubar 16 horas a 37°C con agitación.

Día 2

- A partir del cultivo de noche hacer una resiembra 1/100 en 100 mL de medio LB e incubar a 37°C hasta alcanzar una OD₅₅₀ de 0.5-0.6.
- Poner el cultivo 10 min en hielo.
- Centrifugar el cultivo 10 min a 3000 g a 4°C en tubos estériles.
- Eliminar el sobrenadante y resuspenderlo en CaCl₂ 0.1 M frío (20 mL por cada 100 mL de cultivo) en condiciones de esterilidad.
- Poner el cultivo en hielo durante 30 min.
- Centrifugar durante 10 min a 3000 g a 4°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender en CaCl₂ (4 mL por cada 100 mL de cultivo) con mucho cuidado, ya que en este punto las células son extremadamente frágiles.
- Mezclar con glicerol a una concentración final de 15% (1.5 mL de glicerol 50% por cada 100 mL de cultivo).
- Alicuotar en tubos eppendorf (100, 200 y 500 μ L por tubo) y congelar con hielo seco, guardar a -80C.

Transformación

Procedimiento:

- Mezclar 100 μ L de células competentes y 10-100 ng de DNA plasmídico e incubar durante 30 min en hielo.
- Poner la mezcla a 42°C durante un minuto y medio.
- Añadir 800 μ L de medio LB.

- Incubar la mezcla a 37°C durante una hora.
- Sembrar en placas y suplementos requeridos durante 12-18 h a 37°C.

Soluciones

CaCl₂ 100 mM

CaCl₂ 1.47 g

Disolver en 80 mL de agua destilada y ajustar el volumen a 100 mL; esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Almacenar a temperatura ambiente.

3.3.1.2. Electroporación de *Mycobacterium*

Preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis*

La preparación de células electrocompetentes se realizó en condiciones de esterilidad y en hielo.

Procedimiento:

- Inocular una colonia de *M. smegmatis* en 10 mL de medio Middlebrook 7H9+Tween e incubar durante 2 o 3 días a 37°C en agitación.
- Hacer una resiembra 1/100 en 100 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar a 37°C en agitación hasta una OD₆₀₀ de 0.8-1.0 (16-20h aprox).
- Poner en hielo durante 1 hora y media.
- Centrifugar en tubos estériles durante 10 min a 3000g a 4°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 50 mL de glicerol al 10% (v/v) frío.
- Centrifugar durante 10 min a 3000 g a 4°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de glicerol al 10% (v/v) frío.
- Alicuotar en tubos *ependorf* (80 µL por tubo) y congelar con hielo seco, guardar a -80C.

Electroporación de *M. smegmatis*

Procedimiento:

- Descongelar las células electrocompetentes en hielo.

Materiales y Métodos

- Añadir 80µL de glicerol al 10% (v/v) y el DNA (<5 µL, no añadir cantidades superiores por que puede afectar la conductividad de la muestra).
- Poner la mezcla en hielo durante 10 min con el fin de que el DNA sea pre absorbido.
- Mantener las cubetas de electroporación en hielo durante 15 min y posteriormente secarlas muy bien.
- Homogenizar las células y transferirlas a la cubeta de electroporación.
- Someterlas a un pulso de 2.5 kV, 1000 Ω, 25 µF y constantes de tiempo de 15 ms a 25 ms.
- Añadir inmediatamente 1 mL de medio Middlebrook 7H9, resuspender con mucho cuidado y transferirlas a un tubo estéril.
- Incubar a 37°C en agitación a 200 rpm durante 3-4 horas.
- Resuspender y sembrar en placas de medio Middlebrook 7H10 suplementados con los antibióticos adecuados si se requiere.
- Incubar durante 3-4 días a 37°C.

Preparación de células electrocompetentes de *M. tuberculosis*

El procedimiento es similar al usado para *M. smegmatis* con la diferencia de que toda la preparación se hace a temperatura ambiente:

- Inocular una colonia de *M. tuberculosis* o 100 µL de un cultivo crecido en 10 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar durante 2 o 3 semanas a 37°C.
- Hacer una resiembra 1/100 en 100 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar a 37°C durante una semana. Asegurarse que se encuentra en fase exponencial midiendo la OD₆₀₀.
- Centrifugar en tubos estériles durante 10 min a 3000 g a 15°C-20°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 50 mL de glicerol al 10% (v/v).
- Centrifugar durante 10 min a 3000 g a 15°C-20°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 25 mL de glicerol al 10% (v/v).
- Centrifugar durante 10 min a 3000 g a 15°C-20°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 12 mL de glicerol al 10% (v/v).
- Centrifugar durante 10 min a 3000 g a 15°C-20°C.

- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de glicerol al 10% (v/v).
- Alicuotar en tubos *ependorf* (400 μ L por tubo) y electroporar inmediatamente.

Electroporación de *M. tuberculosis*

- Mezclar las células electrocompetentes con el DNA (<5 μ L) y mezclar.
- Incubar la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente.
- Homogenizar las células y transferirlas a la cubeta de electroporación.
- Someterlas a un pulso de 2.5 kV, 1000 Ω , 25 μ F y constantes de tiempo de 15 ms a 25 ms (electroporador GenePulser XCell™, BioRad).
- Resuspender las células en 1 mL de medio Middlebrook 7H9 y transferirlas a un tubo estéril que contenga 2 mL de medio Middlebrook 7H9.
- Incubar durante 12h-24 horas a 37°C.
- Resuspender y sembrar en placas de medio Middlebrook 7H10 suplementados con el antibiótico adecuado si se requiere. La siembra se puede hacer con asas de Digrafsky desechables estériles o con bolas de vidrio de 0.5 cm de diámetro (Sigma) estériles extendiendo el líquido por rotación de la placa. Las bolas se desinfectan con lejía y autoclave y posteriormente se lavan de nuevo y se esterilizan para su reutilización.
- Incubar durante 3-4 semanas a 37°C.

3.4. Métodos de manipulación de DNA

Gran parte de la metodología utilizada en este apartado se basa en *Molecular Cloning: a laboratory manual* [204] con algunas modificaciones.

3.4.1. Miniextracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Esta técnica está basada en el protocolo de lisis alcalina descrito por Birnboim [205].

Procedimiento:

- Preparar un cultivo de noche en 10 mL de medio TB suplementado con el antibiótico requerido e incubar a 37°C en agitación.
- Centrifugar 1.5 mL de cultivo a 13000 rpm durante cinco min.
- Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 100 μ L de solución I fría (Tampón de lisis), añadir 1 μ L de RNasa e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.

Materiales y Métodos

- Añadir 200 μL de solución II (solución desnaturalizante), mezclar por inversión y mantener durante 5 min en hielo o hasta que se obtenga una solución viscosa.
- Añadir 150 μL de solución III (Tampón neutralizante), mezclar por inversión e incubar durante 5 min en hielo o hasta que se observe un precipitado blanco.
- Centrifugar durante 5 min a 13000 rpm.
- Transferir la fase acuosa a un tubo *ependorf* y añadir 1 mL de tierra de diatomeas (resina que secuestra el DNA).
- Incubar durante 10 min a temperatura ambiente, mezclando por inversión regularmente para evitar que la tierra se precipite.
- Transferir la muestra a una jeringa colocada sobre una columna *Wizard® Minicolumn* (Promega) y pasar la muestra a través del filtro con ayuda del émbolo.
- Quitar la jeringa de la columna, sacar el émbolo y colocar la jeringa en la columna nuevamente. Añadir 2 mL de etanol al 70% y filtrar.
- Quitar la jeringa de la columna y colocar la columna en un tubo *ependorf*. Centrifugar durante 20 s a 13000 rpm para eliminar los restos de etanol. Transferir la columna a un tubo *ependorf* nuevo y dejar secar la columna durante 10 min a temperatura ambiente.
- Añadir al filtro de la columna, 20 μL -50 μL de agua desionizada estéril precalentada a 42°C e incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm.

Soluciones

- TrisHCl 1M pH 7.5: disolver 60.55 g de Tris Base en 300 mL de agua destilada. Ajustar el pH con ácido clorhídrico a 7.5. Llevar a volumen de 500 mL con agua destilada.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M pH 8: añadir 46.35 g de EDTA y 5 g de NaOH a 200 mL de agua destilada. Ajustar el pH con NaOH a 8 y llevar a volumen con agua destilada a 250 mL. Agitar hasta alcanzar una disolución completa. Esterilizar con autoclave por 15 min a 121°C.

Solución I

Tris HCL 1 M pH 7.5	0.625 mL
EDTA 0.5 M pH 8	0.5 mL

Glucosa 20% (p/v) estéril	1.135 mL
Agua desionizada	22.74 mL

Mezclar y almacenar a 4°C.

RNasa A

Concentraciones finales:

RNasa A (Roche)	10 mg/mL
Tris HCl	10 mM
NaCl	15 mM

Mezclar 10 µL de Tris HCl 1 M pH 7.5 con 3 µL de NaCl 5 M y 987 µL de agua desionizada estéril. Añadir 10 mg de RNasa A y homogenizar. Incubar durante 15 min a 100°C. Dejar enfriar a temperatura ambiente, hacer alícuotas de 50 µL y congelarlas a -20°C.

Solución II

SDS 10% (p/v)	2.5 mL
NaOH 10 N (40 g/100 mL)	0.5 mL
Agua desionizada	22 mL

Mezclar y guardar a temperatura ambiente, utilizar la solución recién preparada.

Solución III

Acetato potásico 5 M (49.075 g/100 mL)	15 mL
Ácido acético glacial	2.875 mL
Agua desionizada	7.125 mL

Mezclar y guardar a temperatura ambiente.

Tierra de Diatomeas

Tierra de diatomeas (Sigma)	3.5 g
Hidrocloruro de guanidina	100 g
Tris HCl 1 M pH 7.5	8.75 mL
EDTA 0.5 M pH 8	14 mL

Materiales y Métodos

- Disolver la tierra de diatomeas en 50 mL de agua desionizada estéril en un vaso de precipitados igualmente estéril, dejar precipitar un mínimo de 3h. Proteger de la luz.
- Disolver el hidrocloreuro de guanidina (tóxico) en 50 mL de agua desionizada estéril y añadir el TrisHCl y el EDTA; llevar a volumen (175 mL) con agua desionizada.
- Eliminar la fase acuosa de la tierra de diatomeas con la bomba de vacío y añadir la solución de guanidina.
- Homogenizar la solución y dispensarla en botellas de 100 mL estériles protegidas de la luz.
- Almacenar a temperatura ambiente y mezclar antes de usar.

3.4.2. Extracción de DNA plasmídico de *Mycobacterium*

La extracción de DNA plasmídico micobacteriano no es tan sencilla como en *E. coli*, ya por lo general los plásmidos se encuentran en bajo número de copias y es difícil aislarlos en cantidades suficientes. Para solventar este problema, se han diseñado estrategias que han permitido manipular el DNA aislado de *Mycobacterium* en *E. coli* que permite la propagación y extracción en altas cantidades [206]. Nuestro laboratorio ha implementado el uso de dos técnicas para el aislamiento de pDNA de *Mycobacterium*: por disrupción mecánica y por calor.

Extracción por disrupción mecánica:

Procedimiento (Modificado de [207]):

- Tomar con el asa de Kille bastante cantidad de colonias a partir de una placa bien crecida y añadirlas a un tubo que contenga 200 μ L de TE y 100 μ L de bolitas de zirconia de 0.1 mm de diámetro (Biospect).
- Lisar con el Mini BeadBeater (Biospect) durante 2 min a máxima velocidad.
- Centrifugar y separar el sobrenadante.
- Tomar 20 μ L de lisado y transformar en 100 μ L de competentes de *E. coli*.

Extracción por calor

Procedimiento:

- Tomar con el asa de Kille bastante cantidad de colonias a partir de una placa bien crecida y resuspender en 200 μ L de TE.

- Incubar a 90°C durante 60 min, en el caso de *M. tuberculosis*, sellar muy bien los tubos *ependorf* con Parafilm®.
- Para *M. tuberculosis*, congelar durante 16 horas y descongelar a temperatura ambiente.
- Tomar 20 µL del sobrenadante de los lisados y transformar en 100 µL de competentes de *E. coli*.

Soluciones

TE

Concentraciones finales:

Tris HCL	10 mM
EDTA	1 mM

3.4.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis es una técnica usada con el fin de separar, identificar y purificar fragmentos de DNA bajo la influencia de un campo eléctrico. Los materiales más comunes para separar DNA son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa, las cuales actúan como un filtro separando las moléculas de acuerdo a su tamaño y carga neta. Estos geles se sumergen en tampones de pH ~8.0 en donde el DNA se desplaza al polo positivo (ánodo) por la carga negativa que le brinda el grupo fosfato en condiciones de pH neutro. La resolución y velocidad de separación está ligada a la concentración de agarosa y el voltaje aplicado, en donde los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente que los de mayor tamaño, por lo que al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el desplazamiento del DNA a lo largo del gel resolviendo mejor los fragmentos de menor tamaño; por lo que la concentración de agarosa a utilizar dependerá del tamaño del fragmento de DNA que se quiera observar y el voltaje aplicado será directamente proporcional. Las moléculas de DNA separadas pueden visualizarse mediante el uso de sustancias como el Bromuro de etidio, el cual se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta [204, 208].

Las concentraciones de agarosa utilizadas en este trabajo fueron: 0.7% para fragmentos entre 3-14 kb y plásmidos, 1% para fragmentos de 1 a 4 kb, 2% para fragmentos de 0.1 a 1.5 kb. Se utilizaron dos tipos de agarosa: (LM-sieve, Pronadisa) para geles al 2% y agarosa para biología molecular (Roche) para otros geles. Los marcadores de peso utilizados fueron: MWM XIV (Roche) con fragmentos entre 0.1 y

Materiales y Métodos

2.6 kb, MWM X (Roche) con fragmentos entre 0.07 y 12.2 kb, λ BstEII con fragmentos entre 0.7 y 14.1 kb, GeneRuler 1 Kb Plus DNA ladder (Fermentas) con fragmentos entre 0.075 y 20 kb. Los geles fueron teñidos con Bromuro de etidio para su visualización.

Procedimiento

- Pesar una cantidad de agarosa de acuerdo a la concentración deseada y mezclar con 50 mL de TAE 1X preparado a partir de uno 10X (Roche).
- Calentar hasta fundir la agarosa completamente.
- Atemperar la solución a unos 50°C y añadir bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 μ g/mL a partir de un stock a 625 μ g/mL (Amresco).
- Poner la mezcla en un soporte con los extremos sellados previamente con cinta adhesiva y colocar los peines correspondientes de acuerdo al número de pocillos que se deseen, dejar solidificar.
- Retirar los peines y la cinta adhesiva y poner el soporte del gel en una cubeta de electroforesis con TAE 1X.
- Cargar las muestras de DNA en los pocillos del gel, previamente preparadas con tampón de carga 1X para muestras de hasta 4 μ L de DNA (5 μ L de tampón por cada μ L de DNA). Para volúmenes mayores, utilizar el tampón de carga 6X en una relación 1:5.
- Correr el gel con un voltaje constante entre 40 y 70 V por un tiempo que dependerá del tamaño y el fragmento de DNA a separar.
- Visualizar el DNA con un trans iluminador UV (302 nm de longitud de onda). Si se desea, hacer foto con el digitalizador de imágenes GelDoc 2000, BIO-RAD).

Soluciones

TAE 1X

Mezclar 250 mL de TAE 10X (Roche) con 1.25 L de agua destilada.

Tampón de carga 6X

Ficoll 400	1.2 g
EDTA 0,5 M pH 8 (46,35 g /250 mL)	1.2 mL
SDS 10% (p/v)	0.6 mL
Azul de bromofenol	15 mg
Xilencianol	15 mg

Disolver el Ficoll 400 en 5 mL de agua destilada con temperatura, añadir el SDS y el EDTA; llevar a volumen de 10 mL y añadir los colorantes. Dispensar en alícuotas de 1 mL y guardar a temperatura ambiente.

3.4.4. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Este procedimiento se utilizó para la recuperación de bandas procedentes de PCR o digestión enzimática a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión (LM-sieve, Pronadisa), la cual ha sido modificada por hidroxietilación permitiendo que se funda a temperaturas más bajas (~65°C) de tal manera que el DNA puede ser más fácilmente purificado o tratado enzimáticamente (digestión/ligación). Para fundir la agarosa se utilizó ioduro sódico 6 M y posteriormente tierra de diatomeas para la purificación del DNA.

Procedimiento

- Cortar el fragmento de DNA del gel de agarosa con un cúter previamente flameado para evitar contaminantes.
- Añadir NaI 6 M en una proporción de dos o tres veces el peso de la banda (no exceder la cantidad dado que el NaI puede desnaturalizar el DNA).
- Incubar a 55°C hasta que la agarosa se disuelva completamente.
- Añadir 1 mL de tierra de diatomeas e incubar 10 min a temperatura ambiente, mezclar por inversión con regularidad.
- Transferir a una jeringa sobre una columna *Wizard® Minicolumn* (Promega) y filtrar.
- Separar la columna de la jeringa, extraer el embolo y poner la jeringa en la columna, añadir 2 mL de etanol al 70% y filtrar.
- Poner la columna en un tubo *ependorf* y centrifugar 20 s a 13000 rpm. Transferir la columna a un tubo *ependorf* nuevo y dejarla a temperatura ambiente durante 10 min.
- Añadir 15-25 µL de agua desionizada estéril a 42°C al filtro de la columna e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante un minuto a 13000 rpm para recuperar el DNA eluido.

Soluciones

NaI 6 M

NaI

18 g

Disolver con agitación en 12 mL de agua desionizada. Ajustar a 20 mL con agua desionizada. Proteger de la luz durante todo el proceso ya que es fotosensible. La solución debe ser transparente. Guardar a 4°C.

Alternativamente, se usó el kit E.Z.N.A *Gel Extraction* (OMEGA, bio-tek), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

3.4.5. Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción reconocen secuencias específicas de DNA de un tamaño entre 4 a 6 pb, las cuales cortan el DNA en cada punto en el que encuentran su secuencia diana generando diversos fragmentos de DNA que pueden separarse en base a su tamaño en geles de agarosa o poliacrilamida. De esta forma, las distancias entre los sitios de corte pueden calcularse en base a los tamaños generados. Existen diferentes enzimas de restricción que tienen diferentes secuencias diana; estas enzimas se han aislado de diferentes especies de bacterias [209]. En este trabajo, se utilizaron enzimas y sus tampones de Roche y New England BioLabs, siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3.4.6. Clonación en vectores plasmídicos

Para la clonación de DNA externo en plásmidos, hay que tener en cuenta que los extremos sean compatibles. Hay casos en los que la combinación de enzimas de restricción empleadas no permiten que los extremos sean compatibles por lo que es necesario obtener extremos romos que serán compatibles entre sí. También hay que tener en cuenta que un vector digerido con una única enzima de restricción genera unos extremos que pueden volverse a unir sin haber incorporado el fragmento de DNA. Por lo tanto, se utiliza la fosfatasa alcalina para desfosforilar los extremos del vector y evitar la re-circularización. Los productos de la ligación fueron usados para transformar en competentes de *E. coli*, seleccionándose los transformantes en medio selectivo. La comprobación de las construcciones se realizó por PCR, digestión o secuenciación a partir de DNA plasmídico extraído.

3.4.6.1 Obtención de extremos romos

Cuando los extremos tanto del vector como del inserto eran incompatibles, se utilizó la enzima T4 DNA polimerasa para obtener extremos romos gracias a su actividad polimerasa 5'-3' en presencia de dNTPs y exonucleasa 3'-5'.

Procedimiento:

- Mezclar en un tubo *ependorf*.
2 µg-3 µg de DNA, 5 µL de tampón T4 DNA polimerasa 10X (Roche), 5 µL de T4 DNA polimerasa (1 U/µL) (Roche), 10 µL de dNTPs 0.5 mM (Roche), agua desionizada hasta un volumen de 50 µL.
- Incubar 15 min a 37°C.
- Inactivar a 70°C durante 10 min.
- Añadir 200 µL de agua desionizada y 500 µL de tierra de diatomeas.
- Recuperar el DNA de la misma manera que para la miniextracción de DNA plasmídico con la columna *Wizard® Minicolumn* (Promega), limpiando el DNA con etanol al 70% y eluyéndolo con agua desionizada a 42°C.

3.4.6.2. Desfosforilación

La desfosforilación se usó para eliminar los grupos fosfato de los extremos 5' del vector con fosfatasa alcalina, para así evitar la re-circularización de los plásmidos.

Procedimiento:

- Mezclar en un tubo *ependorf*.
20 µL de DNA plasmídico digerido, 25 µL de agua desionizada, 5 µL de tampón de fosfatasa alcalina 10X (Roche), 0.5 µL de fosfatasa alcalina (1 U/ µL) (Roche).
- Incubar durante 1 hora a 37°C.
- Inactivar la fosfatasa alcalina adicionando EDTA pH 8 a una concentración final de 5 mM e incubarlo a 70°C por 10 min.
- Añadir 200 µL de agua desionizada y 500 µL de tierra de diatomeas.
- Recuperar el DNA de la misma manera que para la miniextracción de DNA plasmídico con la columna *Wizard® Minicolumn* (Promega), limpiando el DNA con etanol al 70% y eluyéndolo con agua desionizada a 42°C.

3.4.6.3 Ligación

La ligación del inserto y el vector se realizó con la T4 DNA ligasa (New England BioLabs), la cual cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los nucleótidos adyacentes de los extremos 3' y 5' del DNA, tanto si es de extremos romos como de extremos cohesivos. Para obtener el máximo número de productos de ligación correctos, es necesario que tanto el vector como el inserto se encuentren en un proporción adecuada (relación molar) que debe ser 1:1 vector:inserto para extremos

Materiales y Métodos

romos y 2:1 para extremos cohesivos. Para calcular dicha proporción se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{ng inserto} = [(\text{ng inserto} \times \text{kb inserto}) / \text{Kb vector}] \times \text{relación molar inserto} / \text{vector}$$

Procedimiento:

- Mezclar en un tubo *ependorf* 1 μL de tampón 10 X de la T4 DNA ligasa (New England BioLabs), 1 μL de T4 DNA ligasa (1 U/ μL) (New England BioLabs), cantidades calculadas de inserto y vector, agua desionizada ajustando el volumen a 10 μL .
- Incubar durante 16 horas a temperatura ambiente para ligar extremos romos y a 4°C para extremos cohesivos.
- Transformar 100 μL de células competentes de *E. coli* y sembrar en medio selectivo adecuado.

Los productos de PCR se ligaron directamente en el plásmido linearizado pGEM®-T *Easy vector* (Promega), el cual contiene una timina en el extremo 3' compatible con la adenina adicionada por la polimerasa en la PCR. Este vector contiene los promotores RNA polimerasa T7 y SP6 flanqueando la región de múltiple clonaje que se encuentra en la región codificante para el péptido α de la β -galactosidasa. La inactivación insercional de de éste péptido por parte del producto de PCR clonado permite identificar los clones recombinantes ya que las colonias serán blancas en placas con X-Gal, mientras que las bacterias con plásmido sin inserto formarán colonias azules en presencia del sustrato cromógeno X-gal por acción de la β -galactosidasa. La región MCS posee varias dianas de restricción que permiten recuperar los insertos clonados generando extremos compatibles con otros vectores y flanqueando esta región, oligonucleótidos que permiten secuenciar los productos clonados.

3.4.7. Amplificación y secuenciación de DNA

3.4.7.1. PCR

La PCR es una de las técnicas más utilizadas en biología molecular dada su aplicación en campos como la clonación, mutagénesis, secuenciación, etc. En esta reacción se amplifica un fragmento específico de DNA *in vitro* con el fin de obtener un gran número de copias de éste. En una reacción común se incluye una polimerasa de DNA termoestable, dos *primers* o oligonucleótidos (directo y reverso), dNTPs, tampón de reacción y magnesio que brindan condiciones especiales para el funcionamiento

adecuado de la enzima. Posteriormente en el termociclador se somete la muestra a diferentes ciclos con diferentes temperaturas. Cada ciclo tiene un periodo de desnaturalización del DNA (separación de cadenas), hibridación de los oligonucleótidos (unión de oligonucleótidos al DNA molde por complementariedad a temperatura específica dada por las bases que componen la secuencia) y extensión de los mismos (elongación de la cadena a partir de la secuencia molde por la polimerasa). La amplificación se da exponencialmente, de modo que las secuencias sintetizadas en cada ciclo sirven como molde para el siguiente ciclo.

En este trabajo se utilizó la *AmpliTaq Gold*® DNA polimerasa (Applied Biosystems) para amplificar DNA de *M. tuberculosis* altamente rico en GC. Esta polimerasa se encuentra en estado inactivo por lo que debe someterse a calor para activarla bien sea en la desnaturalización inicial o a medida que avanza la PCR. Se adicionó DMSO para favorecer la desnaturalización del DNA. Los oligos utilizados se diseñaron con el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) [210].

Procedimiento:

- Irradiar el material a utilizar (Puntas, pipetas, tubos *ependorf*, etc).
- Mantener todas las soluciones en hielo así como la mezcla a realizar.
- Mezclar en un tubo *ependorf*:
 - 2.5 μ L de GeneAmp 10X PCR Buffer II (Applied Biosystems)
 - 2.5 μ L de DMSO (Sigma)
 - 2.5 μ L de dNTPs 20 mM (Roche)
 - 1.5 μ L de MgCl₂ 25 mM (Applied Biosystems)
 - 0.5 μ L de cada oligonucleótido 25 pmol/ μ L (Roche)
 - 0.1 μ L de AmpliTaq Gold 5 U/ μ L (Applied Biosystems)
 - 0.5 μ L de DNA molde (400 μ g/ μ L) o 5 μ L de lisado, o agua desionizada en el tubo control negativo
 - Agua desionizada estéril hasta 25 μ L
- Introducir las muestras en el termocilador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD) en las siguientes condiciones:
 - Desnaturalización inicial durante 9 min a 95°C (activación de la DNA polimerasa)
 - Amplificación 30 ciclos de:
 - Desnaturalización: 1 min a 95°C

- Hibridación: 30s a temperatura indicada de acuerdo a los oligonucleótidos, la cual será unos grados superior a la temperatura del oligonucleótido con temperatura de fusión más baja.
- Extensión: 1 min por Kb amplificada a 72°C
- Extensión final: 7 min a 72°C

3.4.7.2. Secuenciación

La secuenciación del DNA es una técnica que permite la determinación del orden de las bases nucleotídicas en un DNA de interés. El método utilizado fue el método automatizado con electroforesis capilar derivado del método de Sanger o Dideoxido [211]. El kit de secuenciación utilizado fue BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing (Applied-Biosystems) el cual implica el uso de una enzima AmpliTaq® DNA polimerasa FS que permite una menor discriminación de los dideoxinucleótidos (ddNTPs) gracias a que contiene una mutación puntual en su sitio activo, así como la generación de picos de una mayor intensidad en fluorescencia; además, implica el uso de ddNTPs, dNTPs y demás componentes de una PCR tradicional.

Los ddNTPs carecen del grupo OH en el carbono 3' de la desoxirribosa, impidiendo la formación de los enlaces fosfodiéster en el momento de la síntesis del DNA por la enzima AmpliTaq® DNA polimerasa FS. De esta manera se termina la elongación de la cadena generando fragmentos que difieren en longitud por una base. Los ddNTPs están marcados con fluorocromos específicos para cada base que generan su propia longitud de onda (también llamados *dye* terminadores) que es detectada por el secuenciador cuando la muestra es separada electroforéticamente en un polímero desnaturante de alta resolución a los que posteriormente se les asigna su orden en la secuencia. En este trabajo la secuenciación la realizó el Servei Genòmica Bioinformàtica (SGB) de la UAB en el equipo ABI 3730x (Applied Biosystems).

Procedimiento:

- Irradiar el material a utilizar (puntas, pipetas, tubos *ependorf*, etc).
- Mantener todas las soluciones en hielo así como la mezcla a realizar.
- Mezclar en un tubo *ependorf*:
 - 0.5 µL de pre-mix BigDye™ (Applied Biosystems)
 - 1.75 µL de tampon 5X (Applied Biosystems)
 - 0.5 µL de DMSO (Sigma) (Opción)
 - 1.0 µL a 2.5 µL de DNA molde (DNA plasmídico)

- 0.65 μL de oligonucleótido 5 pmol/ μL (Roche)
- Agua desionizada hasta 10 μL
- Introducir las muestras en el termocilador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD) en las siguientes condiciones:
 - Desnaturalización inicial durante 3 min a 94°C
 - Amplificación 25 ciclos de:
 - Desnaturalización: 30 s a 96°C
 - Hibridación: 15 s a temperatura óptima del oligonucleótido
 - Extensión: 4 min a 60°C
- Posterior a la reacción de secuenciación, se realizó la precipitación y purificación de los productos con el fin de remover los *dye* terminadores no incorporados y demás componentes no utilizados en la amplificación como sigue:
 - Añadir 1 μL de EDTA 125 mM, 1 μL de acetato de sodio 3 M y 25 μL de etanol al 100%
 - Mezclar e incubar por 15 min a temperatura ambiente
 - Centrifugar 15 min a velocidad máxima
 - Aspirar el sobrenadante y añadir 35 μL de etanol 70%
 - Centrifugar 5 min a velocidad máxima
 - Aspirar el sobrenadante y secar los pellets
- Resuspender las muestras en 10 μL de formamida y analizar con el ABI 3730x.

3.4.8. Mutagénesis

Para la obtención de mutantes se usó el sistema de transducción especializada que permite generar mutantes por delección con alta eficiencia aunque implica más pasos en comparación con otros métodos [200, 212]. Este sistema comprende cinco pasos que se muestran en la figura 3.1.

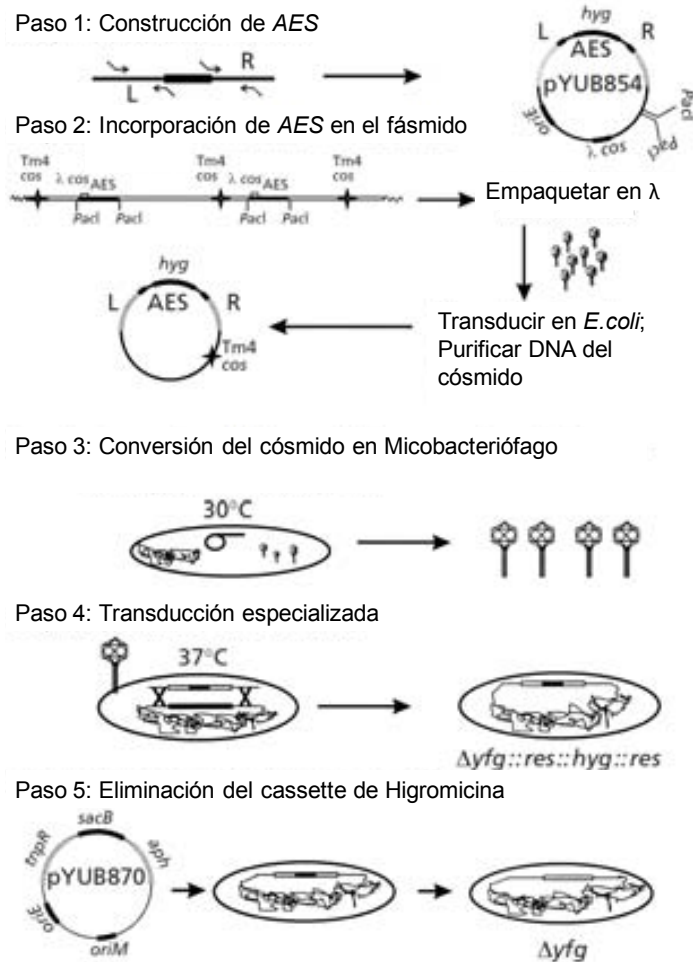


Figura 3.1. Obtención de mutantes por delección usando transducción especializada. Modificado de [200].

Construcción del sustrato de intercambio alélico (AES, *Allelic Exchange substrate*)

Para deleccionar el gen de interés, es necesario generar un AES amplificando por PCR las regiones flanqueantes 5' (corriente arriba) y 3' (corriente abajo) de dicho gen, usando dos sets de oligonucleótidos. Posteriormente, se clonan ambos fragmentos en el cósmido pYUB854 flanqueando un *cassette* de higromicina de manera que el gen de interés además de deleccionado queda interrumpido por e marcador de resistencia. A su vez el *cassette* de higromicina está flanqueado por secuencias de unión a DNA *res* específicas para la resolvasa $\gamma\delta$ -TnpR codificada por el plásmido ayudador pYUB870 lo que permite eliminar el marcador de resistencia de la cepa mutante (Fig. 3.1).

Procedimiento:

- Amplificar por PCR las regiones flanqueantes 5' (fragmento 1) y 3' (fragmento 2) del gen que se desee deletar; se recomienda que los amplicones sean de ~0.5 a 1 kb.
- Clonar cada fragmento en pGEM-T[®] (opcional).
- Liberar el fragmento 1 clonado en pGEM-T[®] con las enzimas de restricción adecuadas y clonarlo en el vector pYUB854 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción lo que producirá el plásmido pYUB854+F1.
- Liberar el fragmento 2 clonado en pGEM-T[®] con las enzimas de restricción adecuadas y clonarlo en el plásmido pYUB854+F1 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción lo que producirá el plásmido pYUB854+F1F2.
- Comprobar por PCR y secuenciación la presencia de la deleción.

Incorporación del AES a un fásmido

El segundo paso implica el clonaje del cósmido recombinante que contiene el AES en el fásmido lanzadera phAE159, el cual permite que las manipulaciones de DNA sean hechas en *E. coli* (Fig. 3.1).

Procedimiento:

- Digerir con la enzima *PacI* el plásmido pYUB854+F1F2 y el fásmido phAE159. La enzima *PacI* no presenta ninguna diana en el cromosoma de *M. tuberculosis*.
- Posteriormente ligar ambos plásmidos, mezclando:
 - 2 a 4 μ L de phAE159
 - 4 a 6 μ L del plásmido pYUB854+F1F2
 - 1 μ L de Buffer 10X de la T4 ligasa
 - 0.5 μ L de T4 DNA ligasa (400 U/ μ L)
 - Completar con agua hasta un volumen final de 10 μ L.
- Añadir 5 μ L de la ligación a 50 μ L del extracto de empaquetamiento MaxPlax (Epicentre); mezclar golpeando ligeramente con los dedos.
- Incubar durante 1-2 horas a temperatura ambiente.
- Añadir 400 μ L de buffer MP para detener la reacción.
- Añadir 1 mL de células *E. coli* HB101 en la mezcla e incubar 1h 15 min a 37°C. Esta cepa de *E. coli* no tiene actividad $\gamma\delta$ resolvasa.
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm a 4°C.

