

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Análisis de los perfiles de expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en una cepa sensible (H37Rv) y otra multifarmacorresistente (CIBIN:UMF:15:99) de *Mycobacterium tuberculosis* expuestas a compuestos con actividad antituberculosis.

POR

ANAIL VIRIDIANA PADRON ROCHA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA APLICADA

FEBRERO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Análisis de los perfiles de expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en una cepa sensible (H37Rv) y otra multifarmacorresistente (CIBIN:UMF:15:99) de *Mycobacterium tuberculosis* expuestas a compuestos con actividad antituberculosis.

Por

Anail Viridiana Padron Rocha

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en
Microbiología Aplicada

Febrero, 2017

Análisis de los perfiles de expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en una cepa sensible (H37Rv) y otra multifarmacorresistente (CIBIN:UMF:15:99) de *Mycobacterium tuberculosis* expuestas a compuestos con actividad antituberculosis

Aprobación de la Tesis:

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
PRESIDENTE

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
SECRETARIO

Dra. Beatriz Silva Ramírez
VOCAL

Dra. María Aracely Hernández Ramírez
SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Análisis de los perfiles de expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en una cepa sensible (H37Rv) y otra multifarmacorresistente (CIBIN:UMF:15:99) de *Mycobacterium tuberculosis* expuestas a compuestos con actividad antituberculosis

Revisión de la Tesis:

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
DIRECTOR

Dra. Beatriz Silva Ramírez
DIRECTOR EXTERNO

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño
COMITÉ TUTORIAL

Dra. Katia Peñuelas Urquides
COMITÉ TUTORIAL

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
COMITÉ TUTORIAL

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Químicas.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

A la Dra. María Elena Cantú Cárdenas. Por darme la oportunidad de realizar el proyecto de posgrado y apoyarme incondicionalmente. Estoy sumamente agradecida por brindarme su tiempo, paciencia y sobre todo sus conocimientos.

A la Dra. Beatriz Silva Ramírez. Gracias por confiar en mí, por darme la oportunidad desde la licenciatura de ser parte de su laboratorio, por la motivación constante y paciencia. Es un gran privilegio haber formado parte de su equipo de trabajo y más aún contar con su amistad.

A la Dra. Katia Peñuelas Urquides. Por formar parte de mi comité de tesis, por brindarme su apoyo en cada momento del proyecto y por ser parte fundamental de él.

Al Dr. Mario Bermúdez de León, por brindarme siempre su apoyo, por siempre ser una persona dispuesta a enseñar y transmitir sus conocimientos.

A la Dra. Laura Adiene González, Gracias Doctora, por su ayuda en la parte experimental del proyecto, por enseñarme como cuidar y respetar a las micobacterias , por ser parte fundamental del proyecto y por estar siempre estar dispuesta.

Dr. Alberto Gómez Treviño, por ser parte importante del proyecto y por sus observaciones en todo momento.

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos, por brindarme sus conocimientos y formar parte de mi comité.

A mis amigas Q.B.P. Brenda Maldonado, Paola K. Vázquez, Stephany Sierra, Andrea Rojas Mercado, Fanny Ramírez, Yadira del Carmen Martínez, gracias por alentarme en esta etapa y más aún por formar parte de ella. A mis compañeros de la FCQ por compartir conmigo conocimientos, apoyo y amistad. A mis amigas de toda la vida, Irene Montemayor, Ana Cecilia Jiménez, Nohemí Mata, Blanca Galván, Saibeth Reyes por su gran amistad. A Orlando Moyeda, Maryandy Rodríguez, Brenda Montelongo, Carlos Belmares, Ivonne Ramírez, José Luis Villa, Norma Vela, Luis Cadena, Yudith Arcibar, Alfonso Barragán, Laura Cárdenas, a los y las de la U, por formar parte de esta etapa y por brindarme su bella amistad.

A la familia Saucedo Monjaráz, especialmente a mi amiga Valentina por regalarme bellos momentos.

A la familia Pérez Monjaráz por estar presentes estos años y su apoyo incondicional. A mis suegros Roberto Monjaráz Alba y María de las Nieves

A hermanas, Thania Shantal y Yosahandy por brindarme días de alegría y apoyo constante. A mi hermana Zully Michelle y mi cuñado Antonio Ortiz, por su gran amistad y por compartirme bellos momentos.

Dedicatoria

A mi gran amor y ahora esposo Roberto Monjaráz Arenas, gracias bebito por luchar junto a mí y apoyarme día a día, por dejarme volar alto sin soltarme.

A mis padres, Rogelio Padron Arredondo y Silvia Rocha Ramírez, por su apoyo incondicional y su amor infinito, estoy muy agradecida con dios por permitirme compartir con ustedes este logro.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
TABLA DE CONTENIDO.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
NOMENCLATURA.....	vi
RESUMEN.....	vii
1 Introducción	
1.1. Tuberculosis en la actualidad.....	1
1.2. Desarrollo de nuevos compuestos con actividad antituberculosis	1
1.3. Técnicas empleadas para medir expresión génica.....	2
1.4. Compuestos con actividad antituberculosis UCI-05 y UCI-14.....	2
1.5. Heterogeneidad en poblaciones micobacterianas.....	2
1.6. Estudio de la expresión de los genes <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i>	3
2. Antecedentes	
2.1. Tuberculosis en la población.....	4
2.2. Características generales de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.3. Medios de cultivo para la identificación de <i>Mycobacterium tuerculosis</i>	6
2.4. Mecanismo de transmisión.....	8
2.5. Características generales de los fármacos de primera línea.....	8
2.6. Problema de multifarmacorresistencia.....	11
2.7. Nuevos compuestos antituberculosis derivados del fármaco etambutol.....	12
2.8. Compuestos UCI.....	15
2.9. Diversidad poblacional en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.10. Perfiles de expresión génica.....	17
2.11. Técnicas empleadas para evaluar expresión génica.....	18
2.12. Gen <i>gltA1</i>	19
2.13. Gen <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i>	21
3. Aportación científica	22
4. Hipótesis	22
5. Objetivo general	22
5.1. Objetivos específicos.....	22

6. Material y Métodos	
6.1. Cepa H37Rv de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
6.2. Cepa CIBIN:UMF:15:99 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
6.3. Resiembra en medio Löwenstein Jensen.....	26
6.4. Activación de las cepas H37Rv y CIBIN99 en medio líquido Middlebrook 7H9.....	26
6.5. Tratamiento de las cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con los compuestos UCI-05 y UCI-14.....	27
6.6. Extracción de ARN total de las cepas H37Rv y CIBIN99.....	28
6.7. Cuantificación e integridad del ARN total.....	29
6.8. Retrotranscripción.....	30
6.9. Evaluación de Funcionalidad del ADNc.....	31
6.10. PCR en tiempo real.....	33
6.11. Análisis de expresión de los genes <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i>	36
6.12. Análisis estadístico.....	37
6.13. Disposición de los residuos generados.....	37
7. Resultados y discusión	
7.1. Resiembra en medio Löwenstein Jensen y activación de las cepas H37Rv y CIBIN99 en medio líquido Middlebrook 7H9.....	38
7.2. Tratamiento de las cepas H37Rv y CIBIN99 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con los compuestos UCI-05 y UCI-14.....	39
7.3. Extracción del ARN total de las cepas H37Rv y CIBIN99 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	39
7.4. Cuantificación del ARN total de las cepas H37Rv y CIBIN99 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	40
7.5. Integridad del ARN total de las cepas H37Rv y CIBIN99 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	41
7.6. Evaluación de la funcionalidad de ADNc.....	42
7.7. PCR en tiempo real.....	44
7.8. Rango dinámico de amplificación.....	45
7.9. Eficiencia de amplificación.....	45
7.10. Cuantificación relativa de la expresión de los genes <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i> de las cepas H37Rv y CIBIN99 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> tratadas con los compuestos UCI.....	48
7.11. Cinética de amplificación de los genes <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i> en comparación con el gen endógeno <i>rrs</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	48
7.12. Expresión relativa de los genes <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i> , de las cepas H37RV y CIBIN99 tratadas con el control dimetilsulfóxido (DMSO) y una condición sin tratamiento.....	52
7.13. Expresión relativa de los genes <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i> , de las cepas H37RV y CIBIN99 tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14.....	53
7.14. Comparación de los niveles de expresión génica relativa de los genes <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i> en las clonas y cepas de H37Rv y CIBIN99...	56
8. Discusión	57
9. Conclusiones	64
10. Perspectivas del proyecto	65
11. Bibliografía	66

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los compuestos UCI-05 y UCI-14 empleadas en las cepas H37Rv y CIBIN99.	27
II. Componentes de la mezcla 1 que se utilizó para 1 Reacción (Rx) en la síntesis del ADNc	30
III. Componentes de la mezcla 2 que se utilizó para 1 Reacción (Rx) en la síntesis del ADNc	30
IV. Secuencias de los primes empleados para amplificación del gen <i>rrs</i>	31
V. Mezcla de componentes para la amplificación por PCR del gen <i>rrs</i>	31
VI. Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen <i>rrs</i> en la técnica PCR	32
VII. Mezcla de componentes empleados para los genes <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i>	35
VIII. Mezcla de componentes empleados para el gen <i>rrs</i>	35
IX. Condiciones de amplificación de los fragmentos de los genes <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> , <i>lprQ</i> y <i>rrs</i> en la técnica qPCR	35
X. Secuencias de los primes y sondas empleadas para la amplificación de los genes <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> , <i>lprQ</i> y <i>rrs</i>	36
XI. Valores de cuantificación y pureza del ARN total aislado a partir de las cepas H37Rv y CIBIN99	40
XII. Gen <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i> , reportados por la base de datos Tuberculist	44
XIII. Comparación de la expresión génica de los genes <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i> de las clonas y cepas de H37Rv y CIBIN99, tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14	56

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Incidencia de casos nuevos de tuberculosis pulmonar, reportados por el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE).	4
2. Representación esquemática de la pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
3. Apariencia de las colonias de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> creciendo en medio sólido Löwenstein-Jensen	7
4. Estructura química del fármaco de primera línea, isoniazida	9
5. Estructura química del fármaco de primera línea, rifampicina	9
6. Estructura química del fármaco de primera línea, pirazinamida	10
7. Estructura química del fármaco de primera línea, etambutol	10
8. Estructura química de los compuestos análogos del etambutol, SQ37	12
9. Estructura química de los compuestos análogos del etambutol SQ59	12
10. Estructura química de los compuestos análogos del etambutol SQ109	13
15. Diagrama de la beta oxidación de los ácidos grasos	20
16. Representación esquemática de la metodología del proyecto	24
17. Genoma de la cepa H37Rv de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
18. Proceso general de amplificación de la técnica de PCR en tiempo real	33
19. Espectro de emisión de los fluoróforos FAM y ROX a longitudes de onda de 515 nm y 602 nm respectivamente.	34
20. Cultivo de la cepa H37Rv de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en medio de cultivo sólido Löwenstein-Jensen	38
21. ARN total extraído de las cepas H37Rv y CIBIN99	41
22. Amplificación del gen <i>rrs</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42
23. Representación esquemática de la estructura genómica del gen <i>rrs</i> y la localización del Primer Forward 1 (F1) y Primer Reverse 1 (R1)	43
24. Eficiencia de la amplificación del gen <i>gltA1</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	46
25. Eficiencia de la amplificación del gen <i>rpsO</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47
26. Eficiencia de la amplificación del gen <i>lprQ</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47
27. Expresión de los genes <i>gltA1</i> y <i>rrs</i> de la cepa H37Rv de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	49
28. Expresión de los genes <i>rpsO</i> y <i>rrs</i> de la cepa H37Rv de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
29. Expresión de los genes <i>lprQ</i> y <i>rrs</i> de la cepa H37Rv de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	51
30. Expresión relativa del gen <i>gltA1</i> , <i>rpsO</i> y <i>lprQ</i> en las cepas H37Rv y CIBIN99 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	52
31. Expresión relativa del gen <i>gltA1</i> , en las cepas H37Rv y CIBIN99 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14	53
32. Expresión relativa del gen <i>rpsO</i> , en las cepas H37Rv y CIBIN99 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14	54
33. Expresión relativa del gen <i>lprQ</i> , en las cepas H37Rv y CIBIN99 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14	55

NOMENCLATURA

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ATCC: American Type Culture Collection

CO₂: Dióxido de Carbono

DMSO: Dimetil sulfóxido

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

LJ: Medio Löwenstein–Jensen

MFR: Multifarmacorresistente

MgCl₂: Cloruro de magnesio

O₂: Oxígeno

OADC: Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

TB: Tuberculosis

TB-pulmonar: Tuberculosis pulmonar

UCI: Universidad de Salamanca-Centro de Investigación Biomédica del Noreste-Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán

UFC: Unidades formadoras de colonias

XDR: Extremadamente resistente

Resumen

Mycobacterium tuberculosis el agente etiológico de la tuberculosis es un grave problema de salud a nivel mundial. A pesar de las medidas establecidas para su control y prevención cada año se generan casos nuevos, el aumento en la frecuencia de cepas resistentes a múltiples fármacos compromete su erradicación. La necesidad de desarrollar nuevos compuestos contra *Mycobacterium tuberculosis* se ha vuelto primordial para combatir la enfermedad. Se han desarrollado nuevos compuestos híbridos del fármaco de primera línea etambutol y la esfingosina denominados UCI-05 y UCI-14, con una efectiva actividad antituberculosis y baja toxicidad en modelos murinos (BALB/c), sin embargo los perfiles de expresión génica en poblaciones micobacterianas expuestas a los compuestos han sido poco estudiados. Existen diferencias entre clonas y cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Una clona es una población homogénea mientras que una cepa corresponde a una población heterogénea. El análisis diferencial en la expresión génica en ambas poblaciones es obligado para definir la acción de nuevos compuestos.

Recientemente se identificó la modificación en la expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en poblaciones homogéneas (clonas) provenientes de una cepa de referencia sensible a los fármacos de primera línea (H37Rv) y un aislado clínico resistente a los mismos (CIBIN99) de *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales fueron expuestas a los compuestos UCI-05 y UCI-14. En este proyecto se determinó si la modificación en la expresión de estos tres genes, se presenta de la misma forma en la población homogénea (clona) y en la población heterogénea (cepas) como consecuencia al tratamiento con los nuevos compuestos UCI. Las cepas H37Rv y CIBIN99 fueron cultivadas y tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14. El RNA fue extraído, se realizó una retrotranscripción. El gen constitutivo *rrs* fue amplificado para verificar la funcionalidad del ADNc. Las modificaciones en los niveles de expresión de las cepas fueron valoradas usando RT-qPCR. El análisis de los resultados se realizó mediante el paquete estadístico SPSS versión 20. La significancia de las diferencias fue determinada usando t-Student para muestras independientes donde $p < 0.05$ se consideró como significativa. El análisis diferencial de la expresión en los tres genes en clonas y cepas mostró una represión en el gen *rpsO* en H37Rv debido al tratamiento con el compuesto UCI-05 comparada con el control DMSO ($p = 0.007$), de igual manera con el compuesto UCI-14 se observó represión pero sin significancia estadística. La expresión de los genes *gltA1* y *lprQ*, se altera de manera diferente en la población homogénea (clonas) y la población heterogénea (cepas) de H37Rv y CIBIN99, como consecuencia al tratamiento con los compuestos UCI-05 y UCI-14. El tratamiento con el compuesto UCI-05 en clonas y cepas de H37Rv reprime la expresión del gen *rpsO*, este gen codifica para la proteína ribosomal S15 de la subunidad 30S. La modificación en la expresión del gen podría alterar el proceso de traducción de *Mycobacterium tuberculosis*.

1. Introducción

1.1. Tuberculosis en la actualidad

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa, crónica y sistémica producida por el agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*, capaz de afectar múltiples órganos y tejidos. Su forma pulmonar (TB pulmonar) se reporta con una mayor incidencia en la población en comparación con su forma extrapulmonar (TB extrapulmonar) ¹.

Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) señalan que tan solo en el año 2014, 9.6 millones de habitantes adquirieron la enfermedad y 1.5 millones fallecieron por dicha causa, en el mismo año se posicionó en el lugar número cinco de las principales causas de muerte en las mujeres en el período más productivo de sus vidas (15-44 años). El mayor número de casos se presenta en regiones de África, China, Pacífico Oeste y Asia Sudoriental ². En México en el año 2014 se presentaron 20,129 casos nuevos de tuberculosis en todas sus formas, de los cuales el 80.7% corresponde a su forma pulmonar, principalmente los estados fronterizos como Sonora, Sinaloa, Veracruz, Nuevo León se ven mayormente afectados al presentar un superior número de casos en comparación con otros estados de la república mexicana ³.

En los últimos años el control de la tuberculosis se ha complicado por el aumento de cepas resistentes y multifarmacorresistentes (MFR) a los fármacos de elección, esto debido primordialmente a una serie de eventos como la capacidad evolutiva de la bacteria que le confiere resistencia a diferentes antibióticos, el empleo indebido y la deficiente efectividad de los mismos ⁴. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en el año 2015, 480,000 personas infectadas desarrollaron tuberculosis multifarmacorresistente ⁵.

1.2. Desarrollo de nuevos compuestos con actividad antituberculosis

La reciente implementación de compuestos con nuevos blancos terapéuticos y efectiva actividad antituberculosis se ha considerado para poder controlar y prevenir el aumento de estas cepas, disminuyendo a la vez la incidencia de la tuberculosis pulmonar en la población ⁴.

La exposición de células micobacterianas a los fármacos convencionales, ocasiona por lo general el bloqueo de determinadas vías metabólicas fundamentales e inhibición de la síntesis del ARN mensajero, generando alteración en los procesos celulares, consecuentemente cambios en los niveles de expresión génica los cuales pueden ser evaluados ^{4, 6}.

1.3. Técnicas empleadas para medir expresión génica

En la actualidad existen técnicas para analizar y cuantificar la expresión génica de células micobacterianas ⁶.

La técnica de hibridación con microarreglos es ampliamente utilizada, debido a su capacidad para analizar simultáneamente un gran número de genes, sin embargo una de las desventajas principales es que la calidad de los resultados obtenidos puede variar en gran parte por la plataforma y el método empleado. Con el fin de apoyar esta herramienta y validar los resultados obtenidos se emplea comúnmente la técnica de RT-qPCR, debido a su sensibilidad para detectar y cuantificar los niveles de ARN mensajero, además posee la cualidad de analizar una célula individual, empleando concentraciones de muestras pequeñas ^{6,7}. El uso de estas herramientas en conjunto permite la identificación de genes y mecanismos moleculares nuevos, facilitando la implementación de terapias totalmente diferentes a las existentes o bien la mejora de las mismas.

1.4. Compuestos con actividad antituberculosis UCI-05 y UCI-14

Se han sintetizado nuevos compuestos (UCI-05 y UCI-14) partir de la hibridación del agente terapéutico etambutol y la esfingosina, siendo este último un componente natural de los fosfolípidos de membrana. Su estructura química se encuentra formada por una cadena alifática de 14 carbonos y cada uno ha mostrado una eficaz actividad antituberculosis *in vivo* en modelos murinos (BALB/c), favorece el descenso de la carga bacilar inicial de 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) en ratones infectados con cepas sensibles y multifarmacorresistentes (MFR) de *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo los perfiles de expresión génica han sido poco estudiados ^{8,9}.

1.5. Heterogeneidad en poblaciones micobacterianas

Recientemente se ha determinado la presencia de heterogeneidad en subpoblaciones de *Mycobacterium tuberculosis* que genera diferente susceptibilidad a los fármacos de primera línea isoniazida y rifampicina dentro de las mismas subpoblaciones ¹⁰. La evaluación de esta heterogeneidad en las subpoblaciones es necesaria para entender la acción de nuevos compuestos, utilizando cepas y clones de *Mycobacterium tuberculosis* ¹¹. Las técnicas empleadas para establecer el comportamiento celular de los microorganismos expuestos a determinados compuestos, se basan en el estudio de poblaciones de células, sin embargo, este tipo de estudios a nivel de población disfraza el comportamiento de las células individuales, generando dificultades para interpretar los procesos biológicos en los que la heterogeneidad celular juega un papel fundamental ^{10,12}.

Actualmente no existe un procedimiento para la identificación de fenotipos distintos dentro de una población isogénica de *Mycobacterium tuberculosis*, para ello es primordial estudiar una célula individual, la cual nos determinará los fenómenos biológicos claves que se llevan a cabo en las células vivas, obteniendo resultados reproducibles y disminuyendo la mezcla de poblaciones altamente inestables ¹². En los últimos años la dinámica de la expresión génica se ha obtenido a partir de experimentos de una sola célula, siendo obligado comprobar los resultados obtenidos en un conjunto de cepas seleccionadas que sean representativas de la diversidad poblacional ^{11,12}.

1.6. Estudio de la expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*

En un trabajo previo empleando los compuestos UCI-05 y UCI-14 y clonas sensibles y multifarmacorresistentes, las cuales se originaron a partir de una cepa de referencia (H37Rv, ATCC 27294) y un aislado clínico multifarmacorresistente (CIBIN:UMF:15:99) la cual se denominará solamente (CIBIN99) de *Mycobacterium tuberculosis*, y el uso de técnica moleculares como microarreglos y RT-qPCR, se determinó que existen tres genes (*gltA1*, *rpsO* y *lprQ*) que se ven modificados debido al tratamiento con estos compuestos ¹³.

