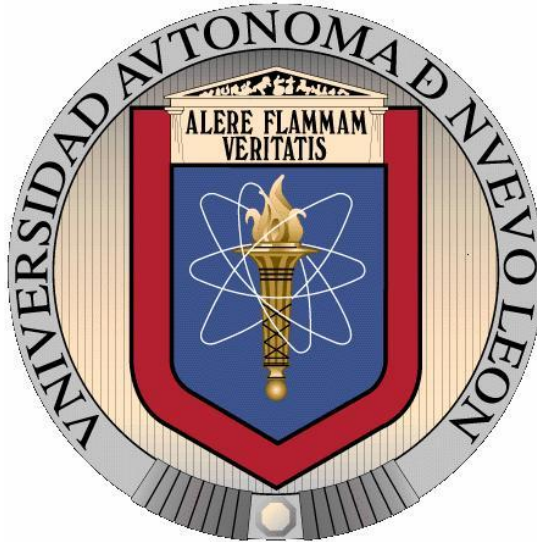


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PROTEOMA DE UNA CLONA
SENSIBLE Y DE UNA RESISTENTE DE *Mycobacterium tuberculosis* A LOS
MEDICAMENTOS DE PRIMERA LÍNEA

POR

M. EN C. VÍCTOR MANUEL TORRES DE LA CRUZ

TESIS

EN OPCIÓN AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

ENERO DE 2011

**"COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PROTEOMA DE UNA CLONA SENSIBLE Y
UNA RESISTENTE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* A LOS
MEDICAMENTOS DE PRIMERA LÍNEA"**

Aprobación de la Tesis:



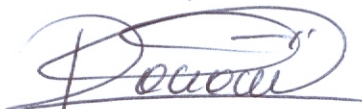
DR. SALVADOR LUIS SAID Y FERNÁNDEZ
Director de Tesis



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Co-Director de Tesis



DRA. ANA MARÍA G. RIVAS ESTILLA
Comisión de Tesis



DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Comisión de Tesis



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Comisión de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Nuevo León

Presenta: M. en C. Víctor Manuel Torres de la Cruz

Título del estudio:

COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PROTEOMA DE UNA CLONA SENSIBLE Y DE UNA RESISTENTE DE *Mycobacterium tuberculosis* A LOS MEDICAMENTOS DE

PRIMERA LÍNEA

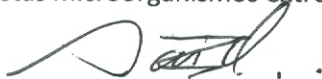
Introducción. La presencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) multifármacorresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) puede convertir a la tuberculosis en una pandemia mundial incontrolable. Por ello, es urgente el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra éstas. Una estrategia importante es encontrar dianas para los nuevos fármacos. Con este propósito analizamos las diferencias en los proteomas de dos cepas de *M. tuberculosis*, una sensible y la otra resistente a todos los medicamentos de primera línea, para luego desarrollar fármacos que ataquen a las proteínas que sirvan como dianas.

Objetivo. Determinar las diferencias entre el proteoma de una población monoclonal pansensible y de una panresistente *M. tuberculosis*.

Material y Métodos. Se compararon, mediante un CLAR/Espectrometría de masas e informática, los proteomas de C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia y ausencia de altas concentraciones de Estreptomicina, Isoniazida, Riampicina y Estreptomicina (SIRE), y de C₁H37 RV en ausencia de SIRE.

Resultados. C₁CIBIN/UMF15-099 mostró una velocidad de crecimiento casi cuatro veces menor que C₁H3 7RV. Se identificaron 31, 24 y cuatro proteínas expresadas por C₁CIBIN/UMF15-099, con, sin y con y sin SIRE y con y sin SIRE, respectivamente. Todas éstas fueron diferentes entre sí y ninguna fue expresada por la cepa pansensible. Los grupos de proteínas más importantes por su número y función fueron las especializadas en regulación de la transcripción, replicación, remodelación de DNA, y las de la familia PPE (inducidas por SIRE) y las de metabolismo intermediario de las familias PE y PE_PGRS (no inducidas). Las funciones de un grupo mayoritario de proteínas aún no se conocen (11 inducidas y cinco no inducidas).

Conclusiones: Existen claras diferencias en los proteomas de H 37 RV y el aislado clínico panresistente, inducido y no inducido por SIRE. Las proteínas inducidas SIRE implicadas en síntesis y replicación de DNA y las de regulación de la parecen ser de vital importancia para C₁CIBIN/UMF15-099, para defenderse de SIRE. La expresión de las proteínas no inducidas dedicadas al metabolismo intermediario posiblemente está regulada por las proteínas inducidas dedicadas a regulación de la transcripción. Todas estas proteínas deben caracterizarse exhaustivamente para explicar mejor su importancia específica en la biología de MTB-MDR y MTB-XDR y porque todas son excelentes nuevas dianas para nuevos medicamentos contra estas microorganismos extremadamente peligrosos.



Dr. Salvador Luis Said y Fernández
Director de tesis



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Co-Directora de Tesis

INDICE

Capítulo I

Introducción

Principales características de *M. tuberculosis*

Importancia epidemiológica de la tuberculosis

Incidencia y mortalidad de tuberculosis en México

Incidencia y mortalidad de tuberculosis en Nuevo León

Estructura y mecanismo de acción de los fármacos de primera línea contra tuberculosis.

Isoniazida

Rifampicina

Estreptomina

Pirazinamida

Etambutol

Mecanismo de acción de los fármacos anti-*M. tuberculosis* de primera línea

Importancia epidemiológica de la tuberculosis farmacorresistente

Tuberculosis XDR

Mecanismo de resistencia a medicamentos anti-*M. tuberculosis* de primera línea

Resistencia a isoniazida

Resistencia a Rifampicina

Proteómica

Electroforesis bidimensional

Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Estrategias Bottom-Up ó Shotgun

Espectrometría de masas

ElectroSpray (ESI)

MALDI

Análisis de datos

Genoma de *M. tuberculosis*

Proteoma de *M. tuberculosis*

Perfiles de sensibilidad a fármacos de primera línea

Capítulo II

Justificación

Capítulo III

Hipótesis

Capítulo IV: Objetivos

Objetivo general

Objetivos específicos

Capítulo V. Metas

Capítulo VI. Material y Métodos

Material biológico

Metodos

Cultivo de H37Rv y CIBIN/UMF15:099

Obtención de clonas

Curvas de crecimiento

Obtención de Biomasa

Practicas de bioseguridad

Integridad de las micobacterias

Certificación de la calidad para el análisis de proteomica de las proteínas contenidas en la biomasa

Obtención de proteínas de las clonas

Separación y detección de proteínas

Separación de proteínas por CLAR

Secuenciación e identificación de las proteínas de C₁-H37Rv y C₁-CIBIN/UMF15:099 con y sin SIRE

Comparación de las proteínas de C₁-H37Rv y C₁-CIBIN/UMF15:099 con y sin SIRE

Alineamiento *In silico* de proteínas.

Criterios de selección de proteínas expresadas en las clonas.

Identificación de interacciones proteínas-proteínas

Capítulo VII. Resultados

Aislamiento de clonas
Curvas de crecimiento
Correlación entre A_{600} y densidad
Esterilidad de los cultivos
Integridad de las micobacterias inactivadas en autoclave
Rendimientos de los cultivos
Integridad de las proteínas de las clonas inactivadas
Curva estándar de SAB
Rendimientos de proteínas
Optimización de los métodos de preparación y detección
Cromatografía e identificación de proteínas
Separación e identificación de las proteínas de interés
Identificación de las proteínas expresadas exclusivamente por C₁-CIBIN/UMF15:099
Proteínas expresadas exclusivamente por C₁-CIBIN/UMF15:099 en presencia de SIRE
Proteínas expresadas exclusivamente por C₁-CIBIN/UMF15:099 en ausencia de SIRE
Proteínas expresadas exclusivamente por C₁-CIBIN/UMF15:099 en presencia y ausencia de SIRE

Proteínas expresadas por C₁-H37Rv en ausencia de SIRE y por C₁-CIBIN/UMF15:099 en presencia de SIRE

Proteínas expresadas por C₁-H37Rv y por C₁-CIBIN/UMF15:099 en ausencia de SIRE

Capítulo VI. Discusión

Capítulo VII. Conclusiones

Capítulo VIII. Perspectivas

Capítulo IX. Referencias

Anexos

INDICE DE FIGURAS

Numero de figura	Página
1.-Aspecto de las colonias de <i>M. tuberculosis</i> creciendo en medio sólido de Lowenstein-Jensen	
2.- Estructura molecular de los fármacos de primera línea	
3.- Distribución de casos de TB-MDR reportados a la WHO entre 1994 y 2009	
4.- Países que han reportado TB-XDR. México incluido	
5.- Mecanismo propuesto para la resistencia de <i>M. tuberculosis</i> a isoniazida	
6.- Mutaciones comunes en el gen <i>rpoB</i> relacionado con la resistencia a rifampicina	
7.- del crecimiento de C ₁ -H37Rv en medio líquido Middlebrook enriquecido con 10% de OADC en presencia (línea roja con cuadrados) y en ausencia de SIRE (Línea negra con círculos llenos).	
8.- Curvas de crecimiento de C ₁ -CIBIN/UMF15-099 en presencia (línea negra con círculos azules) y ausencia (línea roja con cuadrados rojos) de SIRE.	
9.- Relación lineal del Ln del número de micobacterias y la A ₆₀₀ durante el crecimiento exponencial de C ₁ H37 RV	
10.- Relación lineal del Ln del número de micobacterias y la A ₆₀₀ durante el crecimiento exponencial de C ₁ CIBIN/UMF15:099	
11.- Nulo crecimiento de C ₁ H37Rv y C ₁ CIBIN/UMF15-099 en medio de Lowenstein-Jensen después de haber sido inactivados los cultivos en autoclave e incubados a 37 °C en atmósfera de CO ₂ al 5% por 30 d	
12.- Aspecto de un frotis después de haber inactivado un cultivo de C1 H37 RV en autoclave y teñido con la técnica de Zhiel-Neelsen	
13.- Identificación de albumina sérica bovina sometida al proceso de esterilización en autoclave	

14.- Curva de calibración de Albúmina Sérica Bovina (SAB)

15.- Cromatograma de la fase móvil utilizada en la columna de fase reversa del sistema CLAR/Espectrómetro de masas.

16.- Cromatograma de la tripsina

17.-Cromatograma de mezcla de proteínas(hemoglobina, mioglobina, Albúmina sérica bovina, tripsina).

18.-Sobreposición de cromatogramas para ilustrar la reproducibilidad De las separaciones por CLAR.

19.- Cromatograma de los péptidos correspondientes a las proteínas obtenidas de los cultivos masivos de C₁H37 RV en ausencia de SIRE

20.- Sobreposición de cromatogramas de las proteínas totales de C1CIBIN/UMF15-099 cultivada en ausencia de SIRE

21.-Sobreposición de cromatograma de los péptidos correspondientes a las proteínas de CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE

22.- Diagrama de Veen

INDICE DE CUADROS

Numero de cuadros	Página
1.- Actividad Biológica, mecanismos de acción de los fármacos anti-TB de primera línea, genes involucrados en la resistencia y frecuencia de mutación	
2.- Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) de fármacos antituberculosis de primera línea contra una cepa pansensible (H ₃₇ RV) y una panrrresistente (CIBIN/UMF15:99).	
3.- Condiciones de cromatografía en el sistema CLAR/Espectrómetro de masas y validación de los datos	
4.- Proteínas identificadas, cuya función no ha sido descrita expresadas por CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE	
5.- Proteínas expresadas exclusivamente por CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE	
6.- Proteínas expresadas exclusivamente por CIBIN/UMF15-099 en ausencia o en presencia de SIRE	
7.- Proteínas expresadas por H37 RV en ausencia de SIRE y por CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE	
8.- Proteínas expresadas por H37 RV en ausencia de SIRE y por CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE	

RESUMEN

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Nuevo León

Presenta: M. en C. Víctor Manuel Torres de la Cruz

Título del estudio:

COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PROTEOMA DE UNA CLONA SENSIBLE Y DE UNA RESISTENTE DE *Mycobacterium tuberculosis* A LOS MEDICAMENTOS DE PRIMERA LÍNEA

Introducción. La presencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) multifármacorresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) puede convertir a la tuberculosis en una pandemia mundial incontrolable. Por ello, es urgente el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra éstas. Una estrategia importante es encontrar dianas para los nuevos fármacos. Con este propósito analizamos las diferencias en los proteomas de dos cepas de *M. tuberculosis*, una sensible y la otra resistente a todos los medicamentos de primera línea, para luego desarrollar fármacos que ataquen a las proteínas que sirvan como dianas.

Objetivo. Determinar las diferencias entre el proteoma de una población monoclonal pansensible y de una panresistente *M. tuberculosis*.

Material y Métodos. Se compararon, mediante un CLAR/Espectrometría de masas e informática, los proteomas de C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia y ausencia de altas concentraciones de Estreptomicina, Isoniazida, Riampicina y Estreptomicina (SIRE), y de C₁H37 RV en ausencia de SIRE.

Resultados. C₁CIBIN/UMF15-099 mostró una velocidad de crecimiento casi cuatro veces menor que C₁H37 RV. Se identificaron 31, 24 y cuatro proteínas expresadas por C₁CIBIN/UMF15-099, con, sin y con y sin SIRE y con y sin SIRE, respectivamente. Todas éstas fueron diferentes entre sí y ninguna fue expresada por la cepa pansensible. Los grupos de proteínas más importantes por su número y función fueron las especializadas en regulación de la transcripción, replicación, remodelación de DNA, y las de la familia PPE (inducidas por SIRE) y las de metabolismo intermediario de las familias PE y PE_PGRS (no inducidas). Las funciones de un grupo mayoritario de proteínas aún no se conocen (11 inducidas y cinco no inducidas).

Conclusiones: Existen claras diferencias en los proteomas de H 37 RV y el aislado clínico panresistente, inducido y no inducido por SIRE. Las proteínas inducidas SIRE implicadas en síntesis y replicación de DNA y las de regulación de la parecen ser de vital importancia para C₁CIBIN/UMF15-099, para defenderse de SIRE. La expresión de las proteínas no inducidas dedicadas al metabolismo intermediario posiblemente está regulada por las proteínas inducidas dedicadas a regulación de la transcripción. Todas estas proteínas deben caracterizarse exhaustivamente para explicar mejor su importancia específica en la biología de MTB-MDR y MTB-XDR y porque todas son excelentes nuevas dianas para nuevos medicamentos contra estas microorganismos extremadamente peligrosos.

Dr. Salvador Luis Said y Fernández
Director de tesis

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Co-Directora de Tesis



El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Microbacteriología y de Proteómica del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social y de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en la Ciudad de Monterrey, N.L., bajo la Dirección del Dr. Salvador Luis Said y Fernández y la Co-Dirección de la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez.



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa, transmitida por vía aérea, cuyo principal agente causal es *Mycobacterium tuberculosis*¹ (MTB). Otras especies, pertenecientes al complejo tuberculosis (*M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum* y *M. canneti*), también producen esta enfermedad.² Aunque en el área Metropolitana de Monterrey, *MTB* es el único agente que ha sido reportado como agente causal de tuberculosis humana.³

Existen varias formas clínicas de TB, pero la principal es la tuberculosis pulmonar (TBP), porque generalmente los pulmones son la vía de entrada de los agentes causales¹.

La tuberculosis se caracteriza por tos productiva por más de 3 semanas, hemoptisis en casos avanzados, sudoración nocturna, debilidad, falta de apetito, consunción y deterioro progresivo de los órganos afectados⁵.

Esta enfermedad es curable, si se trata a tiempo y en forma adecuada.⁶ Sin embargo, el surgimiento de cepas multifármaco resistentes (MFR [resistentes a cuando menos isoniazida y rifampicina]) y extremadamente resistentes (XDR [cepas MDR que además son resistentes a un aminoglucósido inyectable o capreomicina y a una fluoroquinolona]), y la asociación a factores de riesgo como la Diabetes mellitus, el HIV/SIDA, alcoholismo, drogadicción, tabaquismo, hacinamiento, mala nutrición, y seguimiento inadecuado del tratamiento, dificultan enormemente la curación de los enfermos y por lo tanto el control de la enfermedad⁷. La tuberculosis XDR es virtualmente incurable.⁸



Actualmente se está aplicando un considerable esfuerzo por parte de varias organizaciones, compañías farmacéuticas y gobiernos de diversos países para identificar nuevos compuestos de origen natural, sintético y semisintético que sean efectivos contra cepas MDR y XDR de *MTB*.⁹

El grupo de investigación del Centro de Investigación Biomédica del Noreste para el Estudio de la Biología Celular y Molecular de *Mycobacterium tuberculosis* y de otras bacterias patógenas, al que pertenece el autor de esta tesis, ha colaborado por más de 15 años con profesionales y Directivos del Área Médica de la Delegación Nuevo León para realizar diversos estudios de epidemiología molecular de la tuberculosis pulmonar. Durante estos estudios, se han aislado y caracterizado más de 2,000 cepas de *MTB* de pacientes en diversos estados de evolución de su enfermedad. Además, en el centro mencionado contamos con una colección de cepas utilizadas en el mundo entero como estándares.

La cepa estándar más importante es H37 Rv, que es patógena para el hombre y para ratones BALBc y sensible a todos los medicamentos anti-tuberculosis de primera línea (Estreptomina [S], isonizida [I], rifampicina [R], Etambutol [E] y pirazinamida [P]).¹⁰ Entre las cepas recuperadas de los pacientes, existe una, la CIBIN/UMF15:99, la cual también es patógena para el hombre¹⁰ y para ratones BALBc.¹¹ Esta cepa es resistente a todos los medicamentos de primera línea. Es decir, las cepas H37 Rv y CIBIN/UMF15:99 están en los extremos de sensibilidad, La H37 Rv es pansensible y la CIBIN/UMF15:99 es resistente a SIREP.

SIREP constituye la base de medicamentos de un esquema recomendado por la WHO y adoptado por la mayor parte de los países



del mundo. El nuestro incluido. Este programa se llama DOTS, por su siglas en Inglés (*Directly Observed Treatment, Short-course*). En Español se le conoce como TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado).¹²

H37 Rv y CIBIN/UMF15:99 se han utilizado en numerosos estudios, sobre todo, de búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos. Ver, por ejemplo:^{10,11,13-25}

Uno de los enfoques actuales en la búsqueda de nuevos fármacos contra *MTB* es identificar los posibles blancos moleculares de nuevos compuestos. Y dado que existen claras diferencias en el fenotipo de H₃₇Rv y CIBIN/UMF15:99, es de esperarse que también las haya en su proteoma. Precisamente eso es lo que nos propusimos investigar en este estudio.

1.1 Principales características de *MTB*

Los bacilos de la tuberculosis son bastones delgados, algunas veces, ligeramente curvos, de 0.2 a 0.6 μm de ancho y de 1 a 4 μm de largo. Se presentan aislados, pero algunas veces se observan en grupos pequeños. En otras ocasiones forman masas compactas donde no pueden distinguirse los bacilos individuales. En los tejidos suele conservarse la forma bacilar. En cultivo, algunas veces se observan formas filamentosas, más largas.

Los bacilos de *MTB* son inmóviles, no forman esporas. Es notable la estructura granulosa de las micobacterias individuales. Son bacilos acidorresistentes, que se tiñen bien, de color rojo, con el método de Zhiel Neelsen, que utiliza carbofuchina.²⁶

Los bacilos de *MTB* son aerobios obligados, aunque los de *M. bovis* pueden ser microaerofílicos en su aislamiento primario. La tempera-



tura óptima para el crecimiento de los bacilos de *MTB* es de 37°C. No crecen a una temperatura menor de 30° ni mayor de 42°C.²⁶

Aún a la temperatura óptima de crecimiento su desarrollo es lento. Generalmente se toman de 4 a 6 semanas para lograr un desarrollo abundante. Pueden aparecer colonias diminutas en 8 a 10 d.²⁶

En cultivos en caldo se forma una capa de crecimiento gruesa. Arrugada, que tiende a desparramarse sobre las paredes internas del frasco. Pueden desprenderse masas de bacilos y caer al fondo en forma de sedimento apelmazado.

El medio más utilizado para el aislamiento y mantenimiento de *MTB* es el medio sólido de Lowenstein-Jensen. En el cual las colonias de *MTB* tienen una superficie seca, granular, con zonas nodulares y prominentes.²⁶

La Fig. 1 muestra el aspecto típico de las colonias de *MTB*, creciendo en medio de Lowenstein Jensen.

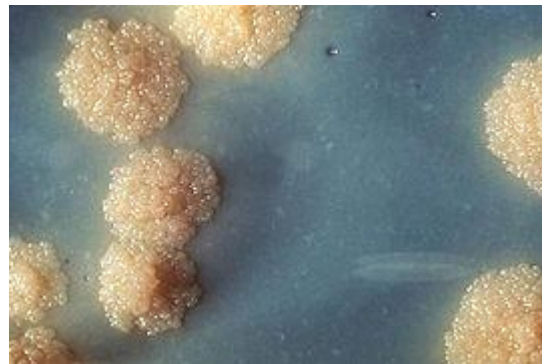


Figura 1. Aspecto de las colonias de *MTB* creciendo en medio sólido de Lowenstein-Jensen

1.2 Importancia epidemiológica de la TB

Prevalencia. Se estima que más de 2 mil millones de personas están infectadas—la tercera parte de la población mundial—por alguno de los agentes causales de TB. Sin embargo, sólo el 10% de estos individuos tienen tuberculosis activa⁴.



De acuerdo con el 13vo reporte anual de la World Health Organization (WHO)¹², publicado en 2009, con datos correspondientes a 2007, la prevalencia mundial estimada fue de 9.27 millones de casos nuevos; lo cual implica incrementos de 9.24 millones, 8.3 millones y 6.6 millones con respecto a los años 2006, 2000 y 1990. La mayor incidencia en 2007 correspondió a Asia, con el 55% del total de casos y Africa con el 31% de casos nuevos.

Incidencia. La WHO, basándose en datos de vigilancia epidemiológica y estudios epidemiológicos estima que en 2007 hubo 9.27 millones de nuevos casos (139 por 100,000 habitantes). En 2006 la tasa de incidencia fue de 140 por 100,000 habitantes.¹²

Mortalidad. En 2007 hubo un estimado de 1.3 millones de muertes por TB en personas HIV negativas (20 por 100,000 habitantes). Además, entre los casos HIV positivos se registraron 456 000 muertes. En total hubo 1,756,000 muertes por TB.¹²

Las poblaciones de los países en vías de desarrollo son las más afectadas por TB, el 90% de los casos nuevos y de muertes se han reportado en África subsahariana, en Asia y en los países que integran la antigua Unión Soviética. Los países de América son de los menos afectados y sólo Brasil tiene una alta mortalidad.

1.2.1. Incidencia y mortalidad de TB en México

EN 2008 se reportaron 15,035 nuevos casos de TBP, 2,892 nuevos casos de otras formas de TB y 283 nuevos casos de TB meníngea (18819 casos en total). De esos casos, correspondieron al IMSS 12,741 nuevos casos (67.7% del total reportado).²⁷



1.2.2. Incidencia y mortalidad de TB en Nuevo León

En 2008 Nuevo León reportó 875 casos de tuberculosis respiratoria. De los cuales correspondieron al IMSS 388 casos. El 44.4%, con respecto al total de casos.²⁸

1.3. Fármacos de primera línea anti-MTB

La estructura molecular de los medicamentos de primera línea se muestran en la Fig. 2 (pág. 8).²⁹ Puede observarse que las estructuras son muy diversas. Y como se describe enseguida, también lo son sus características farmacológicas.

1.3.1. Isoniazida

Micobactericida. Es una molécula sintética. Su estructura corresponde a una piridina derivada del ácido isonicotínico³⁰.

Se trata de un fármaco muy importante en el manejo de la tuberculosis, porque puede administrarse oralmente, intramuscularmente o por vía intravenosa. Es de bajo costo y puede administrarse 2 ó 3 veces por semana. Se absorbe por el tracto gastrointestinal y se distribuye fácilmente a todos los órganos y tejidos, incluyendo al sistema nervioso central.³⁰

1.3.2. Rifampicina³¹

Es bactericida. Se metaboliza en el hígado. Es un compuesto natural perteneciente a la familia de las ansamicinas naftalénicas, caracterizadas por sus estructuras macrocíclicas. La produce el hongo microscópico *Streptomyces mediterranei*.³¹

La rifampicina es un agente antituberculosis extremadamente potente. Generalmente es bien tolerado y puede administrarse por vía oral o intravenosa. Su vida media es de 1.5 a 5 h.³¹



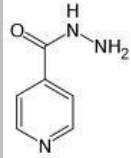
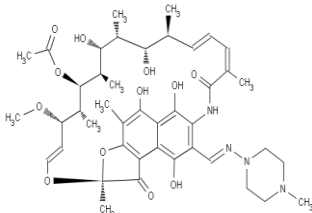
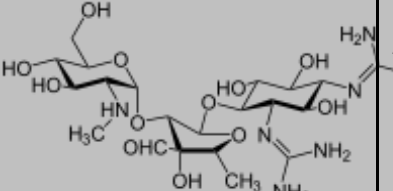
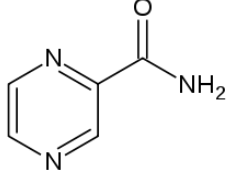
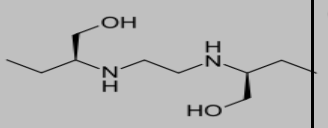
Fármaco	Estructura	CMI
Isoniacida*		0.02-0.2 µg/mL
Rifampicina		0.05-1 µg/mL
Estreptomicina		2.0-4.0 µg/mL
Pirazinamida*		6.25-50 µg/mL
Etambutol		0.5-2.0 µg/mL

Figura 2. Estructura molecular de los fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) y su concentración mínima inhibitoria (CMI).