Materiales y Métodos

- Remover el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de medio LB.
- Hacer diluciones de la mezcla y sembrar diferentes volúmenes (100 μ L-300 μ L) por duplicado en placas de LB+Higromicina e incubar toda la noche a 37°C.
- Picar como mínimo 6 colonias y crecerlas en 5 mL de LB+Higromicina, incubar toda la noche en agitación a 37°C.
- Hacer una miniprep de los cultivos.
- Digerir los fásmidos con *PacI* para comprobar los insertos, como sigue:
 - 5 μ L de DNA
 - 2 μ L de buffer de restricción 10X
 - 0.2 μ L de BSA 100X
 - 1 μ L de *PacI*
 - 2 μ L de agua.

Incubar 3-4 horas a 37°C; posteriormente comprobar el patrón de digestión con una electroforesis.

Empaquetamiento del fásmido

Esta etapa implica el empaquetamiento de los cósmidos lanzadera recombinantes extraídos de *E. coli* Hyg^R en micobacteriófagos, transfectando *M. smegmatis* con los cósmidos purificados e incubando a temperatura permisiva de 30°C. Posteriormente, se preparan lisados de título elevado (Fig. 3.1).

Procedimiento:

- Electroporar 4 a 10 μ L de DNA fasmídico en 400 μ L de células electrocompetentes *M. smegmatis*.
- Añadir 1 mL de medio Middlebrook 7H9 sin Tween 80, e incubar 1 h a 37°C.
- Hacer dos mezclas:
 - A. 400 μ L de *M. smegmatis* electroporada y 400 μ L de un cultivo fresco de *M. smegmatis*.
 - B. 110 μ L de *M. smegmatis* electroporada y 1 mL de un cultivo fresco de *M. smegmatis*.
- Añadir 300 μ L y 500 μ L de la dilución A y 300 μ L y 400 μ L de la dilución B a 3 mL de Middlebrook top agar fundido, mezclar con vórtex y plaquear en placas de Middlebrook 7H10 atemperadas. Sembrar por duplicado.
- Incubar a 30°C durante 3 días.

- Picar calvas obtenidas (~6) con ayuda de una punta de pipeta estéril y mezclar con 200 μ L de buffer MP, incubar 1 h 30 min a temperatura ambiente. Almacenar a 4°C.

Preparación de fago de título elevado:

- Hacer dos diluciones:
 - A. Añadir 5 μ L de fago recuperado en el paso anterior, a 300 μ L de cultivo de *M. smegmatis*. Hacer por duplicado.
 - B. Hacer una dilución 1:5 del fago recuperado en el paso anterior con buffer MP. Añadir 5 μ L de fago diluido a 300 μ L de cultivo de *M. smegmatis*.
- Mezclar cada dilución (A y B) con 3 mL de Middlebrook top agar fundido y plaquear en placas de Middlebrook 7H10 atemperadas. Sembrar por duplicado.
- Incubar a 30°C durante 2 días.
- Seleccionar las placas con el mayor número de calvas y añadir 5 mL de buffer MP, incubar 3 horas a 4°C en agitación y luego 1 h 30 min a 37°C. El top agar se contraerá a 4°C para luego expandirse a 37°C lo que permitirá que más fago sea liberado en el lisado.
- Separar el buffer MP y centrifugarlo a 3000 rpm durante 5 min a 4°C.
- Filtrar el sobrenadante con filtros de 0.45 μ m.
- Hacer diluciones seriadas del lisado del fago en buffer MP por duplicado, mezclar 300 μ L de las diluciones con 300 μ L de cultivo de *M. smegmatis* e incubar 30 min a 30°C.
- Añadir a cada dilución del fago 3 mL de Middlebrook top agar fundido y plaquear en placas de Middlebrook 7H10 atemperadas. Sembrar por duplicado.
- Para cada dilución incubar una placa a 30°C y una placa a 37°C con el fin de confirmar el fenotipo temperatura-sensible y determinar el título del fago en pfu/mL (*plate forming units*).

Transducción especializada

En este paso el fago de alto título se transduce en *M. tuberculosis* a temperatura no permisiva (37°C) en la cual se restringe la replicación del fago. El intercambio alélico ocurre como resultado de la doble recombinación entre el DNA homólogo que se encuentra en los fragmentos flanqueantes a la región génica delecionada. Cuando se siembra en medio selectivo, se obtienen aproximadamente un 95% de transductantes Hyg^R que muestran el fenotipo mutante deseado (Fig. 3.1).

Procedimiento:

- A partir de un cultivo de *M. tuberculosis* con una OD₆₀₀ de 1.0 crecido en 7H9 Tween 80, transferir 10 mL a un falcon y centrifugar 10 min a 3000 rpm a 4°C. Se necesitarán 10 mL de cultivo por cada transducción.
- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 10 mL de solución de lavado de micobacteriófago.
- Centrifugar 10 min a 3000 rpm a 4°C, descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de buffer MP.
- Precalentar el fago a 37°C y preparar tres falcon; mezclar en el primero 1 mL de células con 1 mL de fago de título elevado, en el segundo 1 mL de fago de título elevado con 1 mL de buffer MP y en el tercer tubo 1 mL de células con 1 mL de buffer MP. Mezclar cuidadosamente cada mezcla con pipeta e incubar toda la noche a 37°C.
- Centrifugar 10 min a 3000 rpm a 4°C, descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de 7H9.
- Sembrar en placas de Middlebrook 7H10 suplementadas con higromicina. Se recomienda sembrar 5 placas por transducción.
- Incubar durante 3-4 semanas a 37°C.

Eliminación del cassette de higromicina

Para eliminar el *cassette* de higromicina de los mutantes, se usa el plásmido pYUB870, el cual expresa una resolvasa codificada por el gen *tnpR* bajo el control del promotor *hsp60*. Por otro lado, el gen *sacB* incluido en este plásmido, da una selección negativa para la pérdida espontánea del plásmido pYUB870 cuando se plaquea en medio que contiene sucrosa (Fig. 3.1).

Soluciones

Buffer MP

Concentraciones finales:

Tris HCl, pH 7.6	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	10 mM
CaCl ₂	2 mM

Mezclar 2.5 mL de Tris HCl 1 M pH 7.6 con 1.5 NaCl 5 M, 1 mL CaCl₂ 0.1 M, 5 mL MgCl₂ 100 mM; llevar a volumen de 50 mL de agua Milli-Q. Filtrar con filtros de 0.22 μm, almacenar a temperatura ambiente máximo durante 1 año.

Maltosa 20%

Pesar 2 g de maltosa y diluirlos en 10 mL de agua Milli-Q, filtrar con filtros de 0.22 μm, almacenar a temperatura ambiente máximo durante 1 año.

MgSO₄

Pesar 2.45 g de MgSO₄ y diluirlos en 10 mL de de agua Milli-Q, filtrar con filtros de 0.22 μm, almacenar a temperatura ambiente.

Dextrosa 20%

Pesar 20 g de dextrosa y disolver en agua hasta 100 mL, filtrar con filtros de 0.22 μm, almacenar a temperatura ambiente.

Solución de lavado de micobacteriófago

Mezclar 2.5 mL de glicerol 99% con 5 mL de ADC; llevar a volumen de 50 mL con agua Milli-Q. Filtrar con filtros de 0.22 μm, almacenar a 4°C máximo durante 6 meses.

Preparación de células HB101

- Inocular HB101 en medio LB suplementado con 10 mM de MgSO₄ y 0.2% de maltosa, incubar en agitación toda la noche a 37°C.
- Inocular 0.5 mL del cultivo o/n en 25 mL de medio LB suplementado con 10 mM de MgSO₄ y 0.2% de maltosa.
- Incubar en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcance una OD₆₀₀ de 0.8-1.0.
- Transferir las células a un falcon de 50 mL y centrifugar a 3000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 12.5 mL de MgSO₄ 10 mM.
- Almacenar a 4°C hasta durante dos días.

Middlebrook top agar

Pesar 0.47 g de medio Middlebrook 7H9, 0.75 g de agar y disolver en 100 mL de agua destilada; autoclavar 10 min a 121°C, dejar enfriar un poco y añadir 1 mL de dextrosa al 20% estéril. Alicuotar y almacenar a 4°C.

3.5. Métodos de manipulación de RNA

La manipulación del RNA implica tomar una serie de precauciones que permitan evitar contaminaciones con RNasas, las cuales son extremadamente comunes en el ambiente, por lo que es importante trabajar en un ambiente libre de ellas; para ello todo el material a utilizar debe tratarse para su eliminación, así como implementar el uso de material de plástico libre de RNasas, puntas de micropipeta con filtro, agua desionizada estéril en la preparación de soluciones y agua libre de RNasas para resuspender el RNA una vez aislado. Por otro lado, es importante mantener el área de trabajo desinfectada con etanol y cambiarse los guantes frecuentemente.

3.5.1. Extracción de RNA total

La clave para tener RNA de buena calidad radica en la rapidez con la que se aisle, por lo que se recomienda usar un método que sea sencillo así como preparar el material y las soluciones con antelación. En este trabajo se utilizó el método recomendado por el Bacterial Microarray Group del St. George's Hospital Medical School (Londres) con ligeras modificaciones.

Procedimiento:

- Inocular *M. tuberculosis* en 10 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar a 37°C durante 2 o 3 semanas.
- Medir la OD₆₀₀ de los cultivos y hacer una resiembra en medio Middlebrook 7H9, de manera que la OD₆₀₀ del cultivo sea de 0.01. El medio de cultivo se prepara en un mismo lote y se hacen alícuotas en un número de frascos de cultivo de 75 cm² acorde con los cultivos se vayan a hacer para la extracción del RNA; esto con el fin de evitar variaciones en la expresión génica debidas a diferencias en los cultivos. Incubar a 37°C durante 1 semana.
- Unir los cultivos directamente en un frasco de cultivo de 150 cm² que contenga 4 volúmenes de la solución de tiocianato de guanidina (GTC) 5 M.
- Mezclar moviendo el frasco cuidadosamente para no generar aerosoles.
- Centrifugar alícuotas de 40 mL, a 3000 g durante 10 min, en tubos falcon bien cerrados. Se aconseja no exceder esta cantidad para garantizar la integridad de los tubos.

- Desechar el sobrenadante teniendo la precaución de nunca mezclar la solución de GTC con lejía y usar los restos que quedan de la solución de GTC para resuspender las células (aproximadamente 1 mL de GTC por 40 mL de cultivo original, aunque se debería usar un radio mayor para cultivos en fase estacionaria, o cultivos con bacterias agregadas). Se aconseja usar la solución para lavar bien todo el fondo cónico del tubo donde quedan muchas células adheridas. Transferir alícuotas de 1 mL a tubos *ependorf* de 1.5 mL.
- Centrifugar durante 1 min a 13 000 rpm y desechar el exceso de GTC del pellet bacteriano.
- Resuspender el pellet en 200 μ L de Trizol (Invitrogen) con el fin de resuspender bien las células y añadir 800 μ L más de Trizol. Transferir a un tubo con 0.5 mL de bolitas de zirconia de 0.1 mm de diámetro (glass beads acid-washed Biospec).
- Lisar las células con el Mini BeadBeater (Biospec) sometiéndolas a dos pulsos de 30 s a velocidad máxima. Poner en hielo durante 1 minuto para enfriar la muestra. Repetir dos veces más.
- Mantener los tubos a temperatura ambiente durante 10 min para permitir la disolución de los complejos RNA-proteína y dar un pulso de centrifuga para separa las bolitas.
- Transferir el sobrenadante a 2-mL Heavy Phase Lock Gel I (5 PRIME) que contenga 300 μ L de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
- Mezclar por inversión rápidamente durante 15 s y poner en hielo. Una vez todas las muestras haya sido transferidas, continuar invirtiendo periódicamente durante 2 min.
- Centrifugar durante 5 min a 16.000 g, recuperar la fase acuosa (\approx 540 μ L) y ponerla en un tubo de 1.5 mL que contenga 270 μ L de isopropanol y 270 μ L de solución de alto contenido salino.
- Precipitar a 4°C durante toda la noche.
- Centrifugar 16000 rpm 10 min a 4°C y descartar la fase de isopropanol.
- Añadir 1 mL de etanol 75%, inviertir varias veces, centrifugar durante 5 min a 16000 g.
- Eliminar el etanol y secar el pellet dejando el tubo *ependorf* abierto en la cabina de flujo laminar previamente irradiada durante 5-10 min, posteriormente resuspender en 100 μ L de agua RNase-free (Qiagen, Crawley, UK). Los tubos de RNA de la misma muestra de cultivo deben ser unidos resuspendiendo

todos los pellets en 100 μ L de agua (en una proporción de 100 μ L de agua por 100 mL de cultivo bacteriano original) para mantener una alta concentración de RNA.

Purificación con el RNeasy® Mini Kit (Qiagen)

El uso de este kit combina las propiedades de unión selectiva a una membrana de sílica gel con la tecnología *microspin* en presencia de un buffer de alto contenido salino y etanol que proporciona las condiciones adecuadas para la unión del RNA a la membrana. Con este sistema se pueden purificar hasta 100 μ g de RNA que posteriormente es lavado para eliminar contaminantes y eluido en agua libre de RNasas. El protocolo se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Tratamiento con el *kit* TURBO DNA-free™ (Ambion)

Este kit se utilizó para eliminar restos de DNA presentes en la muestra de RNA extraída. La DNasa incluida es una versión modificada de la DNasa I con 350% más eficiencia catalítica y mayor afinidad por el DNA lo que la hace más efectiva a la hora de eliminar DNA en la muestra a tratar. El tratamiento utilizado fue el “riguroso”:

Procedimiento:

- Diluir la muestra hasta una concentración de ácidos nucleicos de 200 ng/ μ L con agua RNase-free (Qiagen) y dispensar la muestra en alícuotas, de volumen igual o inferior a 87 μ L, en tubo *ependorf* de 0.5 mL para facilitar la recuperación del sobrenadante tras el tratamiento con el inhibidor de la DNasa.
- Añadir a cada tubo *ependorf* 10 μ L de tampón TURBO DNasa 10X, 3 μ L de TURBO DNasa y agua RNase-free (Qiagen) hasta un volumen final de 100 μ L.
- Incubar durante 30 min a 37°C.
- Añadir 3 μ L más de TURBO DNasa e incubar otros 30 min a 37°C.
- Resuspender bien el reactivo inhibidor de la DNasa con el vórtex y añadir 20 μ L a la muestra (0.2 volúmenes).
- Incubar durante 2 min-3 min a temperatura ambiente mezclando bien la muestra 2 o 3 veces durante el tiempo de incubación.
- Centrifugar a velocidad máxima durante 1.5 min. Transferir el RNA a otro tubo. Dado que el inhibidor de la DNasa quela cationes divalentes como el magnesio o el calcio se debe ir con cuidado para no contaminar el RNA con

inhibidor, ya que podría impedir reacciones posteriores como la retrotranscripción.

- Unir todas las muestras procedentes de un mismo cultivo y comprobar por PCR que no quedan restos de DNA; en el caso de que amplificara la PCR, se haría un segundo protocolo de tratamiento con TURBO DNasa de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes (TURBO DNA-free™ *Second Digest Protocol*).
- En caso necesario, reconcentrar las muestras con el protocolo RNA clean-up del RNeasy® Mini kit (Qiagen) según se ha descrito anteriormente.

Soluciones

Solución GTC 5 M

Concentraciones finales:

Tiocianato de guanidina	5 M
N-Lauroilsarcosina sódica	0.5% (p/v)
β-mercaptoetanol	0.1 M
Tween 80	0.5% (v/v)

Pesar 590.8 g de GTC y disolverlos con agitación y calor, añadiéndolos lentamente a 400 mL de agua destilada. La disolución de GTC en agua es una reacción endotérmica por lo que debe disolverse calentándolo manteniéndolo a una temperatura de 20°C-25°C. Una vez disuelta, se añaden 5 g de N-Lauroylsarcosina sódica, 7.5 mL de β-mercaptoetanol y 5 mL de Tween 80. Se disuelve con agitación y se ajusta el volumen a 1 L con agua destilada. Guardar protegiendo de la luz.

Solución de alto contenido salino

Concentraciones finales:

Citrato de Sodio	0.8 M
Cloruro de Sodio	1.2 M

Pesar 10.32 g de citrato de sodio y 5.8 g de Cloruro de sodio disolver en agua desionizada y ajustar a 50 mL.

3.5.2. Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA

El análisis a nivel cuantitativo y cualitativo del RNA extraído permite determinar su integridad y concentración. Se puede usar uno de los métodos descritos a continuación:

3.5.2.1. Cuantificación por espectrofotometría

Para analizar el RNA se hacen lecturas a 230, 260 nm y 280 nm. El cociente $A_{260/280}$ da una estimación de la pureza de la muestra que debe tener valores ≥ 2 ; si por el contrario ésta proporción disminuye, la muestra estaría contaminada con proteínas. Por otro lado, el cociente $A_{260/230}$ da una estimación de la contaminación por carbohidratos, péptidos, fenol o compuestos aromáticos en donde la proporción debe ser también ≥ 2 . Se recomienda diluir la muestra usando Tris-EDTA pH 7-7.5 (1 μ L de RNA en 74 μ L de TE) también como para la calibración del espectrofotómetro. Una unidad de A_{260} corresponde a 44 μ g de RNA por mL.

Por otro lado, se puede comprobar la integridad del RNA por mediante en gel de agarosa al 2%, cargando 1 μ g de RNA de acuerdo a las concentraciones estimadas en el espectrofotómetro; en donde el RNA debe aparecer como dos bandas ribosomales bien definidas.

3.5.2.2. Cuantificación por Nanodrop

El Nanodrop utiliza un diseño basado en el pipeteo de micro volúmenes directamente sobre la superficie de un pedestal plano (extremo de la fibra óptica receptora) que forma un puente de líquido junto con el pedestal superior produciendo una tensión superficial que mantiene la muestra en su sitio, generando un estrecho paso óptico cuya longitud varía automáticamente con la concentración de la muestra, permitiendo hacer mediciones con gran exactitud y reproducibilidad en un rango muy amplio de concentraciones sin hacer diluciones. La cuantificación con Nanodrop se realizó en el Servei Genòmica Bioinformàtica (SGB) de la UAB con el equipo NanoDrop®ND-1000 de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes.

3.6. *Métodos de manipulación de proteínas*

3.6.1. Obtención de extractos proteicos

Los extractos proteicos se obtuvieron con el fin de comprobar la sobreproducción de la dioxigenasa Rv3161c y del transportador Rv1686c-Rv1687c clonados en el vector pMV261 [199] en geles mono dimensionales SDS-PAGE. El procedimiento usado se adaptó al descrito por Parish y Wheeler [213].

Procedimiento:

- Inocular una colonia de *M. tuberculosis* en 10 mL de medio Middlebrook 7H9 e incubar durante 2 o 3 semanas a 37°C.
- Hacer una resiembra 1/100 en medio Middlebrook 7H9 e incubar a 37°C hasta que el cultivo alcance una OD₆₀₀ de aproximadamente 1.
- Centrifugar el cultivo durante 10 min a 3000g y 4°C en tubos estériles.
- Desechar el sobrenadante y hacer dos lavados con PBS 1X para la eliminación del BSA presente en el medio 7H9.
- Resuspender el pellet en solución de lisis proporcionalmente.
- Añadir 200 µL de pellet resuspendido a un tubo de Mini BeadBeater estéril que contenga 100 µL de bolitas acid-washed de 0.1 mm de diámetro (Sigma).
- Someter las células a 3 pulsos de 1 min a velocidad máxima en el Mini BeadBeater (Biospec), con 1 min de reposo en hielo entre cada pulso.
- Centrifugar a 3000g durante 5 min para separar las bolitas y células no lisadas.
- Transferir el sobrenadante a un tubo *ependorf* y filtrar los extractos proteicos con las unidades de filtrado por centrifugación *Ultrafree-MC* con membrana de PVDF de 0.22 µm de diámetro de poro (Millipore) para poder realizar el resto del proceso fuera del laboratorio de bioseguridad.
- Cuantificar y utilizar inmediatamente o congelar a -80°C

Solución de lisis

Concentraciones finales:

Urea (Sigma)	7 M
Tiourea (GE-Health care)	2 M
CHAPS (Sigma)	4% (v/v)
ASB-14 (Sigma)	4% (v/v)

Pesar 21.02 g de urea, 7.61 g de Tiourea, 2 g de CHAPS y 2 g de ASB-14; disolver en agitación en agua Chromasolv® grado HPLC (Sigma) en un vaso de precipitados de plástico para evitar la precipitación de la urea en vasos de cristal y ajustar a 50 mL; alicuotar y congelar a -20°C.

3.6.2. Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el Coomassie® Protein Assay Reagent Kit (Pierce), el cual se basa en el método colorimétrico descrito por Bradford [214]. Cuando el colorante Coomassie® se une a las proteínas en un medio ácido sufre un cambio de color de marrón a azul desplazándose su máximo de absorbancia de 465 nm a 595 nm. La concentración de proteína de la muestra se

calcula comparando las absorbancias obtenidas con una recta patrón hecha con estándares de concentración conocida de BSA que se procesan junto con la muestra.

Procedimiento

- Separar protegiendo de la luz la cantidad necesaria del reactivo Coomassie® (Bradford) previamente agitado y atemperar a temperatura ambiente.
- Prepara la recta patrón por duplicado en placas de 96 pozos, como sigue:

[BSA] $\mu\text{g/mL}$	0	3	6	8	10	12	14	17	20
$\mu\text{L BSA diluida}^*$	0	15	30	40	50	60	70	85	100
$\mu\text{L H}_2\text{O}$	100	85	70	60	50	40	30	15	0

*La dilución a realizar es 1/100 a partir del stock a 2 mg/mL

- Hacer diluciones de la muestra hasta encontrarse dentro del rango de 0 a 20 $\mu\text{g/mL}$.
- Poner 100 μL de la muestra diluida y 100 μL del reactivo de Coomassie® (Bradford).
- Incubar durante 5-10 min a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia a 620 nm en un lector de placas. Todas las muestras se cuantificaron como mínimo por duplicado.
- Calcular la recta de regresión con los valores de la recta patrón y determinar la concentración de proteínas de la muestra extrapolando a la recta patrón obtenida.

3.6.3. Electroforesis de proteínas

Los extractos proteicos se separaron mediante geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Esta técnica, basada en la separación proteica en función de su peso molecular, fue descrita por Laemmli en 1970 [215], en donde las proteínas son desnaturalizadas por temperatura (100°C) en presencia de un detergente (SDS) y agente reductor (β -mercaptoetanol) que rompe los puentes disulfuro. El detergente aniónico SDS permite que las proteínas adquieran una carga superficial negativa que hace que migren hacia el ánodo en presencia de un campo eléctrico; de esta manera, las proteínas migran en función de su peso molecular.

El gel de electroforesis tiene dos partes, la parte superior del gel o *stacking* contiene una porción de acrilamida más baja y se prepara con un tampón de baja

fuerza iónica y de pH diferente que el gel inferior o de separación. La función del gel superior es favorecer la migración rápida de las proteínas que se concentran en la intersección con el gel de separación para que entren a la vez. La visualización de los geles se realizó mediante la tinción con el colorante azul de Commassie.

En este trabajo se hicieron geles con un grosor de 1.5 mm. El equipo de electroforesis utilizado fue el Mini-PROTEAN® Tetra System (BIO-RAD) y una fuente de alimentación POWER-PAC 300 (BIO-RAD).

Procedimiento

- Limpiar los cristales, soportes y separadores con etanol al 70%, secarlos y montarlos según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.
- Preparar el gel inferior de acuerdo a la tabla 3.5.
- Mezclar e introducir la disolución entre los vidrios hasta llenar $\frac{3}{4}$ partes.
- Añadir con mucha precaución una pequeña capa de Isopropanol para evitar la inhibición de la polimerización de la acrilamida por parte del oxígeno y dejar polimerizar.
- Eliminar el Isopropanol por decantación y lavar con agua destilada y escurrir.
- Preparar el gel superior de acuerdo a la tabla 3.5.
- Mezclar e introducir la disolución entre los cristales, colocar el peine de 1.5 mm de grosor y dejar polimerizar.
- Mezclar las muestras con el tampón de carga 5X y calentarlas a 100°C durante 5 min.
- Centrifugar brevemente y poner las muestras en hielo.
- Sacar el peine del gel superior y colocar el soporte con el gel en la cubeta de electroforesis. Añadir tampón de electroforesis 1X, llenando previamente el depósito interior.
- Sembrar un máximo de 20 μ L de muestra y 5 μ L de marcador de peso molecular BenchMark™ (Invitrogen).
- Conectar la cubeta a la fuente de alimentación ajustando el amperaje a ~10 mA/gel hasta que las proteínas bajen completamente el gel superior, posteriormente subir el amperaje a ~20 mA/gel hasta que el frente de azul de bromofenol del tampón de carga sale por la parte inferior del gel.
- Una vez finalizada la electroforesis se saca el soporte y con cuidado el gel.
- Colocar el gel en una cubeta con la solución de Coomassie y mantenerlo en agitación lenta durante 20 min.

Materiales y Métodos

- Descartar el colorante y destefir el gel con solución decolorante en agitación lenta durante 1 hora o hasta que se visualicen correctamente las bandas de proteínas.
- Detener la decoloración lavando el gel con agua destilada.

Tabla 3.5. Concentraciones de geles SDS-PAGE.*30% Acrilamida/Bisacrilamida Solución 37.5:1 (BioRad).

Concentración Gel	10%		12%		12,5%		15,0%	
	Inf	Sup	Inf	Sup	Inf	Sup	Inf	Sup
Agua	3.96 mL	1.944 mL	3.56 mL	1.944 mL	3.46 mL	1.944 mL	2.96 mL	1.944 mL
Buffer inferior	2 mL	-----	2 mL	-----	2 mL	-----	2 mL	-----
Buffer superior	-----	750 μ L	-----	750 μ L	-----	750 μ L	-----	750 μ L
Acril/Bis *	2 mL	300 μ L	2.4 mL	300 μ L	2.5 mL	300 μ L	3 mL	300 μ L
PSA 10%	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L
TEMED	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L

Soluciones

Buffer gel inferior (4X)

Tris Base	91 g
SDS	2 g

Disolver en 300 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl. Añadir agua destilada hasta un volumen final de 500 mL. Filtrar la solución con filtros de 0.45 μ m de diámetro de poro y guardar a 4°C.

Buffer gel Superior (4X)

Tris-HCl	6.05 g
SDS	0.4 g

Disolver en 40 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl. Añadir agua destilada hasta un volumen final de 100 mL. Filtrar la solución con filtros de 0.45 μ m de diámetro de poro y guardar a 4°C.

Persulfato de amonio al 10%

Disolver 1 g de persulfato amónico en 10 mL de agua. Hacer alícuotas de 100 μ L y congelar a -20°C. Cuando se vaya a usar descongelar lentamente en hielo y mantener siempre en hielo.

Tampón de carga 5X

Añadir a 3.8 mL de agua desionizada estéril

TrisHCl 0.5 M pH 6.8	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10% (p/v)	1.6 mL
Azul de bromofenol	0.4 mL
β-mercaptoetanol	0.4 mL

Hacer alícuotas de 500 µL y congelar a -20°C.

Tampón de electroforesis 10X

Tris Base	30.29 g
Glicina	144.1 g
SDS	10 g

Disolver en agua destilada ajustando el volumen final a 1 L. Diluir 10 veces en agua destilada para obtener la solución de trabajo. Conservar a 4°C.

Solución de Coomassie

Coomassie Brilliant Blue R-250	2.5 g
Metanol	500 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Agua	Hasta 1 L

Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz.

Solución decolorante

Mezclar con 100 mL de ácido acético glacial con 900 mL de agua. Guardar a temperatura ambiente.

3.6.4. Geles bidimensionales (2DE)

La electroforesis bidimensional en combinación con la espectrometría de masas es el método clásico usado para monitorear la dinámica de la abundancia de una proteína en sistemas biológicos bajo unas condiciones definidas [20]. Este sistema combina dos métodos diferentes de separación que son el isoelectroenfoco (IEF) en la primera dimensión, en el cual las proteínas son separadas de acuerdo a su punto isoelectroico (pI) y el SDS-PAGE en la segunda dimensión en la que se separan las

proteínas de acuerdo a su peso molecular [216]. En este trabajo se realizaron geles bidimensionales con el fin de comprobar la sobreproducción de la dioxigenasa Rv3161c y del transportador Rv1686c-Rv1687c clonados en el vector pMV261 [199] así como la detección del perfil proteico en cultivos de *M. tuberculosis* tratados y no tratados con TRC como ha sido previamente descrito a nivel transcripcional [129, 189].

Con el fin de evitar contaminaciones se requiere tomar ciertas medidas, entre ellas:

- Trabajar siempre con guantes y evitar la contaminación por queratinas presentes en piel, cabello o ropa.
- Usar guantes sin polvo, preferentemente de nitrilo o vinilo.
- Usar reactivos de la máxima pureza posible.
- Usar agua bidestilada (Milli-Q) o de pureza superior (grado HPLC).
- Evitar calentar la muestra por encima de los 30°C con el fin de prevenir la degradación de la úrea a isocianato que modificaría las cadenas laterales de los aminoácidos modificando por lo tanto el punto isoeléctrico de las proteínas.
- Trabajar con muestras libres de contaminantes.

3.6.4.1. Obtención de extractos proteicos para 2DE

La obtención de extractos proteicos para 2DE es un punto crítico en la obtención de geles de buena calidad. Muchos componentes celulares como lípidos, DNA y RNA así como la presencia de sales y azúcares en la muestra pueden afectar los resultados obtenidos. El método utilizado ha sido adaptado a partir del recomendado por GE *Healthcare*.

Procedimiento:

- Inocular una colonia de *M. tuberculosis* en 10 mL de medio Middlebrook 7H9+Tween e incubar durante 2 o 3 semanas a 37°C.
- Hacer una resiembra 1/100 en los mL deseados de medio Middlebrook 7H9+Tween e incubar a 37°C hasta que el cultivo alcance una fase exponencial o estacionaria según se requiera.
- Centrifugar el cultivo durante 10 min a 3000 g y 4°C en tubos estériles.
- Desechar el sobrenadante y hacer dos lavados con PBS 1X estéril.
- Resuspender el pellet en solución de lisis* proporcionalmente.
- Sonicar en hielo con un homogenizador ultrasónico LABSONIC U (B. Braun) con una sonda de aguja de titanio durante 5 min con una amplitud de 40% en ciclos de 30 s ON/ 60 s OFF. Alternativamente se puede lisar con Mini

BeadBeater (Biospec), pero en nuestro caso este sistema no fue muy efectivo dado que la concentración proteica obtenida fue muy baja.

- Centrifugar a 3000g durante 5 min para separar las células no lisadas
- Transferir el sobrenadante a un tubo *ependorf* y filtrar los extractos proteicos con las unidades de filtrado por centrifugación *Ultrafree-MC* con membrana de PVDF de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore) para poder realizar el resto del proceso fuera del laboratorio de bioseguridad.
- Cuantificar y utilizar inmediatamente o congelar a -80°C

*La solución de lisis utilizada fue previamente descrita en el apartado 3.6.1.

3.6.4.2. Determinación de la concentración de proteínas para 2DE

Para la cuantificación de las muestras se utilizó el kit 2-D Quant de GE Healthcare; un sistema que está basado en la unión específica de iones de cobre a las proteínas. Las proteínas precipitadas son resuspendidas en una solución que contiene cobre y el cobre no unido es medido con un agente colorimétrico. La densidad de color es inversamente proporcional a la concentración de proteína.

Procedimiento:

- Preparar un volumen requerido de solución de trabajo “*color reagent*”, mezclando 100 partes de reactivo A con 1 parte de reactivo B.
- Preparar la curva estándar por duplicado como sigue:

Número de tubos	1	2	3	4	5	6
Volumen de solución estándar BSA 2mg/mL	0 μL	5 μL	10 μL	15 μL	20 μL	25 μL
Concentración de Proteína	0 μg	5 μg	10 μg	15 μg	20 μg	25 μg

- Poner en tubos *ependorf* 1 μL , 2 μL , 5 μL y 10 μL de muestra por duplicado.
- Añadir 500 μL de solución precipitante a cada tubo *ependorf* (incluyendo los tubos *ependorf* de la curva estándar). Mezclar con vórtex e incubar 2-3 min a temperatura ambiente.
- Añadir 500 μL de solución co-precipitante a cada tubo *ependorf* y mezclar con vórtex.
- Centrifugar por lo menos a 10000 g durante 5 min para sedimentar las proteínas.
- Remover rápidamente los tubos *ependorf* de la centrífuga y decantar los sobrenadantes con cuidado de no perder los pellets.

- Volver a poner las muestras en la centrífuga y dar un pulso de centrífuga, remover con micropipeta los sobrenadantes restantes. Es importante eliminar completamente el sobrenadante para evitar posteriores interferencias.
- Añadir 1 mL de la solución de trabajo “*color reagent*” y mezclar asegurándose de que la solución se mezcle instantáneamente.
- Incubar a temperatura ambiente durante 15-20 min.
- Leer la absorbancia a 480 nm usando agua como blanco. La absorbancia se debe leer dentro de los 40 min después de la adición de la solución de trabajo.
- Calcular la recta de regresión con los valores de la recta patrón y determinar la concentración de proteínas de la muestra extrapolando a la recta patrón obtenida.

3.6.4.3. Limpieza de la muestra para el IEF

Para la limpieza de las muestras se usó el kit 2-D Clean-Up de GE Healthcare, donde las proteínas son precipitadas dejando en suspensión sustancias como detergentes, sales, lípidos, ácidos nucleicos o compuestos fenólicos; las proteínas son entonces resuspendidas en solución de lisis.

Procedimiento:

- Transferir 1 μ L-100 μ L de muestra equivalente a una cantidad de proteína de de 100 μ g a un tubo *ependorf*.
- Añadir 300 μ L de solución precipitante y mezclar bien con vórtex o mediante inversión e incubar en hielo durante 15 min.
- Añadir 300 μ L de solución co-precipitante y mezclar bien con vórtex.
- Centrifugar por lo menos a 12000 g durante 5 minutos.
- Remover rápidamente los tubos *ependorf* de la centrífuga y decantar los sobrenadantes.
- Volver a poner las muestras en la centrífuga cuidadosamente y dar un pulso, remover con micropipeta los sobrenadantes.
- Añadir 40 μ L de solución co-precipitante e incubar en hielo durante 5 minutos.
- Reposicionar en la centrífuga y centrifugar durante 5 min, remover el sobrenadante.
- Añadir 25 μ L de agua destilada o desionizada y mezclar con vórtex durante 5-10 s asegurándose de la completa dispersión del pellet.

- Añadir 1 mL de *wash Buffer* previamente enfriado por lo menos 1 hora a -20°C y 5 μL de *wash additive*, mezclar por vórtex hasta que el pellet se disperse completamente.
- Incubar los tubos *ependorfs* a -20°C mezclando mediante vórtex durante 20-30 s cada 10 min durante 30 min como mínimo. En este punto, las muestras se pueden guardar a -20°C como máximo una semana.
- Centrifugar durante lo menos a 12000 g durante 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet durante 5 min sin exceder este tiempo ya que un exceso de sequedad comportaría una difícil disolución.
- Resuspender el pellet en 100 μL de solución de lisis que contenga 20 mM del agente reductor Ditioneitol (DTT) (Sigma) que rompe puentes disulfuro presentes y mantiene las proteínas en su estado reducido, *IPG buffer* al 0.5% (GE Healthcare) que potencia la solubilidad y minimiza la agregación de las proteínas y una punta de espátula de azul de bromofenol (GE Healthcare); éstos deben ser añadidos justo antes de usar.
- Mezclar mediante vórtex e incubar durante 1 h y 30 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar como mínimo a 12000 g durante 5 minutos para eliminar cualquier material insoluble.
- Cargar el sobrenadante en la primera dimensión o congelar a -80°C .

