

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE CEPAS  
MULTIFÁRMACORRESISTENTES DE *Mycobacterium tuberculosis*  
EXPUESTAS A NUEVOS COMPUESTOS CONTRA  
TUBERCULOSIS PULMONAR**

Por

**KATIA PEÑUELAS URQUIDES**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología

Noviembre 2012

**ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE CEPAS**

**MULTIFÁRMACORESISTENTES DE *Mycobacterium tuberculosis***

**EXPUESTAS A NUEVOS COMPUESTOS CONTRA**

**TUBERCULOSIS PULMONAR**

**Comité de tesis**

---

**Dra. Licet Villarreal Treviño**

Presidente

---

**Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León**

Secretario

---

**Dr. Salvador Luis Said y Fernández**

Primer vocal

---

**Dra. Norma Laura Heredia Rojas**

Segundo vocal

---

**Dr. Mario Morales Vallarta**

Tercer vocal

**ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE CEPAS  
MULTIFÁRMACORESISTENTES DE *Mycobacterium tuberculosis*  
EXPUESTAS A NUEVOS COMPUESTOS CONTRA  
TUBERCULOSIS PULMONAR**

**por**

**M. en C. Katia Peñuelas Urquides**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Licet Villarreal Treviño, en el Departamento de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la asesoría del Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León y en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la asesoría del Dr. Salvador Luis Said y Fernández.

---

Dra. Licet Villarreal Treviño  
Director Interno

---

Dr. Mario A. Bermúdez de León  
Asesor Interno

---

Dr. Salvador Luis Said y Fernández  
Asesor Externo

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS .....	viii
DEDICATORIA .....	ix
LISTA DE TABLAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
NOMENCLATURA .....	xiv
ABREVIATURAS .....	xvi
RESUMEN .....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	2
3. HIPÓTESIS .....	3
4. OBJETIVOS .....	4
4.1. Objetivo General .....	4
4.2. Objetivos Particulares .....	4
5. ANTECEDENTES .....	5
5.1. Definición de la Enfermedad y Etiología .....	5
5.2. Resistencia a Fármacos Antituberculosis .....	6
5.3. Mecanismos de Acción de Fármacos de Primera Línea .....	8
5.4. Fármacos UCI .....	10
5.5. Análisis de la expresión génica usando microarreglos .....	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	16
6.1. Aislamiento de clonas sensibles y multifármacorresistentes de <i>M. tuberculosis</i> .....	17
6.2. Caracterización Fenotípica y Genotípica de las Clonas H37Rv y CIBIN99 .....	18
6.2.1.1. Caracterización Fenotípica .....	18

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
6.2.1.1.1. Determinación del Perfil de Susceptibilidad o Resistencia a los Fármacos de Primera Línea .....	18
6.2.1.1.2. Prueba de Pirazinamidasas .....	19
6.2.1.1.3. Cinética de Crecimiento de Clonas H37Rv y CIBIN99 en Ausencia y Presencia de Fármacos de Primera Línea .....	19
6.2.1.2. Caracterización Genotípica de Clonas H37Rv y CIBIN99 .....	20
6.2.1.2.1. Extracción de DNA Genómico .....	20
6.2.1.2.2. Spoligotyping .....	21
6.2.1.2.3. RFLP-IS6110 .....	23
6.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Compuestos UCI-05 y UCI-14 en las Clonas H37Rv y CIBIN99 .....	24
6.4. Tratamiento de las Clonas H37Rv y CIBIN99 con los Compuestos UCI-05 y UCI-14 .....	25
6.5. Extracción de RNA total de las Poblaciones Clonales H37Rv y CIBIN99 de M. tuberculosis .....	25
6.6. Retrotranscripción .....	26
6.7. Evaluación de Funcionalidad de RNA Extraído de M. tuberculosis .....	27
6.8. Hibridación de Microarreglos y Análisis de Datos .....	27
6.9. Ensayos de PCR en Tiempo Real .....	29
6.10. Análisis Estadístico .....	31
6.11. Análisis del Mecanismo de Acción de los Compuestos UCI en M. tuberculosis .....	31
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
7.1. Aislamiento y Caracterización de Clonas de M. tuberculosis .....	32
7.2. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los Compuestos UCI-05 y UCI-14 .....	37
7.3. Estandarización del Método de Extracción de RNA Total en M. tuberculosis .....	38
7.3.1. Funcionalidad del RNA Total Obtenido de la Cepa H37Rv .....	41
7.4. Extracción de RNA Total de Clonas de M. tuberculosis Tratadas con los Compuestos UCI-05 y UCI-14 .....	42
7.5. Microarreglos Genómicos de M. tuberculosis .....	44

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
7.6. Expresión Diferencial de Genes en Clonas de M. tuberculosis Tratadas con los Compuestos UCI-05 y UCI-14 .....	47
7.7. Validación por PCR Cuantitativa de Genes con Expresión Diferencial en Clonas de M. tuberculosis Tratadas con los Compuestos UCI-05 y UCI-14 .....	55
7.7.1. Rango Dinámico de Amplificación .....	56
7.7.2. Eficiencia de la Amplificación .....	57
7.8. Cuantificación Relativa de la Expresión de Genes de M. tuberculosis en Clonas Tratadas con los Compuestos UCI-05 y UCI-14 .....	59
7.9. Expresión Génica Diferencial Debido al Tratamiento por el Compuesto UCI-05 en las Clonas de M. tuberculosis H37Rv y CIBIN99 .....	63
7.10. Expresión Génica Diferencial Debido al Tratamiento por el Compuesto UCI-14 en las Clonas de M. tuberculosis H37Rv y CIBIN99 .....	65
7.11. Integración de los Datos para Identificar los Procesos Celulares y Rutas Metabólicas Modificadas por Efecto de los Compuestos UCI-05 y UCI-14 en Clonas de M. tuberculosis Pansensible y Multifármacorresistente .....	66
7.11.1. Gen <i>gltA1</i> .....	66
7.11.2. Gen <i>rpsO</i> .....	68
7.11.3. Gen <i>lprQ</i> .....	69
8. DISCUSIÓN .....	71
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	76
9.1. Conclusiones .....	76
9.2. Recomendaciones .....	77
<b>APÉNDICES</b>	
A. Ensayos de RT-PCR en tiempo real en las cepas H37Rv y CIBIN99 de M. tuberculosis .....	78
B. Regiones genéticas que mostraron una expresión diferencial por microarreglos .....	90
C. Rango dinámico de amplificación de genes de M. tuberculosis seleccionados para su validación por PCR cuantitativa .....	96
D. Evaluación de la eficiencia de amplificación de los genes de M. tuberculosis seleccionados para su validación PCR cuantitativa .....	114
E. Análisis de la cuantificación relativa de los genes utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ .....	133

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
F. Análisis por RT-PCR en tiempo real de la expresión génica promedio obtenida de las clonas H37Rv y CIBIN99 tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14 .....	151
LITERATURA CITADA .....	169
RESUMEN BIOGRÁFICO .....	179

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por el apoyo para la realización de este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por la formación académica.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste por permitir el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Licet Villarreal por su constante apoyo y compromiso durante la realización del posgrado.

Al Dr. Mario Bermúdez por compartir sus valiosos conocimientos, por su orientación impulsando mi crecimiento como persona y profesionista, por la paciencia y compromiso en el desarrollo de cada paso del proyecto. Gracias por todas las enseñanzas.

Al Dr. Salvador Said por todo su apoyo durante el desarrollo el proyecto, por alentar mi formación profesional y por todas sus valiosas aportaciones.

A la Dra. Norma Heredia y al Dr. Mario Morales por ser parte de mi comité de tesis.

A la Dra. Beatriz Silva por su apoyo y sus aportaciones al proyecto.

A la Dra. Esther del Olmo y al Dr. Arturo San Feliciano por la síntesis de los compuestos UCI.

A la Dra. Gloria Molina por su apoyo en la realización de los ensayos de microdilución en placa.

Al INMEGEN y al LBG José Dávila por el desarrollo y análisis de los microarreglos.

A la Dra. Fabiola Castorena por su apoyo en el análisis estadístico.

Al Dr. Pablo Zapata por su orientación y apoyo.

A todos los compañeros del laboratorio en especial a Laura González y Carolina Becerril por hacer del laboratorio un lugar ameno, por todos sus comentarios para enriquecer cada uno de los proyectos y por su amistad.

A mis amigas Yazmín, Susan, Karla y Anadulce por todo su apoyo a pesar de la distancia.

A toda mi familia por su apoyo constante desde la distancia, por todos esos buenos momentos.

A la familia Salazar-Macías: mis suegros José Angel y Adelita, mis cuñados Ivett, Luis, Chely y Sinuhe, y a los pequeños Sofy, Patito, Mariana, Diego, Pablito y Eugenia. Gracias por todo su apoyo.

A mis padres José Luis y Laura Elena, a mis hermanas Any y Elisa, a mi cuñado Omar y a la pequeña Regina. Gracias por creer en mí y por estar siempre a mi lado apoyándome.

A Pepe por su gran apoyo y comprensión, por todo su amor y paciencia, por hacer de los retos profesionales, nuestros retos y por hacer especial cada día compartido.

A todas aquellas personas que me acompañaron y apoyaron durante la realización de esta tesis.



## **DEDICATORIA**

A mis padres: Laura Elena y José Luis

Por ser una fuente constante de apoyo e inspiración  
y por impulsarme siempre a lograr mis metas.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Mezcla de reacción para la amplificación del locus DR .....	22
2. Condiciones del programa para la amplificación del locus DR.....	23
3. Condiciones de amplificación del gen rrs de M. tuberculosis.....	27
4. Iniciadores y sondas TaqMan® para los genes de M. tuberculosis utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real .....	30
5. Perfiles de sensibilidad y resistencia a fármacos de primera línea en cepas y clonas de M. tuberculosis .....	33
6. Concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos UCI-05 y UCI-14 en cepas y clonas de M. tuberculosis .....	38
7. Métodos utilizados en este estudio para la extracción de RNA total de M. tuberculosis .....	39
8. Valores de cuantificación y pureza del RNA total aislado a partir de las cepas H37Rv y CIBIN99 en ausencia y presencia de DMSO .....	40
9. Condiciones del cultivo de las clonas H37Rv y CIBIN99 utilizadas para la extracción de RNA total .....	42
10. Concentración y pureza del RNA total extraído de los cultivos de clonas de M. tuberculosis tratados con dimetilsulfóxido (DMSO), UCI-05 y UCI-14 .....	43
11. Comparaciones por tratamiento con compuestos UCI-05 y UCI-14 .....	47
12. Genes con expresión diferencial observados en la clona H37Rv C-2 por efecto del compuesto UCI-05 .....	52
13. Genes con expresión diferencial observados en la clona H37Rv C-2 por efecto del compuesto UCI-14 .....	53
14. Genes con expresión diferencial observados en la clona H37Rv C-3 por efecto del compuesto UCI-14 .....	54
15. Genes seleccionados para su validación por PCR cuantitativa.....	55

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Incidencia estimada de tuberculosis en 2011 .....	5
2. Porcentaje de tuberculosis multifármacorresistente por país en nuevos casos .....	6
3. Porcentaje de tuberculosis multifármacorresistente por país en casos previamente tratados .....	7
4. Fármacos anti-tuberculosis y sus blancos .....	8
5. Estructura de etambutol, esfingosina y de los compuestos UCI-05 y UCI-14 .....	10
6. Carga bacilar en ratones BALB/c infectados con $1 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias (UFC) de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y su posterior tratamiento con fármacos y compuestos antituberculosis .....	11
7. Porcentaje de área neumónica afectada observada en el estudio histológico realizado en ratones BALB/c después de la infección con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y el tratamiento con distintas combinaciones de fármacos y compuestos anti-tuberculosis .....	12
8. Carga bacilar en ratones BALB/c infectados con la cepa sensible de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y la cepa multifármacorresistente (MFR), CIBIN99 y su posterior tratamiento con 0.3 mg/kg/día del compuesto antituberculosis UCI-107 .....	13
9. Análisis de los patrones de spoligotyping .....	22
10. Determinación de la sensibilidad o resistencia a pirazinamida mediante la prueba de pirazinamidasa .....	34
11. Determinación de la cinética de crecimiento de la cepa y clonas sensibles (H37Rv) y multifármacorresistentes (CIBIN99) en ausencia y presencia de 4 fármacos de primera línea .....	35
12. Spoligotyping de cepas y clonas sensibles (H37Rv) y multifármacorresistentes (CIBIN99) .....	36
13. Patrones de RFLP-IS6110 de cepas y clonas sensibles (H37Rv) y multifármacorresistentes (CIBIN99) .....	37