*Profármacos: Estas especies químicas no son activas hasta ser activadas por enzimas del propio microorganismo.²⁹

1.3.3. Estreptomicina³²

Es un aminoglucósido natural, producido por *Streptomyces griseus*. Se comercializa como sulfato de estreptomicina.³² Es activa solo



sobre bacilos de *MTB* que están creciendo fuera de las células huéspedes. Debe administrarse parenteralmente.³⁰

1.3.4. Pirazinamida³³

Es un compuesto heterocíclico, sintético³³. Es bactericida, sólo contra micobacterias intracelulares. Es el único medicamento que puede eliminar infecciones persistentes. Puede usarse durante 2 meses para reducir una duración larga de quimioterapia. Se desarrolla resistencia rápidamente si se usa sola. El efecto secundario no deseado más importante es la hepatitis, por ser la pirazinamida un producto hepatotóxico.³⁰

1.3.5. Etambutol

El etambutol es bacteriostático³⁴, pero a pesar de esto, este compuesto es un agente muy efectivo para el tratamiento de la tuberculosis. Los picos de su concentración en plasma se alcanzan entre las 2 y 4 h posteriores a su administración.³⁰

1.4. Mecanismos de acción de los fármacos anti-*MTB* de primera línea

El Cuadro 1 (pág.10) describe muy brevemente los mecanismos de acción de los fármacos anti-*MTB* y también los genes involucrados.³⁴

1.5. Importancia epidemiológica de la TB fármaco-resistente

En 2008, hubo en el mundo un estimado de 390,000–510,000 casos de tuberculosis resistente a cuando menos isoniazida y rifampicina—los dos fármacos más efectivos que existen—. A esta modalidad de resistencia se le llama tuberculosis MFR (TB-MDR). La incidencia de TB-MDR arriba mencionada representa el 3.6% del total de casos de TB. Cerca del 50% del total de casos de TB- MDR en el



Cuadro 1. Actividad Biológica, mecanismos de acción de los fármacos anti-TB de primera línea, genes involucrados en la resistencia y frecuencia de mutación³⁴

Fármaco (año del lanzamiento)	CIM ¹ µg/mL	Genes involucrados en la resistencia	Función de los genes	Mecanismo de acción	Frecuencia de mutación (%)
Isoniacida ² (1952)	0.02-0.2	<i>katG</i>	Catalasa peroxidasa ³	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos y otros múltiples efectos	50-95
		<i>inhA</i>	Enoil AC P reductasa		8-43
Rifampicina (1966)	0.05-1.0	<i>rpoB</i>	Subunidad β de la RNA polimerasa	Inhibe la síntesis de RNA	95
Pirazinamida** (1952)	16-50 (pH 5.5)	<i>prcA</i>	Nicotinamidasa/ pirazinamidasa ³	Depleción del potencial de membrana	72-97
Etambutol (1961)	1-5	<i>embB</i>	Arabinosil transferasa	Inhibe la síntesis de arabinogalactanas	47-65
Estreptomina (1944)	2-8	<i>rpsL</i>	Proteína ribosomal 12	Inhibe la síntesis de proteínas	52-59
		<i>rrs</i>	rRNA 16S		8-91
		<i>gloB</i>	rRNA metiltransferasa (G527 en 530 loop)		?

¹Concentración inhibitoria mínima; ²Profármaco, ³Enzimas que activan a los profármacos respectivos.

mundo ocurrieron en China y la India. Se estima que en 2008 hubo 150 000 muertes por TB-MDR.³⁵

La Fig. 3 (pág. 11) muestra la distribución de casos de TB-MDR. Se observa que en México se han reportado casos nuevos y previamente tratados de TB-MDR. Estos casos se reportaron entre 1994-2008.³⁶ Nosotros hemos estudiado este problema en el área metropolitana de Monterrey, y hemos encontrado fármaco resistencia, tanto entre casos previamente tratados como en nuevos casos, 52.3% de los casos son resistentes a uno o hasta 5 fármacos y el resultado MFR.³⁷

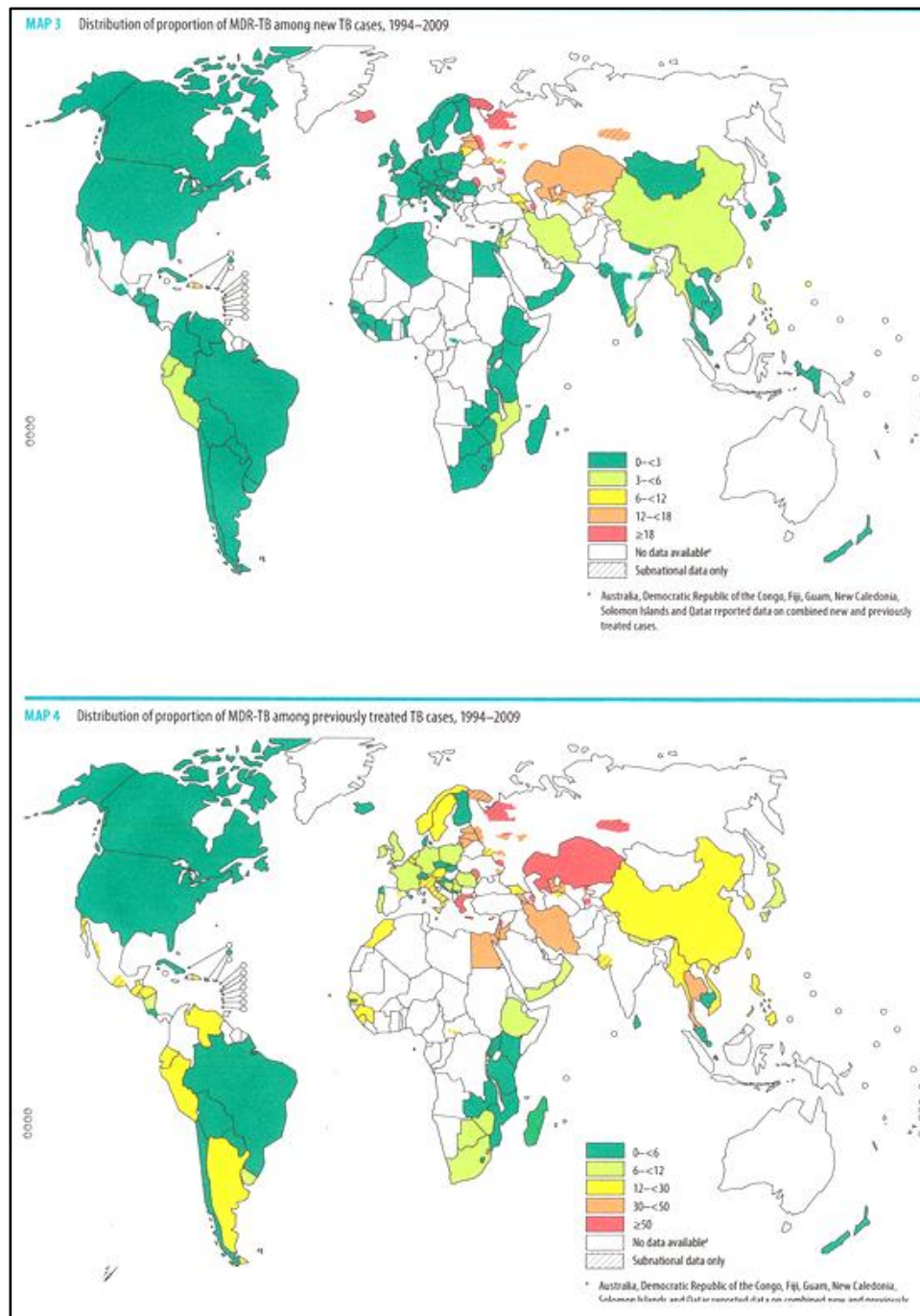


Figura 3. Distribución de casos de TB-MDR reportados a la WHO entre 1994 y 2009 por organizaciones subnacionales o nacionales. Los casos de México fueron reportados por organizaciones subnacionales.³⁵



1.6. TB XDR^{35,37}

Existe una nueva epidemia, reconocida por la WHO en 1996, llamada tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR), que se caracteriza por ser MDR y además por ser resistente a cuando menos un aminoglucósido inyectable (Kanamicina o Amikacina), o Capreomicina y cuando menos a una fluoroquinolona³⁷. Estos casos prácticamente no tienen esperanza de curación.⁸

Las causas más importantes para el surgimiento de TB-MDR y TB-XDR son el mal uso de los medicamentos anti-TB y sistemas deficientes del cuidado de la salud. Esto ha originado una nueva y dura batalla por el control de la tuberculosis.^{35,38}

La Fig. 4 (pág. 13) muestra un mapa mundial con los países que han reportado TB-XDR, incluyendo el nuestro.³⁹

1.7. Mecanismos de resistencia a medicamentos anti-MTB de primera línea

Los estudios moleculares del mecanismo de acción de los medicamentos anti-TB de primera línea se han estado dilucidando paulatinamente durante la última década. La fármacorresistencia de MTB se atribuye, en primera instancia a la acumulación de mutaciones en los genes que codifican para las dianas de los medicamentos anti-MTB. Esas mutaciones conducen a proteínas estructurales o con actividades enzimáticas en las micobacterias, que les confieren resistencia a los medicamentos (i.e, se sabe, por estudios genéticos que la RNA polimerasa y la catalasa-peroxidasa están involucradas en la resistencia a rifampicina e isoniazida, respectivamente. El cuadro 1 (pág. 10) muestra las principales causas de resistencia a los cinco fármacos de primera línea y la frecuencia de mutaciones para cada uno de los genes que se han identificado hasta ahora.^{29,38}

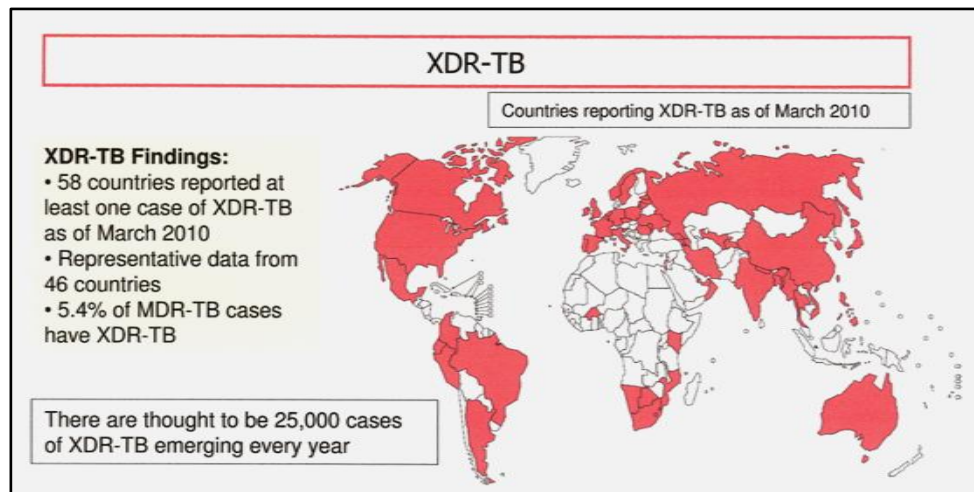


Figura 4. Países que han reportado TB-XDR. México incluido.³⁵

La resistencia a isoniazida y rifampicina ha sido la más estudiada. Por esta razón, enseguida se describe este fenómeno de forma sucinta.

1.7.1. Resistencia a Isoniazida^{29,38}

Isoniazida (I [*isonicotinic acid hydrazide, 4-pyridinecarboxylic acid hydrazide*]), es muy activa contra *MTB*. El mecanismo de acción de I, así como los mecanismos que confieren a *MTB* su resistencia son muy complejos y no se han comprendido cabalmente (Fig.5, pág. 16).

Sin embargo, la evidencia experimental sugiere que INH inhibe la síntesis de ácidos micólicos de la pared celular.

La activación de INH a un intermediario electrofílico requiere de la acción de la enzima catalasa-peroxidasa (KatG [la cual está codificada por el gen *katG*]), y de un donador de electrones (H_2O_2)²⁹. KatG es la única enzima capaz de activar a INH. Consecuentemente, las cepas de *MTB* que son mutantes de KatG son invariablemente resistentes a INH.

Sin embargo se ha propuesto que otra enzima, encargada de des

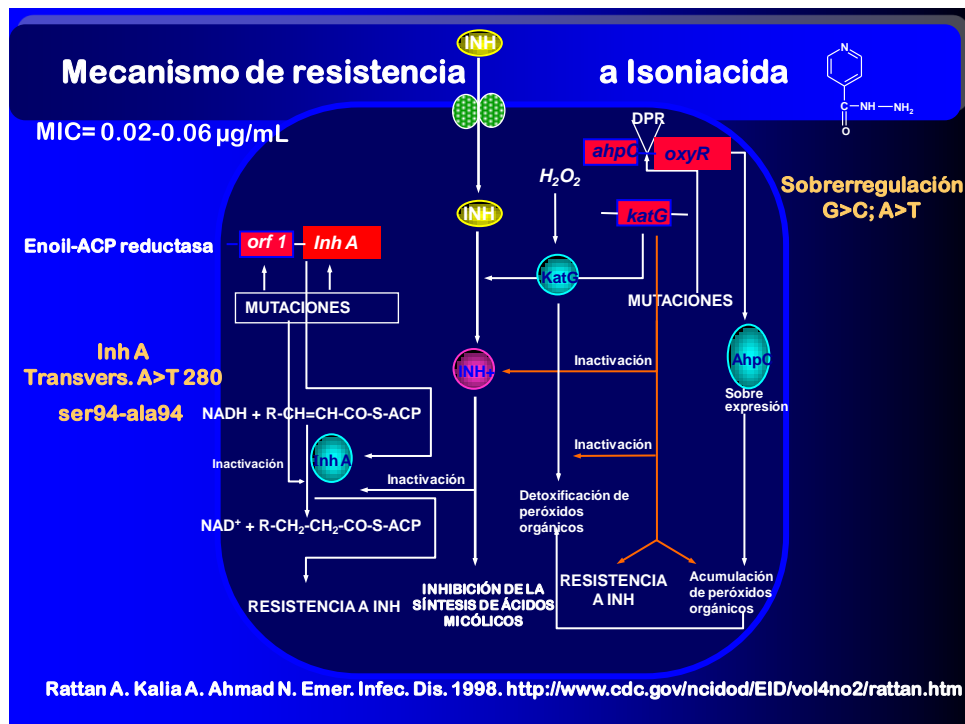


Figura 5. Mecanismo propuesto para la resistencia de MTB a isoniazida²⁹

toxificar peróxidos está involucrada en un mecanismo de salvamento, mediante su sobreexpresión de *ahpC* para combatir el estrés oxidativo. La Fig. 5 ilustra los principales conocimientos que se tienen sobre el mecanismo de resistencia de MTB a INH.

1.7.2. Resistencia a Rifampicina²⁹

La rifampicina (R) se introdujo al mercado en 1972 como un fármaco contra la tuberculosis. La rifampicina es extremadamente efectiva contra MTB. Tiene una acción bactericida, y por ello, junto con isoniazida, constituye la columna vertebral de la quimioterapia de corta duración. La resistencia RIF se está incrementando. Es ampliamente aceptado que la diana de la RIF es la RNA polimerasa de MTB, y por lo tanto mata a estos organismos interfiriendo con la transcripción. Usando RNA de *M. smegmatis* se demostró que la R inhibe específicamente



camente la elongación de los transcritos y que virtualmente no tiene efecto en la iniciación de la transcripción.

La RNA polimerasa, es un oligómero complejo compuesto por cuatro subunidades diferentes, codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, y *rpoD*. Esta enzima es altamente conservada en bacterias. La caracterización del gen *rpoB* de *Escherichia coli* demostró que RIF interactúa específicamente con la subunidad β de la RNA polimerasa. De ese modo inhibe la transcripción. Por otro lado, las mutaciones en el locus *rpoB* confieren cambios que conducen a una unión defectuosa con la RIF y, por lo tanto, resistencia. Subsecuentemente se caracterizó el locus *rpoB* de *MTB* y se identificaron las mutaciones que confieren resistencia a *MTB*. Se determinó que la mayor parte de las mutaciones están restringidas a una región de 81-pb y dominadas por cambios en un solo nucleótido, resultando en sustituciones de un solo aminoácido. Sin embargo, también ocurren deleciones e inserciones dentro del marco de lectura con menor frecuencia. Los cambios en los codones Ser 531 e His 526 se han documentado en más del 70% de los aislados resistentes a RIF. Un número muy pequeño de mutaciones en aislados resistentes a RIF no se localizan en la región de 81-pb.

Además de lo anterior, se ha propuesto que puede haber otros mecanismos que confieran a la micobacterias resistencia a RIF. Como por ejemplo disminución de la permeabilidad a RIF y mutaciones en subunidades alternas de la RNA polimerasa que también podrían conferir el fenotipo de resistencia. Sin embargo, más del 95% de las cepas deben su resistencia a mutaciones en una región del gen *rpoB* denominada “región caliente”.

La Fig. 6 (pág. 16) muestra las principales mutaciones que confieren a *MTB* el fenotipo de resistencia a RIF y la región caliente de 81-pb.

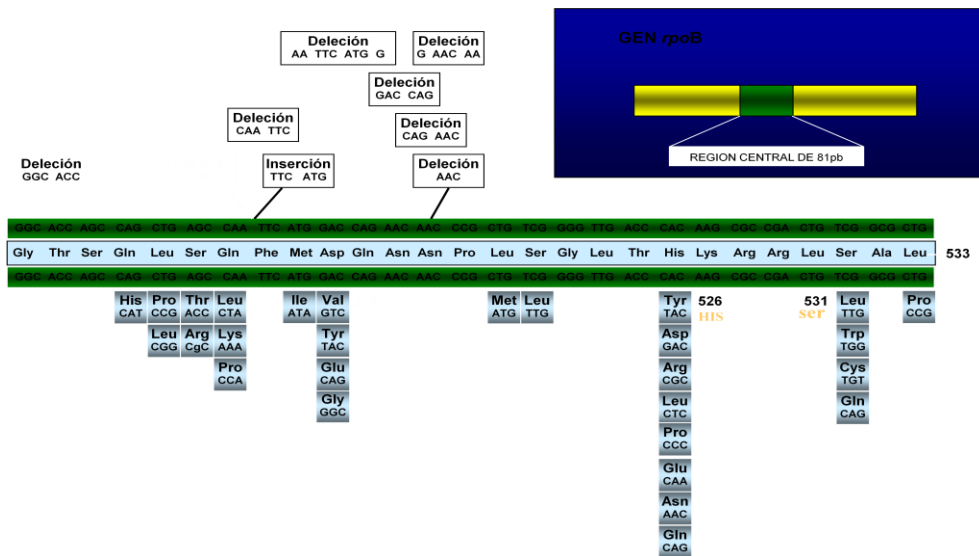


Figura 6. Mutaciones comunes en el gen *rpoB* relacionado con la resistencia a rifampicina

1.8. Proteómica

La proteómica emergió como una excitante disciplina nueva a mediados de los 1990's. Desde entonces, esta especialidad ha estado creciendo continuamente. Puede ser definida como el análisis de la totalidad del contenido de proteínas expresado en una célula o muestra biológica en un tiempo determinado bajo condiciones específicas⁵⁹.

La proteómica puede dividirse en dos grandes áreas: Proteómica de expresión y Proteómica funcional, la primera tiene que ver con la expresión de proteínas por un organismo bajo distintas condiciones y la segunda con caracterizar los componentes de los compartimientos celulares, complejos multiproteicos, rutas o vías de señalización. Este nuevo enfoque de la investigación en Biología y Biomedicina se ha fortalecido enormemente por la posibilidad de conocer el genoma completo de una diversidad de organismos y por el desarrollo de técnicas e instrumentos, altamente sensibles y específicos como la



espectrometría de masas para analizar proteínas y péptidos, particularmente el desarrollo de la ionización suave; lo cual se refiere a la habilidad de ionizar y volatizar compuestos térmicamente lábiles como los señalados sin inducir fragmentación, las modalidades desarrolladas son principalmente ESI-MS y MALDI-TOF.

La estructura del genoma de las células es finita y relativamente estable. En contraste, su proteoma cambia constantemente en respuesta a estímulos externos y durante el desarrollo. En el caso de organismos complejos, como los eucariotes superiores el número potencial de genomas es esencialmente ilimitado.

La proteómica puede involucrar cualquiera de las siguientes áreas: 1) La descripción del proteoma, 2) la delineación de las interacciones proteína-proteína, 3) las modificaciones post-transcripcionales y 4) el análisis estructural de este tipo de moléculas.⁴⁰

Como disciplina, la proteómica ha estado ligada al desarrollo de algunas técnicas instrumentales que abarcan desde la preparación de las muestras, el análisis y el procesamiento de la información.

1.8.1. Electroforesis bidimensional.

La utilización de electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida ha sido el método más extensamente usado, dado su gran poder de resolución. Una de las ventajas de esta técnica es su capacidad para separar y visualizar simultáneamente cientos de proteínas. Y la posibilidad de recuperar proteínas de interés. La electroforesis bidimensional es considerada el estándar de oro. Por otro lado, una de las desventajas de esta técnica es que requiere muchísimo tiempo y trabajo y la investigación y complementación de los resultados *in silico* es muy limitada.



1.8.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). En Inglés, *High Performance Liquid Chromatography*) es un método más rápido que la electroforesis bidimensional y tiene diferentes modalidades que aprovechan las propiedades fisicoquímicas de péptidos y proteínas. Además, CLAR se complementa excelentemente con la espectrometría de masas y con la caracterización integral de las proteínas de interés *in silico* (ver más adelante).

Algunas de las propiedades de proteínas y péptidos excelentemente aprovechadas por CLAR y sus diferentes modalidades son las siguientes: su tamaño, para ello se utiliza la CLAR de exclusión molecular. Su carga eléctrica, CLAR de intercambio iónico. Su hidrofobicidad, aplicando cromatografía de fase reversa. Además, CLAR puede ser utilizado eficientemente en el estudio de proteínas hidrofóbicas y a modificaciones post-traduccionales. CLAR, con sus diferentes modalidades puede automatizarse en su parte analítica. Además, pueden recuperarse compuestos de interés con un colector de fracciones.

Adicionalmente, se han desarrollado métodos multidimensionales en los que se busca la ortogonalidad de las propiedades a usar en la separación, tal es el caso del uso secuencial en línea de la cromatografía de intercambio iónico con diferentes pasos de elución con distintas concentraciones de sales (NaCl) y su posterior separación en fase reversa. También se han reportado estudios usando dos etapas de separación en línea: una de fase reversa, en donde se varían las proporciones de los solventes—ya sea en forma isocrática o en gradientes cortos—; y la otra, de intercambio iónico, utilizando gradientes lineales de disolventes.⁶⁶



A estas modalidades multidimensionales se les ha denominado MUD-PIT (*multi-dimensional protein identification technology*)⁷⁰.

1.8.3. *Bottom-Up* ó *Shotgun proteomics*.

Mediante esta modalidad pueden identificarse proteínas partiendo de péptidos derivados de la digestión proteolítica de una mezcla compleja de proteínas de un espécimen de interés. La mezcla de péptidos resultante de la digestión se fracciona mediante CLAR, antes de someterla a un análisis con espectrometría de masas. Dentro del espectrómetro de masas, cada péptido se fragmenta generando péptidos de diferentes tamaños, e incluso aminoácidos. Con esta información, un software especializado deduce la secuencia original del péptido.

1.9. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas ha permitido un desarrollo espectacular de la proteómica, porque permite el análisis de proteomas completos, los cuales habitualmente constan de miles de proteínas. Los resultados son extraordinariamente precisos y confiables y complementan perfectamente la información que se tiene sobre genes que codifican para proteínas putativas. Éstas se deducen exclusivamente de las secuencia de genomas de interés. Además de la extraordinaria capacidad analítica de la espectrometría de masas, las computadoras y software que son parte de los instrumentos analíticos, permiten conectarse con una enorme variedad de bancos de proteínas y de genes, complementando maravillosamente la información deseada. La espectrometría de masas está continuamente perfeccionándose, haciéndose cada vez más poderosa y confiable.



Uno de los avances más notables en la pasada década fue el desarrollo de la ionización suave, como se ha comentado anteriormente, este avance se debe principalmente al desarrollo de las interfases ESI y MALDI; lo cual les mereció el premio Nobel, en 2002, a John Fin y a Moheci Tanaka, respectivamente⁶⁶.

A continuación, se describen brevemente los fundamentos de las mismas.

1.9.1. *ElectroSpray* (ESI)

Uno de los requisitos básicos para la operación de esta interfase es que el analito de interés esté ionizado. Esto se debe a que el objetivo de esta interfase es generar microgotas conteniendo el analito previamente ionizado. La muestra de interés es disuelta y bombeada a través de un fino capilar o aguja a la que se aplica una carga eléctrica. El potencial eléctrico generado puede ser positivo o negativo. Como resultado del intenso campo eléctrico presente en la muestra, la solución sale del capilar a un aditamento que tiene forma de un cono, denominado cono de Taylor.

El proceso es asistido por componentes de la interfase para controlar parámetros como temperatura, flujo de gases de des-solvatación o nebulización, vacío y diferencias de potenciales de los conos de extracción. Los arreglos geométricos de estos componentes—o de otros— pueden variar de acuerdo con la marca o el modelo del instrumento. Todos estos componentes van formando gotas progresivamente más pequeñas, hasta llegar a un equilibrio entre la repulsión de cargas y la tensión superficial. A este estado se le conoce como el límite de estabilidad de Rayleigh. En este límite de estabilidad, los iones son expulsados de la microgota, removiendo el solvente, y la corriente de iones es conducida hasta los analizadores⁶⁶.



Los péptidos y proteínas analizados por esta técnica presentan múltiples iones cargados, p.e. $[M+nH]^{n+}$). Esta técnica es muy sensible para detectar cambios de concentración de los analitos; en especial cuando se trabaja con nanoflujos, lo cual la hace ideal para realizar estudios cuantitativos.

1.9.2. MALDI

A diferencia de lo que sucede con el ESI, cuando se utiliza MALDI se producen iones con una sola carga. La muestra que contiene el analito de interés es co-cristalizada con un exceso de matriz. La matriz también desempeña la función de diluyente, ya que ésta absorbe la radiación ultravioleta proveniente del laser para facilitar la desorción y la ionización del analito.

El analito se deposita en una placa metálica. Después de un proceso de secado, la placa portando la muestra y la matriz, son colocadas en la fuente donde se aplica alto vacío.