Por lo tanto, debido a heterogeneidad presente en poblaciones de *Mycobacterium tuberculosis*, este trabajo se basa en el estudio de la expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en la cepa sensible y en la cepa multifarmacorresistente, las cuales le dieron origen a las clonas, con la finalidad de identificar la dinámica de la expresión génica en diferentes poblaciones debido al tratamiento con los compuestos UCI-05 y UCI-14.

2. Antecedentes

2.1. Tuberculosis en la población

Mycobacterium tuberculosis es el principal agente causal de la enfermedad de la tuberculosis, que afecta a la población mundial, sin importar etnia, género y clase social. En el año 2013 la mayor parte de los casos ocurrieron en Asia Sudoriental y regiones del Pacífico Occidental, representando un 56% de todos los casos nuevos que se generaron a nivel mundial. Los primeros seis países que presentaron el mayor número de casos por cada 100 000 habitantes fueron India, Indonesia, Nigeria, Pakistán, la República Popular de China y Sudáfrica ².

En México la TB-pulmonar sigue aumentando y generando graves problemas en la salud pública los cuales frecuentemente se asocian con enfermedades como diabetes, desnutrición y VIH/SIDA ¹⁴. En nuestro país en el año 2014 se estimó una incidencia de 13,6 casos por 100 mil habitantes, que corresponden a 16,237 casos de TB ¹⁴. El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en el mismo año señala que los estados de Baja California, Guerrero, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Nayarit, Chiapas, Veracruz, Nuevo León presentaron un mayor número de casos de tuberculosis en todas sus formas en comparación con los demás estados de la república mexicana ¹⁵.

En el año 2015 de acuerdo al Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE), nuestro estado se posicionó en el lugar número cuatro de los estados con mayor incidencia de tuberculosis pulmonar, al reportar 1,148 casos nuevos ¹⁶.



Figura 1. Incidencia de casos nuevos de tuberculosis pulmonar, reportados por el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE).

De acuerdo con la información disponible en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en nuestro país se registran cada año cerca de 15,000 casos nuevos de Tuberculosis pulmonar y aproximadamente 2,000 defunciones por dicha causa ¹⁷.

2.2. Características generales de *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*, es un bacilo delgado, intracelular obligado, sin movilidad que mide de 2 a 4 µm de longitud por 0.2 a 0.5 µm de ancho, se caracteriza por su desarrollo lento, su tiempo de duplicación de 12-24 horas y requerimiento nutricional exigente ¹⁸, su envoltura está compuesta por una pared celular muy compleja y membrana citoplasmática.

Su pared celular se sitúa próxima a la membrana citoplasmática y está dividida en capas. La capa externa es la principal barrera de defensa que le confiere la protección contra múltiples factores externos y se compone principalmente de mucósidos, glicolípidos, los cuales se asocian a menudo con algunos ácidos grasos de cadenas cortas o largas que se encuentran en la capa interior ¹⁹.

La capa interna principalmente está compuesta de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico con cadenas cortas de alanina, peptidoglicanos, arabinogalactanos y ácidos micólicos covalentemente unidos entre sí para formar un complejo denominado complejo MA-AG-PG que se extiende desde la membrana citoplasmática hacia el exterior, estos últimos son ácidos grasos complejos de gran interés taxonómico que contienen alrededor de 60 a 90 carbonos y le confiere una naturaleza hidrofóbica, esta composición de la pared celular le otorga a la micobacteria una limitada permeabilidad que en parte es responsable de la ineficacia de algunos detergentes y múltiples fármacos, sin embargo suele ser la diana terapéutica de elección de varios de los fármacos contra la micobacteria ^{18, 19}.

La membrana citoplasmática de *Mycobacterium tuberculosis* posee las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, además moléculas ancladas como lipopolisacáridos, lipoarabinomananos (LAM), lipomananos y fosfatidil inositol manósidos ¹⁹.

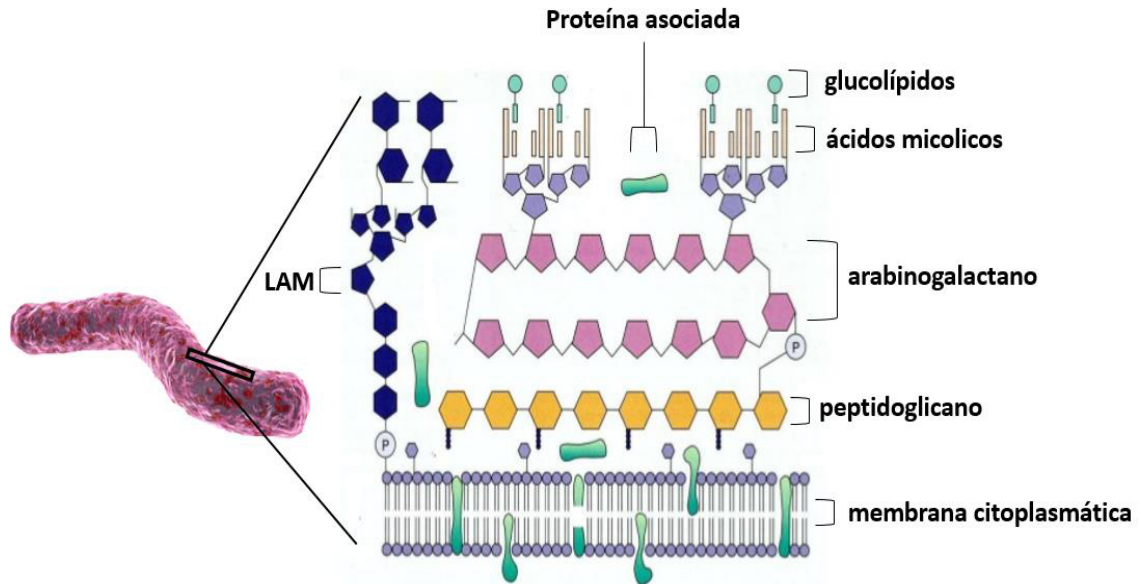


Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*

La pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*, se sugiere como una adecuada opción de diana terapéutica, debido a que las enzimas involucradas en su biosíntesis no poseen homología en el mamífero, pudiendo actuar selectivamente sobre ellas. Habitualmente el empleo de fármacos lipófilicos como rifamicinas y fluoroquinolonas son empleados en el tratamiento, debido a la facilidad de penetrar esta barrera, generando ventajas como la acción eficaz en comparación con otros fármacos ^{18, 19}.

Mycobacterium tuberculosis tiene la capacidad de asimilar la glucosa, el glicerol y ácidos grasos como fuente de carbono, amonio o aminoácidos como fuente de nitrógeno y su crecimiento puede estimularse mediante el aumento en la presión de CO₂, específicamente una atmósfera de 5 a 10% favorece su desarrollo. La temperatura óptima de crecimiento es 37°C ¹⁹.

2.3. Medios de cultivo para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*

En la actualidad los cultivos continúan siendo los métodos más sensibles y específicos para el aislamiento de las micobacterias, clasificándose como el estándar de oro. Con el fin de garantizar el aislamiento, se recomienda el empleo de una combinación de medios de cultivo sólidos y líquidos, que permitan observar su morfología, producción de pigmentos y una proliferación de colonias más rápida y abundante ²⁰.

El crecimiento de las colonias típicas de *Mycobacterium tuberculosis* en medios de cultivo sólidos suele llevarse a cabo utilizando Petragani, Coletsos, Stonebrink y Löwenstein-Jensen. Este último, es ampliamente usado y está compuesto por ingredientes específicos en combinación, como fosfato monopotásico, sulfato de magnesio hepta hidratado, citrato de magnesio, asparagina, fécula de papa, glicerol y verde de malaquita como inhibidor del crecimiento de otras bacterias, los cuales le aportan fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, etcétera, claves para la producción de energía y biomasa ²¹.

La incubación de las muestras se lleva a cabo en tubos de vidrio los cuales contienen medio de cultivo en posición inclinada que facilita el intercambio de CO₂ a O₂. La identificación de las características fenotípicas empleando estos medios, es muy fiable ²¹. La morfología colonial macroscópica de las micobacterias suelen observarse de color crema, esféricas, secas, rugosas, opacas, polimorfas y de dimensiones variables como se muestra en la figura 3.



Figura 3. Apariencia de las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* creciendo en medio sólido Löwenstein-Jensen.

Debido a la necesidad de tener un método sensible, específico y rápido para el diagnóstico preciso de *Mycobacterium tuberculosis*, se implementó el uso de medios de cultivo en estado líquido, Proskauer-Beck, Sauton, Dubos, Middlebrook 7H9, estos últimos dos suelen ser los más utilizados, el inconveniente principal es que no permiten la visualización del crecimiento y morfología de las colonias. Por lo tanto estos medios no se recomiendan para obtener un cultivo primario ^{21, 22}.

De forma natural las micobacterias tienden a ser más resistentes a los agentes químicos en comparación con otras bacterias, principalmente por la naturaleza hidrófoba de la superficie celular, esta cualidad a su vez le confiere un particular crecimiento en grumos en determinados medios de cultivo en estado líquidos ²².

El crecimiento de las micobacterias utilizando el medio Dubos, normalmente se observa disperso, libre de aglutinamiento, por lo general suele emplearse para preparar suspensiones relativamente uniformes ²². No obstante el medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 es ampliamente recomendado para identificar el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, frecuentemente se suplementa con distintos nutrientes, como ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) para garantizar su desarrollo, el cual se puede apreciar alrededor de los 14 a 28 días de incubación. Este medio está compuesto por sulfato de amonio, glutamato de sodio, citrato de sodio, piridoxina, biotina, fosfato disódico, fosfato monopotásico, citrato férrico de amonio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, sulfato de zinc y sulfato de cobre ²³.

Las sales inorgánicas le otorgan a *Mycobacterium tuberculosis* sustancias esenciales para su crecimiento, el ácido oleico y ácidos grasos pueden ser utilizados en su metabolismo y la catalasa le ayuda para catalizar los peróxidos que pueden llegar a ser tóxicos ²².

2.4. Mecanismo de transmisión

La transmisión del agente etiológico se produce de persona a persona a través del aire, mediante las gotitas de flugge que se generan en el aparato respiratorio de las personas infectadas con tuberculosis pulmonar activa, al toser, estornudar o hablar. Estas gotitas de alrededor de 1 a 5 μm de diámetro pueden contener varios bacilos y propagarse con facilidad hasta llegar a los alvéolos pulmonares. Inicialmente una persona infectada no presenta síntomas y no es contagiosa, los síntomas se presentan después de unas semanas, siendo capaces de transmitir la enfermedad. Los síntomas que aparecen son fatiga, fiebre, sudoración nocturna, expectoraciones con sangre, dolor torácico, pérdida de peso, escalofríos y falta de apetito ⁵.

La tuberculosis es tratable y curable si se detecta a tiempo. Desde 1882 tras su descubrimiento se han elaborado distintas estrategias para su control y prevención, las cuales aseguran reducir su transmisión en la sociedad ¹.

2.5. Características generales de los fármacos de primera línea

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un esquema terapéutico inicial para los pacientes confirmados con tuberculosis, el cual se basa en una combinación de cuatro fármacos denominados de primera línea que se administran durante un periodo de seis meses. Algunas características de los fármacos isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB) se describen a continuación ^{2, 24}.

Isoniazida (INH) es un fármaco que se administra desde 1952 de forma oral, presenta actividad bactericida frente a los bacilos metabólicamente activos y actividad bacteriostática en poblaciones latentes. La concentración mínima inhibitoria (CMI) en las cepas sensibles oscila entre 0,025 y 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Inhibe la síntesis de los ácidos micólicos de la pared celular y se activa *in vivo* por la acción de la enzima catalasa peroxidasa, la cual es codificada por el gen KatG^{4, 25}.

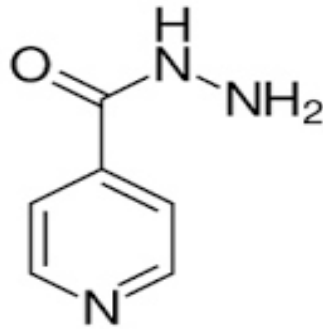


Figura 4. Estructura Química del fármaco de primera línea, isoniazida.

Rifampicina (RIF) se descubrió en 1965, se administra de forma oral, presenta actividad bactericida frente a los bacilos metabólicamente activos, latentes y con crecimiento irregular. Inhibe la síntesis del RNA mensajero interaccionando de manera selectiva con la subunidad beta de la RNA polimerasa, la cual es codificada por el gen *rpoB*. La concentración mínima inhibitoria (CIM) para *Mycobacterium tuberculosis* se encuentra entre 0,005 a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ ^{4, 25}.

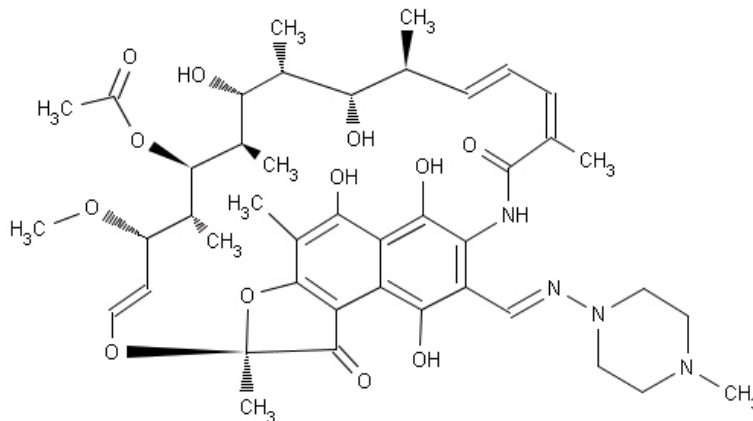


Figura 5. Estructura Química del fármaco de primera línea, rifampicina.

Pirazinamida (PZA) se descubrió en 1970, se administra de forma oral, presenta actividad bactericida frente a los bacilos en estado latente. Aún no se ha establecido su mecanismo de acción pero se cree altera la membrana celular y disminuye el transporte de energía de la célula. La concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a *Mycobacterium tuberculosis* es de 20 µg/ml ^{4, 25}.

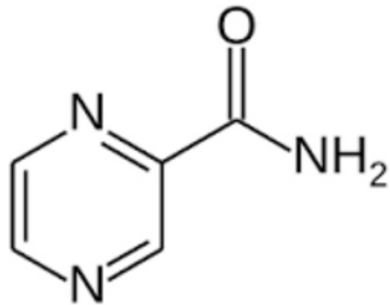


Figura 6. Estructura Química del fármaco de primera línea, pirazinamida

Etambutol (EMB) se desarrolló en 1968, se administra de forma oral, presenta actividad bacteriostática en los bacilos metabólicamente activos. Inhibe la síntesis de la pared celular micobacteriana específicamente la formación de arabinogalactano, en la cual está involucrada la enzima arabinosin transferasa que es codificada por el gen embCAB. La concentración mínima inhibitoria (CMI) es de 1 a 5 µg/ml. A pesar que no tiene una alta efectividad, sigue siendo un fármaco de elección debido a su baja toxicidad y efectos secundarios ^{4, 25}.

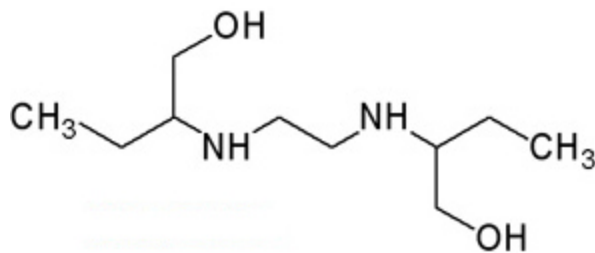


Figura 7. Estructura Química del fármaco de primera línea, etambutol

2.6. Problema de multifarmacorresistencia

A pesar de que existen sistemas de salud implementados para que se lleve a cabo el tratamiento adecuado y se controle la propagación de la enfermedad, en los últimos años se siguen generando nuevos casos, los cuales se ven agravados por la aparición de cepas resistentes a uno e incluso a todos los fármacos de primera línea y segunda línea, dificultado drásticamente su eliminación ²⁶. El aumento de estas cepas se debe en cierta manera al uso de fármacos por largos períodos de tiempo y bajo apego al tratamiento indicado. Autores han asociado algunos mecanismos que se encuentran involucrados en dicha resistencia como la impermeabilidad de la membrana celular, la expulsión de los mismos por bombas de flujo, la producción de enzimas que desactivan los fármacos e inclusive lo asocian con mutaciones o factores genéticos de *Mycobacterium tuberculosis* ²⁷.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) se define como tuberculosis multifarmacorresistente aquella enfermedad originada por una cepa de tuberculosis que no responde al tratamiento de los fármacos antituberculosis de primera línea o por lo menos a isoniazida y rifampicina, dos de los fármacos más eficaces ², la misma organización en el año 2013 estimó que 300,000 de los pacientes diagnosticados con TB-pulmonar tenían cepas multifarmacorresistentes ². En el 2014, 480 000 personas a nivel mundial, fueron afectadas por estas cepas las cuales complicaron su salud y 190 000 fallecieron por dicha causa ²⁸.

Estudios previos en Monterrey, Nuevo León, demuestran la variabilidad fenotípica de resistencia a fármacos de primera línea y segunda línea en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y recomiendan tomar medidas preventivas para frenar su transmisión y evitar la aparición de cepas extremadamente resistentes (XDR) ²⁹. Uno de los grandes problemas actuales es que los métodos terapéuticos frente a las distintas formas de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* no han sido modificados trascendientemente en los últimos años. Este problema ha hecho que el tratamiento de la tuberculosis resistente sea más difícil de tratar, más compleja y el índice de mejoría sea mucho menor comparado con los pacientes con tuberculosis tradicional ³⁰. El esfuerzo para desarrollar nuevas terapias con mecanismos de acción diferentes, que se dirijan a blancos que son cruciales para la supervivencia de la micobacteria, puede ser una alternativa para detener la propagación de cepas multifarmacorresistentes (MFR) y disminuir las cifras de la enfermedad en la población ⁴. Se ha establecido que la capacidad de las bacterias para responder a distintos estímulos y generar niveles de resistencia a diversos antibióticos está relacionada directamente con el mecanismo de acción de los fármacos, por lo tanto entender su función sería útil para decidir una terapia adecuada ⁵.

2.7. Nuevos compuestos antituberculosis derivados del fármaco etambutol

El etambutol (etilen-diamino-dibutanol), es un producto originado de la etilendiamina, que en los últimos años ha sido el fármaco predilecto por diversos autores para el desarrollo de compuestos análogos, principalmente porque interviene en la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*, pudiendo ser este un blanco terapéutico importante ³¹.

En el año 2005, se desarrollaron 63,238 análogos del etambutol, que conservaban el farmacóforo 1,2-diamina, los mismos fueron sintetizados, analizando su actividad antituberculosis. 2,796 de los compuestos contaba con afinidad por los lípidos, creyéndolos prometedores, sin embargo tras una serie de estudios, solo se propusieron tres análogos (SQ37, SQ59, SQ109) como posibles candidatos contra la tuberculosis, estos obtuvieron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 1.25, 12.5 y 0.63 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, destacando este último por poseer una concentración mínima inhibitoria (CMI) inferior a la del etambutol ³².

Las estructuras químicas de los compuestos se presentan en las figuras 8,9 y 10.

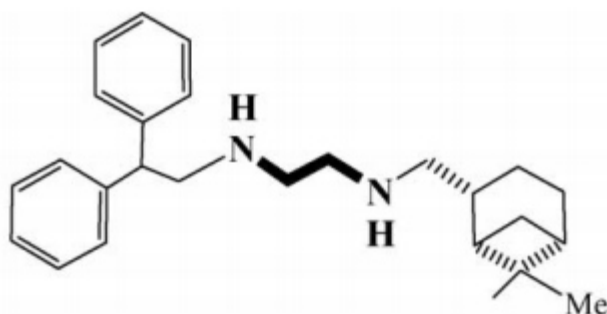


Figura 8. Estructura química de los compuestos análogos del etambutol, SQ37.

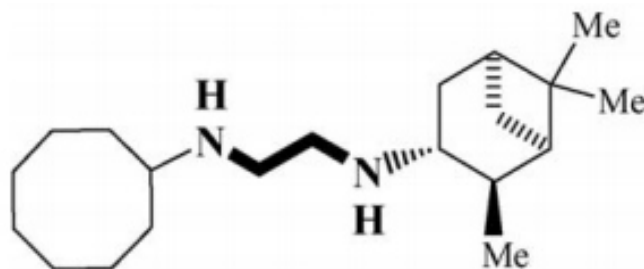


Figura 9. Estructura química de los compuestos análogos del etambutol, SQ59.

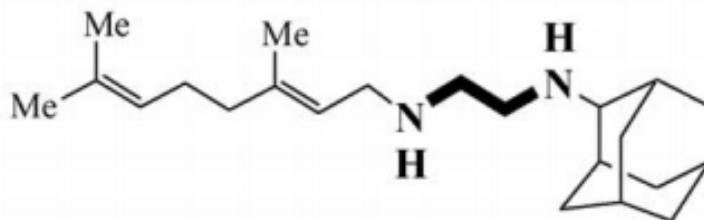


Figura 10. Estructura química de los compuestos análogos del etambutol, SQ109.

En el mismo año se publicaron trabajos extensos del compuesto SQ109 (1,2-etilendiamina), en los cuales se determinó su farmacodinámica y farmacocinética. Un trabajo *in vitro* empleando cepas sensibles y resistentes a isoniazida, rifampicina y etambutol, demostró su efectiva actividad antituberculosis, no obstante en ensayos en modelos animales se señaló una mala biodisponibilidad oral, por ello, se han creado compuestos con variantes estructurales que mejoren sus propiedades farmacocinéticas, conservando su actividad antituberculosis. Este compuesto interacciona con la biosíntesis de la pared celular de la micobacteriana, a pesar de ello, aún se desconoce con precisión su mecanismo de acción ³³.