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
14. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los compuestos UCI-05 y UCI-14 .....	38
15. Imagen del RNA total obtenido a partir de cultivos de las cepas H37Rv y CIBIN99 en ausencia y presencia de DMSO .....	40
16. Amplificación del gen constitutivo rrs de M. tuberculosis por PCR .....	41
17. Imágenes del RNA total extraído de los cultivos de las clonas de M. tuberculosis tratados con UCI-05, UCI-14 y DMSO.....	43
18. Amplificación del gen constitutivo rrs en las clonas H37Rv y CIBIN99 de M. tuberculosis tratadas con UCI-05, UCI-14 y DMSO .....	44
19. Imagen de los rangos de intensidad de señal de los microarreglos .....	45
20. Imagen de la distribución de la intensidad de señal de los microarreglos antes y después de la normalización de datos.....	46
21. Gráficas MvA de los datos de microarreglos .....	46
22. Gráficas MvA de las comparaciones de la intensidad de señal de las clonas H37Rv y CIBIN99 agrupadas por tratamiento.....	48
23. Gráficas de volcán de las comparaciones de la intensidad de señal de las clonas H37Rv y CIBIN99 agrupadas por tratamiento.....	49
24. Representación del agrupamiento de genes en comparación con todos los ensayos de microarreglos usando un mapa de calor.....	50
25. Representación de los genes con expresión diferencial en las clonas H37Rv C-2 y C-3 debido al tratamiento con los compuestos UCI..	51
26. Rango dinámico de amplificación para el gen esxH de M. tuberculosis .....	57
27. Curva de regresión lineal de la evaluación de la eficiencia de amplificación del gen esxH de M. tuberculosis .....	58

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
28. Curva de regresión lineal de la evaluación de la eficiencia de amplificación del gen <i>lldD2</i> en relación al gen de referencia <i>rrs</i> de <i>M. tuberculosis</i> .....	59
29. Expresión de los genes <i>rpmI</i> y <i>rrs</i> de <i>M. tuberculosis</i> .....	60
30. Expresión relativa del gen <i>esxG</i> en las clonas H37Rv y CIBIN99 de <i>M. tuberculosis</i> .....	61
31. Expresión relativa del gen <i>esxG</i> en las clonas H37Rv y CIBIN99 de <i>M. tuberculosis</i> expuestas a compuestos UCI .....	62
32. Expresión relativa de los genes <i>gltA1</i> y <i>rpsO</i> en las clonas H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> expuestas al compuesto UCI-05 .....	63
33. Expresión relativa del gen <i>lprQ</i> en las clonas CIBIN99 de <i>M. tuberculosis</i> expuestas al compuesto UCI-05 .....	64
34. Expresión relativa del gen <i>gltA1</i> en las clonas H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> expuestas al compuesto UCI-14 .....	65
35. Esquema general de la expresión diferencial génica en las clonas H37Rv y CIBIN99 de <i>M. tuberculosis</i> .....	66
36. Localización del gen <i>gltA1</i> ( <i>prpC</i> ) según la base de datos genómicos Tuberculist .....	67
37. Localización del operón Rv1130-Rv1132 según la plataforma integral de tuberculosis, TBdatabase .....	67
38. Reconstrucción bioinformática del ciclo del glioxilato y del ciclo del metilcitrato en <i>M. tuberculosis</i> .....	68
39. Localización del gen <i>rpsO</i> según la base de datos genómicos de <i>M. tuberculosis</i> , Tuberculist .....	68
40. Localización del operón <i>lppU-rpsO</i> según la plataforma integral de tuberculosis, TBdatabase .....	69
41. Representación esquemática de las subunidades ribosomales .....	69
42. Localización del gen <i>lprQ</i> según la base de datos genómicos de <i>M. tuberculosis</i> , Tuberculist .....	70

## NOMENCLATURA

$\mu\text{J}/\text{cm}^2$	Microjoules por centímetro cuadrado
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micras
A	Absorbancia
ATP	Adenosin trifosfato
cDNA	DNA complementario
Ct	Umbral de detección
CTP	Citidina trifosfato
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleotido trifosfato
DTT	Ditiotreitol (Dithiothreitol)
GTP	Guanosin trifosfato
h	Horas
kg	Kilogramo
M	Molar
m/s	Metro por segundo
mg	Miligramo
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
mg/mL	Miligramos por mililitro

MIC	Concentración mínima inhibitoria
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
NFQ	Quencher no fluorescente (Por sus siglas en inglés Non-fluorescent quencher)
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
pH	Potencial de Hidrógeno
pmol	Picomoles
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
RNA <sub>r</sub>	Ácido ribonucleico ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
tRNA	RNA de transferencia
TTP	Timidina trifosfato
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios
v/v	Volumen/volumen

## ABREVIATURAS

M. tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis
TB	Tuberculosis
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
MFR	Multifármacorresistente
DR	Repetición directa
ID	Identificación



## RESUMEN

La tercera parte de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), el cual es el patógeno que provoca la tuberculosis y causa la muerte de 1.5 millones de personas cada año; por esta razón es necesario diagnosticar oportunamente los casos de enfermedad causados por este microorganismo e iniciar el tratamiento de manera inmediata y eficaz. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos con fármacos de primera línea ha empezado a disminuir debido a la aparición de cepas resistentes a dichos fármacos, las cuales están comprometiendo seriamente el control de la tuberculosis y el resurgimiento de ésta en todo el mundo. Por lo tanto se requieren desarrollar nuevos fármacos con actividad anti-tuberculosis (anti-TB) para generar otras alternativas de tratamiento y limitar la transmisión de estas cepas. Nuestro grupo de investigación ha realizado estudios preclínicos de nuevos compuestos sintéticos con actividad anti-TB (UCI, No. Patente P200800797). Los compuestos UCI han mostrado una excelente actividad in vitro e in vivo contra cepas de *M. tuberculosis* sensibles y multifármacorresistentes con una mínima toxicidad in vitro en un modelo murino (BALB/c). Sin embargo, el mecanismo celular y molecular de los compuestos UCI en *M. tuberculosis* aun se desconoce, por lo que el objetivo del presente proyecto es analizar los perfiles de expresión genética de cepas sensibles y multifármacorresistentes de *M. tuberculosis* expuestas a nuevos compuestos (UCI-05 y UCI-14) contra tuberculosis pulmonar. Para llevar a cabo este análisis se aislaron clonas a partir de una cepa sensible (H37Rv, ATCC 27294) y del aislado clínico multifármacorresistente CIBIN:UMF:15:99 (CIBIN99). Las clonas se caracterizaron fenotípicamente determinando su perfil de sensibilidad por medio del sistema Bactec 960 y por la realización de una cinética de crecimiento en ausencia y en presencia de una combinación de 4 fármacos de primera línea (estreptomina, isoniazida, rifampicina y etambutol). También se realizó un análisis genético de las cepas mencionadas por medio de spoligotyping y RFLP-IS6110. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos UCI mediante el método de microdilución en placa utilizando el compuesto alamar azul. Las clonas se trataron por 4 h con los compuestos UCI de manera independiente utilizando la CMI durante la fase de crecimiento logarítmica (McFarlando 3.0-4.0). Se llevó a cabo la extracción del RNA total de los cultivos tratados, la retrotranscripción y la hibridación en microarreglos genómicos de *M. tuberculosis* (Affymetrix). Los datos obtenidos fueron confirmados por PCR cuantitativa utilizando sondas TaqMan. Los resultados de PCR cuantitativa mostraron que durante el tratamiento con el compuesto UCI-05 se observó la inducción del gen *gltA1* y una represión del gen *rpsO* en las clonas sensibles; así como una inducción en el gen *lprQ* en las clonas multifármacorresistentes. Por otro lado, durante el tratamiento con el compuesto UCI-14 se observó la inducción del gen *gltA1* en las clonas sensibles y dicho gen no se alteró en las clonas multifármacorresistentes. La función de los genes modificados y los mecanismos moleculares que acontecen en las cepas sensibles y multifármacorresistentes de *M. tuberculosis* durante el tratamiento con los compuestos UCI son discutidos. Como conclusión, los compuestos UCI-05 y UCI-14 modifican la expresión de genes en *M. tuberculosis*.

## ABSTRACT

One-third of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), the main causal agent of tuberculosis. Tuberculosis disease causes 1.5 million deaths per year. It is very important to timely diagnose tuberculosis and implementing the treatment. However, treatment efficacy with first line antituberculosis drugs has decreased due to the emergence of drug-resistant strains, which are compromising the disease control and its resurgence worldwide. Therefore, the development of new antituberculosis drugs is necessary to generate alternative treatments in order to detain the transmission of these strains. Our research group has performed preclinical studies of new antituberculosis synthetic compounds named UCI (Patent P200800797). UCI compounds have shown an excellent in vitro and in vivo activity against sensitive and multidrug-resistant strains, and they had minimum in vitro toxicity in the murine model BALB/c. Nevertheless, cellular and molecular action mechanisms of UCI compounds on *M. tuberculosis* remain unknown. The aim of this study was to analyze the gene expression profile of sensitive and multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis* exposed to UCI-05 and UCI-14 compounds. For this purpose, sensitive and multidrug resistant clones were isolated from the H37Rv sensitive strain and from the clinical CIBIN:UMF:15:99 (CIBIN99) multidrug-resistant isolate. Drug-resistant characterization of clones was performed using Bactec 960 system and by mycobacterial growth kinetics either in presence or absence of antituberculosis first-line drugs (streptomycin, isoniazid, rifampicin and ethambutol). Subsequently, the genetic characterization by spoligotyping and RFLP-IS6110 methods was carried out. The minimum inhibitory concentration (MIC) of UCI compounds was determined by the Microplate Alamar Blue assays. Afterward, clones were cultured until log phase (3-4 McFarland units) and treated with the MIC for each UCI compound for 4 h. Total RNA was extracted from the cultures, and reverse transcription and hybridization assays were performed on *M. tuberculosis* genomic microarrays (Affymetrix). Validation assays were carried out by quantitative PCR (qPCR) using TaqMan probes (Applied Biosystems). We found that UCI-05 treatment upregulated *gltA1* gene expression in H37Rv sensitive clones, while *rpsO* expression was downregulated. Also, UCI-05 compound increased *lprQ* gene expression in clinical CIBIN99 multidrug-resistant isolate. On the other hand, UCI-14 treatment upregulated *gltA1* gene expression in sensitive clones but not in clinical multidrug-resistant clones. The role of the modified genes and the molecular mechanisms that could happen in sensitive and multidrug-resistant strains are discussed. As conclusion, UCI-05 and UCI-14 compounds modify gene expression in *M. tuberculosis*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tercera parte de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), el cual es el principal agente causal de la tuberculosis (TB) en humanos. La TB es una enfermedad infectocontagiosa y crónica, la forma más común es la TB pulmonar pero puede afectar otros sitios (conocida como TB extrapulmonar). En 2011 se reportó una incidencia de 8.7 millones de nuevos casos y 1.4 millones de muertes en todo el mundo, incluyendo pacientes positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), manteniéndose una prevalencia de 12 millones de casos (rango entre 10 millones y 13 millones), equivalente a 170 casos por cada 100,000 habitantes. Aunque los países más afectados con esta enfermedad son Afganistán, Bangladesh, Brasil, Camboya y China (WHO, 2012), en México en los últimos años se han ido incrementado los casos de tuberculosis pulmonar.

La aparición de cepas resistentes a medicamentos anti-tuberculosis (anti-TB) así como la co-epidemia de TB con HIV ha complicado el control de esta enfermedad en todo el mundo (WHO, 2012).

Recientemente se ha generado un gran interés por estudiar la farmacogenética de MTB utilizando la tecnología de microarreglos. Esta herramienta permite identificar simultáneamente modificaciones en los genes a nivel transcripcional, los cuales estarían relacionados con la acción de un fármaco y/o vinculados con sus efectos tóxicos (Fu, 2006). Estas plataformas permiten tener información más precisa de como los microorganismos responden a la exposición farmacológica.

En el presente proyecto se pretende proponer el mecanismo de acción de dos nuevos compuestos con actividad anti-TB (UCI-05 y UCI-14) usando un análisis de expresión genética simultánea y su posterior confirmación por una prueba molecular más sensible y específica.

## **2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

La tercera parte de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* y 1.4 millones de personas mueren cada año en todo el mundo por causa de este patógeno. Los tratamientos con fármacos de primera línea han mostrado una baja eficacia en el tratamiento de infecciones causadas por cepas de *M. tuberculosis* resistentes. Este evento ha comprometido el control de la TB y el resurgimiento de la enfermedad en todo el mundo por lo que existe una urgente necesidad de generar nuevas alternativas de tratamiento para reforzar el control de la TB.

La generación de nuevos fármacos anti-TB y el conocimiento de sus mecanismos de acción permitirán proponer esquemas de tratamiento más efectivos para combatir la tuberculosis.

### **3. HIPÓTESIS**

Los nuevos fármacos UCI-05 y UCI-14, con uso potencial y eficacia contra tuberculosis pulmonar, modifican la expresión de genes en cepas de *M. tuberculosis* sensibles y multifármacorresistentes.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Analizar los perfiles de expresión genética de cepas multifármacorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* expuestas a nuevos compuestos contra tuberculosis pulmonar.