Actualmente, algunos avances tecnológicos han colocado a la interfase MALDI como una de las favoritas. Uno de estos avances está constituido por los analizadores en tándem (TOF/TOF). Este arreglo consiste en acoplar en línea la preparación de muestras a un sistema de CLAR y un espectrómetro de masas equipado con un sistema de deposición de las gotas en las placas y secado de las mismas. Recientemente, se lanzó al mercado una aplicación que permite la posibilidad de detectar proteínas y/o péptidos directamente en tejidos (MALDI-IMAGEN). Lo cual significa un salto cuántico en proteómica.

La posibilidad de detección de péptidos de interés también depende del tipo de analizador que se utilice; ya que la función principal del



analizador es la separación de iones. En este sentido existen instrumentos para determinar la masa nominal y otros para determinar masas exactas. Estas funciones dependen de la capacidad de resolución del instrumento de medición. Los instrumentos capaces de determinar la masa nominal tienen una resolución aproximada de 1.0 UMA (unidad de masa atómica). En tanto que para determinar masas exactas se requiere un instrumento que utilice sólo una cuantas ppm del analito.

1.10. Análisis de los datos

La información obtenida por espectrometría de masas en cualquiera de sus modalidades MALDI-TOF o ESI-TOF debe ser procesada mediante técnicas avanzadas de informática. El flujo de información es muy variable, pero en general deben seguirse los siguientes pasos:⁵⁶

1.- Convertir las relaciones masa carga (m/z) a secuencias de péptidos por medio de alguna de las bases de datos como MASCOT, X-tandem o Sequest.⁴³

2.-Validar las secuencias peptídicas obtenidas. Esta etapa es crítica porque define y delimita las secuencias que cumplen con criterios estadísticos de aceptación o rechazo; por ejemplo, los motores de búsqueda automatizados tienen parámetros particulares de procesamiento y aceptación de las secuencias asignadas. MASCOT considera como válidas las asignaciones a las secuencias con un valor (*score*) > 40%; y en el caso de SEQUEST, valores de 1.9, 2.2 y 3.7 son considerados como confiables para iones con carga 1, 2 y 3 respectivamente⁸⁰. Además, existen algoritmos automatizados de validación como PeptideProphet, el cual usa parámetros denominados MPT (*minimum probability thersshold*) para definir la sensibilidad



(número de péptidos correctamente asignados) o el error (numero de péptidos incorrectamente asignados). Esta información se presenta en una tabla o gráfica para cada péptido (espectro). Después de esta validación, se asigna una probabilidad específica de secuencia a cada fragmento. Cabe señalar que los algoritmos de asignación de score son distintos para cada motor de búsqueda, pero todas requieren de espectros de buena calidad para asegurar la confiabilidad de los resultados.

3.-Alinear las secuencias peptídicas con bases de datos de proteínas. Las bases de datos comúnmente usadas son Swissprot, Uniprot o bases de datos específicas de organismos como el caso de las bases de datos de *MTB*⁵⁶, en cuyo alineamiento también existen parámetros que permiten la validación de las asignaciones o inferencias a proteínas, tal es el caso de ProteinProphet, la validación es importante porque uno o varios péptidos pueden alinear con una sola proteína, lo cual define el porcentaje de cobertura de la secuencia asignada.

4.-Cuantificar las proteínas de interés.

Existen diversas estrategias para cuantificar proteínas; dos de las más empleadas son ICAT (*Isotope-coded affinity tag*) o iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*). La principal limitación de estas estrategias es que ambas dependen de que el marcaje sea muy eficiente. Además estas técnicas implican altos costos y limitada disponibilidad de los reactivos.

Recientemente se desarrolló una estrategia alternativa denominada *Intensity-based Label-free quantitative proteomic* (LFQP); lo cual está facilitando notablemente el proceso de cuantificación de proteínas de interés.



Existen varias opciones de software para el proceso de cuantificación, algunos son plataformas de acceso libre como por ejemplo, MzMine, PEPPER o TOPPAS. Además, ProteinLynx Global Server de Waters o ProteoIQ de Bioinquire están disponibles comercialmente.

5.- Interpretar la importancia biológica de las proteínas identificadas.

La significancia biológica de las proteínas que componen el proteoma de un organismo dado—y que han sido identificadas mediante espectroscopía de masas— puede determinarse utilizando los programas informáticos y las bases de datos adecuados. Con éstos, es posible conocer la interrelación de las proteínas identificadas en el contexto del proteoma total (interactoma) o el papel biológico específico que tiene cada una de ellas y su importancia relativa en el metabolismo.

Para modelar y discernir el interactoma de un conjunto de proteínas pueden usarse algunas plataformas de acceso libre; tales como *String* (<http://string-db.org/>), *Cytoscape* (<http://www.cytoscape.org>); o bien utilizarse programas comerciales; i.e. *Osprey* (<http://biodata.mshri.on.ca/osprey/servlet/Index>).

Las bases de datos están construidas con la información disponible del genoma de los organismos de interés. Por lo tanto, muchas de estas bases son construcciones virtuales (*in silico*), usando como referencias los marcos de lectura abiertos. Por esta razón, la existencia de cada una de las proteínas identificadas mediante alguna de las técnicas arriba descritas debe confirmarse experimentalmente. Por otro lado, la probabilidad de encontrar una proteína depende de que el organismo de interés la exprese bajo las condiciones experimentales usadas. Es importante recordar que la expresión del genoma es un proceso dinámico determinado por los mecanismos de regulación propios y por factores ambientales y fisiológicos⁴¹.



1.11 Genoma de *MTB*

Existen en la actualidad reportes de los genomas de varias especies de micobacterias, dentro de las cuales se encuentra la cepa H₃₇ Rv de *MTB*. Los institutos Sanger y Pasteur publicaron el genoma de H37 Rv el 11 de Junio de 1998. Este genoma contiene de 4,411,529 pb. El 91.45% del genoma es codificante. El genoma de H37 Rv codifica para aproximadamente 4,000 proteínas. Se conoce la función bioquímica de cerca del 40% de estas proteínas. El 44% tiene alta homología con proteínas de otras especies de microorganismos y el 16% ellas no son únicas de micobacterias y tienen una función desconocida⁵⁸.

1.12. Proteoma de *MTB*

Como se comentó con anterioridad el conocimiento del genoma de *MTB* ha permitido generar una clasificación conceptual de las funciones y compartimentalización de las proteínas⁶⁹; lo cual permite crear mapas que servirán para compararlas con hallazgos experimentales. En la actualidad, existen numerosos reportes sobre el proteoma de *MTB*. Dichos estudios se han realizado con diversos fines. Por ejemplo para conocer los factores responsables de la variación de la virulencia de *MTB*⁶⁵; la búsqueda de blancos que puedan ser usados para el desarrollo de nuevos fármacos⁶⁸, el efecto en la expresión de proteínas bajo la influencia de fármacos ya existentes o experimentales, el desarrollo de nuevas vacunas o el entendimiento de fenómenos como la tuberculosis latente⁴⁴.



1.13. Perfiles de sensibilidad a fármacos de primera línea

En el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN) se ha abordado el tema de la tuberculosis pulmonar desde diversos aspectos. Una línea de especial importancia es la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos, arriba comentada. Para ello se ha utilizado sistemáticamente el aislado clínico CIBIN/UMF15-099, el cual es resistente a todos los medicamentos de primera línea. Por esta razón hemos denominado, arbitrariamente, a esta cepa “panresistente”, en concordancia con la denominación de pansensible para la cepas H37 Rv, la cual es sensible a estos mismos medicamentos.

CIBIN/UMF15:99, cuyo perfil de resistencia se contrasta contra una cepa control (Cuadro 2), de la cual se conoce su fenotipo de sensibilidad a los fármacos mencionados en el Cuadro 1 (pág. 10).

Cuadro 2. Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) de fármacos anti-TB de primera línea contra una cepa pansensible (H₃₇RV) y una panresistente (CIBIN/UMF15:99).

Fármaco	Cepa de <i>MTB</i>	
	MIC (µg/mL)	
	H37Rv	CIBIN/UMF15:99
Estreptomina	0.5	≥100
Isoniazida	0.06	3.13
Rifampicina	0.06	100
Etambutol	2	8



CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

En los laboratorios para la Investigación de la Biología Celular y Molecular de *MTB del CIBIN*, en colaboración con diversas Instituciones extranjeras y nacionales, y en especial con la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, España, el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, se están desarrollando nuevos fármacos que sean eficaces contra cepas MDR y XDR de *MTB*.

La tendencia actual para el desarrollo de nuevos medicamentos es conocer las dianas de cepas MDR de *MTB*, que sean susceptibles de ser atacadas por nuevos fármacos, porque de esta manera pueden seleccionarse o diseñarse moléculas *ad hoc*.

Es ampliamente aceptado que la resistencia a varios fármacos en la misma cepa es producto de una serie de mutaciones que residen en el DNA genómico de las micobacterias.³⁷ Por ello, nosotros elegimos para el presente estudio un aislado clínico llamado CIBIN/UMF15:99, que es resistente a los cinco fármacos de primera línea: Estreptomina, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol y Pirazinamida. La utilizamos para compararla con una cepa ampliamente conocida, desde el punto de vista de su biología celular y molecular, y que es sensible a los cinco fármacos antes mencionados.

Con este estudio nos propusimos investigar cuales son las diferencias cualitativas de los proteomas que expresan estas dos cepas, H37 RV y CIBIN/UMF15:099, bajo la presión de una mezcla de cuatro de los cinco fármacos de primera línea (Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina y Etambutol), conteniendo el doble de sus MICs,



bajo condiciones de cultivo controladas y uniformes. Excluimos del estudio a pirazinamida (el quinto fármaco de primera línea) debido a que para ser eficaz este compuesto requiere un pH demasiado ácido (5.5-6.0), lo cual no es compatible con el resto de los fármacos.

El conocimiento que esperamos adquirir con este estudio consiste en identificar proteínas que sean blancos de nuevos fármacos, diseñados *ex professo* contra estas proteínas, lo cual incrementará la probabilidad de éxito contra cepas MDR, o panresistentes y facilitará el tamizaje de alto rendimiento (de grandes cantidades) actualmente utilizados por la mayor parte de las industrias farmacéuticas. Además, la identificación, mediante proteómica, de proteínas que están reportadas en las bases de datos sólo como putativas, permitirá aportar evidencia muy importante sobre su existencia, e información valiosa sobre su importancia biológica en cepas MDR de *MTB*.



CAPÍTULO III

3.1 Hipotesis

Existen diferencias cualitativas entre los proteomas de una población monoclonal resistente a todos los medicamentos de primera línea, aislada del aislado clínico CIBIN/UMF15:099 y de una clona sensible, aislada de la cepa H37 Rv.



CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar las diferencias cualitativas existentes entre el proteoma de una población monoclonal pansensible, aislada de la cepas H37Rv y de una panresistente, aislada de la cepa CIBIN/UMF15:99 de *MTB*.

4.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar las diferencias cualitativas entre los proteomas de las poblaciones monoclonales seleccionadas.
- 2) Realizar la interpretación bioquímica de la información obtenida.



CAPÍTULO V

METAS

- 1.) Aislar clonas de las cepas H37 RV y CIBIN/UMF15:099.
- 2.) Confirmar el fenotipo de pansensibilidad y panresistencia de C₁-H37 RV Y C₁-CIBIN/UMF15:99, respectivamente.
- 3.) Obtener cultivos masivos de las clonas C₁H37 RV y C₁-CIBIN/UMF15:99.
- 4.) Desarrollar un método para esterilizar y lisar las micobacterias sin alterar su proteoma.
- 5.) Obtener proteínas totales de cada clona, en cantidad y con un grado de pureza adecuados para analizar su proteoma.
- 6.) Establecer las condiciones cromatográficas y de detección para la separación e identificación de proteínas por CLAR.
- 7.) Establecer una red de interacciones proteína-proteína con base a procesos moleculares con las proteínas predichas por el genoma de H 37rv.
- 8.) Establecer la red de interacciones específicas de las proteínas de interés obtenidas de las diferencias cualitativas.



CAPÍTULO VI

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Cepa de *MTB* H37 Rv (ATTCC 27294) con perfil de sensibilidad a estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida.

Cepa de *MTB* CIBIN/UMF15:99, resistente a los mismos fármacos la cual fue aislada de un paciente con TBP avanzada, identificada y caracterizada en el laboratorio de micobacteriología del CIBIN-IMSS.

Clona C₁H37Rv, aislada de la cepa H37 Rv.

Clona C₁CIBIN/UMF-099, aislada de la cepa CIBIN/UMF15:099

6.2 Métodos

6.2.1. Cultivo de H37 RV y CIBIN/UMF15:099

La cepa H37 Rv fue incluida en este estudio como estándar, considerando su capacidad de infección a seres humanos y su sensibilidad a estreptomicina (S), isoniacida (I), rifampicina (R), etambutol (E) y pirazinamida (P). Dicha sensibilidad fue probada por el método de Almar-Azul, modificado por Molina et al.¹⁰. Las concentraciones Mínimas Inhibitorias CIMs), para S, I, R, E y P fueron 0.50-, 0.06-, 0.06-, 2.0- y 5.0 µg/mL.

La cepa CIBIN/UMF15:99 fue aislada y caracterizada en el laboratorio de micobacteriología del CIBIN-IMSS, de una muestra de esputo de un paciente con tuberculosis pulmonar avanzada. Esta persona fue atendida en la Unidad de Medicina Familiar Número 15 del IMSS, en Monterrey, N.L. Este paciente falleció sin haber respondido al tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) ni al TAES-plus. Las CIMs para SIRE del aislado clínico CIBIN/UMF15-099 fueron: >100.00-, 3.12,100.00, 8.00 and µg/mL. Esto significa que



este aislado fue >200-, 52-, 1,667-, 4 veces, más resistente a S, I, R, E que la cepa sensible, H 37 RV.

Las cepas seleccionadas para el estudio permanecieron en congelamiento a -70°C en medio Middlebrook 7H9, adicionado con OADC 10%, v/v (Medio de Middlebrook enriquecido), en crioviales (Daigger and Company Inc., Vernon Hills, IL, USA). Uno de estos viales fue descongelado a temperatura ambiente. De éste se tomó una asada—con un asa de platino— y se inoculó en tubos con medio Lowenstein-Jensen. Los cultivos se incubaron a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5 % por 5 semanas, hasta obtener colonias bien definidas, grandes y vigorosas. Cada cepa fue subcultivada tomando una de las mejores colonias e inoculándola en un tubo de 12 x 125 mm conteniendo 12 mL de medio Middlebrook 7H9 enriquecido. Los tubos contenían 15 perlas de vidrio de 1mm de diámetro. La colonia se dispersó dentro del tubo de cultivo, inicialmente con el asa usada para inocular y posteriormente ayudada con agitación en un vortex, a 37°C durante 5 min. De esta suspensión se tomó una asada y se inoculó en un nuevo tubo con medio de Lowenstein-Jensen.

6.2.2. Obtención de clonas

Clonas de H37Rv. Cuando se observaron colonias típicas en uno de tres tubos con cultivos en medio de Lowenstein-Jensen, se tomaron tres de las mejores colonias con una asa de platino y se inocularon por separado en medio tubos de Middlebrook 7H9 enriquecido. Las colonias se dispersaron en el medio con el asa de platino y se perfeccionó la suspensión agitándolas con un vortex. Los cultivos se incubaron como se describió arriba, hasta que éstos alcanzaron una densidad equivalente al estándar uno de McFarland. De éstos cultivos se tomó una asada del cultivo y se inocularon tubos nuevos con



medio de Lowenstein-Jensen y se incubaron como se describió antes.

Tres de las colonias que estaban separadas claramente en este cultivo se tomaron, se inocularon en medio de Middlebrook enriquecido, se dispersaron y se incubaron como la vez anterior. Este procedimiento se repitió una vez más. Las colonias recuperadas del tercer procedimiento se consideraron como clonas y se designaron como C_1 -H37Rv, C_2 -H37Rv y C_3 -H37Rv. Cada clona fue caracterizada para determinar su fenotipo de sensibilidad a S,I,R,E y P. y a la mezcla de cuatro de estos antibióticos (SIRE). De las clonas descritas, se seleccionó a C_1 H37 Rv, ya que fue la que mostró un mejor crecimiento en el medio líquido, en ausencia de SIRE.

Clonas de CIBIN/UMF-099. El procedimiento empleado para obtener las clonas de la cepa CIBIN/UMF-099 fue exactamente el mismo empleado para la obtención de las clonas de la cepa H37Rv, con la única diferencia de que los medios líquidos Middlebrook y el sólido Lowenstein-Jensen fueron adicionados con una solución (SIRE) de estreptomycin (2mg/mL), isoniazida (0.1µg/mL), Rifampicina (2 µg/mL) y etambutol (2.5 µg/mL) durante todo el proceso de aislamiento de las clonas. Las concentraciones señaladas en paréntesis, se refieren a concentraciones finales.

Se aislaron tres clonas de CIBIN/UMF-099: C_1 CIBIN/UMF-099, C_2 CIBIN/UMF-099 y C_3 CIBIN/UMF-099. En todas las clonas se verificó el fenotipo de resistencia a SIRE. Se eligió la clona C_1 -CIBIN/UMF-099 para este estudio por tener mejor crecimiento, todas las clonas obtenidas fueron almacenadas a -70°C , cada una en cinco criotubos.

6.2.3. Curvas de crecimiento



El inóculo de cada clona se obtuvo descongelando—a temperatura ambiente—uno de los crioviales almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada una de las clonas se inoculó en tres tubos de Middlebrook 7H9 enriquecido. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad equivalente al estándar uno de McFaland (cerca de la quinta semana). Del criovial de C₁H37 RV se inoculó (1 mL) en un frasco de cultivo conteniendo 400mL de medio Middlebrook 7H9 enriquecido. Del criovial de C₁-CIBIN/UMF15-099 se inocularon, con 1 mL, 2 frascos de cultivo, cada uno con 400 mL de medio 7H9 enriquecido: Un frasco fue adicionado con SIRE y el otro no. Los tres frascos de cultivo se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de CO₂ al 5% por 30 días. Los frascos se agitaron suavemente cada 24 h y también se tomó 1 mL del cultivo y se depositó en un tubo de vidrio con tapón de rosca. Las micobacterias se inactivaron en autoclave a 15 psi durante 30 min. Una vez frías, las muestras se adicionaron con 500 μL de agua grado Milli-Q, se agitaron por 5 min con un vortex y se leyó su absorbancia a 600nm con un espectrofotómetro (Beckman-Coulter DU800, Brea, CA, USA). Las mediciones se hicieron por triplicado, se calculó el promedio \pm desviación estándar (DE) y estos datos se graficaron en función del tiempo de incubación.

También, se realizaron determinaciones empleando citometría de flujo, con un equipo modelo FACSAaria (Beckton-Dickinson Bioscience, San Jose, CA, USA), para correlacionar el nivel de absorbancias con el número de microorganismos, de las mismas muestras leídas en el espectrofotómetro a 600nm se tomaron 100 μL y se adicionaron 200 μL de agua MilliQ, se agitaron en vortex por 5 min. y los 300 μL contenidos en el tubo de plástico fueron inyectados en el



equipo señalado, el cual fue calibrado con los estándares del fabricante para ajustar el rango de trabajo al tamaño reportado para las micobacterias(3-5 micras)³⁹ Los datos fueron adquiridos y graficados en el software del fabricante BDFACSDiva, ver. 4.1.2.

6.2.4. Obtención de biomasa

Se descongelaron un crioval con la clona C₁-H37 Rv y dos de la C₁-CIBIN/UMF-099 y se inoculó, por separado, la totalidad del contenido de cada tubo en frascos de cultivo con 40 mL de medio 7H9 enriquecido. Uno de los frascos inoculados con C₁-CIBIN/UMF-099 se adicionó con SIRE. Los tres frascos fueron incubados a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y agitación manual cada 24h por 16 días. Los frascos se cosecharon con un sistema de filtración de 1L, con membranas de 0,22 µm, de nylon, aplicando vacío de 20 µm de Hg, con una bomba marca Gast MFG Corp.(Benton Harbor, Mich. USA). Se levantaron las micobacterias retenidas en la membrana de aditamento utilizado para cosechar, lavando, tres veces, con 50 mL de amortiguador de fosfatos, [KCl 2.68mM, KH₂PO₄ 1.47mM, NaCl 136.89mM, Na₂HPO₄ 8.10mM (PBS, [pH 7.4])]. Este proceso se hizo tres veces. Después de lavarlas tres veces, las micobacterias se recuperaron utilizando una jeringa de polipropileno de 20 mL, (Becton-Dickinson, Taxarcana, TX, USA).

En un tubo de polietileno con tapón de rosca y 50 mL de capacidad (BD Bioscienciences, San José, CA, USA) se mezcló el producto de los tres lavados.

6.2.5. Prácticas de bioseguridad

Cada uno de los tubos conteniendo el producto de los cultivos masivos se esterilizó en autoclave a 15 psi, por 30 min. Los tubos se de-



jaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a $1,500 \times g$ por 30 min. Se recuperaron las micobacterias sedimentadas por decantación y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

6.2.6. Integridad de las micobacterias

Se verificó la integridad de las micobacterias después de haberlas inactivado en autoclave, observándolas en un frotis teñido con la técnica de de Ziehl-Neelsen³⁸ con un microscopio (Olympus CH20, Optical Co. LTD, Japan), equipado con un objetivo de inmersión 100X.

Se certificó que los cultivos estuvieran inactivados inoculando tubos con medio de Lowenstein-Jensen e incubando, como se explicó antes, durante 30 d.

Todos los procedimientos microbiológicos, arriba descritos, se realizaron en condiciones de asepsia, en instalaciones y con equipo de contención para un laboratorio microbiológico clase III y observando estrictas medidas de seguridad.

6.2.7. Calidad de las proteínas de interés

Se realizó un análisis completo—desde su digestión hasta su análisis *in silico*— de proteínas bien conocidas (tripsina, albumina sérica bovina, hemoglobina y mioglobina de corazón de caballo) para certificar que la inactivación en autoclave de las micobacterias; además de la digestión con tripsina y la derivatización y reducción de los péptidos (ver más adelante) no interfieren con el análisis espectroscópico y la identificación *in silico* de las proteínas de las clonas. Las proteínas utilizadas como controles, arriba mencionadas, se disolvieron con agua, grado Milli-Q y se ajustaron a 1mg/mL. Todas las proteínas, excepto la tripsina se sometieron al mismo procedi-



miento de esterilización en autoclave empleado con las micobacterias.

6.2.8. Obtención de proteínas de las clonas

Se pesaron las pastillas de micobacterias arriba descritas y 0.5 g de cada una de ellas se pasó a un tubo de polipropileno, estéril, de 2.0 mL de capacidad, conteniendo 0.5 g de perlas de sílica Lysing Matrix B (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Las micobacterias se suspendieron en un amortiguador de lisis (1M urea, 50 mM de $(\text{NH})\text{HCO}_3$ y 5mM de EDTA), su volumen se ajustó a 1.0 mL y las micobacterias se lisaron con ciclos de un equipo FastPrep FP-120 (Savant, Carlsbat, CA, USA), ajustado al paso 6 del control de energía por 45 segundos. Cada una de las pastillas se sedimentó por centrifugación con una microcentrífuga refrigerada (Eppendorf, Barkhausenweg, Amburgo, Alemania) a $10,000 \times g$, 4°C por 10 min.

Se descartó el sobrenadante y las proteínas, en el sedimento, se recuperaron cuidadosamente con una pipeta Pasteur. Se suspendieron con NH_4HCO_3 100mM, ajustando su volumen a 1.0 mL y se filtraron con un acrodisco de 13 mm de diámetro y membrana de Nylon de $0.22 \mu\text{m}$ (Pall Gelman, Port Washington, NY, USA). Se recuperó el filtrado y se determinó su concentración de proteínas a 280 nm. Para ello se utilizó una curva estándar (de 0.1 a 0.5 mg/ mL) de seroalbúmina bovina (SAB), sometida al mismo tratamiento en autoclave que el utilizado para inactivar las micobacterias. Se calculó la concentración de proteínas en las muestras de interés por interpolación en dicha curva. Las lecturas de A_{280} se realizaron por triplicado, con un espectrofotómetro (Beckman-Coulter DU800, Brea, CA, USA) Los datos se registraron como media \pm DE de cada muestra de interés.



6.2.9. Separación y detección de proteínas

Digestión. Las muestras de proteínas fueron digeridas con tripsina, para lo cual 100 μ g de las proteínas de C₁-H37 Rv y las expresadas por C₁-CIBIN/UMF-099 en presencia y ausencia de SIRE así como los controles de albúmina sérica bovina y la mezcla de proteínas conocidas usadas como control positivo y de verificación de la integridad de las proteínas respectivamente y un control negativo fueron digeridas con tripsina, empleando el siguiente protocolo.

Cada muestra fue adicionada con 5 μ L de 1,4 Ditiotreitól (DTT, Sigma Aldrich) para realizar la reducción, y se incubó 45 min. a 65°C en baño María (ThermoFisher, Presicion, Walthman, MA, USA), posteriormente se adicionaron 4 μ L de Iodoacetamida, 1.0M (Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 45 min., la reacción fue detenida por adición de 20 mL de DTT e incubando a temperatura ambiente por 45 min. Finalmente a esta preparación se adicionó tripsina grado secuenciación (Promega, Madison, Wisconsin, USA) siempre manteniendo una relación 1:50 tripsina/proteína (p/p). La tripsina se incubó a 37°C en baño María por 16 h. Se detuvo la reacción por adición del 10% de FTA y se centrifugó a 1000 \times g, a 4°C, por 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un vial de recuperación total (Waters, Milford, MA, USA).