3.6.4.4. Primera dimensión (IEF)

Rehidratación de las tiras de IEF

En este trabajo se usaron tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de GE Healthcare de 24 cm que permiten la separación proteica de acuerdo a su punto isoeléctrico. Estas tiras se suministran deshidratadas por lo cual deben ser rehidratadas.

Procedimiento:

- Añadir al "*IPGstrip Holder*" (GE Healthcare) 450 μL de solución de lisis que contenga 12 μL de Destreak Reagent (GE Healthcare) que ayuda a evitar la re-formación de los puentes disulfuro, *IPG buffer* al 0.5% (GE Healthcare) y una punta de espátula de azul de bromofenol (GE Healthcare); éstos deben ser añadidos justo antes de usar.

Materiales y Métodos

- Retirar el plástico de protección de la tira de IEF, manipulándolas con guantes y pinzas.
- Colocar la tira en el “*IPGstrip Holder*” con la parte que lleva la acrilamida deshidratada cara abajo sobre la solución de lisis sin que queden burbujas (Fig. 3.2).
- Cubrir la tira con 2 mL de aceite mineral (GE Healthcare) para evitar evaporación del agua durante el proceso de rehidratación.

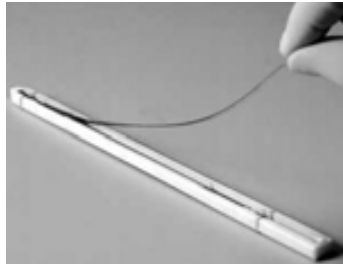


Figura 3.2. Posicionamiento de la tira IPG en el *IPGstrip Holder*.

- Dejar a temperatura ambiente como mínimo durante 12 horas a una temperatura no superior a los 30°C sobre una superficie completamente plana. Idealmente se debe rehidratar a media tarde y dejarlo toda la noche.

Isoelectroenfoque (Primera dimensión)

El IEF se realizó con el sistema “Ettan™ IPGphor™ Cup loading Manifold” de GE Healthcare con la unidad electroforética Ettan IPGphor 3. En este sistema el IEF se hace con el gel cara arriba y la muestra es aplicada en una copa lo que proporciona mejores resultados y una mayor resolución en cantidades de proteína superiores a 1 mg.

Procedimiento:

- Colocar el *manifold* (placa de cerámica con óxido de aluminio que permite la transferencia de calor eficientemente) en la unidad electroforética Ettan IPGphor como muestra la figura 3.3.



Figura 3.3. Posición del Manifold en el IPGphor. Tomado de [217].

- Colocar las tiras previamente rehidratadas en los carriles del *manifold* cara arriba, alineándolas con ayuda de unas pequeñas guías que tiene el *manifold* como muestra la figura 3.4A.
- Colocar las copas como muestra la figura 3.4B, preferiblemente en el cátodo donde se realizará la carga de la muestra y nunca sobre las guías del *manifold*; las copas no deben perder líquido por lo que antes de cargar la muestra es recomendable llenarlas con aceite mineral y esperar un rato para asegurarse de que hayan quedado bien colocadas.
- Colocar dos tiras de papel (*Paper wick*, GE Healthcare) por tira de IPG impregnadas con 150 μL de agua Milli-Q tanto en el ánodo como en el cátodo (Fig. 3.4B) de manera que quede una pequeña zona de contacto papel-acrilamida como muestra la figura 3.4C. Se recomienda cambiar los papeles varias veces durante el IEF, ya que estos se van impregnando de contaminantes a medida que el isoelectroenfoco tiene lugar.

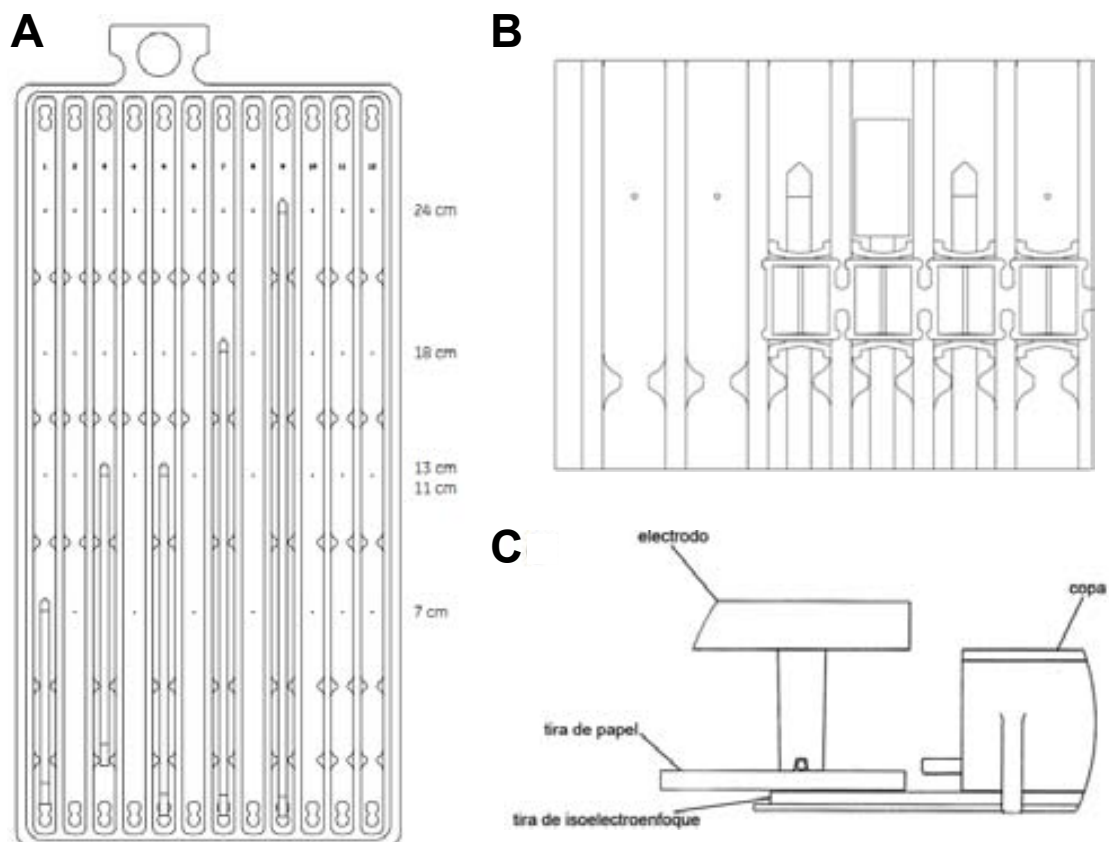


Figura 3.4. A) Placa y posición de las tiras. B). Posición de las copas y las tiras de papel en la placa. C) Posición de las tiras de papel y el electrodo. Tomado de [217].

Materiales y Métodos

- Cubrir con aceite mineral con el fin de evitar evaporación del agua durante el proceso.
- Colocar los electrodos sobre las tiras de papel como se muestra en la figura 3.4C y la figura 3.5 y cerrarlos.

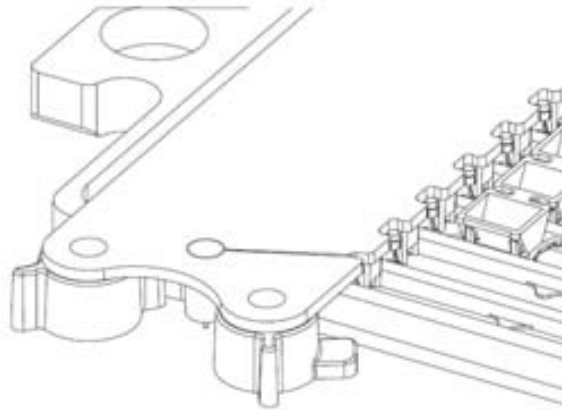


Figura 3.5. Posición del electrodo sobre las tiras de papel. Tomado de [217].

- Cargar la muestra y verificar que no hayan pérdidas por mala posición de las copas.
- El IEF se realizó a 20°C y 25-75 μA / tira bajo unas condiciones que variaron en función del rango de pH de la tira utilizada, como sigue:

Geles pH 3-10:

- 100V: 3 horas en gradiente
- 500V: 1 hora
- 1000V: 3 horas en gradiente
- 1000V: 1 hora
- 8000V: 3 horas en gradiente
- 8000V: 6 horas

Geles pH 4-7

- 100V: 3 horas en gradiente
- 500V: 1 hora
- 1000V: 3 horas en gradiente
- 1000V: 1 hora
- 8000V: 3 horas en gradiente
- 8000V: 6 horas

Geles pH 6-9

- 100V: 3 horas en gradiente
- 500V: 1 hora
- 1000V: 3 horas en gradiente
- 10000V: 1 hora en gradiente
- 10000V: 3 horas

Geles pH 7-11

- 100V: 3 horas en gradiente
- 500V: 1 hora
- 1000V: 3 horas en gradiente
- 10000V: 1 hora en gradiente
- 10000V: 8 horas

Equilibrado de tiras

El equilibrado de las tiras se realizó con el fin de reducir y alquilar los puentes disulfuros que pudieron quedar oxidados, así como también sustituir los detergentes no-iónicos por SDS para llevar a cabo la segunda dimensión.

Procedimiento:

- Añadir a un tubo que contenga 10 mL de solución de equilibrado 100 mg de DTT (Sigma) y mezclar hasta disolver.
- Añadir a un tubo que contenga 10 mL de solución de equilibrado 250 mg de Iodoacetamida (Sigma) y mezclar hasta disolver.
- Romper con un objeto contundente una pipeta de plástico de 25mL para cultivo celular en el extremo que tiene el trozo de algodón, con el fin de tener los dos extremos abiertos. Preferiblemente hacerlo sin sacar la pipeta de su envoltura.
- Cerrar el extremo más angosto con Parafilm®.
- Introducir la tira de isoelectroenfoco en la pipeta de modo que el lado que tiene la acrilamida quede cara arriba.
- Añadir a la pipeta la solución de equilibrado con DTT, cerrar el extremo abierto con Parafilm® e incubar durante 15 min en agitación suave.
- Descartar la solución de equilibrado con DTT y reemplazarla con la que contiene Iodoacetamida, cerrar el extremo abierto con Parafilm® e incubar durante 15 min en agitación suave.

Materiales y Métodos

- Retirar la tira y proceder inmediatamente con la segunda dimensión para evitar la difusión de las proteínas o alternativamente congelar a -80°C .

Soluciones

Solución de Equilibrado

Concentraciones finales:

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	50 mM
Urea	6 M
Glicerol 99%	30% (v/v)
SDS	2% (p/v)
Azul de Bromofenol	granos

Pesar 144.14 g de urea y 8 g de SDS, disolverlos en un vaso de precipitados de plástico con 13.4 mL de Tris-HCL, 120 mL de glicerol y ajustar el volumen a 400 mL con agua Milli-Q. Añadir pocos granos de azul de bromofenol, mezclar. Hacer alícuotas de 10 mL y congelar a -20°C .

3.6.4.5. Segunda dimensión

La segunda dimensión se hizo en el sistema Ettan DALTsix con geles de acrilamida al 12.5% con unas medidas de 25.5 X 20.5 cm, compatibles con las tiras de isoelectroenfoque de 24cm.

Preparación de geles de acrilamida 2DE

Procedimiento:

- Limpiar con etanol los cristales y separadores, secarlos y montarlos como muestra la figura 3.6.

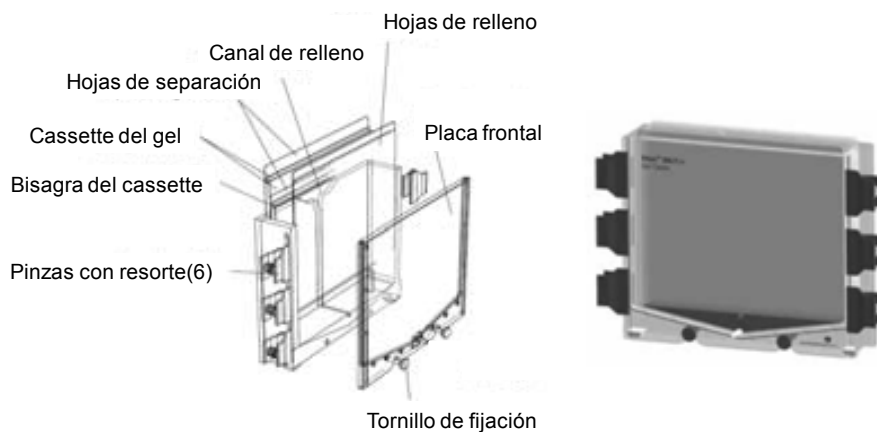


Figura 3.6. Esquema equipamiento para geles 2DE. Tomado de [218].

- Preparar las soluciones de acrilamida/bisacrilamida, SDS, TEMED, Persulfato y TRIS-HCl, mezclar e introducir en el montaje.
- Añadir 2 mL de isopropanol o n-butanol en la parte superior de cada gel para asegurar un frente recto y dejar polimerizar.
- Eliminar el isopropanol o n-butanol, desmontar y lavar con agua destilada.
- Usar inmediatamente o envolver los geles en papel film con tampón de electroforesis 1X y almacenar a 4°C.

Soluciones

Solución de Acrilamida al 12.5% para 6 geles

Concentraciones finales

Solución Acrilamida/Bisacrilamida (Sigma)	30.8% (p/v)
Tris HCl 1.5 M, pH 8.8	0.37 M
SDS (Sigma)	10%
Persulfato de amonio (Sigma)	10%
TEMED	10%

Pesar 56.4 g de Acrilamida y 1.5 g de Bisacrilamida, disolver en agitación con agua Milli-Q y ajustar a 188 mL. Esta solución debe prepararse en cabina de extracción dado la toxicidad de la acrilamida. Mezclar la solución de acrilamida/bisacrilamida con 4.5 mL de SDS (0.45 g en 4.5 mL de agua), 113 mL de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (recién preparado), 4.5 mL de Persulfato de amonio (0.45 g en 4.5 mL de agua Milli-Q) y 0.62 mL de TEMED (62 μ L temed+558 μ L de agua Milli-Q).

Montaje de la tira de Isoelectroenfoque en el gel

- Retirar el exceso de la segunda solución de equilibrado, aclarando con tampón de electroforesis 1X.
- Introducir la tira de isoelectroenfoque entre los cristales del gel como se muestra en la figura 3.7.

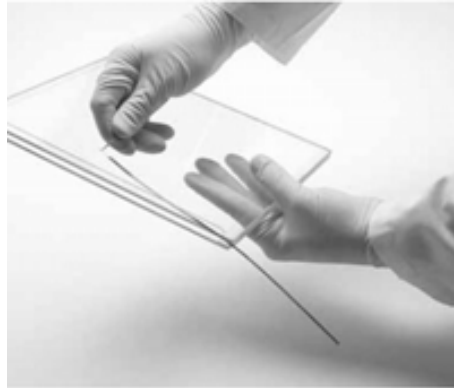


Figura 3.7. Esquema posicionamiento de la tira en el gel. Tomado de [218].

- Después de colocar la tira entre los cristales, con la ayuda de una regla como muestra la figura 3.8A, empujar suavemente la tira de modo que ésta quede en contacto “íntimo” con el gel, teniendo la precaución de no dejar burbujas entre la tira de isoelectroenfoco y el gel, así como evitar algún tipo de rotura o rasgadura de la tira.

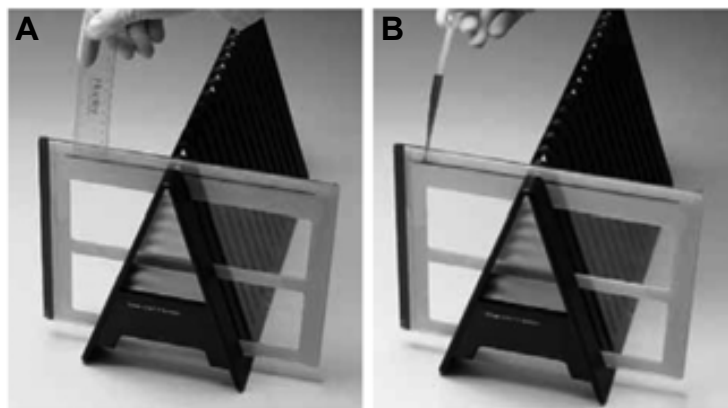


Figura 3.8. A) Esquema posicionamiento de la tira en el gel. B) Sellado de las tiras con solución de agarosa. Tomado de [217].

- Recortar una tira pequeña de papel Whatman e impregnar un extremo con 5 μ L de marcador BenchMark™ (Invitrogen), dejar secar y poner 15 μ L de solución de sellado, secar y colocar esta tira en el extremo de derecho de la tira (cátodo).
- Colocar el gel en posición vertical sobre un soporte y añadir la solución de sellado previamente fundida (evitando que esté muy caliente) como muestra la figura 3.8B.
- Llenar el tanque de la cámara de electroforesis con 5 L de tampón de electroforesis 1X e introducir los geles que previamente se han colocado en el ánodo.
- Colocar el cátodo y llenarlo con 1200 mL de tampón de electroforesis 3X.

- Con ayuda de un embudo preferiblemente, equilibrar los tampones como indica la figura 3.9 con el fin de establecer un balance hidrostático.

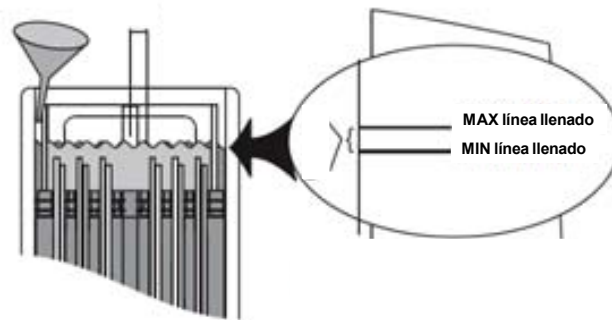


Figura 3.9. Esquema del llenado del tanque. Tomado de [218].

- Cerrar el equipo y aplicar corriente eléctrica tal y como indica la siguiente tabla:

Paso	Intensidad (mA/Gel)	Voltaje (V)	Potencia (W/Gel)	Tiempo (h)
1	10	80	1	1
2	40	500	13	4-6

El primer paso se hace a poca potencia con el fin de permitir una buena transferencia entre la primera y la segunda dimensión, aproximadamente durante 1 hora; posteriormente se continúa con el segundo paso. Los geles se detuvieron 40 min después de que el frente azul salió por el extremo inferior de los geles e inmediatamente se procedió a desmontarlos para fijarlos siendo éste el primer paso de la tinción con plata.

Soluciones

Solución de sellado

Agarosa	0.125 g
Tampón electroforesis 1X	25 mL
Azul de bromofenol	granos

Fundir la agarosa en el tampón de electroforesis y añadir el azul de bromofenol, mezclar y alicuotar. Guardar a temperatura ambiente.

3.6.4.6. Tinción con plata

La tinción con plata es uno de los métodos de tinción más sensibles y económicos de los que se dispone actualmente. Esta tinción implica varios pasos en los que se usan una serie de reactivos que deben ser de alta calidad. Cuando un gel

de poliacrilamida es bañado en una solución que contiene iones de plata (Ag^+) y es revelado por el tratamiento con un reductor, éste promueve la reducción de los iones de plata a plata metálica (Ag^0) la cual es insoluble y visible. Uno de los inconvenientes de esta tinción es la modificación química de las proteínas lo que imposibilita la implementación de técnicas como la espectrometría de masas para su identificación; por lo anterior el protocolo de tinción debe ser modificado para que éste sea compatible con espectrometría de masas [217, 219, 220].

Procedimiento:

PASO	SOLUCIONES	VOLUMEN	TIEMPO
FIJACIÓN*	Etanol Absoluto Acido acético glacial Agua destilada	400 mL 100 mL Hasta 1 L	30 min
SENSIBILIZACIÓN	Etanol Absoluto Tiosulfato de sodio Acetato de sodio Agua destilada	300 mL 2 g 68 g Hasta 1 L	30 min
LAVADO	Agua destilada	1 L	3 X 5 min
REACCIÓN CON PLATA	Nitrato de Plata Agua destilada	2.5 g Hasta 1 L	20 min
LAVADO	Agua destilada	1 L	2 X 1 min
REVELADO	Carbonato de sodio Formaldehido 37%** Agua destilada	50 g 800 μL Hasta 2 L	4min
PARADA	EDTA- Na_2 Agua destilada	14.6 g Hasta 1L	10 min
LAVADO	Agua destilada	1 L	3 X 5 min
PRESERVACIÓN	Glicerol (87%) Agua destilada	100 mL Hasta 1 L	30 min

*El paso de fijación se puede prolongar hasta tres días.

**Debe añadirse justo antes de utilizar la solución y el tiempo de revelado podrá variar y se parará en el momento en el que se alcance el contraste deseado.

- Posterior a la tinción con plata, los geles fueron escaneados para posterior análisis.

3.6.4.7. Análisis de Imágenes

El análisis de imágenes se realizó en colaboración con el grupo de Biología Computacional i Proteómica de la UAB, con el programa *Samespot* de Nonlinear

Dynamics; una vez hecho, se seleccionaron los *spots* diferenciales para ser analizados mediante espectrometría de masas.

3.6.4.8. Extracción de *spots*

Una vez seleccionados los *spots*, éstos deben extraerse del gel y para ello se usan puntas de una pipeta recortadas a un diámetro similar al de los *spots*. En este paso es sumamente importante el uso de guantes y bata para, así como trabajar en cabina de flujo laminar con el fin de evitar contaminación con queratinas. Posteriormente se procede a desteñir los *spots*.

3.6.4.9. Desteñido de *spots*

Procedimiento:

- Añadir 200 μL de solución de desteñido a cada tubo *ependorf* que contiene el *spot*.
- Proteger de la luz ya que la solución de desteñido es fotosensible e incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
- Descartar la solución de desteñido y añadir 200 μL de agua Chromasolv® grado HPLC (Sigma) e incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
- Repetir el paso anterior hasta que el *spot* quede completamente transparente.

Soluciones

Solución de desteñido

A. Ferricianuro de potasio	30 mM
B. Tiosulfato de sodio	100 mM

Pesar 0.0998 g de ferricianuro de potasio y disolverlos en 10 mL de agua Chromasolv® grado HPLC (Sigma), mezclar y proteger de la luz. Pesar 0.2482 g de tiosulfato de sodio y disolverlos en 10 mL de agua Chromasolv® grado HPLC (Sigma). Mezclar la solución de ferricianuro de potasio (A) con la de tiosulfato de sodio (B) en una proporción de 1:1. Esta solución debe prepararse antes de usar.

3.6.4.10. Digestión enzimática

La digestión enzimática es un paso esencial para la identificación de proteínas mediante la técnica conocida como huella peptídica; para ello se utilizan enzimas que generan péptidos que posteriormente son identificados en el MALDI. En este trabajo la digestión se realizó con tripsina. Esta enzima proteolítica, corta en las posiciones del

carboxilo de residuos Arginina (Arg, R) o Lisina (Lys, K) en la cadena siempre y cuando no haya una Prolina (Pro, P) en el extremo N-terminal de la proteína. La tripsina genera el mismo patrón de péptidos de una proteína, este patrón se conoce como huella peptídica o PMF (*Peptide mass fingerprint*). Para la digestión enzimática se usó el equipo DigestPro MSi (Intavis) siguiendo las especificaciones del fabricante.

3.6.4.11. Purificación de la muestra

Una vez finalizada la digestión, se debe purificar la muestra con el fin de eliminar contaminantes que se pueden incorporar en el proceso de digestión; para ello se usaron los ZipTip® Pipette Tips (Millipore) que son puntas de pipeta con una resina de fase reversa C18 en donde los péptidos quedan capturados y después de unos lavados son eluidos en un volumen deseado.

Procedimiento:

- Pipetear 4 veces con 15 μ L ACN al 100%
- Pipetear 4-6 veces con 15 μ L TFA al 0.2%
- Pipetear 4-6 veces con 15 μ L de muestra
- Pipetear 4-6 veces con 15 μ L TFA al 0.2%
- Pipetear 5 μ L de ACN 50%+TFA 0.1%
- Tomar 1 μ L de matriz HCCA y 1 μ L de muestra, mezclar y poner en la placa GroundSteel (Bruker Daltonics) del MALDI-TOF.

Soluciones

Matriz

Preparar una disolución saturada de HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) pesando 5 mg de HCCA (Bruker Daltonics) y disolverlos en 333.3 μ L de ACN 100% grado HPLC (Sigma)+566.6 μ L de agua Chromasolv® grado HPLC (Sigma)+100 μ L TFA 1% (Sigma). Mezclar con vórtex e incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Es recomendable preparar la matriz con frecuencia y utilizar el mismo tubo *ependorf*.

3.6.5. Espectrometría de masas

Para la identificación de las proteínas por huella peptídica se empleó la espectrometría masas tiempo de vuelo, ionización/ desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF), la cual permite conocer con exactitud las masas moleculares de los péptidos generados mediante la digestión con una enzima proteolítica, que

posteriormente son comparadas con una base de datos. La proteína puede ser identificada correctamente si hay un número suficiente de coincidencias con la base de datos produciendo un alto *score*, de esta forma se evita falsos positivos [221]. Esta parte del trabajo fue realizada en colaboración con el grupo de Biología Comptacional i Proteòmica de la UAB, utilizando un equipo Ultraflex eXtreme™ (Bruker Daltonics).

Descripción del sistema

La espectrometría de masas láser de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI-TOF) permite conocer exactamente la distribución de las masas moleculares de una muestra. Con esta tecnología se detectan y caracterizan biomoléculas como proteínas péptidos y oligosacáridos de masas entre 400 y 350.000 Da. Es un método muy sensible que permite detectar pequeñas cantidades de muestra (10^{-15} a 10^{-18} mols) con una precisión de 0.1-0.01%. La identificación de proteínas mediante esta técnica tiene la ventaja que utiliza tiempos de análisis muy cortos (pocos minutos) y un consumo mínimo de muestra (menos de 1pmol), además de proporcionar información de microheterogeneidades (ej. Glicosilaciones) y la presencia de productos secundarios. La precisión en la determinación de la masa molecular mediante este espectrómetro de masas es suficiente como para caracterizar proteínas después de su digestión trípica siempre y cuando el genoma del cual proviene la muestra esté completamente secuenciado y depositado en las bases de datos.

Para poder analizar la muestra en el MALDI-TOF, ésta debe mezclarse con un compuesto que sea capaz de absorber la luz UV, a este compuesto se le conoce como matriz; la matriz adecuada para el análisis de péptidos es la HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico). Una vez están la muestra y la matriz mezcladas, se deposita la mezcla sobre una placa GroundSteel (Fig. 3.10) y se deja secar quedando la matriz y la muestra en forma de cristales. Estas placas se caracterizan por que en cada posición de la placa hay una superficie hidrofílica rodeada de una zona hidrofóbica, lo que permite que la muestra se concentre en una superficie muy pequeña que puede variar de 200 a 800 μm .



Figura 3.10. Imagen de la Placa del MALDI-TOF. Tomado de [222].

La placa es introducida en la cámara de ionización del MALDI que dispone de una bomba de vacío para poder extraer todo el aire de la cámara. Una vez dentro de la cámara, al hacer incidir en la muestra un haz de luz láser (330-360 nm) con pulsaciones de nanosegundos, la matriz absorbe la energía a la que la exponemos y esta energía es transferida al analito. De esta manera, la matriz ioniza la muestra y los péptidos ionizados quedan dispersos en el vacío de la cámara (desorción/ionización) tal y como se muestra en la figura 3.11.

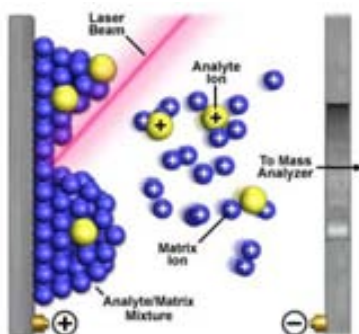


Figura 3.11. Esquema de la ionización de las partículas en el MALDI. Tomado de [223].

La cámara donde se coloca la placa con las muestras se encuentra entre dos electrodos, un cátodo y un ánodo. Al estar la muestra ionizada con cationes, la muestra migrará hacia el ánodo. El detector se encuentra por detrás del ánodo. La resolución de estos equipos depende en gran medida de la longitud del tubo de vuelo. Una forma elegante de alargar el recorrido de los iones sin incrementar la longitud del tubo es colocar un detector, conocido como detector reflector, a mitad de recorrido del tubo de vuelo. Utilizando este detector los iones rebotan en el detector lineal y son detectados por el detector reflector (Fig. 3.12).

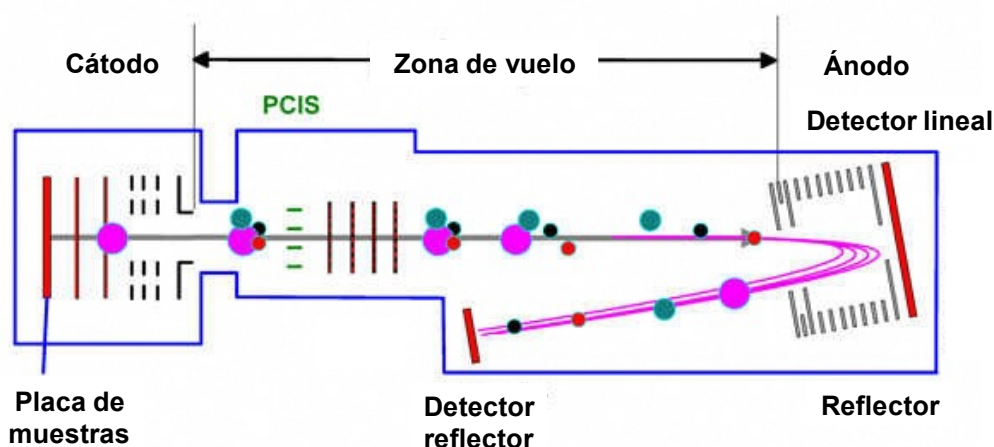


Figura 3.12. Esquema del espectrómetro de masas MALDI-TOF. Tomado de [224].

En la mayoría de los casos sólo hay una carga positiva en cada péptido, por lo que si se aplica la misma fuerza eléctrica sobre cada molécula cuando está presente en un campo eléctrico de dos electrodos y siguiendo la ley de Newton:

$$\text{Fuerza (F)} = \text{masa (m)} \times \text{aceleración (a)}; a = F/m$$

Para una fuerza concreta, cuanto más grande es la masa, más pequeña es la aceleración. Es decir, los péptidos de mayor tamaño colisionaran más tarde en el detector que aquellos péptidos cuyas masas sean menores. Todos los péptidos que colisionan en el detector a la vez (misma masa) generan un pico y su magnitud es proporcional al número de péptidos que colisionan a la vez.

Para la identificación de proteínas mediante la técnica de la huella peptídica es necesario que la calibración del espectrómetro sea lo más precisa posible. Con tal objetivo, las muestras se prepararon alternando una muestra con un marcador de masa molecular (Bruker Daltonics) compuesto de:

Péptido	Masa molecular (Da)
Angiotensina II	1046.5418
Angiotensina I	1296.6848
Sustancia P	1347.7354
Bombesina	1619.8223
ACTH_clip(18-39)	2465.1983
Somatostatina(28)	3147.4710

Para el análisis de los péptidos se utilizaron los siguientes programas de Bruker Daltonics:

- FlexControl: permite controlar el MALDI-TOF. Los espectros fueron obtenidos en el modo de iones positivos en el espectrómetro de masas.
- FlexAnalysis: permite el procesado de los espectros obtenidos por el FlexControl. El método utilizado para la detección de los picos fue PMF.FAMS.
- Biotools: permite la búsqueda en bases de datos. Utiliza como motor de búsqueda el Mascot (MatrixScience). Los parámetros de búsqueda en la base de datos fueron:
 - Tolerancia: 50 ppm de error.
 - Tolerancia de la digestión de la tripsina: 1 fallo.
 - Modificaciones: oxidación de las metioninas.

Materiales y Métodos

- Mínimo de 4 coincidencias en las masas de los péptidos.
- Ninguna restricción en el taxón.

Según estos parámetros de búsqueda, la puntuación de la proteína es $-10 \cdot \log(P)$, donde P es la probabilidad que un acierto observado sea un evento aleatorio.

En la espectrometría de masas, se recomienda utilizar sólo fungibles de material que no se disuelva en presencia de disolventes orgánicos de lo contrario, sólo se observan polímeros de plástico en el espectro del MALDI como se muestra en la figura 3.13. En este trabajo se utilizó un fungible especial, tanto tubos como puntas de pipeta, comercializado por Eppendorf.

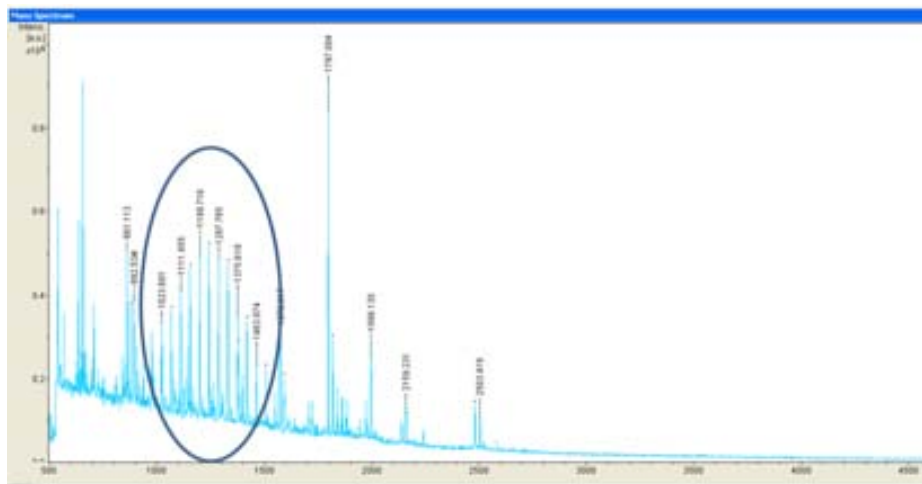


Figura 3.13. Imagen de un espectro con presencia de polímeros.

3.6.6. Electroforesis en Gel Diferencial 2-D (2D-DIGE)

El 2-D DIGE es un método que permite el análisis preciso de las diferencias en abundancia de las proteínas entre dos muestras. Este método se basa en el marcaje con tres fluoróforos (CyDye): Cy2, Cy3 y Cy5, que reaccionan con el grupo ϵ -amina de la lisina. Los fluoróforos llevan una carga positiva que reemplaza la carga positiva del grupo amino por lo que el punto isoeléctrico de la proteína se conserva, adicionalmente tienen el mismo peso molecular por lo que las proteínas marcadas con cada fluoróforo migrarán en la misma posición en el gel 2DE; por otro lado, los fluoróforos son compatibles con la tinción con plata u otros métodos de tinción.