En el 2008 un grupo de investigadores del centro de ciencias de la salud de la Universidad de Tennessee realizaron el diseño y síntesis de compuestos que mantiene una gran analogía con la estructura química del etambutol, presentando valores de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) similares, a pesar de ello ninguno mejoró la actividad del fármaco de primera línea ³⁴.

En la siguiente figura se muestra la estructura química de uno de ellos, el cual conserva el farmacóforo 1,2-diamina.

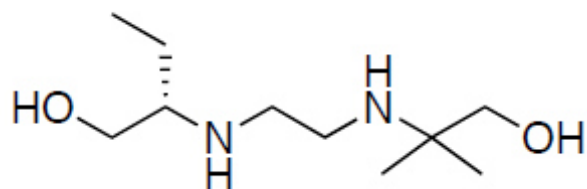


Figura 11. Estructura química de un compuesto análogo del etambutol.

Un año más tarde, con el objetivo de crear potentes compuestos que puedan remplazar o potencializar la actividad del tratamiento contra la tuberculosis, científicos de Shanghai, China, propusieron el compuesto S2824 cuya estructura es derivada de etilendiamina. El compuesto presentó una alta actividad antituberculosis con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 6.25 µg/mL, mayores a las reportadas para el etambutol, a pesar de estudios su mecanismo de acción aún se desconoce. En la figura 9 se muestra la estructura química del compuesto S2824, a la cual se le incorporaron fragmentos bencídricos, se observa a la vez la gran similitud con la estructura química del etambutol ³⁵.

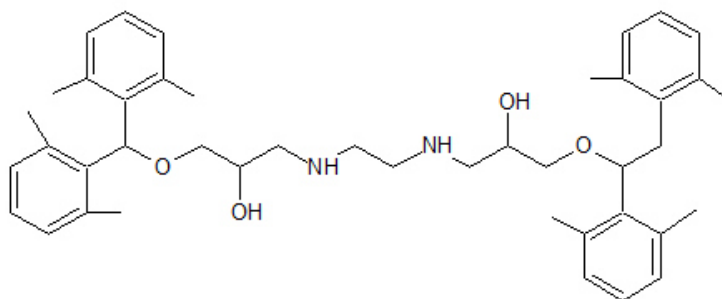


Figura 12. Estructura química del compuesto S2824.

Actualmente diversos autores continúan con el desarrollo de nuevos compuestos análogos del etambutol, los cuales aseguren una eficaz actividad antituberculosis con bajos efectos secundarios, elucidado los mecanismos de acción, sugiriendo a la vez la implementación de derivados de origen biológico como una nueva alternativa terapéutica. La pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* es fundamental para su supervivencia y es altamente selectiva, por lo tanto el diseño de compuestos químicos que permitan simular la estructura de esta matriz extracelular, e induzcan una perturbación en su estabilidad, pueden llegar a ser una gran alternativa ³⁶.

2.8. Compuestos UCI

Una asociación formada por la Universidad de Salamanca, Centro de Investigación Biomédica del Noreste y el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, han sintetizados análogos del fármaco de primera línea etambutol y la esfingosina, esta última forma parte importante de los fosfolípidos de membrana de las micobacterias y se sintetiza a partir del aminoácido serina y el ácido palmítico. Los compuestos fueron evaluados para determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* utilizando la cepa de referencia H37Rv sensible a los cuatro fármacos de primera línea y la cepa CIBIN:UMF:15:99 la cual pertenece a un aislado clínico resistente a estos fármacos. De estos análogos solamente el compuesto UCI-05 y UCI-14, presentaron una eficaz actividad antituberculosis ^{8,9}.

El ensayo *in vitro* se llevó a cabo usando el método modificado de microdilución en placa, ambos compuestos resultaron ser más eficaces que el agente de uso clínico, obteniendo concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) menores a 7.2 µg/ml para H37Rv y menores que 58 µg/ml para la cepa CIBIN99 ^{8,9}.

La actividad antituberculosis *in vivo* de ambos compuestos se determinó empleando modelos murinos (BALB/c) de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones fueron expuestos a una carga bacilar de 1×10^6 bacterias de la cepa de referencia H37Rv, obteniendo resultados favorables y una mínima toxicidad. El compuesto UCI-05 resultó más potente al disminuir la carga bacilar 15 veces en comparación con el UCI-14 que solo redujo la carga bacilar pulmonar 3 veces ^{8,9}.

La estructura química de los compuestos está formada por una cadena alifática larga de 14 carbonos, un anillo bencénico como se muestra en la figura 13 y 14. Se puede observar que el compuesto UCI-14 presenta dos grupos etilo unidos al nitrógeno, lo cual estructuralmente le otorga una mayor lipofilicidad, comparado con el compuesto UCI-05 ^{8,9}.

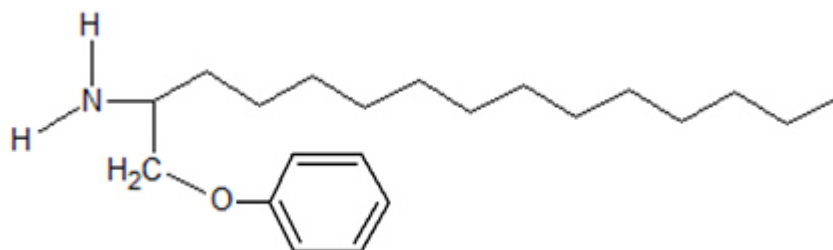


Figura 13. Estructura química del compuesto UCI-05.

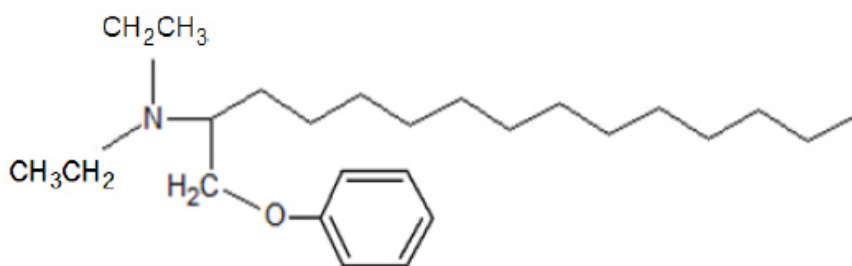


Figura 14. Estructura química del compuesto UCI-14.

Los mecanismos de acción de ambos compuestos se desconocen. Por lo tanto es primordial el análisis de los perfiles de expresión génica en poblaciones de *Mycobacterium tuberculosis* para determinar su blanco terapéutico e identificar si el mismo se mantiene.

2.9. Diversidad poblacional en *Mycobacterium tuberculosis*

Los microorganismos cuentan con mecanismos los cuales son regulados por diversos genes, con el fin de adaptarse y soportar diferente estrés ambiental, como la disponibilidad de oxígeno, cambios en la temperatura o la exposición a un antibiótico, mediante la modificación de su perfil transcripcional, sin embargo múltiples trabajos reportan una importante heterogeneidad en poblaciones bacterianas, inclusive cuando estas poseen la misma información genética y se exponen al mismo factor ambiental, centrándose en la posibilidad de que tal diversidad entre una célula y otra es inevitable en los sistemas biológicos ^{11, 37}.

En el 2012 un grupo de investigadores, planteó la posibilidad de que la heterogeneidad se lleva a cabo por variaciones particulares en las células micobacterianas, lo cual crea diferentes patrones de susceptibilidad a los fármacos, estos autores se basaron en trabajos previos los cuales sugirieron que se requiere un largo tratamiento con los fármacos actuales debido a que la población micobacteriana es funcionalmente heterogénea y contiene células que son sensibles ¹⁰.

Se estableció que *Mycobacterium tuberculosis* presenta una notable variabilidad, la cual es determinada por su tasa de elongación y su asimétrica en la división celular, dando como consecuente células hijas con diferente velocidad y tamaño de elongación, lo cual origina subpoblaciones fisiológicamente distintas ¹⁰, por lo tanto la heterogeneidad fenotípica en una población es capaz de otorgarle ventajas de supervivencia ante el tratamiento con antibióticos ^{38, 39}.

Autores han definido el término clona a una población individual homogénea la cual se obtiene a partir de un aislado en específico, tras una serie de diluciones seriales, mientras que una cepa corresponde a una población heterogénea, que puede presentar diversos perfiles genéticos y fenotípicos ^{37, 40}.

En un análisis previo se comparó clonas y cepas sensibles y multifarmacorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, empleando técnicas de *spoligotyping* y RFLP-IS6110, revelando que se conserva el patrón genotípico y fenotípico entre ellas, sin embargo estos patrones fueron distintos entre poblaciones sensibles y resistentes ¹³.

2.10. Perfil de expresión génica

El perfil de expresión génica se determina mediante la evaluación de la actividad de los genes o grupo de genes, midiendo los niveles de expresión del ARN mensajero o la expresión diferencial del mismo, bajo una condición experimental específica, con el propósito de conocer los mecanismos celulares claves de un microorganismo ⁴¹.

El ruido en el análisis de la expresión génica, es atribuible a la variabilidad fenotípica entre poblaciones idénticas, la cual se presenta por diversos procesos naturales aleatorios, que son llevados a cabo por un sinnúmero de reacciones bioquímicas dentro de las células ⁴².

Reconocer los genes que están diferencialmente regulados en determinadas condiciones como la exposición a un fármaco es crítico para interpretar los cambios fisiológicos.

Mycobacterium tuberculosis al igual que una infinidad de microorganismos tiene la habilidad de modificar su perfil transcripcional, reorganizando su transcriptoma, con el fin de adaptarse, dicho cambio puede ser evaluado mediante diversas técnicas como microarreglos o RT-qPCR ⁴³.

2.11. Técnicas empleadas para evaluar expresión génica

La técnica de microarreglos (chips de ADN), surgió con el objetivo de detectar y cuantificar simultáneamente la expresión de miles de genes, este proceso se lleva a cabo en un soporte sólido, el cual contiene diferentes celdas, con múltiples sondas de ADN de cadena simple ancladas a ella. Existen diversos modelos de microarreglos los cuales se fundamentan en el mismo principio, en ellos la hibridación de las secuencias se lleva a cabo cuando la cadena complementaria de ADN de estudio se une a la secuencia de ADN anclada al soporte, la fluorescencia producida por dicha interacción se evalúa mediante el empleo de equipos automatizados. El grado de expresión génica se define mediante el análisis de dicha señal y la cuantificación se lleva a cabo, utilizando números representativos, pudiendo de esta manera analizar simultáneamente miles de genes ⁴⁴.

Una de las principales desventajas de este método es su baja sensibilidad, baja reproducibilidad y elevada manipulación. La calidad de los datos producidos por esta herramienta puede cambiar en gran medida con la plataforma y el protocolo que se aplica ⁴⁴.

Actualmente un conjunto de técnicas más específicas se han implementado. La técnica RT-qPCR, cumple con las cualidades necesarias para este fin, por ello se usa como una herramienta de validación de resultados obtenidos a partir de microarreglos ⁴⁵.

Esta técnica tiene la cualidad de analizar genes en específico. Previo al uso de esta técnica, es indispensable sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm, esto se lleva a cabo, empleando la transcripción inversa. El producto obtenido, se amplifica y cuantifica ciclo por ciclo mediante fluorescencia emitida la cual es proporcional a la cantidad de ADNc producida, este parámetro se evalúa en términos absolutos o relativos dependiendo de su utilidad ⁷.

Los valores obtenidos en esta prueba, se registran mediante cinéticas de amplificación, determinando en ellas un punto fijo que se denomina umbral de detección. Los valores del ciclo umbral (Ct) se determinan identificando el ciclo en el cual la intensidad de fluorescencia atraviesa el punto del umbral de detección, por encima del ruido de fondo, este valor suele utilizarse como referencia para calcular la expresión génica ⁷.

El papel que juega la expresión de genes de *Mycobacterium tuberculosis* empleando fármacos con actividad antituberculosis ha sido poco estudiado, sin embargo, es importante conocer las modificaciones e identificar la función de los mismos con el fin de generar terapias efectivas.

En la actualidad no existe un método de identificación de fenotipos distintos dentro de una población homogénea de *Mycobacterium tuberculosis*, por lo tanto, la comparación de diversos perfiles de expresión génica se ha vuelto una herramienta fundamental para comprender procesos biológicos ⁴⁶.

La evaluación de los perfiles de expresión génica de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*, previamente tratados con fármacos de primera línea, estableció mediante el empleo de la técnica de RT-qPCR, la existencia de una regulación positiva de genes implicados en la respuesta al estrés por antibióticos, proponiendo que los bacilos cuentan con mecanismos los cuales permiten su supervivencia bajo esta condición de estrés, así como sistemas que disminuyen su velocidad de crecimiento y metabolismo. La reducción de la tasa de crecimiento, se asocia con una deficiente acción de los fármacos los cuales se dirigen a la replicación de la bacteria ⁴⁷.

Un reciente estudio de los perfiles de expresión génica en clonas provenientes de una cepa de referencia (H37Rv) sensibles a los fármacos de primera línea y clonas provenientes de un aislado clínico multifarmacorresistente a los mismos (CIBIN99), tratadas con los nuevos compuestos UCI-05 y UCI-14, identificó mediante el uso de la técnica de microarreglos, la modificación de diversos genes debido al tratamiento, de los cuales 17 genes (*desA2*, *esXG*, *esXH*, *esXI*, *groES*, *hspX*, *infA*, *iniB*, *LLdD2*, *mmaA4*, *nrdH*, *rpml*, *tatA*, *whiB1*, *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*) que cumplieron con el criterio de selección y fueron validados por la técnica de RT-qPCR, obteniendo como resultado que los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*, se modificaron significativamente como consecuencia al tratamiento con ambos compuestos ¹³.

Específicamente el gen *gltA1* el cual codifica para la enzima metilcitrato sintasa se sobreexpresó significativamente ($p < 0.05$) en comparación con el control (DMSO) en la población clonal de H37Rv, en presencia de los compuestos UCI-05 y UCI-14. El gen *rpsO* que codifica para la proteína ribosomal S15 se reprimió significativamente ($p < 0.05$) en la población clonal de H37Rv, en presencia del compuesto UCI-14. El gen *lprQ* que codifica para la lipoproteína LprQ, se sobreexpresó, sin tener significancia estadística, pero obtuvo una tendencia a la significancia, en la población clonal CIBIN99, en presencia del compuesto UCI-05.

Dichos genes están involucrados en categorías funcionales, vías de información, procesos celulares, pared celular, metabolismo intermediario y respiración de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo a la base de datos genómicos de tuberculist ⁴⁸.

El estudio en poblaciones individuales se realizó en este trabajo con el fin de disminuir el ruido generado por la heterogeneidad presente en aislados clínicos y cultivos, garantizando resultados únicos.

El gen *gltA* equivalente al gen *prpC* codifica para la enzima citrato sintasa I también llamada metilcitrato sintasa de acuerdo a la base de datos Tuberculist ⁴⁸, dicha enzima interviene por una parte en el ciclo del metilcitrato metabolizando propionil-CoA y por otra parte participa en el ciclo del glioxilato metabolizando la conversión de oxaloacetato más acetil-CoA en citrato ⁴⁹. Ensayos sugieren que la generación de propionil-CoA y acetil-CoA producidos a través de la β -oxidación de los ácidos grasos son altamente tóxicos para *Mycobacterium tuberculosis* ⁵⁰.

Recientemente el ciclo del metilcitrato se ha investigado como una potencial vía metabólica que pudiera ser un blanco de nuevos fármacos y es primordial el estudio de enzimas específicas en este proceso como: metilcitrato sintasa y metilcitrato deshidratasa ⁵¹, de igual manera se ha propuesto la estrategia de crear nuevos fármacos que inhiban enzimas que intervienen en el ciclo del glioxilato y de esta manera causar la muerte de la bacteria ⁴³.

Shi L, y colaboradores señalan que el aumento en la expresión de genes involucrados en estos dos ciclos se genera en respuesta a un menor índice de crecimiento y no a la variación de la fuente de carbono disponible ⁵².

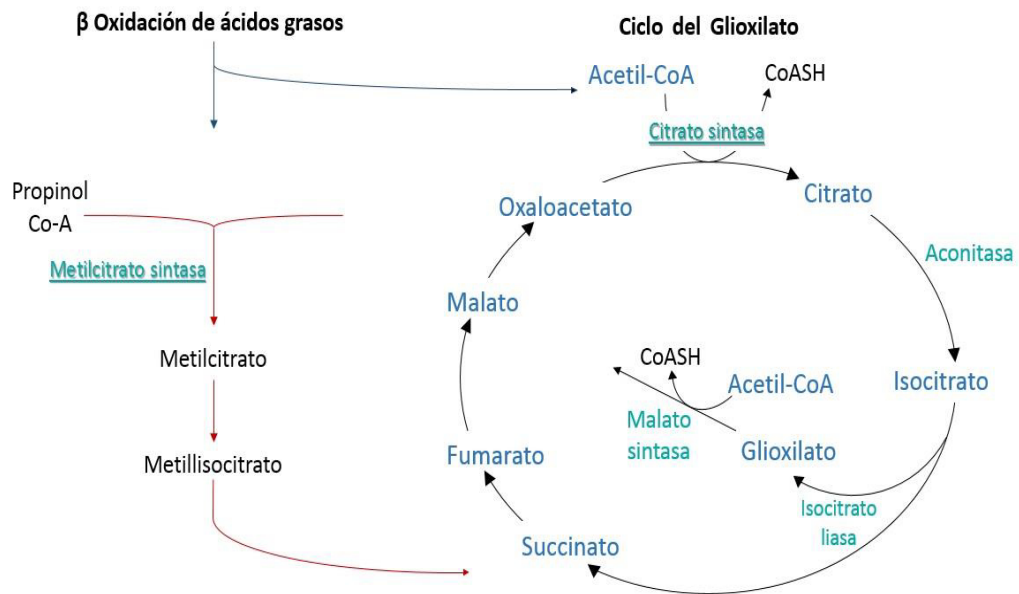


Figura 15. Diagrama de la beta oxidación de los ácidos grasos.

El gen *rpsO* codifica para la proteína ribosomal S15 de la subunidad pequeña 30S de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo a la base de datos tuberculist⁴⁸, dicha proteína ha sido poco estudiada en micobacterias pero se cree es una de las proteínas primarias de unión al RNAr, la cual se une de manera directa a 16S, colaborando de esta manera con el ensamblaje de la subunidad 30S⁵³.

El gen *lprQ* que codifica para la lipoproteína LprQ no ha sido determinado por completo y su función todavía se desconoce⁴⁸. Recientemente se propuso que existe una relación entre la resistencia a fármacos antituberculosis y ciertos genes que antes no se habían asociado los cuales poseen actividades particulares en el desarrollo de la micobacteria. Entre estos se encuentran el gen *lprO* que se encuentra asociado a la categoría funcional de procesos celulares y de la pared celular, el gen *rpsT* que codifica para la proteína s20 rpST de la subunidad 30S del ribosoma y se encuentra en la categoría funcional de vías de información y el gen *lipG* el cual codifica para una probable lipasa/esterasa LipG, y se encuentra en la categoría funcional del metabolismo intermediario y respiración de acuerdo a la base de datos tuberculist⁴⁸,⁵⁴.

Para el control de la tuberculosis es primordial el diseño de nuevos compuestos, los cuales se basen en estudios a nivel molecular. En particular el estudio de los perfiles de expresión génica, es obligado para identificar los genes involucrados en funciones vitales para la célula, los cuales pudieran ser blancos de tratamientos alternativos.

El objetivo de este trabajo es analizar el perfil de expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, una sensible (H37Rv) y otra multifarmacorresistente (CIBIN99), expuestas a los compuestos UCI-05 y UCI-14, las cuales le dieron origen a las clonas, determinando las modificaciones en la expresión génica como consecuencia al tratamiento.

3. Aportación Científica

El análisis del perfil de expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* expuestas a compuestos UCI-05 y UCI-14 (con actividad antituberculosis comprada), permitirá determinar las vías de acción y las probables modificaciones que se generan debido al tratamiento con los nuevos compuestos. Lo cual podría resultar en la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

4. Hipótesis

La expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* de *Mycobacterium tuberculosis*, en una cepa sensible (H37Rv) y una cepa multifarmacorresistente (CIBIN99), se modifica al tratarlas con los compuestos UCI-05 y UCI-14.

5. Objetivo General

Evaluar el perfil de expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en una cepa sensible y una multifarmacorresistente de *Mycobacterium tuberculosis* expuestas a los compuestos anti-TB (UCI-05 y UCI-14).

5.1. Objetivos específicos

1. Tratar con los compuestos anti-tuberculosis UCI-05 y UCI-14 las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis* a las CMI correspondientes.
2. Obtener el RNA total de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis* tratadas con los compuestos anti-TB UCI-05 y UCI-14.
3. Evaluar mediante RT qPCR la expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (sensible) en presencia y ausencia de los compuestos anti-TB UCI-05 y UCI-14.
4. Evaluar mediante RT qPCR la expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en la cepa CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis* (multifarmacorresistente) en presencia y ausencia de los compuestos anti-TB UCI-05 y UCI-14.
5. Confirmar si existe el mismo patrón de expresión de genes entre las cepas y clones de *Mycobacterium tuberculosis* expuestas a los compuestos UCI-05 y UCI-14.