6.2.10. Separación de proteínas por CLAR

Arreglo del sistema de espectrometría de masas en línea y separación y procesamiento de péptidos. Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina (80 μ L) se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de fase reversa, usando un



sistema cromatográfico Alliance 2695 (Waters) conectado directamente a una válvula de intercambio de 6 puertos. La separación por intercambio iónico fue asistida por una bomba secundaria modelo 600 (Waters) conectada directamente a la válvula de intercambio. La operación fue controlada por el software MassLynx, ver 4.1. Se utilizó una configuración para trabajo en línea: Una columna de intercambio iónico SP-PEEK CXC, 4.6 × 50 mm (Waters) con fase sólida formada por partículas de 7 μm . La columna estaba conectada al puerto 5 de la válvula arriba mencionada. El líquido eluido de esta columna se pasó directamente a una trampa de desalado Atlantis C18, 4.6 × 2.1 mm (Waters); la cual estaba conectada al puerto 1, en su extremo de entrada y al puerto 4 en el extremo de salida. El puerto 3 fue conectado a una línea para desechos. El flujo fue enviado en forma alterna a la línea para desechos, para eliminar las sales, o hacia la siguiente columna— de fase reversa—, moviendo las posiciones de la válvula.

Para la elución utilizando la técnica de intercambio iónico se usaron tres concentraciones de NaCl (Sigma-Aldrich): 100, 250 y 500 mM, en forma isocrática, con flujo de 0.4 mL/min.

Después de cada separación isocrática se lavó la trampa de desalado haciendo pasar una solución de ácido fórmico al 0.1% y un gradiente lineal de 0-40% de acetonitrilo (Tedia, Fairfield, OH, USA) con flujo de 0.2 mL/min, por 2 min.

La separación en fase reversa se realizó con una columna BioSuite C-18, PA-B, 2.1 × 250 mm, 3.0 μM (Waters) conectada en línea a la válvula de 6 puertos. Para realizar la cromatografía en fase reversa se aplicó un gradiente lineal de una solución de ácido fórmico con una concentración inicial de 0.1% y un gradiente de concentración



de acetonitrilo de 0-60%. La corrida tuvo una duración de 220 min, con un flujo de 0.150 mL/min y 50°C en la columna.

Condiciones de detección. Se usó un espectrómetro de masas ortogonal cuadrupolo-tiempo de vuelo modelo Q-TOF micro, configurado con una interfase *electrospray* y el sistema de calibración interna continua *lockspray* controlado por el software MassLynx, versión 4.1.

Las condiciones de detección fueron las siguientes:

1. Modo de adquisición: *Direct data analysis*(DDA)
2. Rango de masas para experimento MS: 200-2000 m/z
3. Rango de masas para experimento MS/MS: 100-1700 m/z
4. Formato de adquisición: Continuo
5. Temperatura de la fuente: 150°C
6. Temperatura de solvatación: 350°C
7. Flujo de nitrógeno en cono: 50L/h
8. Voltaje del capilar: 3500 V
9. Voltaje de cono de muestra: 35 V
10. Voltaje del cono de extracción: 2.0 V
11. LockSpray flujo: 5 μ L/min
12. Frecuencia: 10 seg
13. Voltajes del detector Microplate: 2700 V
14. Resolución: > 5,000

El espectrómetro fue calibrado con una solución de 100 fmol/ μ L de [Glu-1] fibrinopéptido B. Esta misma solución fue usada para el proceso de calibración continua con el sistema *lockspray*.

Diariamente se realizó una verificación de la sensibilidad y la resolución del instrumento con un estándar de leucina-encefalina, a una concentración de 2 ng/ μ L. Dicha solución fue preparada con una mezcla de 50/50 metanol/agua + 1% de ácido fórmico.



6.2.11 Secuenciación e identificación de las proteínas de C₁-H37 Rv y C₁-CIBIN/UMF-099 con y sin SIRE

Todo el proceso de bioinformática fue realizado con la ayuda del software de acceso libre *Trans-Proteomic-PipeLine* (v.4.1, revisión 0, Build 200908071234 [min GW])(TPP), del *Institute for Biological system, Seattle Proteome Center* y el *NHLBI proteomics*, instalado en una estación de trabajo HP, con procesador *Intel Pentium 4, 3.6 GHz, Windows XP, Service Pack 3*.

La información MS y MS/MS adquirida por el software MassLynx fue exportada en formato .RAW, posteriormente fue convertida a formato .mzXML por medio del software MassWolf, Ver. 4.3.1. En el software TPP se usó el motor de búsqueda *X-Tandem* para la asignación de las secuencias de péptidos usando los siguientes parámetros:

1. Toleración de péptidos: 1.0 Da
2. Tolerancia de fragmentos: 0.5Da
3. Rango de masas: 100 a 200,000 Da
4. Modificaciones fijas: Carbamidometil en C
5. Modificaciones variables: oxidación de metionina
6. Digestión con tripsina

Primera validación de los resultados. Posterior a este procesamiento cada secuencia asignada fue validada por medio de algoritmo *PeptideProphet* y aceptada para su posterior uso o rechazada si la asignación era dudosa.

Cabe señalar que X-tandem usó una base de datos denominada *MTB*, la cual fue obtenida de la base de datos Uniros, dicha base de datos se usó en formato FASTA. Dicha base de datos contenía 8,022 secuencias de *M. tuberculosis* H37Rv.



Segunda validación de los datos. Los péptidos validados por PeptideProphet fueron alineados con las proteínas de la base de datos y dichas inferencias fueron validadas por el algoritmo ProteinProphet, pero solo aquellas con valores de confiabilidad mayor al 90% fueron consideradas para el estudio cuantitativo.

6.2.12. Comparación de las proteínas de C₁-H37 RV y C₁CIBIN/UMF15-099 con y sin SIRE

Los proteomas de C₁-H37 RV y C₁-CIBIN/UMF15-099 en ausencia y en presencia de SIRE, y validados como se explicó en los párrafos anteriores, se compararon entre sí para identificar las proteínas exclusivas de cada uno, y las que se expresaron tanto por C₁-H37 RV, o por C₁-CIBIN/UMF-099 con SIRE, sin SIRE o por una combinación de dos de estas condiciones. Para ello se construyó un diagrama de Venn, empleando el software ProteoIQ de Bioinquired (NuSep, Atlanta, USA).

6.2.13. Alineamiento *in silico* de proteínas.

Esta información fue obtenida empleando el método denominado *Label Free Quantitation*, con la ayuda del software ProteoIQ. Con ello se realizó el alineamiento y normalización de espectros a partir de los valores obtenidos por el algoritmo *Total Spectral Counts* para cada grupo y réplica. Para realizar este procedimiento se analizaron tres muestras y se hicieron tres réplicas de cada una.

6.2.14. Criterios de selección de proteínas expresadas por las clonas

Las proteínas expresadas tanto por C₁CIBIN/UMF-099 como por C₁H37Rv en ausencia de SIRE fueron seleccionadas para determinar su perfil de expresión diferencial ya que las diferencias de la



comparación cualitativa permitió definir un grupo de interés, para la cual se tomaron en cuenta algunos criterios, tales como medida de corte— para definir la sobre-expresión de alguna proteína— el valor Log_2 relativo $\text{SD}=1.5$ — y para definir su subexpresión— valores >0.5 .

La confiabilidad de las proteínas fue mayor o igual al 99% expresado como la probabilidad de asignación.

6.2.15. Identificación de interacciones proteína-proteína.

Las proteínas definidas como de interés prioritario resultantes de las comparaciones cualitativas fueron analizadas con el software *String* (<http://string-db.org/>) y *Cytoscape* (<http://www.cytoscape.org/>) para conocer las redes de interacciones directas entre las proteínas seleccionadas y otras proteínas ya caracterizadas como integrantes del proteoma de *MTB*.



CAPÍTULO VII

RESULTADOS

7.1 AISLAMIENTO DE LAS CLONAS

Se obtuvieron tres clonas a partir de la cepa de H37Rv (ATCC 27294): C₁-H37 Rv, C₂ H37 Rv y C₃ H37 Rv. Todas tenían el fenotipo de sensibilidad a los cinco fármacos de primera línea (SIREP). Sin embargo, debido al volumen de trabajo que implicaba el presente estudio, al tiempo requerido para completarlo y a los altos costos del mismo se decidió trabajar solamente con una clona. Para ello se seleccionó la que mostró el mejor crecimiento, en términos de producción de biomasa y de tiempo de duplicación (datos no presentados). Esta clona fue C₁-H37 Rv. Además, se aislaron tres clonas a partir del aislado clínico CIBIN/UMF15-099: C₁CIBIN/UMF15-099, C₂CIBIN/UMF15-099 y C₃CIBIN/UMF15-099. Todas éstas tenían el fenotipo de resistencia a los cinco fármacos de primera línea (SIREP). Sin embargo, debido a las razones expuestas en el párrafo anterior, también se decidió trabajar solamente con una clona. Para ello se seleccionó a la que mostró el mejor crecimiento, bajo los mismos criterios que en el caso anterior. Esta clona fue C₁CIBIN/UMF15-099.

7.2 CURVAS DE CRECIMIENTO

Las curvas de crecimiento de C₁-H37 Rv, en presencia y en ausencia de SIRE se muestran en la Fig. 7 (pág.46).

En presencia de SIRE se observó un ligero incremento en la A₆₀₀ entre el 4° y el 10° día y en el día 26°, pero el resto del tiempo las lecturas de A₆₀₀ permanecieron en la basal (≈ 0.1). En contraste, en ausencia de SIRE se observó un incremento sistemático de la A₆₀₀ desde el día 0 hasta el día 18°. A partir de entonces se presentó una súbita fase de lisis.

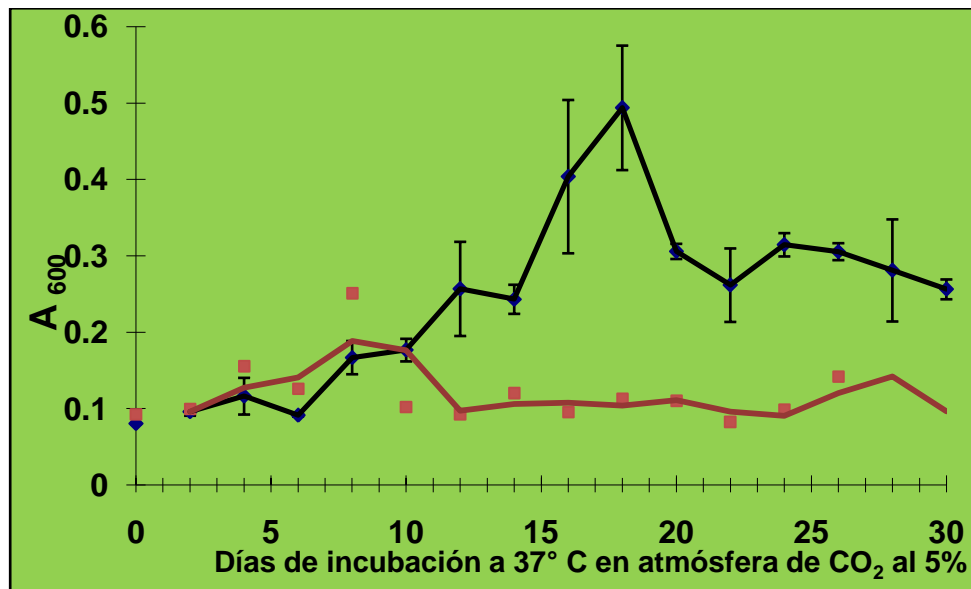


Figura 7 Curva del crecimiento de C₁-H37Rv en medio líquido Middlebrook enriquecido con 10% de OADC en presencia (línea roja con cuadrados) y en ausencia de SIRE (línea negra con círculos llenos). Obsérvese que el crecimiento de esta clona fue bueno en ausencia de la mezcla de compuesto anti-*MTB*. En contraste con el nulo crecimiento en presencia de SIRE.

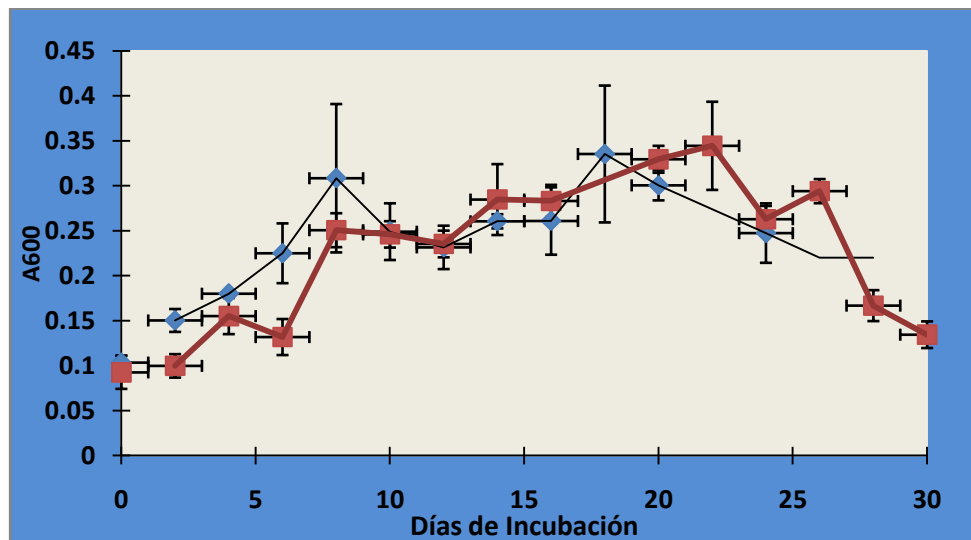


Figura 8. Curvas de crecimiento de C₁-CIBIN/UMF15-099 en presencia (línea negra con círculos azules) y ausencia (línea roja con cuadrados rojos) de SIRE. C₁-CIBIN/UMF15-099 se cultivó en medio de Middlebrook 7H9, enriquecido con 10% de OADC. Esta clona creció bien en presencia o en ausencia de SIRE.



La Fig. 8 (pág. 46) muestra el comportamiento de los cultivos de C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia y en ausencia de SIRE. En presencia de esta mezcla de compuestos anti-*M tuberculosis*.

Los perfiles de crecimiento de esta clona no mostraron una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los rendimientos máximos (a los 16 d) en presencia o ausencia de SIRE.

7.3. CORRELACIÓN ENTRE A_{600} Y DENSIDAD

En las Figs. 9 (pág 47) y 10 (pág. 48) puede apreciarse una excelente correlación lineal ($r^2 > 0.99$ y > 0.97 , respectivamente) entre las mediciones de A_{600} y el número de microorganismos, tanto en C₁H₃₇RV como en C₁CIBIN/UMF15-099, cultivadas bajo condiciones comparables, en ausencia de SIRE.

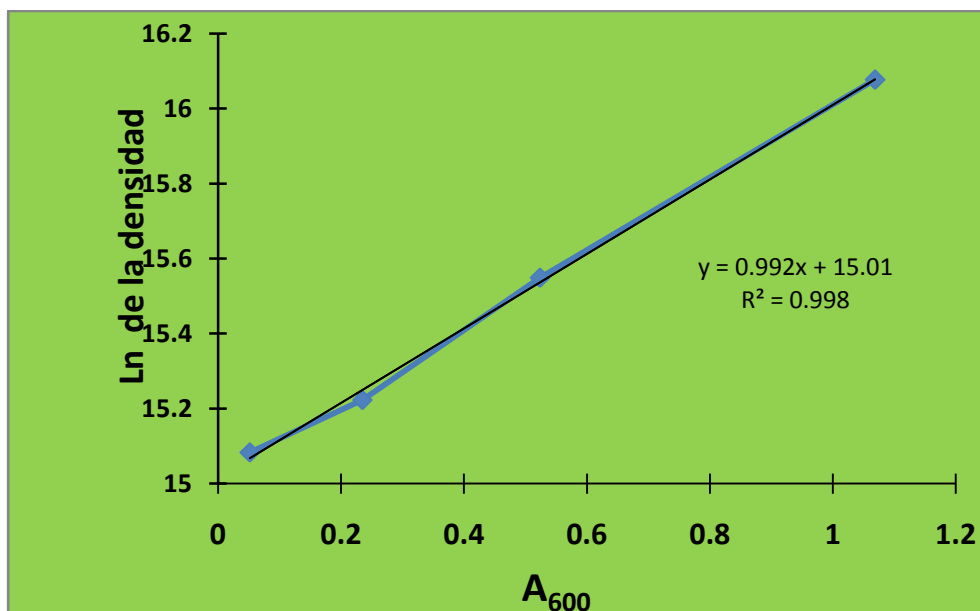


Figura 9 Relación lineal del Ln del número de micobacterias y la A_{600} durante el crecimiento exponencial de C₁H₃₇ RV.

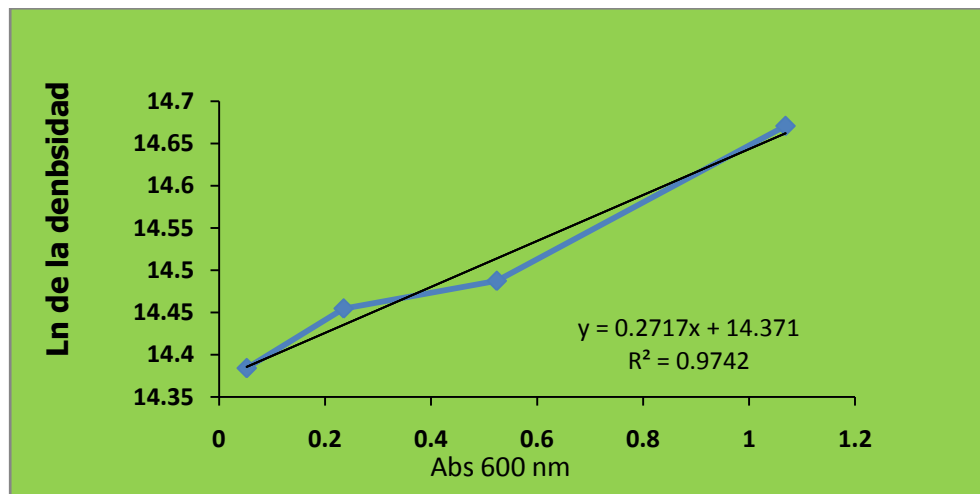


Figura 10 Relación lineal del Ln del número de micobacterias y la A_{600} durante el crecimiento exponencial de C₁CIBIN/UMF15:099.

El cálculo del cociente de ambas pendientes mostró un crecimiento 3.7 veces mayor de la clona C₁H37Rv en relación al de C₁-CIBIN/UMF15:099.

La Fig. 11 (pag. 49) muestra el nulo crecimiento de C₁H37 RV y C₁CIBIN/UMF15-099 después de haber sido inactivados en autoclave e incubados por 30 días en medio de Lowenstein-Jensen.

7.5. INTEGRIDAD DE LAS MICOBACTERIAS INACTIVADAS

La Fig. 12 (Pág. 49) muestra el aspecto microscópico de las micobacterias inactivadas en autoclave preparadas para su observación con un microscopio en un frotis teñido con la técnica de Zhiel-Neelsen. Puede observarse que después del tratamiento con calor los microorganismos no perdieron ni su forma ni su integridad, al menos en forma aparente.

Los bacilos de C₁CIBIN/UMF15-099, en presencia o en ausencia de SIRE, eran más cortos que los de C₁H37Rv.

7.4. ESTERILIDAD DE LOS CULTIVOS.

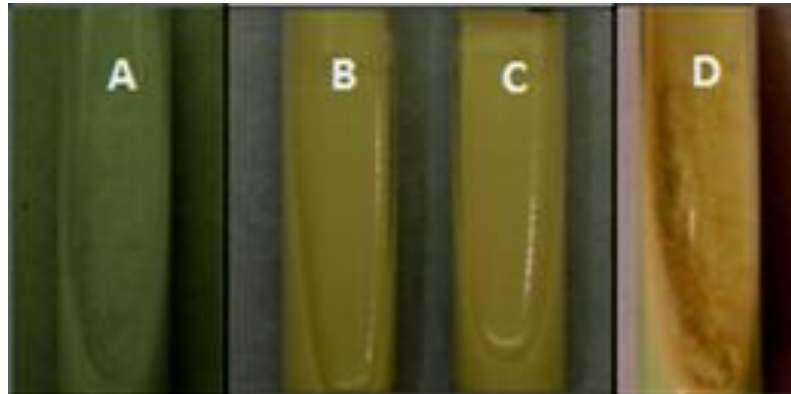


Figura 11. Nulo crecimiento de C_1H37Rv y $C_1CIBIN/UMF15-099$ en medio de Löwenstein-Jensen después de haber sido inactivados los cultivos en autoclave e incubados a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5% por 30 d. Las fotografías corresponden a $C_1CIBIN/UMF15-099$ sin esterilizar (A) e inactivada en autoclave (B) y a C_1H37Rv inactivada (C) y sin inactivar (D) Obsérvese la ausencia de colonias en B y C y el crecimiento vigoroso de éstas en A y D.

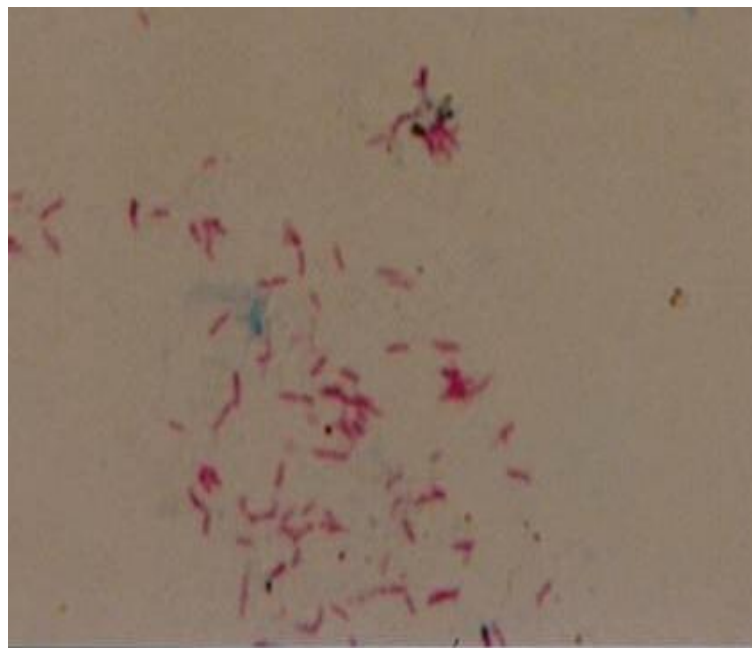


Figura 12. Aspecto de un frotis después de haber inactivado un cultivo de C_1H37RV en autoclave y teñido con la técnica de Zhiel-Neelsen. Obsérvese que la micobacterias no perdieron ni su aspecto característico de bacilos curvos ni su resistencia a la decoloración con ácido y alcohol.



7.6. RENDIMIENTOS DE LOS CULTIVOS

Los cultivos masivos de C₁H37 RV y de C₁CIBIN/UMF15-099 produjeron 24.8 mg y 7.7 mg de biomasa (peso húmedo), respectivamente. Los rendimientos de C₁CIBIN/UMF15-099 fueron los mismos tanto en presencia como en ausencia de SIRE. Estos datos muestran que los rendimientos de C₁H37 RV fueron 3.7 veces mayores que los de C₁ CIBIN/UMF15-099, en presencia o en ausencia de SIRE.

7.7. INTEGRIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE INTERÉS

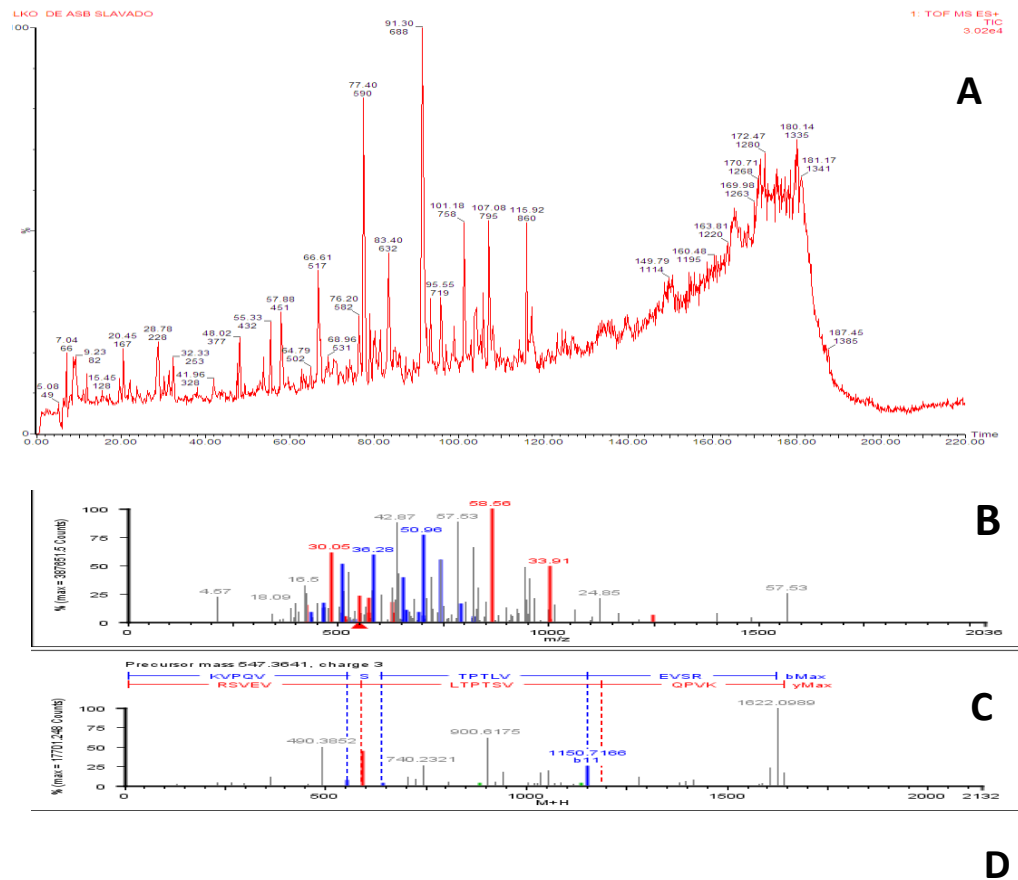
El análisis de seroalbúmina bovina (SAB) produjo un cromatograma compuesto por 31 picos y una serie de datos reportados por el software relativos a la investigación *in silico* que confirmaron que la muestra correspondía a SAB con un 100% de confiabilidad (Fig. 13, pág. 51).