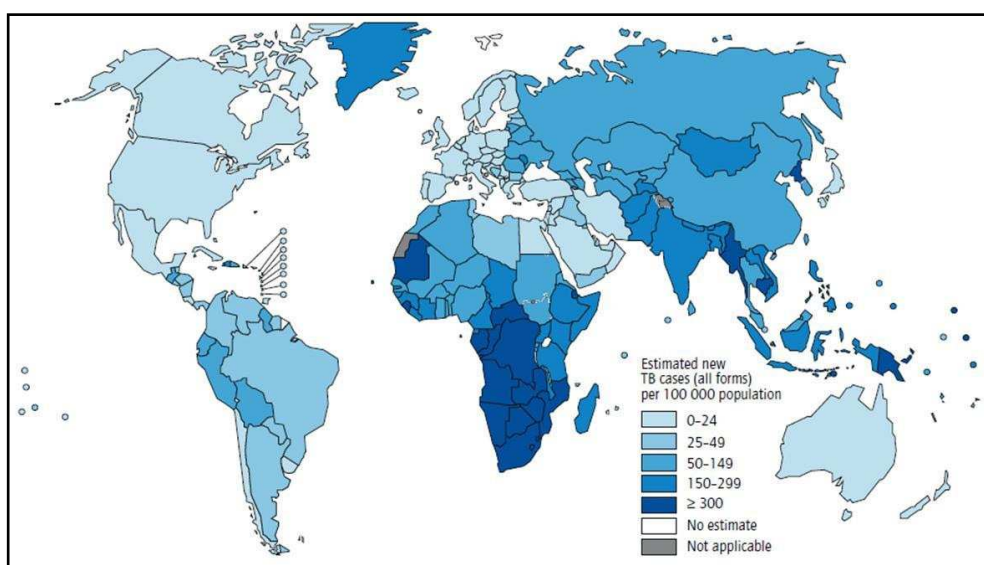
### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 4.2.1. Aislar y caracterizar clonas de *M. tuberculosis* a partir de una cepa pansensible y un aislado clínico multifármacorresistente.
- 4.2.2. Determinar la cinética de crecimiento de las clonas aisladas.
- 4.2.3. Determinar la concentración mínima inhibitoria de los compuestos UCI-05 y UCI-14 en las clonas sensibles y multifármacorresistentes.
- 4.2.4. Identificar los genes cuya expresión se haya alterado por efecto del tratamiento con los compuestos UCI-05 y UCI-14 en clonas sensibles y multifármacorresistentes.
- 4.2.5. Proponer un mecanismo de acción de los compuestos UCI-05 y UCI-14 en *M. tuberculosis* sensible y multifármacorresistente.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. Definición de la Enfermedad y Etiología

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa que se caracteriza por una destrucción tisular progresiva circunscrita a las zonas infectadas (Smith, 2003). Es considerada por la Organización mundial de la salud como un problema de salud pública que afecta a aproximadamente un tercio de la población mundial, reportándose en el año 2011, 8.7 millones de casos (Figura 1) y 1.4 millones de muertes. Esta enfermedad se ha convertido en la segunda causa de muerte atribuible a una enfermedad infecciosa (WHO, 2012).

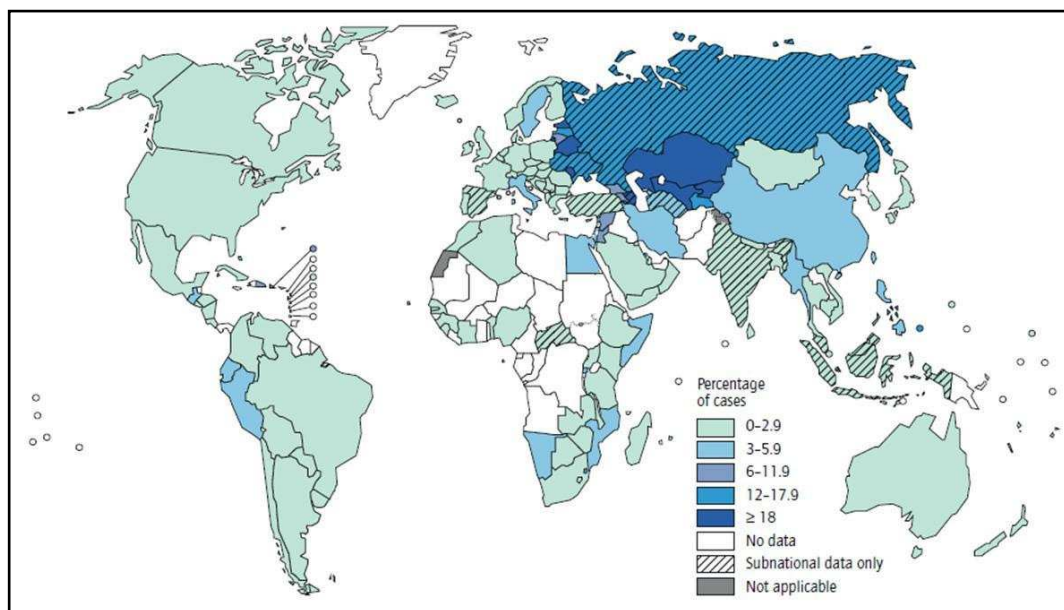


**Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis en 2011.** Las diferentes intensidades de color azul representan el rango de casos de tuberculosis por cada 100,000 habitantes (WHO 2012).

El principal agente causal de la tuberculosis en humanos es *M. tuberculosis* (WHO, 2012), una bacteria de forma bacilar, inmóvil, no esporulada, de crecimiento lento con un tiempo de generación de 15 a 20 h que mide de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Ésta es una bacteria aerobia estricta, condición que favorece su localización en los alvéolos pulmonares al inicio de la enfermedad (Todar, 2012).

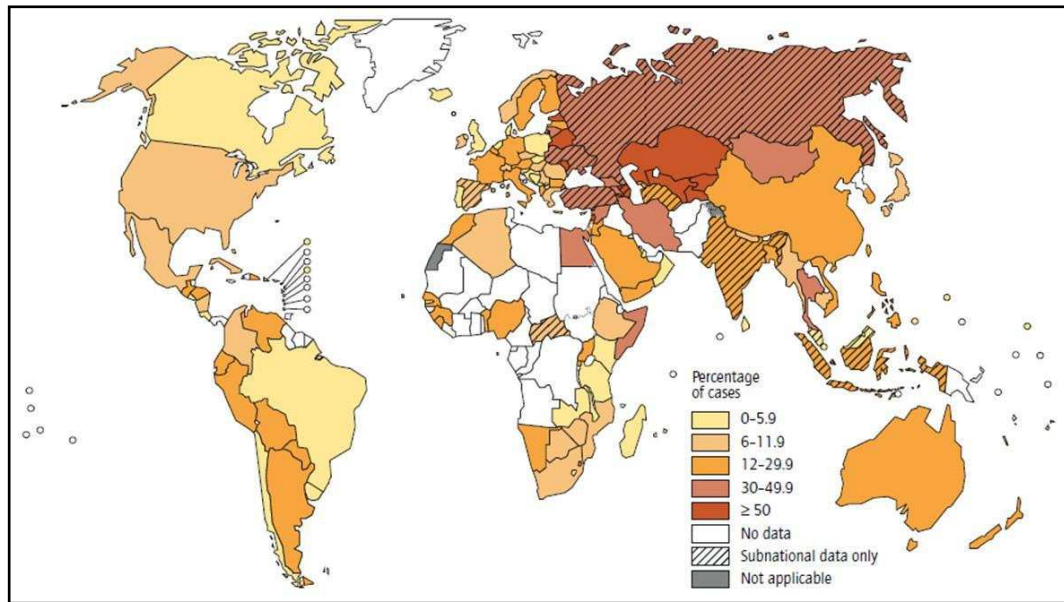
## 5.2. Resistencia a Fármacos Antituberculosis

El tratamiento convencional de la TB implica el uso de 4 fármacos en un esquema supervisado por 6 meses. Estos fármacos, conocidos como de primera línea, son isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol (WHO, 2012). Sin embargo, pocos años después de haberse iniciado su uso como fármacos anti-TB se reportó el surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los dos medicamentos más eficaces (rifampicina e isoniazida). Estas cepas se denominaron multifármacorresistentes (MFR, Figuras 2 y 3). Además, la resistencia a rifampicina generalmente está asociada a la resistencia de otros fármacos de primera línea. Esta situación ha comprometido el control de la TB y ha contribuido al resurgimiento de la TB en todo el mundo (Rattan et al., 1998), debido a que los pacientes portadores de cepas MFR tienen escasa probabilidad de curarse. A pesar de la seriedad de la TB-MFR, este problema aún no se aborda en una forma adecuada por parte de la comunidad médica y científica mundial (WHO, 2007).



**Figura 2. Porcentaje de tuberculosis multifármacorresistente por país en nuevos casos.** Las figuras están basadas en el año más reciente reportado, el cual puede variar entre países (WHO 2012).





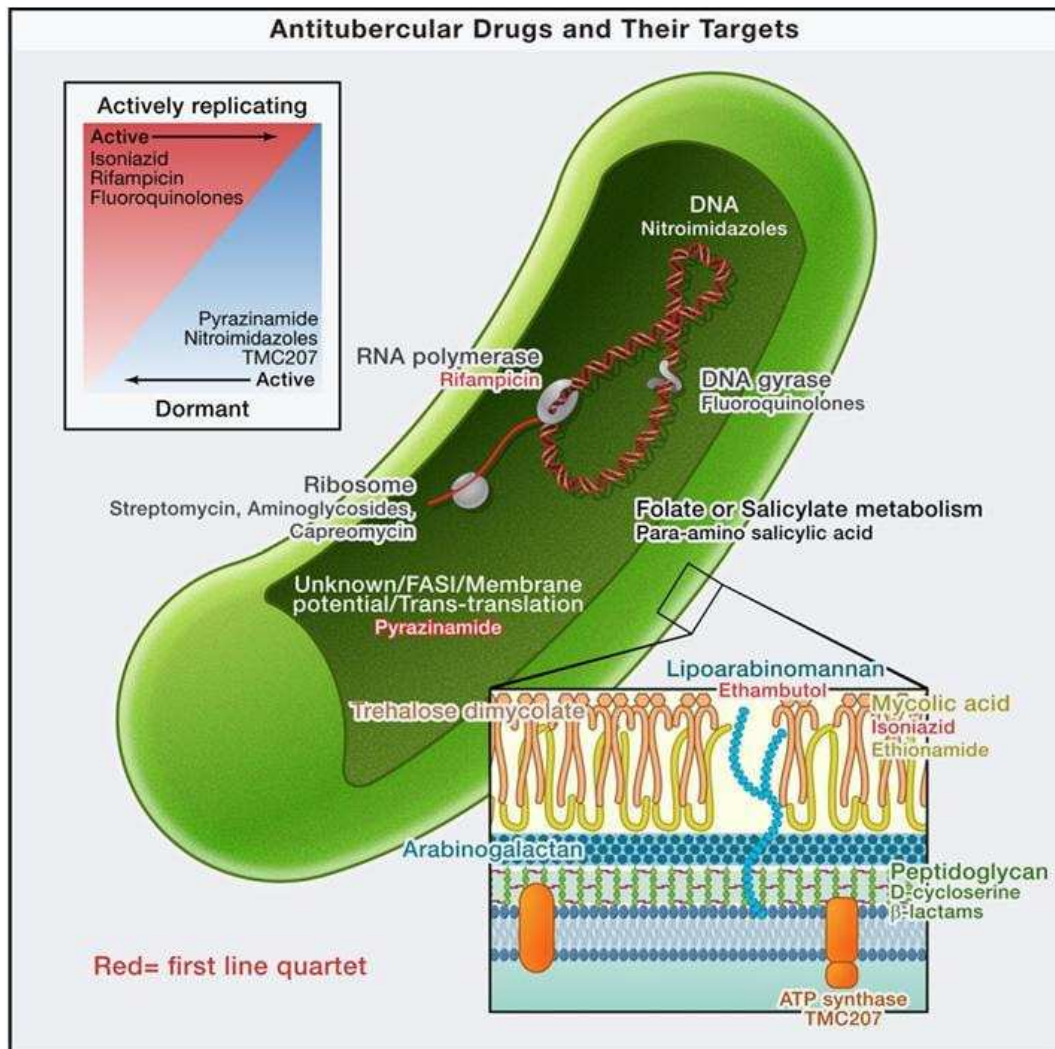
**Figura 3. Porcentaje de tuberculosis multifármacorresistente por país en casos previamente tratados.** Las figuras están basadas en el año más reciente reportado, el cual puede variar entre países (WHO 2012).

Con respecto a México, algunos estudios sugieren que la TB-MFR ha estado presente en nuestro país al menos desde los años 80. Se ha documentado un amplio rango de fármacorresistencia en casos nuevos de TB (6-18%) y altos niveles de resistencia en casos previamente tratados (46%-72%) (Laszlo and de Kantor, 1994; Sifuentes-Osornio et al., 1995; Acosta Bermudez et al., 1998; Garcia-Garcia et al., 2001; Yang et al., 2001). En el estado de Nuevo León, en una de las dos áreas con mayor prevalencia en México, se encontró que de 142 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social, 49% eran resistentes a medicamentos anti-TB de primera línea, y de éstas, 17.8% fueron MFR (datos no publicados).

La respuesta bacteriana a los fármacos puede variar dependiendo del nivel de resistencia de los microorganismos. Este nivel de resistencia está relacionado directamente con el mecanismo de acción de los medicamentos por lo cual su entendimiento resultaría de gran importancia para la elección de la opción terapéutica adecuada (Fu and Shinnick, 2007b).