La posibilidad de separar más de una muestra en un único gel permite la inclusión de dos muestras y un control interno el cual es preparado mezclando cantidades iguales de cada muestra a evaluar y cargarlo en el gel junto con la muestra problema,

eliminando de esta forma diferencias en la movilidad electroforética debido a pequeñas variaciones entre geles. Ver figura 3.14.

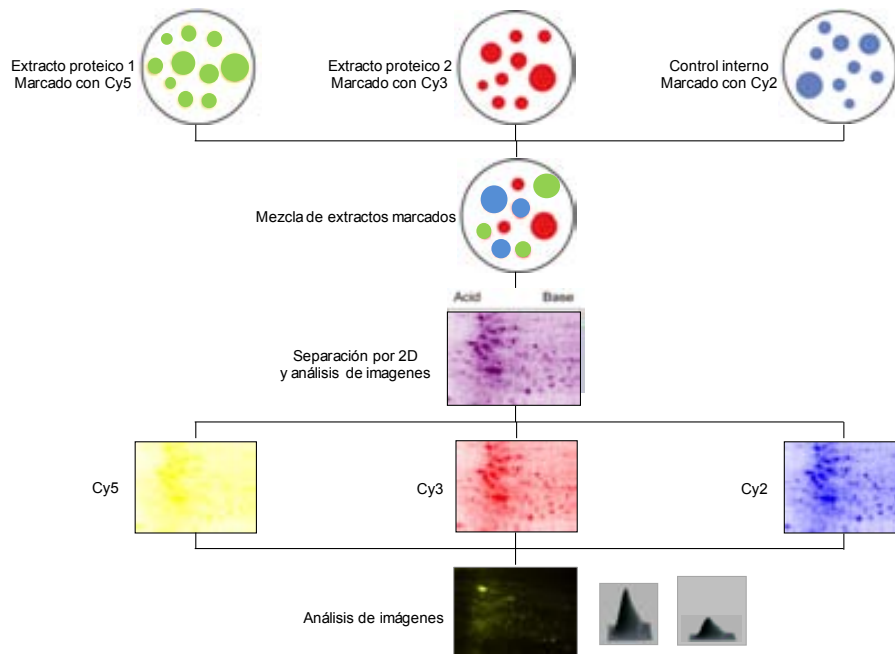


Figura 3.14. Esquema del proceso de 2D-DIGE. Modificado de [217].

3.6.6.1. Preparación de la Muestra para 2D-DIGE

Procedimiento:

- Obtener el extracto proteico como ha sido descrito en el apartado 3.6.4.1, realizando los tratamientos deseados a los cultivos.
- Cuantificar las muestras como ha sido descrito en el apartado 3.6.4.2.
- Para un gel se limpia aproximadamente 90 μg de cada muestra como ha sido descrito en el apartado 3.6.4.3 en alícuotas de 30 μg , dejando preferiblemente todo un fin de semana en *wash buffer* y cambiándola el primer día de la semana, mezclar con vórtex durante todo el día y continuar con el protocolo. Por cada gel, se necesitarán 50 μg de proteína de cada muestra (tratada y no tratada) y 50 μg de proteína para el control interno mezclando 25 μg de cada muestra (tratada y no tratada).
- Una vez resuspendidas las muestras en la solución de lisis descrita en el apartado 3.6.1, se ajusta el pH a 8.5.

3.6.6.2. Reconstitución de los fluoróforos

Los fluoróforos utilizados fueron CyDye™ minimal labelling DIGE de GE Healthcare.

Procedimiento:

- Atemperar los viales de los fluoróforos (Cy3, Cy5 y Cy2) durante 5 min protegiéndolos de la luz.
- Añadir 5 μL de dimetilformamida (DMF) anhidra al 99.8% (Sigma) a cada fluoróforo; la DMF preferiblemente nueva ya que ésta se degrada rápidamente.
- Mezclar con vórtex por 30 s.
- Centrifugar durante 30 s a 12000 g.
- Preparar la solución de trabajo a 400 pmol/ μL diluyendo 1 volumen de la solución stock en 1.5 volúmenes de DMF (5 μL fluoróforo+7.5 μL DMF).

3.6.6.3. Marcaje de las muestras

Procedimiento:

- En un tubo *ependorf*, añadir un volumen equivalente a 50 μg de proteína y 1 μL de fluoróforo a 400 pmol/ μL ; mezclar y dar un pulso de microcentrífuga e incubar en hielo durante 30 minutos protegiendo de la luz.
- Añadir 1 μL de lisina a 10 mmol/L para parar la reacción, mezclar y dar un pulso de microcentrífuga e incubar durante 10 min en hielo protegiendo de la luz.

3.6.6.4. Preparación de las muestras para la primera dimensión (IEF)

Procedimiento:

- Combinar las muestras marcadas y el control interno de acuerdo a la figura 3.15.
- Añadir buffer de lisis hasta un volumen final de 100 μL con los IPGs adecuados al rango de pH que se va a utilizar en la primera dimensión.

A partir de este punto, se corrió la primera y segunda dimensión como se ha descrito en los apartados 3.6.4.4 y 3.6.4.5, protegiendo en todo momento de la luz. Posteriormente, las imágenes fluorescentes de los geles fueron obtenidas en un scanner Typhoon 9400 de GE Healthcare, en el servicio de Proteómica del Hospital Vall d'Hebron. Las imágenes del Cy2, Cy3 y Cy5 fueron escaneadas a unas longitudes de onda de excitación/emisión de 488/520 nm, 532/580 nm y 633/670 nm respectivamente. El análisis de las imágenes, así como el análisis estadístico de las mismas, se llevo a cabo como se describió en el apartado 3.6.4.7 y la identificación de

los *spots* como se describió en los apartados 3.6.4.8, 3.6.4.9, 3.6.4.10, 3.6.4.11, 3.6.5. Se recomienda hacer los geles con una réplica de cada.

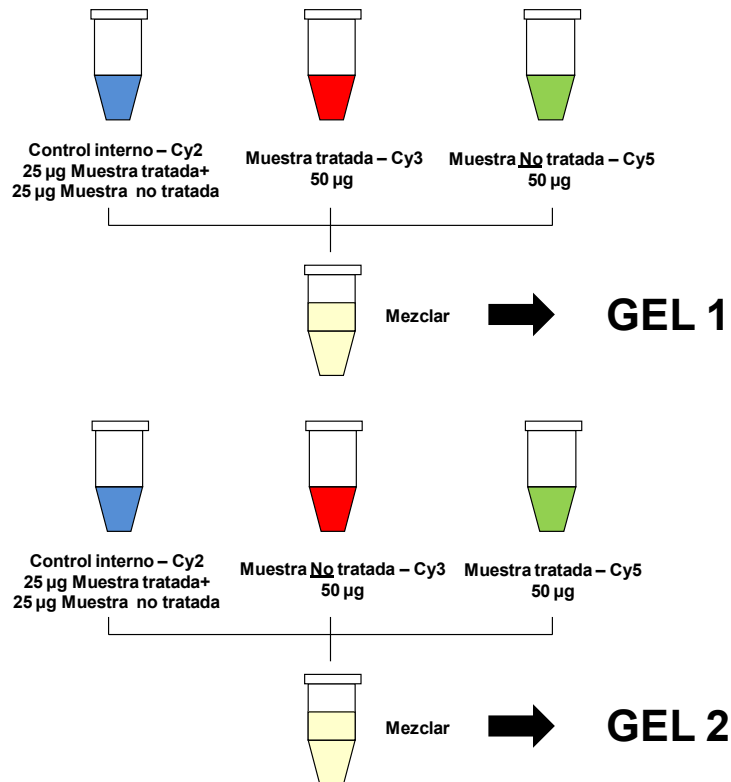


Figura 3.15. Esquema del diseño experimental de 2D-DIGE.

3.7. Análisis de la expresión génica

3.7.1. RT-PCR

La PCR con transcripción inversa (RT-PCR, *Reverse Transcription-PCR*) se ha convertido en una de las técnicas más ampliamente usadas en investigación. La facilidad con la cual esta técnica permite que el RNA sea detectado y cuantificado ha sido su mayor ventaja. Este método permite identificar mutaciones y polimorfismos en secuencias transcritas, también como medir los niveles de expresión génica. El primer paso implica la conversión de RNA a DNA complementario (cDNA) mediante el uso de cebadores que pueden ser específicos e hibridar en un gen determinado o pueden no serlo y unirse a todos los mRNAs. La elección del tipo de cebador a utilizar dependerá del tipo de diseño experimental. En este trabajo esta técnica se usó como control de calidad del RNA que posteriormente se usó en la PCR en tiempo real.

Para la síntesis del cDNA se utilizó la AMV *Reverse Transcriptase* (AMV-RT) de Promega. El producto de esta reacción se utilizó posteriormente como DNA molde

Materiales y Métodos

para la amplificación por PCR con la *AmpliTaq Gold*[®] DNA polimerasa (Applied Biosystems) como se ha descrito en el apartado 3.4.7.1.

Procedimiento:

Para una reacción de un volumen final 20 μ L

- Irradiar previamente con luz ultravioleta el material a utilizar (micropipetas, puntas, tubos *ependorf*, etc.) en el lugar donde se realiza la mezcla de reacción.
- Mantener todas las soluciones en hielo junto con las mezclas.
- Mezclar en un tubo *ependorf*: 1 μ g de RNA, 4 μ L de tampón de reacción 5X de la AMV-RT (Promega), 2 μ L de dNTPs 20 mM (Roche), 1 μ L del oligonucleótido reverso, y agua RNase-free (Qiagen) hasta completar un volumen de 19 μ L.
- Incubar las muestras en el termociclador a 65°C durante 10 min para desnaturalizar el RNA.
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la hibridación del cebador.
- Añadir a todos los tubos (excepto al control negativo de la RT): 0.1 μ L de inhibidor de RNasa 40 U/ μ L (Roche) y 1.0 μ L de AMV-RT 10 U/ μ L (Promega).
- Mantener en el termociclador durante 1 h a 42°C para que se produzca la síntesis de cDNA, y 5 min a 95°C para inactivar la AMV-RT.
- Usar 2 μ L de la reacción anterior como DNA molde para una PCR usando el mismo oligonucleótido reverso que en la RT y un oligonucleótido directo. En el control negativo de la RT no debe haber amplificación, puesto que al no añadirle AMV-RT no se sintetiza cDNA; si se detecta amplificación significa que el RNA está contaminado con DNA. Debe hacerse un control negativo de RT por cada muestra de RNA.

3.7.2. PCR en Tiempo Real (*Real time-PCR*)

En la PCR tradicional, secuencias específicas de DNA o cDNA pueden ser copiadas o amplificadas miles a millones de veces y su detección se realiza a punto final después del último ciclo de PCR por electroforesis en gel. En la PCR en tiempo real, la cantidad de producto de PCR se mide en cada ciclo. La posibilidad de monitorear la reacción durante su fase exponencial hace posible que se pueda cuantificar la cantidad inicial del transcrito con gran precisión comparándolo con un

control conocido. Esta técnica implementa el uso de marcadores fluorescentes que emiten fluorescencia a medida que avanza la PCR. El incremento en la señal de fluorescencia es directamente proporcional al número de amplicones generados en la fase exponencial de la reacción.

Los sistemas para detección de fluorescencia incluyen agentes de unión a DNA de doble cadena como el SYBR Green en donde la intensidad de la fluorescencia aumenta en la medida en la que el fluoróforo se une al DNA, oligonucleótidos fluorescentes como Amplifluor que inicialmente tienen una configuración de horquilla en donde la fluorescencia está inhibida y que es permitida cuando se incorporan en la PCR y sondas como TaqMan que contienen un fluorocromo y un *quencher* que inactiva el fluorocromo e hibrida en la zona intermedia del DNA molde, entre el oligo directo y el reverso, de modo que durante la PCR la sonda es degradada por la Taq polimerasa liberando el reportero fluorescente generando una señal que incrementa en cada ciclo.

En este trabajo se utilizaron sondas TaqMan marcadas con FAM que fueron diseñadas por Applied Biosystems para los genes *Rv1687c* (oligo directo: 5'-GCAAGCCGCCGATGAG-3, oligo reverso: 5'-CCGGACAGGTTGGCACAA-3 y sonda: 5'-CCACCGCTTCGATCAC-3)' y *Rv3161c* (oligo directo: 5'-CGAATTCGCCGGCTATCG-3', oligo reverso: 5'-TCCAATTAGCTGCCACTCATG-3', y sonda: 5'-CTCGACCTGCACCATC-3'). Las muestras de RNA fueron enviadas al *Microbiology Group* del *Department of Medicine* en el *Imperial College London* en Londres. El cDNA se sintetizó usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems, junto con las sondas específicas para los genes *Rv1687c*, *Rv3161c* y *sigA* para generar las curvas estándar y realizar la PCR en tiempo real. La expresión del *sigA* se utilizó como control endógeno de las muestras para normalizar la expresión.

En primer lugar se realizó un experimento de validación para comprobar que la eficiencia de las sondas/oligos. de los genes de estudio y del control eran equivalentes. Para ello se hizo una PCR en tiempo real con las diferentes sondas usando diluciones seriadas de concentración conocida del RNA y se calculó la curva estándar a partir de los datos de ciclo umbral (C_T) y la concentración de la muestra. A continuación se realizó la PCR en tiempo real con las diferentes muestras de RNA y se calculó la expresión de los genes de interés utilizando el método del C_T comparativo o $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Se utilizaron tres extracciones de RNA independientes para cada cepa/condición y cada muestra de RNA se amplificó en cuadruplicado.

3.8. Métodos de caracterización fenotípica

3.8.1. CMI

El estudio de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos es de suma importancia ya que permite dirigir la terapéutica una vez la bacteria es identificada así como vigilar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia. Los métodos implementados pueden clasificarse en métodos cuantitativos y cualitativos. Los métodos cuantitativos son aquellos que permiten determinar la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB). La CMI es la concentración mínima a la que un antimicrobiano en un periodo de tiempo determinado es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de una bacteria. La determinación de la CMI puede hacerse por micro o macro dilución en cultivo líquido, dilución en agar o E-test. En el primer método se hacen diluciones seriadas del antimicrobiano que son incorporadas en el medio de cultivo; posteriormente se inocula con una cantidad fija del microorganismo y después de incubar se hace la lectura determinándose la CMI [75].

3.8.1.1. Ensayo en microplaca de la resazurina (REMA)

Este método implementa el uso de un indicador redox (resazurina) que cambia de color azul (estado oxidado) a rosa cuando está en un ambiente reductor como el generado durante el metabolismo celular. Esta propiedad ha sido utilizada para medir la viabilidad de *M. tuberculosis* tras la exposición a fármacos antituberculosos. Es un método simple, rápido y de bajo costo que no requiere de un equipamiento especial para su utilización ya que el cambio de color puede detectarse visualmente [225, 226].

En este trabajo se usó este método con el fin de establecer las CMIs de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* frente a los compuestos que se listan en la tabla 3.6:

Procedimiento:

Preparación del Inóculo

- Inocular una colonia de *M. tuberculosis* o *M. smegmatis* en 10 mL de medio Middlebrook 7H9+Tween+ADC e incubar a 37°C durante 2 o 3 semanas para *M. tuberculosis* y 3 días en el caso de *M. smegmatis*.
- Hacer una resiembra 1/100 en medio Middlebrook 7H9+Tween+ADC e incubar a 37°C hasta que el cultivo alcance una OD₆₀₀ de aproximadamente 1.

- Medir la OD₆₀₀ de los cultivos y diluir en 10 mL de 7H9+glicerol+ADC (ya que el Tween afecta la CMI) de modo que la OD₆₀₀ final sea de 0.01 para *M. tuberculosis* y 0.001 para *M. smegmatis*.

Tabla 3.6. Concentraciones de los antibióticos para los ensayos de CMIs.

Compuesto	Disolvente	Concentración stock mg/ml	Rangos ensayados (µg/mL)
Triclosán*	DMSO	34.74 (100X)	2.71-86.85
Isoniacida*	Agua	4 (1000X)	0.03125-1
Etambutol*	Agua	3.2 (100X)	0.25-8
Estreptomina**	Agua	0.4 (100X)	0.03125-1
Rifampicina*	Metanol	0.128 (1000X)	0.016-0.512
Clofazimina*	DMSO	1.92 (1000X)	0.015-0.48
Ethionamida*	DMSO	1.92 (250X)	0.06-1.92
Acido <i>p</i> -aminosalicílico*	Etanol	3.2 (100X)	0.025-0.8
D-cicloserina*	Agua	25.6 (100X)	2.0-64
Kanamicina**	Agua	3.2 (100X)	0.25-1
Tetraciclina*	Etanol 50%	1.6 (50X)	0.25-8
Eritromicina*	Etanol	40 (50X)	6.25-200
Cloranfenicol***	Etanol	8 (100X)	0.625-20
Gentamicina*	Agua	4.8 (100X)	0.375-12
Ofloxacina*	NaOH 0.1 N	0.8 (100X)	0.0625-2
Levofloxacina*	NaOH 0.1 N	0.8 (100X)	0.0625-2
Acriflavina*	Agua	1.6 (100X)	0.125-4
Reserpina*	DMSO	38.4 (100X)	3.0-96
<i>o</i> -vanadato*	Agua	28.8 (100X)	2.25-75
<i>m</i> -clorocarbonilcianuro fenilhidrazona*	DMSO	4 (100X)	0.31-10
Verapamil*	DMSO	128 (100X)	10-320
Tioridazine hidrocloreto*	Agua	16 (100X)	1.25-40
Amikacina**	Agua	1.6 (100X)	0.125-4
Bromuro de Etidio [†]	Agua	0.625 (39X)	0.125-4
Safranina ^{††}	Agua	1.6 (100X)	0.125-4
Bromuro de cetiltrimetilamonio*	Agua	20 (100X)	1.56-50

*Sigma, **Apollo Scientific, ***Roche, [†]Amresco, ^{††} Panreac.

Preparación del compuesto

- A partir de una solución stock del compuesto, diluir en 5 mL de 7H9-glicerol+ADC hasta una concentración 1X (equivalente a 4 veces respecto a la concentración máxima que se desee ensayar).

Montaje de la placa de 96 pocillos

Materiales y Métodos

- Añadir 200 μ L de agua Milli-Q estéril en los pocillos de las filas A y H y de las columnas 1 y 12 con el fin de mantener la humedad durante la incubación (Fig. 3.16).
- Añadir 100 μ L de 7H9+glicerol+ADC a el resto de pocillos (aproximadamente 6 mL/placa de medio en total).
- Añadir 100 μ L de la solución 1X del compuesto a ensayar en los pocillos B2 al B5 y B7 a B10. Hacer diluciones seriadas tomando un volumen de 100 μ L hasta la fila G descartando los últimos 100 μ L.
- Añadir 100 μ L del inóculo a los todos los pocillos excepto los B6 y B11 que servirán como controles de esterilidad. Los pocillos C6 al G6 y C11 al G11 serán los controles de crecimiento.
- Añadir 100 μ L de medio a los pocillos del control de esterilidad B6 y B11 de modo que todos los pocillos tendrán un volumen final de 200 μ L.
- Cerrar las placas y en el caso de *M. tuberculosis* sellarlas con Parafilm®, colocar las placas dentro de una bolsa de plástico y cerrarla.
- Incubar a 37°C durante 1 día en el caso de *M. smegmatis* y 7 días en el caso de *M. tuberculosis*.

Revelado

- Añadir 30 μ L de resazurina (Sigma) al 0.01% (recién preparada a partir de un stock al 0.1%) a los pocillos control de crecimiento C6 y C11. Incubar durante 3-4 horas para *M. smegmatis* y 24 h para *M. tuberculosis*. Si el indicador vira a rosa, revelar toda la placa e incubar durante 3 o 24 h más; en caso de que no vire revelar los pocillos control de crecimiento D6 y D11 incubar nuevamente y proceder como se mencionó anteriormente. Es importante realizar la lectura al cabo de 3 o 24 h ya que si se incuba por más tiempo se pueden tener resultado erróneos. Se considera positivo si el indicador vira a un rosa similar al del pocillo control de crecimiento. Un color lila se considera negativo. La CMI es la menor concentración del compuesto más baja a la que no hay crecimiento (permanece azul o lila).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B						CE					CE	
C						CC1					CC1	
D						CC2					CC2	
E						CC3					CC3	
F						CC4					CC4	
G						CC5					CC5	
H												


 Pocillos con agua CC: Control de crecimiento
 CE: Control de esterilidad

Figura 3.16. Diseño de la placa para el ensayo REMA.

Soluciones

Resazurina 0.1%

Pesar 0.01 g y disolverlos en 10 mL de agua Milli-Q, mezclar y esterilizar mediante filtración con filtros de 0.22 μm de diámetro de poro. Hacer alícuotas y congelar a -20°C . La solución de trabajo 0.01% es estable durante una semana a 4°C .

3.8.2. Ensayo de permeabilidad

La estructura de la envuelta de las micobacterias hace que tenga una fluidez muy baja y que por tanto la penetración de fármacos sea difícil. Sin embargo la permeabilidad puede potenciarse usando inhibidores específicos que interfieran en la biosíntesis de los componentes de la pared celular. El etambutol es un compuesto sintético que se usa en el tratamiento de primera línea contra la tuberculosis; éste afecta la síntesis de arabinogalactano generando una desorganización de la pared celular así como la pérdida de su integridad y cambios en la composición de lípidos libres lo que conlleva a incrementar la permeabilidad de la pared [227]. El etambutol se ha usado a concentraciones sub-inhedoras con el fin de permeabilizar la pared de micobacterias y revertir la resistencia natural a diversos compuestos [228-231]. En este trabajo se usó con el fin de permeabilizar la pared de *M. tuberculosis* y estudiar el efecto del TRC.

Procedimiento:

Materiales y Métodos

- Inocular una colonia de *M. tuberculosis* en 10 mL de medio Middlebrook 7H9-Tween+ADC e incubar a 37°C durante 2 o 3 semanas.
- Hacer una resiembra 1/100 en medio Middlebrook 7H9+Tween+ADC e incubar a 37°C hasta que el cultivo alcance una OD₆₀₀ de aproximadamente 1.
- Medir la OD₆₀₀ de los cultivos y diluir en 10 mL de 7H9+glicerol+ADC de modo que la OD₆₀₀ final sea de 0.01.
- Añadir etambutol a una concentración final de 0.3 µg/mL y TRC a diferentes concentraciones. Así mismo, hacer el seguimiento de la OD₆₀₀ a cultivos sólo con etambutol, sólo con TRC y sin etambutol y TRC.
- Incubar a 37°C y medir la OD₆₀₀ cada 24 horas durante 12 días.

3.9. Métodos de manipulación de cultivos celulares

3.9.1. Mantenimiento y manipulación de líneas celulares

El mantenimiento y la manipulación de las líneas celulares que se han utilizado en este trabajo se realizó en el Servei de Cultius Cel·lulars, Producció d'Anticossos i Citometria (SCAC) del Institut de Biotecnologia i de Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

La línea celular utilizada en este trabajo fue la J774 A.1, que son macrófagos murinos derivados de médula ósea. Esta línea fue donada por Jesús García-Gil del laboratorio de Microbiología Molecular de la Universitat de Girona.

Los macrófagos fueron cultivados en medio D-MEM (4.5 g/L glucosa, 580 mg/L L-glutamina, 110 mg/L piruvato, 15 mg/L rojo fenol) (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) de GIBCO, en una atmósfera controlada a 37°C con un 5% de CO₂.

3.9.1.1. Congelación de las células

Procedimiento:

- Descongelar el FBS a 37°C.
- Mezclar 9 mL con 1 mL de DMSO estéril (DMSO al 10%) y ponerlo a 4°C (en un tubo de 15 mL en hielo).
- Hacer un recuento de células tomando una alícuota de la suspensión celular (10 µL) y mezclandola con la solución de azul de tripán (10 µL), posteriormente sembrar 10 µL de la mezcla en la cámara de Neubauer y contar las células viables (que serán brillantes, refringentes y no coloreadas) de los 4 cuadrantes

externos de la cámara. Hacer el promedio de células contadas y aplicar la fórmula:

$\text{células/mL} = \text{promedio de células contadas} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$.

- Resuspender las células a una concentración de $6-10 \times 10^6$ células/mL.
- Poner 500 μL de las células en un criotubo y añadir 500 μL de medio de congelación. La concentración final de DMSO será del 5%.
- Congelar el criotubo 1 h a -20°C , 24 h a -80°C y finalmente en nitrógeno líquido.

3.9.1.2. Descongelación de las células

Procedimiento:

- Atemperar el medio de cultivo a 37°C .
- Poner el criotubo en un baño de agua a 37°C durante 1 min.
- Resuspender en 5 mL de medio a 37°C y mezclarlo con 5 mL de medio en un tubo.
- Centrifugar durante 5 min a 1400 rpm y descartar el sobrenadante.
- Resuspender en un volumen de medio a 37°C según la cantidad de células.
- Poner las células en un frasco de cultivo e Incubar.

El DMSO es tóxico a 37°C por lo tanto se debe trabajar lo más rápido posible.

3.10. Análisis de la virulencia de *M. tuberculosis* en macrófagos

3.10.1. Preparación de stocks de cultivos de para la infección

Procedimiento:

- Descongelar las cepas originales que se quieran ensayar y crecerlas en 10 mL de medio Middlebrook 7H9+Tween+ADC e incubar a 37°C durante 2 o 3 semanas para *M. tuberculosis*.
- Hacer una resiembra 1/100 en medio Middlebrook 7H9+Tween+ADC e incubar a 37°C hasta que el cultivo alcance una OD_{600} de aproximadamente 1.
- En un criotubo mezclar 500 μL de cultivo y 500 μL de glicerol al 20% y congelar a -20°C .

3.10.2. Ensayo de infección

Cultivos de *M. tuberculosis*:

Materiales y Métodos

- Descongelar un stock del cultivo y crecerlo en 10 mL de medio Middlebrook 7H9+Tween+ADC e incubar a 37°C durante 2 o 3 semanas.
- Hacer una resiembra 1/100 en medio Middlebrook 7H9+Tween+ADC e incubar a 37°C hasta que el cultivo alcance una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.6-0.8.

Procedimiento:

Día 1

Infección

- Sembrar los macrófagos a última hora del día en una placa de 96 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/mL en 100 μ L de DMEM suplementado con FBS al 10% (GIBCO).
- Incubar toda la noche a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂.

Día 2

Preparación del inóculo

- Centrifugar el cultivo de *M. tuberculosis* OD₆₀₀ 0.6-0.8 durante 10 min a 3000 g.
- Hacer dos lavados con DPBS (GIBCO)+Tween 0.05%.
- Resuspender en DPBS (GIBCO), dejar el cultivo a temperatura ambiente durante 5 min con el fin de sedimentar agregados.
- Separar el “sobrenadante”, ponerlo en otro falcon y medir la OD₆₀₀.
- Diluir el cultivo en medio DMEM suplementado con FBS al 10% (GIBCO) de modo que se tenga la concentración adecuada para infectar las células a una MOI (multiplicidad de infección) deseada. Hacer recuento de viables de éste inóculo.

Infección

- Inspeccionar las monocapas bajo el microscopio.
- Aspirar el medio presente en los pocillos.
- Añadir un volumen (20-100 μ L) de la suspensión bacteriana a las monocapas; dejar un pocillo como control adicionando medio sin bacteria.
- Incubar a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ durante 4 horas.
- Hacer un lavado con 200 μ L de DPBS (GIBCO).

- Añadir 200 μL de DMEM con 200 $\mu\text{g/mL}$ de amikacina para eliminar las bacterias extracelulares en cada pocillo, Incubar durante 1 hora a 37°C con 5% de CO_2 .
- Hacer dos lavados con 200 μL de DPBS (GIBCO) para quitar la amikacina.
- En este punto o bien se lisan las monocapas de células para hacer el recuento de viables de bacterias intracelulares o bien se adicionan 200 μL de DMEM para continuar con la incubación durante los tiempos post infección que se desee determinar.
- Calcular el número de viables a diferentes tiempos post infección: día 1, día 2, día 3, día 4 y día 7 para. Se tratan las monocapas de células con 100 μL de agua Milli-Q estéril y se incuba durante 30 min a 37°C con 5% de CO_2 .
- Pipetear el lisado y sembrar viables mediante la técnica de la gota haciendo un banco de diluciones con DPBS (GIBCO)+Tween 0.05% en placas de 7H10 e incubar durante 3-4 semanas.

3.10.3. Ensayo de resistencia al peróxido de hidrógeno

Procedimiento:

- Preparar medio Middlebrook 7H9 como se ha descrito en el apartado 3.2.1.1 pero sin catalasa en el suplemento ADC (7H9-AD).
- Preparar medio 7H9+AD+ H_2O_2 100mM.
- Añadir 1000 μL 7H9-AD en las columnas 2 a 6 de una placa de 24 pocillos estéril (Fig. 3.17).
- Añadir 640 μL de 7H9+AD+ H_2O_2 100mM en la columna 1 y mezclarlo con 1360 μL de 7H9-AD, lo que dará un volumen final 2 mL y una concentración final de H_2O_2 de 32mM.
- Hacer diluciones seriadas, tomando un volumen de 1000 μL de la columna 1 hasta la columna 4 descartando los últimos 1000 μL . Las concentraciones de las columnas 1 a 4 serán: 32mM, 16 mM, 8 mM, 4 mM. La columna 5 será el control de crecimiento y la 6 el control de esterilidad.
- Añadir 10 μL de un cultivo de *M. tuberculosis* en fase logarítmica crecida en medio libre de catalasa, cerrar la placa, sellar con Parafilm®, colocar las placas dentro de una bolsa de plástico e incubar durante 90 min a 37°C .
- Sembrar viables en placas de 7H10 e incubar a 37°C durante 3-4 semanas.

	1	2	3	4	5	6
A	32 mM				CC	CE
B	16 mM				CC	CE
C	8 mM				CC	CE
D	4 mM				CC	CE

Figura 3.17. Diseño de la placa para el ensayo de resistencia a H₂O₂. CC: control de crecimiento, CE: control de esterilidad.

Soluciones

Medio Middlebrook 7H9+AD (sin catalasa) con H₂O₂

Añadir 0.56 mL de H₂O₂ al 30% (Panreac) a 49.4 mL de 7H9+AD; esto dará una concentración de 100mM.

Algunos de los métodos que se describieron en este apartado se basaron en trabajos previos desarrollados en el Institut de Biotecnologia y de Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona [232-234].

Resultados



4. Resultados

4.1. Estudio del efecto del triclosán sobre la expresión de los genes *Rv1687c* y *Rv3161c*

En primer lugar se procedió a comprobar los resultados reportados en la literatura respecto al efecto del TRC sobre la expresión del transportador ABC *Rv1686c-Rv1687c* y de la dioxigenasa *Rv3161c*. Para ello se evaluó el nivel de expresión de los genes *Rv1687c* y *Rv3161c* a partir de RNA total extraído de cultivos en fase logarítmica de H37Rv en presencia y ausencia de TRC a una concentración de 108.5 µg/mL (375 µM) equivalente a 5 veces su CMI (21.7 µg/mL, 75 µM). Al cultivo no tratado con TRC se le adicionó DMSO (99%) ya que éste fue usado para solubilizar el TRC. Los cultivos tratados y no tratados se incubaron durante 2 horas a 37°C y posteriormente se realizó la extracción del RNA. Este experimento se hizo por triplicado. La expresión génica se cuantificó mediante Real-Time PCR usando las sondas descritas en el apartado 3.7.2.

Los resultados mostraron que en presencia de TRC la expresión del gen *Rv1687c* del transportador ABC aumenta aproximadamente 1000 veces y la del gen *Rv3161c* más de 1300 veces en la cepa H37Rv (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Expresión de los genes *Rv1687c* y *Rv3161c* en respuesta al tratamiento con TRC en la cepa H37Rv respecto a la misma cepa no tratada.

Gen	H37Rv	
	EN	± DS
<i>Rv1687c</i>	1002.67	0.82
<i>Rv3161c</i>	1366.83	0.46

E.N: Expresión Normalizada respecto al gen *sigA*, **SD:** Desviación Estándar. Los valores son el resultado de la media de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

De esta forma, estos resultados confirmaron la inducción de estos genes en presencia del TRC, tal y como había sido reportado previamente por otros autores [129, 189].

4.2. Construcción de los mutantes *Rv1686c-Rv1687c* y *Rv3161c* en *M. tuberculosis*

Para la obtención de los mutantes se siguió el sistema de transducción especializada descrito en materiales y métodos (apartado 3.4.8).

4.2.1. Mutante del transportador ABC (Rv1686c-Rv1687c)

Para la construcción del AES se amplificó por PCR la región flanqueante 3' (corriente abajo) del gen *Rv1686c* con los oligonucleótidos MutUp1Bgl y MutLw1Hin, generando el fragmento 1 (Mut1) de 815 pb que incluye sólo 73 pb de dicho gen. El fragmento 2 (Mut2) fue generado por amplificación de la región flanqueante 5' (corriente arriba) del gen *Rv1687c* con los oligonucleótidos MutUp2Xba y MutLw2Stu produciendo un amplicón de 746 pb que incluye sólo 38 pb del gen *Rv1687c*; de esta forma se omitieron 608 pb del gen *Rv1686c* de un total de 681 pb y 730 pb del gen *Rv1687c* de un total de 768 pb (Fig. 4.1).

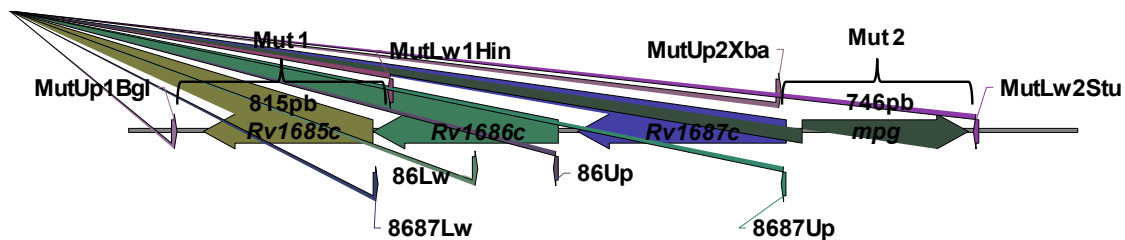


Figura 4.1. Construcción de las deleciones de los genes *Rv1686c*-*Rv1687c*.

El fragmento 1 (Mut1) se clonó en el vector pGEM-T[®], fue secuenciado y no se observaron cambios en la secuencia. Posteriormente fue liberado digiriendo con las enzimas BglIII y HindIII para luego clonarlo en el vector pYUB854 digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el vector pYUB854Mut1. El segundo fragmento (Mut2) también fue clonado en el vector pGEM-T[®]; igualmente fue secuenciado y no se observaron cambios en la secuencia. Este fragmento posteriormente fue liberado por digestión con XbaI y StuI; se hicieron extremos romos y se clonó en pYUB854Mut1 digerido con StuI y tratado con la T4 DNA polimerasa generando el plásmido pYUB854Δ8687. Los fragmentos Mut1 y Mut2 se clonaron en pYUB854 corriente arriba y corriente abajo del gen de resistencia de higromicina respectivamente (Fig. 4.2) La orientación y presencia de la deleción se comprobó por PCR con los oligonucleótidos Hyg out1-8687Up, Hyg out2-8687Lw y por digestión con las enzimas SacI y NotI (Fig. 4.2).