Metas

1. Presentar los resultados obtenidos al menos un congreso nacional o internacional.
2. Publicar un artículo científico
3. Terminar tesis en Diciembre de 2016

Metodología del trabajo

6. Material y Métodos

Los equipos que se utilizaron para el desarrollo del presente trabajo de tesis se encuentran ubicados en el Laboratorio de Biología Molecular y Laboratorio de Inmunogenética en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Los microorganismos con los que se trabajó fueron los siguientes:

Cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, sensible a los fármacos de primera línea.

Cepa de *Mycobacterium tuberculosis* CIBIN:UMF:15:99, aislado clínico resistente a los fármacos de primera línea, identificada y caracterizada en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste.

La parte experimental se dividió en 8 pasos los cuales se muestran en la figura 16, se describe cada uno de ellos posteriormente.

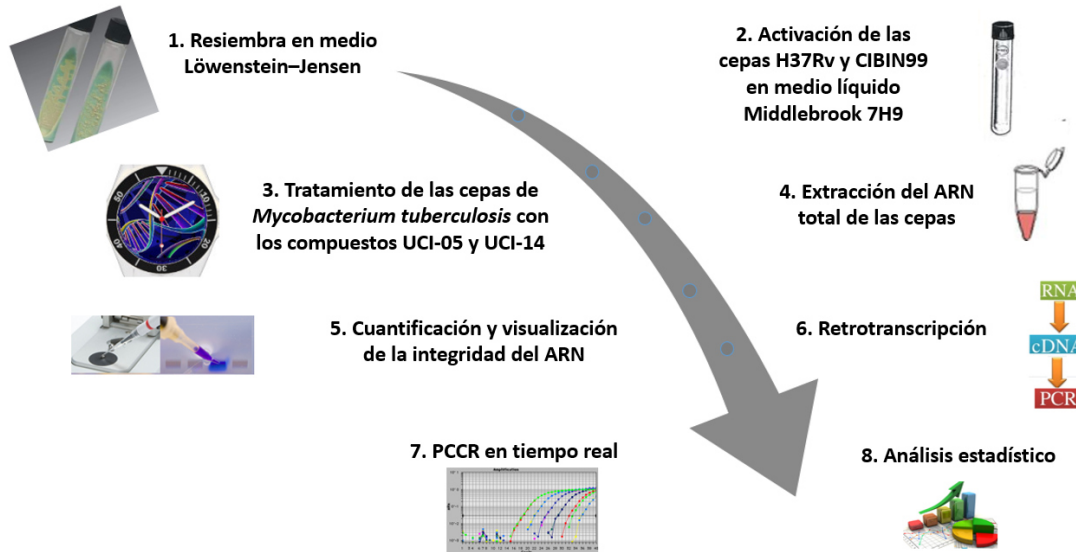


Figura 16. Representación esquemática de la metodología del proyecto.

6.1. Cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

La cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* fue aislada en 1905 y es ampliamente utilizada en un gran número de estudio debido a su estable virulencia. H37Rv es susceptible a los fármacos estreptomina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida (SIREP), su manipulación es sencilla y rutinaria en ensayos de biología molecular ⁵⁵.

En 1998 se determinó su genoma completo, el cual está compuesto por un cromosoma circular de 4.411,529 pb, conteniendo alrededor de 4,000 genes, aproximadamente 200 de estos genes codifican enzimas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos, tiene un contenido alto de guanina y citosina (GC= 65.6%), el cual es relativamente constante a lo largo del genoma ⁵⁵.

En la siguiente figura se representa su cromosoma circular, el círculo externo señala la escala en megabases, donde el 0 representa el origen de la replicación. El primer círculo de afuera hacia adentro muestra genes estables del ácido ribonucleico (ARN), el siguiente representa diversas secuencias codificantes, estableciendo por tonalidad el sentido, el tercer círculo el ácido nucleico (ADN) repetitivo. En el centro de color amarillo se representa el contenido de GC (>65%) ⁵⁵.

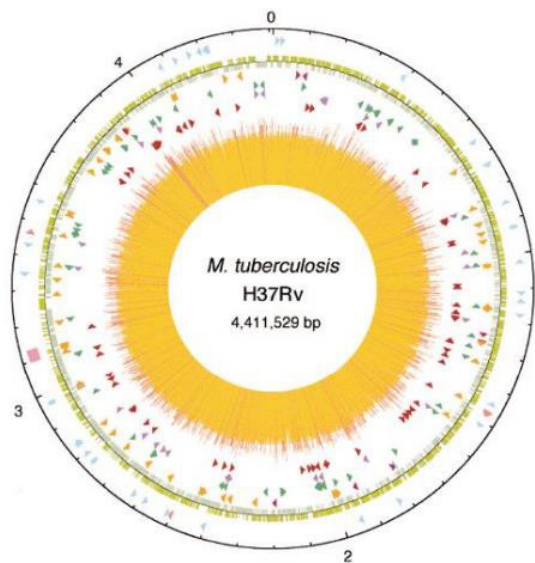


Figura 17. Genoma de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

6.2. Cepa CIBIN:UMF:15:99 de *Mycobacterium tuberculosis*

La cepa CIBIN:UMF:15:99, denominada CIBIN99 pertenece a un aislado clínico, el cual fue obtenido a partir de un paciente con diagnóstico de tuberculosis de la unidad de medicina familiar número 15 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), ubicado en el municipio de Monterrey, Nuevo León, México ⁵⁶.

La identificación de su perfil fenotípico y genotípico se empleó mediante el uso del sistema Bactec 960 y pruebas con pirazinamida, así como técnicas de *spoligotyping* y RFLP-IS6110, en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) situado en Monterrey, Nuevo León, México.

La cepa es resistente a todos los fármacos de primera línea (SIREP), carece de los espaciadores 18, 33 al 36, del elemento de inserción de la secuencia repetitiva directa (DR) y presenta 4 copias del elemento de inserción IS6110 ¹³.

6.3. Resiembra en Medio Löwenstein–Jensen.

Para llevar a cabo el procedimiento se usaron ambas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* descritas anteriormente. Las cuales se trabajaron en el laboratorio de micobacterias situado en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, el cual cuenta con un nivel de bioseguridad BL3. A partir de las cepas H37Rv y CIBIN99 mantenidas en congelación se tomó un inóculo y se colocó en dos tubos de vidrio de 13 X 100 mm estériles los cuales contenían 6 perlas de vidrio y 2 ml de agua mili Q, se homogenizó la muestra con vortex por 5 minutos y se transfirió un volumen de 200 µl a un tubo con medio Löwenstein–Jensen, este proceso se realizó por duplicado para cada cepa.

Los cultivos se mantuvieron en incubación alrededor de 3 semanas hasta observar las características morfológicas típicas de las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* de las cepas H37Rv y CIBIN99. Este paso se realizó 3 veces y posteriormente se activaron las cepas en medio líquido Middlebrook 7H9.

6.4. Activación de cepas H37Rv y CIBIN99 en medio líquido Middlebrook 7H9.

La activación de las cepas se dividió en 2 etapas.

En la etapa 1 a partir de las colonias formadas en los tubos con medio Löwenstein–Jensen de las cepas H37Rv y CIBIN99, se tomó un inóculo y se colocó en dos tubos de vidrio de 13 X 100 mm estériles con 6 perlas de vidrio y 2 ml de agua mili Q, se homogenizó la muestra y se transfirieron 200 µl a un nuevo tubo con medio Löwenstein–Jensen. El mismo inóculo fue usado para activar las cepas de H37Rv y CIBIN99 en tubos de vidrio de 13 X 100 mm que contenían 3 ml de medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa). Tanto los tubos con medio Löwenstein–Jensen y los tubos de 13 X 100 mm con medio líquido se conservaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ dentro de una incubadora alrededor de 3 semanas y 14 días respectivamente. Se determinó que el crecimiento micobacteriano se encontraba en 1.0 de la escala McFarland.

Cada tercer día los tubos con medio Löwenstein–Jensen y los tubos de vidrio de 13 X 100 mm con medio líquido se destaparon y se agitaron en vortex con la finalidad de llevar a cabo un intercambio de CO₂ y O₂ (Cada cepa se trabajó por triplicado). La etapa 2 se realizó una vez que transcurrieron los 14 días de incubación del cultivo de la etapa 1, a partir de ellos se colocó 1 ml del inóculo (1.0 de McFarland) a tubos falcon de 50 ml que contenían 11 ml de medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con 10 % de OADC (por triplicado cada cepa). Cada tercer día se agitaron en vortex y se destaparon los tubos de 13 X 100 mm para generar el intercambio de CO₂ y O₂. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ con agitación constante alrededor de 15 días para alcanzar la fase de crecimiento exponencial en las cepas.

6.5. Tratamiento de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con los compuestos UCI-05 y UCI-14

Los cultivos de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis* que se conservaban en tubos falcon de 50 ml alcanzaron una fase de crecimiento exponencial (14 días) y se ajustaron a un volumen final de 10 ml, el restó del volumen se utilizó para determinar que el crecimiento se encontrara en 1.0 de escala McFarland, posteriormente se expusieron al tratamiento con los compuestos antituberculosis UCI-05 y UCI-14, durante 4 horas a las siguientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que se muestran en la Tabla I.

Cepa	TRATAMIENTO CMI $\mu\text{g/ml}$	
	UCI-05	UCI-14
H37Rv	5 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$
CIBIN99	2.5 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$

Tabla I. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los compuestos UCI-05 y UCI-14 empleadas en las cepas H37Rv y CIBIN99 ¹³.

Los cultivos en condiciones sin ningún tratamiento y expuestas al tratamiento con los compuestos UCI-05 y UCI-14 se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ con agitación constante por 4 horas. Una concentración de 0.1% de DMSO (dimetilsulfóxido) se utilizó como control, debido a que los compuestos se disolvieron en este solvente.

6.6. Extracción de ARN total de cepa H37Rv y CIBIN99

A partir de los cultivos de las cepas H37Rv y CIBIN99 expuestas a los compuestos UCI-05 y UCI-14, el control (DMSO), así como una condición sin tratamiento se llevó a cabo la extracción de ARN total mediante el protocolo de TRIzol® (Invitrogen) + Fast-Prep (Qbiogene Inc), estandarizado por la Dra. Katia Peñuelas Urquides ¹³ como se describe a continuación.

Los cultivos se centrifugaron por 20 minutos a 3,390 rpm a 4°C, el sobrenadante se decantó y se adicionaron 800 µl del reactivo TRIzol® esta solución se homogenizó y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y se agitó cada 10 minutos para incrementar la homogenización.

Se transfirió 1 ml de esta solución a tubos FastPrep y estos se colocaron 3 veces en el equipo de homogenización simultanea FastPrep con ciclos de velocidad de 6/20 segundos, entre cada ciclo las muestras se incubaron en hielo por 2 minutos.

Posteriormente los tubos FastPrep se centrifugaron por 3 minutos a 12,000 rpm a 4°C, el sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml.

Se adicionaron 200 µl de cloroformo y se homogenizó por inversión hasta que se observó un viraje de color transparente a color rosa claro. Se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó por 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C y se transfirió la fase acuosa a tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 500 µl de isopropanol y se homogenizó por inversión. Cada muestra se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó por 10 minutos a 12,000 rpm a 4°C.

El pellet formado se lavó con 1 ml de etanol al 75%, se homogenizó por inversión, se centrifugó a 9,400 rpm por 5 minutos a 4°C. Con el objetivo de eliminar los restos de etanol, los tubos con el pellet se dejaron secar a temperatura ambiente en la campana y finalmente el ARN obtenido se resuspendió en 20 µl de Buffer TE 1X.

Debido a que existen reportes donde se propone que las enzimas RNAsas son extremadamente frecuentes en el medio ambiente y muy estables. En este proyecto se utilizó el empleo de una solución descontaminante de RNAsas, con el propósito de eliminar de forma fácil y rápida la contaminación de superficies e instrumentos de trabajo, garantizando de esta manera una zona libre de impurezas ⁵⁷.

6.7. Cuantificación e integridad del ARN total

Las concentraciones y la calidad de las muestras de ARN total extraído se determinaron mediante el uso del equipo espectrofotómetro NaNoDrop 2000 (Thermo scientific), el cual tiene la capacidad de detectar longitudes de onda de 190-840 nm.

Se calculó la relación de absorbancia ($A_{260/280}$ nm) cuyo valor debe mantenerse entre 1.7 a 2.0, indicando que el ARN no presenta contaminación con proteínas, mostrando de esta manera la pureza de las muestras.

La integridad de cada muestra se observó mediante el empleo de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1 % usando 1X Blue Juice™ Gel Loading Buffer y Gel Red™ Nucleic Acid. Para su realización se pesaron 0.3 gr de agarosa y se mezclaron con 30 ml de buffer TBE 0.5X, se calentó y agitó constantemente hasta tener una mezcla homogénea, se depositó en la cámara de electroforesis por 5 minutos hasta solidificar y se agregó buffer TBE 0.5X.

En cada pocillo se cargaron 2 μ l de la muestra más 1 μ l de buffer de carga el cual previamente se diluyó con Gel red, glicerol y agua. La electroforesis se realizó por 30 minutos a 100 Voltios para observar la separación de las bandas. Los fragmentos del ARN total generados se visualizaron con luz UV en un fotodocumentador de imágenes UVP.

La matriz de agarosa se emplea para observar bandas específicas de cada molécula, lo cual se lleva a cabo utilizando agentes intercalantes, que revelen la posición exacta dentro del gel. Por lo general la agarosa al 1% es el estándar para examinar bandas de ARN ribosomal ⁵⁸.

6.8. Retrotranscripción

Se realizó la síntesis del ADNc (ADN complementario) a partir del ARN extraído. Previamente se aseguró la eliminación del ADN contaminante mediante la aplicación de la enzima DNAsa I (1U) (Invitrogen) a 2µg de ARN de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante e inactivando la enzima mediante incubación por 5 minutos a 95°C.

La retrotranscripción se llevó a cabo usando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) de acuerdo al protocolo establecido por el distribuidor (Invitrogen). El cual consistió en añadir los componentes de la mezcla 1 (Tabla II) a tubos eppendorf de 0.2 ml ajustado a un volumen final de 12 µl. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 65°C y se colocaron en hielo. Los compuestos de la mezcla 2 (tabla III) se adicionaron a la mezcla 1 y se incubaron durante 2 minutos a 37°C, seguida de la incorporación de 200 U de la enzima M-MLV, se incubaron los tubos por 10 minutos a 25°C, durante 50 minutos a 37°C y por 15 minutos a 70°C con el propósito de inactivar la enzima.

El ADNc obtenido se usó como templado para la reacción de qPCR.

Los componentes y los volúmenes que se emplearon para la síntesis del ADNc se muestran en la Tabla II y Tabla III.

Mezcla 1		
Componente	Concentración inicial	1Rx
Random Primers	50 ng/µl	1µl
ARN(Tratado con DNAsa)	2µg	3µl
dNTP´s mix	10 mM	1µl
H ₂ O	-	7µl

Tabla II. Componentes de la mezcla 1 que se utilizó para 1 Reacción (Rx) en la síntesis del ADNc.

Mezcla 2		
Componente	Concentración inicial	1Rx
First-Strand Buffer	5X	4µl
DTT (ditiotreitól)	0.1M	2µl
RNaseOUT™	40 U/µl	1µl

Tabla III. Componentes de la mezcla 2 que se utilizaron para 1 Reacción (Rx) en la síntesis del ADNc.

6.9. Evaluación de Funcionalidad del ADNc

Con el objetivo de comprobar la funcionalidad del ADNc se realizó la amplificación del gen constitutivo *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la técnica de PCR punto final.

Dicho gen codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal. La secuencia y las características de los primers empleados se presentan en la tabla 4, seguida de la mezcla de componentes y los volúmenes que se emplearon para 1 Reacción (Rx) en la técnica de PCR punto final (Tabla IV).

Las condiciones de amplificación que se utilizaron se muestran en la tabla 6.

Gen	Codificación	Secuencia	Tamaño del amplicón
<i>rrs</i>	<i>rrs</i> Forward	5'-GTCAGGATATTTCTAAATACCTTTGG-3'	805 pb
	<i>rrs</i> Reverse	5'-CACCTCAGCGTCAGTTACTG-3'	

Tabla IV. Secuencias de los primers empleados para amplificación del gen *rrs*

Componentes para la reacción de la técnica de PCR	
Componente	1Rx
Buffer	2.5µl
dNTP's	0.5µl
MgCl ₂	0.75µl
Forward 1 <i>rrs</i>	1.25µl
Reverse 1 <i>rrs</i>	1.25µl
Taq ADN pol	0.125µl
H ₂ O	16.625µl
ADNc	1µl
Volumen final = 24µl	

Tabla V. Mezcla de componentes para la amplificación por PCR del gen *rrs*

Temperatura	Tiempo
95°C	5 minutos
94°C	1 minutos
55°C	1 minutos
72°C	1 minutos
72°C	7 minutos
18°C	∞

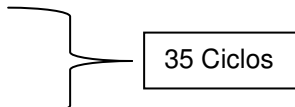


Tabla VI. Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen *rrs* en la técnica PCR

Para corroborar el tamaño del amplicón que se obtuvo después de someter las muestras a la técnica de PCR punto final, empleamos el método de electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, para su realización se pesó 1 gr de agarosa la cual se mezcló con 100 ml de buffer TBE 0.5X.

En cada pocillo se cargaron 3µl de la muestra más 1µl de buffer de carga el cual previamente se diluyó con Gel red, glicerol y agua, se utilizaron 5 µl de marcador de peso molecular TrackIt™ 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

La electroforesis se realizó por 45 minutos a 100 Voltios para observar la separación de las bandas. Los fragmentos generados se visualizaron en con luz UV en un fotodocumentador de imágenes UVP.

6.10. PCR en tiempo Real

A partir de las muestras de ADNc de las cepas H37Rv y CIBIN99 se midieron los niveles de expresión génica relativa de los genes *gltA1*, *rpsO*, *lprQ*. Todas las reacciones de amplificación se realizaron en el equipo 7500 Fast de Applied Biosystems.

En este método se hizo uso de sondas TaqMan® marcadas con un fluoróforo FAM en el extremo 5' y un fluoróforo quencher en el extremo 3' y el gen *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis* como control endógeno de la reacción. La técnica se llevó a cabo en un termociclador, el cual genera ciclos con cambios de temperatura, que permiten la desnaturalización de la secuencia de ADN blanco y el alineamiento de los primers y sondas TaqMan® al extremo 3' de la misma. La polimerización de la secuencia se llevó a cabo por la Taq polimerasa, la cual al llegar al punto donde se encontraba la sonda TaqMan® fue capaz de hidrolizarla, generando la emisión de fluorescencia como se muestra en la figura 18.

El equipo cuenta con un sistema fluorométrico el cual consiste en una fuente de energía que excita a los fluoróforos a una definida longitud de onda de excitación y un sistema de detección, que proporciona la señal fluorescente emitida a una longitud de onda de emisión, dando como resultado una curva de amplificación, que es proporcional a la cantidad de producto amplificado.

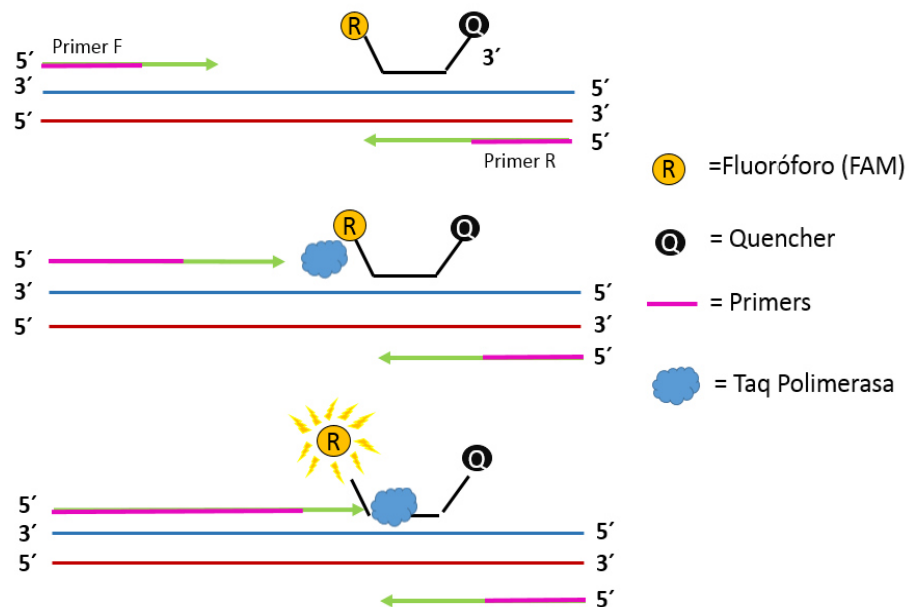


Figura 18. Proceso general de amplificación de la técnica de PCR en tiempo real

El fluoróforo FAM cuenta con una longitud de onda de excitación de 492 nm y una longitud de onda de emisión de 515 nm, el fluoróforo ROX posee una longitud de onda de excitación de 575 nm y una longitud de onda de emisión de 602 nm, este último se empleó como un colorante de referencia, para normalizar las señales de fluorescencia de las sondas TaqMan®.

En la siguiente figura se muestra el espectro de emisión de ambos fluoróforos.