### 5.3. Mecanismos de Acción de Fármacos de Primera Línea

Las micobacterias presentan una resistencia natural a diversos agentes antimicobacterianos debido a que poseen una pared celular compleja, muy hidrófoba, y por lo tanto con permeabilidad reducida para un gran número de compuestos (Coll, 2003). Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con un solo agente anti-TB favorece el surgimiento de fármacorresistencia (CDC and ATS, 1993). Debido a esto, el tratamiento de la TB se debe realizar con al menos 3 agentes anti-TB administrados en forma combinada y por períodos prolongados (por ejemplo, un mínimo de 6 meses en el caso de cepas pansensibles) (Figura 4) (Coll, 2003).



**Figura 4. Fármacos anti-tuberculosis y sus blancos.** Se muestran en rojo cuatro de los fármacos anti-tuberculosis de primera elección para la quimioterapia estándar de la tuberculosis. Tomado de (Goldberg et al., 2012).

La estreptomycin es un antibiótico aminoglicósido que interfiere con la síntesis proteica bloqueando la traducción del RNAm. Actúa sobre la unidad 16S del RNAr (rrs) y sobre la proteína ribosomal S12 (rpsL). La alteración genética en estos blancos le confiere a las micobacterias resistencia a este fármaco (Coll, 2003).

La isoniazida es un profármaco que requiere de su activación in vivo, llevada a cabo por la enzima catalasa-peroxidasa codificada por el gen *katG* (Somoskovi et al., 2001). La generación de especies químico-reactivas y bactericidas inhibe selectivamente la síntesis de ácidos micólicos de la pared celular de *M. tuberculosis*. Se ha propuesto como sus blancos primarios 2 proteínas involucradas en el sistema FAS II de síntesis de ácidos grasos que permite el alargamiento de las cadenas de meromicolatos (Takayama et al., 2005). Mutaciones en el gen *katG* producen una enzima incapaz de activar la isoniazida y por lo tanto se genera la resistencia. Como mecanismo de salvamento se sobreexpresan los genes como *InhA* y *ahpC* en cepas resistentes a isoniazida (Telenti, 1998).

La rifampicina pertenece a la familia de las rifamicinas, que fueron aisladas de *Nocardia mediterranei* por Sensi et al. (Sensi, 1983). Este es un antibiótico macrolactámico semisintético, derivado de la rifamicina B, el cual interacciona de manera selectiva con la subunidad beta de la RNA polimerasa (*rpoB*), inhibiendo la síntesis del RNAm de la micobacteria y no la del huésped (McClure and Cech, 1978). Somoskovi et al., reportaron que las micobacterias adquieren resistencia al presentar mutaciones en una región central de 81 pb del gen *rpoB* (Somoskovi et al., 2001).

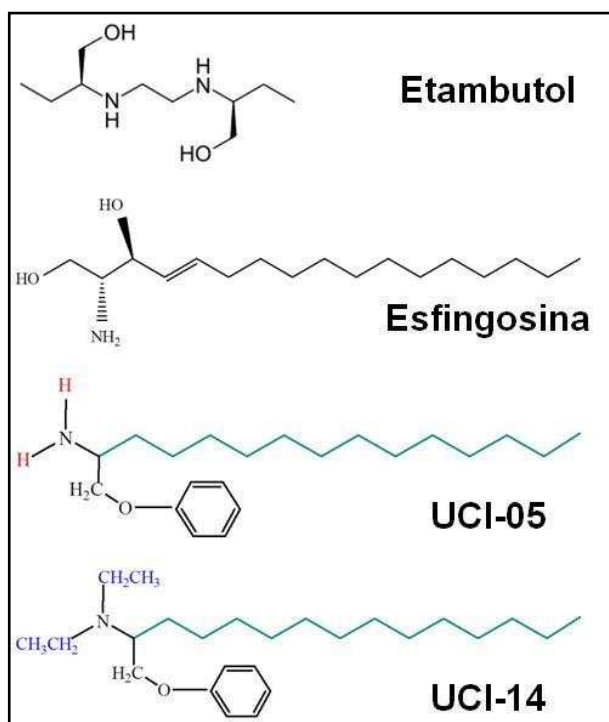
El etambutol (etilen-diamino-dibutanol) es un fármaco de primera línea con una de actividad de amplio espectro. Inhibe la biosíntesis de la pared micobacteriana, y su resistencia está asociada con cambios en el operón *embCAB*, que codifica para la enzima arabinosin transferasa (*EmbC*, *EmbA* y *EmbB*). Este operón está relacionado con la síntesis de componentes de la pared celular, tal como el arabinogalactano y el lipoarabinomanano (Belanger et al., 1996).

La pirazinamida es un compuesto bioisómero de la nicotinamida, y se considera un profármaco convertido en su forma activa (ácido pirazinóico) por la enzima

pirazinamidasas bacterianas (Somoskovi et al., 2001). La pirazinamida altera la función de la membrana celular y disminuye el transporte de energía. Se ha propuesto como su blanco potencial a la sintasa de ácidos grasos (Fas) (Zimhony et al., 2000). Mutaciones provocadas en el gen *pncA*, responsable de la síntesis de la pirazinamidasas, inhiben la acción del fármaco (Scorpio and Zhang, 1996).

#### 5.4. Fármacos UCI

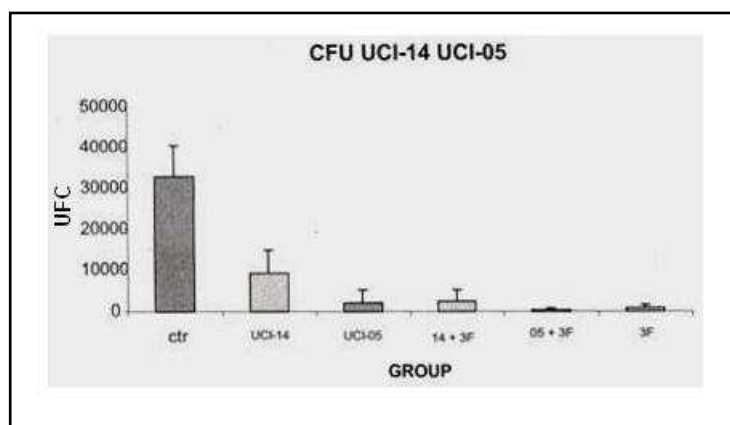
El consorcio Universidad de Salamanca-Centro de Investigación Biomédica del Noreste-Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (UCI), ha desarrollado nuevos compuestos con actividad anti-TB. Las nuevas moléculas sintetizadas fueron diseñadas como híbridos del etambutol (fármaco anti-TB de primera línea) y de la esfingosina (metabolito endógeno común para la biosíntesis y estabilidad de la envoltura de *M. tuberculosis*) con grupos funcionales similares incorporados a esqueletos carbonados distintos a este último (Figura 5) (San Feliciano-Martín et al., 2006; Del Olmo et al., 2009).



**Figura 5. Estructura de etambutol, esfingosina y de los compuestos UCI-05 y UCI-14.** Los compuestos UCI se diseñaron tomando como base al etambutol y la esfingosina.

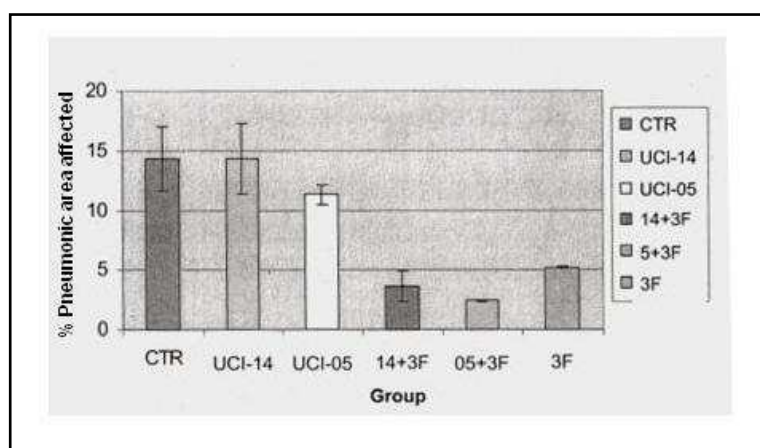
Los compuestos UCI mostraron actividad contra cepas de *M. tuberculosis* sensibles y resistentes a los cinco fármacos de primera línea, donde se observaron rangos de concentraciones inhibitorias mínimas (MICs) contra cepas MFR de 0.8 a 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Tres compuestos UCI (UCI-05, UCI-14, UCI-107) han demostrado ya su eficacia contra TB-MFR y su seguridad en ratones BALBc, siendo su  $\text{DL}_{50} > 2,000 \text{ mg}/\text{kg}$  de peso, tanto en hembras como en machos. La administración diaria de 25  $\text{mg}/\text{kg}$  por vía intraesofágica durante 2 meses (equivalente al 8.2% del promedio de vida para esta especie) no produjeron ninguna muerte ni mostraron alteraciones macroscópicas ni microscópicas perceptibles en ningún órgano.

Por otro lado, ratones BALB/c infectados con  $1 \times 10^6$  bacterias de la cepa sensible H37Rv, que habían desarrollado neumonía, se trataron ya sea con los compuestos UCI-05, UCI-14, mezcla de los fármacos rifampicina (10  $\text{mg}/\text{kg}$ ), isoniazida (10  $\text{mg}/\text{kg}$ ) y pirazinamida, o tratamientos combinados de UCI con los fármacos. Al grupo de ratones control se les administró solución salina fisiológica. En comparación con el grupo control, se redujo la carga bacilar 3 veces en el grupo que recibió UCI-14, 15 veces en el grupo que recibió UCI-05, 30 veces cuando solo se administraron los fármacos, 15 veces cuando se administró la mezcla de UCI-014 más los fármacos, 100 veces cuando se administró la combinación de UCI-05 más los fármacos (Figura 6).



**Figura 6. Carga bacilar en ratones BALB/c infectados con  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) de *M. tuberculosis* H37Rv y su posterior tratamiento con fármacos y compuestos antituberculosis. Ctr representa a los animales control sin tratamiento y 3F a los fármacos rifampicina, isoniazida y pirazinamida.**

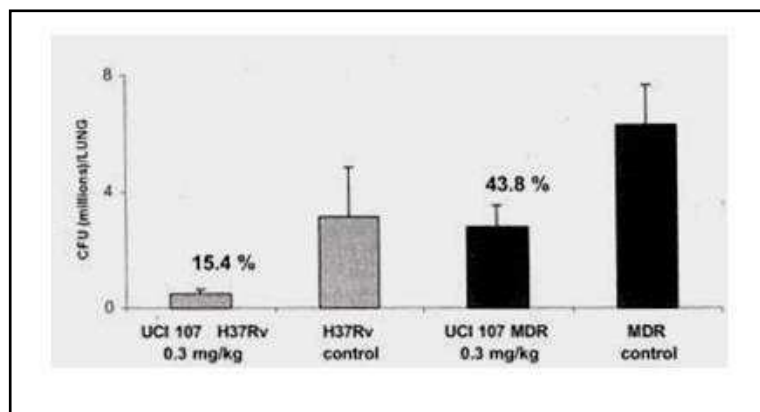
Los animales tratados con los fármacos mostraron un área neumónica afectada correspondiente al 6 % de la superficie pulmonar; los animales tratados con UCI-14 más los fármacos mostraron un área afectada del 4 %; los animales tratados con UCI-05 más los fármacos mostraron un área afectada del 2 %; los animales tratados con UCI-14 mostraron un área afectada similar a los animales control mientras que los animales tratados exclusivamente con UCI-05 mostraron una reducción del 20 % de superficie afectada en comparación con los animales control (Figura 7).



**Figura 7. Porcentaje de área neumónica afectada observada en el estudio histológico realizado en ratones BALB/c después de la infección con *M. tuberculosis* H37Rv y el tratamiento con distintas combinaciones de fármacos y compuestos anti-tuberculosis.** CTR representa a los animales control sin tratamiento y 3F a los fármacos rifampicina, isoniazida y pirazinamida.

En otro experimento con diseño similar, el compuesto UCI-107 fue administrado en ratones infectados con la cepa sensible H37Rv o MFR CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Usando una dosis de 0.32  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , administrada vía intraperitoneal durante un mes, el compuesto redujo  $\sim 15\%$  y  $\sim 40\%$  la carga bacilar en los ratones infectados con la cepa sensible y MFR, respectivamente (Figura 8).





**Figura 8.** Carga bacilar en ratones BALB/c infectados con la cepa sensible de *M. tuberculosis* H37Rv y la cepa multifármacorresistente (MFR), CIBIN99 y su posterior tratamiento con 0.3 mg/kg/día del compuesto antituberculosis UCI-107.

Estos resultados se encuentran protegidos a través de peticiones de patentes en oficinas de España y Europa (San Feliciano-Martín et al., 2006).