El plásmido pYUB854Δ8687 se clonó en el fásmido phAE159 digiriendo ambos plásmidos con PacI, generando el fásmido phAE159Δ8687. Posteriormente se empaquetó en el fago lambda y se transdujo en *E. coli* HB101. Los transductantes resultantes se comprobaron por PCR con los oligonucleótidos Hyg out1-8687Up, Hyg out2-8687Lw, 8687Up-8687Lw y por digestión con PacI.

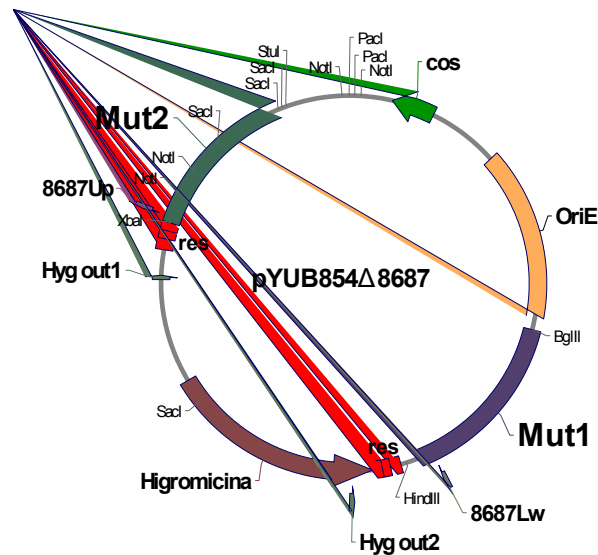


Figura 4.2. Clonación y comprobación de los fragmentos Mut1 y Mut2 en pYUB854.

El fásmidio pAE159Δ8687 se electroporó en *M. smegmatis* y luego se preparó un lisado de título elevado que fue transducido en *M. tuberculosis*. Se hicieron un total de tres transducciones en donde se obtuvieron 38 transductantes de los cuales 12 fueron analizados por PCR con los oligonucleótidos 8687Up-8687Lw que amplifican un fragmento de 1.5 kb en la cepa salvaje y 2.1 Kb en la cepa mutante (Fig. 4.3 carriles 1 y 2), Hyg out1-8687Up que no amplifican en la salvaje y amplifican un fragmento de 285 pb en el mutante (Fig. 4.3 carriles 3 y 4), Hyg out2-8687Lw que no amplifican en la salvaje y amplifican un fragmento de 385 pb en el mutante (Fig. 4.3 carriles 5 y 6). Adicionalmente, se amplificó con los oligonucleótidos 86Up-86Lw para diferenciar los recombinantes simples que conservan una copia salvaje del operón y en los que por lo tanto sí hay amplificación, de los recombinantes dobles o mutantes en los que no hubo amplificación. En todas las PCRs se usaron el fásmidio pAE159Δ8687 y la cepa H37Rv como controles. Finalmente se confirmaron 5 mutantes (Δ8687 5.31, 5.15, 5.16, 1.14, 1.15).

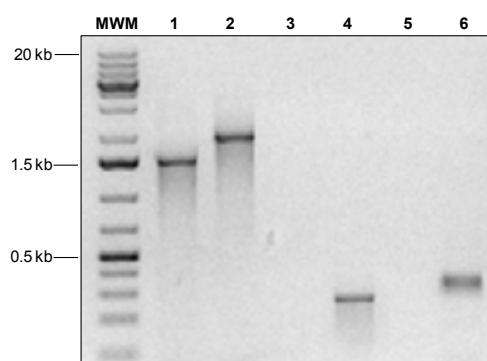


Figura 4.3. Comprobación de la cepa Δ8687 mediante PCR. Electroforesis en agarosa al 1% de la amplificación por PCR de: H37Rv (carril 1) y Δ8687 (carril 2) con los oligonucleótidos 8687Up-8687Lw, H37Rv (carril 3) y Δ8687 (carril 4) con los oligonucleótidos HygOut1-8687Up,

Resultados

H37Rv (carril 5) y $\Delta 8687$ (carril 6) con los oligonucleótidos HygOut2-8687Lw. El marcador utilizado fue el GeneRuler 1 Kb Plus DNA ladder (Fermentas). Se muestran los resultados para el clon 5.31 como ejemplo de los resultados obtenidos con los otros 4 clones.

4.2.2. Mutante de la dioxigenasa (Rv3161c)

Para la construcción del AES se amplificó por PCR la región flanqueante 3' (corriente abajo) del gen *Rv3161c* con los oligonucleótidos Mut61Up1Bgl y Mut61Lw1Hin, generando el fragmento 1 (Mut61-1) de 788 pb que incluye sólo 99 pb de dicho gen. El fragmento 2 (Mut61-2) fue generado por amplificación de la región flanqueante 5' (corriente arriba) con los oligonucleótidos Mut61Lw2Xba y Mut61Up2Stu produciendo un amplicón de 767 pb que incluye sólo 59 pb del gen; de esta forma se omitieron 991 pb del gen *Rv3161c* de un total de 1149 pb (Fig. 4.4).

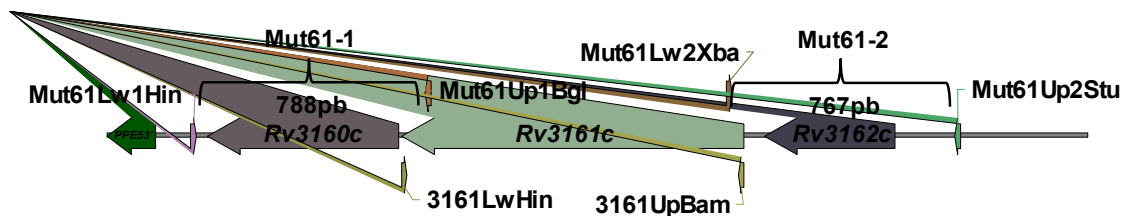


Figura 4.4. Construcción de las deleciones del gen *Rv3161c*.

El fragmento 2 (Mut61-2) se clonó en el vector pGEM-T[®], fue secuenciado y no se observaron cambios en la secuencia; posteriormente fue liberado y digerido con las enzimas *StuI* y *XbaI* para luego clonarlo en el vector pYUB854 digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el vector pYUB854Mut61-2. El primer fragmento (Mut61-1) fue clonado en el vector pGEM-T[®], también fue secuenciado y no se observaron cambios en la secuencia; posteriormente fue liberado por digestión con *BglIII* y *HindIII*; se hicieron extremos romos y se clonó en pYUB854Mut61-2 digerido con *HindIII* y tratado con la T4 DNA polimerasa generando el plásmido pYUB854 Δ 3161. Los fragmentos Mut61-1 y Mut61-2 se clonaron en pYUB854 corriente abajo y corriente arriba del gen de resistencia a higromicina respectivamente (Fig. 4.5). La orientación y presencia de la deleción se comprobó por PCR con los oligonucleótidos Mut61Lw1Hind-Mut61Up1Bgl, Hygout2-Mut61LwHind y por digestión con *BamHI* y *SacI* (Fig. 4.5).

El plásmido pYUB854 Δ 3161 fue clonado en el fásmido phAE159 digiriendo ambos plásmidos con *PacI*, generando el fásmido phAE159 Δ 3161. Posteriormente se empaquetó en el fago lambda y se transdujo en *E. coli* HB101. Los transductantes resultantes se comprobaron por PCR con los oligonucleótidos Hyg out1-3161UpBam y Hyg out2-3161LwHin y por digestión con *PacI*.

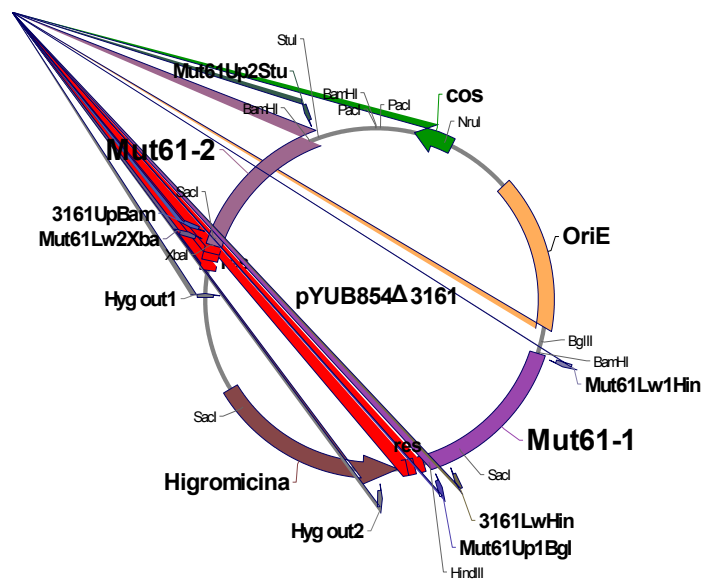


Figura 4.5. Clonación y comprobación de los fragmentos Mut61-1 y Mut61-2 en pYUB854.

El fásmido phAE159 Δ 3161 se electroporó en *M. smegmatis* y luego se preparó un lisado de título elevado que fue transducido en *M. tuberculosis*. Se hicieron un total de dos transducciones en donde se obtuvieron 16 transductantes que fueron analizados por PCR con los oligonucleótidos 3161UpBam-3161LwHin que amplifican un fragmento de 1.1 kb en la cepa salvaje y 2 Kb en la cepa mutante (Fig. 4.6 carriles 1 y 2), Hyg out1-3161UpBam que no amplifican en la salvaje y amplifican un fragmento de 310 pb en el mutante (Fig. 4.6 carriles 3 y 4) y Hyg out2-3161LwHin que no amplifican en la salvaje y amplifican un fragmento de 354 pb en el mutante (Fig. 4.6 carriles 5 y 6). En todas las PCRs se usaron el fásmido phAE159 Δ 3161 y la cepa H37Rv como controles. Se confirmaron 11 mutantes (Δ 3161 2.14, 2.15, 2.16, 2.17, 2.18, 2.21, 2.24, 2.25, 2.26, 2.27, 2.28).

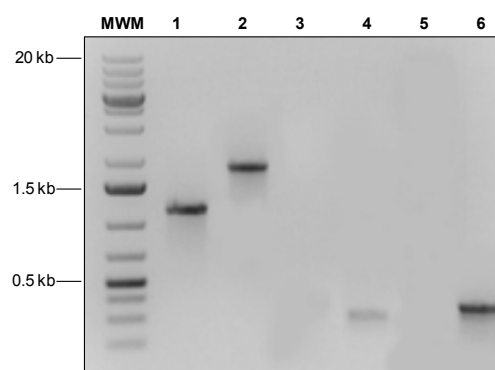


Figura 4.6. Comprobación de la cepa Δ 3161 mediante PCR. Electroforesis en agarosa al 1% de la amplificación por PCR de: H37Rv (carril 1) y Δ 3161 (carril 2) con los oligonucleótidos 3161UpBam-3161LwHin, H37Rv (carril 3) y Δ 3161 (carril 4) con los oligonucleótidos HygOut1-

Resultados

3161UpBam, H37Rv (carril 5) y Δ 3161 (carril 6) con los oligonucleótidos HygOut2-3161LwHin. El marcador utilizado fue el GeneRuler 1 Kb Plus DNA ladder (Fermentas). Se muestran los resultados para el clon 2.24 como ejemplo de los resultados obtenidos para el resto de mutantes aislados.

El *cassette* de higromicina tanto de los mutantes del transportador como los de la dioxigenasa no pudo ser eliminado con el plásmido pYUB870 pese a los muchos intentos, lo que dificultó la construcción de cepas dobles mutantes para los dos sistemas.

4.3. Construcción de cepas sobreproductoras de *Rv1686c-Rv1687c* y *Rv3161c*

Los genes *Rv1686c-Rv1687c* fueron amplificados por PCR con los oligonucleótidos 8687Up y 8687Lw (Fig. 4.1), para luego ser clonados y secuenciados en pGEM-T[®]. Posteriormente el fragmento fue liberado y clonado en el vector pMV261 (que posee el promotor *hsp60* de expresión constitutiva fuerte) tratando ambos plásmidos con Ball y EcoRI. Se analizó la zona de unión vector-inserto por secuenciación comprobándose que las proteínas entraban en fase. Este plásmido se electroporó en *M. tuberculosis* y los transformantes obtenidos se comprobaron transformando *E. coli* con los lisados obtenidos por calor y digiriendo los vectores purificados de *E. coli* con Sall y Smal. Se comprobaron 5 clones designados como 8687-1, 8687-2, 8687-4, 8687-5 y 8687-6.

En el caso del gen *Rv3161c*, se amplificó por PCR con los oligonucleótidos 3161UpBam y 3161LwHin (Fig. 4.4), para luego clonarlo y secuenciarlo en pGEM-T[®]; posteriormente el fragmento fue liberado y clonado en el vector pMV261 tratando ambos plásmidos con BamHI y HindIII. Se analizó la zona de unión vector-inserto por secuenciación comprobándose que las proteínas entraban en fase. El plásmido resultante se electroporó en *M. tuberculosis* y los transformantes se comprobaron transformando *E. coli* con los lisados obtenidos por calor y digiriendo los plásmidos purificados de *E. coli* con NcoI y NruI. Se comprobaron 5 clones designados como 3161-4.1, 3161-4.2, 3161-12.1, 3161-12.2 y 3161-12.3.

4.3.1. Comprobación de las cepas sobreproductoras

En primer lugar se evaluó la expresión de los genes *Rv1687c* y *Rv3161c* a nivel transcripcional usando RNA total extraído de cultivos en fase exponencial de las cepas H37Rv, H37Rv (pMV261), 8687-1, 8687-2, 3161-4.1 y 3161-12.1. La expresión génica se cuantificó mediante Real-Time PCR. Los resultados mostraron que en el caso del transportador ABC el gen *Rv1687c* se expresa 9 y 6 veces más en los clones 8687-1 y 8687-2 respectivamente, que en la cepa salvaje H37Rv, y 6 y 4 veces más que en la

cepa H37Rv (pMV261). Por su parte los clones 3161-4.1 y 3161-12.1 expresan el gen *Rv3161c* casi 128 y 160 veces más que la cepa salvaje H37Rv y 133 y 167 veces más que la cepa H37Rv (pMV261) (Tabla 4.2). Estos resultados confirmaron que los genes *Rv1687c* y *Rv3161c* se sobreexpresan en las cepas estudiadas.

Tabla 4.2. Expresión del gen *Rv1687c* en los clones 8687-1 y 8687-2 sobreproductores del transportador ABC y del gen *Rv3161c* en los clones 3161-4.1 y 3161-12.1 sobreproductores de la dioxigenasa, respecto a las cepas H37Rv y H37Rv electroporada con pMV261.

Gen/Clon	H37Rv		H37Rv (pMV261)	
	E.N.	± SD	E.N.	± SD
<i>Rv1687c</i>				
Clon 8687-1	9.39	1.42	6.05	1.42
Clon 8687-2	6.71	3.81	4.32	3.28
<i>Rv3161c</i>				
Clon 3161-4.1	127.96	1.47	133.6	1.47
Clon 3161-12.1	160.67	0.6	167.7	0.60

E.N.: Expresión Normalizada respecto al gen *sigA*, **SD:** Desviación Estándar. Los valores son el resultado de la media de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

A continuación se verificó la sobreexpresión de los genes a nivel proteico. Para ello se hicieron geles bidimensionales a partir de extractos proteicos obtenidos de cultivos en fase estacionaria, de las cepas H37Rv (pMV261), la cepa 8687-1 (sobreproductora del transportador ABC) y la cepa 3161-4.1 (sobreproductora de la dioxigenasa). Se usaron cultivos en fase estacionaria para poder obtener una mayor biomasa y por tanto una mayor cantidad de proteína total. Inicialmente se utilizaron geles con un gradiente de pH de 3 a 10, pero para resolver mejor las zonas donde posiblemente se encontraban tanto el transportador ABC como la dioxigenasa se usaron tiras de isoelectroenfoque con gradientes de pH de 6 a 9 y de 4 a 7 respectivamente. Una vez realizada la electroforesis bidimensional se llevó a cabo la identificación por huella peptídica mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

El análisis comparativo de las imágenes mediante el programa *Samespot* (Nonlinear Dynamics) mostró un único *spot* diferencial cuya intensidad era mayor en la cepa sobreproductora que en la cepa control H37Rv (pMV261). Este *spot* estaba localizado en una zona que concordaba con la masa y el punto isoelectrico predichos para la proteína codificada por el gen *Rv1687c* (MW: 27.55 kDa, pI: 6.95). Dicho *spot* no se detectó en el gel de la cepa control H37Rv (pMV261), indicando que o bien no se expresa o bien que la abundancia de esta proteína está por debajo del límite de sensibilidad de la tinción con plata (Fig. 4.7).

Mediante el análisis por huella peptídica, el *spot* fue identificado como la posible proteína de unión a ATP *Rv1687c* del transportador ABC *Rv1686c-Rv1687c* de

Resultados

M. tuberculosis (Fig. 4.8). La proteína codificada por *Rv1686c* no fue identificada en estos geles ya que ésta proteína tiene un punto isoeléctrico de 8.49 que está al límite de detección del gel. Aún así se infiere la expresión del la proteína completa dado que el gen *Rv1686c* precede al gen *Rv1687c* en el vector recombinante (Fig. 4.1).

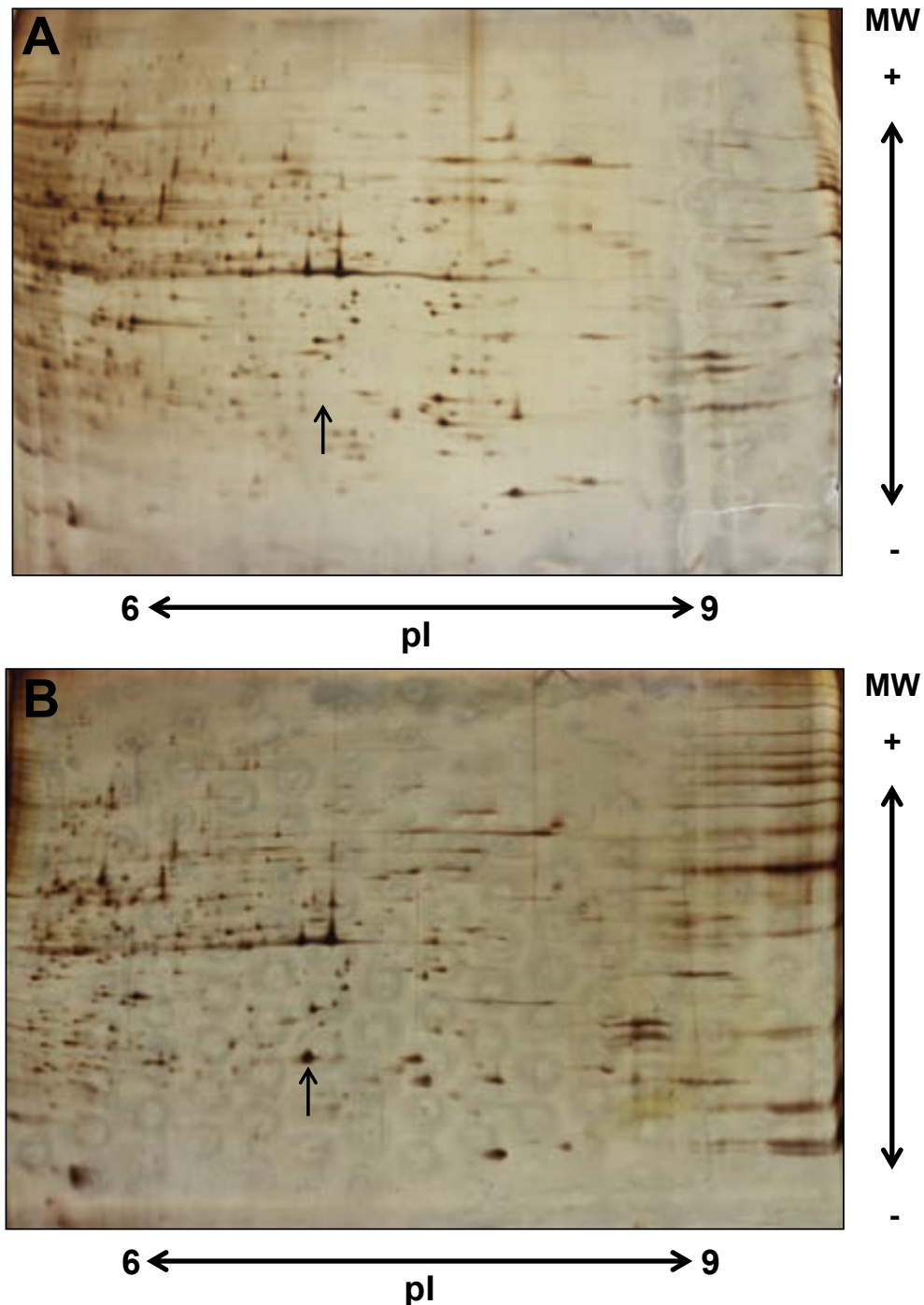


Figura 4.7. Geles 2DE de pH 6-9 teñidos con nitrato de plata. A) H37Rv electroporada con pMV261. B) Clon 8687-1 que sobreproduce el transportador ABC *Rv1686c*-*Rv1687c*. Las flechas indican el *spot* diferencial. Los geles fueron cargados con 100µg de proteína total. El marcador de masa molecular utilizado es el BenchMark™ (Invitrogen).

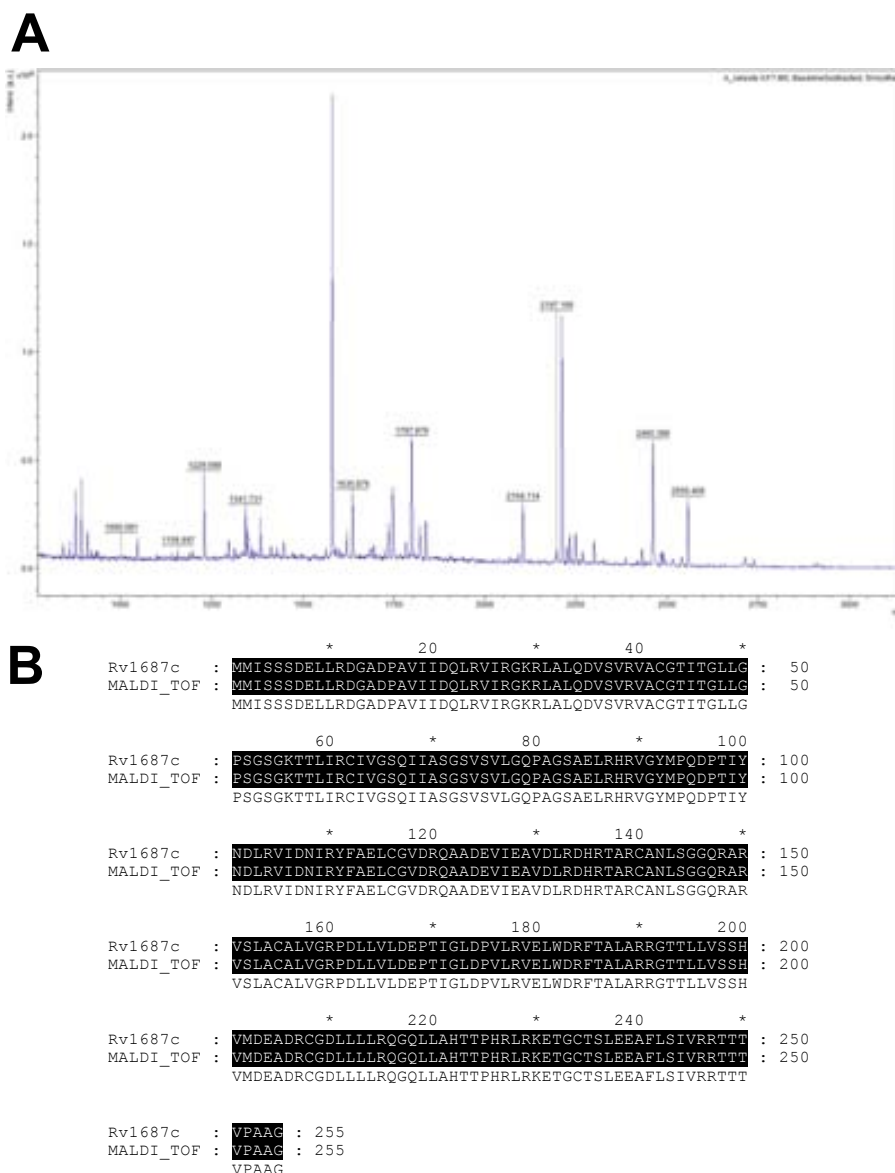


Figura 4.8. A) Espectro de masas obtenido para el *spot* diferencial identificado en el gel de la cepa que sobreproduce el transportador (Fig. 4.7, B), cada pico corresponde a un péptido derivado de la digestión trípica de la proteína. B) Alineamiento de la secuencia identificada mediante huella peptídica vs. Rv1687c reportada en la base de datos Tuberculist.

Para el análisis de la sobreproducción de la dioxigenasa codificada por *Rv3161c* se usaron geles con un gradiente de pH de 4 a 7 teniendo en cuenta que el punto isoeléctrico de esta proteína es de 5.16 y su masa molecular de 42.5 kDa. Después del análisis de las imágenes obtenidas se identificó un *spot* en el gel de la cepa sobreproductora cuya abundancia era mayor que en la cepa control H37Rv (pMV261). El *spot* seleccionado estaba en la zona en la que posiblemente se encontraría la proteína codificada por el gen *Rv3161c* (Fig. 4.9). La identificación por huella peptídica mostró que dicho *spot* era en efecto la proteína codificada por *Rv3161c*, cuyo espectro y alineamiento se muestran en la figura 4.10.

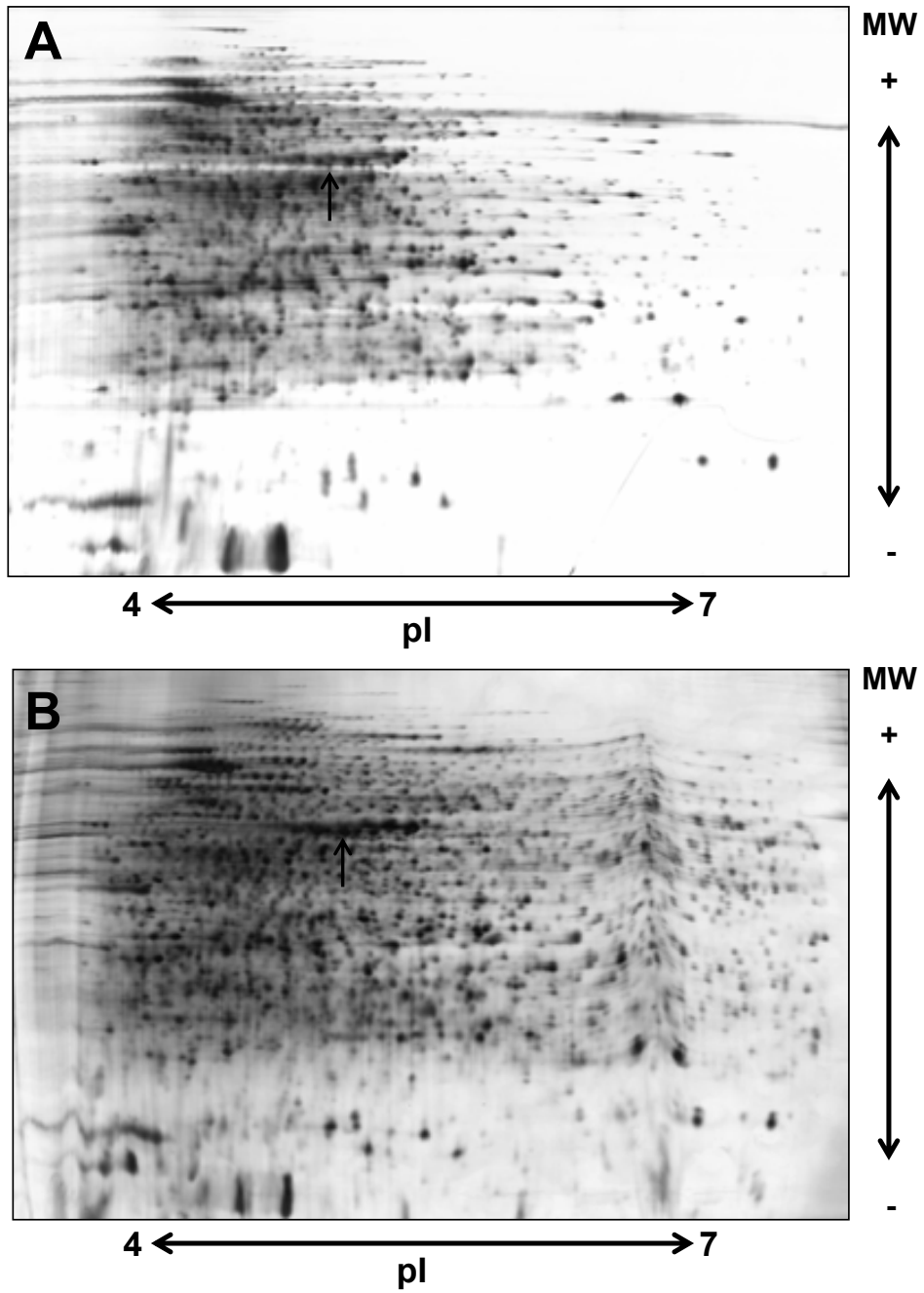
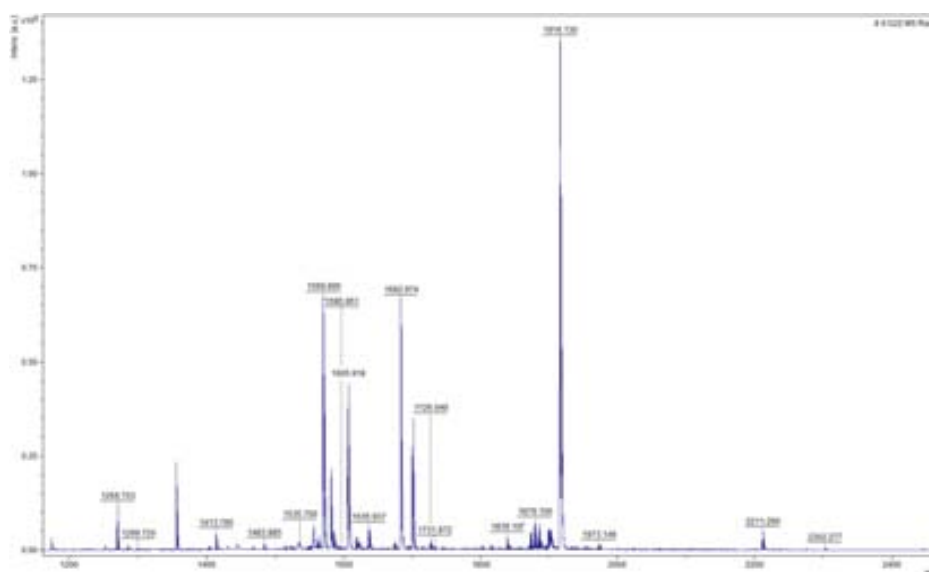


Figura 4.9. Geles 2DE de pH 4-7 teñidos con nitrato de plata. A) H37Rv electroperforada con pMV261. B) Clon 3161-4.1 que sobreproduce la dioxigenasa Rv3161c. Las flechas indican el *spots* diferencial. Los geles fueron cargados con 100µg de proteína total. El marcador de masa molecular utilizado fue el BenchMark™ de Invitrogen.

A



B

```

      *           20           *           40           *
Rv3161c : MLSTDNRAELGDILTLDIGDYLDNPPALSLPPAAYTSSELWQLERERIFN : 50
MALDI_TOF : MLSTDNRAELGDILTLDIGDYLDNPPALSLPPAAYTSSELWQLERERIFN : 50
      *           60           *           80           *           100
Rv3161c : RSWMLVAHVDQVAKTGDYVTVSVAGEPVMVVRDVGQLHALSPICRHRLM : 100
MALDI_TOF : RSWMLVAHVDQVAKTGDYVTVSVAGEPVMVVRDVGQLHALSPICRHRLM : 100
      *           120          *           140          *
Rv3161c : LMVEPGAGRIDTLTCQYHLWRYGLDGRRLRGAPHMAANLDFNRRECRLPQF : 150
MALDI_TOF : LMVEPGAGRIDTLTCQYHLWRYGLDGRRLRGAPHMAANLDFNRRECRLPQF : 150
      *           160          *           180          *           200
Rv3161c : AVATWNGLVWINLDADAEP TAAHLDLT DDEFAGYRLGEMVQVESWSHEWR : 200
MALDI_TOF : AVATWNGLVWINLDADAEP TAAHLDLT DDEFAGYRLGEMVQVESWSHEWR : 200
      *           220          *           240          *
Rv3161c : ANWKVAAENGHENYHVLGLHRQTLEFPVPGGDLDRQYSRWALRLRVPF : 250
MALDI_TOF : ANWKVAAENGHENYHVLGLHRQTLEFPVPGGDLDRQYSRWALRLRVPF : 250
      *           260          *           280          *           300
Rv3161c : TVPVEAKSLQLNEVQKSNLVVLTFFPNSALAIAGERVWVWFGFIPQSIDRV : 300
MALDI_TOF : TVPVEAKSLQLNEVQKSNLVVLTFFPNSALAIAGERVWVWFGFIPQSIDRV : 300
      *           320          *           340          *
Rv3161c : QVLGGVLTTPELAADAATAQTSQFVMAMINDEDRLGLEAVQVGAGSRFA : 350
MALDI_TOF : QVLGGVLTTPELAADAATAQTSQFVMAMINDEDRLGLEAVQVGAGSRFA : 350
      *           360          *           380
Rv3161c : ERGHLSSKEWPGMLAFYRNLMALVGDHFGAS : 382
MALDI_TOF : ERGHLSSKEWPGMLAFYRNLMALVGDHFGAS : 382
      *           380
Rv3161c : ERGHLSSKEWPGMLAFYRNLMALVGDHFGAS : 382
MALDI_TOF : ERGHLSSKEWPGMLAFYRNLMALVGDHFGAS : 382

```

Figura 4.10. A) Espectro de masas obtenido para el *spot* diferencial en el gel correspondiente al clon 3161-4.1, sobreproductora de la dioxigenasa (Fig. 4.9, B), cada pico corresponde a un péptido derivado de la digestión trípica de la proteína. B) Alineamiento de la secuencia identificada por huella peptídica vs. Rv3161c reportada en la base de datos Tuberculist.

De esta forma se confirmó que tanto la proteína Rv1687c del transportador ABC codificado por *Rv1686c-Rv1687c* como la dioxigenasa codificada por *Rv3161c* se sobreproducen en las cepas 8687-1 y 3161-4.1 respectivamente.