7.8. CURVA ESTÁNDAR DE SAB

Se construyó una curva de calibración para cuantificar los rendimientos de proteínas de los cultivos masivos de las clonas de interés. En la Fig. 14 (pág. 52) puede observarse que esta curva tenía una excelente correlación con la recta, con una r^2 prácticamente de 1.0. Con esta curva se calcularon por interpolación los contenidos de proteínas que se obtuvieron de los cultivos masivos de C₁H37 RV y C₁ CIBIN/UMF15-099

7.9. RENDIMIENTO DE PROTEÍNAS

Se obtuvieron 6.2 mg por g (peso húmedo) de pastilla de micobacterias, tanto de los cultivos masivos de C₁H37 RV como de C₁ CIBIN/UMF15-099. En el caso de C₁ CIBIN/UMF15-099, sin importar si se cultivó o no en presencia de SIRE.



Accession	Entry	Description	mW (Da)	pI (pH)	Score	Probability (%)	Peptides	Coverage (%)	Mean Error	RMS Error	Missed Cleavages (%)
P02769	ALBU_BOVIN	Serum albumin	69248	5.75	11.55	100	39	46.29	208.39	260.49	43

Figura 13. Identificación de albúmina sérica bovina sometida al proceso de esterilización en autoclave. El recuadro A muestra el cromatograma obtenido con el sistema CLAR-espectrómetro de masas. El recuadro B es una gráfica de las relaciones m/z. C representa a los péptidos de SAB y muestra una gráfica de su fragmentación; y D contiene la información sobre el procesamiento

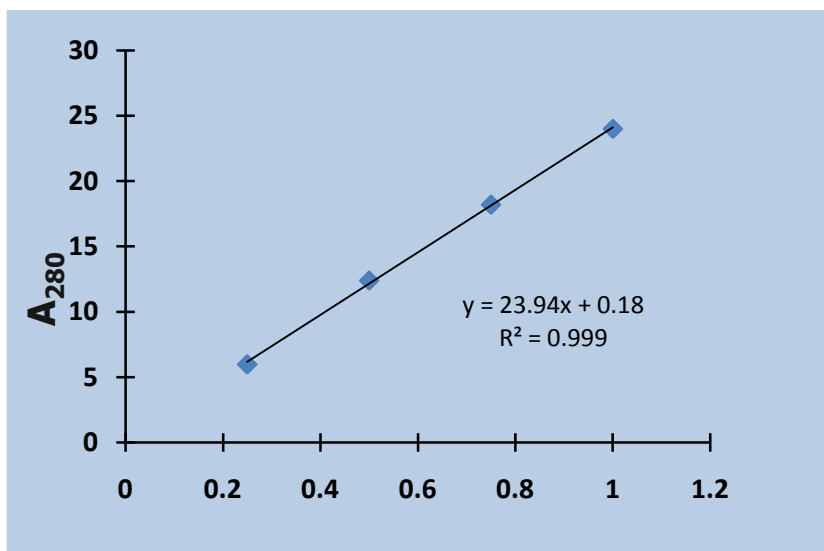


Figura 14. Curva de calibración de SAB.

7.10. OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN

Se realizaron una serie de experimentos para desarrollar el mejor procedimiento para realizar la cromatografía de las proteínas de interés, mediante intercambio iónico, desalado y fase reversa. Estos procesos y los software para validación permitieron generar la mejor resolución posible, una sensibilidad adecuada; además de garantizar la calidad de los datos. El Cuadro 3 (Pág. 53) muestra las condiciones encontradas y estandarizadas para realizar los experimentos de proteómica con las proteínas de C₁H37 Rv y C₁CIBIN/UMF-099.

Cromatografía de blancos. La Fig. 15 (Pág. 54) corresponde a un cromatograma del disolvente utilizado para realizar la cromatografía de fase reversa (última columna del arreglo lineal) de las proteínas de las micobacterias. El sistema automáticamente descartó las señales correspondientes a esta fase móvil por no corresponder al peso exacto de ningún amino ácido.



Cuadro 3. Condiciones de cromatografía en el sistema CLAR/Espectrómetro de masas y validación de los datos

Preparación de la muestra	Separación cromatográfica	Condiciones de Detección por MS-MS/MS	Condiciones de Procesamiento TPP
Digestión con Tripsina de 100µg de proteína 100mM de NH ₄ HCO ₃	Gradiente lineal agua 0.1 % AF, 100%/ACN 40% duración 220min. Flujo: 0.150 ml/min. Temp. Col: 50 °C Vol. Inyección: 80µL Col:CXC, PEEK, 4.6 x 50mm, 7µ Col: BioSuite PA-B, 2.1 x250 mm, 3.5 µm. Trampa de desalado: Atlantis C18, 4.6 x 2.1 mm, 5 micras.	Modo de adquisición: DDA Rango de masas MS: 200-2000 MS/MS: 100-1700 Temp. Fuente: 150 Temp. Desolv: 350 Nitrogeno: Desolv: 500l/h Cono: 50 L/h Voltajes: Capilar: 3500 V Cono muestra: 35 V Cono extracción: 2V MCP: 2700Volts	Tolerancia para péptidos: 1Da Fragmentos: 0.5Da PM: rango:1000-200,000 BD: Uniprot MTB , H37Rv Formato FASTA X-tandem Validación: Peptide prophet* Protein prophet*

*Software utilizado para validar los datos

La Fig. 16 (página 55) muestra el cromatograma de la tripsina que se utilizó para digerir las proteínas obtenidas de los cultivos masivos de C1H37 RV y C1CIBIN/UMF-099. Pueden observarse los picos característicos de esta enzima, que el sistema pudo reconocer adecuadamente, distinguirlos de las proteínas de MTB e identificar inequívocamente a esta proteína como tripsina, de la misma manera que se hizo con SAB (Fig. 18).

7.11. CROMATOGRAFÍA E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Estándares. La Fig. 17 (pág. 56) contiene un cromatograma de hemoglobina humana, como muestra de la identificación de las prote

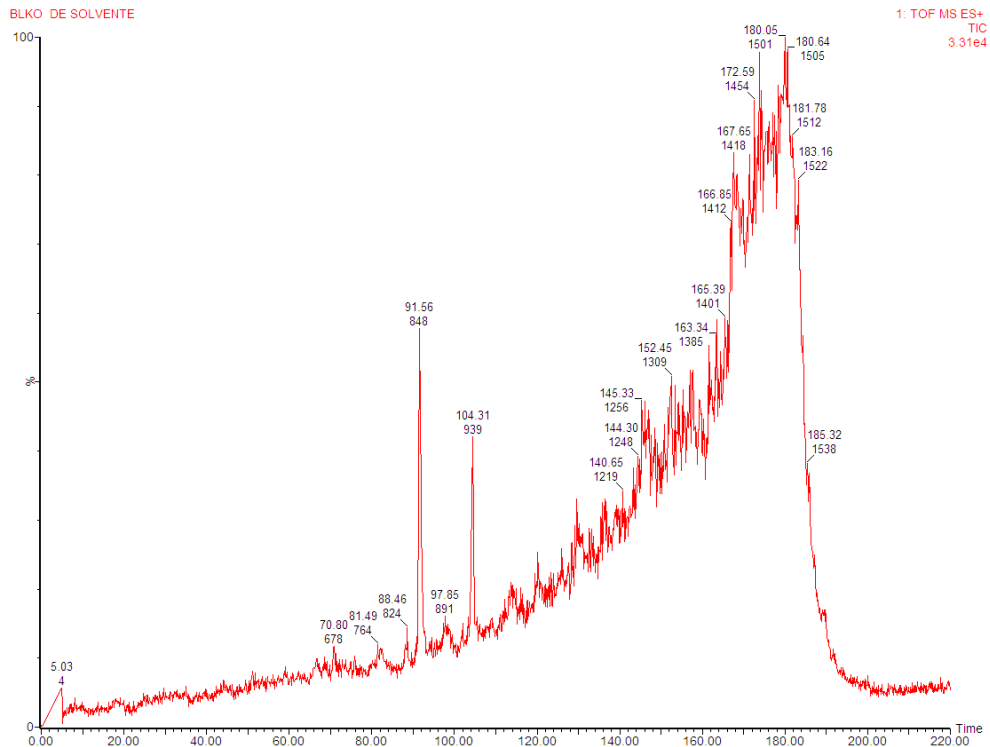
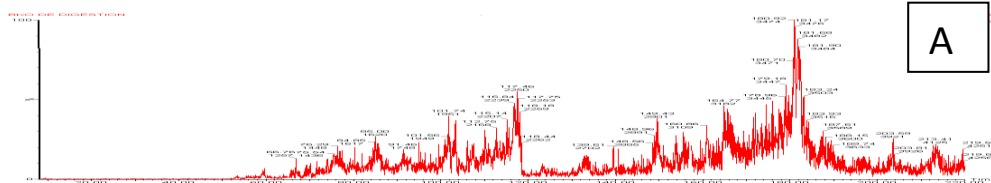


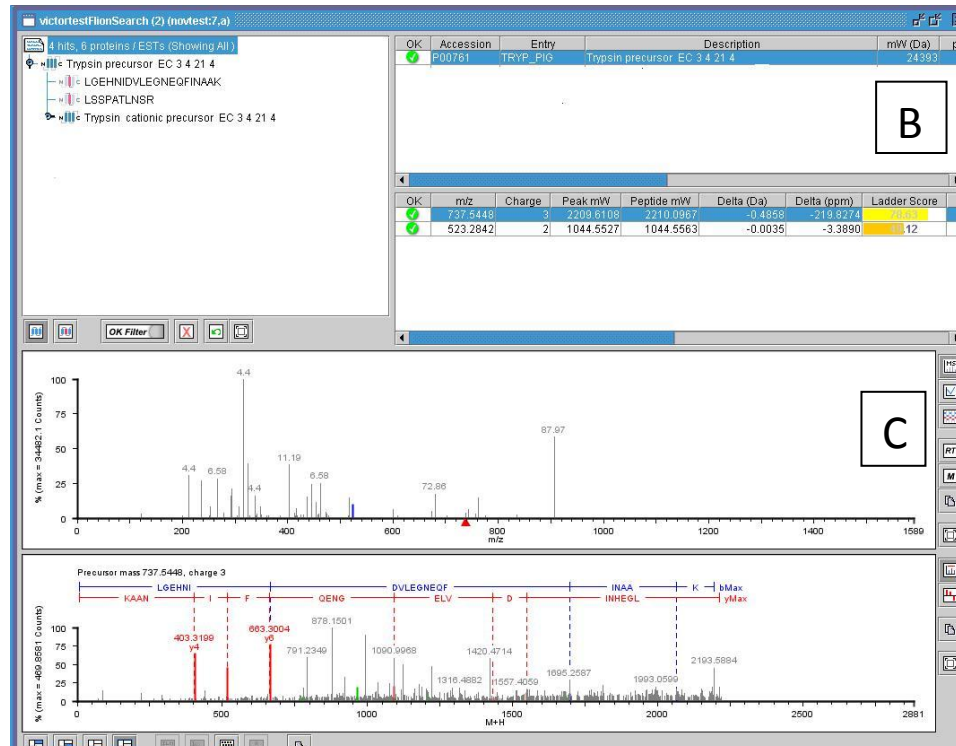
Figura. 15. Cromatograma de la fase móvil utilizada en la columna de fase reversa del sistema CLAR/Espectrómetro de masas. El eje horizontal muestra una escala del tiempo de retención (en min) y el vertical (de la Y) es una escala del % de intensidad. Estos picos fueron descartados automáticamente por el software del sistema debido a que ninguno de ellos correspondía al peso exacto de ningún aminoácido

teínas que constituían la mezcla adquirida comercialmente, que son bien conocidas y que además sus secuencias completas están depositadas en el banco SwissProt. Dos de ellas (SAB y tripsina) habían sido utilizadas previamente para los experimentos arriba descritos. Las otras proteínas fueron hemoglobina humana y mioglobina de corazón de caballo. Cada una de estas proteínas fue identificada con precisión por el sistema cromatográfico e informático utilizado. Lo que indica la confiabilidad del sistema.

Reproducibilidad de los resultados cromatográficos. La Fig. 18 (pág. 57) muestra dos cromatogramas de la mezcla de proteínas comer-



A

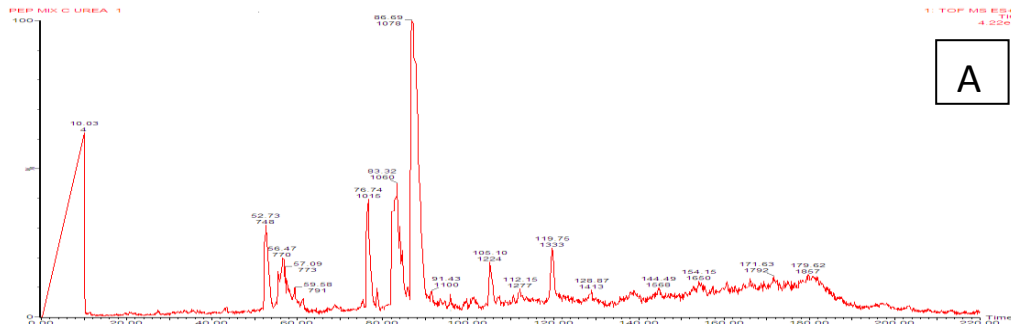


B

C

Figura 16. Cromatograma de la tripsina disuelta e incubada bajo las mismas condiciones utilizadas para digerir las proteínas de las micobacterias, antes de someterlas al análisis cromatográfico con el sistema CLAR/Espectrómetro de masas (A). El eje horizontal muestra una escala del tiempo de retención (en min) y el vertical (de las Y) es una escala del % de intensidad.

ciales usadas como estándar, descrita en el párrafo anterior. Estos cromatogramas fueron obtenidos con el sistema CLAR/ Espectrómetro de masas con dos muestras preparadas independientemente con las mismas proteínas ya mencionadas. Los principales picos de ambos cromatogramas se superponen perfectamente, lo que denota la reproducibilidad del sistema.



Cromatograma hemoglobina, junto con mioglobina de corazón de caballo, tripsina y SAB por el sistema CLAR/espectrómetro de masas. El eje horizontal

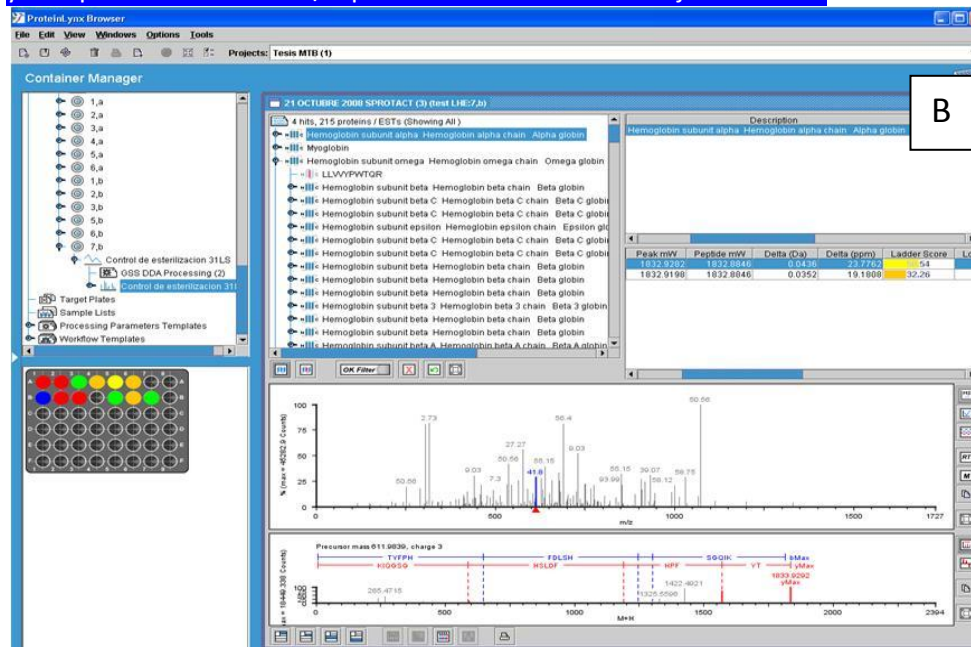


Figura 17. Se muestra una escala del tiempo de retención (en min) y el vertical (de la Y) es una escala del % de intensidad. (B) Identificación de hemoglobina humana, como ejemplo de la información proporcionada por el software del instrumento asociado a SwissProt Bank.

7.12. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE INTERÉS

La Figs. 19 (pág. 57) y 20 y 21 (pág. 58) muestran los cromatogramas típicos de las proteínas expresadas por C₁H37 RV y por C₁CIBIN/UMF-099 en ausencia y presencia de SIRE, respectivamen-

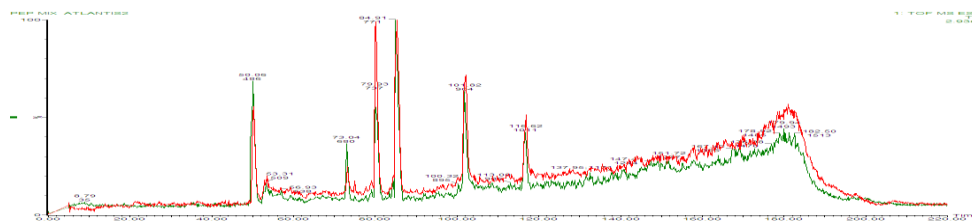


Figura 18. Reproducibilidad de los resultados obtenidos con el sistema CLAR/espectrómetro de masas. El eje horizontal muestra una escala del tiempo de retención (en min) y el vertical (de la Y) es una escala del % de intensidad. Los picos principales (correspondientes a los péptidos de interés) se superponen perfectamente.

te. En total se identificaron 544 proteínas H37 RV y de C₁CIBIN/UMF-099 537 y 541 en ausencia y presencia de SIRE, respectivamente.

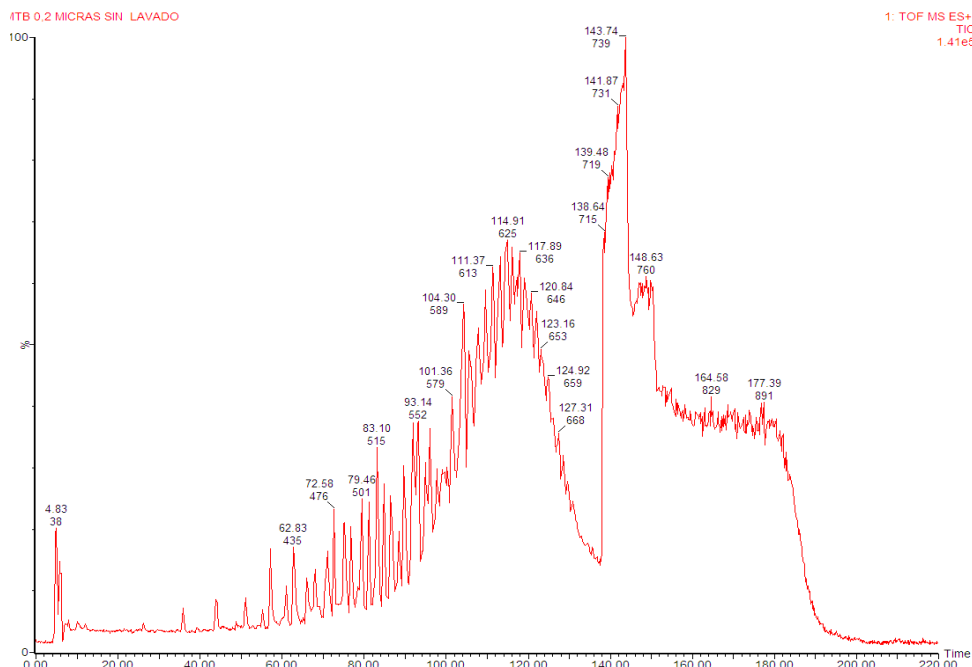


Figura 19. Cromatograma de los péptidos correspondientes a las proteínas obtenidas de los cultivos masivos de C₁H37 RV en ausencia de SIRE. El eje horizontal muestra una escala del tiempo de retención (en min) y el vertical (de la Y) es una escala del % de intensidad.

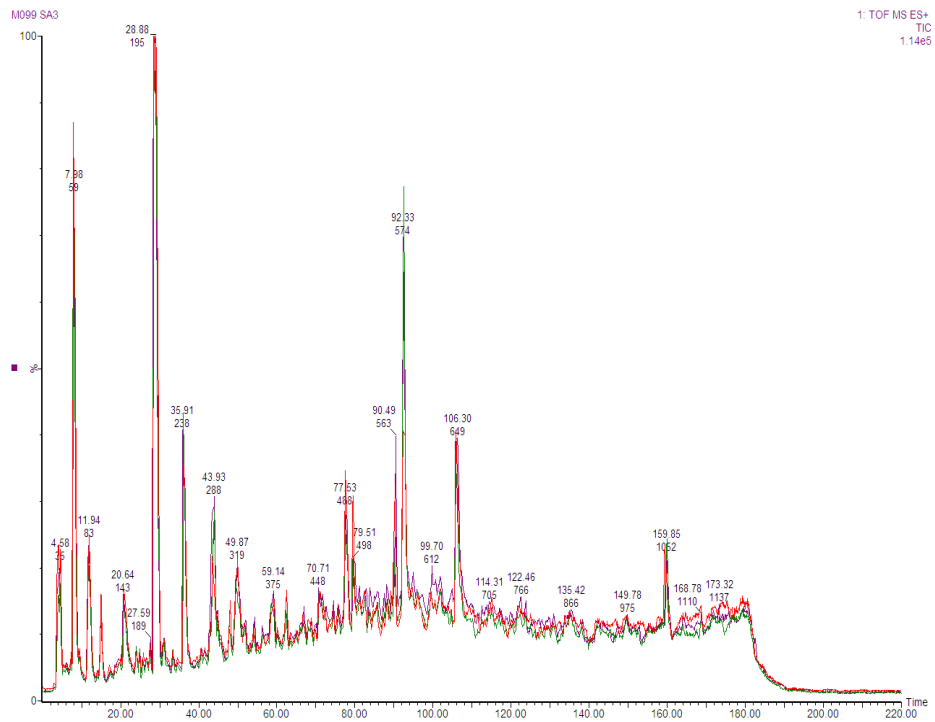


Fig. 20. Cromatogramas de las proteínas totales de *C1CIBIN/UMF15-099* cultivada en ausencia de SIRE.

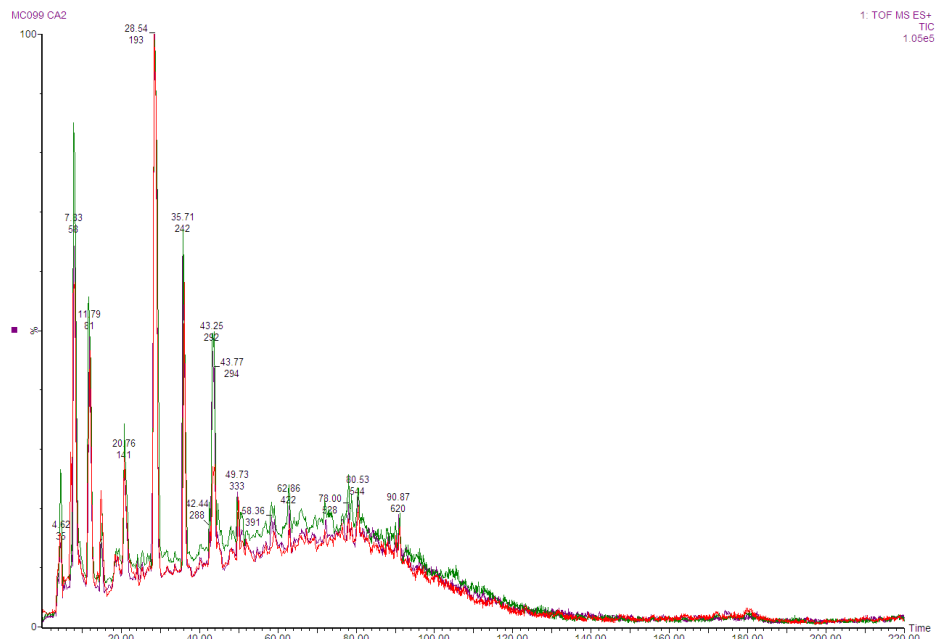


Figura 21. Cromatograma de los péptidos correspondientes a las proteínas de *C1CIBIN/UMF15-099* en presencia de SIRE.



7.13. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EXPRESADAS EXCLUSIVAMENTE POR CIBIN/UMF15-099.