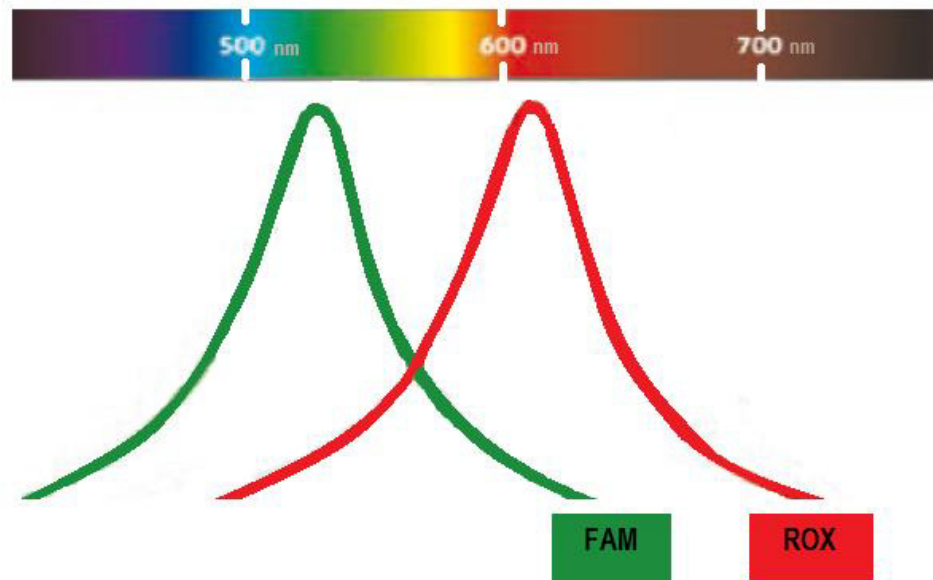


Figura 19. Espectro de emisión de los fluoróforos FAM y ROX a longitudes de onda de 515 nm y 602 nm respectivamente.

Previamente se estableció la eficiencia de la reacción para cada gen mediante la realización de curvas de rango dinámico, empleando diluciones seriales de ADNc a partir de 1:16 hasta 1:1024.

La eficiencia de la amplificación se determinó al evaluar el logaritmo de la concentración de RNA contra el valor de Ct mediante el análisis de regresión lineal. Para normalizar los datos obtenidos se realizaron curvas de regresión lineal del logaritmo de la concentración de ARN vs la diferencia del Ct (ΔC_t) entre el gen de interés y el gen *rrs*; el valor de la pendiente de la curva debe mantenerse < 0.1 para garantizar que la eficiencia de amplificación de ambos genes es aproximadamente igual.

El parámetro fundamental que proporciona el equipo y en función del cual se van a realizar todos los cálculos posteriores, es el denominado cycle threshold (Ct) equivalente al número de ciclos necesarios para que se alcance una señal de fluorescencia estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo (background).

En las siguientes tablas se indica la mezcla de componentes y volúmenes que se emplearon para 1 Reacción (Rx) de PCR para los genes *gltA1*, *rpsO*, *lprQ* (Tabla VII), gen *rrs* (Tabla VIII) y las condiciones de amplificación en la técnica de PCR en tiempo real (Tabla IX).

Componentes para la reacción de la técnica de qPCR	
Componente	1Rx
Buffer Master Mix (2X)	12.5µl
Primers/Sondas(20X)	1.25µl
ADNc	3µl
H ₂ O	8.25µl
Volumen final = 25µl	

Tabla VII. Mezcla de componentes empleados para los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*

Componentes para la reacción de la técnica de qPCR	
Componente	1Rx
Buffer Master Mix (2X)	12.5µl
Primers/Sondas(60X)	0.42µl
ADNc	3µl
H ₂ O	9.08µl
Volumen final = 25µl	

Tabla VIII. Mezcla de componentes empleados para el gen *rrs*

Temperatura	Tiempo
50°C	2 minutos
95°C	10 minutos
95°C	15 segundos
60°C	1 minutos

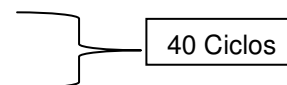


Tabla IX. Condiciones de amplificación de los fragmentos de los genes *gltA1*, *rpsO*, *lprQ* y *rrs* en la técnica qPCR

Las secuencias de los primers y las sondas TaqMan® empleadas para la amplificación de los genes *gltA1*, *rpsO*, *lprQ* y *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis* se diseñaron y sintetizaron por la empresa Applied Biosystems y se muestran en la tabla siguiente (Tabla X).

Gen	Sonda (FAM 5'-NFQ 3')	Secuencia	
<i>gltA1</i>	ACC TCC CCG AAG CAC	5'-CGG TTA TGC GCA GAA CTT CCT-3'	Forward
		5'-CAC GAC GGC GGT TTC G-3'	Reverse
<i>rpsO</i>	CAT CGC CGA CCT CAC C	5'-ATC GCG TTG CTG ACC AAA C-3'	Forward
		5'-CGA ATG ATG GTC GTG CTT GTG-3'	Reverse
<i>lprQ</i>	TCG ACG CCA AGC TGT	5'-GCG TCC TCG GGA GTA CTA C-3'	Forward
		5'-CCG AAC GGC AGC CCA T-3'	Reverse
<i>rrs</i>	TCGCTCCCCACGCTTT	5'-GGGTCTCTGGGCAGTAACTG -3'	Forward
		5'-GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT-3'	Reverse

Tabla X. Secuencias de los primers y sondas empleadas para la amplificación de los genes *gltA1*, *rpsO*, *lprQ* y *rrs*

En el ensayo se colocaron controles negativos (H₂O) y un control endógeno (gen *rrs*) para garantizar una prueba confiable. Para validez del método se realizaron triplicados técnicos de cada tratamiento determinando la desviación estándar del valor de Ct, la cual se fijó menor a 0.2 para garantizar un bajo error experimental.

6.11. Análisis de expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*

Los valores de Ct de los genes de estudio y el gen endógeno que proporciona el equipo fueron utilizados para cuantificar los niveles de expresión génica relativa entre tratamientos mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ propuesto por Livak y Schmittgen en el 2001. Con los valores de Ct se empleó la fórmula de cálculo de expresión génica relativa que se muestra a continuación.

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(muestra)} - \Delta Ct_{(control)}$$

6.12. Análisis Estadístico

El análisis de los resultados se realizó mediante el paquete estadístico SPSS versión 20, comparando las medias de los niveles de expresión génica relativa del mRNA de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* entre los niveles de expresión génica relativa del mRNA del gen *rrs* (UR) de las cepas y las clonas (trabajo previo) expuestas a los compuestos UCI-05 y UCI-14.

La significancia de las diferencias fue determinada usando la prueba de t-Student para muestras independientes donde $p < 0.05$ se consideró como significativa.

6.13. Disposición de los residuos generados

Los residuos peligrosos biológico infecciosos generados se colocaron en bolsa de polietileno color roja, se esterilizaron en autoclave a 121° centígrados con 15 libras de presión durante 30 minutos de acuerdo a lo establecido en la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 antes de su eliminación, finalmente el material inactivado fue clasificado para su eliminación apropiada.

7. Resultados

7.1. Resiembra en medio Löwenstein–Jensen y activación de las cepas H37Rv y CIBIN99 en medio líquido Middlebrook 7H9.

Las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis* fueron cultivadas en medio sólido Löwenstein–Jensen durante tres semanas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, cumpliendo las normas establecidas para un laboratorio de bioseguridad nivel 3.

En este trabajo se pudo visualizar e identificar después de un período prolongado de 20 días el crecimiento de colonias típicas de *Mycobacterium tuberculosis*, correspondientes a las cepas H37Rv y CIBIN99.

Las características fenotípicas típicas de las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* se observaron en ambas cepas, las cuales tuvieron un crecimiento abundante.

La morfología (tamaño grande, forma granular y seca) y pigmentación (color crema) de las colonias de la cepa H37Rv se muestran en la siguiente figura.



Figura 20. Cultivo de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* en medio sólido Löwenstein-Jensen

La activación de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis*, se pudo realizar utilizando el medio líquido Middlebrook 7H9.

El crecimiento celular las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis*, se visualizó en forma de grumos o masas, a partir de un período de 14 días.

Mediante el uso del aparato nefelómetro, se pudo determinar la concentración de bacilos de *Mycobacterium tuberculosis*, presente en cada una de las muestras, las cuales se mantenían en el medio líquido Middlebrook 7H9. El crecimiento se definió midiendo la turbidez de las mismas.

En nuestro trabajo ambas cepas se mantuvieron a las mismas condiciones de incubación de 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, por un período de 14 días, para garantizar que ambas poblaciones se encontrarán en la misma fase de crecimiento exponencial.

7.2. Tratamiento de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis* con los compuestos UCI-05 y UCI-14.

Los cultivos en la fase exponencial de crecimiento de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* se mantuvieron en tratamiento con los compuestos UCI-05 y UCI-14, control (DMSO) y sin tratamiento por 4 horas.

7.3. Extracción del ARN total de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis*

Con el fin de examinar los niveles de expresión génica de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis*, expuestas a los compuestos con actividad antituberculosis (UCI-05 y UCI-14), se llevó a cabo la extracción de ARN total, usando el protocolo estandarizado de Trizol ® más el equipo Fast-Prep ¹³.

El uso en conjunto del reactivo Trizol ® y el equipo FastPrep se han recomendado, con el objetivo de obtener ácido ribonucleico (ARN) proveniente de micobacterias de alta calidad y funcional ⁵⁹.

Mediante el empleo de método modificado y los parámetros establecidos, se pudo extraer ARN total de alta calidad de ambas cepas, el cual fue comprobando en ensayos posteriores.

7.4. Cuantificación del ARN total de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis*

El ARN procedente de las cepas tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14, fue de alta calidad y funcional.

En la siguiente tabla se muestran los valores de concentración y pureza obtenidos del análisis espectrofotométrico del ARN total extraído de las cepas H37Rv y CIBIN99.

Muestra (ARN total)	Concentración (ng/μl)	Pureza (A 260/280 nm)
H37Rv sin tratamiento	438.8	1.93
H37Rv DMSO	447.4	1.96
H37Rv UCI-05	476.8	1.91
H37Rv UCI-14	819.4	1.92
CIBIN99 sin tratamiento	363	1.89
CIBIN99 DMSO	448	1.94
CIBIN99 UCI-05	1035.4	1.87
CIBIN99 UCI-14	689.73	1.77

Tabla XI. Valores de cuantificación y pureza del ARN total aislado a partir de las cepas H37Rv y CIBIN99.

De forma particular cada una de las bases del ácido ribonucleico (ARN), cuenta con su propio y único espectro de absorción, este le confiere propiedades de absorbancia diferentes que otra molécula en específico. Los ácidos nucleicos poseen un límite de absorción a una determinada longitud de onda de 260nm, por lo tanto a esta longitud de onda, la absorción será proporcional a la concentración de dicha muestra, de igual manera las proteínas cuentan con máximo de absorción de 280nm el cual puede ser evaluados. Específicamente 1 densidad óptica (D.O.) a 260 nm para las moléculas de ácido ribonucleico (ARN) es igual a 40 ng / ul de ARN ⁶⁰.

La relación de absorbancia de 260nm/280nm por lo general se emplea con el fin de establecer la pureza de las muestras, es decir sin la presencia de contaminantes como proteínas, fenol, u otros compuestos. El ácido ribonucleico (ARN) puro tiene una relación de A260/A280 de 2.1, no obstante los valores entre 1.8 a 2.0, suelen considerarse como aptos para un gran número de protocolos ⁶⁰. En nuestro trabajo, todas las muestras se mantuvieron en estos valores, excepto la muestra CIBIN99 UCI-14, al tener una relación de A260/A280 de 1.77, sin embargo esta muestra se consideró para ensayos posteriores.

7.5. Integridad del ARN total de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis*

La integridad de las muestras de ARN total es fundamental y crítico para un adecuado análisis de expresión génica, previo a la síntesis del ADN complementario (ADNc) ⁷⁰.

En este proyecto la integridad del ARN total extraído de las cepas H37Rv y CIBIN99, se visualizó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%, observando bandas correspondientes a las subunidades 23S, 16S y 5S características del ARN ribosomal, confirmando de esta manera la integridad del ARN total de ambas cepas (figura 21).

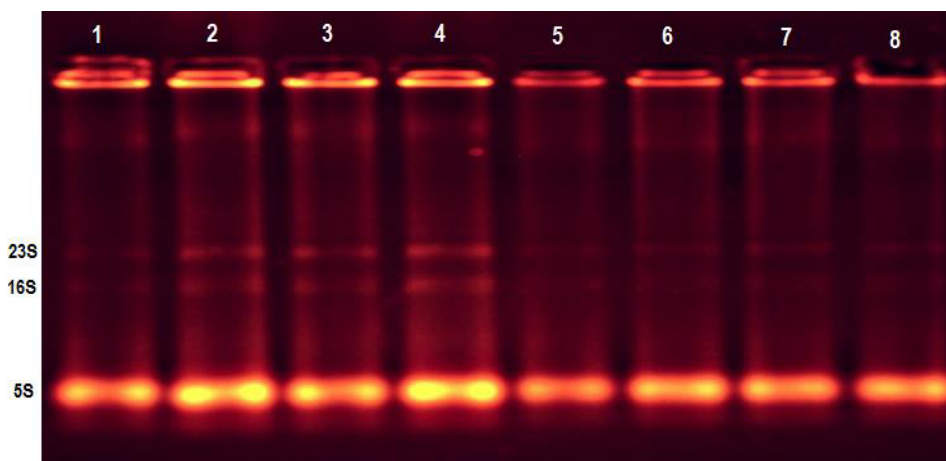


Figura 21. ARN total extraído de las cepas H37Rv y CIBIN99. Se observa en el carril 1: cepa H37Rv sin tratamiento, carril 2: cepa H37Rv tratada con DMSO, carril 3: cepa H37Rv tratada con UCI-05, carril 4: cepa H37Rv tratada con UCI-14, carril 5: cepa CIBIN99 sin tratamiento, carril 6: cepa CIBIN99 tratada con DMSO, carril 7: cepa CIBIN99 tratada con UCI-05, carril 8: cepa CIBIN99 tratada con UCI-14.

Las subunidades 23S, 16S y 5S del ARNr de los procariontes cuenta con un tamaño (pb) específico, el cual puede ser medido, por lo tanto determinar la calidad de ARNr se emplea como un indicador de la calidad del ARNm, el cual no puede visualizarse adecuadamente ⁵⁸.

En todas las muestras analizadas se detectó la presencia de tres bandas distintas, las cuales corresponden a las subunidades del ARN ribosomal. La técnica de electroforesis en gel de agarosa, continúa siendo el método más económico, fácil y rápido, para verificar la integridad y calidad de las mismas.

7.6. Evaluación de Funcionalidad del ADNc

La síntesis de ADN complementario (ADNc), a partir de las muestras de ARN obtenidas, es un proceso obligado que debe llevarse a cabo, para el análisis de expresión génica.

La validación de su funcionalidad, es primordial, para asegurar resultados prometedores y la aplicación de tratamientos con DNasas, previos, garantiza, la eliminación de contaminación con ácido desoxirribonucleico (ADN), obteniendo resultados exclusivamente de ácido ribonucleico (ARN) ⁷⁶.

En este proyecto la evaluación de la funcionalidad del ADNc obtenido, se realizó mediante la amplificación del gen constitutivo *rrs* y el fragmento amplificado se visualizó por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%.

En la figura 22, se observan fragmentos de un tamaño de 805 pb, ligeramente por debajo de la banda de 850 pb del marcador de peso molecular, las cuales corresponden a la amplificación del gen *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis* que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal.

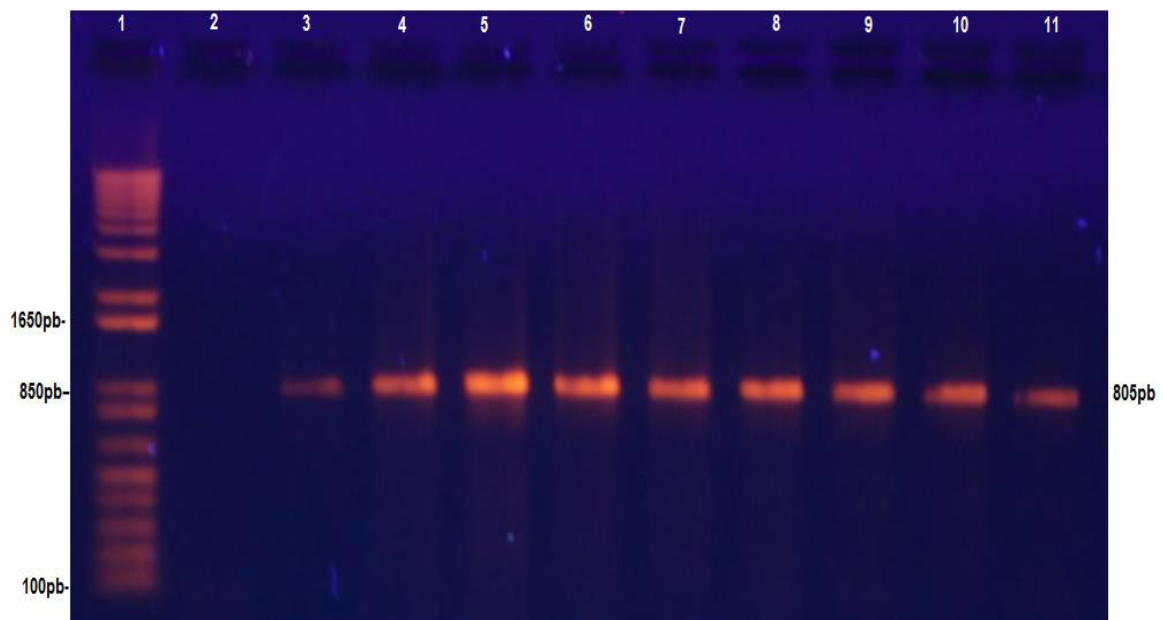


Figura 22. Amplificación del gen *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Se observa en el carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Control negativo (H₂O), carril 3: Control positivo (cepa de referencia), carril 4: cepa H37Rv sin tratamiento, carril 5: cepa H37Rv tratada con DMSO, carril 6: cepa H37Rv tratada con UCI-05, carril 7: cepa H37Rv tratada con UCI-14, carril 8: cepa CIBIN99 sin tratamiento, carril 9: cepa CIBIN99 tratada con DMSO, carril 10: cepa CIBIN99 tratada con UCI-05, carril 11: cepa CIBIN99 tratada con UCI-14.

De acuerdo a National Center for Biotechnology information (NCBI) se identificó la secuencia completa del gen *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis*, estableciendo la posición en la cual los primers reconocerían parte de la secuencia del gen, esto se puede visualizarse en la figura 23.

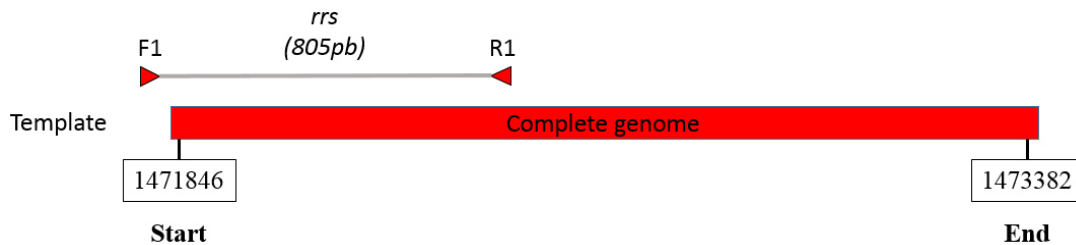



Figura 23. Representación esquemática de la estructura genómica del gen *rrs* y la localización del primer Forward 1 (F1) y primer reverse 1 (R1). La secuencia codificante se marca de color rojo y en la parte inferior las coordenadas nucleotídicas de inicio y termino establecidas para el genoma de *Mycobacterium tuberculosis*. El producto de amplificación está indicado por la línea horizontal  y el tamaño de amplificación se muestra en pares de bases (pb).

El empleo de genes constitutivos, los cuales se expresan en niveles relativamente constantes, bajo condiciones normales, es fundamental en esta etapa. La presencia de ellos, nos garantiza que los procesos previos se realizaron de manera adecuada y que las muestras son funcionales para ensayos siguientes ⁶¹.

El gen *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis*, codifica para el ARNr 16S, su aplicación para ensayos de funcionalidad y expresión génica es constante, debido a que los niveles de ARN, se expresan en relación a los ARNr 16S estables.

7.7. PCR en tiempo real

En la siguiente tabla se muestra la categoría funcional, función y el producto obtenido de cada gen de acuerdo a la base de datos Tuberculist ⁴⁸ (<http://tuberculist.epfl.ch/>).

Genes	No	Categoría funcional	Función	Producto
<i>gltA1</i>	Rv1131	Metabolismo intermediario y respiración	Involucrada en el ciclo de metilcitrato [actividad catalítica: propionil-CoA + oxaloacetato + H ₂ O = 2-metilcitrato + CoA]	(PrPc) Probable metilcitrato sintasa
<i>rpsO</i>	Rv2785c	Vías de información	Involucrados en el mecanismo de traducción. Esta proteína es una de las proteínas de unión al ARN ribosomal 16S	(RpsO) proteína S15 de la subunidad 30S ribosomal
<i>lprQ</i>	Rv0288	Procesos celulares y pared celular	Desconocida	(LprQ) probable lipoproteína conservada

Tabla XII. Gen *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* reportados por la base de datos tuberculist

En este proyecto se emplearon pruebas previas, que aseguraron una adecuada extracción e integridad del ARN, así como funcionalidad del ADNc sintetizado. En la técnica de RT-qPCR, se utilizaron controles negativos, se calculó la eficiencia de la reacción y se normalizaron los datos con un gen endógeno.