4.4. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes y sobreproductoras

Se analizó el fenotipo de dos clones escogidos al azar de las cepas sobreproductoras del transportador ABC (8687-1, 8687-2) y de la dioxigenasa Rv3161c (3161-4.1 y 3161-12.1), así como de 3 clones del mutante Δ 8687 (5.31, 5.15, 5.16) y 3 del mutante Δ 3161 (2.21, 2.24 y 2.14).

4.4.1. Crecimiento y morfología colonial

El crecimiento en medio líquido mediante el seguimiento de la OD₆₀₀, no mostró diferencias entre la cepa parental H37Rv y las cepas sobreproductoras o los mutantes (Fig. 4.11).

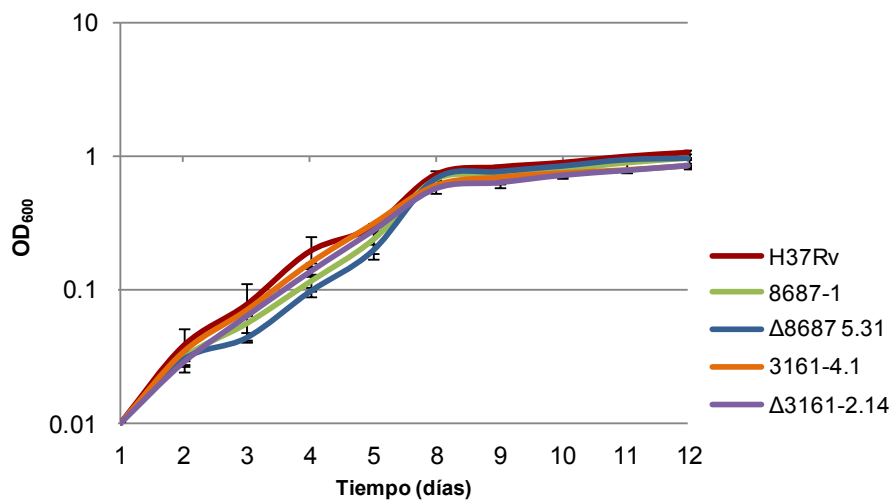


Figura 4.11. Crecimiento en medio líquido de H37Rv, las cepas sobreproductoras 8687-1, 3161-4.1 y los mutantes Δ 8687 5.31 y Δ 3161-2.14. Se muestran los resultados para un clon representativo de cada cepa. Los datos representan el promedio de tres ensayos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

Tanto las cepas que sobreexpresan el transportador y la dioxigenasa, como sus mutantes mostraron un crecimiento abundante en medio sólido formando colonias rugosas.

4.4.2. Análisis de susceptibilidad a compuestos

Se determinó la CMI de las cepas sobreproductoras del transportador ABC y de la dioxigenasa así como la de las cepas mutantes, frente a los compuestos que se listan en el apartado 3.8.1.1 usando como controles la cepa parental H37Rv y la H37Rv (pMV261). Se hicieron como mínimo dos ensayos independientes con dos réplicas técnicas en cada ensayo. En general, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas (prueba t Mann-Whitney) respecto a las cepas controles ni para el transportador ni para la dioxigenasa (tabla 4.3).

Tabla 4.3. CMI's en µg/mL determinadas mediante el ensayo REMA. Los resultados son la mediana y el rango (mínimo-máximo) de al menos dos experimentos independientes.

Compuesto	H37Rv	H37Rv (pMV261)	Sobreproducción transportador		Mutantes transportador (Δ 8687)			Sobreproducción dioxigenasa		Mutantes dioxigenasa (Δ 3161)		
			8687_1	8687_2	5.31	5.15	5.16	3161-4.1	3161-12.1	2.14	2.21	2.24
Triclosán	21.7 (21.7)	21.7 (10.8-21.7)	21.7 (21.7)	21.7 (21.7)	21.7 (21.7)	21.7 (21.7)	21.7 (21.7)	21.7 (21.7)	21.7 (21.7)	21.7 (21.7)	21.7 (21.7)	21.7 (21.7)
Isoniacida	0.062 (0.062-0.125)	0.093 (0.062-0.125)	0.125 (0.062-0.125)	0.062 (0.062-0.125)	0.062 (0.062-0.125)	0.062 (0.062-0.125)	0.062 (0.062-0.125)	0.062 (0.062)	0.062 (0.062)	0.090 (0.062-0.125)	0.093 (0.062-0.125)	0.093 (0.062-0.125)
Etambutol	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
Estreptomina	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)
Rifampicina	0.064 (0.032-0.064)	0.064 (0.032-0.064)	0.064 (0.032-0.064)	0.064 (0.032-0.064)	0.064 (0.032-0.064)	0.064 (0.032-0.064)	0.064 (0.032-0.064)	0.064 (0.064)	0.064 (0.064)	0.064 (0.032-0.064)	0.064 (0.032-0.064)	0.064 (0.032-0.064)
Clofazimina	0.12 (0.12-0.24)	0.12 (0.12-0.24)	0.12 (0.12)	0.12 (0.12)	0.12 (0.12)	0.12 (0.12)	0.12 (0.12-0.24)	0.12 (0.12-0.24)	0.18 (0.12-0.24)	0.12 (0.12-0.24)	0.12 (0.12-0.24)	0.12 (0.12-0.24)
Etionamida	0.48 (0.24-0.48)	0.48 (0.24-0.48)	0.48 (0.48)	0.48 (0.48)	0.48 (0.48)	0.48 (0.48)	0.48 (0.48)	0.48 (0.24-0.48)	0.48 (0.24-0.48)	0.48 (0.24-0.48)	0.48 (0.24-0.48)	0.48 (0.24-0.48)
Acido <i>p</i> -aminosalicílico	0.1 (0.1-0.2)	0.1 (0.1-0.2)	0.1 (0.1-0.2)	0.1 (0.1-0.2)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1-0.2)	0.1 (0.1-0.2)	0.1 (0.1-0.2)	0.1 (0.1-0.2)	0.1 (0.1-0.2)
D-cicloserina	8 (8)	8 (8)	8 (8)	8 (8)	8 (8)	8 (8)	8 (8)	8 (8)	8 (8)	8 (8)	8 (8)	8 (8)
Kanamicina	2 (2)	NA	NA	NA	2 (2)	2 (2)	2 (2)	NA	NA	2 (2)	2 (2)	2 (2)
Tetraciclina	4 (4-8)	4 (4-8)	8 (4-8)	4 (4-8)	4 (4-8)	4 (4)	4 (4)	4 (4-8)	8 (4-8)	4 (4)	4 (4)	4 (4)
Eritromicina	100 (50-100)	100 (50-100)	75 (50-100)	100 (50-100)	75 (50-100)	100 (50-100)	100 (50-100)	100 (100)	100 (100)	100 (50-100)	100 (50-100)	100 (50-100)
Cloranfenicol	2.5 (2.5)	2.5 (2.5)	2.5 (2.5)	2.5 (2.5)	2.5 (2.5)	2.5 (2.5)	2.5 (2.5)	2.5 (2.5)	2.5 (2.5)	2.5 (2.5)	2.5 (2.5)	2.5 (2.5)
Gentamicina	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)
Ofloxacina	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)	0.25 (0.25)
Levofloxacina	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)	0.125 (0.125)
Acriflavina	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	2 (2)
Tioridazina hidroclorada	10 (5-10)	10 (5-10)	10 (10)	10 (10)	10 (10)	10 (10)	10 (10)	10 (10)	10 (5-10)	10 (10)	10 (10)	10 (10)
Amikacina	0.5 (0.5-1)	1 (1)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.75 (0.5-1)	0.75 (0.5-1)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)
Bromuro de Etidio	2 (2)	1 (1-2)	2 (2)	1 (1-2)	1.5 (1-2)	1.5 (1-2)	1.5 (1-2)	2 (2)	2 (2)	1.25 (1-2)	1.5 (1-2)	1.5 (1-2)
Safranina	1 (1)	1 (1)	1 (1)	0.5 (0.5-1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
Bromuro de cetiltrimetilamonio	25 (25)	25 (25)	25 (25)	25 (25)	25 (25)	25 (25)	25 (25)	25 (25)	25 (25)	25 (25)	25 (25)	25 (25)

NA: No aplica, plásmido con resistencia a kanamicina.

4.4.3. Estudio de la virulencia

Estudios previos habían mostrado que la expresión del transportador ABC Rv1686c-Rv1687c se induce en macrófagos activados [193], por lo que se había sugerido que este transportador podría tener algún papel en la virulencia de *M. tuberculosis*. Por lo anterior se planteó evaluar el efecto de la mutación por delección y la sobreproducción del transportador en la virulencia. Para ello se comparó el crecimiento de las cepas H37Rv, 8687-1 y Δ 8687 5.31 en la línea celular de macrófagos J774 A.1 haciendo un seguimiento de las CFUs durante 7 días.

Como muestra la figura 4.12 ni la mutación, ni la sobreproducción del transportador tuvieron un efecto significativo en la supervivencia de *M. tuberculosis* dentro de los macrófagos.

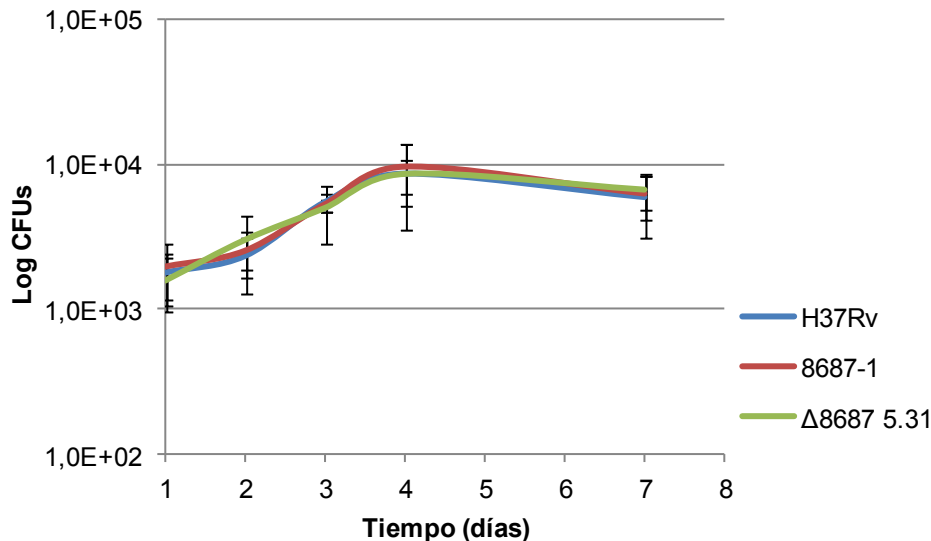


Figura 4.12. CFUs de las cepas H37Rv, 8687-1 que sobreproduce el transportador y el mutante Δ 8687 5.31 infectando la línea celular de macrófagos J774 A.1. Los datos representan el promedio de como mínimo tres ensayos independientes con tres réplicas técnicas por cepa. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

También, se evaluó el efecto de la delección y la sobreproducción de la dioxigenasa en la virulencia de *M. tuberculosis*, infectando igualmente la línea celular de macrófagos J774 A.1. En este caso tampoco se obtuvieron diferencias entre el mutante, la cepa que sobreproduce la dioxigenasa y la salvaje (Fig. 4.13).

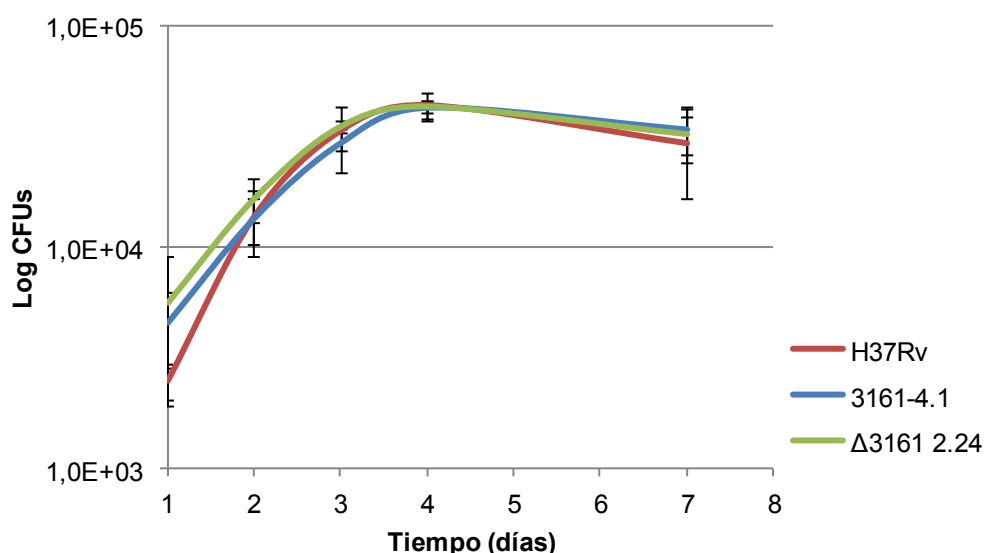


Figura 4.13. CFUs de las cepas H37Rv, la cepa 3161-4.1 que sobreproduce la dioxigenasa y el mutante Δ 3161 2.24 infectando la línea celular de macrófagos J774 A.1. Los datos representan el promedio de cómo mínimo tres ensayos independientes y tres réplicas técnicas por cepa. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

Estos resultados muestran que ni la delección ni la sobreproducción del transportador ABC Rv1686c-Rv1687c y la dioxigenasa Rv3161c tienen un efecto en la virulencia de *M. tuberculosis* en macrófagos.

4.4.4. Estudio de la resistencia al H₂O₂

De acuerdo con Schnappinger y colaboradores [193], los genes del posible transportador ABC se inducen en presencia de H₂O₂. Este es un estrés encontrado por la bacteria en el macrófago, por lo que los genes que responden a este estímulo podrían ser importantes para la supervivencia del patógeno en el huésped. Así pues, se estudió el papel del transportador en la resistencia de *M. tuberculosis* al H₂O₂. Para ello se evaluó la viabilidad de las cepas H37Rv, 8687-1, 8687-2 y los mutantes Δ 8687 5.31, 5.15, 5.16 tras el tratamiento con diferentes concentraciones de H₂O₂ (8-32 mM) durante 90 min a 37°C. Los resultados no mostraron diferencias significativas (prueba t Mann-Whitney) entre las cepas sobreproductoras y los mutantes respecto a la salvaje H37Rv (Tabla 4.4).

Resultados

Tabla 4.4. Recuento de viables (CFU/mL) de la cepa parental H37Rv, las cepas sobreproductoras 8687-1 y 8687-2 y los mutantes Δ 8687 5.31, 5.15, 5.16 tras la exposición a diferentes concentraciones de H₂O₂. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

[H ₂ O ₂]	H37Rv	8687-1	8687-2	Δ 8687 5.31	Δ 8687 5.15	Δ 8687 5.16
32mM	9.71E+04 ± 5.40E+04	1.19E+05 ± 4.59E+04	9.33E+04 ± 1.15E+04	9.75E+04 ± 3.54E+03	9.90E+04 ± 1.41E+03	1.00E+05 ± 7.00E+04
16mM	1.07E+05 ± 7.33E+04	1.33E+05 ± 8.31E+04	1.32E+05 ± 3.40E+04	9.90E+04 ± 1.41E+03	1.10E+05 ± 1.41E+04	1.02E+05 ± 9.39E+04
8mM	1.56E+05 ± 5.39E+04	1.13E+05 ± 1.04E+05	1.78E+05 ± 5.28E+04	1.08E+05 ± 6.33E+04	1.59E+05 ± 1.02E+05	1.07E+05 ± 1.07E+04
4mM	2.13E+05 ± 1.56E+05	1.83E+05 ± 1.28E+05	2.12E+05 ± 1.06E+05	2.21E+05 ± 1.36E+05	1.81E+05 ± 4.31E+04	2.17E+05 ± 6.25E+04

4.5. Estudio de la resistencia a triclosán en *M. tuberculosis*

Los resultados obtenidos parecían indicar que ni el transportador Rv1686c-Rv1687c ni la dioxigenasa Rv3161c estaban implicados en la resistencia al TRC. Por ello se planteó estudiar el papel de las bombas de eflujo y de la impermeabilidad de la envuelta celular en la resistencia de *M. tuberculosis* al TRC, así como analizar a nivel proteómico el efecto del tratamiento con TRC, con el fin de identificar otras posibles proteínas que pudieran estar implicadas en la respuesta a este desinfectante.

4.5.1. Implicación de bombas de eflujo

Para estudiar si la resistencia al TRC en *M. tuberculosis* es debida a la detoxificación por bombas de eflujo, se evaluó el efecto de los inhibidores de bombas reserpina, CCCP, verapamil y *o*-vanadato. Para ello, se determinó la CMI de estos inhibidores en la cepa salvaje H37Rv, cuyos resultados fueron: 48 μ g/mL para la reserpina, 5 μ g/mL para el CCCP, 80 μ g/mL para el verapamil y >96 μ g/mL para el *o*-vanadato. Posteriormente se determinó la CMI del TRC en presencia de los inhibidores de bombas a unas concentraciones sub-inhedorias de 12 μ g/mL para la reserpina, 1.25 μ g/mL para el CCCP, 40 μ g/mL para el verapamil y 9 μ g/mL para el *o*-vanadato, en la cepa H37Rv. Las concentraciones de los inhibidores se eligieron en base a la literatura ya que no afectan el crecimiento de *M. tuberculosis* tal y como se comprobó mediante la determinación de la CMI de estos inhibidores en la cepa salvaje H37Rv.

Los resultados no mostraron cambios en la CMI del TRC (21.7 μ g/mL, 75 μ M) en presencia de reserpina, CCCP u *o*-vanadato, pero sí se observó una disminución

en presencia de verapamil (10.85 $\mu\text{g/mL}$, 37.5 μM). Para estudiar mejor esta disminución, se hicieron curvas de crecimiento con la cepa H37Rv y el verapamil, en donde se observó que la concentración utilizada en las CMI (40 $\mu\text{g/mL}$) sí afectaba el crecimiento y que por lo tanto la disminución observada podría estar relacionada con un efecto tóxico de este inhibidor (Fig.4.14). Cuando se usó una concentración de verapamil de 20 $\mu\text{g/mL}$ no se observaron cambios en la CMI del TRC.

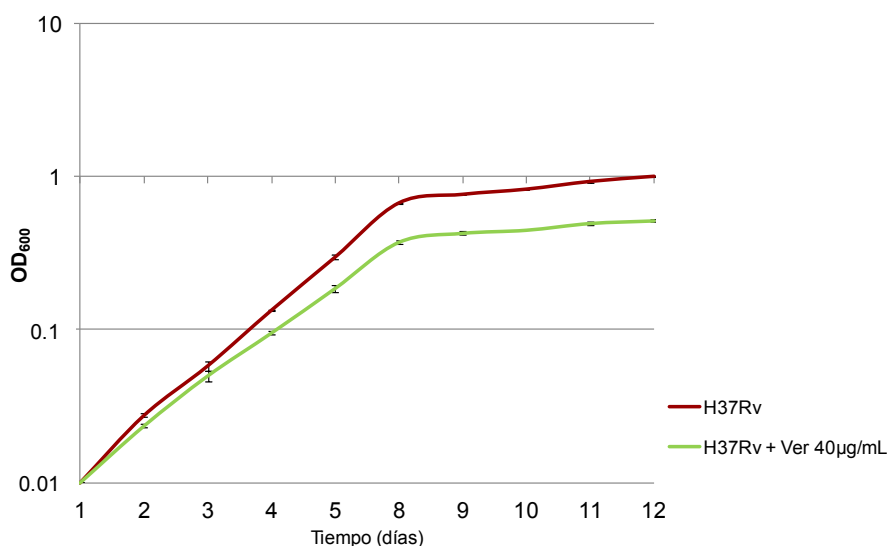


Figura 4.14. Crecimiento en medio líquido de *M. tuberculosis* H37Rv en presencia y ausencia de verapamil a una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$. Los datos representan el promedio de tres ensayos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

Estos resultados sugieren que la resistencia TRC en *M. tuberculosis* no se debe a la función de otras bombas de eflujo.

4.5.2. Implicación de la envuelta celular

Para estudiar si la resistencia de *M. tuberculosis* al TRC está relacionada con la resistencia natural dada por la envuelta celular del bacilo, se utilizó el etambutol que a concentraciones sub-inhedoras afecta en la permeabilidad de la pared sin afectar la viabilidad del bacilo. En primer lugar se estudió la CMI del TRC en presencia de etambutol a una concentración 4 veces por debajo de la CMI (0.25 $\mu\text{g/mL}$) en la cepa salvaje H37Rv. La CMI obtenida fue la misma que la obtenida en ausencia de etambutol (75 μM , 21.7 $\mu\text{g/mL}$). Al no observar cambios en la CMI se realizó el seguimiento de la OD₆₀₀ de cultivos de H37Rv en presencia de etambutol, TRC y ambos a unas concentraciones sub-inhedoras de 0.3 $\mu\text{g/mL}$ y 18.7 μM , respectivamente.

Resultados

Las curvas de crecimiento mostraron que ni el etambutol ni el TRC solos afectan el crecimiento de la H37Rv a las concentraciones utilizadas, pero cuando se combinan se reduce la viabilidad de esta cepa (Fig. 4.15).

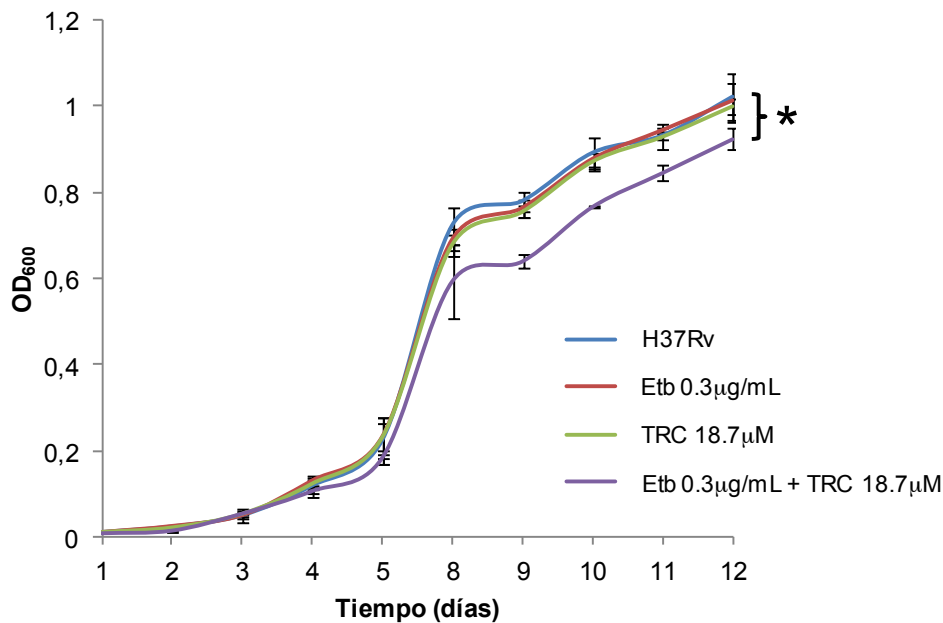


Figura 4.15. Crecimiento en medio líquido de la cepa H37Rv con TRC (18.7 µM), etambutol (0.3 µg/mL) y ambos. Los datos representan el promedio de dos ensayos independientes con dos réplicas cada uno, las barras de error representan la desviación estándar de la media. $p < 0.05$ (*) con la prueba t Mann-Whitney.

Este resultado sugiere que parte de la resistencia de *M. tuberculosis* al TRC puede ser revertida por concentraciones sub-inhedorias de inhibidores de la pared celular como el etambutol y que por tanto parte de la resistencia estaría relacionada también con la permeabilidad de la envuelta celular.

4.5.3. Análisis proteómico

Con el fin de identificar proteínas que respondan al tratamiento con TRC en *M. tuberculosis*, se prepararon extractos proteicos para 2DE y 2D-DIGE que fueron obtenidos a partir de dos cultivos de H37Rv en fase logarítmica, tratados independientemente con TRC (5 veces su CMI: 108.5 µg/mL, 375 µM) o con DMSO (99%) durante 2 h a 37°C. En primer lugar, se llevó a cabo la comparación del perfil proteico entre los cultivos tratados con TRC y los no tratados (+DMSO) mediante la técnica de 2D-DIGE. Para ello se utilizaron geles con un gradiente de pH de 4 a 7 ya que en esta zona se agrupan la mayoría de proteínas. Los extractos proteicos fueron marcados como se describió en los apartados 3.6.6.3 y 3.6.6.4. Se hicieron dos geles por cada condición experimental (Fig. 3.15) resultando en un total de cuatro geles.

Una vez los extractos fueron separados por 2DE, los geles fueron escaneados y se realizó el análisis de imágenes, donde se observó una mayor abundancia de una proteína (*spot* 1, Fig. 4.16) y la disminución en la abundancia de tres proteínas (*spots* 3, 4 y 7), figura 4.17.

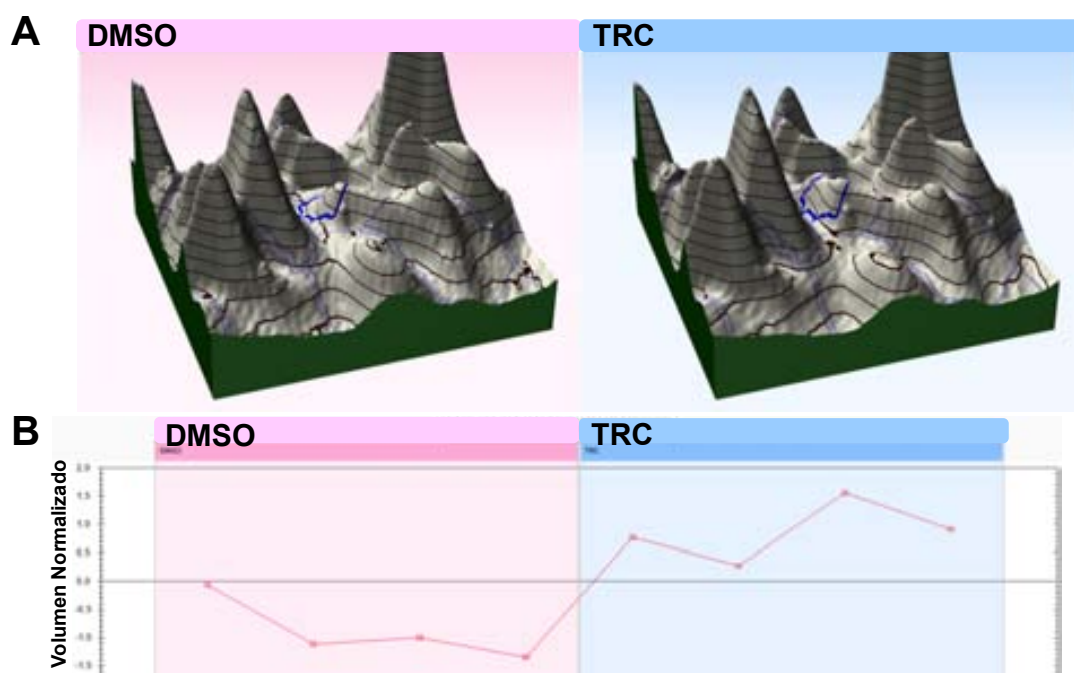


Figura 4.16. *Spot* 1 en la muestra no tratada (+DMSO) vs. muestra tratada con TRC. A) Representación en 3D del perfil del *spot* 1. B) Representación del volumen normalizado para el *spot* 1, cada punto indica el volumen obtenido para cada una de las cuatro réplicas.

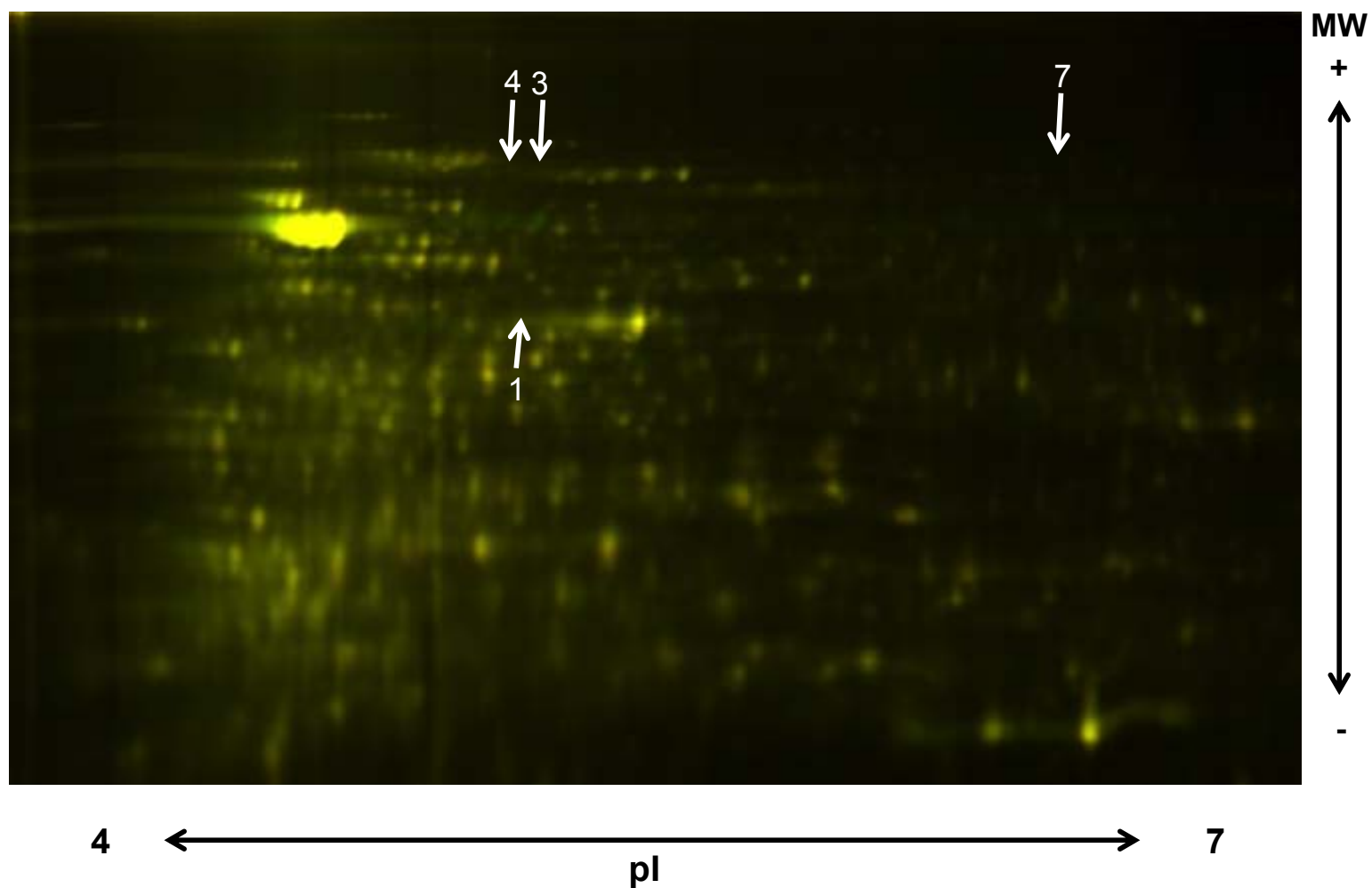


Figura 4.17. Gel 2D-DIGE de la cepa H37Rv tratada con TRC vs H37Rv no tratada (+DMSO), marcados con Cy3 (Rojo) y Cy5 (verde) respectivamente. Los spots señalados tuvieron un $p < 0.05$ de acuerdo con el análisis de ANOVA de dos vías y un $fold\ change > 1.5$.

Posteriormente, los geles fueron teñidos con nitrato de plata y los *spots* fueron extraídos para ser identificados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, en donde el *spot* 1 fue identificado como la dioxigenasa Rv3161c, cuyo espectro se muestra la figura 4.18.

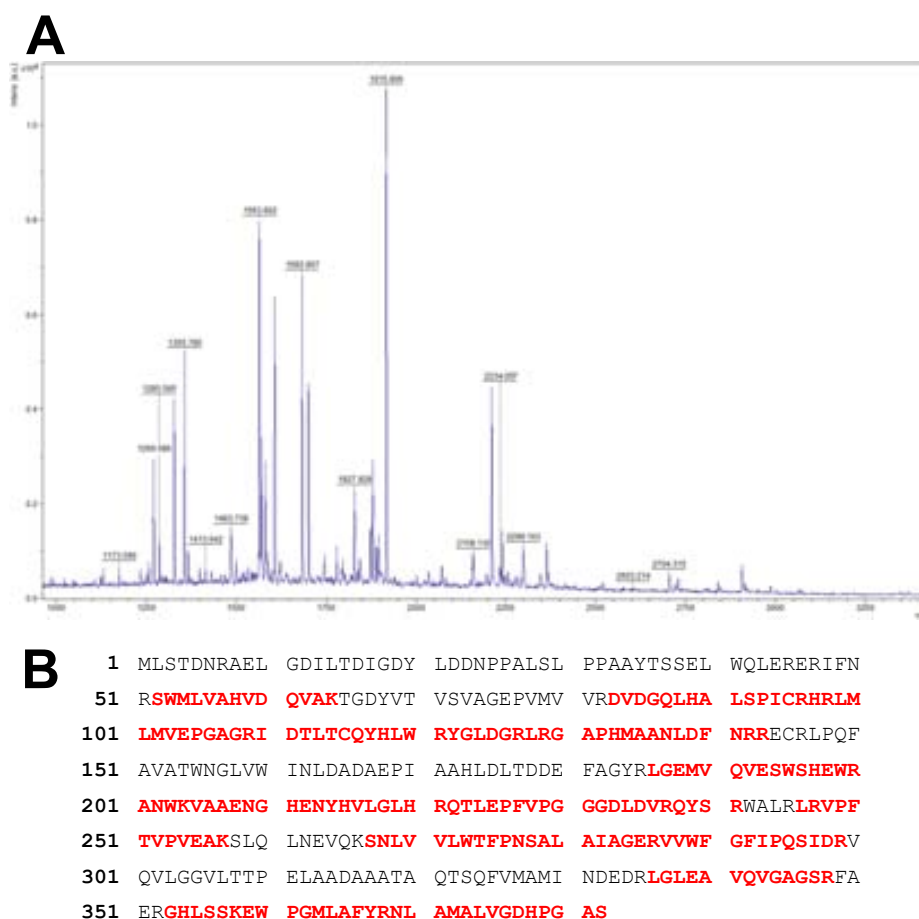


Figura 4.18. A) Espectro de masas obtenido para el *spot* 1, cada pico corresponde a un péptido derivado de la digestión trípica de la proteína. B) Secuencia de la proteína codificada por Rv3161c, en la que se muestran en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF.