Diagrama de VEEN. Para identificar las proteínas de nuestro interés y principal objetivo de este trabajo, incluimos en el siguiente análisis aquellas proteínas expresadas exclusivamente por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE, y en ausencia de esta mezcla de antibióticos y las comparamos entre sí y con las expresadas por C₁H37 RV, las cuales fueron seleccionadas con los criterios mencionados arriba. Para realizar este análisis recurrimos a la ayuda de un software especializado y construimos un diagrama de Veen (Fig. 22, pág. 59). En el diagrama mencionado pueden observarse que en conjunto las clonas expresaron 125 proteínas, todas ellas fueron seleccionadas con uno de los criterios más estrictos: un índice de confiabilidad ≥ 0.9 . Lo cual indica que la alineación con la secuencia teórica o determinada, depositada en los bancos de datos es del 90% o mayor. Se observan tres campos de proteínas expresadas en forma exclusiva: 24.8 % (31/125) proteínas por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE, 19.2 % (24/125) proteínas por C₁CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE y 17.6% (22/125) por C₁H37 RV en ausencia de SIRE. El total de proteínas expresadas bajo el conjunto de estas tres condiciones fue de 61.6% (77/125). El resto de las proteínas se identificaron en campos correspondientes a una combinación de dos ó tres condiciones. Estas combinaciones fueron las siguientes: presentes en el proteoma de CIBIN/UMF15-099 en presencia o en ausencia de SIRE 3.2% (4/125), por C₁H37 RV en ausencia de SIRE y por CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE 11.2% (14/125) y por C₁H37 RV en ausencia de SIRE y C₁CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE 7.2% (9/125), y por

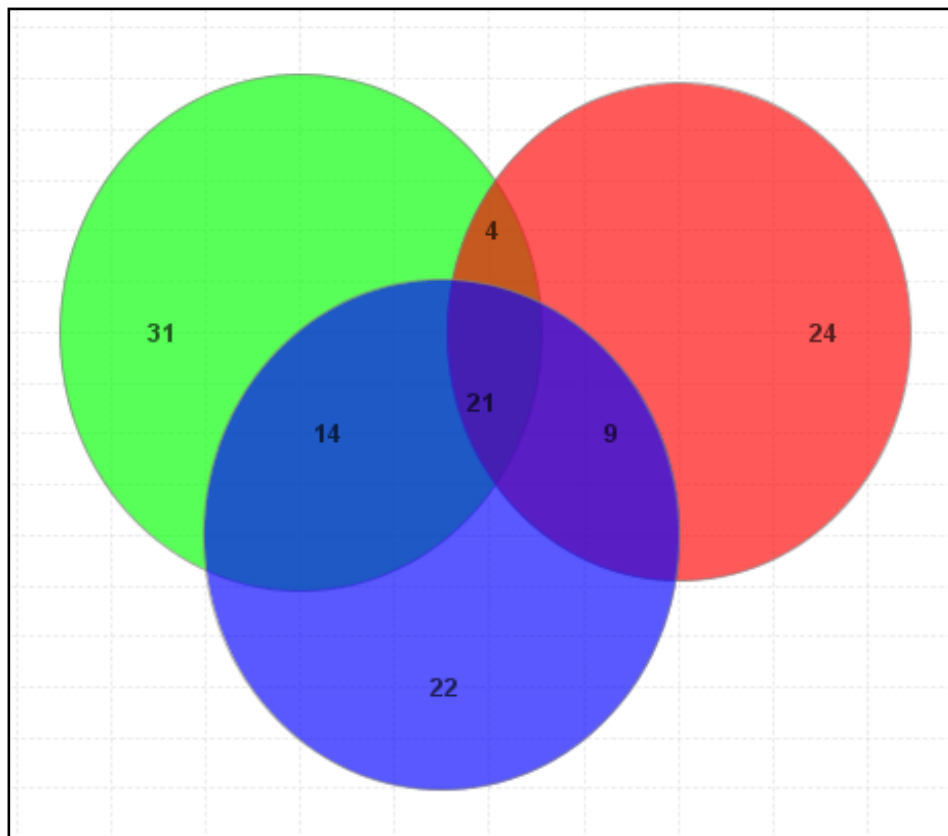


Figura 22. Diagrama de Veen. La figura muestra el total de las proteínas que tuvieron un índice de correlación ≥ 0.9 con las secuencias del banco de datos. Estas proteínas fueron expresadas por C₁CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE (círculo rojo), por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE (círculo verde) y por C₁H37 RV en ausencia de SIRE (círculo azul). Los números en los campos de intersección de estos círculos y en los campos no interseccionados corresponden al número de proteínas identificadas y pertenecientes a cada condición de interés.

C₁H37 RV en ausencia de SIRE, C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE y en el diagrama de Veen se observa una zona con 31 proteínas que corresponde a las proteínas expresadas exclusivamente por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE (24.8%), 4 proteínas expresadas por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia o ausencia de SIRE (3.2 %), 24 proteínas que corresponden a C₁CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE (19.2%), 14 proteínas coexpresadas por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE y por H37 RV en ausen-



cia de SIRE (11.2%), 21 proteínas expresadas por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia o en ausencia de SIRE y por H37 RV en ausencia de SIRE (16.8); nueve por C₁CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE y por H37 RV en ausencia de SIRE (7.2%), y 22 exclusivamente por H37 RV en ausencia de SIRE (17.6 %).

El total de proteínas expresadas por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia y en ausencia de SIRE fue de 70 y de 58, respectivamente. Es decir, en presencia de SIRE la misma clona C₁CIBIN/UMF15-099 expresó 12 proteínas más que en ausencia de la mezcla de antibióticos. Por otro lado, H37 RV expresó un total de 66 proteínas, 4 menos que C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE, pero ocho más que en ausencia de la mezcla anti-*MTB*.

Las proteínas de mayor interés son aquellas que expresó C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia o en ausencia de SIRE, en forma exclusiva o co-expresadas con C₁H37 RV (47.2%) del conjunto completo incluido en el diagrama de Veen.

7.14. PROTEÍNAS EXPRESADAS EXCLUSIVAMENTE POR C₁CIBIN/UMF 15-099 EN PRESENCIA DE SIRE

El cuadro 4 (págs. 62-64) muestra los atributos de las 31 proteínas que forman parte del proteoma de C₁CIBIN/UMF15-099. De 11 de ellas (35.5%) aún no se conoce ni su función ni su nombre (C4.1 a C4.11, zona blanca). De 10 proteínas ya se propuso una función (C4.12-C4.21) y de otras 10 ya se sugirió un nombre y una función (C4.22 a C4.31).

En la primera parte del Cuadro 3 (pág. 83) se incluyen 3 proteínas relacionadas con regulación de la transcripción (C4.12 a C4.14, amarillo); cuatro proteínas involucradas en síntesis de DNA (C4.15 a C4.18, zona azul), una ATPasa—que produce energía para una fun



Cuadro 4. Proteínas no identificadas, expresadas por CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE cuya existencia es putativa***

Número progresivo	Número de Registro	Longitud (aa)	Función (deducida electrónicamente)	Nombre del gen
C4.1	A2VP24	72	Desconocida	TBCG_03163
C4.2	A2VLX8	207	Desconocida	TBCG_02946
C4.3	A2VHM4	344	Desconocida	TBCG_01315
C4.4	A2VNB4	96	Desconocida	TBCG_00188
C4.5	A2VN00	133	Desconocida	TBCG_00065
C4.6	A2VNE8	226	Desconocida	TBCG_00227
C4.7	A2VN27	282	Desconocida	TBCG_00094
C4.8	A2VKZ7	479	Desconocida	TBCG_02590
C4.9	A4KE70	302	Desconocida	TBHG_00376
C4.10	A2VIC3	565	Desconocida	TBCG_01588
C4.11	A2VKK4	491	Desconocida	TBCG_02423
C4.12	A2VHD0	411	Regulación de la transcripción	TBCG_01212
C4.13	A2VN17	114	Regulación de la transcripción	TBCG_00082
C4.14	A2VF40	832	Regulación de la transcripción	TBCG_00334
C4.15	A2VMT9	187	Unión a ácidos nucleicos	TBCG_03847
C4.16	D5XPP0	631	Actividad de nucleósido-trifosfatasa	TBDG_01308
C4.17	A2VIS0	610	Actividad de nucleósido-trifosfatasa	TBCG_01753
C4.18	A2VNI3	397	DNA primasa	TBCG_00268
C4.19	A2VKF1	291	ATPasa	TBCG_02370
C4.20	A2VN16	152	Unión a FMN	TBCG_00081
C4.21	A2VFF6	146	Proteína integral de membrana prenil transferasa	TBCG_00462

cion desconocida—(C4.19; zona gris) una involucrada en oxidación reducción (C4.21, zona naranja) y una proteína involucrada en alquilación de proteínas de membrana (C4.20, zona salmón)

En la segunda parte del Cuadro 3 (pág. 84) aparecen dos proteínas relacionadas con replicación de DNA (zona azul), una proteína cha



Continúa cuadro4. Proteínas expresadas exclusivamente por C ₁ CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE cuyos nombres o función ya han sido propuestos.				
No. Progresivo	No. de registro	Longitud (aa)	Atributos	Nombre del gen
C4.22	A2VMU7	686	Nombre recomendado: DNA girasa, subunidad B. Pertenec a la Familia de las topoisomerasas Tipo II. Tiene dominio Toprim. Actividad: DNA topoisomerasa con actividad de ATPasa.	TBCG_00005
C4.23	A2VMZ4	874	Nombre propuesto: DNA helicasa replicativa dnaB	TBCG_00057
C4.24	A5U8S2	848	Nombre propuesto: Clp proteasa subunidad CLpC con unión a ATP Funciones: Unión a ATP, chaperona, hidrolasa y proteasa	clpC1
C4.25	A2VN38	1625	Nombre propuesto: ATPasa transportadora de cationes Ictpl Pertenece a la familia de ATPasas (tipo P). Es una proteína integral de membrana.	TBCG_00107
C4.26	A2VGU1	286	Nombre propuesto: Deoxyribonucleasa tatD (YjjV protein) Actividad: endodesoxiribonucleasa con producción de 5'fosfato monoésteres	TBCG_00997
C4.27	A2VNE0	403	Nombre propuesto: Esterase lipC	TBCG_00218
C4.28	A2VG19	787	Nombre propuesto: arilsulfatasa atsA (Aryl-sulfate sulfhidrolasa) Actividad: hidrolasa de ester sulfúrico	TBCG_00701

perona, con actividad de proteasa, relacionada con la conformación tridimensional o direccionamiento de proteínas neosintetizadas



Continúa cuadro4. Proteínas expresadas exclusivamente por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE cuyos nombres o función ya han sido propuestos.

No. Progresivo	No. de registro	Longitud (aa)	Atributos	Nombre del gen
C4.29	A4KE30	805	Nombre propuesto: reductasa Fe-S. Reductasa hipotética Función: Acarreadora de electrones	TBHG_00333
C4.30	A4KNI3	468	Nombre propuesto: Proteína perteneciente a la familia PE	TBHG_00159
C4.31	A5WIY9	906	Nombre propuesto: Proteína de la familia PE-PGRS	TBFG_10285

*Base de datos: UniProtKB/TrEMBL Disonible en línea:
<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=author%3a%22Zhang+X.L.%22&offset=50>
Consultado el 15 de Enero de 2011
** Se conoce la secuencia completa de los genes de esta tabla. Todos los genes y las proteínas putativas pertenecen a *MTB*, aunque las cepas pueden variar.

(C4.24, zona blanca), una ATPasa transportadora de cationes (C4.25, gris), una proteína relacionada con degradación de DNA (C4.26, zona rosa) y otra con hidrólisis de lípidos (C4.27, rojo), degradación de compuestos con ésteres ligados a azufre (C4.28, verde), una con transporte de electrones (C4.29, azul) y dos pertenecientes a la familia PE y PE-PGRS (C4.30 y C4.31, respectivamente; magenta).

Todas las proteínas se dedujeron de la secuencia de un marco de lectura abierta de *MTB*, pero aún no había evidencias de su existencia, hasta ahora.



7.15. PROTEÍNAS EXPRESADAS EXCLUSIVAMENTE POR CIBIN/UMF15-099 EN AUSENCIA DE SIRE

CIBIN/UMF15-099 expresó, en forma exclusiva, 24 proteínas que das en este trabajo (Cuadro 5, págs. 66 y 67). Diez de estas proteínas (41.7%) aparecen en la base de datos UniProtKb como proteínas no caracterizadas (C5.1 a C5.10). De cinco proteínas (20.8%) aún no se conoce su función (zona naranja), y de las otras cinco se dedujo su actividad *in silico*, considerando la similitud de su secuencia con proteínas bien caracterizadas de otras especies (C5.6 a C5.10). El resto de las proteínas (56%, 14/25) está parcialmente caracterizado, pero su existencia es hipotética, y se dedujo por la secuencia de sus genes y por la comparación con otras proteínas.

En este grupo de proteínas parcialmente caracterizadas se identificaron: una involucrada en regulación de la transcripción (C5.6, blanca), una en replicación (C5.7, café), una en transporte transmembranal (C5.8, salmón), una ATPasa citocida (C5.9) cuatro en metabolismo intermediario (C5.10 a C5.13, verde), una en remodelación de DNA (C5.14, azul), ocho en catabolismo (dos de metaloproteínas (amarillo, C5.15 a C5.22), una de la familia PPE (C5.23, gris) y una de la familia PE_PGRS, rojo) Todas las proteínas mencionadas pertenecen a la especie *MTB* y se conocen sus secuencias teóricas completas.

No. Progresivo	No.de registro	Longitud (aa)	Atributos	Nombre del gen
C5.1	A2VF32	220	Proteína no caracterizada	TBCG_00323
C5.2	A2VFT7	910	Proteína no caracterizada	TBCG_00608
C5.3	A2VF71	251	Proteína no caracterizada	TBCG_00367
C5.4	A2VGV4	163	Proteína no caracterizada	TBCG_01012



Continúa Cuadro 5. Proteínas expresadas exclusivamente por CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE				
C5.5	A2VF60	275	Proteína no caracterizada	TBCG_00356
C5.6	A4KLM1	382	Proteína no caracterizada Función putativa: regulación de la transcripción	TBHG_03263
C5.7	A2VHT3	658	Proteína Primosomal N priA (Factor Y de la replicación)	TBCG_01380
C5.8	A2VF94	958	Transporte transmembranal Proteína mmpL1	TBCG_00394
C5.9	A2VF65	197	Enlace con ATP. Citocida	TBCG_00361
C5.10	A2VPG8	536	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa dxs2	TBCG_03323
C5.11	A2VG80	472	Adenosuccinato liasa purB	TBCG_00768
C5.12	A2VLX6	394	Lipoproteína lppZ	TBCG_02944
C5.13	A2VLU2	1127	Piruvato carboxilasa pca Involucrada en gliconeogénesis	TBCG_02906
C5.14	A5U013	1094	Exodeoxyribonuclease V sub-unit beta	recB
C5.15	A4KHB9	528	L-aspartato oxidasa nadB	TBHG_01556
C5.16	A2VMZ8	380	Celulasa celA1 Actividad de compuestos O-glicosil	TBCG_00061
C5.17	A2VHL9	737	Glucanasa glgE. Actividad catalítica	TBCG_01309
C5.18	A2VH14	291	Actividad de hidrolasa. Actúa sobre enlaces carbón-nitrógeno de muchos compuestos, pero no sobre enlaces peptídicos.	TBCG_01082
C5.19	A2VGP5	332	Actividad de metaloendopeptidasa	TBCG_00941
C5.20	A2VNC2	663	Actividad de metalopeptidasa	TBCG_00196
C5.21	A2VFP1	241	Función putativa: Actividad de metil transferasa	TBCG_00555



Continúa Cuadro 5. Proteínas expresadas exclusivamente por CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE				
No. Progresivo	No.de registro	Longitud (aa)	Atributos	Nombre del gen
C5.22	A2VFU2	363	Galactoquinasa galK Actividad catalítica: ATP + D-galactosa = ADP + alfa-D-galactosa 1-fosfato	TBCG_00614
C5.23	D5Y8T4	1184	Proteína de la familia PPE	TBEG_02489
C5.24	Q8VKA5	476	Proteína de la familia PE_PGRS	MT1008

7.16. PROTEÍNAS EXPRESADAS EXCLUSIVAMENTE POR CIBIN/UMF15-099 CON Y SIN SIRE

Se detectaron cuatro proteínas que expresó C₁CIBIN/UMF19-099 en presencia o en ausencia de SIRE (Cuadro 6): una no caracterizada (C6.1, zona blanca), una perteneciente al sistema UvABC, involucrado en reparación de DNA (C6.2, zona azul) y dos a la familia PE-PGRS (C6.3 y C6.4, amarilla).

Cuadro 6. Proteínas expresadas exclusivamente por CIBIN/UMF15-099 en ausencia o en presencia de SIRE				
No. Progresivo	No. de registro	Longitud (aa)	Atributos	Nombre del gen
C6.1	A2VMW1	521	Proteína putativa no identificada	TBCG_00020
C6.2	A5U2Y9	698	Sistema UVr, proteína B	uvrB
C6.3	A2VJ92	558	Proteína de la familia PE-PGRS	TBCG_01932
C6.4	A4KF64	84 (Fragmento)	Proteína de la familia PE-PGRS	TBHG_00740



7.17. PROTEÍNAS EXPRESADAS POR C₁H37 RV CON SIRE Y POR C₁CIBIN/UMF15-099 SIN SIRE

El Cuadro 7 (pág. 68) muestra los nombres o las actividades de las 14 proteínas expresadas tanto por C₁H37 RV en ausencia de SIRE como por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE.

Cuadro 7. Proteínas expresadas por H37 RV en ausencia de SIRE y por CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE				
No. progresivo	No. de registro	Longitud (aa)	Atributos	Nombre del gen
C7.1	A5TY97	448	No identificada	MRA_0029
C7.2	A2VIB0	484	Proteína de membrana conservada	TBCG_01573
C7.3	A2VFC3	728	Pertenece a la familia de AAA ATPasas	TBCG_00427
C7.4	A2VGC3	389	Nombre recomendado: tRNA-dihidrouridina sintasa	TBCG_00813
C7.6	A2VFJ6	568	Uroporfirina-III C-metil transferasa hemD	TBCG_00505
C7.7	A2VNH0	494	Sintasa del ácido cobirico. CobQ	TBCG_00254
C7.8	A2VJS9	603	Ligasa de CoA-ácidos grasos de cadena larga fadD15	TBCG_02134
C7.9	A2VF97	336	Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa dependiente de F420 fgd1	TBCG_00399
C7.10	A2VMU2	116	Componente de la Ribonucleasa P	rnpA
C7.11	A2VMV9	514	Serina/treonina fosfatasa ppp	TBCG_00018
C7.12	A4KH97	247	Fumarato reductasa [subunidad hierro-azufre] frdB	TBHG_01532
C7.13	Q7D9L6	1306	Proteína de la familia PE_PGRS	MT0607
C7.14	A4KLZ3	132	Proteína fágica phiRv1	TBHG_03402



Las proteínas que integran este grupo son las siguientes: una proteína no identificada (C7.1, azul), una proteína conservada, de membrana (C7.2, naranja), una perteneciente a la superfamilia de AAA ATPasas (C7.3, rojo); ambas con función desconocida. Una proteína relacionada con transcripción (C7.3, amarillo), tres con rutas metabólicas biosintéticas (C7.6 a C7.8, verde), una relacionada con el procesamiento de los RNA de transferencia (C7.10, magenta) y otra con modificación de proteínas mediante defosforilación que probablemente esté involucrada en la regulación de actividad enzimática (C7.11, blanco), una con catabolismo de carbohidratos (C7.12, gris), una perteneciente a la familia PE_PGRS (C7.13, café), y una interesante proteína de posible origen fágico (C7.14, blanco).

7.18. PROTEÍNAS EXPRESADAS POR H37 RV Y POR CIBIN/UMF15-099 SIN SIRE

Al cruzar la información sobre las proteínas expresadas por C₁H37 RV en ausencia de SIRE y por C₁CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE, identificamos 10 proteínas que se expresaron en ambas condiciones (Cuadro 8, pág. 70).

Entre éstas, cuatro proteínas aún no están identificadas (zona naranja, C8.1 a C8.4), una está relacionada con reacciones de oxidación-reducción (C8.5, azul), replicación de DNA (C8.6, blanca), replicación de DNA, (C8.7, verde) síntesis de ácidos micólicos, (C8.8, amarillo) ruta de las hexosas monofosfato, ATPasa para transporte transmembrana de cationes (magenta, C8.9) y una proteína perteneciente a la familia PPE (C8.10, café).



Cuadro 8. Proteínas expresadas por H37 RV en ausencia de SIRE y por CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE				
No. progresivo	No. de registro	Longitud (aa)	Atributos	Nombre del gen
C8.1	Q8VIZ9	141	No identificada	TBCG_00460
C8.2	A4KMC6	82 (fragmento)	No identificada	TBCG_00096
C8.3	A2VIK6	494	No identificada	TBCG_01677
C8.4	A2VFR3	795	No identificada	TBCG_00581
C8.5	A2VN29	289	Actividad de óxido-reductasa	TBCG_00097
C8.6	A2VMU4	402	DNA polimerasa III (cadena β) dnaN Actividad: DNA nucleotidyltransferasa (síntesis de DNA)	TBCG_00002
C8.7	A2VFF4	292	Sintasa de Ac. micólicos umaA	TBCG_00460
C8.8	A4KH01	700	Transcetolasa tkt (Tk)	TBHG_01427
C8.9	A2VN34	752	Transportadora de cationes ATPasa B ctpB Tipo -P	TBCG_00103
C8.10	A2VN28	463	Proteína de la familia PPE	TBCG_00096

7.15. COMPARACIÓN DE PROTEOMAS

La Fig. 23 (pág. 71) es una comparación del número de proteínas expresadas exclusivamente por C₁CIBIN/UMF15 en presencia y en ausencia de SIRE, considerando el número de ellas y su función.

Puede observarse que el número de proteínas expresadas por C₁CIBIN/UMF-099, cuya función se desconoce fue mayor (2.2 veces) en presencia de SIRE que en su ausencia. De este análisis es interesante notar que las proteínas involucradas en síntesis de DNA y en regulación de la transcripción se expresaron en un número considerablemente mayor (seis y tres veces, respectivamente en presencia de SIRE que en su ausencia).

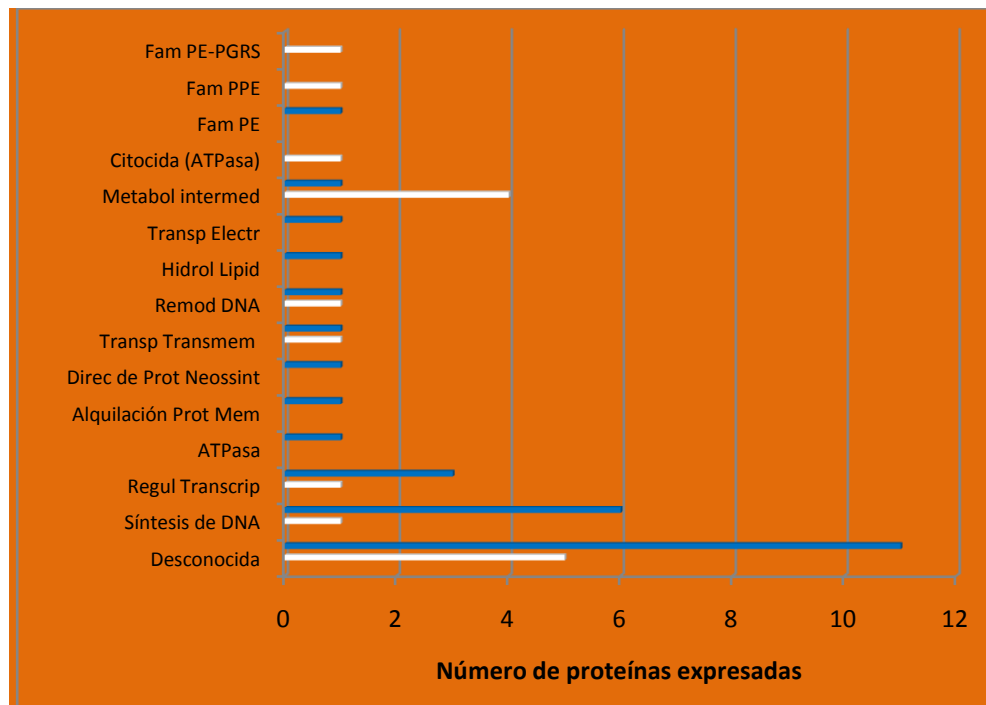


Figura 23. Comparación del número y función de las proteínas expresadas exclusivamente por CIBIN/UMF15 en presencia (barras rojas) o en ausencia de SIRE (barras azules).

Por otro lado, en ausencia de SIRE, esta clona expresó preferentemente proteínas destinadas al catabolismo y al metabolismo intermedio que en presencia de SIRE (8 y 4 veces más, respectivamente).

También se observaron proteínas con funciones exclusivas en ausencia de SIRE: regulación de la transcripción, y proteínas pertenecientes a las familias PE y PE_PGRS. En tanto que se detectaron las siguientes proteínas en presencia de SIRE, pero no en su ausencia: una ATPasa de función no especificada, una enzima dedicada a alquilar proteínas de membrana, una proteína chaperona con actividad de proteasa, una hidrolasa de lípidos, una proteína dedicada a transporte de electrones, otra a producción de energía y una proteína perteneciente a la familia PPE.



CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

Para obtener resultados útiles y confiables en este trabajo se tuvieron que desarrollar numerosas técnicas que no estaban descritas. Algunas de las más importantes fueron las siguientes: obtención de cultivos masivos, inactivación de las micobacterias sin alterar la estructura primaria de las proteínas que serían analizadas por el sistema CLAR/Espectrómetro de masas e informática. En este sentido el presente estudio es pionero en el mundo.

Otras de las contribuciones del presente estudio consisten en haber demostrado por primera vez que las cepas y las clonas de *MTB* consideradas MDR— y en el caso de CIBIN/UFM15-099 y C₁-, C₂- y C₃-CIBIN/UFM15-099, que son panresistentes—son capaces de crecer en presencia de cuatro de los cinco fármacos anti-*MTB* de primera línea. Esto es digno de subrayarse, porque tradicionalmente y en forma sistemática se ha analizado la resistencia de cepas o de aislados clínicos de *MTB* utilizando un fármaco a la vez, nunca la mezcla de cuatro de ellos, hasta en el presente trabajo. No nos fue posible incluir Pirazinamida en la mezcla debido a que este fármaco es soluble sólo a un pH muy bajo (≈ 5) y los otros a $\text{pH} \approx 7$, pero no a $\text{pH} \approx 5$. Sin embargo está publicado que CIBIN/UFM15-099, también es resistente a Pirazinamida¹⁰ y nosotros nos cercioramos de ello, experimentalmente, en su oportunidad. Además, CIBIN/UMF15-099 y sus tres clonas fueron capaces de crecer en presencia de una concentración considerablemente mayor de SIRE que sus respectivas CIMs.

Nosotros sometimos nuestros cultivos de micobacterias a estas condiciones tan exigentes para asegurarnos de que nuestras clonas



eran verdaderamente resistentes a SIRE y que las diferencias que esperábamos ver en el proteoma de C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE con respecto a C₁H37 RV y C₁CIBIN/UMF15-099 en ausencia de SIRE fueran claras, significativas y reproducibles.

Trabajamos con clonas en vez de cepas para evitar variaciones atribuibles a poblaciones policlonales.