La normalización de los ensayos se llevó a cabo utilizando el gen constitutivo *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis*, el cual codifica para la subunidad ribosomal 16S del ARNr, debido a que presenta las cualidades ideales como control interno de la reacción y es frecuentemente usado para este fin.

7.8. Rango dinámico de amplificación

A partir de una muestra de H37Rv se determinó el rango dinámico de amplificación para cada gen ⁵⁸.

En este proyecto la dilución de ADNc para cada gen analizado fue de 1:128. Esta concentración resultó óptima para valorar los cambios de Ct que determinaran la sobreexpresión o represión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*¹³.

7.9. Eficiencia de la amplificación

La técnica de qPCR requiere primers y sondas, y que estos sean específicos y generen amplificaciones de alta calidad ^{57,58}. Para asegurarnos de ello, se realizaron determinaciones de la eficiencia de la amplificación.

La eficiencia de la amplificación se establece a partir de curvas de calibración, las cuales se realizan mediante la técnica estadística de regresión lineal, en la cual se evalúa el logaritmo de la concentración de ARN vs el umbral de detección (Ct).

Esta técnica resulta una forma rápida, sencilla y reproducible para determinar el promedio de las eficiencias de las reacciones y los resultados obtenidos se calculan de acuerdo a la pendiente de la curva y el coeficiente de determinación (R^2) de la variable dependiente e independiente. Se describe que la pendiente depende de la eficiencia de los primers y no debería cambiar entre experimentos ^{45, 57, 62}.

La eficiencia se define como la capacidad de la reacción, para duplicar la cantidad de ADNc disponible en cada ciclo, el cual se expresa en porcentaje y se calcula a partir de las pendientes de las curvas obtenidas después de realizar las diluciones seriadas, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E=10^{-1/pendiente} - 1$$

Se recomienda trabajar con pendientes con un valor de -3.32, ya que éste equivale a una eficiencia de 100%, no obstante pendientes entre -3.1 y -3.6, las cuales generan una eficiencia de amplificación entre 90% y 110% respectivamente, son aceptables.

Un coeficiente de determinación (R^2) > 0.99, proporciona un alto grado de confianza en la correlación de los dos valores.

En nuestro trabajo todas las curvas de regresión lineal de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* presentaron valores de pendiente y coeficiente de determinación (R^2), dentro de los rangos mencionados, lo cual garantizó una eficiencia de amplificación cercana al 100% ¹³, la cual se observa en la figuras 24,25 y 26.

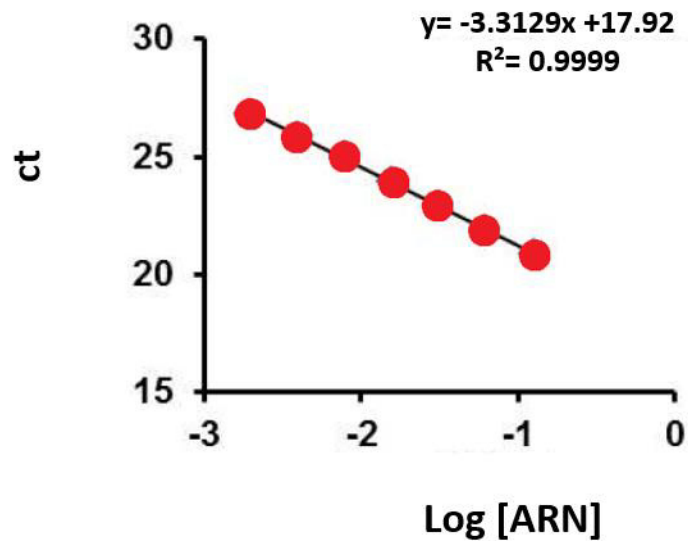


Figura 24. Eficiencia de la amplificación del gen *gltA1* de *Mycobacterium tuberculosis*. La gráfica muestra la variable dependiente (Log [ARN]) con respecto a la variable independiente (Ct). La pendiente (-3.3129) y el coeficiente de determinación (R^2) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100%.

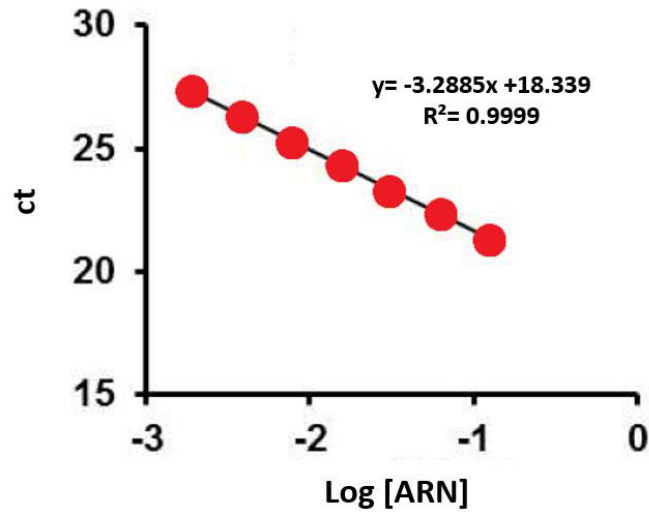


Figura 25. Eficiencia de la amplificación del gen *rpsO* de *Mycobacterium tuberculosis*. La gráfica muestra la variable dependiente (Log [ARN]) con respecto a la variable independiente (Ct). La pendiente (-3.2885) y el coeficiente de determinación (R^2) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100%.

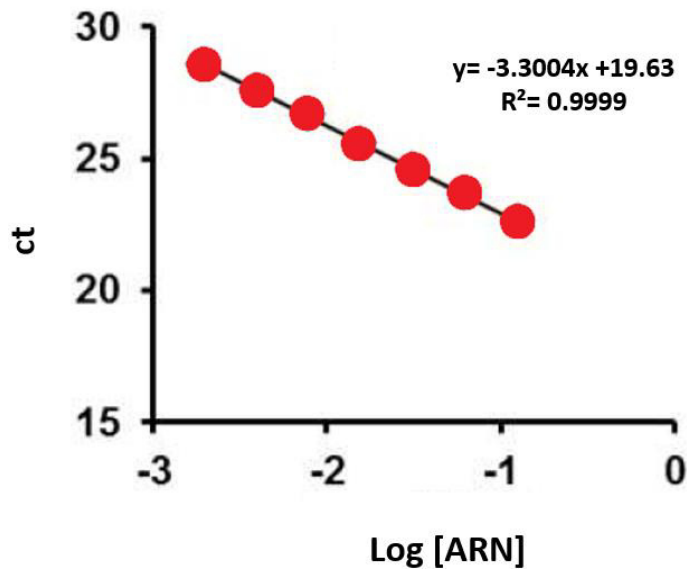


Figura 26. Eficiencia de la amplificación del gen *lprQ* de *Mycobacterium tuberculosis*. La gráfica muestra la variable dependiente (Log [ARN]) con respecto a la variable independiente (Ct). La pendiente (-3.3004) y el coeficiente de determinación (R^2) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100%.

7.10. Cuantificación relativa de la expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14

La técnica se basa en medir el cambio relativo en los niveles de expresión de ARNm, específicamente los niveles de expresión de un gen diana en comparación con un gen endógeno (control) ⁶³.

Para que este método sea exitoso primeramente se debe realizar una normalización de la cantidad relativa de cada gen diana con respecto al gen endógeno, tanto el rango dinámico de la muestra y del control deben ser aproximadamente iguales, para confirmar si esta regla se cumple se calcula el ΔCt de diversas diluciones de la muestra y del gen endógeno, realizando curvas de regresión lineal del logaritmo de la concentración de ARN vs la diferencia del Ct (ΔCt), el valor de dicha pendiente debe ser < 0.1 .

En este proyecto se obtuvieron valores de la pendiente < 0.1 , lo cual nos garantizó una normalización adecuada del gen blanco y el gen endógeno.

Para el cálculo de la expresión génica se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, analizando los cambios relativos en la expresión génica, en tiempo real.

Esta herramienta se basa en comparar los valores de (Ct) de un gen blanco y un gen endógeno, a un nivel constante de fluorescencia. En todos los procedimientos anteriores, se determinó que se cumpliera la eficiencia de amplificación en cada gen, para un adecuado análisis de los datos ^{61, 62}.

7.11. Cinéticas de amplificación de los genes *gltA1*, *rpsO*, *lprQ*, en comparación con el gen endógeno *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis*.

La modificación de la expresión génica, se estimó de la siguiente manera. Cuando la curva de amplificación se desplaza a su izquierda en comparación con la muestra control (gen endógeno), se establece una sobreexpresión de la expresión génica, lo cual consecuentemente requiere un menor umbral de detección (Ct), en cambio una represión en la expresión génica, se obtiene cuando la curva de amplificación se desplaza a la derecha con respecto al gen endógeno, lo cual necesita un mayor umbral de detección (Ct) para ser detectado.

En las siguientes figuras 27, 28, 29, se presenta un modelo de la expresión relativa del triplicado técnico de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* de la cepa H37Rv en comparación con la expresión relativa del gen *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis*, tratadas con el compuesto UCI-05.

Los valores Ct fueron utilizados para realizar el análisis de la expresión genética por medio del método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

En esta figura, se observa la cinética de amplificación del gen *gltA1*, en comparación con el gen *rrs*, en este caso en particular, se pudo identificar una expresión génica relativa del gen blanco en el ciclo (Ct) 26 y una expresión génica relativa del gen endógeno en el ciclo (Ct) 15.

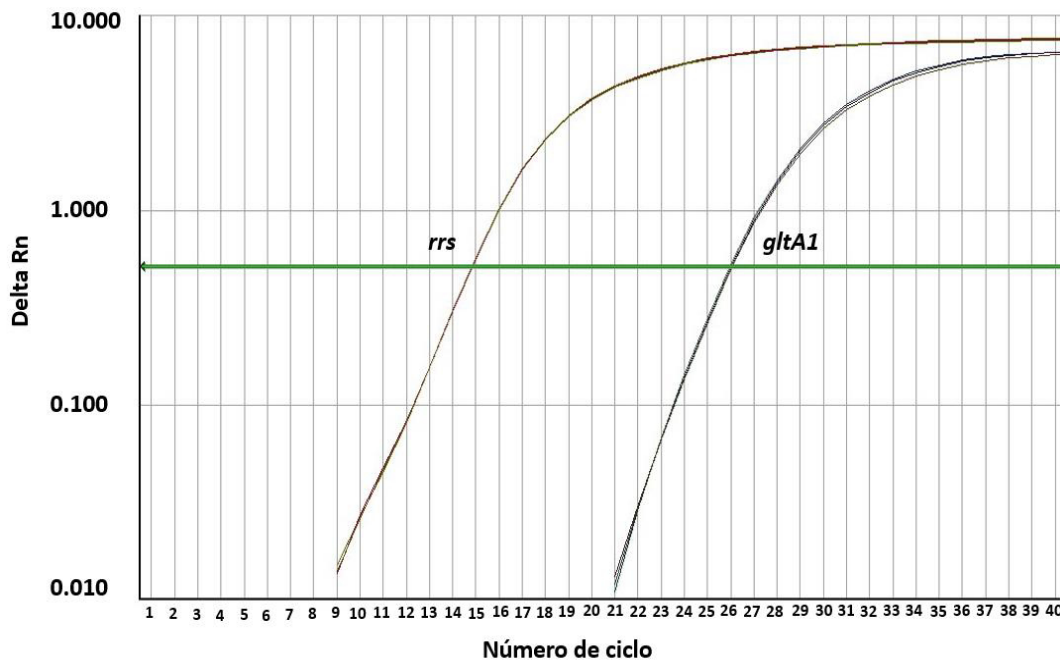


Figura 27. Expresión de los genes *gltA1* y *rrs* de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. Se presenta la cinética de amplificación correspondiente al gen *gltA1* y *rrs*, en el eje Y se gráfica Delta Rn el cual corresponde al valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de las sondas TaqMan®. Los valores Ct fueron utilizados para realizar el análisis de la expresión genética por medio del método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

De igual manera en esta figura, se observa la cinética de amplificación del gen *rpsO*, en comparación con el gen *rrs*, en esta ocasión, se identificó una expresión génica relativa del gen blanco, similar al gen *gltA1* en el ciclo (Ct) 25 y una expresión génica relativa del gen endógeno en el ciclo (Ct) 15.

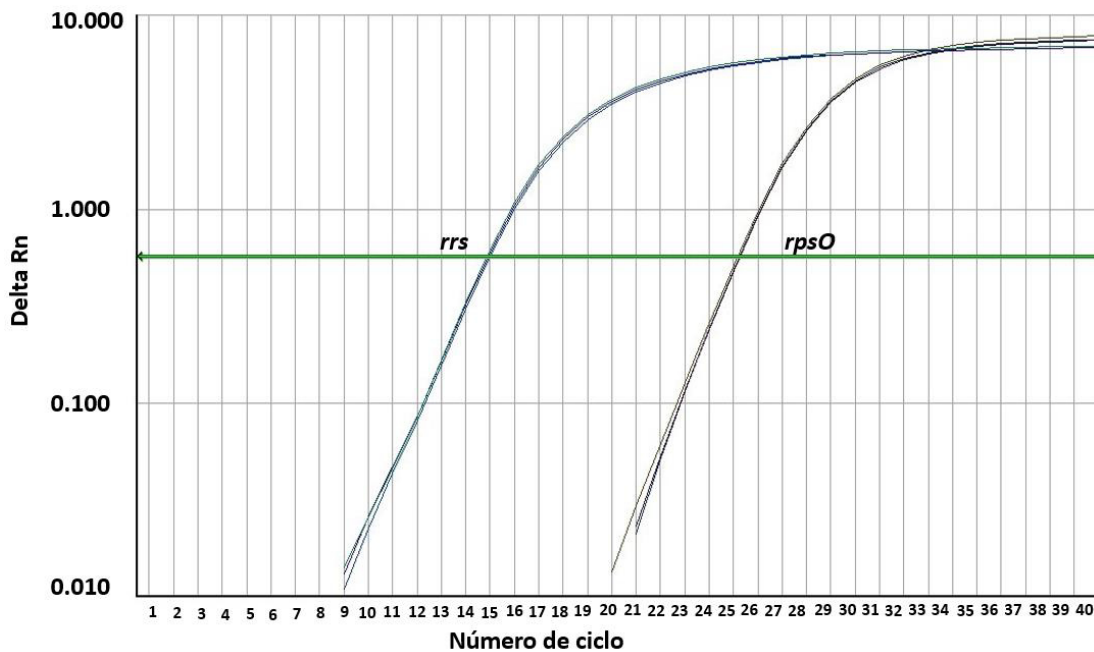


Figura 28. Expresión de los genes *rpsO* y *rrs* de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. Se presenta la cinética de amplificación correspondiente al gen *rpsO* y *rrs*, en el eje Y se gráfica Delta Rn el cual corresponde al valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de las sondas TaqMan®. Los valores Ct fueron utilizados para realizar el análisis de la expresión génica por medio del método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Por último en esta figura, se pudo determinar una expresión génica relativa del gen *lprQ* en el ciclo (Ct) 28 y una expresión génica relativa del gen endógeno (*rrs*) en el ciclo (Ct) 15.

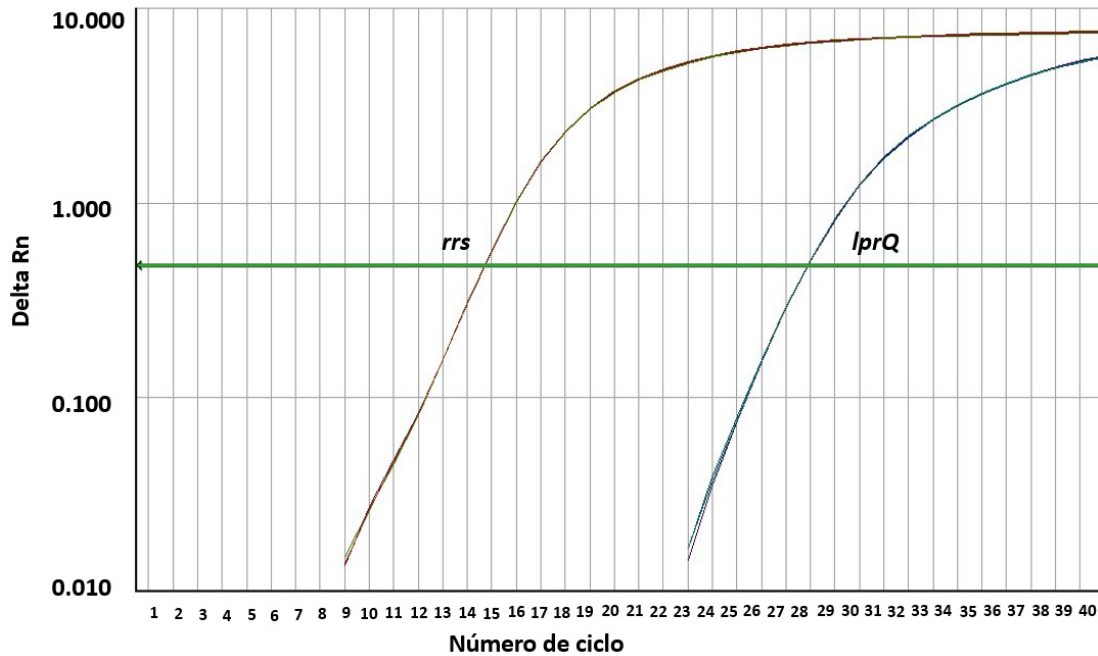


Figura 29. Expresión de los genes *lprQ* y *rrs* de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. Se presenta la cinética de amplificación correspondiente al gen *lprQ* y *rrs*, en el eje Y se gráfica Delta Rn el cual corresponde al valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de las sondas TaqMan®. Los valores Ct fueron utilizados para realizar el análisis de la expresión génica por medio del método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

En las figuras 27, 28 y 29, así como en los ensayos de los genes en la cepa CIBIN99 los ciclos necesarios para alcanzar una señal de fluorescencia, del gen *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis* fue en un (Ct) de 15, lo cual nos confirma, la estabilidad del gen endógeno en diversos tratamientos y nos asegura que fue un adecuado control interno.

7.12. Expresión relativa de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*, de las cepas H37RV y CIBIN99 tratadas con el control dimetilsulfóxido (DMSO) y una condición sin tratamiento.

Para determinar que el control dimetilsulfóxido (DMSO), el cual es el solvente donde están disueltos los compuestos UCI-05 y UCI-14, no modifica la expresión de los genes, se compararon las cepas H37Rv y CIBIN99, en una condición sin tratamiento y expuestas al dimetilsulfóxido (DMSO)

A la expresión basal de la expresión relativa del ARNm, se le asignó el valor relativo de 1 en la gráfica, a partir de este se identificó la modificación de la expresión de los genes, como se muestra en la figura 30.

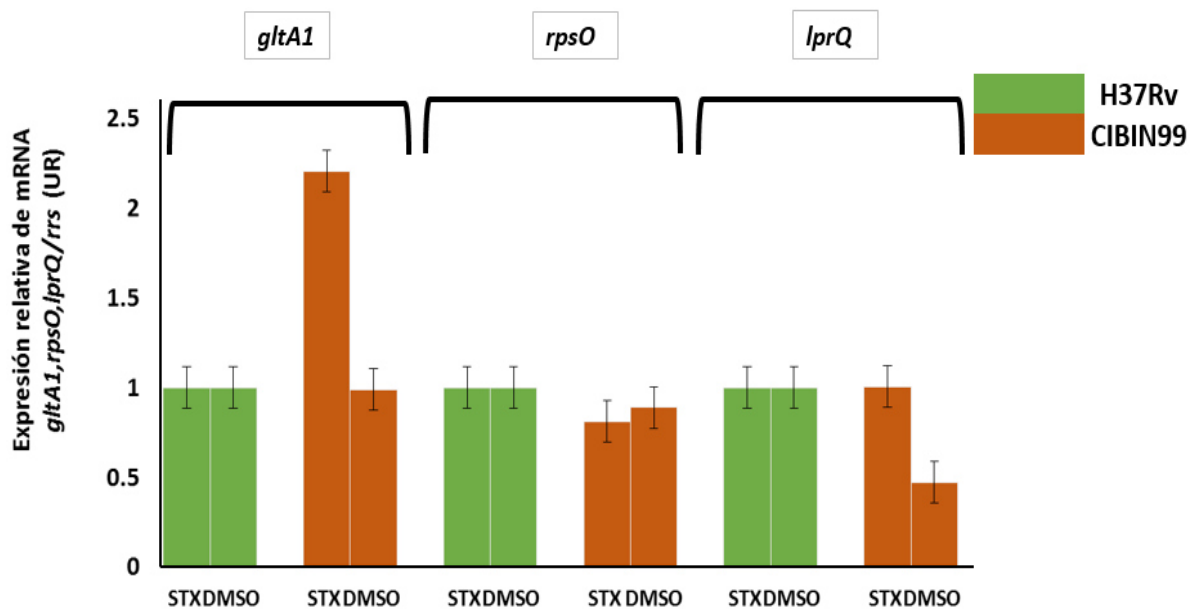


Figura 30. Expresión relativa del gen *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en las cepas de H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis*.