El *spot* 3 fue identificado como la proteína ThiC (Rv0423c), probablemente implicada en la biosíntesis de tiamina y el *spot* 4 como una probable peptidasa citoplasmática llamada PepQ (Rv2535c); sus espectros se muestran en las figuras 4.19 y 4.20 respectivamente. En cuanto al *spot* 7, su identificación no fue posible ya sea debido a la baja cantidad de proteína presente en el *spot*, modificaciones post-traduccionales que modifican la masa molecular de los péptidos o bien a la falta de representación de este producto proteico en la base de datos utilizada.

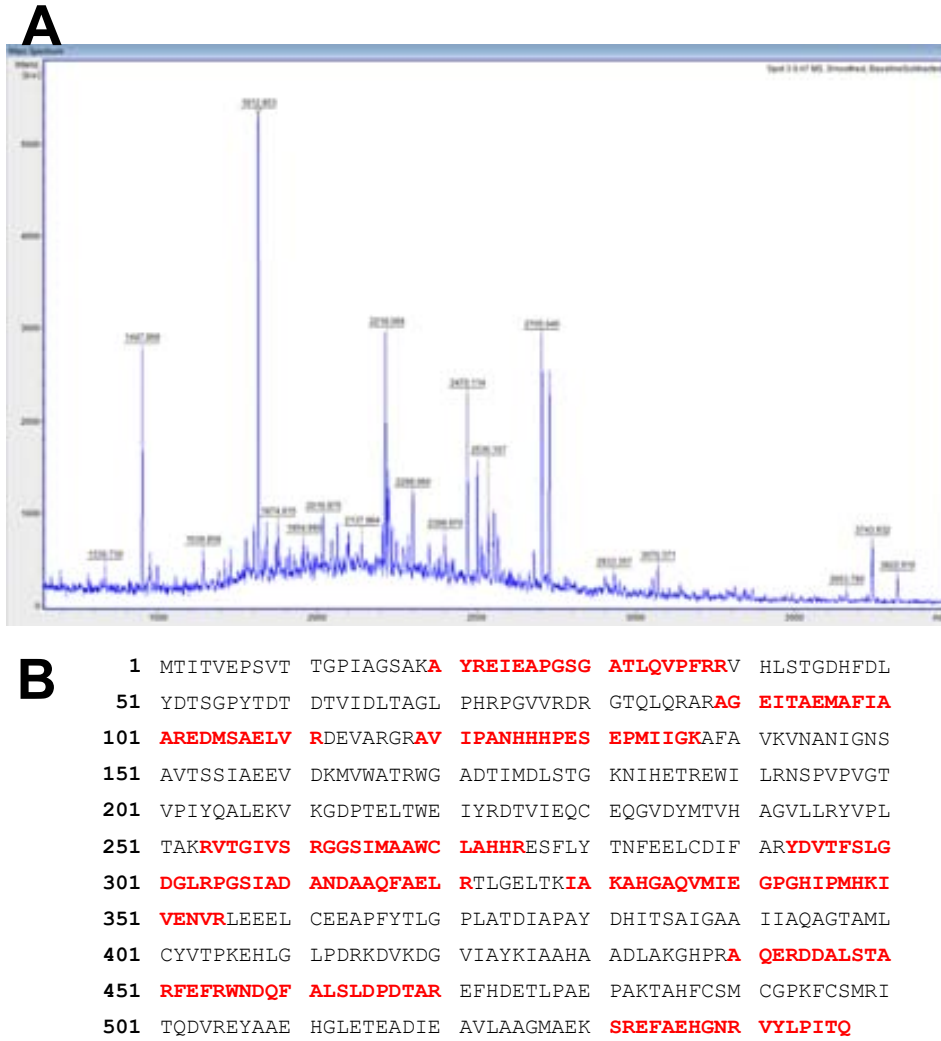
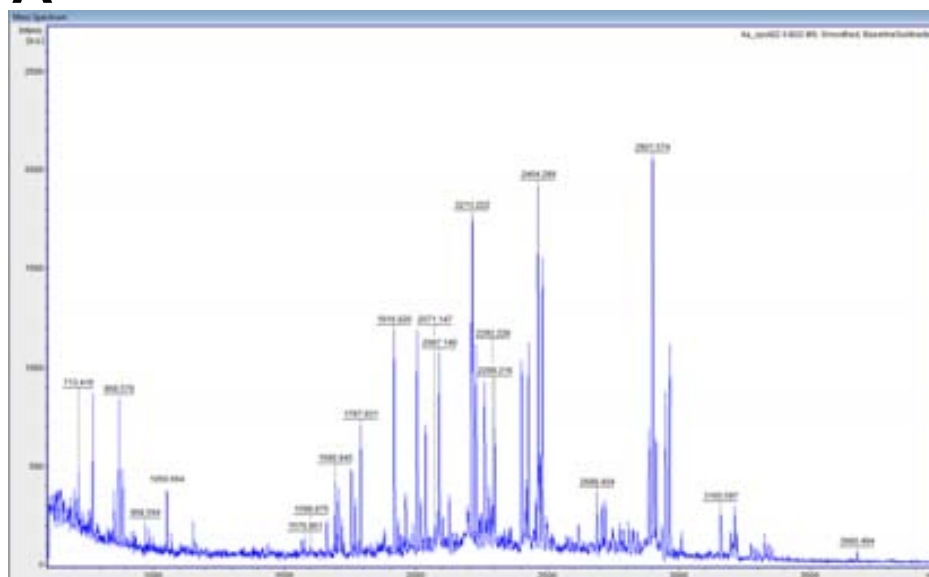


Figura 4.19. A) Espectro de masas obtenido para el spot 3, cada pico corresponde a un péptido derivado de la digestión trípica de la proteína. B) Secuencia de la proteína ThiC, en la que se muestran en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF.

A**B**

1	MTHSQRRDKL	KAQIAASGLD	AMLISDLINV	RYLSGFSGSN	GALLVFADER
51	DAVLATDGRY	RTQAASQAPD	LEVAIERAVG	RYLAGRAGEA	GVGKLG FESH
101	VVTVDGLDAL	AGALEGK NTE	LVRASGTVES	LREVKDAGEL	ALLR LACEAA
151	DAALTDLVAR	GGLRPGRTER	QVSRELEALM	LDHGADAVSF	ETIVAAGANS
201	AIPHHRPTDA	VLQVGDFVK I	DFGALVAGYH	SDMTRTFVLG	KAADWQLEIY
251	QLVAEAQQAG	RQALLPGAEL	RGVDAAARQL	IADAGYGEHF	GHGLGHGVGL
301	QIHEAPGIGV	TSAGTLLAGS	VVTVEPGVYL	PGRGGVR IED	TLVVAGGTPK
351	MPETAGQTPE	LLTRFPKELA	IL		

Figura 4.20. A) Espectro de masas obtenido para el *spot* 4, cada pico corresponde a un péptido derivado de la digestión triptica de la proteína. B) Secuencia de la proteína pepQ, en la que se muestran en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF.

También se utilizaron geles con un gradiente de pH de 7 a 11 NL (No lineal) que fueron teñidos con nitrato de plata y que se muestran en la figura 4.21.

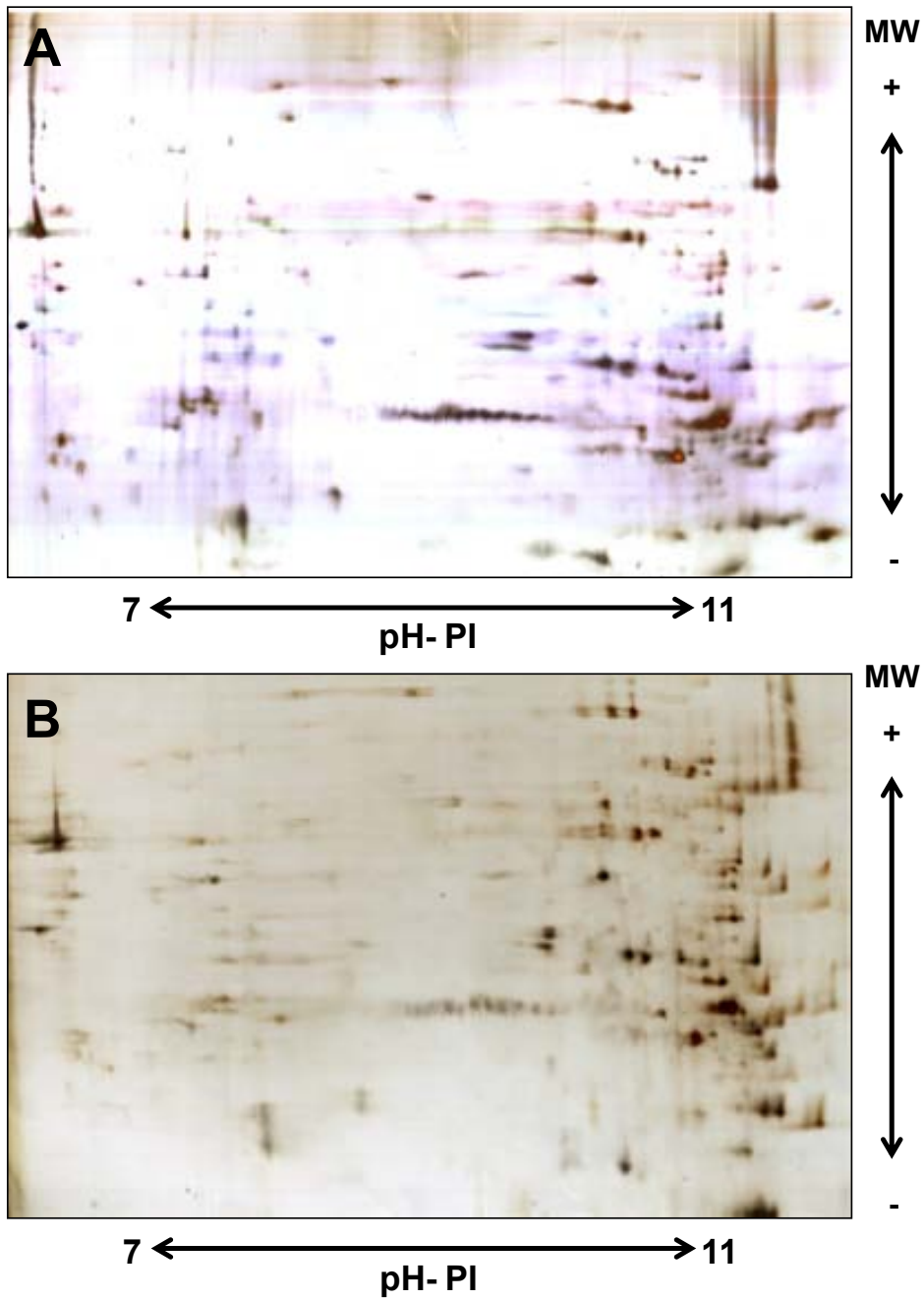


Figura 4.21. Geles 2DE de pH 7-11 NL teñidos con nitrato de plata. A) H37Rv no tratada (+DMSO) B) H37Rv tratada con TRC. Los geles fueron cargados con 100 μ g de proteína total. El marcador de masa molecular utilizado fue el BenchMark™ de Invitrogen.

El análisis comparativo de imágenes no mostró diferencias significativas en los perfiles proteicos comparados en este gradiente de pH.

Discusión



5. Discusión

La alta mortalidad y morbilidad asociada a la tuberculosis, la convierte en uno de los principales problemas de salud pública mundial. La quimioterapia es una de las principales herramientas de control de esta enfermedad a falta de una vacuna más efectiva, sin embargo el incremento en la prevalencia de la tuberculosis está estrechamente relacionado con la aparición de cepas resistentes, por lo que es necesaria una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia, con el fin de desarrollar fármacos más eficaces [138].

La implementación de tecnologías de biología molecular y la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* y otras micobacterias han permitido incrementar el conocimiento de los mecanismos de resistencia a los principales fármacos usados en el tratamiento, aunque aún queda mucho por dilucidar [184].

La resistencia en *M. tuberculosis* está dada principalmente por la impermeabilidad de la pared celular, la generación de mutaciones en genes diana, la presencia de enzimas que inactivan el fármaco y las bombas de eflujo. Muchos de estos mecanismos se inducen en respuesta al tratamiento, permitiéndole a la bacteria adaptarse y sobrevivir [137]. En este contexto, en este trabajo se estudió la implicación del posible transportador ABC Rv1686c-Rv1687c y la posible dioxigenasa Rv3161c de *M. tuberculosis* en la resistencia a fármacos. Estudios previos habían mostrado que dichos sistemas se inducen en respuesta al TRC y a otros compuestos, sugiriendo que podrían formar parte de los mecanismos de detoxificación de *M. tuberculosis* [129, 189-192].

El transportador ABC Rv1686c-Rv1687c, la dioxigenasa Rv3161c y la resistencia en *M. tuberculosis*

En primer lugar se estudió la respuesta a nivel transcripcional de los genes *Rv1687c* y *Rv3161c* al tratamiento con TRC. Los resultados obtenidos confirmaron que estos sistemas se inducen en la cepa H37Rv en presencia de TRC tal y como había sido reportado anteriormente por Betts y colaboradores [189] y Sullivan y colaboradores [129].

Para estudiar el papel de estos genes en la resistencia se construyeron mutantes deficientes en estos sistemas usando como referencia la cepa H37Rv (apartado 4.2) así como cepas sobreproductoras usando el vector de expresión pMV261 (apartado 4.3). Se determinó entonces la CMI del TRC y de otros compuestos

Discusión

(apartado 4.4.2), en donde no se observaron diferencias significativas entre la cepa salvaje H37Rv, la cepa control H37Rv (pMV261), los mutantes y las cepas sobreproductoras tanto del transportador como de la dioxigenasa. Este resultado fue inesperado teniendo en cuenta la posible función de estas proteínas y el hecho de que su expresión se induce en presencia de TRC. Así mismo, en el caso de las cepas sobreproductoras, se descartó un fallo en la sobreproducción de las proteínas ya que su expresión se confirmó a nivel transcripcional y proteico (apartado 4.3.1).

Por lo tanto aunque estos sistemas se inducen en presencia de TRC, su inducción parece no estar relacionada con la resistencia de *M. tuberculosis* al TRC ni a otros compuestos ensayados en este trabajo. Entonces, por qué se inducen estos genes en presencia del TRC? Una hipótesis podría ser que estos sistemas podrían detoxificar otros metabolitos generados en respuesta al daño inducido por el TRC. En el caso del transportador, éste podría transportar componentes de la pared celular para compensar el daño causado por la interferencia en la síntesis de los ácidos micólicos, como ha sido sugerido para el transportador Mmr de *M. tuberculosis* [158] que aunque no está implicado en el eflujo de isoniacida, es inducido por la isoniacida, la cual comparte la misma diana del TRC, la InhA. En bacterias como *E. coli* y *Salmonella enterica*, se ha descrito la sobreexpresión de genes implicados en la síntesis de la pared celular tras el tratamiento con TRC como mecanismo de protección [116, 235]. Así mismo, en *M. tuberculosis* se ha observado la inducción de genes relacionados con la síntesis de la pared en respuesta al tratamiento con etionamida, entre otros [191]. Por lo tanto, algunas proteínas de membrana pueden contribuir a eventos de remodelación de la pared en respuesta al estrés ambiental y es posible que el TRC en *M. tuberculosis* induzca una respuesta similar que resulte en la expresión de mecanismos que contrarresten el efecto deletéreo del biocida [105, 236].

El TRC en *M. tuberculosis* bloquea la síntesis de ácidos micólicos por inhibición de la enoil reductasa InhA [110]. Esta inhibición es 10000 veces menos eficiente en comparación con su homóloga en *E. coli* FabI [237]. Este hecho explicaría la mayor resistencia de *M. tuberculosis* que tiene altos valores de CMI (~5-12 µg/mL) [110, 129, 189] comparados con los bajos valores obtenidos en *E. coli* (<1 µg/mL) [106, 111, 113, 235]. Sin embargo, es posible que *M. tuberculosis* tenga otros mecanismos que contribuyan a esta resistencia. Así pues, luego de descartar la implicación del transportador y la dioxigenasa, se planteó evaluar otros factores que podrían estar relacionados con la resistencia de *M. tuberculosis* al TRC. Uno de ellos fue el papel de otras posibles bombas que pudieran detoxificar el TRC. Para ello se determinó la CMI del TRC en presencia de los inhibidores de bombas CCCP, verapamil, *o*-vanadato y

reserpina en la cepa H37Rv (apartado 4.5.1). Compuestos como el CCCP y el verapamil afectan el gradiente electroquímico de la membrana por disipación de la fuerza protónica motriz y por el bloqueo de los canales de calcio, respectivamente [78, 238]. Por su parte, el *o*-vanadato inhibe la acción de bombas de eflujo que utilizan la hidrólisis del ATP como fuente de energía [239] y la reserpina es un alcaloide vegetal con una amplia especificidad de sustrato que interacciona con ciertas bombas de eflujo como NorA de *S. aureus*, Bmr de *Bacillus subtilis* y la glicoproteína P en mamíferos [239, 240]. Estos compuestos han mostrado ser unos inhibidores efectivos de sistemas de eflujo intrínsecos en micobacterias [78, 238]. Los resultados obtenidos en este trabajo no mostraron ningún efecto de los inhibidores ensayados, que pudiera reflejarse en cambios en la CMI del TRC descartando así la implicación de bombas en la resistencia al biocida.

Otro de los factores que juega un papel importante en la resistencia intrínseca de *M. tuberculosis* es su envuelta celular, ya que ésta es una barrera muy eficiente que impide el paso de muchos fármacos. Para evaluar si parte de la resistencia intrínseca al TRC estaba dada por la pared se utilizó etambutol el cual a concentraciones sub-inhibitorias aumenta la permeabilidad de la envuelta de *M. tuberculosis*, como ha sido evidenciado en otros trabajos en los que lo han utilizado para aumentar la eficacia de fármacos como la claritromicina [228], isoniacida, rifampicina, estreptomina [229] y cefepime [230]. En otras bacterias como *P. aeruginosa*, se ha observado que la pared celular está implicada en la resistencia al TRC, de manera que el uso de agentes permeabilizantes como la polimixina B, el compuesto 48/80 y el EDTA, hace que esta bacteria sea más susceptible al biocida [241]. Los resultados obtenidos en *M. tuberculosis* mostraron que aunque no se observaron variaciones en la CMI del TRC en presencia de etambutol, sí se observó una ligera disminución en el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv cuando se hizo el seguimiento de la OD₆₀₀ en presencia de etambutol y TRC (apartado 4.5.2), por lo que es posible que la pared tenga un papel en la resistencia de *M. tuberculosis* al biocida. La no variación de la CMI puede estar relacionada con el bajo efecto del etambutol y la concentración utilizada (0.25 µg/mL) que fue ligeramente menor que la utilizada en las curvas de crecimiento (0.3 µg/mL).

Por último, se estudió la respuesta de *M. tuberculosis* al tratamiento con TRC, pero a nivel proteico. Para ello se comparó el proteoma de cultivos de H37Rv tratados y no tratados con TRC (apartado 4.5.3). Los resultados mostraron que el tratamiento de *M. tuberculosis* con TRC produce una mayor abundancia de dioxigenasa Rv3161c, sin embargo no se detectó la inducción ni del transportador ni de otras proteínas.

Discusión

La proteína codificada por *Rv3161c* fue detectada en un gradiente de pH de 4 a 7 y cabe resaltar que la detección del transportador u otras proteínas pudo verse afectada por las limitaciones de la técnica de 2DE, en la que la obtención de geles del gradiente de pH básico (en donde se esperaba encontrar el transportador) es significativamente más compleja dada la dificultad de enfocar proteínas básicas. Así mismo con esta técnica es difícil detectar proteínas que se encuentran en baja abundancia o proteínas de membrana las cuales son difíciles de resolver e identificar [236].

También se observó que el efecto del tratamiento con TRC en *M. tuberculosis* resulta en una disminución en la abundancia de tres proteínas, de las cuales dos pudieron ser identificadas: la proteína hipotética ThiC (Rv0423c) y la peptidasa hipotética PepQ (Rv2535c). La proteína ThiC está implicada en la síntesis de la tiamina o vitamina B1, la cual es un importante cofactor de varias enzimas de vías metabólicas como la glicólisis, la vía de la pentosa fosfato, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la síntesis de aminoácidos [242, 243]. En *M. tuberculosis*, el gen codificante para esta proteína es esencial para el crecimiento *in vitro* [244, 245]. Por su parte la peptidasa PepQ podría estar implicada en la digestión molecular y reducción de proteínas a aminoácidos que serán utilizados en diferentes procesos celulares como fuentes de energía o como subunidades para la biosíntesis. En *M. tuberculosis*, la mutación del gen codificante para esta peptidasa reduce el crecimiento *in vitro* de H37Rv [244]. El análisis de expresión génica realizado por Betts y colaboradores [189] no reporta la identificación de estas proteínas en particular, pero no se descarta que formen parte de los 23 genes des-regulados que pertenecen a la misma clase funcional (metabolismo intermediario y respiración) que ThiC y PepQ de acuerdo al Tuberculist, ya que ese trabajo no lista la totalidad de genes obtenidos. La disminución en la abundancia de estas proteínas puede también estar relacionada con algún cambio en la traducción o con la vida media de estas proteínas.

Por otro lado, en el mismo estudio se detectaron 207 genes inducidos y 168 genes des-regulados en respuesta al tratamiento con TRC (5 veces la CMI) [189], por lo que los resultados a nivel transcripcional no reflejan los obtenidos en este trabajo a nivel proteómico, en el que se detectó sólo una proteína en mayor abundancia y tres en menor. Esta diferencia podría estar relacionada con modificaciones post traduccionales así como las limitaciones inherentes a las técnicas utilizadas [246]. Este hecho pone de manifiesto que los patrones de expresión génica son necesarios pero insuficientes por si solos en el estudio de un sistema biológico [246].

La respuesta de *M. tuberculosis* al TRC a nivel proteico difiere de la de otros microorganismos como *E. coli* en el que hay un aumento de proteínas como FabI, bombas de eflujo como TolC, proteínas de membrana relacionadas con virulencia como OmpA, OmpX y NmpC y otras proteínas involucradas en el metabolismo general [247]. Así mismo, en *S. enterica* también se detectó un aumento en la abundancia de FabI, TolC y de una serie de proteínas relacionadas con la producción de energía celular consistente con un incremento en su demanda para ser utilizada en los mecanismos de defensa celular y reparación [116, 248]. Por lo que la respuesta al TRC es caso-dependiente y obedece al tipo de bacteria, la concentración del biocida y otras variables del entorno [249, 250].

Los genes *Rv1686c-Rv1687c* y *Rv3161c* y la virulencia de *M. tuberculosis*

Una de las características más importantes de *M. tuberculosis* es su capacidad para sobrevivir y proliferar en el interior de los macrófagos, siendo capaz de adaptarse a ambientes muy diferentes como los encontrados en los fagosomas y los granulomas [251]. En gram negativos las bombas de eflujo se han relacionado con múltiples funciones relacionadas con la virulencia, incluyendo la colonización del intestino, la adherencia y la invasión de las células [89]. Algunas bombas de *M. tuberculosis* participan en actividades similares posiblemente para asegurar la supervivencia intracelular contribuyendo así a la virulencia del bacilo [252]. Por ejemplo el transportador BacA codificado por *Rv1819c* juega un rol en el mantenimiento de la infección crónica en ratones y aunque no está implicado en el transporte de antimicrobianos se ha sugerido que éste puede participar en el transporte de ciertos péptidos antimicrobianos y lípidos que son importantes en la progresión de la infección en el huésped [253, 254]. Por su parte, el operón formado por *lprG* (*Rv1411*) y *P55* (*Rv1410*) es requerido para mantener la composición normal de la superficie celular en *M. smegmatis* y mutantes de *Rv1411* en *M. tuberculosis* que no producen LprG o P55 generan cepas atenuadas en ratón; además, P55 está implicado en la respuesta al estrés oxidativo y el crecimiento normal *in vitro* [165, 255, 256].

Otros estudios han mostrado que cuando *M. tuberculosis* infecta macrófagos, es más resistente a la isoniacida y a la rifampicina; este hecho fue explicado por la presencia de la bomba de eflujo *Rv1258c* que media la tolerancia a la rifampicina y que además promueve el crecimiento bacteriano intracelular en ausencia de antimicrobianos y que por tanto es considerada como un factor de virulencia. Además, esta bomba junto con otras anotadas en el genoma, se inducen a nivel transcripcional

Discusión

una vez infectan los macrófagos como respuesta a los diferentes mecanismos de defensa del huésped [252].

Dentro de las bombas que son inducidas en macrófagos se encuentra el transportador ABC Rv1686c-Rv1687c, que también es inducido en respuesta al H₂O₂ y a la privación de nutrientes [193, 194]. Por lo anterior, se evaluó el papel de este transportador en la virulencia de *M. tuberculosis*, infectando la línea de macrófagos J774 A.1 con el mutante Δ 8687 5.31, la cepa sobreproductora 8687-1 y la H37Rv como control (apartado 4.4.3). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias entre la cepa control, el mutante y la cepa sobreproductora. Así mismo, aunque no habían reportes en la bibliografía que relacionaran la dioxigenasa con la virulencia, se evaluó el efecto de la mutación y la sobre producción de este sistema en la virulencia de *M. tuberculosis* en macrófagos pero no se encontraron diferencias entre las cepas ensayadas y el control.

También, se realizaron ensayos con H₂O₂ para estudiar la resistencia de *M. tuberculosis* a este compuesto. Para ello se evaluó la viabilidad de las cepas H37Rv, las cepas sobreproductoras del transportador y los mutantes, pero los resultados tampoco mostraron diferencias entre las cepas sobreproductoras, los mutantes respecto a la H37Rv.

En conjunto, estos resultados apuntan a que ni el transportador ABC ni la dioxigenasa están relacionados con la virulencia de *M. tuberculosis*, ni tampoco son genes esenciales en la proliferación del bacilo al interior de los macrófagos, confirmando lo descrito por Rengarajan y colaboradores quienes en un análisis de mutagénesis por transposones, no observaron que estos sistemas estuvieran relacionados con la proliferación del bacilo [257]. Sin embargo en el caso del transportador, su inducción podría estar relacionada con algún mecanismo compensatorio como respuesta a la presión ejercida por el sistema inmune del huésped.

Hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos en los ensayos de infección pudieron verse influenciados por el hecho de trabajar con macrófagos no activados con IFN- γ . Igualmente este tipo de ensayos son *in vitro* y estas condiciones no son las mismas que las encontradas *in vivo*, por lo que sería interesante estudiar el efecto de la mutación y la sobreproducción del transportador en un modelo animal que permita evaluar una respuesta que sea más acorde con la realidad.

Conclusiones



6. Conclusiones

1. La expresión de los genes *Rv1687c* y *Rv3161c* se inducen unas 1000 veces a nivel transcripcional en respuesta al tratamiento con triclosán.
2. El tratamiento de *M. tuberculosis* con triclosán induce una mayor abundancia de la proteína codificada por *Rv3161c* y una disminución en la abundancia de las proteínas ThiC y PepQ.
3. Ni el transportador ABC *Rv1686c-Rv1687c* ni la dioxigenasa *Rv3161c* están directamente implicados en la resistencia de *M. tuberculosis* al triclosán u otros antibióticos ensayados en este trabajo.
4. Los genes *Rv1686c-Rv1687c* y *Rv3161c* no son necesarios para la virulencia de *M. tuberculosis* en macrófagos *in vitro*.
5. La resistencia natural al triclosán en *M. tuberculosis* no parece ser debida a la actividad de bombas de eflujo.
6. La impermeabilidad de la pared celular sería en parte responsable de la resistencia intrínseca de *M. tuberculosis* al triclosán.

Bibliografía

7. Bibliografía

1. Rinaggio, J., *Tuberculosis*. Dent Clin North Am, 2003. **47**(3): p. 449-65, v.
2. Zink, A.R., et al., *Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt*. Epidemiol Infect, 2003. **130**(2): p. 239-49.
3. Ruggiero, D., *A Glimpse at the colorful History of TB: Its Toll and Its effect on the U.S. and the World*, in *TB Notes*, C.f.D.C.a.P. (CDC), Editor. 2000: Atlanta. p. 1-7.
4. Bates, J.H. and W.W. Stead, *The history of tuberculosis as a global epidemic*. Med Clin North Am, 1993. **77**(6): p. 1205-17.
5. Zakhm, F., et al., *Computational genomics-proteomics and Phylogeny analysis of twenty one mycobacterial genomes (Tuberculosis & non Tuberculosis strains)*. Microb Inform Exp, 2012. **2**(1): p. 7.
6. Murray, J.F., *Mycobacterium tuberculosis and the cause of consumption: from discovery to fact*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **169**(10): p. 1086-8.
7. Cummings, K.J., *Tuberculosis control: challenges of an ancient and ongoing epidemic*. Public Health Rep, 2007. **122**(5): p. 683-92.
8. Keshavjee, S. and P.E. Farmer, *Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine*. N Engl J Med, 2012. **367**(10): p. 931-6.
9. WHO, *Global Tuberculosis Report 2012*. 2012: Geneva.
10. Euzéby, J.P. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. 1997 [cited 2013 Marzo]; Available from: <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>.
11. Rastogi, N., E. Legrand, and C. Sola, *The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis*. Rev Sci Tech, 2001. **20**(1): p. 21-54.
12. Brennan, P.J. and H. Nikaido, *The envelope of mycobacteria*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 29-63.
13. McEvoy, C.R., et al., *The role of IS6110 in the evolution of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2007. **87**(5): p. 393-404.
14. Issa, R., et al., *Detection and discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012. **72**(1): p. 62-7.
15. Lew, J.M., et al., *TubercuList--10 years after*. Tuberculosis (Edinb), 2011. **91**(1): p. 1-7.
16. Cole, S.T., et al., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 537-44.

Bibliografía

17. Brodin, P., C. Demangel, and S. Cole, *Introduction to Functional Genomics of the Mycobacterium tuberculosis Complex*, in *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, S. Cole, et al., Editors. 2005, ASM Press: Whashington. p. 143-153.
18. Mehaffy, M.C., N.A. Kruh-Garcia, and K.M. Dobos, *Prospective on Mycobacterium tuberculosis proteomics*. J Proteome Res, 2012. **11**(1): p. 17-25.
19. Belisle, J., et al., *The Proteome of Mycobacterium tuberculosis*, in *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, S. Cole, et al., Editors. 2005, ASM Press: Whashington. p. 235-260.
20. Mattow, J., et al., *Two-Dimensional Gel Electrophoresis-Based Proteomics of Mycobacteria*, in *Mycobacteria Protocols*, T. Parish and A. Brown, Editors. 2008, Humana Press: Totowa. p. 111-141.
21. Jagusztyn-Krynicka, E.K., P. Roszczenko, and A. Grabowska, *Impact of proteomics on anti-Mycobacterium tuberculosis (MTB) vaccine development*. Pol J Microbiol, 2009. **58**(4): p. 281-7.
22. Betts, J.C., et al., *Comparison of the proteome of Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551*. Microbiology, 2000. **146 Pt 12**: p. 3205-16.
23. Pfeiffer, C., et al., *Protein expression by a Beijing strain differs from that of another clinical isolate and Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 4): p. 1139-50.
24. Jungblut, P.R., et al., *Comparative proteome analysis of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens*. Mol Microbiol, 1999. **33**(6): p. 1103-17.
25. Malen, H., et al., *Comparison of membrane proteins of Mycobacterium tuberculosis H37Rv and H37Ra strains*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 18.
26. Kelkar, D.S., et al., *Proteogenomic analysis of Mycobacterium tuberculosis by high resolution mass spectrometry*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(12): p. M111011627.
27. Bell, C., et al., *Characterization of the Mycobacterium tuberculosis proteome by liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics techniques: a comprehensive resource for tuberculosis research*. J Proteome Res, 2012. **11**(1): p. 119-30.
28. Zheng, J., et al., *A comprehensive proteomic analysis of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin using high resolution Fourier transform mass spectrometry*. J Proteomics, 2012. **77**: p. 357-71.

29. Giri, P.K., et al., *Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from M. tuberculosis-infected and culture filtrate protein-treated macrophages*. *Proteomics*, 2010. **10**(17): p. 3190-202.
30. de Souza, G.A. and H.G. Wiker, *A proteomic view of mycobacteria*. *Proteomics*, 2011. **11**(15): p. 3118-27.
31. Draper, P. and M. Daffé, *The Cell Envelope of Mycobacterium tuberculosis with Special Reference to the Capsule and Outer Permeability Barrier*, in *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, S. Cole, et al., Editors. 2005, ASM Press: New York. p. 261.
32. Niederweis, M., et al., *Mycobacterial outer membranes: in search of proteins*. *Trends Microbiol*, 2010. **18**(3): p. 109-16.
33. Hett, E.C. and E.J. Rubin, *Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008. **72**(1): p. 126-56, table of contents.
34. Donohue-Rolfe, A. *Microbial Pathogenesis*. [cited 2013 Agosto]; Available from: <http://www.studyblue.com/notes/n/mycobacterium/deck/1232513>.
35. Brennan, P.J. and D.C. Crick, *The cell-wall core of Mycobacterium tuberculosis in the context of drug discovery*. *Curr Top Med Chem*, 2007. **7**(5): p. 475-88.
36. Daffé, M., *The Global Architecture of the Mycobacterial Cell Envelope*, in *The Mycobacterial Cell Envelope*, M. Daffé and J.-M. Reyrat, Editors. 2008, ASM Press: Washington, DC.
37. Kremer, L. and G. Besra, *A Waxy Tale, by Mycobacterium tuberculosis*, in *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, S. Cole, Editor. 2005, ASM Press: Whashington, D.C. p. 287-305.
38. Kaur, D., et al., *Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Appl Microbiol*, 2009. **69**: p. 23-78.
39. Nguyen, L. and C.J. Thompson, *Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm*. *Trends Microbiol*, 2006. **14**(7): p. 304-12.
40. Svenson, S., et al., *Towards new tuberculosis vaccines*. *Hum Vaccin*, 2010. **6**(4): p. 309-17.
41. Knechel, N.A., *Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis*. *Crit Care Nurse*, 2009. **29**(2): p. 34-43; quiz 44.
42. Gengenbacher, M. and S.H. Kaufmann, *Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy*. *FEMS Microbiol Rev*, 2012. **36**(3): p. 514-32.
43. Abbas, A. and A. Lichtman, *Effector Mechanisms of Cell-Mediated Immunity*, in *Cellular and Molecular Immunology*, A. Abbas and A. Lichtman, Editors. 2005, Elsevier Saunders: Philadelphia. p. 354.