El proceso de inactivación de los cultivos de micobacterias implicó que las proteínas de interés se hubieran desnaturizado por efecto de la temperatura y la presión altas. Sin embargo, los estudios realizados con proteínas estándar sometidas al mismo tratamiento que las muestras de interés demostraron que no se modificó su estructura primaria y nuestro sistema cromatográfico e informático fue capaz de detectar inequívocamente todas éstas (SAB, tripsina, mioglobina de corazón de caballo y hemoglobina humana), con un 100% de probabilidad.

Los estudios mencionados, previos al análisis de las proteínas de interés, nos permitieron identificar más de 400 proteínas en cada una de nuestros cultivos. Sin embargo, para evitar en lo posible resultados falsos positivos, incorporamos un criterio de selección muy estricto, y consideramos para nuestro análisis de resultados únicamente aquellas proteínas con un índice de confiabilidad ≥ 0.9 . Con este criterio identificamos, en conjunto, 125 proteínas de interés. Esta decisión posiblemente eliminó de nuestro análisis varias proteínas que juegan un papel importante en la resistencia de C₁CIBIN/UMF15-099 a SIRE por haber tenido índices de confiabilidad < 0.9 . Sin embargo, el presente estudio no pretendió realizar una detección exhaustiva del proteoma de C₁CIBIN/UMF15-099 con y sin SIRE, sino detectar las proteínas más notables, suficientes para poner a prueba nuestra hipótesis y realizar hallazgos interesantes



respecto a posibles blancos para descubrir y desarrollar nuevos compuestos anti-*MTB* MFR, lo cual se logró cabalmente.

La secuencia de las 125 proteínas identificadas con los criterios arriba mencionados se dedujo de los marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en Inglés) de los genomas de varias cepas de *MTB* que ya fueron totalmente secuenciadas y cuyos genes fueron depositados en los bancos especializados. Entonces, las proteínas identificadas por nosotros están consideradas como putativas en el banco de datos. Es decir, salvo las secuencias de ORFs, no se ha depositado en esas bases ninguna evidencia de la existencia de las proteínas de interés. Sin embargo, con este trabajo, nosotros hemos confirmado la existencia de las 125 proteínas arriba mencionadas; y además, con una muy alta probabilidad.

Las razones que avalan lo anterior son las siguientes: el sistema CLAR/Espectrómetro de masas trabaja con material biológico real. El instrumento para CLAR separa las proteínas mediante dos sistemas diferentes—intercambio iónico y fase reversa—, luego las somete al análisis de espectrometría de masas, lo cual implica determinar, con muy alta precisión, las masas exactas de cada amino ácido y péptido; reconstruye la secuencia más probable, tanto de los péptidos como de las proteínas respectivas y compara esta información con el banco de proteínas propuestas para *MTB*.

Nosotros detectamos 31 proteínas con diversas actividades biológicas en el proteoma de C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia SIRE, 24 en su ausencia, y cuatro más en presencia o ausencia de SIRE, haciendo un total de 35 proteínas con SIRE y 28 sin SIRE. Ninguna de éstas fue detectada en C₁H37 RV. Este hecho sugiere fuertemente que todas, o al menos algunas de estas proteínas le confieren a C₁CIBIN/UMF15-099 la notable resistencia a SIRE que la caracteri-



za, y que la expresión de las 31 proteínas detectadas exclusiva en presencia de SIRE es inducida por la presión ejercida por la mezcla de antibióticos, cosa que no sucede con C₁H37 RV, porque esta clona murió en presencia de SIRE.

Interesantemente, las proteínas expresadas exclusivamente por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE fueron claramente diferentes, en número y en funciones, a las expresadas por esta misma clona, en ausencia de SIRE, con excepción de 25 proteínas, cuatro expresadas exclusivamente por C₁CIBIN/UMF15-099 con o sin SIRE y 21 expresadas también por H37 RV.

También lo fue el tiempo de duplicación y el aspecto de los bacilos de C₁CIBIN/UMF15-099, siendo lo primero casi 4 veces mayor que H37 RV y los bacilos considerablemente cortos. Estos fenotipos seguramente tienen correlación con el genotipo de C₁CIBIN/UMF15-099 y con las proteínas expresadas, especialmente el importante número de proteínas especializadas en regulación de la transcripción: C₁CIBIN/UMF15-099 expresó, en presencia de SIRE, 3 de éstas proteínas y en su ausencia 1, haciendo un total de 4. Las cuales, posiblemente usan las micobacterias para sintetizar el resto de proteínas detectadas. Entre este grupo de proteínas se haya una especialmente interesante, porque no se trata de la subunidad β de la RNA polimerasa, sino de otra enzima relacionada con la activación de tRNAs, y por lo tanto es muy poco probable que la Rifampicina la inhiba o que C₁ CIBIN/UMF15-099 deba su resistencia a la Rifampicina a estas proteínas. Por eso esta enzima es también un nuevo y fascinante blanco molecular para nuevos medicamentos anti-MTB MFR y MTB-XDR.



Entre las proteínas inducidas por SIRE en C₁CIBIN/UMF15-099 destaca, por su número, un grupo muy importante de ellas (6/31, 19.4 %), y una más especializada en reparar los daños ocasionados por la luz UV, que fue detectada sólo en C₁CIBIN/UMF15-099 sin importar si SIRE estaba o no. Entonces, el grupo proteínas hace un total de 7, que están dedicadas a la síntesis o degradación de DNA. Lo cual implica que estas micobacterias deben tener una enorme necesidad de remodelar o de replicar su DNA frente a la amenaza de una poderosa mezcla de antibióticos. Interesantemente, entre los medicamentos anti-TB que se encuentran actualmente en el mercado, ninguno está diseñado para inhibir la remodelación de DNA o la replicación de MTB y hay sólo un medicamento, Rifampicina, por cierto uno de los más poderosos, que inhibe la replicación. Este hecho implica la existencia de al menos dos excelentes áreas de oportunidad para la búsqueda y desarrollo de nuevos medicamentos contra MTB-MFR y también para MTB-XDR.

Igualmente interesante es el hecho de que C₁CIBIN/UMF15-099 sin SIRE expresa, en forma exclusiva, ocho proteínas relacionadas con catabolismo y cuatro con metabolismo intermediario (12/24, 50%); lo cual posiblemente implica la implementación de rutas de salvamento debido a las múltiples mutaciones que probablemente contiene su genoma y que no existen en H37 RV, puesto que C₁CIBIN/UMF15-099 es resistente a todos los medicamentos anti-MTB de primera línea y H37 RV es sensible a los mismos.

Otro grupo importante de proteínas (cinco en total) que nosotros detectamos en C₁CIBIN/UMF15-099, pero no en H37 RV está constituido por proteínas que pertenecen a las familias PE, PPE y PE-



PGRS. Estas proteínas son exclusivas de *MTB* y están íntimamente relacionadas con virulencia, con inhibición de la respuesta inmune y con la destrucción de macrófagos. Además, esta clona tiene una ATPasa con propiedades citocidas. Este hallazgo constituye otra área de oportunidad para la búsqueda y desarrollo de nuevos medicamentos contra *MTB*-MFR y *MTB*-XDR.

Además de lo anterior, encontramos un grupo muy importante de proteínas que constituyen una auténtica caja negra: 12 proteínas con función desconocida expresadas por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE, cinco en su ausencia y una con o sin SIRE, 17/59 proteínas, 28.8%). Estas proteínas muy posiblemente desempeñan importantes funciones biológicas, y probablemente son estratégicas para conferirle a esta clona la notable resistencia que tiene contra los medicamentos anti-TB más poderosos de que dispone la humanidad por ahora. De todas estas proteínas nos referimos, sobre todo, a las inducidas con SIRE. Por esta razón es muy importante identificar y caracterizar estas proteínas utilizando los métodos bioquímicos y moleculares clásicos.

Otras proteínas con funciones muy importantes para la biología de las micobacterias, pero con un número pequeño (1 ó 2 proteínas por clase) son las siguientes: transporte de electrones, producción de energía, hidrólisis de lípidos (¿remodelación de pared?), transporte transmembranal de cationes, ATPasas con funciones desconocidas (¿eflujo de medicamentos?), direccionamiento de proteínas recién sintetizadas (proteínas chaperonas con actividad proteolítica). Posiblemente estas enzimas procesan y dirigen a la membrana plasmáti-



ca proteínas de superficie y alquilación de proteínas de membrana y regulación de la transcripción.

Toda la información anterior, ha sido deducida de las las bases de datos especializadas. Por ello, todas las posibilidades mencionadas en este capítulo están sujetas a comprobación. Esto, a pesar de que este trabajo representa una prueba importante de la existencia de proteínas que se expresan preferentemente ante una circunstancia especial, como lo es enfrentarse a una poderosa mezcla de medicamentos.

La comprobación experimental de la expresión de estas proteínas, su purificación y su caracterización exhaustiva es ampliamente justificado, no solo por su importancia científica, sino por la magnífica probabilidad de desarrollar y ofrecer a la humanidad nuevos medicamentos, dirigidos contra dianas que no han sido tocadas todavía y que representan una auténtica esperanza para la humanidad para defenderse de la terrible amenaza de la TB-MDR, y sobre todo, de TB-XDR, la cual, hoy por hoy no tiene cura, pero sí se está extendiendo por todo el mundo.



CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- 1.- Las clonas C₁CIBIN/UMF15-099, y C₁H₃₇ RV conservan el fenotipo de resistencia o sensibilidad a SIRE de sus respectivas cepas.
- 2.- C₁CIBIN/UMF15-099 tiene un crecimiento sensiblemente más lento que lento C₁H₃₇RV, posiblemente debido a la serie de mutaciones en línea, que le confieren, entre otras características, la notable resistencia a los principales medicamentos anti-TB.
- 3.- Tanto la clona pansensible—C₁H₃₇ RV— como la panresistente—C₁CIBIN/UMF15-099—expresan proteínas que son detectables consistentemente, una vez aplicados estrictos parámetros de validación para asegurar su reproducibilidad y confiabilidad.
- 4.- Este trabajo, aporta evidencia de la existencia de las 125 proteínas detectadas y analizadas por nosotros, y reportadas como putativas en los bancos de datos especializados.
5. La clona panresistente expresa proteínas diferencialmente en presencia de SIRE o en su ausencia; así como en cualquiera de estas dos condiciones. El grupo de estas proteínas es mayor en número con respecto al resto del proteoma de C₁CIBIN/UMF15-099 expresado por esta clona y seleccionado por nosotros.
- 5.- La clona, panresistente, expresa 31 proteínas, exclusivamente en presencia de SIRE, que no son detectables en la clona pansensible. Lo cual confirma nuestra hipótesis.
- 6.- Los grupos de proteínas más importantes, expresados exclusivamente por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE son más los siguientes: proteínas no identificadas, replicación o remodelación del DNA, y pertenecientes a las familias PE y PE_PGRS.



7. Los grupos de proteínas más importantes de C₁CIBIN/UMF15-099 expresadas exclusivamente en ausencia de SIRE son los siguientes: con función desconocida, metabolismo intermediario, PE_ y PPE y PE_PGRS y proteínas citocidas y ATPasas de función desconocida. Estas proteínas son usadas posiblemente como rutas de salvamento y proteínas de estrés metabólico.

9.- La expresión de las proteínas expresadas por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia de SIRE fue inducida como una respuesta a la presión ejercida por la mezcla de antibióticos; y las proteínas expresadas exclusivamente por C₁CIBIN/UMF15-099 en ausencia o en presencia de SIRE probablemente están sobre expresadas y son el producto de una serie de mutaciones presentes en el genoma de esta clona.

C₁CIBIN/UMF15-099 11.- La expresión diferencial de proteínas por la clona panresistente con respecto a la clona pansensible podría explicar porqué, nuestro grupo ha encontrado diversos fármacos que son mucho más eficaces contra la cepa panresistente que contra la pansensible.

10. Los grupos de proteínas mencionados en los puntos 7 y 8 son excelentes áreas de oportunidad para el desarrollo de nuevos medicamentos, puesto que no hay ninguno en el mercado diseñado específicamente con el propósito de inhibirlos.



CAPÍTULO VIII

PERSPECTIVAS

- 1) Las 59 proteínas expresadas por C₁CIBIN/UMF15-099 en presencia o ausencia de SIRE, identificadas en este trabajo abren interesantes perspectivas para diseñar nuevos fármacos hechos a la medida contra cepas extremadamente peligrosas, como C₁CIBIN/UMF15-099, utilizada en el presente trabajo. Especialmente las especializadas en replicación o modelación de DNA, las pertenecientes a las familia PE, PPE y PE_PGRS y las citocidas asociadas en su función a éstas familias.
- 2) Son de especial motivo de estudio las proteínas con función desconocida; primero porque éstas seguramente desempeñan importantes funciones para otorgar a C₁CIBIN/UMF15-099 sus peligrosas cualidades de patogenicidad, infectocontagiosidad y resistencia a los medicamentos anti-TB de primera línea
- 3) Todas las proteínas arriba mencionadas requieren ser purificadas y analizadas siguiéndolos métodos bioquímicos y de Biología molecular, para investigar su importancia específica en la resistencia y capacidad de supervivencia de cepas MDR y XDR y para desarrollar sistemas *in vitro* con éstas proteínas, purificadas y activas, que permitan hacer ensayos de alto rendimiento (robotizados) para los millones de compuestos con que cuentan las drogotecas de la industria farmacéutica. Vale la pena porque en el mercado no se cuenta con fármacos dirigidos contra ellas y eso significa que son blancos vírgenes.
- 4) Todos los nuevos fármacos encontrados por nuestro grupo en los últimos ocho años de estudios sobre búsqueda y desarrollo de medi-



camentos anti-TB son susceptibles de ser probados contra cada una de las proteínas arriba mencionadas. Esto para saber si alguno de estos compuestos encuentra una diana específica entre las proteínas que hemos identificado en el presente estudio.



CAPÍTULO IX

REFERENCIAS

1. Asim K, Stead D, Stead W. Chapter 1. Epidemiology and Host Factors. **En:**Schlossberg D (Ed.) Tuberculosis and Nontuberculosis Mycobacterial Infections. Fourth Edition. W.B. Saunders Company Philadelphia PA. 1999. Pp. 3-16.
2. [R. Brosch](#), [Gordon](#) SV, [Marmiesse](#) M, [Brodin](#) P, [Buchrieser](#) C, [Eiglmeier](#) K, [Garnier](#) T, [Gutierrez](#) C., [Hewinson](#) G, [Kremer](#) K, [Parsons](#) LM, [Pym](#) AS, [Samper](#) S, [van Soolingen](#) D, [Cole](#) ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS 2002;99:3684-9.
3. Said-Fernández S., Enciso Moreno JA, Torres-López J., Castro-Garza J, Navarrol-Marmolejo L., Becerril-Montes P., Rojas-Alvarado M. A. Caballero-Olín G., Valdéz-Salazar H, Flores-Ibarra LL., Pernas-Buitrón N, Valdovinos-Chávez S., Martínez-Rodríguez HG, Luna-Herrera J. Epidemiología Molecular de la Tuberculosis Pulmonar en el Norte de México. En García-Peña C., Reyes-Morales H., Viniegra-Velázquez L (Eds) Las Múltiples facetas de la investigación en Salud. 2001. Pp 201-220 ISBN 968-7729.
4. WHO. Ten facts about tuberculosis. Disponible en línea: <http://www.who.int/features/factfiles/tuberculosis/en/index.html>
Consultado el 11 de Noviembre de 2010.
WHO. Report 2009. Global Tuberculosis Control. Epidemiology, Strategy, Financing. Pp 1-15.
5. Centers for Disease Control (CDC). You one site for Credible Health Information. Tuberculosis: Learn the Signs and Symptoms of TB disease.

Disponible en línea: <http://www.cdc.gov/Features/Tbsymptoms/>



Consultado el 8 de noviembre de 2010.

6. García-García M, Ponce-de-León A, García-Sancho MC, Ferrera-Reyes L, Palacios-Martínez M, Fuentes J, et al. Tuberculosis-related deaths within a well-functioning DOTS control program. *Emerg Infect Dis* [serial online] 2002 Nov [date cited];8. Disponible en línea: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no11/02-0021.htm>

7. Tuberculosis risk factors. Mayo Clinical Staff.

Disponible en línea:

<http://www.mayoclinic.com/health/tuberculosis/DS00372/DSECTION=risk-factors> Consultado el 13 de Noviembre de 2010.

8. World Health Organization (WHO). Emergence of XDR-TB. WHO Concerns over drug resistant TB strains that are virtually untreatable.

Disponible en línea:

<http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2006/np23/en/print.html>

Consultado el 11 de Noviembre de 2010.

9. Stop TB partnership. Global Plan to Stop TB 2011-2015.

Disponible en línea: <http://www.stoptb.org/>

Consultado el 13 de Noviembre de 2010.

10. Molina-Salinas GM, Ramos-Guerra MC, Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, Becerril-Montes P, Said-Fernández S. Bactericidal activity of organic extracts from *Fluorensia cernua* DC on sensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res* 2006; 37: 45-49.

11. San Feliciano A. M, Del Olmo Fernández E., López-Pérez J.L., Rebollo Andrés, O. Said y Fernández S.L, González Hernández S., Molina Salinas G.M., González Ramírez D. Hernández Pando



R. PCT WO 2008/059014. Antituberculosis agents. 22 de Mayo de 2008.

12. World Health Organization. WHO REPORT 2009. Global Tuberculosis Control Epidemiology, Strategy, Financing.

Disponible en línea:

http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/full_report.pdf

Consultado el 13 de Noviembre de 2007.

13. Encarnación-Dimayuga R, Ángeles-Espinoza J, García Abraham, Delgado GM Molina-Salinas G., Said-Fernández Salvador Two New Cassane-Type Diterpenes from *calliandra 86econdary86a* with antituberculosis and citotoxic activities. *Planta Médica* 2006;72:757-761.

14. Jiménez-Arellanes A, Martínez R, García R, León-Días R, Luna-Herrera J, Molina-Salinas G, **Said-Fernández S.** *Thymus vulgaris* As a potential source of antituberculous compounds. *Pharmacologyonline*, 2006; 3:569-574.

15. Cornejo-Garrido J., Juménez-Arellanes A, Meckes-Fischer M., Rojas-Bribiesca G., Nicasio-Torres P., Tortoriello-García J., **Said-Fernández S.**, y Mata-Cárdenas B. Pharmacological potential from *Rubus liebanii* micropropagated and the callus biomass. *Pharmacologyonline*, 2006; 3:454-461.

16. Gloria María Molina-Salinas, Alejandro Pérez-López, Pola Becerril-Montes, Ricardo Salazar-Aranda, **Salvador Said-Fernández** and Noemí Waksman de Torres. Evaluation of the flora of Northern Mexico for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *Etnopharmacology*. 2007; 109:435-441.

17. Borges-Argáez R., Canche-Chay C.I. , Peña-Rodríguez LM, **Said-Fernández S.**, María Molina-Salinas G.M. Antimi-



crobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoterapia*. 2007. 78-370-372

18. Castro-Garza J, Barrios-García HB, Cruz-Vega DE, **Said-Fernández S**,

Carranza-Rosales P, Molina-Torres CA, Vera-Cabrera L. Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56:733-737.

19. Navarrete-Vázquez G, Molina-Salinas GM, Duarte-Fajardo ZV, Vargas-Villarreal J, Estrada-Soto S, González-Salazar F, Hernández-Núñez E, Said-Fernández S. Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007;15:

20. León-Rivera I., Mirón-López G., Molina-Salinas G.M., Herrera-Ruiz M., Estrada-Soto S., Gutiérrez M. del C., Alonso-Cortes D., Navarrete-Vázquez G., Ríos MY y **Said-Fernández. S**. Tyrianthinic Acids from *Ipomea tyrianthina* and their antimycobacterial activity, cytotoxicity and effects on the Central Nervous system. *J. Ntl. Prod*. 2008. En Prensa.

21. Estrada-Soto S., Arteaga-González V., Castillo-España P., Molina-Salinas GM, **Said-Fernández S.**, Navarrete G. Antimycobacterial Activity of Extracts from Plants used in Mexico for Treatment of Infectious Diseases. *Pharmacology Magazine* 2009; 4: 106-111.

22. Camacho-Corona MdelR, Favela-Hernándezs JMJ, González-Santiago O, Garza-González E, Molina-Salinas GM, **Said-Fernández S**, Delgado G y Luna-Herrera J. Evaluation of some plant-derived secondary metabolites against sensitive and mul-



- tidrug-resistente *Mycobacterium tuberculosis*. J. Mex. Chem Soc. 2009;53:71-75.
23. Molina-Salinas GM, Bórges J, Ardiles A., **Said-Fernández, S**, Loyola LA, San-Martín A, González-Collado I, Peña-Rodríguez LM. Antituberculosis activity of natural and semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Fitoterapia* 2010;81:50-54.
24. Gloria María Molina-Salinas, Jorge Bórquez, **Salvador Said-Fernández**, Luis Alberto Loyola, Alejandro Yam-Puc, Pola Becerril-Montes, Fabiola Escalante-Erosa, Luis Manuel Peña-Rodríguez. Antituberculosis activity of alkylated mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*. 2010; 81: 219–222.
25. Molina-Salinas Gloria María, Borques J., Ardiles A., Said-Fernández S., Loyola L.A., Yam Pue A., Becerril-Montes P., Escalante-Erosa F., San Martína A., González-Collado I., Peña-Rodríguez L.M. Bioactive Metabolites from the Andean Flora. Antituberculosis activity of natural and semi synthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Phytochem Reviews*. 2010; 9:271-278.
26. Freeman BA. (Editor). Traducido por Espinoza Zarza R. **En:** Tratado de Microbiología de Burrows. Capítulo 30. *Mycobacterium*. Nueva Editorial Interamericana. México D.F. 1983. Pp. 685-711
27. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE). 2008. Distribución de los casos nuevos de enfermedades por fuente de notificación Población General Disponible en línea <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. Consultado el 15 de Noviembre de 2010.
28. CENAVECE. Epidemiología. Casos de Tuberculosis respiratoria (A15-A16) por fuente de notificación Estados Unidos Mexicanos



2008. Población General Disponible en línea:<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

Consultado el 15 de Noviembre de 2010.

29. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. *Emerging Infectious Diseases* 1998;4:195-209.

30. Patterson PE, Kimerling ME, Bailey WC, Dunlap NE. **En:** Schlossenger D. (Editor). *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections*. Fourth Edition. Chapter 6. Chemotherapy of Tuberculosis. W.B. Saunder Company. A Division of Harcourt Brace & Company. Philadelphia PA. USA. Pp. 71-82.

31. Chemicalland. Rifampin. Product identification.

Disponible en línea:
<http://www.chemicalland21.com/lifescience/phar/RIFAMPIN.htm>

Consultado el 16 de Noviembre de 2010.

32. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Pubchem Compound.

Streptomycin. Compound summary (CID 19649).

Disponible en línea:

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=19649>

Consultado el 16 de Noviembre de 2010.

33. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Pubchem Compound. Pyrazinamide. Compound summary (CID 1046).

Disponible en línea:
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1046#pc>

Consultado el 16 de Noviembre de 2010.

34. University of Maryland. Pathogenic Microbiology Basic Mechanisms of Antibiotic Action and Resistance



Disponible en línea:
<http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/Chemotherapy/AntibioticMechanisms.htm>

Consultado el 15 de Noviembre de 2010.

35. WHO. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. Disponible en línea:

http://www.who.int/tb/features_archive/m_xdrtb_facts/en/index.html

Consultado el 16 de Noviembre de 2010.

36. Yang Z. H., Rendon A., Flores A., Medina R., Ijaz K., Ilaca J., Eisenach K. D., Bates J. H., Villarreal A., Cave M. D. A clinic-based Molecular epidemiologic Study of Tuberculosis in Monterrey, México. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2001; 5: 313-320.
37. Said-Fernández S., Enciso Moreno JA, Torres-López J., Castro-Garza J, Navarrol-Marmolejo L., Becerrill-Montes P., Rojas-Alvarado M. A. Caballero-Olín G., Valdéz-Salazar H, Flores-Ibarra LL., Pernas-Buitrón N, Valdovinos-Chávez S., Martínez-Rodríguez HG, Luna-Herrera J. Epidemiología Molecular de la Tuberculosis Pulmonar en el Norte de México. *En* García-Peña C., Reyes- Morales H., Viniestra-Velázquez L (Eds) *Las Múltiples facetas de la investigación en Salud*. 2001. Pp 201-220.
38. Jaramillo E. Divisive drug-resistance. *Bull World Health Organ* 2009;87:493–494.
39. Jain Amita, Mondal Rajesh. Extensively drug-resistant tuberculosis: current challenges and threats. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53: 145-150.



40. Speicher W.D. (ed.) **En**. Proteome analysis. Interpreting the genome. Speicher W.D. Chapter 1. Overview of Proteomics. Elsevier B.V. Neaderlands. 2004. pp- 1-15.
41. Champ P, Harvey R (eds.). Capítulo 32. Regulación de la Expresión Génica. **En**: Bioquímica, 4ª Ed. Wolter Cluer Lippincot , Williams & Wilkins. Baltimore MD, U.S.A. (2007) pp. 449-464.
42. Wang Mu, You Jinsam, Bemis Kerry G, Tegeler Tony J., Brown Dawn P. G. Label-free mass spectrometry-based protein quantification technologies in proteomic analysis. Briefings in functional genomics and proteomics. 2010; 7. 329-339.
43. Vandal Omar H., Pierini Linda M., Schnappinger Dirk, Nathan Carl F., Ehrt Sabine. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal Mycobacterium tuberculosis. Nature medicine 2008; 14: 849-854.
44. G.M. Molina-Salinas, M.C. Ramos-Guerra, J. Vargas Villarreal, B.D. Mata-Cardenas, P. Becerril-Montes and S. Said-Fernandez. Bactericidal activity of organic extracts from *Fluorensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Med Res 37: 45-49 (2006).
45. Safi Hassan, Sayers Brendan, Hasbón Manzour H., Alland David. Transfer of embB Codon 306 Mutations into clinical Mycobacterium tuberculosis Strains Alters Susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, and Rifampin. American Society for Microbiology. 2008; 52: 2027-2034.
46. Zhang Y., Yew W. W. Mechanism of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Drug resistance tuberculosis. 2009; 13: 1320-1330.
47. Tenover Fred C. Mechanism of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine. 2006; 119: S3-S10.