En la cepa H37Rv la cual es sensible a los fármacos de primera línea, el dimetilsulfóxido (DMSO), no modifica la expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*, manteniendo su expresión génica basal, sin embargo en la cepa CIBIN99 la cual es resistente a los mismos, el compuesto modifica la expresión génica de los 3 genes. Dicha modificación puede presentarse por la naturaleza propia del compuesto DMSO, el cual es capaz de atravesar membranas citoplasmáticas de las células ⁶⁴. No obstante en nuestro trabajo no se presentaron modificaciones en la expresión de genes relacionados con metabolismo intermediario y respiración, vías de información, procesos celulares y pared celular, en la cepa H37Rv ante el tratamiento con el compuesto DMSO, solamente en la cepa multifarmacorresistente CIBIN99.

7.13. Expresión relativa de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*, de las cepas H37Rv y CIBIN99 tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14

Los resultados de la expresión génica de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*, para las cepas H37Rv y CIBIN99, se midieron en unidades relativas (UR) y fueron obtenidos mediante la cuantificación relativa empleando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, como se presenta en las figuras siguientes.

En la figura 31, se muestra la expresión génica relativa del gen *gltA1* en la cepa sensible (H37Rv) y multifarmacorresistente (CIBIN99), tratadas con los compuestos UCI-05, UCI-14 y el control dimetilsulfóxido (DMSO), en comparación con el gen constitutivo *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis*.

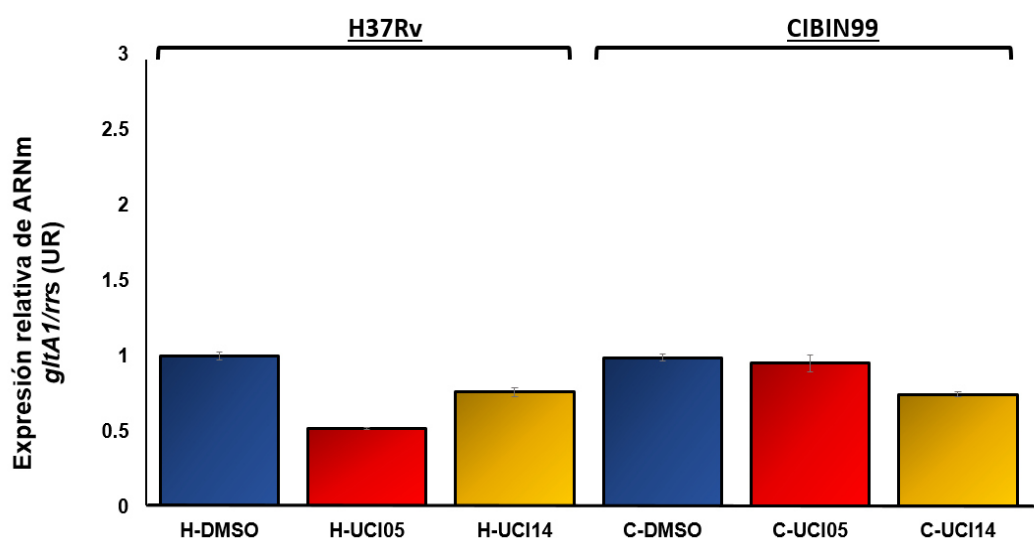


Figura 31. Expresión relativa del gen *gltA1* en las cepas de H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14.

En la figura anterior se observa que no hubo cambios en la expresión del gen *gltA1* en ambas cepas empleando el control dimetilsulfóxido (DMSO), sin embargo ocurrió una represión del mismo gen, para las cepas H37Rv y CIBIN99, tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14.

En la figura 32, se muestra la expresión génica relativa del gen *rpsO* en las cepas de H37Rv y CIBIN99, tratadas con los compuestos UCI-05, UCI-14 y el control dimetilsulfóxido (DMSO), en comparación con el gen constitutivo *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis*.

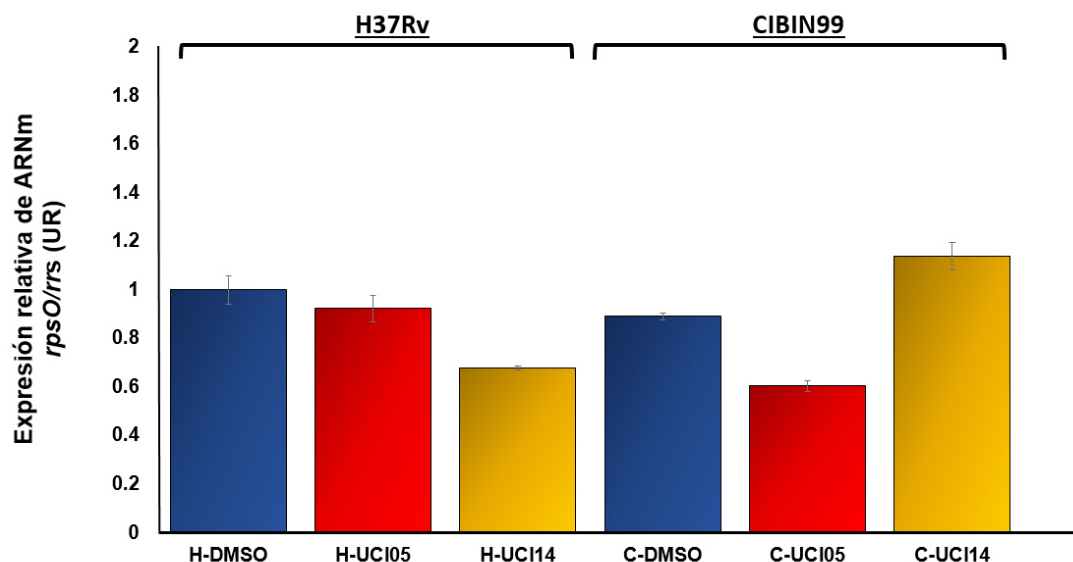


Figura 32. Expresión relativa del gen *rpsO* en las cepas de H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14.

En la figura 32 se observa que el control dimetilsulfóxido (DMSO) no modifica la expresión del gen *rpsO* el cual codifica para la proteína ribosomal 15S, en la cepa H37Rv, sin embargo existe una limitada represión del gen en la cepa CIBIN99 con el compuesto UCI-05.

En ambas cepas tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI14, la expresión del gen *rpsO* se reprime, excepto en la cepa CIBIN99 tratada con el compuesto UCI-14, en la cual se presenta una sobreexpresión.

En la figura 33, se muestra la expresión génica relativa del gen *lprQ* en las cepas de H37Rv y CIBIN99, tratadas con los compuestos UCI-05, UCI-14 y el control dimetilsulfóxido (DMSO), en comparación con el gen constitutivo *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis*.

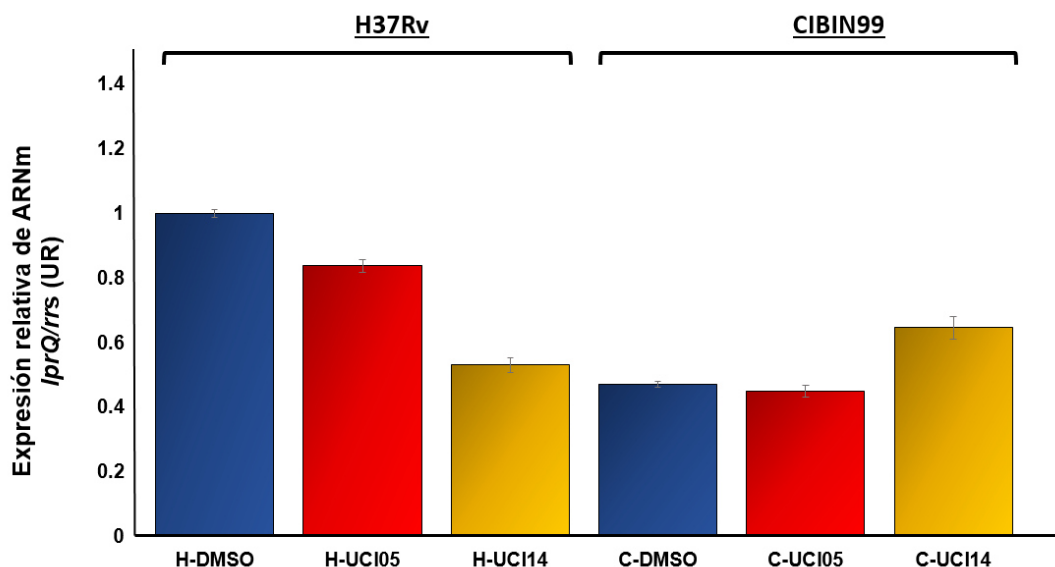


Figura 33. Expresión relativa del gen *lprQ* en las cepas de H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14.

En la figura 33 se observa que el control dimetilsulfóxido (DMSO) no modifica la expresión del gen *lprQ* en la cepa sensible H37Rv, no obstante el mismo diluyente reprime notablemente la expresión en la cepa multifarmacorresistente CIBIN99.

En ambas cepas tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI14, la expresión del gen *lprQ* se reprime.

7.14. Comparación de los niveles de expresión génica relativa de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en las clonas y cepas de H37Rv y CIBIN99

La expresión diferencial de las cepas H37Rv y CIBIN99, se compararon con los valores obtenidos de las clonas H37Rv y clonas CIBIN99 ¹³ y se analizaron los resultados utilizando el paquete estadístico SPSS versión 20. La significancia fue determinada usando t-Student para muestras independientes donde $p < 0.05$ se consideró como significativa. En dicho análisis se compararon ambas poblaciones expuestas a los compuestos UCI-05 y UCI-14 contra el control DMSO.

En la siguiente tabla se colocan los resultados obtenidos de la modificación de la expresión génica de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* de las clonas y las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis*, en donde las flechas negras hacia la parte superior indican una sobreexpresión y las flechas negras hacia la parte inferior una represión.

		UCI-05			UCI-14		
		<i>gltA1</i>	<i>lprQ</i>	<i>rpsO</i>	<i>gltA1</i>	<i>lprQ</i>	<i>rpsO</i>
H37Rv	CLONA	↑	↑	↓	↑	↓	↓
	CEPA	↓	↓	↓	↓	↓	↓
CIBIN99	CLONA	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	CEPA	↓	↓	↓	↓	↓	↑

Tabla XIII. Comparación de la expresión génica de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* de las clonas y las cepas de H37Rv y CIBIN99 tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14.

Existen modificaciones en la expresión de los genes *gltA1* y *lprQ*, de forma diferente en la población homogénea (clonas) y la población heterogénea (cepas) de H37Rv y CIBIN99, como consecuencia al tratamiento con los compuestos UCI-05 y UCI-14, excepto la expresión del gen *lprQ* en las clonas y cepas de H37Rv tratadas con el compuesto UCI-14, no obstante, en ambos casos se obtuvieron valores de $p > 0.05$. El gen *rpsO*, se modifica de manera diferente en la población homogénea (clonas) y la población heterogénea (cepas) de CIBIN99, como consecuencia al tratamiento con el compuesto UCI-05. En este trabajo a pesar de que las dos poblaciones de H37Rv y CIBIN99 expuestas al compuesto UCI-14, generaron modificaciones similares, no se presentaron resultados estadísticamente significativos. No obstante, el análisis diferencial de la expresión mostró una represión en el gen *rpsO* en H37Rv debido al tratamiento con el compuesto UCI-05, comparada con el control, el cual resultó estadísticamente significativo con un valor de $p = 0.007$, lo cual podría generar un desequilibrio en el proceso de traducción de *Mycobacterium tuberculosis*.

8. Discusión

En este proyecto identificamos el crecimiento celular las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis*, combinando el uso del medio de cultivo sólido Löwenstein–Jensen y el medio en estado líquido Middlebrook 7H9. Desde 1998 se recomienda la práctica combinada de medios sólidos con medios líquidos, ambos medios se encuentran compuestos de distintos ingredientes en combinación, ricos en fósforo, potasio, nitrógeno, carbón, vitaminas y minerales para facilitar el aislamiento y crecimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* ⁶⁵.

Recientemente en un estudio en el cual se analizaron 1,368 muestras de pacientes diagnosticados con tuberculosis, se propone el uso en conjunto del medio sólido Löwenstein–Jensen y el medio líquido Middlebrook 7H9 para asegurar la recuperación del total de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* ⁶⁶.

Se ha establecido que la fase de crecimiento exponencial de las clonas y la cepa H37Rv, en ausencia de SIRE (estreptomina, isoniazida, pirazinamida y etambutol), se logra a partir de un período aproximado de 9 días, no obstante las clonas y cepa CIBIN99 después de un lapso aproximado de 12 días ^{13, 40}. En nuestro proyecto para asegurarnos que ambas cepas se encontrarán en la misma fase de crecimiento exponencial, se analizaron después de mantenerse 14 días en crecimiento en el medio líquido Middlebrook 7H9. El empleo de dicho medio de cultivo se recomienda ampliamente por mantener las poblaciones bacterianas más estables que otros medios de cultivo, de esta forma se garantizó que la variabilidad en la expresión génica se debió por el fondo genético de las poblaciones en lugar de las condiciones de crecimiento.

De acuerdo a antecedentes, la turbidez ocasionada por la proliferación celular puede ser medida empleando métodos indirectos, cuanto mayor sea el número de bacterias en una solución, más opaco será el medio de cultivo ⁶⁷. Todos los cultivos celulares que utilizamos en este proyecto, se encontraban en 1.0 de la escala McFarland, de acuerdo a antecedentes, esto equivale a 1.97×10^6 UFC/ml ⁶⁸ y su uso mejora la interpretación de los resultados en cultivos que se encuentran en estado líquido.

Trabajos previos reportan que el rendimiento de la extracción de ARN suele ser mayor cuando se realiza a partir de la fase exponencial del crecimiento de las micobacterias. En esta fase, los bacilos asimilan de una manera preferente los nutrientes presentes en el medio de cultivo, debido a que se encuentran en una velocidad máxima de crecimiento, consecuentemente en esta etapa se presentan variaciones en la expresión génica, como consecuencia a la adaptación, la cual puede ser evaluada fácilmente ⁴⁶.

La expresión génica es un mecanismo altamente regulado que posee la habilidad de controlar funciones de adaptabilidad de las células ante un estímulo específico. Ordinariamente el aislamiento de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) se usa como una medida indirecta para definir la variación que ocurre dentro del sistema como respuesta a ciertos factores ⁵⁷.

En un principio diferentes métodos de extracción, se basaban en la hidrólisis enzimática y tratamiento químico, sin embargo la purificación del ARN procedente de micobacterias era difícil ⁶⁹.

Anteriormente el uso de métodos de sonicación, los cuales emplean ultrasonidos para excitar diversas partículas, era prohibido, una de las razones principales era la producción de aerosoles, sin embargo en los últimos años la invención del equipo FastPrep, ha resultado favorable, como un método físico para producir lisis celular, debido a que cuenta con una cubierta la cual no permite dispersar los aerosoles generados ⁷⁰.

Debido a la necesidad de conseguir extracciones de ARN de alta calidad e intacto se decidió emplear protocolos que empleen el reactivo Trizol®, el cual es una solución química monofásica compuesta por isotiocinato de guanidina, fenol, cloroformo y otros componentes, que facilitan el aislamiento e integridad del ARN. La adición de un exceso del reactivo no suele reflejarse negativamente con la estabilidad de ARN, sin embargo no cumplir con los parámetros de temperatura o el volumen recomendado, puede generar desestabilización del mismo ⁵⁹.

Los rendimientos de la extracción de ARN, empleando el reactivo Trizol® y el equipo FastPrep, se ha reportado desde 1.75 - 2.00 µg/µl ⁵⁸. En la actualidad no se encuentra una gran cantidad de reportes de rangos de concentración, para este protocolo. En nuestro trabajo empleando los parámetros recomendados para el protocolo modificado por la Dra. Katia Peñuelas Urquides, empleando el reactivo Trizol® y el equipo FastPrep, obtuvimos concentraciones en rangos variables que van desde 363 ng/µl hasta 1035.4 ng/µl.

Actualmente el empleo de técnicas específicas como RT-qPCR que midan los niveles de expresión génica en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y validen los de resultados obtenidos a partir de microarreglos son primordiales ^{45, 71}.

La cuantificación de los niveles de expresión génica puede realizarse de forma absoluta o relativa. La evaluación de la cuantificación relativa de los niveles de expresión génica, empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ propuesto por Livak y Schmittgen en el 2001 ⁶³, se recomienda para un sinnúmero de estudios, los cuales deseen analizar y comparar cambios fisiológicos a través del estudio de los niveles de expresión génica o bien la medición de la expresión génica en respuesta a un fármaco en tiempo real.

Esta herramienta se basa en comparar los valores de (Ct) de un gen blanco y un gen endógeno, a un nivel constante de fluorescencia. Las ventajas que lo distinguen es que no utiliza curvas estándar, con lo cual se mantiene un mayor volumen de la muestra, puede amplificar el gen diana y el control endógeno en el mismo tubo, aumentando el rendimiento y reduciendo los errores técnicos, se pueden realizar pruebas de validación para demostrar que las eficiencias de los genes son aproximadamente iguales ^{45, 63}.

La elección adecuada de genes endógenos como controles internos, es crítica en estos estudios, los cuales sirven para examinar cambios específicos en diversas células, estos genes deben mantener niveles de expresión constantes en diferentes estados fisiológicos de la célula y no deben verse afectados en respuesta a los tratamientos ⁶¹.

La subunidad 16S del ARNr se encuentra presente y conservada en todas las células procariotas, reportes indican que sus niveles de expresión son constantes, incluso en diferentes condiciones, por ende estas propiedades, lo ubican como un candidato idóneo para diversos ensayos de expresión génica, asimismo se reporta su constante uso en pruebas de relación filogenética de diferentes microorganismos, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* ⁷².

En esta investigación empleando el gen constitutivo *rrs* de *Mycobacterium tuberculosis* y el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, identificamos que el gen *gltA1*, que está involucrado en la beta oxidación de los ácidos grasos de la micobacteria, en poblaciones heterogéneas (cepas) de H37Rv y CIBIN99, se encuentra reprimido debido al tratamiento con los compuestos UCI-05 y UCI-14.

Los niveles de expresión génica que obtuvimos del gen *gltA1*, concuerdan con reportes previos, donde se propone que enzimas involucradas en el ciclo del metilcitrate, solo se encuentran activas durante la etapa de la infección bacteriana y su bloqueo puede dificultar su supervivencia, planteando que su estudio resulta un poco complicado, principalmente por su baja cantidad en ensayos *in vitro* ⁵⁰, no obstante su evaluación en poblaciones individuales (clonas), identificó una sobreexpresión de su actividad, ante estos mismos compuestos, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de las poblaciones para asimilar el medio de cultivo y adaptarse a distintos factores de estrés.

La comparación de la expresión génica en clonas y cepas de H37Rv y CIBIN99, usando t-Student para muestras independientes, no presentó resultados con significancia estadística, por ello para comprender mejor la actividad de la enzima, en procesos vitales, se recomienda clonar, expresar y purificar la enzima, en vectores lanzadera que puedan replicarse en micobacterias, como el vector pMV261 ⁷³.

Para el desarrollo de nuevos compuestos con actividad antituberculosis, se recomienda el uso de vehículos de transporte los cuales les permitan ser transportados con facilidad en modelos *in vivo* e *in vitro*, ejerciendo su actividad. En este proyecto el dimetilsulfóxido (DMSO), fue utilizado como control debido a que es el diluyente de los compuestos UCI, dicho compuesto es ampliamente administrado, su capacidad hidrofóbica, le confiere facilidad para transportar diversos fármacos y atravesar fácilmente la mayoría de las membranas citoplasmáticas ⁷⁴, a pesar de ello en las clonas y cepas de H37Rv y CIBIN99, tratadas con el control (DMSO), no se presentó modificación en la expresión del gen *gltA1*.

Debido al reciente interés de desarrollar nuevas dianas terapéuticas ^{75,76} se han localizado posibles genes cruciales para *Mycobacterium tuberculosis*, entre estos el gen *gltA1*, el cual codifica para la enzima citrato sintasa I también llamada metilcitrato sintasa de acuerdo a la base de datos Tuberculist ⁴⁸, su interés se centra en que no tiene homología con enzimas del humano. Debido a lo anterior es fundamental estudiar la implicación de dicho gen en poblaciones de *Mycobacterium tuberculosis* empleando técnicas de clonación, expresión y purificación.

De igual manera se determinó el nivel de expresión del gen *rpsO* el cual codifica para la proteína ribosomal S15 de la subunidad pequeña 30S de *Mycobacterium tuberculosis*, en las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Al tratar la cepa sensible (H37Rv) y la otra multifarmacorresistente (CIBIN99) con los compuestos UCI-05 y UCI-14, se identificó una represión del gen, la cual es más notable en la cepa CIBIN99, a excepción de la cepa CIBIN99 tratada con el compuesto UCI-14, en la cual se produjo una sobreexpresión.

En este análisis se identificó que no hubo modificación en la expresión del gen, en las cepas tratadas con el control (DMSO), excepto en la cepa CIBIN99, donde se observó una índice de represión bajo.

Un trabajo realizado en el 2012, empleando ratones infectados con cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, determinó la influencia de diversos compuestos con el objetivo de proponer la mejor molécula, aplicada en modelos murinos. La administración del compuesto dimetilsulfóxido (DMSO), destacó como un adecuado vehículo de transporte, en comparación con compuestos como aceite de maíz, carboximetilcelulosa, al proporcionar parámetros físicos aceptables y no interferir con el crecimiento celular ⁶⁴, en nuestro trabajo se puede observar que el control (DMSO) modifica de una manera mínima la expresión del gen *rpsO*, el cual se encuentra relacionado con el proceso de traducción del patógeno.