### 5.5. Análisis de la Expresión Génica Usando Microarreglos

El conocimiento de la secuencia completa de *M. tuberculosis* en conjunto con el surgimiento de nuevas tecnologías genómicas, como los microarreglos y PCR en tiempo real, ha permitido la identificación de genes de importancia en las interacciones hospedero-patógeno (Butcher, 2004). Los microarreglos bacterianos han sido utilizados para: 1) definir el genoma de una cepa o especie en particular en comparación con la secuencia de una cepa de referencia por hibridación genómica comparativa, y 2) monitorear simultáneamente la expresión génica relativa mediante la comparación de niveles del RNAm. Se han usado microarreglos para identificar eliminaciones en el DNA genómico (Behr et al., 1999; Kivi et al., 2002), para evaluar la expresión genética en respuesta a condiciones ambientales y fármacos (Wilson et al., 1999; Betts et al., 2003; Butcher, 2004).

Particularmente, Wilson y cols. utilizaron microarreglos de DNA para analizar el perfil de expresión génica de *M. tuberculosis* en respuesta al fármaco de primera línea isoniazida. Se observó que este fármaco induce genes que codifican para proteínas fisiológicamente relevantes para el mecanismo de acción del mismo, entre estos se encuentran genes del sistema FAS II y *fbpC* los cuales codifican para enzimas sintetas de ácidos grasos tipo II y para una trealosa respectivamente. Sin

embargo, también se observaron alteraciones relacionadas a consecuencias tóxicas del fármaco (Wilson et al., 1999).

Recientemente ha sido posible la comparación de los perfiles de expresión génica entre una cepa sensible y otra resistente a isoniazida utilizando niveles de concentración del fármaco cercana a la concentración mínima inhibitoria (CMI). En el experimento se observó una concordancia en la inducción de algunos genes (operón FAS III), así como ciertas diferencias entre ambas cepas: 1) el fármaco induce una menor cantidad de genes en una cepa resistente que en una sensible, y 2) los genes Rv0341 y Rv0342 que están inducidos en la cepa sensible en respuesta al fármaco, se encontraron reprimidos o no mostraron cambios en la cepa resistente; concluyendo que el efecto de la isoniazida en una cepa resistente es dependiente de la concentración del fármaco y así como del grado de resistencia de la cepa (Fu and Shinnick, 2007b).

Por otro lado, también se han evaluado los niveles de expresión génica en cepas sensibles usando el antimicobacteriano capreomicina, el cual es utilizado actualmente para el tratamiento de TB-MFR. Se demostró que la subunidad ribosomal 16S es un blanco molecular específico de la capreomicina, además se observó la expresión diferencial de los genes Rv0054 (*ssb*) y Rv3715c (*recR*) y de genes involucrados en división celular (Rv3260c, *whiB2*) (Fu and Shinnick, 2007a).

Los antecedentes previamente descritos muestran que la herramienta de microarreglos permite identificar modificaciones a nivel transcripcional de genes relacionados con el mecanismo de acción de un fármaco, genes relacionados con la resistencia y genes vinculados a los efectos tóxicos de los mismos. La expresión diferencial de estos genes podría considerarse un indicador biológico confiable de la resistencia a fármacos y permitiría conocer la posible respuesta terapéutica a este medicamento (Fu, 2006), y por tanto una modificación oportuna del esquema de tratamiento.

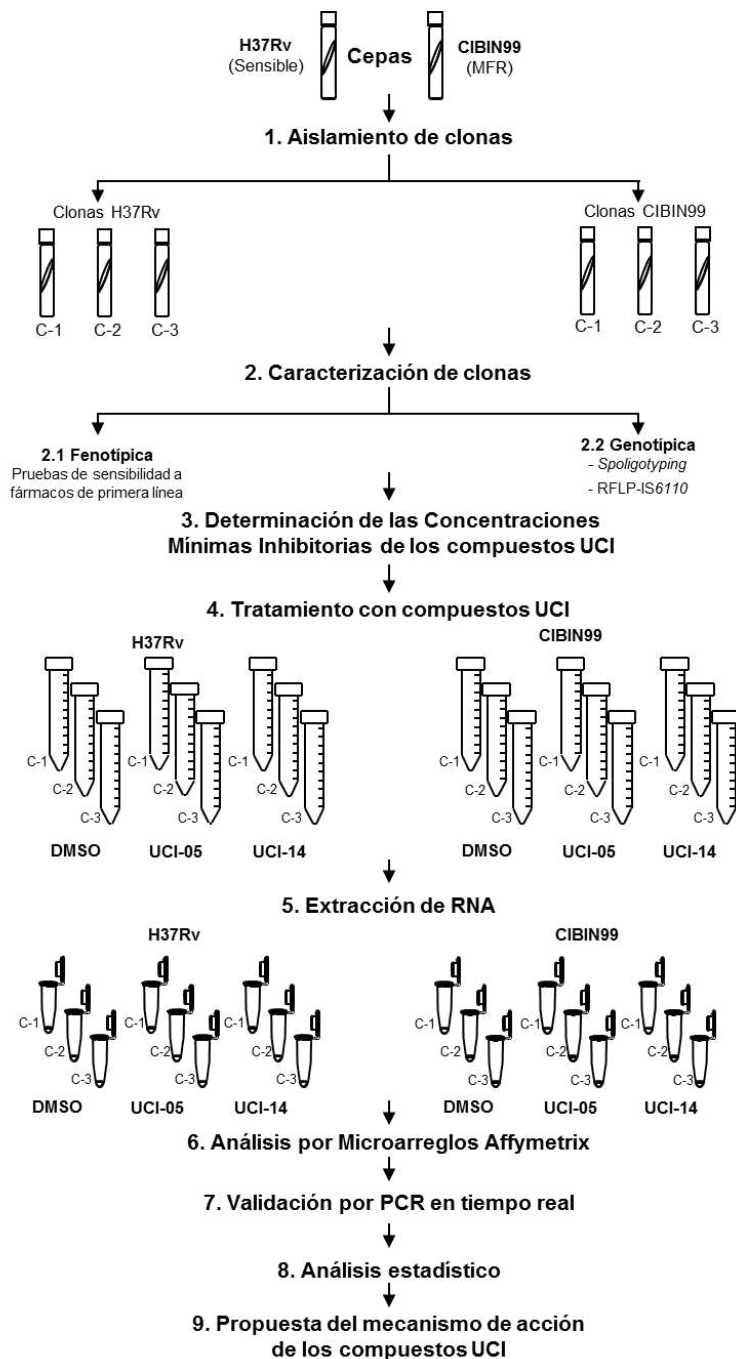
Debido a la necesidad de identificar los mecanismos de acción de los nuevos compuestos UCI en cepas de *M. tuberculosis* sensibles y MFR, en este proyecto se evaluaron los perfiles de expresión de los compuestos UCI-05 y UCI-14 usando la



tecnología de microarreglos y validando los resultados obtenidos por medio de PCR en tiempo real.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO EXPERIMENTAL



**MFR** Multifármacorresistentes

**UCI** Consorcio Universidad de Salamanca, España-Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social-Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**RFLP-IS6110** Restriction fragment length polymorphism

**MIRU** Mycobacterial Interspersed Repetitive Units

**VNTR** Variable Number of Tandem Repeats

## **6.1. Aislamiento de Clonas Sensibles y Multifármacorresistentes de *M. tuberculosis***

A partir de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, la cual es sensible a los fármacos de primera línea, y del aislado clínico de *M. tuberculosis* CIBIN:UMF:15:99, multifármacorresistente (denominado en adelante CIBIN99), se obtuvieron poblaciones clonales resemebrando la población original en medio sólido Lowenstein-Jensen (LJ, Merck, Darmstadt, Alemania). Los cultivos se mantuvieron a 37° C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> dentro de una incubadora (Nuairé, Minnesota, EE.UU.). La incubación se llevó a cabo por 2 a 3 semanas hasta observar colonias micobacterianas típicas de *M. tuberculosis*. Una porción de estos cultivos fue transferida a tubos de vidrio estériles de 13×100 mm conteniendo 2 mL de agua destilada y 6 perlas de vidrio con la finalidad de realizar suspensiones micobacterianas homogéneas. Las suspensiones se agitaron en vortex por 5 min y se dejaron sedimentar por aproximadamente 20 min para evitar la propagación de los aerosoles generados durante la agitación; se transfirieron a tubos de vidrio estériles de 13×100 mm y se ajustaron a una turbidez equivalente al estándar 1 de McFarland [1.97 x10<sup>6</sup> UFC/mL en cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv (Peñuelas-Urquides, 2013)]. Las mediciones de turbidez en unidades McFarland se realizaron utilizando un nefelómetro BioMérieux (ATB 1550, BioMérieux, Francia)

Con las suspensiones micobacterianas homogéneas y ajustadas al estándar 1 de McFarland, se realizaron diluciones seriales (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-8</sup>) y las bacterias se sembraron por goteo en placas con medio sólido Middlebrook 7H10 (Difco, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia) conteniendo 10 % de OADC (suplemento que favorece el crecimiento de *M. tuberculosis* el cual consta de ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa. Becton Dickinson and Company, Sparks, MD. EE.UU.); el inóculo se extendió realizando estrías en el medio sólido con la finalidad de obtener colonias aisladas. Los cultivos sólidos en medio Middlebrook 7H10 se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> por 3 semanas. Se seleccionaron 3 colonias aisladas provenientes de la cepa H37Rv y 3 colonias provenientes del aislado clínico CIBIN99. Las colonias seleccionadas se cultivaron cada una por separado en medio líquido Middlebrook 7H9 (Difco, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia) suplementado con 10 % de OADC. Los cultivos líquidos se incubaron a 37 °C en una

atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> por 3 semanas, y se resembraron nuevamente en medio LJ para obtener suficiente biomasa para los análisis subsecuentes. Una porción de los cultivos en medio LJ se resuspendió en medio de cultivo líquido Soya-Trypticase (Bioxon, Becton Dickinson, Estado de México, México) conteniendo 20 % de glicerol y se realizaron alícuotas de 200 µL las cuales se conservaron a -70 °C hasta su utilización.

## **6.2. Caracterización Fenotípica y Genotípica de las Clonas H37Rv y CIBIN99**

### **6.2.1. Caracterización Fenotípica**

La caracterización fenotípica de las clonas H37Rv y CIBIN99 se realizó mediante la determinación del perfil de susceptibilidad o resistencia a los fármacos de primera línea (SIREP: estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida) utilizando el sistema Bactec 960 y mediante la realización de cinéticas de crecimiento en ausencia y presencia de cuatro fármacos de primera línea. Además, la confirmación de la susceptibilidad o resistencia al fármaco pirazinamida se llevó a cabo mediante la prueba de pirazinamidasa.

#### **6.2.1.1. Determinación del Perfil de Susceptibilidad o Resistencia a los Fármacos de Primera Línea.**

El perfil de sensibilidad o resistencia a fármacos anti-TB de primera línea de las clonas H37Rv y CIBIN99 se realizó utilizando el sistema Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD. USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para llevar a cabo el ensayo se realizó una suspensión de cultivos líquidos de *M. tuberculosis* en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10 % de OADC y se ajustó a una turbidez equivalente al estándar 1 de McFarland; una alícuota de 100 µL del cultivo se inoculó en un tubo MGIT indicador de crecimiento complementado con el suplemento BACTEC MGIT 960, el tubo se colocó en el equipo hasta que el cultivo mostró crecimiento indicado como positivo. Una alícuota de 0.5 mL del cultivo positivo se inoculó en tubos MGIT complementados con el suplemento BACTEC SIRE más uno de los fármacos de primera línea utilizando la concentración crítica para cada uno de ellos, estreptomicina 1.0 µg/mL, isoniazida

0.1 µg/mL, rifampicina 1.0 µg/mL o etambutol 5.0 µg/mL (BACTEC MGIT 960 SIRE Kit).

Para la prueba de sensibilidad a pirazinamida se realizó una dilución 1:5 del cultivo positivo; una alícuota de la dilución fue inoculada en un tubo MGIT complementado con el suplemento MGIT 960 PZA más 100 µg/mL de pirazinamida. Una vez inoculados, los tubos se colocaron en el equipo Bactec 960 utilizando la opción AST (BACTEC, MGIT 960 PZA Kit) y se incubaron hasta que el equipo Bactec 960 marcó el fin del experimento generando el resultado.

#### **6.2.1.2. Prueba de Pirazinamidasa.**

Para confirmar la susceptibilidad o resistencia al fármaco pirazinamida (PZA) se realizó la prueba de pirazinamidasa. Se asume que un microorganismo sin actividad de pirazinamidasa es resistente a PZA debido a su inhabilidad para metabolizar dicho fármaco a ácido pirazinoico (componente activo) y amonio. Para llevar a cabo el procedimiento, se inoculó una porción abundante de un cultivo activo de *M. tuberculosis* crecido en medio sólido LJ en la superficie del medio de pirazinamidasa, el cual se preparó a base de medio Bacto Dubos deshidratado (Difco, Becton Dickinson), 0.8 mM de pirazinamida (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), piruvato de sodio y agar bacteriológico (Bioxon, Becton Dickinson, Estado de México, México). Los cultivos se incubaron a 37 °C por 4 días; posteriormente se agregó 1 mL de una solución de sulfato de amonio ferroso 1 % a cada uno de los cultivos, los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 30 min hasta observar la aparición de una banda rosa en la superficie del medio de cultivo. La aparición de la banda rosa indica la hidrólisis enzimática de PZA a ácido pirazinoico y se considera como pirazinamidasa positivo y susceptible a PZA. Las pruebas negativas se repitieron a los 7 días de incubación para su confirmación.