48. Timmins Graham S., Deretic Vojo. Mechanism of action of isoniazid. *Molecular Microbiology*. 2006; 62: 1220-1227.
49. Li X Z., Zhang L., Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48: 2415-2423.
50. Buriánková Karolina, Populaire Doucet Florence, Dorson Olivier, Anne Gondran, Ghnassia Jean-Claude, Weiser Jaroslav, Pernodet Jean-Luc. Molecular Basis of Intrinsic Macrolide Resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex.
51. Gumbo Tawanda, Louie Arnold, Liu Weiguo, Brown David, Ambrose Paul G., Bhavnani Sujata M., Drusano George L. Isoniazid Bactericidal Activity and Resistance Emergence: Integrating Pharmacodynamics and Pharmacogenomics To Predict Efficacy in Different Ethnic Populations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007; 51: 2329-2336.
52. Riska P. F., Jacobs Jr. W. R., Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2000; 4: S4-S10.
53. Siddiqi Noman, Shamim Md., Jain NK, Rattan Ashok, Amin Amol, Katoch VM, Sharma SK, Hasnain Seyed E. Molecular Genetic Analysis of Multi-drug Resistance in Indian Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 589-594.
54. Torres Maria J., Criado Antonio, Palomares Jose C., Aznar Javier. Use of Real-Time PCR and Fluorimetry for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance-Associated Mutations in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 200; 38: 3194-3199.



55. Ren Huiping, Liu Jun. AsnB Is Involved in Natural Resistance of *Mycobacterium smegmatis* to Multiple Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50: 250-255.
56. Nesvizhskii Alexey I, Vitek Olga, Aebersold Ruedi. Analysis and Validation of Proteomic Data Generated by Tandem Mass Spectrometry. *Nature Methods*. 2007; 4: 787-797.
57. Application Note. Waters. Hughes Chris, McKenna Therese, Berger Scott, Langridge James. Analysis of Complex Protein Mixtures Using The Alliance Bioseparations Module And 2D LC/MS/MS.
58. Mawuenyega Kwasi G., Forst Christian V., Dobos Karen M., Belisle John T., Chen Jin, Bradbury E. Morton, Bradbury Andrew R.M., Chen Xian. *Mycobacterium Tuberculosis* Functional Network Analysis by Global subcellular Protein Profiling. *Molecular Biology of the Cell*. 2005; 16: 396-404.
59. Supporting Information_Quantitative proteomic analysis. Hughes Minerva A., Silva Jeffrey C., Geromanos Scott J., Townsend Craig A. Quantitative Proteomic Analysis of Drug Induced Changes in *Mycobacteria*.
60. Silva Jeffrey C. Denny Richard, Dorschel Craig A., Gorenstein Marc, Kass Ignatius J., Li Guo-Zhong, McKenna Therese, Nold Michael J. Richardson Keith, Young Phillip, Geromanos Scott. Quantitative Proteomic Analysis by Accurate Mass Retention Time Pairs. *Analytical Chemistry* 2005; 77: 2187-2200.
61. Supporting Information_Quantitative proteomic Analysis. Hughes Minerva A. Silva Jeffrey C., Geromanos Scott J., Townsend Craig A., Quantitative Proteomic Analysis of Drug-Induced Changes in *Mycobacteria*.



62. Wang Ron., Marcotte Edward M., The proteomic Response of Mycobacterium smegmatis to Anti-Tuberculosis Drugs Suggests Targeted Pathways. Journal of Proteome Research. 2008; pp. A-K.
63. Stark Joakim, Källenius Gunilla, Marklund Britt-Inger. Anderson Dan I., Akerlund Thomas. Comparative Proteome Analysis of Mycobacterium tuberculosis Tgrown under Aerobic And Anaerobic Conditions. Microbiology. 2004; 150: 3821-3829.
64. Betts Joanna C., Paul Dodson, Quan Selwyn, Lewis Alan P., Thomas Pam J., Duncan ken, McAdam Ruth A. Comparison of The Proteome of Mycobacterium tuberculosis Strain H37Rv With Clinical Isolate CDC 1551. Microbiology 2000; 146: 3205-3216.
65. Pheiffer Carmen, Betts Joanna C., Flynn Helen R., Lukey Pauline T., Van Helden Paul. Protein Expression by a Beijing Strain Differs From That of Another Clinical Isolate and Mycobacterium tuberculosis H37Rv. Microbiology. 2005; 151: 1139-1150.
66. Graham Robert LJ, Graham Ciaren, McMullan Geoff. Microbial Proteomics: A Mass Spectrometry Primer for Biologists. Microbial Cell Factories. 2007; 6: 1-14.
67. Wolfe Lisa M., Mahaffey Spencer B. Kruh Nicole A., Dobos Karen M. Proteomic Definition of the Cell Wall of Mycobacterium tuberculosis. Journal of proteome Research. 2010; 9: 5816-5826.
68. Murphy Dennis J, Brown James R., Novel Drug Target Strategies Against Mycobacterium tuberculosis. Current Opinion in Microbiology. 2008; 11: 422-427.



69. Sharma Prashant, Kumar Bhavnesh, Gupta Yash, Singhal Neelja, Katoch Vishwa Mohan, Venkatesan Krishnamurthy, Deepa Bisht. Proteomic Analysis of Streptomycin Resistant and Sensitive Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Proteome Science*. 2010; 8: 1-17.
70. Vlahou A., Fountoulakis M. Proteomic Approaches in the Search for Disease Biomarkers. *Journal Of Chromatography B*. 2005; 814: 11-19.
71. Pan Sheng, Aebersold Ruedi, Chen Ru, Rush John, Goodlett David R. Mcintosh Martin W., Zhang Jing Brentnall Teresa A. Mass Spectrometry Based targeted protein quantification: Methods and Applications. *Journal Proteome Research*. 2009; 8: 787-797.
72. Gillespie Steven H. Evolution of Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 2002; 46: 267-274.
73. Siddiqi Noma, Shamim Mohammed, Hussain Seema, Choudhary Rakesh Kumar, Ahmed Niyaz, Prachee, Banerjee Sharmistha, Savithri G. R., Alam Mahfooz, Pathak Niteen, Amin Amol, Hanief Mohammed, Katoch V. M., Sharma S. K., Hasnain Seyed E. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Isolates of Mycobacterium tuberculosis from Patients in North India. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 2002; 46: 443-450.
74. *Epidemiología* 2010, Semana 1. Secretaria de Salud México
75. U. S. Global Health Policy: The Global Tuberculosis Epidemic. Fact Sheet 2010
76. *Epidemiología* 2006, No. 1 Vol. 23 Semana 1. Secretaria de Salud México.



77. Epidemiología 2004, No. 2 Vol. 21 semana 2. Secretaria de Salud México.
78. Guía de operación. Micromass Q-ToF micro Mass Spectrometer. Waters, Milford MA 01757, Rev. A.
79. Asim K, Stead D, Stead W. Chapter 1. Epidemiology and Host Factors. **En:** Schlossberg D (Ed.) Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections. Fourth Edition. W.B. Saunders Company Philadelphia PA. 1999. Pp. 3-16.
80. [R. Brosch](#), [Gordon](#) SV, [Marmiesse](#) M, [Brodin](#) P, [Buchrieser](#) C, [Eiglmeier](#) K, [Garnier](#) T, [Gutierrez](#) C., [Hewinson](#) G, [Kremer](#) K, [Parsons](#) LM, [Pym](#) AS, [Samper](#) S, [van Soolingen](#) D, [Cole](#) ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS 2002;99:3684-9.
81. Said-Fernández S., Enciso Moreno JA, Torres-López J., Castro-Garza J, Navarrol-Marmolejo L., Becerrill-Montes P., Rojas-Alvarado M. A. Caballero-Olín G., Valdéz-Salazar H, Flores-Ibarra LL., Pernas-Buitrón N, Valdovinos-Chávez S., Martínez-Rodríguez HG, Luna-Herrera J. Epidemiología Molecular de la Tuberculosis Pulmonar en el Norte de México. En García-Peña C., Reyes-Morales H., Viniegra-Velázquez L (Eds) Las Múltiples facetas de la investigación en Salud. 2001. Pp 201-220 ISBN 968-7729.
82. WHO. Ten facts about tuberculosis. Disponible en línea: <http://www.who.int/features/factfiles/tuberculosis/en/index.html>
- Consultado el 11 de Noviembre de 2010.



WHO. Report 2009. Global Tuberculosis Control. Epidemiology, Strategy, Financing. Pp 1-15.

83. Centers for Disease Control (CDC). You one site for Credible Health Information. Tuberculosis: Learn the Signs and Symptoms of TB disease.

Disponible en línea: <http://www.cdc.gov/Features/Tbsymptoms/>
Consultado el 8 de noviembre de 2010.

84. García-García M, Ponce-de-León A, García-Sancho MC, Ferrera-Reyes L, Palacios-Martínez M, Fuentes J, et al. Tuberculosis-related deaths within a well-functioning DOTS control program. *Emerg Infect Dis* [serial online] 2002 Nov [date cited];8. Disponible en línea: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no11/02-0021.htm>

85. Tuberculosis risk factors. Mayo Clinical Staff.

Disponible en línea: <http://www.mayoclinic.com/health/tuberculosis/DS00372/DSECTION=risk-factors> Consultado el 13 de Noviembre de 2010.

86. World Health Organization (WHO). Emergence of XDR-TB. WHO Concerns over drug resistant TB strains that are virtually untreatable.

Disponible en línea: <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2006/np23/en/print.html>
Consultado el 11 de Noviembre de 2010.



87. Stop TB partnership. Global Plan to Stop TB 2011-2015.

Disponible en línea: <http://www.stoptb.org/>

Consultado el 13 de Noviembre de 2010.

88. Molina-Salinas GM, Ramos-Guerra MC, Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, Becerril-Montes P, Said-Fernández S. Bactericidal activity of organic extracts from *Fluorensia cernua* DC on sensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Med Res 2006; 37: 45-49.

89. San Feliciano A. M, Del Olmo Fernández E., López-Pérez J.L., Rebollo Andrés, O. Said y Fernández S.L, González Hernández S., Molina Salinas G.M., González Ramírez D. Hernández Pando R. PCT WO 2008/059014. Antituberculosis agents. 22 de Mayo de 2008.

90. World Health Organization. WHO REPORT 2009. Global Tuberculosis Control

Epidemiology, Strategy, Financing.

Disponible en línea:

http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/full_report.pdf

Consultado el 13 de Noviembre de 2007.

91. Encarnación-Dimayuga R, Ángeles-Espinoza J, García Abraham, Delgado GM Molina-Salinas G., Said-Fernández Salvador Two New Cassane-Type Diterpenes from *calliandra 98econda-*



ry99a with antituberculosis and cytotoxic activities. *Planta Médica* 2006;72:757-761.

92. Jiménez-Arellanes A, Martínez R, García R, León-Días R, Luna-Herrera J, Molina-Salinas G, **Said-Fernández S**. *Thymus vulgaris* As a potential source of antituberculous compounds. *Pharmacologyonline*, 2006; 3:569-574.
93. Cornejo-Garrido J., Jiménez-Arellanes A, Meckes-Fischer M., Rojas-Bribiesca G., Nicasio-Torres P., Tortoriello-García J., **Said-Fernández S**, y Mata-Cárdenas B. Pharmacological potential from *Rubus liebanii* micropropagated and the callus biomass. *Pharmacologyonline*, 2006; 3:454-461.
- 94.16. Gloria María Molina-Salinas, Alejandro Pérez-López, Pola Becerril-Montes, Ricardo Salazar-Aranda, **Salvador Said-Fernández** and Noemí Waksman de Torres. Evaluation of the flora of Northern Mexico for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *Ethnopharmacology*. 2007; 109:435-441.
- 95.17. Borges-Argáez R., Canche-Chay C.I. , Peña-Rodríguez LM, **Said-Fernández S**, María Molina-Salinas G.M. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoterapia*. 2007. 78-370-372
96. Castro-Garza J, Barrios-García HB, Cruz-Vega DE, **Said-Fernández S**, Carranza-Rosales P, Molina-Torres CA, Vera-Cabrera L. Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of *Mycobac-*



terium tuberculosis strains. Journal of Medical Microbiology. 2007; 56:733-737.

97. Navarrete-Vázquez G, Molina-Salinas GM, Duarte-Fajardo ZV, Vargas-Villarreal J, Estrada-Soto S, González-Salazar F, Hernández-Núñez E, Said-Fernández S. Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2007;15.

98. León-Rivera I., Mirón-López G., Molina-Salinas G.M., Herrera-Ruiz M., Estrada-Soto S., Gutiérrez M. del C., Alonso-Cortes D., Navarrete-Vázquez G., Ríos MY y **Said-Fernández. S.** Tyrianthinic Acids from *Ipomea tyrianthina* and their antimycobacterial activity, cytotoxicity and effects on the Central Nervous system. J. Ntl. Prod. 2008. En Prensa.

99. Estrada-Soto S., Arteaga-González V., Castillo-España P., Molina-Salinas GM, **Said-Fernández S.**, Navarrete G. Antimycobacterial Activity of Extracts from Plants used in Mexico for Treatment of Infectious Diseases. Pharmacology Magazine 2009; 4: 106-111.

100. Camacho-Corona MdelR, Favela-Hernándezs JMJ, González-Santiago O, Garza-González E, Molina-Salinas GM, **Said-Fernández S**, Delgado G y Luna-Herrera J. Evaluation of some plant-derived secondary metabolites against sensitive and



multidrug-resistente *Mycobacterium tuberculosis*. J. Mex. Chem Soc. 2009;53:71-75.

101. Molina-Salinas GM, Bórges J, Ardiles A., **Said-Fernández, S**, Loyola LA, San-Martín A, González-Collado I, Peña-Rodríguez LM. Antituberculosis activity of natural and semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Fitoterapia* 2010;81:50-54.
102. Gloria María Molina-Salinas, Jorge Bórquez, **Salvador Said-Fernández**, Luis Alberto Loyola, Alejandro Yam-Puc, Pola Becerril-Montes, Fabiola Escalante-Erosa, Luis Manuel Peña-Rodríguez. Antituberculosis activity of alkylated mulinane diterpenoids. *Fitoterapia*. 2010; 81: 219–222.
103. Molina-Salinas Gloria María, Borques J., Ardiles A., Said-Fernández S., Loyola L.A., Yam Pue A., Becerril-Montes P., Escalante-Erosa F., San Martína A., González-Collado I., Peña-Rodríguez L.M. Bioactive Metabolites from the Andean Flora. Antituberculosis activity of natural and semi synthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Phytochem Reviews*. 2010; 9:271-278.
104. Freeman BA. (Editor). Traducido por Espinoza Zarza R. **En:** Tratado de Microbiología de Burrows. Capítulo 30. *Mycobacterium*. Nueva Editorial Interamericana. México D.F. 1983. Pp. 685-711



105. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE). 2008. Distribución de los casos nuevos de enfermedades por fuente de notificación Población General

Disponible en línea

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

Consultado el 15 de Noviembre de 2010.

106. CENAVECE. Epidemiología. Casos de Tuberculosis respiratoria (A15-A16) por fuente de notificación Estados Unidos Mexicanos 2008. Población General. Disponible en línea:

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

Consultado el 15 de Noviembre de 2010.

107. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. Emerging Infectious Diseases 1998;4:195-209.

108. Patterson PE, Kimerling ME, Bailey WC, Dunlap NE. **En:** Schlossengerg D. (Editor). Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections. Fourth Edition. Chapter 6. Chemotherapy of Tuberculosis. W.B. Saunder Company. A Division of Harcourt Brace & Company. Philadelphia PA. USA. Pp. 71-82.

109. Chemicalland. Rifampin. Product identification.

Disponible en línea:

<http://www.chemicalland21.com/lifescience/phar/RIFAMPIN.htm>

Consultado el 16 de Noviembre de 2010.



110. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Pubchem Compound.
Streptomycin. Compound summary (CID 19649).
Disponible en línea:

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=19649>

Consultado el 16 de Noviembre de 2010.

111. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Pubchem Compound. Pyrazinamide. Compound summary (CID 1046).

Disponible en línea:
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1046#pc>
las

Consultado el 16 de Noviembre de 2010.

112. University of Maryland. Pathogenic Microbiology Basic Mechanisms of Antibiotic Action and Resistance **Disponible en línea:**

<http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/Chemotherapy/AntibioticMechanisms.htm>

Consultado el 15 de Noviembre de 2010.

113. WHO. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. Disponible en línea:

http://www.who.int/tb/features_archive/m_xdrtb_facts/en/index.html



Consultado el 16 de Noviembre de 2010.

114. Yang Z. H., Rendon A., Flores A., Medina R., Ijaz K., Ilaca J., Eisenach K. D., Bates J. H., Villarreal A., Cave M. D. A clinic-based Molecular epidemiologic Study of Tuberculosis in Monterrey, México. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2001; 5: 313-320.
115. Said-Fernández S., Enciso Moreno JA, Torres-López J., Castro-Garza J, Navarrol-Marmolejo L., Becerrilil-Montes P., Rojas-Alvarado M. A. Caballero-Olín G., Valdéz-Salazar H, Flores-Ibarra LL., Pernas-Buitrón N, Valdovinos-Chávez S., Martínez-Rodríguez HG, Luna-Herrera J. Epidemiología Molecular de la Tuberculosis Pulmonar en el Norte de México. *En* García-Peña C., Reyes- Morales H., Viniegra-Velázquez L (Eds) *Las Múltiples facetas de la investigación en Salud*. 2001. Pp 201-220.
116. Jaramillo E. Diverse drug-resistance. *Bull World Health Organ* 2009;87:493–494.
117. Jain Amita, Mondal Rajesh. Extensively drug-resistant tuberculosis: current challenges and threats. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53: 145-150.
118. Speicher W.D. (ed.) *En*. Proteome analysis. Interpreting the genome. Speicher W.D. Chapter 1. Overview of Proteomics. Elsevier B.V. Neaderlands. 2004. pp- 1-15.



119. Champ P, Harvey R (eds.). Capítulo 32. Regulación de la Expresión Génica. **En:** Bioquímica, 4ª Ed. Wolter Cluer Lippincot , Williams & Wilkins. Baltimore MD, U.S.A. (2007) pp. 449-464.
120. Wang Mu, You Jinsam, Bemis Kerry G, Tegeler Tony J., Brown Dawn P. G. Label-free mass spectrometry-based protein quantification technologies in proteomic analysis. Briefings in functional genomics and proteomics. 2010; 7. 329-339.
121. Vandal Omar H., Pierini Linda M., Schnappinger Dirk, Nathan Carl F., Ehrt Sabine. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal Mycobacterium tuberculosis. Nature medicine 2008; 14: 849-854.
122. Safi Hassan, Sayers Brendan, Hasbón Manzour H., Alland David. Transfer of embB Codon 306 Mutations into clinical Mycobacterium tuberculosis Strains Alters Susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, and Rifampin. American Society for Microbiology. 2008; 52: 2027-2034.
123. Zhang Y., Yew W. W. Mechanism of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Drug resistance tuberculosis. 2009; 13: 1320-1330.
124. Tenover Fred C. Mechanism of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine. 2006; 119: S3-S10.



125. Timmins Graham S., Deretic Vojo. Mechanism of action of isoniazid. *Molecular Microbiology*. 2006; 62: 1220-1227.
126. Li X Z., Zhang L., Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 2004; 48: 2415-2423.
127. Buriánková Karolina, Populaire Doucet Florence, Dorson Olivier, Anne Gondran, Ghnassia Jean-Claude, Weiser Jaroslav, Pernodet Jean-Luc. Molecular Basis of Intrinsic Macrolide Resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex.
128. Gumbo Tawanda, Louie Arnold, Liu Weiguo, Brown David, Ambrose Paul G., Bhavnani Sujata M., Drusano George L. Isoniazid Bactericidal Activity and Resistance Emergence: Integrating Pharmacodynamics and Pharmacogenomics To Predict Efficacy in Different Ethnic Populations. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 2007; 51: 2329-2336.
129. Riska P. F., Jacobs Jr. W. R., Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2000; 4: S4-S10.
130. Siddiqi Noman, Shamim Md., Jain NK, Rattan Ashok, Amin Amol, Katoch VM, Sharma SK, Hasnain Seyed E. *Molecular*



Genetic Analysis of Multi-drug Resistance in Indian Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 589-594.

131. Torres Maria J., Criado Antonio, Palomares jose C., Aznar Javier. Use of Real-Time PCR and Fluorimetry for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance-Associated Mutations in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 200; 38: 3194-3199.

132. Ren Huiping, Liu Jun. *AsnB* Is Involved in Natural Resistance of *Mycobacterium smegmatis* to Multiple Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50: 250-255.

133. Nesvizhskii Alexey I, Vitek Olga, Aebersold Ruedi. Analysis and Validation of Proteomic Data Generated by Tandem Mass Spectrometry. *Nature Methods*. 2007; 4: 787-797.

134. Application Note. Waters. Hughes Chris, McKenna Therese, Berger Scott, Langridge James. Analysis of Complex Protein Mixtures Using The Alliance Bioseparations Module And 2D LC/MS/MS.

135. Mawuenyega Kwasi G., Forst Christian V., Dobos Karen M., Belisle John T., Chen Jin, Bradbury E. Morton, Bradbury Andrew R.M., Chen Xian. *Mycobacterium Tuberculosis* Functional Net-



work Analysis by Global subcellular Protein Profiling. *Molecular Biology of the Cell*. 2005; 16: 396-404.

136. Supporting Information_Quantitative proteomic analysis. Hughes Minerva A., Silva Jeffrey C., Geromanos Scott J., Townsend Craig A. Quantitative Proteomic Analysis of Drug Induced Changes in Mycobacteria.
137. Silva Jeffrey C. Denny Richard, Dorschel Craig A., Gorenstein Marc, Kass Ignatius J., Li Guo-Zhong, McKenna Therese, Nold Michael J. Richardson Keith, Young Phillip, Geromanos Scott. Quantitative Proteomic Analysis by Accurate Mass Retention Time Pairs. *Analytical Chemistry* 2005; 77: 2187-2200.
138. Supporting Information_Quantitative proteomic Analysis. Hughes Minerva A. Silva Jeffrey C., Geromanos Scott J., Townsend Craig A., Quantitative Proteomic Analysis of Drug-Induced Changes in Mycobacteria.
139. Wang Ron., Marcotte Edward M., The proteomic Response of *Mycobacterium smegmatis* to Anti-Tuberculosis Drugs Suggests Targeted Pathways. *Journal of Proteome Research*. 2008; pp. A-K.
140. Stark Joakim, Källenius Gunilla, Marklund Britt-Inger. Anderson Dan I., Akerlund Thomas. Comparative Proteome Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Tgrown under Aerobic And Anaerobic Conditions. *Microbiology*. 2004; 150: 3821-3829.



141. Betts Joanna C., Paul Dodson, Quan Selwyn, Lewis Alan P., Thomas Pam J., Duncan ken, McAdam Ruth A. Comparison of The Proteome of Mycobacterium tuberculosis Strain H37Rv With Clinical Isolate CDC 1551. *Microbiology* 2000; 146: 3205-3216.
142. Pheiffer Carmen, Betts Joanna C., Flynn Helen R., Lukey Pauline T., Van Helden Paul. Protein Expresion by a Beijing Strain Differs From That of Another Clinical Isolate and Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Microbiology*. 2005; 151: 1139-1150.
143. Graham Robert LJ, Graham Ciaren, McMullan Geoff. Microbi- all Proteomics: A Mass Spectrometry Primer for Biologists. *Microbial Cell Factories*. 2007; 6: 1-14.
144. Wolfe Lisa M., Mahaffey Spencer B. Kruh Nicole A., Dobos Karen M. Proteomic Definition of the Cell Wall of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of proteome Research*. 2010; 9: 5816-5826.
145. Murphy Dennis J, Brown James R., Novel Drug Target Strate- gies Against Mycobacterium tuberculosis. *Current Opinion in Microbiology*. 2008; 11: 422-427.



146. Sharma Prashant, Kumar Bhavnesh, Gupta Yash, Singhal Neelja, Katoch Vishwa Mohan, Venkatesan Krishnamurthy, Deepa Bisht. Proteomic Analysis of Streptomycin Resistant and Sensitive Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Proteome Science*. 2010; 8: 1-17.
147. Vlahou A., Fountoulakis M. Proteomic Approaches in the Search for Disease Biomarkers. *Journal Of Chromatography B*. 2005; 814: 11-19.
148. Pan Sheng, Aebersold Ruedi, Chen Ru, Rush John, Goodlett David R. McIntosh Martin W., Zhang Jing Brentnall Teresa A. Mass Spectrometry Based targeted protein quantification: Methods and Applications. *Journal Proteome Research*. 2009; 8: 787-797.
149. Gillespie Steven H. Evolution of Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 2002; 46: 267-274.
150. Siddiqi Noma, Shamim Mohammed, Hussain Seema, Choudhary Rakesh Kumar, Ahmed Niyaz, Prachee, Banerjee Sharmistha, Savithri G. R., Alam Mahfooz, Pathak Niteen, Amin Amol, Hanief Mohammed, Katoch V. M., Sharma S. K., Hasnain Seyed E. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Isolates of Mycobacterium tuberculosis from Patients in North India. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*. 2002; 46: 443-450.



151. Epidemiología 2010, Semana 1. Secretaria de Salud México.
152. U. S. Global Health Policy: The Global Tuberculosis Epidemic. Fact Sheet 2010
153. Epidemiología 2006, No. 1 Vol. 23 Semana 1. Secretaria de Salud México.
154. Epidemiología 2004, No. 2 Vol. 21 semana 2. Secretaria de Salud México.
155. Guía de operación. Micromass Q-ToF micro Mass Spectrometer. Waters, Milford MA 01757, Rev. A.
G.M. Molina-Salinas, M.C. Ramos-Guerra, J. Vargas Villarreal, B.D. Mata-Cardenas, P. Becerril-Montes and S. Said-Fernandez. Bactericidal activity of organic extracts from *Fluorensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Med Res 37: 45-49 (2006).