La comparación de la expresión génica del gen *rpsO* en las clonas y cepas de H37Rv, tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14, mostró una represión con ambos compuestos, sin embargo usando la prueba de t-Student para muestras independientes, solamente se presentó significancia estadística en las clonas y cepas de H37Rv tratadas con el compuesto UCI-05. Cabe señalar que este mismo gen se comporta de manera opuesta, en clonas y cepas de CIBIN99, ante el tratamiento con el compuesto UCI-05 y UCI-14.

El crecimiento celular tardío de cepas multifarmacorresistentes, se ha reportado en múltiples trabajos, como una forma de adaptación de estos microorganismos ^{13, 40, 56}. En un trabajo publicado en el año 2009, se identificó que el crecimiento celular de las cepas resistentes a isoniazida y rifampicina difiere comparado con cepas sensibles hasta 3 semanas, no obstante, después de este período el crecimiento se asimila en ambas poblaciones, con lo cual se sugiere que las mutaciones en los genes *rpoB* y *KatG*, no tiene un impacto en la cinética de crecimiento ⁷⁷. En nuestro estudio, analizando las cepas sensibles y multifarmacorresistentes en la misma fase de crecimiento exponencial, pudimos identificar que la expresión del gen *rpsO* fue menor en la cepa multifarmacorresistente CIBIN99, lo cual puede disminuir el proceso de traducción de *Mycobacterium tuberculosis* al ser tratada con el compuesto UCI-05, excepto al tratarse con el compuesto UCI-14, en donde se observó una sobreexpresión.

El gen *lprQ*, que codifica para una lipoproteína (LPRQ) de *Mycobacterium tuberculosis* ⁴⁸, ha sido poco estudiado, sin embargo diferentes estudios, han demostrado que la envoltura celular de estas bacterias presentan en su pared una gran variedad de lipoproteínas, que son un subgrupo de proteínas que tienen un rol en el proceso de patogénesis y son determinantes en la virulencia del patógeno ^{78, 79}.

Nuestro análisis mostró una represión del gen *lprQ* en las cepas de H37Rv y CIBIN99 tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14, particularmente se identificó una expresión variable del gen en la cepa H37Rv, la cual se reporta como virulenta en comparación con la cepa CIBIN99.

Markarian y colaboradores realizaron un estudio para evaluar características como densidad, viscosidad y conductividad del fármaco de primera línea isoniazida en combinación con dos compuestos [dimetilsulfóxido (DMSO) y agua] y encontraron que ambas combinaciones presentan una viscosidad y conductividad similar. Sin embargo, la densidad de la mezcla isoniazida-agua fue mejor en comparación con la combinación isoniazida-dimetilsulfóxido, a pesar de ello la combinación fármaco- DMSO presentó un efecto sinérgico en cepas sensibles de *Mycobacterium tuberculosis*, potencializando su actividad ⁸⁰, el uso en conjunto de este compuesto (5%) y el fármaco de primera línea isoniazida en concentraciones menores de su concentración mínima inhibitoria (CMI), mostró una acción sinérgica, inhibiendo el crecimiento celular de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* ⁸⁰.

A pesar de ello en nuestros resultados podemos observar que en la cepa sensible H37Rv tratada con el control dimetilsulfóxido (DMSO), no presentó ninguna modificación en la expresión del gen, no obstante la cepa CIBIN99 presentó una represión del mismo, dicha cepa cuenta con perfiles genotípicos y fenotípicos característicos, los cuales pueden contribuir con su comportamiento particular ^{13, 40, 56}.

Por otra parte se identificó que el gen *lprQ* se sobreexpresa en la población clonal de H37Rv y CIBIN99 al ser tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14, excepto en la clona H37Rv tratada con el compuesto UCI-14 donde se identifica una represión, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en cepas de H37Rv y CIBIN99, sin embargo al contrastar la expresión del gen en clonas y cepas de H37Rv y CIBIN99, usando t-Student para muestras independientes, no se produjeron resultados con significancia estadística.

En nuestro estudio identificamos, que se presenta una variabilidad en la expresión génica de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en poblaciones individuales (clonas) y poblaciones heterogéneas (cepas) de *Mycobacterium tuberculosis*, expuestas a nuevos compuestos con actividad antituberculosis.

Se ha identificado que las poblaciones de clonas y cepas de H37Rv son estables y que presentan una menor heterogeneidad, en etapas de crecimiento, en comparación con CIBIN99, en la cual se presenta una notable diferencia, en cinéticas de crecimiento.

Debido a lo anterior, para comprender los mecanismos implicados en la regulación y adaptación, ante un estímulo como la exposición a un compuesto, se recomienda estudiar, mediante el análisis de expresión génica, el comportamiento de células individuales, en segunda instancia replicar los estudios en poblaciones de células, las cuales cuentan con una heterogeneidad importante, ya que el estudio en las poblaciones únicas, puede disfrazar la interpretación de diferentes procesos biológicos.

El análisis de la expresión génica en clonas y cepas expuestas a nuevos compuestos contribuye a disminuir los resultados altamente variables generados por la diversidad poblacional.

9. Conclusiones

Se obtuvo el ARN total de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *Mycobacterium tuberculosis*, tratadas con los compuestos UCI, el cual fue de alta calidad y funcional.

La expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*, se reprime en la cepa H37Rv, en presencia de los compuestos UCI-05 y UCI-14, comparada con el control (DMSO).

La expresión de los genes *gltA1* y *lprQ*, se reprime en la cepa CIBIN99, en presencia de los compuestos UCI-05 y UCI-14, al igual que la expresión del gen *rpsO* con el compuesto UCI-05, mientras que en presencia del compuesto UCI-14 se sobreexpresa, comparada con el control (DMSO).

La expresión génica, de los genes *gltA1* y *lprQ*, en una clona y una cepa, no tiene el mismo patrón de expresión, al tratarse con los compuestos UCI-05 y UCI-14.

En el caso del gen *rpsO* en clones y cepas de H37Rv, tratadas con el compuesto UCI-05, se reprime la expresión del gen, que puede generar un desequilibrio en el proceso de traducción de *Mycobacterium tuberculosis*.

Se puede proponer que la acción del compuesto UCI-05 se mantiene, al conservarse los cambios en la expresión génica.

Existe variabilidad en la expresión génica, de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*, entre una clona y una cepa, la cual puede estar relacionado con la activación de diversos mecanismos de adaptación ante la presencia de los compuestos con actividad antituberculosis.

10.Perspectivas del proyecto

Clonar, expresar y purificar las proteínas codificadas por los genes *gltA1* y *lprQ*, para ser evaluadas como blanco terapéutico en el control de *Mycobacterium tuberculosis* , en especial el gen *rpsO*, que demostró una represión significativa en clonas y cepas tratadas con el compuesto UCI-05.

11. Bibliografía

1. Secretaría de Salud. 2013. Evaluación Externa del Programa de Control de Tuberculosis de México. Organización mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud.
Disponible en:
http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/reporte_final_mexico.pdf
2. World Health Organization. 2014. Global Tuberculosis Report 2014. In: Organization WH (ed): World Health Organization
3. Secretaria de Salud. 2014. Situación Actual de la Tuberculosis en México y el Mundo. Global tuberculosis Report 2014.
4. Pere Coll. 2009. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 27(8): 474-4.
5. World Health Organization. 2016. Tuberculosis. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
6. Aguado M. 2007. DNA Microarrays in Microbiology. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 1: 1988–2688.
7. Morey J, Ryan J, Van Dolah F. 2006. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced*, 8, 175–93.
8. Del Olmo E, Molina G, Escarcena R, Alves M, Lopez J, Hernández R, Said S, San Feliciano A. 2009. Simple dihydrosphingosine analogues with potent activity against MDR *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem Lett*. 19:5764-5768.
9. San Feliciano A., Del Olmo E, López J, Said S, Molina G., González S, González D, Hernández R. 2010. Agentes antituberculosos. Oficina Española de patentes y marcas.
10. Aldridge B, Fernandez M, Heller D, Ambravaneswaran V, Irimia D, Toner, M, Fortune S. 2012. Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility. *Science*. 335(6064): 100–4.
11. Andreu N, Gilbert I. 2008. Cell population heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuberculosis*. 88(6): 553-559.
12. Longo D, Hasty J. 2006. Dynamics of single-cell gene expression. *Molecular Systems Biology*, 2, 64: 1-10.
13. Peñuelas Urquides K. 2012. Análisis de los perfiles de expresión genética de cepas multifármacorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* expuestas a nuevos compuestos contra tuberculosis pulmonar. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. Monterrey, Nuevo León, México.
14. Mancha Moctezuma C. 2014. La tuberculosis y sus determinantes sociales en las Américas. Secretaria de Salud.
15. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Disponible en:
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/biinegi/?ind=6300000240>

- 16.** Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). Disponible en:
http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/casos_nuevos_tb_pulmonar.pdf
- 17.** Secretaria de Salud. 2012. Perfil epidemiológico de la tuberculosis en México. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE).
- 18.** Ortega Roque J. 2009. Búsqueda de biomarcadores en la infección con diferentes micobacterias. Tesis de Posgrado, Instituto Politécnico Nacional, Distrito Federal, México.
- 19.** Flores Treviño S. 2013. Caracterización genotípica de aislamientos clínicos de Mycobacterium Tuberculosis: perfiles de resistencia a antifímicos y mutaciones en genes asociados a resistencia. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina U.A.N.L. Monterrey, Nuevo León, México.
- 20.** Cercenado E, Cantón R. 2005. Procedimientos en microbiología clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- 21.** Forbes B, Saham D, Weissfeld A. 2009. Diagnostico Microbiológico. Buenos Aires. Médica Panamericana.
- 22.** García P, Paredes F, Fernández M. 1994. Microbiología clínica práctica. Servicio Publicaciones UCA.
- 23.** Atlas R, Snyder J. 2006. Handbook of Media for Clinical Microbiology. Taylor & Francis Group.
- 24.** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2003. Tratament of tuberculosis. Morbidity and Mortality Weekly Report.
- 25.** Lenus D. 2007. Métodos rápidos para la detección de resistencia de Mycobacterium tuberculosis. Tesis de Doctorado. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. Habana Cuba.
- 26.** Jain A, Dixit P. 2008. Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? J Biosci, 33(4), 605–16.
- 27.** D’ambrosio L., Centis R, Sotgiu G, Pontali E, Spanevello A, Migliori G. 2015. New anti-tuberculosis drugs and regimens: 2015 update. Eur Respir J. 1, 10–2015.
- 28.** Fadul S, López M. 2015. Tuberculosis multifármacorresistente. Protocolo de vigilancia en la salud pública. Instituto nacional de salud.
- 29.** Becerril P, Said S, Luna J, Caballero G, Enciso J, Martínez H, Padilla G, Garza E, Molina G. 2013. A population-based study of first and second-line drug-resistant tuberculosis in a high-burden area of the Mexico/United States border. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. 108(2): 160-166.
- 30.** Gómez C, Vivancos M, Moreno S. 2016. Multidrug-resistant tuberculosis: current epidemiology, therapeutic regimens, new drugs. Rev Esp Quimioter. 28 (1): 35-8.
- 31.** Asif M. 2012. Mini review on Ethambutol and its some analogues as antitubercular agents. Elixir Pharm. 53, 11774-11778.
- 32.** Jia L, Tomaszewski J, Noker P, Gorman G, Glaze E, Protopopova M. 2005. Simultaneous estimation of pharmacokinetic properties in mice of three anti-tubercular ethambutol analogs obtained from combinatorial lead optimization. J Pharm Biomed Anal. 37(4), 793–799.

- 33.** Jia L, Tomaszewski J, Noker P, Gorman G, Glaze E, Protopopova M. 2005. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of SQ109, a new diamine-based antitubercular drug. *Br J Pharmacol* 144(1), 80–7.
- 34.** Yendapally R, Lee R. 2008. Design, synthesis, and evaluation of novel ethambutol analogues. *Bioorg Med Chem Lett.* 18(5), 1607–11.
- 35.** Zhang X, Hu Y, Chen S, Luo R, Yue J, Zhang Y, Duan W, Wang H. 2009. Synthesis and evaluation of (S,S)-N,N'-bis-[3-(2,2',6,6'-tetramethylbenzhydryloxy)-2-hydroxy-propyl]-ethylenediamine(S2824) analogs with anti-tuberculosis activity. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 6074–6077.
- 36.** Bustos González L. 2013. Síntesis de nuevos compuestos aminoalcoholes y diaminas lipídicas activas frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Doctorado, Universidad de Salamanca, España.
- 37.** Richardson K, Bennion O, Tan S, Hoang A, Cokol M, Aldridge B. 2016. Temporal and intrinsic factors of rifampicin tolerance in mycobacteria. *Proc Natl acad Sci.* 113(29), 8302–7.
- 38.** Mouton J, Helaine S, Holden D, Sampson S. 2016. Elucidating population-wide mycobacterial replication dynamics at the single-cell level. *Microbiology,* 162(6), 966–978.
- 39.** Beaulaurier J, Zhang X, Zhu S, Sebra R, Rosenbluh C, Deikus G, Shen N, Munera D, Waldor M, Chess A, Blaser M, Schadt E, Fang G. 2015. Single molecule-level detection and long read-based phasing of epigenetic variations in bacterial methylomes. *Nature.* 6, 7438.
- 40.** Torres de la Cruz V. 2011. Comparación de la expresión del proteoma de una clona sensible y de una resistente de *Mycobacterium tuberculosis* a los medicamentos de primera línea. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, Nuevo León, México.
- 41.** Yu J, Xiao J, Ren X, Lao K, Xie X. 2006. Probing Gene Expression in Live Cells, One Protein Molecule at a Time. *Science* 311, 1600-1603.
- 42.** Nguyen T, Parisot A, Vignal C, Rameau P, Stockholm D, Picot J, Paldi A. 2008. Epigenetic gene expression noise and phenotypic diversification of clonal cell populations. *Differentiation* 76(1), 33–40.
- 43.** Meléndez E, Cervantes E, Ramos M, Cravioto A. 2005. Impacto de la genómica bacteriana en la medicina humana. *Rev Fac Med UNAM* 48(1): 18-23.
- 44.** Talaat A, Howard S, Hale W, Lyons R, Garner H, Johnston S. 2002. Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucl. Acids Res.* 30 (20): E104, 1-9.
- 45.** Jeanty C, Longrois D, Mertes P, Wagner D, Devaux Y, Valk P, Barbry P. 2010. An optimized protocol for microarray validation by quantitative PCR using amplified amino allyl labeled RNA. *BMC Genomics,* 11(1), 542.
- 46.** Gao Q, Kripke K, Saldanha A, Yan W, Holmes S, Small P. 2005. Gene expression diversity among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Microbiology.* 151, 5–14.
- 47.** Walter N, Dolganov G, Garcia B, Worodria W, Andama A, Musisi E, Davis J. 2015. Transcriptional Adaptation of Drug-tolerant *Mycobacterium tuberculosis* During Treatment of Human Tuberculosis, *J Infect Dis.* 15 (6) 1–9.

- 48.** Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. TubercuList- 10 years after. *Tuberculosis (Edinb)*. 91 (1): 1-7.
- 49.** Muñoz E, Upton A, Cherian J, Mckinney J. 2006. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Mol. Microbiol.* 60(5): 1109–1122
- 50.** Kandasamy E, Urmi B. 2015. Cloning, expression, purification and bioinformatic analysis of 2–methylcitrate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Asian Pac J Trop Med.* 8(1):19-23.
- 51.** Upton A, Mckinney J. 2007. Role of the methylcitrate cycle in propionate metabolism and detoxification in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology.* 153(12): 3973-3982.
- 52.** Shi L, Sohaskey C, Pfeiffer C, Datta P, Parks M, McFadden J, North R, Gennaro M. 2010. Carbon flux rerouting during *Mycobacterium tuberculosis* growth arrest. *Molecular Microbiology.* 78(5), 1199–1215.
- 53.** Bubunenko M, Korepanov A, Court D, Jagannathan I, Dickinson D, Chaudhuri B, Culver G. 2006. 30S ribosomal subunits can be assembled in vivo without primary binding ribosomal protein S15. *RNA* 12(7): 1229–1239.
- 54.** Zhang H, Li D, Zhao L, Fleming J, Lin N, Wang T, Liu Z, Li C, Galwey N, Deng J, Zhou Y, Zhu Y, Gao Y, Wang T, Wang S, Huang Y, Wang M, Zhong Q, Zhou L, Chen T, Zhou J, Yang R, Zhu G, Hang H, Zhang J, Li F, Wan K, Wang J, Zhang XE, Bi L. 2013. Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance. *Nat Genet.* 45(10):1255-60.
- 55.** Cole S, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Barrell B. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), 537–544.
- 56.** Martínez Martínez Y. 2014. Secuenciación del genoma de una clona de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a todos los medicamentos antituberculosis de primera línea. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina U.A.N.L. Monterrey, Nuevo León, México.
- 57.** Fleige S, Pfaffl M. 2006. RNA integrity and the effect on the real time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 27(2), 126–139.
- 58.** Alli A, Mangan J, Butcher P, Spreadbury C. 2009. Optimization Of Rna Extraction In *Mycobacterium Tuberculosis* For Studying Intracellular Gene Expression. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 10(2), 64–79.

- 59.** Rio D, Ares M, Hannon G, Nilsen T. 2010. Purification of RNA using TRIzol. *Cold Spring Harb Protoc.* 6, 1-4.
- 60.** Padiadpu J, Baloni P, Chandra N. 2015. Gene expression profiles of wild-type and isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. *Data Brief.* 4, 186-189.
- 61.** Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity.* 6, 279-284.
- 62.** Wong M, Medrano J. 2005. Real time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques.* 39, 1-11.
- 63.** Livak K, Schmittgen T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods.* 408, 402–408.
- 64.** Singh S, Dwivedi R, Chaturvedi V. 2012. Influence of vehicles used for oral dosing of test molecules on the progression of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(11), 6026–8.
- 65.** Saito H. 1998. Laboratory media for the cultivation of tubercle bacillus. *Kekkaku.* 73(5), 329–37.
- 66.** Martínez M, Sardiña M, García G, Mederos L, Díaz R. 2015. Nuevas herramientas para el diagnóstico de la tuberculosis. *Rev Cubana Med Trop* 67(1), 41–49.
- 67.** Bollela V, Sato D., Fonseca B. 1999. McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using *Mycobacterium tuberculosis* as a research tool. *Braz J Med Biol Res.* 32(9), 1073–1076.
68. DRUFCA, katia
- 69.** Akhtar S, Sarkar S, Mishra A, Sarkar D. 2011. A method to extract intact and pure RNA from mycobacteria. *Anal Biochem,* 417(2), 286–288
- 70.** Arnvig K, Comas I, Thomson N, Houghton J, Boshoff H, Croucher N, Young D. 2011. Sequence-Based Analysis Uncovers an Abundance of Non Coding RNA in the Total Transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 7(11) 1-16.
- 71.** Wilson M, DeRisi J, Kristensen H, Imboden P, Rane S, Brown P, Schoolnik G. 1999. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 96(22), 12833–8.
- 72.** Choi Y, Hong S, Jeon B, Wang H, Lee G, Cho S, Lee H. (2015). Conventional and real-time PCR targeting 16S ribosomal RNA for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int J Tuberc Lung Dis.* 19(9), 1102–8.
- 73.** Bashiri G, Baker E. 2015. Production of recombinant proteins in *Mycobacterium smegmatis* for structural and functional studies. *Protein Sci.* 24(1), 1–10.

- 74.** Poggi M, Barroso R, Costa, A, Barbosa, H, Pavan F, Leite C, Torre M. 2013. New Isoniazid Complexes, Promising Agents Against Mycobacterium tuberculosis. *Chem. Soc. J. Mex. Chem. Soc.* 57(573), 198–204.
- 75.** Zumla A, Nahid P, Cole S. 2013. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nature.* 12, 388-401.
- 76.** Sánchez F, López J, Villarino E, Grosset J. 2011. New drugs for tuberculosis treatment. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29(1):47-56.
- 77.** Dave S, Faujdar J, Kumar P, Gupta P, Das R, Parasher D, Chauhan D, Natrajan M, Gupta U, Katoch V. 2009. Comparative growth pattern of multi drug resistance versus susceptible isolates of Mycobacterium tuberculosis in mice lungs. *Indian J Med Res.* 130 (1): 58-62.
- 78.** Dorronsoro I, Torroba L. 2007. Microbiology of tuberculosis. *An. Sist. Sanit. Navar.* 30: 68-85.
- 79.** Sutcliffe I, Harrington D. 2004. Lipoproteins of Mycobacterium tuberculosis: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *FEMS Microbiol Rev.* 28 (5), 645-659.
- 80.** Markarian S, Evangelopoulos D, Harutyunyan L, Pepoyan E, Guzman J, McHugh T, Bhakta S. 2012. The Properties of Solutions of Isoniazid in Water and Dimethylsulfoxide. *J Solution Chem.* 41(9), 1462–1476.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Anail Viridiana Padron Rocha

Candidato para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias con orientación en Microbiología Aplicada

Tesis: Análisis de los perfiles de expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en una cepa sensible (H37Rv) y otra multifarmacorresistente (CIBIN:UMF:15:99) de *Mycobacterium tuberculosis* expuestas a compuestos con actividad antituberculosis.

Campo de estudio: Microbiología

Datos personales:

Nacida en Monterrey Nuevo León, México, el 09 de Febrero de 1990.

Hija de Rogelio Padron Arredondo y Silvia Rocha Ramírez.

Educación: Egresada en 2014 como Químico Bacteriólogo Parasitólogo, por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.