#### **6.2.1.3. Cinética de Crecimiento de Clonas H37Rv y CIBIN99 en Ausencia y Presencia de Fármacos de Primera Línea.**

Las curvas de crecimiento bacteriano de las clonas H37Rv y CIBIN99 se realizaron en ausencia y presencia de una mezcla de 4 fármacos de primera línea utilizando la concentración crítica de cada uno de ellos (estreptomycin 2 µg/mL,

isoniazida 0.1 µg/mL, rifampicina 2 µg/mL y etambutol 2 µg/mL). Las poblaciones clonales se crecieron en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con 10 % de OADC y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> en agitación constante a 300 rpm. Se realizaron mediciones de turbidez en unidades McFarland cada 3 días por un periodo de 21 días tomando 1 mL del cultivo para cada lectura.

### **6.2.2. Caracterización Genotípica de Clonas H37Rv y CIBIN99**

La caracterización genética de las clonas de *M. tuberculosis* se llevó a cabo por medio de las técnicas de spoligotyping y RFLP-IS6110 (Kamerbeek et al., 1997; Supply et al., 2006) a partir de DNA genómico.

#### **6.2.2.1. Extracción de DNA Genómico**

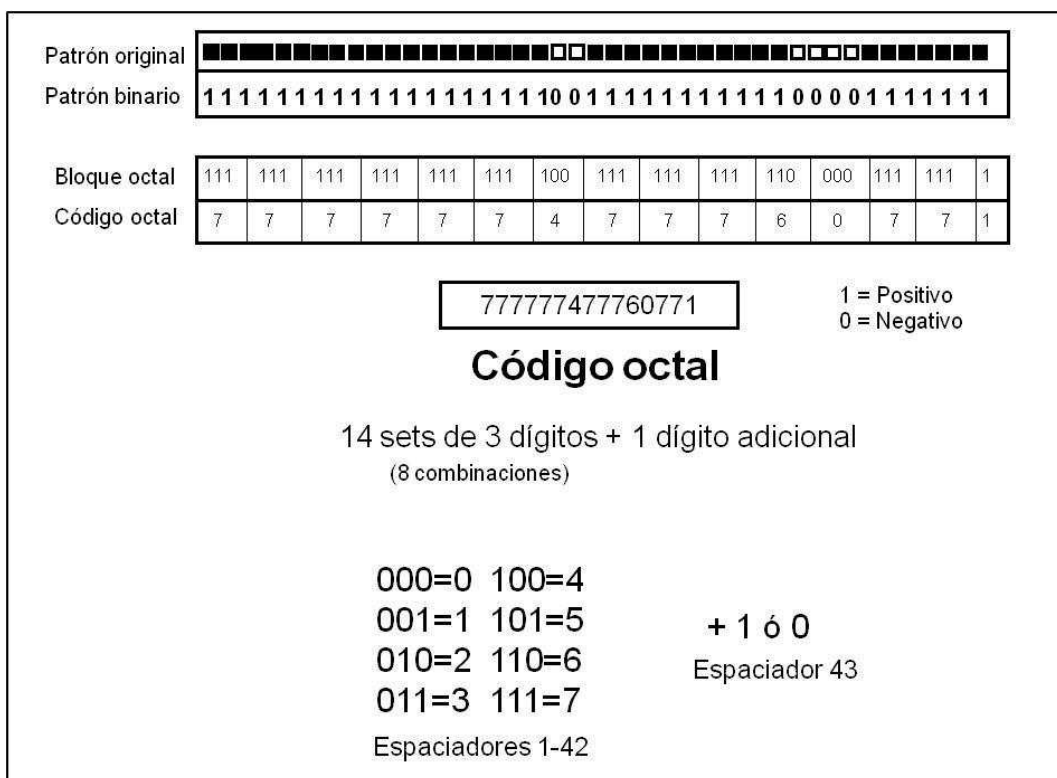
La extracción de DNA genómico de *M. tuberculosis* se llevó a cabo utilizando el método de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

A partir de cultivos sólidos de 2 a 3 semanas de crecimiento de las clonas H37Rv y CIBIN99 en medio LJ, se tomó una porción y se transfirió a un tubo de vidrio de 13×100 mm conteniendo perlas de vidrio y 2 mL de buffer TE 1×. Las muestras se agitaron en vortex por 5 min y se dejaron sedimentar por aproximadamente 10 min para evitar la propagación de los aerosoles generados durante la agitación. Se realizaron dos alícuotas de 500 µL de las suspensiones y se incubaron a 80 °C por 60 min para su inactivación; se agregó un volumen de 50 µL de lisozima [10mg/mL] y se realizó una agitación en vortex por 10 s, seguido de una incubación a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, se agregaron 70 µL de SDS 10 % más 6 µL de proteinasa K [10 mg/mL]; las muestras se agitaron en vortex por 10 s y se incubaron por 10 min a 65 °C en un termobloque (Labnet, Nueva Jersey, EE.UU.); se adicionaron 10 µL de 5 M NaCl más 80 µL de una solución de CTAB-NaCl (10 % CTAB y 0.7 M NaCl respectivamente) y se realizó una agitación en vortex por 10 s; las muestras se incubaron nuevamente 10 min a 65 °C. Para la separación de los ácidos nucleicos, se adicionó un volumen de 700 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1); las muestras se agitaron en vortex por 10 s y se centrifugaron a temperatura ambiente por 5 min a 12,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un

microtubo de 2 mL estéril y se adicionaron 0.6 volúmenes (360  $\mu$ L) de isopropanol para precipitar el DNA. La reacción de precipitación se incubó a  $-20$  °C toda la noche y se centrifugó a temperatura ambiente por 15 min a 12,000 rpm. El DNA precipitado se lavó con etanol al 70 % frío y se centrifugó a temperatura ambiente por 1 min a 12,000 rpm. El etanol se desechó, y el DNA genómico obtenido se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20  $\mu$ L de buffer TE 1 $\times$ . Se determinó la concentración y pureza del DNA genómico obtenido utilizando el equipo nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.) y su integridad se observó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con 0.5  $\mu$ L de bromuro de etidio [10 mg/mL].

#### **6.2.2.2. Spoligotyping**

El método de spoligotyping (spacer oligotyping) analiza las variaciones dentro del locus de repetición directa (DR) por medio de la presencia o ausencia de 43 de los espaciadores de secuencia única de este locus. Para este propósito se utilizó un kit comercial de Isogen Life Science (Isogen Life Science, De Meern, Holanda). Se obtuvo una alícuota del DNA genómico aislado y se ajustó a una concentración de 20 ng/ $\mu$ L, el cual se utilizó como templado en la reacción de amplificación de fragmentos de diferente longitud del locus DR utilizando primers complementarios a las secuencias de repetición directa. Los componentes de la mezcla de reacción para la amplificación se indican en la tabla 1 y las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 2. Posteriormente se realizó una hibridación en línea utilizando los productos amplificados y se siguieron las especificaciones del kit Isogen Life Science. El DNA hibridado se detectó por quimioluminiscencia utilizando un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (1.25 U/mL). Para el análisis de la presencia o ausencia de los espaciadores, los patrones obtenidos fueron convertidos a un código binario y a un código octal de acuerdo a la descripción de Dale et al. (2001) (Dale et al., 2001) para su análisis y comparación con la base de datos spolDB4 (Figura 9).



**Figura 9. Análisis de los patrones de spoligotyping.** Se muestra un ejemplo de la conversión de los patrones de hibridación obtenidos en spoligotyping a códigos octales. Se indican los 43 espaciadores del locus DR con los símbolos ■ y □, los cuales indican la presencia y ausencia del espaciador respectivamente. A cada uno de los símbolos se les asigna un valor de 1 para el espaciador presente y 0 para el ausente; estos valores después son agrupados en bloques de tres para la asignación de un valor numérico siguiendo las indicaciones de las 8 combinaciones señaladas, los cuales formarán el código octal de cada cepa.

**Tabla 1**

**Mezcla de reacción para la amplificación del locus DR**

Reactivo	Concentración final
Agua desionizada	c.b.p. 50 µL
Buffer Tth	1 ×
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
dNTPs	0.2 mM
Primer DRa (marcado con biotina)	5 pmol
Primer DRb	5 pmol
Reactivo enhancer	1 ×
DNA polimerasa Tth	0.5 U
DNA	80 ng

c.b.p. cuanto baste para



**Tabla 2****Condiciones del programa para la amplificación del locus DR**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96 °C	4 min	1
96 °C	1 min	30
55 °C	1 min	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	1
18 °C	Indefinido	

**6.2.2.2. RFLP-IS6110.**

El método de RFLP-IS6110 descrito por van Embden et al. (1993) analiza el número y localización del elemento de inserción IS6110 presente en *M. tuberculosis*. Para llevar a cabo esta técnica, 2 µg del DNA genómico de cada muestra fueron digeridos con la endonucleasa de restricción PvuII (8 U); la mezcla de digestión contenía además 1 µg de RNasa, Buffer B 1× y agua desionizada en un volumen final de 10 µL. La digestión del DNA se llevó a cabo a 37 °C por 4 h y ésta se verificó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Posteriormente se adicionó a cada muestra 5 µL de una mezcla 1:1 de los marcadores de peso molecular Lambda/Hind III (Dilución 1:100) y Phi X174/Hae III (Dilución 1:100). Los fragmentos de DNA obtenidos después de la digestión se sometieron a una separación electroforética en un gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). El corrimiento electroforético se llevó a cabo por 10 min a 85 V seguido de 17 h a 35 V. El gel de agarosa conteniendo los fragmentos de DNA fue tratado con una solución de desnaturalización (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) por 20 min en agitación constante y posteriormente se realizó un lavado con una solución de neutralización (1.5 M NaCl, 1 M Tris pH 8) por 20 min en agitación constante. Los fragmentos de DNA se transfirieron a una membrana de Nylon cargada positivamente mediante un equipo de transferencia con presión negativa (Bio-Rad, México, D.F., México). La transferencia se llevó a cabo aplicando una presión de 5 pulgadas de mercurio por 2 h. Una vez transferidos los fragmentos a la membrana, éstos fueron irradiados con luz UV ( $1200 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) para su fijación por entrecruzamiento usando el equipo

Ultraviolet Crosslinker (UVP, Cambridge, Reino Unido). Se realizó la hibridación utilizando como sonda un segmento del elemento de inserción IS6110 y su detección se realizó por quimioluminiscencia. Finalmente, se determinó el número y localización del elemento IS6110 en cada una de las muestras analizadas.

### **6.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Compuestos UCI-05 y UCI-14 en las Clonas H37Rv y CIBIN99**

La evaluación de la actividad anti-TB in vitro de los compuestos UCI-05 y UCI-14 se realizó utilizando el método modificado de microdilución en placa con el compuesto alamar azul (Molina-Salinas et al., 2006) con el apoyo de la Dra. Gloria María Molina Salinas. El fármaco rifampicina se utilizó como control para la cepa y clonas H37Rv (sensibles a los fármacos de primera línea) a una concentración final de 0.06 a 2.00 µg/mL, y el fármaco ofloxacina se utilizó como control para el aislado y clonas CIBIN99 (multifármacorresistentes) a una concentración final de 0.50 a 16.00 µg/mL. La cepa H37Rv es sensible a los dos fármacos utilizados como control mientras que el aislado CIBIN99 es sensible a ofloxacina y resistente a rifampicina. Para llevar a cabo el procedimiento, los compuestos UCI-05 y UCI-14 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se ajustaron a una concentración de 1 mg/mL. Se depositaron 4 µL de los compuestos UCI en 196 µL de medio de cultivo en una microplaca de 96 pozos y se realizaron diluciones seriales a partir de 1:2 hasta 1:32 para obtener concentraciones finales de los compuestos UCI-05 y UCI-14 de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.3125 µg/mL. Como parte de los controles en la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias se incluyó al fármaco etambutol. A cada pozo con el compuesto UCI y los controles se adicionaron 100 µL de los cultivos de *M. tuberculosis* ajustados al estándar 1 de McFarland. Las microplacas se incubaron a 37 °C por 5 días en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>; al quinto día, se añadió una mezcla de 1.6:1 (v/v) de alamar azul y tween 80 al 20% (v/v) y se incubaron nuevamente a 37 °C por 24 h. Para la interpretación de resultados, el viraje del color azul a rosa es indicativo de crecimiento bacteriano. La CMI para cada compuesto es la menor concentración que inhibe el crecimiento bacteriano (evita el cambio de azul a cualquier tonalidad de violeta o rosa). En todos los casos, los resultados se confirmaron por observación del crecimiento micobacteriano a través de un microscopio invertido de campo claro con un aumento de 100×.