Bibliografía

44. Flynn, J.L. and J. Chan, *Tuberculosis: latency and reactivation*. Infect Immun, 2001. **69**(7): p. 4195-201.
45. Sharma, S.K., et al., *Miliary tuberculosis: new insights into an old disease*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(7): p. 415-30.
46. Hopewell, P. and R. Jasmer, *Overview of Clinical Tuberculosis*, in *Tuberculosis and The Tubercle Bacillus*, M. Daffe and J.-M. Reyrat, Editors. 2008, ASM Press: Washington. p. 15.
47. Jayaswal, S., et al., *Identification of host-dependent survival factors for intracellular Mycobacterium tuberculosis through an siRNA screen*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000839.
48. Ehrh, S. and D. Schnappinger, *Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses*. Cell Microbiol, 2009. **11**(8): p. 1170-8.
49. Koo, M.S., S. Subbian, and G. Kaplan, *Strain specific transcriptional response in Mycobacterium tuberculosis infected macrophages*. Cell Commun Signal, 2012. **10**(1): p. 2.
50. Mukhopadhyay, S., S. Nair, and S. Ghosh, *Pathogenesis in tuberculosis: transcriptomic approaches to unraveling virulence mechanisms and finding new drug targets*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(2): p. 463-85.
51. Meena, L.S. and Rajni, *Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. FEBS J, 2010. **277**(11): p. 2416-27.
52. Borrero, R., et al., *Mycobacterium tuberculosis: factores de virulencia*. VaccciMonitor, 2011. **20**(1): p. 34-38.
53. Maulen, N.P., *[Virulence factors of Mycobacterium tuberculosis]*. Rev Med Chil, 2011. **139**(12): p. 1605-10.
54. Fenton, M., L. Riley, and L. Schlesinger, *Receptor-Mediated Recognition of Mycobacterium tuberculosis by Host Cells*, in *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, S. Cole, et al., Editors. 2005, ASM Press: Whashington. p. 405-426.
55. Zuniga, J., et al., *Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 193923.
56. Abramovitch, R.B., et al., *aprABC: a Mycobacterium tuberculosis complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome*. Mol Microbiol, 2011. **80**(3): p. 678-94.
57. McNERNEY, R., et al., *Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities*. J Infect Dis, 2012. **205 Suppl 2**: p. S147-58.

58. Parsons, L.M., et al., *Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(2): p. 314-50.
59. Eichbaum, Q. and E.J. Rubin, *Tuberculosis. Advances in laboratory diagnosis and drug susceptibility testing*. Am J Clin Pathol, 2002. **118 Suppl**: p. S3-17.
60. Yang, H., N.A. Kruh-Garcia, and K.M. Dobos, *Purified protein derivatives of tuberculin--past, present, and future*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **66**(3): p. 273-80.
61. Andersen, P. and T.M. Doherty, *The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(8): p. 656-62.
62. WHO, *Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines*. 2011, Geneva.
63. Orme, I.M., *The Achilles heel of BCG*. Tuberculosis (Edinb), 2010. **90**(6): p. 329-32.
64. Zwerling, A., et al., *The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices*. PLoS Med, 2011. **8**(3): p. e1001012.
65. Baumann, S., A. Nasser Eddine, and S.H. Kaufmann, *Progress in tuberculosis vaccine development*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(4): p. 438-48.
66. Kaufmann, S.H., *Tuberculosis vaccines: Time to think about the next generation*. Semin Immunol, 2013. **25**(2): p. 172-81.
67. Cardona, P.J., *RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection*. Tuberculosis (Edinb), 2006. **86**(3-4): p. 273-89.
68. Nambiar, J.K., et al., *Protective immunity afforded by attenuated, PhoP-deficient Mycobacterium tuberculosis is associated with sustained generation of CD4+ T-cell memory*. Eur J Immunol, 2012. **42**(2): p. 385-92.
69. García, R., et al., *Tratamiento actual de la tuberculosis*. Anales de Medicina Interna, 2003. **20**(2): p. 91-100.
70. Beena and D.S. Rawat, *Antituberculosis Drug Research: A Critical Overview*. Med Res Rev, 2012.
71. Yew, W.W., C. Lange, and C.C. Leung, *Treatment of tuberculosis: update 2010*. Eur Respir J, 2011. **37**(2): p. 441-62.
72. Onyebujoh, P., et al., *Treatment of tuberculosis: present status and future prospects*. Bull World Health Organ, 2005. **83**(11): p. 857-65.
73. Amaral, L. and M. Viveiros, *Why thioridazine in combination with antibiotics cures extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis infections*. Int J Antimicrob Agents, 2012. **39**(5): p. 376-80.

Bibliografía

74. Curry, F., *Drug-Resistant Tuberculosis*. 2 ed. 2008: National Tuberculosis Center and California Department of Public Health.
75. Schwalbe, R., L. Steele-Moore, and A. Goodwin, *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, ed. R. Schwalbe, L. Steele-Moore, and A. Goodwin. 2007, Boca Raton: CRC Press.
76. Ginsberg, A.M., *Drugs in development for tuberculosis*. *Drugs*, 2010. **70**(17): p. 2201-14.
77. Ruiz-Manzano, J., et al., *[Diagnosis and treatment of tuberculosis]*. *Arch Bronconeumol*, 2008. **44**(10): p. 551-66.
78. Rodrigues, L., et al., *Inhibition of drug efflux in mycobacteria with phenothiazines and other putative efflux inhibitors*. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2011. **6**(2): p. 118-27.
79. Harbottle, H., et al., *Genetics of antimicrobial resistance*. *Anim Biotechnol*, 2006. **17**(2): p. 111-24.
80. Poole, K., *Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance*. *J Appl Microbiol*, 2002. **92 Suppl**: p. 55S-64S.
81. Wright, G.D., *The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity*. *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(3): p. 175-86.
82. Andersson, D.I. and D. Hughes, *Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations*. *FEMS Microbiol Rev*, 2011. **35**(5): p. 901-11.
83. Canton, R. and M.I. Morosini, *Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics*. *FEMS Microbiol Rev*, 2011. **35**(5): p. 977-91.
84. De Rossi, E., J.A. Ainsa, and G. Riccardi, *Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question*. *FEMS Microbiol Rev*, 2006. **30**(1): p. 36-52.
85. Wright, G.D., *Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005. **57**(10): p. 1451-70.
86. Putman, M., H.W. van Veen, and W.N. Konings, *Molecular properties of bacterial multidrug transporters*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000. **64**(4): p. 672-93.
87. Fernandez, L. and R.E. Hancock, *Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance*. *Clin Microbiol Rev*, 2012. **25**(4): p. 661-81.
88. De Rossi, E., et al., *The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med*, 2002. **8**(11): p. 714-24.
89. Piddock, L.J., *Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance*. *Nat Rev Microbiol*, 2006. **4**(8): p. 629-36.

90. Li, X.Z. and H. Nikaido, *Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update*. *Drugs*, 2009. **69**(12): p. 1555-623.
91. Opazo, A.C., et al., *[Multi-drug efflux pumps and antibiotic resistance in Acinetobacter baumannii]*. *Rev Chilena Infectol*, 2009. **26**(6): p. 499-503.
92. Krulwich, T.A., et al., *Do physiological roles foster persistence of drug/multidrug-efflux transporters? A case study*. *Nat Rev Microbiol*, 2005. **3**(7): p. 566-72.
93. Braibant, M., P. Gilot, and J. Content, *The ATP binding cassette (ABC) transport systems of Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000. **24**(4): p. 449-67.
94. Davidson, A.L. and J. Chen, *ATP-binding cassette transporters in bacteria*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 241-68.
95. Mendez, C. and J.A. Salas, *The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms*. *Res Microbiol*, 2001. **152**(3-4): p. 341-50.
96. Li, X.Z. and H. Nikaido, *Efflux-mediated drug resistance in bacteria*. *Drugs*, 2004. **64**(2): p. 159-204.
97. Higgins, C.F., *Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters*. *Nature*, 2007. **446**(7137): p. 749-57.
98. Paulsen, I.T., M.H. Brown, and R.A. Skurray, *Proton-dependent multidrug efflux systems*. *Microbiol Rev*, 1996. **60**(4): p. 575-608.
99. Poole, K., *Bacterial Multidrug Efflux Pumps Serve Other Functions*. *Microbe* 2008. **3**(4): p. 179-185.
100. Nikaido, H., *Multidrug resistance in bacteria*. *Annu Rev Biochem*, 2009. **78**: p. 119-46.
101. Ortega Morente, E., et al., *Biocide tolerance in bacteria*. *Int J Food Microbiol*, 2013. **162**(1): p. 13-25.
102. Poole, K., *Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms*. *Ann Med*, 2007. **39**(3): p. 162-76.
103. Poole, K., *Efflux-mediated antimicrobial resistance*. *J Antimicrob Chemother*, 2005. **56**(1): p. 20-51.
104. Yazdankhah, S.P., et al., *Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview*. *Microb Drug Resist*, 2006. **12**(2): p. 83-90.
105. Escalada, M.G., et al., *Triclosan-bacteria interactions: single or multiple target sites?* *Lett Appl Microbiol*, 2005. **41**(6): p. 476-81.
106. McMurry, L.M., M. Oethinger, and S.B. Levy, *Triclosan targets lipid synthesis*. *Nature*, 1998. **394**(6693): p. 531-2.

Bibliografía

107. Hoang, T.T. and H.P. Schweizer, *Characterization of Pseudomonas aeruginosa enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis*. J Bacteriol, 1999. **181**(17): p. 5489-97.
108. Heath, R.J., et al., *Inhibition of the Staphylococcus aureus NADPH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4654-9.
109. McMurry, L.M., P.F. McDermott, and S.B. Levy, *Genetic evidence that InhA of Mycobacterium smegmatis is a target for triclosan*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(3): p. 711-3.
110. Parikh, S.L., G. Xiao, and P.J. Tonge, *Inhibition of InhA, the enoyl reductase from Mycobacterium tuberculosis, by triclosan and isoniazid*. Biochemistry, 2000. **39**(26): p. 7645-50.
111. Heath, R.J. and C.O. Rock, *A triclosan-resistant bacterial enzyme*. Nature, 2000. **406**(6792): p. 145-6.
112. Escalada, M.G., et al., *Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(6): p. 879-82.
113. McMurry, L.M., M. Oethinger, and S.B. Levy, *Overexpression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 1998. **166**(2): p. 305-9.
114. Sanchez, P., E. Moreno, and J.L. Martinez, *The biocide triclosan selects Stenotrophomonas maltophilia mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(2): p. 781-2.
115. Braoudaki, M. and A.C. Hilton, *Mechanisms of resistance in Salmonella enterica adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan*. Int J Antimicrob Agents, 2005. **25**(1): p. 31-7.
116. Webber, M.A., et al., *Triclosan resistance in Salmonella enterica serovar Typhimurium*. J Antimicrob Chemother, 2008. **62**(1): p. 83-91.
117. Lin, J., L.O. Michel, and Q. Zhang, *CmeABC functions as a multidrug efflux system in Campylobacter jejuni*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(7): p. 2124-31.
118. Pumbwe, L., et al., *Bacteroides fragilis BmeABC efflux systems additively confer intrinsic antimicrobial resistance*. J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(1): p. 37-46.

119. Chuanchuen, R., R.R. Karkhoff-Schweizer, and H.P. Schweizer, *High-level triclosan resistance in Pseudomonas aeruginosa is solely a result of efflux*. Am J Infect Control, 2003. **31**(2): p. 124-7.
120. Mima, T., et al., *Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of Pseudomonas aeruginosa requiring two membrane fusion proteins*. J Bacteriol, 2007. **189**(21): p. 7600-9.
121. Chen, J., et al., *An RND-type multidrug efflux pump SdeXY from Serratia marcescens*. J Antimicrob Chemother, 2003. **52**(2): p. 176-9.
122. Chuanchuen, R., et al., *Cross-resistance between triclosan and antibiotics in Pseudomonas aeruginosa is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(2): p. 428-32.
123. Mazzariol, A., et al., *High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of Escherichia coli overproduce multidrug efflux protein AcrA*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(12): p. 3441-3.
124. Meade, M.J., R.L. Waddell, and T.M. Callahan, *Soil bacteria Pseudomonas putida and Alcaligenes xylosoxidans subsp. denitrificans inactivate triclosan in liquid and solid substrates*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **204**(1): p. 45-8.
125. Hundt, K., et al., *Transformation of triclosan by Trametes versicolor and Pycnoporus cinnabarinus*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(9): p. 4157-60.
126. Sivaraman, S., et al., *Inhibition of the bacterial enoyl reductase FabI by triclosan: a structure-reactivity analysis of FabI inhibition by triclosan analogues*. J Med Chem, 2004. **47**(3): p. 509-18.
127. Massengo-Tiasse, R.P. and J.E. Cronan, *Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(9): p. 1507-17.
128. Freundlich, J.S., et al., *Triclosan derivatives: towards potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant Mycobacterium tuberculosis*. ChemMedChem, 2009. **4**(2): p. 241-8.
129. Sullivan, T.J., et al., *High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis*. ACS Chem Biol, 2006. **1**(1): p. 43-53.
130. Boyne, M.E., et al., *Targeting fatty acid biosynthesis for the development of novel chemotherapeutics against Mycobacterium tuberculosis: evaluation of A-ring-modified diphenyl ethers as high-affinity InhA inhibitors*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(10): p. 3562-7.

Bibliografía

131. Stone, G.W., et al., *Mechanism of action of NB2001 and NB2030, novel antibacterial agents activated by beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(2): p. 477-83.
132. Stec, J., et al., *Modification of Triclosan Scaffold in Search of Improved Inhibitors for Enoyl-Acyl Carrier Protein (ACP) Reductase in Toxoplasma gondii*. ChemMedChem, 2013. **8**(7): p. 1138-60.
133. Chiang, C.Y., R. Centis, and G.B. Migliori, *Drug-resistant tuberculosis: past, present, future*. Respirology, 2010. **15**(3): p. 413-32.
134. Jassal, M. and W.R. Bishai, *Extensively drug-resistant tuberculosis*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(1): p. 19-30.
135. Shehzad, A., et al., *Challenges in the development of drugs for the treatment of tuberculosis*. Braz J Infect Dis, 2013. **17**(1): p. 74-81.
136. Lemos, A.C. and E.D. Matos, *Multidrug-resistant tuberculosis*. Braz J Infect Dis, 2013. **17**(2): p. 239-46.
137. Balganesh, M., et al., *Efflux pumps of Mycobacterium tuberculosis play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(5): p. 2643-51.
138. da Silva, P.E., et al., *Efflux as a mechanism for drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011. **63**(1): p. 1-9.
139. Louw, G.E., et al., *A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(8): p. 3181-9.
140. Liu, J., H.E. Takiff, and H. Nikaido, *Active efflux of fluoroquinolones in Mycobacterium smegmatis mediated by LfrA, a multidrug efflux pump*. J Bacteriol, 1996. **178**(13): p. 3791-5.
141. De Rossi, E., et al., *Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(8): p. 1931-7.
142. Ainsa, J.A., et al., *Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 1998. **180**(22): p. 5836-43.
143. Choudhuri, B.S., et al., *Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes drrA and drrB of Mycobacterium tuberculosis*. Biochem J, 2002. **367**(Pt 1): p. 279-85.
144. Pasca, M.R., et al., *Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(8): p. 3175-8.

145. Danilchanka, O., C. Mailaender, and M. Niederweis, *Identification of a novel multidrug efflux pump of Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**(7): p. 2503-11.
146. Balganesh, M., et al., *Rv1218c, an ABC transporter of Mycobacterium tuberculosis with implications in drug discovery*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(12): p. 5167-72.
147. Paulsen, I. *Transport DB*. 2002-2013 Febrero 2013; Available from: <http://www.membranetransport.org/>.
148. Pasca, M.R., et al., *mmpL7 gene of Mycobacterium tuberculosis is responsible for isoniazid efflux in Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(11): p. 4775-7.
149. Domenech, P., M.B. Reed, and C.E. Barry, 3rd, *Contribution of the Mycobacterium tuberculosis MmpL protein family to virulence and drug resistance*. *Infect Immun*, 2005. **73**(6): p. 3492-501.
150. Camacho, L.R., et al., *Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of Mycobacterium tuberculosis. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(23): p. 19845-54.
151. Domenech, P., et al., *The role of MmpL8 in sulfatide biogenesis and virulence of Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(20): p. 21257-65.
152. Milano, A., et al., *Azole resistance in Mycobacterium tuberculosis is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2009. **89**(1): p. 84-90.
153. Silva, P.E., et al., *Characterization of P55, a multidrug efflux pump in Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. **45**(3): p. 800-4.
154. Siddiqi, N., et al., *Mycobacterium tuberculosis isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump*. *Infection*, 2004. **32**(2): p. 109-11.
155. Ramon-Garcia, S., et al., *Contribution of the Rv2333c efflux pump (the Stp protein) from Mycobacterium tuberculosis to intrinsic antibiotic resistance in Mycobacterium bovis BCG*. *J Antimicrob Chemother*, 2007. **59**(3): p. 544-7.
156. Gupta, A.K., et al., *jefA (Rv2459), a drug efflux gene in Mycobacterium tuberculosis confers resistance to isoniazid & ethambutol*. *Indian J Med Res*, 2010. **132**: p. 176-88.
157. De Rossi, E., et al., *mmr, a Mycobacterium tuberculosis gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors*. *J Bacteriol*, 1998. **180**(22): p. 6068-71.

Bibliografía

158. Rodrigues, L., et al., *Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(2): p. 751-7.
159. Mishra, M.N. and L. Daniels, *Characterization of the MSMEG_2631 gene (mmp) encoding a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family protein in Mycobacterium smegmatis and exploration of its polyspecific nature using biolog phenotype microarray*. J Bacteriol, 2013. **195**(7): p. 1610-21.
160. Colangeli, R., et al., *The Mycobacterium tuberculosis iniA gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol*. Mol Microbiol, 2005. **55**(6): p. 1829-40.
161. McDermott, P.F., et al., *Multidrug resistance following expression of the Escherichia coli marA gene in Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol, 1998. **180**(11): p. 2995-8.
162. Schaller, A., et al., *Salicylate reduces susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to multiple antituberculosis drugs*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(8): p. 2636-9.
163. Sarathy, J., V. Dartois, and E. Lee, *The Role of Transport Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis Drug Resistance and Tolerance*. Pharmaceuticals, 2012. **5**(11): p. 1210-1235.
164. Adams, K.N., et al., *Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism*. Cell, 2011. **145**(1): p. 39-53.
165. Ramon-Garcia, S., et al., *Role of the Mycobacterium tuberculosis P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(9): p. 3675-82.
166. Kwon, H.H., H. Tomioka, and H. Saito, *Distribution and characterization of beta-lactamases of mycobacteria and related organisms*. Tuber Lung Dis, 1995. **76**(2): p. 141-8.
167. Flores, A.R., L.M. Parsons, and M.S. Pavelka, Jr., *Genetic analysis of the beta-lactamases of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis and susceptibility to beta-lactam antibiotics*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 2): p. 521-32.
168. Quan, S., H. Venter, and E.R. Dabbs, *Ribosylative inactivation of rifampin by Mycobacterium smegmatis is a principal contributor to its low susceptibility to this antibiotic*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(11): p. 2456-60.
169. Davies, J. and G.D. Wright, *Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics*. Trends Microbiol, 1997. **5**(6): p. 234-40.

170. Draker, K.A., et al., *Functional annotation of putative aminoglycoside antibiotic modifying proteins in Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. J Antibiot (Tokyo), 2003. **56**(2): p. 135-42.
171. Ainsa, J.A., et al., *Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the aac(2')-Ic gene from Mycobacterium tuberculosis and the aac(2')-Id gene from Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol, 1997. **24**(2): p. 431-41.
172. Payton, M., et al., *Cloning and characterization of arylamine N-acetyltransferase genes from Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium tuberculosis: increased expression results in isoniazid resistance*. J Bacteriol, 1999. **181**(4): p. 1343-7.
173. Hayward, D., I. Wiid, and P. van Helden, *Differential expression of mycothiol pathway genes: are they affected by antituberculosis drugs?* IUBMB Life, 2004. **56**(3): p. 131-8.
174. Ren, H. and J. Liu, *AsnB is involved in natural resistance of Mycobacterium smegmatis to multiple drugs*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(1): p. 250-5.
175. Lee, A.S., A.S. Teo, and S.Y. Wong, *Novel mutations in ndh in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(7): p. 2157-9.
176. Gillespie, S.H., *Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(2): p. 267-74.
177. Martín, C. *Desarmando "El bacilo de la Tuberculosis"*. 2006 [cited 2013 Marzo]; Available from: <http://www.unizar.es/sg/interes/sanbraulio/06/alocucion.pdf>.
178. Suzuki, Y., et al., *Detection of kanamycin-resistant Mycobacterium tuberculosis by identifying mutations in the 16S rRNA gene*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(5): p. 1220-5.
179. Maus, C.E., B.B. Plikaytis, and T.M. Shinnick, *Mutation of tlyA confers capreomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(2): p. 571-7.
180. Kruuner, A., et al., *Discordant resistance to kanamycin and amikacin in drug-resistant Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(9): p. 2971-3.

Bibliografía

181. Rengarajan, J., et al., *The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria*. Mol Microbiol, 2004. **53**(1): p. 275-82.
182. Johnson, R., et al., *Ethambutol resistance testing by mutation detection*. Int J Tuberc Lung Dis, 2006. **10**(1): p. 68-73.
183. Zhang, Y., *The magic bullets and tuberculosis drug targets*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 529-64.
184. Almeida Da Silva, P.E. and J.C. Palomino, *Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(7): p. 1417-30.
185. Wilson, M., et al., *Exploring drug-induced alterations in gene expression in Mycobacterium tuberculosis by microarray hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12833-8.
186. Gupta, A.K., et al., *Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis during stress induced by common anti-tuberculous drugs*. Microb Drug Resist, 2010. **16**(1): p. 21-8.
187. Gupta, A.K., et al., *Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its correlation with expression levels of two major efflux pumps in mycobacteria*. J Commun Dis, 2006. **38**(3): p. 246-54.
188. Jiang, X., et al., *Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate Mycobacterium tuberculosis by real-time reverse transcription PCR*. Microb Drug Resist, 2008. **14**(1): p. 7-11.
189. Betts, J.C., et al., *Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thioamycin-, and triclosan-treated Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(9): p. 2903-13.
190. Waddell, S.J., et al., *The use of microarray analysis to determine the gene expression profiles of Mycobacterium tuberculosis in response to anti-bacterial compounds*. Tuberculosis (Edinb), 2004. **84**(3-4): p. 263-74.
191. Boshoff, H.I., et al., *The transcriptional responses of Mycobacterium tuberculosis to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action*. J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 40174-84.
192. Dutta, N.K., S. Mehra, and D. Kaushal, *A Mycobacterium tuberculosis sigma factor network responds to cell-envelope damage by the promising anti-mycobacterial thioridazine*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10069.
193. Schnappinger, D., et al., *Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 693-704.

194. Betts, J.C., et al., *Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling*. Mol Microbiol, 2002. **43**(3): p. 717-31.
195. Gu, S., et al., *Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a Mycobacterium tuberculosis strain*. Mol Cell Proteomics, 2003. **2**(12): p. 1284-96.
196. Malen, H., et al., *Definition of novel cell envelope associated proteins in Triton X-114 extracts of Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 132.
197. Bahk, Y.Y., et al., *Antigens secreted from Mycobacterium tuberculosis: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker*. Proteomics, 2004. **4**(11): p. 3299-307.
198. Snapper, S.B., et al., *Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol, 1990. **4**(11): p. 1911-9.
199. Stover, C.K., et al., *New use of BCG for recombinant vaccines*. Nature, 1991. **351**(6326): p. 456-60.
200. Bardarov, S., et al., *Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in Mycobacterium tuberculosis, M. bovis BCG and M. smegmatis*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 10): p. 3007-17.
201. Bardarov, S., et al., *Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10961-6.
202. Miller, J.M., *Experiments in Molecular Genetics*, ed. C.S.H. Laboratory. 1972, New York: Cold Spring Harbor.
203. Tartof, K.D. and C.A. Hobbs, *Improved media for growing plasmid and cosmid clones*. Vol. 9. 1987: Bethesda Res. Lab.
204. Sambrook, J., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2 ed, ed. C.s.H.L. Press. 1989, New York: Cold spring Harbor
205. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
206. Movahedzadeh, F. and W. Bitter, *Ins and Outs of Mycobacterial Plasmids*, in *Mycobacteria Protocols*, T. Parish and A. Claire, Editors. 2008, Humana Press: New York. p. 217-228.

Bibliografía

207. Madiraju, M.V., M.H. Qin, and M. Rajagopalan, *Development of simple and efficient protocol for isolation of plasmids from mycobacteria using zirconia beads*. Lett Appl Microbiol, 2000. **30**(1): p. 38-41.
208. Bartlett, J. and S. D., *PCR protocols*. Second ed. Methods in Molecular Biology. Vol. 226, Totowa: Humana Press.
209. Lewin, B., *GENES VIII*. 2004, New Jersey: Pearson Prentice Hall.
210. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.
211. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
212. Larsen, M., et al., *Generating Mycobacterium tuberculosis - knockout mutants with specialized transduction*, in *Current Protocols in Microbiology*. 2007, Willey Interscience. p. 10A.2.10-10A.2.14.
213. Parish, T. and P. Wheeler, *Preparation of Cell-Free Extracts from Mycobacteria*, in *Micobacteria Protocols*, T. Parish and N. Stoker, Editors. 1998, Humana Press: Totowa. p. 77-89.
214. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
215. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
216. Shaw, M.M. and B.M. Riederer, *Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis*. Proteomics, 2003. **3**(8): p. 1408-17.
217. Healthcare, G., *2-D Electrophoresis*, in *2-D Electrophoresis Principles and Methods*. 2004.
218. Healthcare, G., *User Manual in Ettan DALTsix Electrophoresis System* 2006-2007.
219. Rabilloud, T., *Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis*. Anal Chem, 2000. **72**(1): p. 48A-55A.
220. Yan, J.X., et al., *A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry*. Electrophoresis, 2000. **21**(17): p. 3666-72.
221. Pandey, A. and M. Mann, *Proteomics to study genes and genomes*. Nature, 2000. **405**(6788): p. 837-46.
222. Gross, J. *Mass Spectrometry*. 2004 [cited 2013 Enero]; Available from: <http://www.ms-textbook.com/>.

223. Laboratory, N.H.M.F. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)*. [cited 2013 Enero]; Available from: http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_maldi.html.
224. GIGA-Protéomique. *MALDI-TOF/TOF*. 2005 [cited 2013 Enero]; Available from: http://www.giga.ulg.ac.be/jcms/cdu_15169/maldi-tof/tof-bruker-ultraflex-ii-tof/tof-april-2005.
225. Martin, A., et al., *Resazurin microtiter assay plate testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(11): p. 3616-9.
226. Palomino, J.C., et al., *Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(8): p. 2720-2.
227. Rumijowska-Galewicz, A., et al., *The composition of cell wall skeleton and outermost lipids of Mycobacterium vaccae is modified by ethambutol treatment*. *Pol J Microbiol*, 2008. **57**(2): p. 99-104.
228. Bosne-David, S., et al., *Intrinsic resistance of Mycobacterium tuberculosis to clarithromycin is effectively reversed by subinhibitory concentrations of cell wall inhibitors*. *J Antimicrob Chemother*, 2000. **46**(3): p. 391-5.
229. Jagannath, C., V.M. Reddy, and P.R. Gangadharam, *Enhancement of drug susceptibility of multi-drug resistant strains of Mycobacterium tuberculosis by ethambutol and dimethyl sulphoxide*. *J Antimicrob Chemother*, 1995. **35**(3): p. 381-90.
230. Abate, G. and S.E. Hoffner, *Synergistic antimycobacterial activity between ethambutol and the beta-lactam drug cefepime*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1997. **28**(3): p. 119-22.
231. Hoffner, S.E., et al., *Studies on the mechanisms of the synergistic effects of ethambutol and other antibacterial drugs on Mycobacterium avium complex*. *Acta Leprol*, 1989. **7 Suppl 1**: p. 195-9.
232. Soto, C.Y., *Caracterización de la reacción citoquímica de Mycobacterium tuberculosis con rojo neutro. Correlación con el contenido sulfolípidos*, in *Departament de Genètica i de Microbiologia*. 2002, Universitat Autònoma de Barcelona: Barcelona.
233. Andreu, N., *Estudio de la implicación de los genes Rv0576-Rv0577 en la tinción con rojo neutro y la virulencia de Mycobacterium tuberculosis*, in *Departament de Genètica i de Microbiologia*. 2007, Universitat Autònoma de Barcelona: Barcelona.

Bibliografía

234. Ferrer-Navarro, M., *Análisis de los proteomas de dos micoplasmas: Mycoplasma penetrans y Mycoplasma genitalium*, in *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular*. 2006, Universitat Autònoma de Barcelona: Barcelona.
235. Yu, B.J., et al., *Genome-wide enrichment screening reveals multiple targets and resistance genes for triclosan in Escherichia coli*. *J Microbiol*, 2012. **50**(5): p. 785-91.
236. Wolfe, L.M., et al., *Proteomic definition of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(11): p. 5816-26.
237. Sivaraman, S., et al., *Structure-activity studies of the inhibition of FabI, the enoyl reductase from Escherichia coli, by triclosan: kinetic analysis of mutant FabIs*. *Biochemistry*, 2003. **42**(15): p. 4406-13.
238. Mahamoud, A., et al., *Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy*. *J Antimicrob Chemother*, 2007. **59**(6): p. 1223-9.
239. Ramon-Garcia, S., et al., *Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from Mycobacterium fortuitum*. *J Antimicrob Chemother*, 2006. **57**(2): p. 252-9.
240. Ahmed, M., et al., *Mutants of the Bacillus subtilis multidrug transporter Bmr with altered sensitivity to the antihypertensive alkaloid reserpine*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(15): p. 11086-9.
241. Champlin, F.R., et al., *Effect of outer membrane permeabilisation on intrinsic resistance to low triclosan levels in Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*, 2005. **26**(2): p. 159-164.
242. Jurgenson, C.T., T.P. Begley, and S.E. Ealick, *The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis*. *Annu Rev Biochem*, 2009. **78**: p. 569-603.
243. Raschke, M., et al., *Vitamin B1 biosynthesis in plants requires the essential iron sulfur cluster protein, THIC*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(49): p. 19637-42.
244. Sassetti, C.M., D.H. Boyd, and E.J. Rubin, *Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis*. *Mol Microbiol*, 2003. **48**(1): p. 77-84.
245. Griffin, J.E., et al., *High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism*. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(9): p. e1002251.
246. Gygi, S.P., et al., *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(3): p. 1720-30.

247. Sheridan, A., et al., *Proteomic and phenotypic analysis of triclosan tolerant verocytotoxigenic Escherichia coli O157:H19*. J Proteomics, 2013. **80C**: p. 78-90.
248. Condell, O., et al., *Comparative proteomic analysis of Salmonella tolerance to the biocide active agent triclosan*. J Proteomics, 2012. **75**(14): p. 4505-19.
249. Saleh, S., et al., *Triclosan - an update*. Lett Appl Microbiol, 2011. **52**(2): p. 87-95.
250. McBain, A.J., et al., *Selection for high-level resistance by chronic triclosan exposure is not universal*. J Antimicrob Chemother, 2004. **53**(5): p. 772-7.
251. Cook, G.M., et al., *Physiology of mycobacteria*. Adv Microb Physiol, 2009. **55**: p. 81-182, 318-9.
252. Szumowski, J.D., et al., *Antimicrobial Efflux Pumps and Mycobacterium Tuberculosis Drug Tolerance: Evolutionary Considerations*. Curr Top Microbiol Immunol, 2012.
253. Domenech, P., et al., *BacA, an ABC transporter involved in maintenance of chronic murine infections with Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2009. **191**(2): p. 477-85.
254. Pethe, K., et al., *Isolation of Mycobacterium tuberculosis mutants defective in the arrest of phagosome maturation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13642-7.
255. Bigi, F., et al., *The knockout of the lprG-Rv1410 operon produces strong attenuation of Mycobacterium tuberculosis*. Microbes Infect, 2004. **6**(2): p. 182-7.
256. Farrow, M.F. and E.J. Rubin, *Function of a mycobacterial major facilitator superfamily pump requires a membrane-associated lipoprotein*. J Bacteriol, 2008. **190**(5): p. 1783-91.
257. Rengarajan, J., B.R. Bloom, and E.J. Rubin, *Genome-wide requirements for Mycobacterium tuberculosis adaptation and survival in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8327-32.

Agradecimientos

Durante estos años son muchas las personas a las que he tenido la suerte de conocer y que han hecho parte de esta “aventura”. Sé que serán pocas las palabras para expresarles mis agradecimientos; espero no olvidar a nadie...

En primer lugar a Isidre por haber depositado su confianza en mí, por haber permitido que me incorporase a su grupo en el que me he sentido como en casa y por su apoyo incondicional en todo momento, sobre todo en los más difíciles, para él un simple gracias no es suficiente....

También quiero agradecer a Núria por enseñarme a trabajar con micobacterias en “tiempo record” y por todos sus aportes al desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Mario por introducirme en el “mágico mundo del 2D”, por su disposición y paciencia para enseñar y ayudar a resolver mis líos proteómicos (que no fueron pocos). Raquel por sus consejos y por siempre estar dispuesta a responder a mis preguntas. Gracias a los dos por sus palabras de ánimo, ustedes son simplemente geniales! A Paula por escucharme y por tener siempre una sonrisa para todos y contagiarnos con su optimismo. A Pol por su buena energía, es un compañero de labo estupendo! A Daniel por la revisión de esta tesis y por llevarnos merienda de vez en cuando ☺. A Elías por darle vidilla al labo con sus “hits” de la radio y por supuesto los tererés!! A Ignasi, Anaïs y Gerard por siempre estar dispuestos a echarme una mano.... Todos han contribuido de alguna manera a que el día a día fuera más ameno.

Quisiera también agradecer al servicio de cultivo celular, especialmente a Fran por su ayuda con mis células y por los buenos momentos que nos hace pasar a los “inquilinos” de cultivo.

A los demás labos del IBB que muchas veces me “salvaron la vida” dejándome algún reactivo. También a Alicia por estar siempre dispuesta a echarnos una mano con toda la burocracia de la ciencia.

Al departamento de Genètica i Microbiologia y a las chicas de los integrados del C5 por su ayuda con las prácticas.

A Jose A. Aínsa y Liliana Rodrigues por abrirme las puertas de su laboratorio en Zaragoza, por su amabilidad y hospitalidad así como a Jose Dominguez y Cristina Prat por su amable ayuda en Can Ruti.

También a mis amigos, que han estado ahí en las buenas y sobre todo en las malas y que aunque a muchos nos separan miles de kilómetros los llevo en el corazón. Es lindo saber que cuento con personas así. Caro López... gracias por estar a mi lado siempre. A mis "mexicans" Eve y Abraham y también a Paula con los que pasé momentos geniales! A Dolors por compartir su casa conmigo. A los FIDIC: Carlos, Pili, Paula, Cami, Yago, Adri, Oscar, Jair, Alvaro, Angie, las Caros, Juanca, Diana, Sandra, Cathe, Fer y Manuel... allí empezó todo...

A mis padres Miryam y Jaime y a Leo, qué les puedo decir...son el motor de mi vida, gracias por su constante apoyo, sus consejos y por soportar mis estados "bipolares"... soy muy afortunada de tener la familia que tengo!!!!. También al resto de mi familia al "otro lado del charco": Julia, Alexa, mis abues, Consuelo y a Janis.

Y por último y no menos importante a Gus, por su infinito amor, comprensión y apoyo en todo momento... no tengo palabras para expresar mi agradecimiento, es un privilegio tenerlo en mi vida! Esta tesis también es suya.