### **6.3. Tratamiento de las Clonas H37Rv y CIBIN99 con los Compuestos UCI-05 y UCI-14**

Las clonas H37Rv y CIBIN99 se cultivaron en medio LJ por 2 a 3 semanas a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Una vez observado el crecimiento micobacteriano característico, se tomó una porción del cultivo y se realizó una suspensión en tubos de 13×100 mm conteniendo 2 mL de agua desionizada estéril y 6 perlas de vidrio. La suspensión se agitó por 2 min y se dejó sedimentar por aproximadamente 5 min. Se inocularon 100 µL de la suspensión en 3 mL de medio líquido 7H9 suplementado con 10% de OADC. El cultivo se incubó a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una turbidez equivalente al estándar 2.0 a 3.0 de McFarland. Los cultivos se agitaron en vortex cada 3 días. Se realizaron cultivos de 15 mL por triplicado para cada una de las clonas C-1, C-2 y C-3 de H37Rv y CIBIN99; una alícuota de 1 mL del cultivo con crecimiento micobacteriano entre 2.0-3.0 de McFarland se inoculó en 15 mL de medio 7H9 suplementado con 10% de OADC. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en agitación constante a 300 rpm hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmica (i.e. McFarland 3 y 4.). Las replicas de los cultivos de cada una de las clonas se mezclaron para obtener un cultivo homogéneo y posteriormente se dividieron en alícuotas de 10 mL para su tratamiento con los compuestos UCI. A los cultivos se les adicionó los compuestos UCI-05 y UCI-14 utilizando una concentración equivalente a su CMI (tabla 6) con una concentración final de 0.1% DMSO y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en agitación constante a 300 rpm por 4 horas. El tratamiento con DMSO a la misma concentración se utilizó como control. Transcurrido el tiempo de incubación se llevó a cabo la extracción de RNA total en cada uno de los cultivos.

### **6.4. Extracción de RNA Total de las Poblaciones Clonales H37Rv y CIBIN99 de M. tuberculosis**

Una vez realizado el tratamiento de las clonas de M. tuberculosis H37Rv y CIBIN99 con los compuestos UCI y el control DMSO de la manera descrita en la sección anterior, se realizó la medición de la turbidez de los cultivos en el nefelómetro. Posteriormente, los cultivos de 10 mL fueron centrifugados por 20 min a 3,390 rpm a 4°C, se desechó el medio de cultivo y el RNA total se aisló en cada

una de las clonas de acuerdo a las instrucciones provistas en el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La pastilla bacteriana se resuspendió en 800  $\mu$ L del reactivo TRIzol, la muestra se transfirió a tubos de 1.5 mL y se incubó por 20 min a temperatura ambiente, agitando por pipeteo suave cada 10 min; las muestras fueron transferidas a tubos FastPrep conteniendo una matriz de esferas de sílica de 0.1 mm. Las muestras se agitaron en el equipo FastPrep-24 por 20 s a una velocidad de 6 m/s, seguido de una incubación en hielo por 2 min; este procedimiento de agitación se realizó tres veces consecutivas. Las muestras se centrifugaron por 3 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente, el sobrenadante se transfirió a tubos de 1.5 mL, se adicionaron 200  $\mu$ L de cloroformo y las muestras se incubaron 3 min a temperatura ambiente. Después las muestras se centrifugaron por 15 min a 12,000 rpm a 4 °C. Posteriormente, se recuperó la fase acuosa y el RNA total se precipitó con isopropanol (500  $\mu$ L), se realizaron 2 lavados con 1 mL de etanol frío al 75 %. Se desechó el etanol y se dejó evaporar el etanol restante a temperatura ambiente. El RNA total aislado se resuspendió en 20  $\mu$ L de buffer TE 1 $\times$ . La cuantificación y pureza del RNA total aislado se determinó por espectrofotometría con luz UV y la integridad se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con 0.5  $\mu$ L de bromuro de etidio [10 mg/mL]. El RNA total se almacenó a -70 °C hasta su utilización.

## **6.6. Retrotranscripción**

El RNA total obtenido fue tratado con la enzima DNasa I para digerir el DNA genómico presente en la muestra. A 2  $\mu$ g de RNA total se adicionó 1 U de DNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen final de 5  $\mu$ L.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV y hexámeros aleatorios como primers (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se prepararon dos mezclas de reacción de manera independiente; la mezcla de reacción 1 contenía 2  $\mu$ g de RNA total, hexámeros aleatorios (2.5 ng/ $\mu$ L) y dNTPs (0.5 mM de ATP, CTP, TTP y GTP). La mezcla 2 se preparó con el buffer First Strand 1 $\times$ , DTT 10 mM, y 40 U de RNasa OUT® (Invitrogen). La mezcla 1 se incubó a 65 °C por 5 min y se enfrió en hielo por 5 min. La mezcla 2 se agregó a la mezcla 1 y se incubó a 37 °C por 2 min.

Posteriormente se adicionaron 200 U de enzima transcriptasa reversa M-MLV y se incubó por 10 min a 25 °C, seguido de una incubación a 37 °C por 50 min y finalmente la transcriptasa reversa se inactivó a 70 °C por 15 min.

### 6.7. Evaluación de Funcionalidad de RNA Extraído de *M. tuberculosis*

Para verificar la funcionalidad del RNA, se llevó a cabo la amplificación del gen constitutivo rrs que codifica para la subunidad ribosomal 16S. La mezcla de reacción fue preparada con los siguientes componentes: Buffer de PCR 1×, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 5 ng/μL del primer rrs F1 (5'-GTCAGGATATTTCTAAATACCTTTGG-3'), 5 ng/μL del primer rrs R1 (5'-CACCTCAGCGTCAGTACTG-3'), 0.625 U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) y 2 μL de cDNA. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA) utilizando las condiciones de amplificación mostradas en la tabla 3.

**Tabla 3**

#### Condiciones de amplificación del gen rrs de *M. tuberculosis*

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	5 min	1
94 °C	1 min	35
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1
18 °C	Indefinido	

### 6.8. Hibridación de Microarreglos y Análisis de Datos

Para los análisis de expresión génica se utilizaron microchips con secuencias antisentido de *M. tuberculosis* acoplados a la plataforma Affymetrix. Los chips fueron sintetizados usando como referencia a la secuencia genómica completa de la cepa de referencia H37Rv de *M. tuberculosis*. El procedimiento de hibridación de los microarreglos se realizó en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) con el apoyo de la M. en C. Laura Uribe Figueroa, el M. en C. Raúl

Mojica Espinosa y el C. Dan Jerzain Gutiérrez Fuentes. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: La calidad del RNA se evaluó usando el Bioanalizador RNA 6000 Nano Assay, Agilent 2100 (Agilent Technologies). La cuantificación del RNA se realizó mediante espectrofotometría con luz UV. Para la síntesis del cDNA se utilizaron 10 µg de RNA total, transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA) y hexámeros aleatorios (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA). La eliminación del RNA se realizó mediante la adición de NaOH 1N y posteriormente se adicionó HCl 1N para neutralizar la reacción. La purificación del cDNA se llevó a cabo utilizando el sistema de purificación MiniElute PCR Purification 96 UF plates (QIAGEN, Hilden, Germany) y la cuantificación del DNA se llevó a cabo por espectrofotometría con luz UV a una longitud de onda de 260 nm. El cDNA fue fragmentado utilizando la enzima DNasa I (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL. USA) y marcado en su extremo 3' usando 60 U de la enzima Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Promega, Madison, WI. USA) más 7.5 mM de reactivo de marcaje (Biotinylated GeneChip DNA Labeling Reagent). El cDNA marcado se calentó a 95 °C y se hibridó en los chips Affymetrix (GeneChip TB-All microarrays) a 45 °C en rotación constante a 60 rpm por 17 h en un horno de hibridación Affymetrix GeneChip Hybridization Oven 640. Los chips fueron después lavados con soluciones de baja y alta astringencia y teñidos con estreptavidina-ficoeritrina usando el equipo Affymetrix Fluidics Station 450. Para la medición de la señal de fluorescencia se utilizó el equipo GeneChip Scanner 3000 7G mientras que para la medición de la intensidad de señal y los datos de control de calidad de los arreglos escaneados se usó el equipo Affymetrix GeneChip Expression Console.

El análisis de datos se realizó con el apoyo del Mat. Iván Imaz Rosshandler y la Dra. Claudia Rangel Escareño del Departamento de Genómica Computacional del INMEGEN, así como del L.B.G. José Dávila Velderrain del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los datos de microarreglos fueron pre-procesados usando el algoritmo RMA (Irizarry et al., 2003), en el cual los valores crudos se normalizaron mediante una corrección de fondo, transformación a logaritmo base 2 y el cálculo sintetizado de la señal. Para la identificación de expresión diferencial se utilizó un modelo lineal limma (limma package, Smyth, 2004). Finalmente se crearon listas de genes expresados diferencialmente para cada una de las condiciones de tratamiento mediante la selección de los genes con

significancia estadística de acuerdo a dos parámetros: 1) tasa de cambio en escala logarítmica mayor a 1 ( $\log \text{fold-change} \geq |1|$  ó  $\log\text{-Fch} \geq |1|$ ) y 2) estadístico  $B > 0$  ( $\log \text{odds} > 0$ ); en donde  $\log\text{-Fch}$  representa el valor de cambio en logaritmo base 2 entre dos condiciones para cada gen. Los valores de  $\log\text{-Fch}$  positivos ( $\log\text{-Fch} > 0$ ) indican un incremento en la expresión del gen y los valores negativos ( $\log\text{-Fch} < 0$ ) indican una disminución en la expresión. Por otro lado, los valores del estadístico  $B$  ( $\log\text{-odds}$ ) representan la posibilidad de que un gen este diferencialmente expresado, de tal manera que un valor de  $B=0$  indica que existe la misma posibilidad (50 %) de que el gen este o no expresado diferencialmente.

## 6.9. Ensayos de PCR en Tiempo Real

Para estos ensayos se utilizó la misma muestra de RNA usada en los ensayos de microarreglos. Las secuencias de los genes seleccionados se enviaron a la compañía Applied Biosystems para el diseño y síntesis de primers y sondas TaqMan® específicas (Tabla 4).

Los ensayos de PCR cuantitativa se llevaron a cabo utilizando el equipo 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo la mezcla maestra de PCR para ensayos TaqMan® 1 $\times$  (Applied Biosystems) más 400 mM de iniciadores/sondas y 3  $\mu\text{L}$  de cDNA como templado. La amplificación se realizó en el modo estándar utilizando las siguientes condiciones: una incubación inicial a 50 °C por 2 min, seguido por 95 °C por 10 min; posteriormente 40 ciclos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min.

Se estableció una curva de rango dinámico para cada gen, en la cual se realizaron diluciones seriales de cDNA a partir de 1:16 hasta 1:1024; se incluyeron además triplicados técnicos y controles negativos en todos los ensayos. Se utilizó como control endógeno el análisis de la expresión del gen *rrs* en paralelo. Se utilizaron los valores del umbral de detección ( $C_t$ ) para el análisis mediante el método comparativo ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) propuesto por Livak y Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001).

**Tabla 4**

**Iniciadores y sondas TaqMan® para los genes de *M. tuberculosis* utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real**

<b>Gen</b>	<b>Primers (5'-3')</b>	<b>Sondas (FAM 5'-3' NFQ)</b>
desA2	F- TCG AGT CCA ACA CGT GAT GAA G R- CGC TCG TAG AAC GCC ATG TA	CTG CGT GTA CTT CTC G
esxG	F- CGG CTC AGG CGT TTC AC R- CCG CCG CCA CAA ACC	CCG CCG ACG ACT CC
esxH	F- CAG GCC GCG TTG CA R- CTG CCA CGC CTG ATA CGT	CCC TGC CAC GCA CTC
esxI	F- GAC CGC GAG TGA CTT TTG G R- GCT CGT AGA TCA CCT GGA AGT TAC	CAG GCC GCC GAA CCG
gltA1	F- CGG TTA TGC GCA GAA CTT CCT R- CAC GAC GGC GGT TTC G	ACC TCC CCG AAG CAC
groES	F- GGA GGG CAC CGT CGT T R- GTC ACC CTC CGC AAC GT	CTC GCC GTC CTC GTC C
hspX	F- GTC CGC GAT GGT CAG CT R- CGA AGG AAC CGT ACG CGA AT	ACC GTC GAA GTC CTT C
infA	F- CCT GCC CAA TGC CAT GTT C R- ACG CAT CTT GCC GCT GAT	CCT TGT GGC CGT TCT C
iniB	F- GCT AGC CAG ATC GGT GTC T R- CAG GCC GCT GAC ATT GC	CCG CCG AGC CCA CCA C
lldD2	F- TCG ACG CGA TGG GAC AC R- GGC CAG CGA TCC AGT GAA	TTG ACC ACC GAA CCG C
lprQ	F- GCG TCC TCG GGA GTA CTA C R- CCG AAC GGC AGC CCA T	TCG ACG CCA AGC TGT
mmaA4	F- GAC CGG ATT GTG TCG ATC GAA R- CGC TTG AAG AAG TCG TCG TAG TT	TCG TGC CCG AAG TGC
nrhH	F- AAG GTT GAT ATC AGC CTG GAT TCC R- CGA CGG GTG CTT GTA GGT AA	CCC AGC GCC ATC ACG T
rpml	F- CGG TAC CGG CAA GAT CGT R- CGG GTG CTC GGC TTG T	ACG GTT GGC CTT CTG C
rpsO	F- ATC GCG TTG CTG ACC AAA C R- CGA ATG ATG GTC GTG CTT GTG	CAT CGC CGA CCT CAC C
tatA	F- CGC TGT CGT GGT GAT CGT R- TCG GAC TTA AAG ATT CGC AAT GAC T	CTT GGC ACC GAA CAA C
whiB1	F- GCC CGG TCA CCA CAG A R- CAG ACG CCC GAG TCC TG	CTG GGC ACT GAA TAC C



## **6.10. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los valores promedio obtenidos por PCR en tiempo real se realizó con el apoyo de la Dra. Fabiola Castorena Torres del Tecnológico de Monterrey. Los resultados de PCR en tiempo real se conjuntaron y se presentaron como la media de las replicas biológicas y técnicas con su respectiva desviación estándar. Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando la prueba t de student y el criterio de significancia se estableció en un valor de  $p \leq 0.05$  en todos los casos. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el software STATA versión 8.1 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

## **6.11. Análisis del Mecanismo de Acción de los Compuestos UCI en M. tuberculosis**

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de expresión génica se realizó la identificación de los procesos celulares y las rutas metabólicas posiblemente afectadas durante el tratamiento de M. tuberculosis con los compuestos UCI-05 y UCI-14. El análisis se llevó a cabo utilizando la base de datos genómica Tuberculist, y la plataforma integral de tuberculosis TBdatabase.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Aislamiento y Caracterización de Clonas de *M. tuberculosis*

Debido a que los aislados clínicos y cultivos en el laboratorio están compuestos de poblaciones heterogéneas, las cuales pueden interferir en el análisis de expresión genética por efecto de un tratamiento, se realizó el aislamiento de poblaciones clonales para cada fenotipo de farmacosenibilidad o fármacorresistencia. Se aislaron 3 poblaciones clonales a partir de la cepa H37Rv, la cual es sensible a fármacos anti-TB de primera línea, y 3 poblaciones clonales del aislado clínico CIBIN:UMF:15:99 (denominada en adelante como CIBIN99), el cual es resistente a estreptomicina (S), isoniazida (I), rifampicina (R), etambutol (E) y pirazinamida (P). El proceso de obtención de clonas está señalado en la sección de Materiales y Métodos.

Para llevar a cabo la caracterización fenotípica de las clonas aisladas se determinó la sensibilidad a los fármacos de primera línea (SIREP) por medio del sistema Bactec 960 y por medio de cinéticas de crecimiento en presencia y ausencia de 4 de los fármacos de primera línea (SIRE). Respecto a la caracterización con el sistema Bactec 960, se determinó que las tres clonas aisladas a partir de la cepa sensible H37Rv mostraron sensibilidad a los 5 fármacos de primera línea mientras que las tres clonas obtenidas a partir del aislado multifármacorresistente CIBIN99 mostraron resistencia a 4 de los fármacos de primera línea (SIRE) (Tabla 5).

Con la finalidad de confirmar la resistencia o sensibilidad a pirazinamida de las cepas y las clonas aisladas se realizó la prueba de pirazinamidasa. Después de realizado el ensayo como se describe en la sección de Materiales y Métodos, se observó la aparición de una banda rosa en la superficie del medio de cultivo de la cepa y clonas H37Rv, lo que indica la hidrólisis enzimática de pirazinamida a ácido pirazinoico (componente activo), y por lo tanto se considera como positivo para la actividad de pirazinamidasa, lo cual hace susceptible a la cepa y clonas H37Rv al fármaco pirazinamida. La ausencia de la banda de color rosa observada en los

cultivos de la cepa y clonas CIBIN99 indica la ausencia de actividad de pirazinamidas, por lo tanto son resistentes a la pirazinamida (Figura10 Tabla 5).

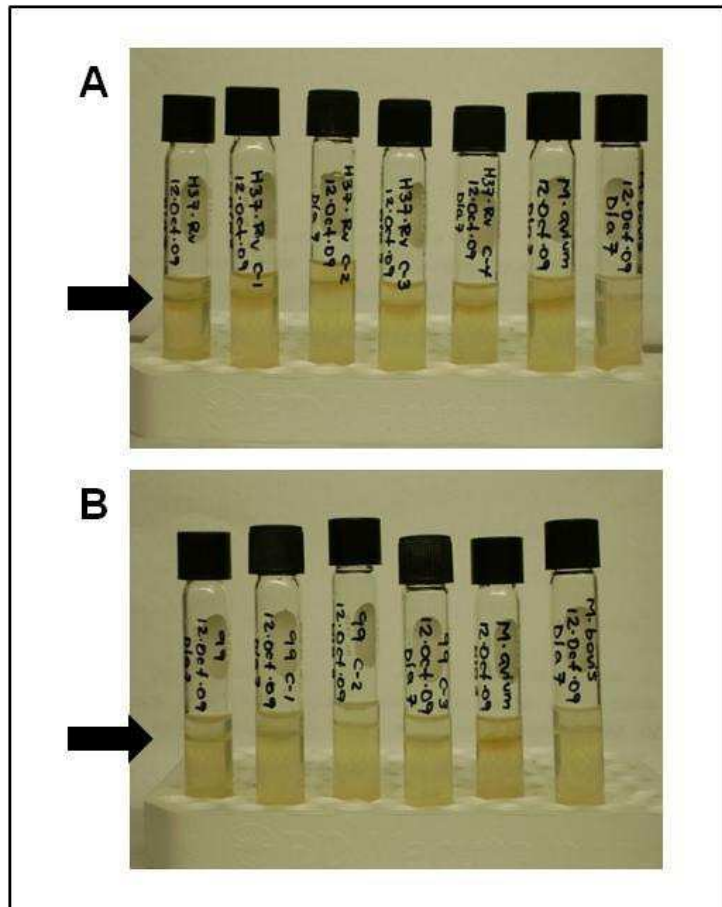
**Tabla 5**

**Perfiles de sensibilidad y resistencia a fármacos de primera línea en cepas y clonas de *M. tuberculosis***

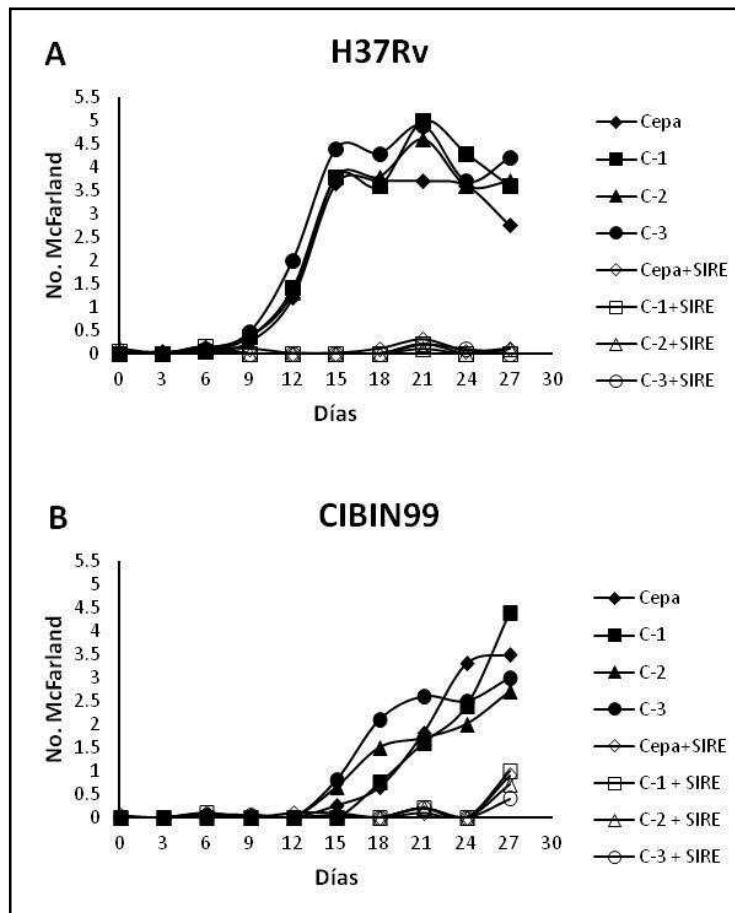
Cepa/Clona	S	I	R	E	P
H37Rv cepa	s	s	s	s	s
H37Rv C-1	s	s	s	s	s
H37Rv C-2	s	s	s	s	s
H37Rv C-3	s	s	s	s	s
CIBIN99 cepa	r	r	r	r	r
CIBIN99 C-1	r	r	r	r	r
CIBIN99 C-2	r	r	r	r	r
CIBIN99 C-3	r	r	r	r	r

La denotación C-1, C-2 y C-3 hace referencia a cada una de las clonas obtenidas de la cepa respectiva. S, estreptomina; I, isoniazida; R, rifampicina; E, etambutol; P, Pirazinamida; s, sensible; r, resistente.

Para confirmar los perfiles de sensibilidad y resistencia a los fármacos, se realizaron cinéticas de crecimiento en presencia y ausencia de 4 fármacos (estreptomina, isoniazida, rifampicina y etambutol, SIRE); pirazinamida no se incluyó en la combinación de fármacos debido a que se ha reportado que tanto la pirazinamida como el ácido pirazinoico (componente activo) tienen acción anti-TB solamente a pH ácido (Zhang et al., 2003). Las cinéticas de crecimiento mostraron que la cepa y clonas H37Rv sensibles fueron capaces de crecer en ausencia de los fármacos pero no en presencia de estos (Figura 11, Panel A). La cepa y clonas CIBIN99 multifármacorresistentes mostraron crecimiento tanto en ausencia como en presencia de los fármacos, aunque en estos últimos se observó a partir del día 27 (Figura 11, Panel B).



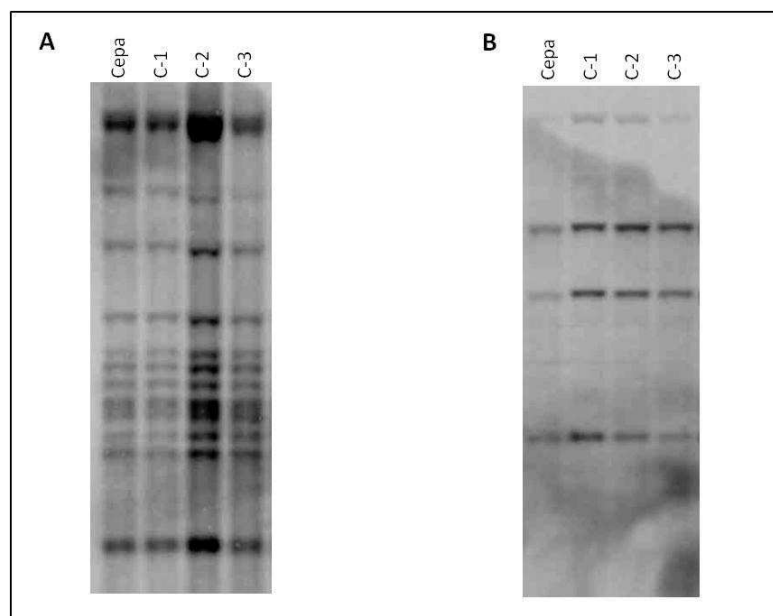
**Figura 10. Determinación de la sensibilidad o resistencia a pirazinamida mediante la prueba de pirazinamidasa.** En el panel A se muestran los resultados de la cepa y clonas H37Rv y en el panel B los correspondientes a la cepa y clonas CIBIN99. Como controles positivo y negativo de la actividad de pirazinamidasa se utilizaron las cepas *M. avium* y *M. bovis*, respectivamente. La aparición de una banda rosa (flecha) en la superficie del medio de cultivo indica la hidrólisis enzimática de pirazinamida a su componente activo, el ácido pirazinoico, y se considera como positivo a la actividad de pirazinamidasa, lo cual lo hace susceptible al fármaco. La ausencia de la banda de color rosa indica la inhabilidad para metabolizar dicho fármaco, y por lo tanto se considera resistente al mismo.



**Figura 11. Determinación de la cinética de crecimiento de la cepa y clonas H37Rv sensibles y CIBIN99 multifármacorresistentes en ausencia y presencia de 4 fármacos de primera línea.** Se utilizaron las concentraciones críticas de cada uno de los fármacos (SIRE: estreptomicina, 2µg/mL; isoniazida, 0.1µg/mL; rifampicina, 2µg/mL; y etambutol, 2µg/mL). Las lecturas del crecimiento bacteriano se realizaron cada 3 días utilizando unidades de turbidez mediante estándares de McFarland. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*, respectivamente. Los símbolos cerrados (◆■▲●) representan cultivos de las cepas H37Rv y CIBIN99 y sus clonas cultivadas sin fármacos de primera línea; los símbolos abiertos (◇□△○) representan cultivos de las cepas H37Rv y CIBIN99 y sus clonas cultivados en presencia de los fármacos de primera línea.

Con la finalidad de realizar la caracterización genotípica de las clonas aisladas se analizaron dos regiones del genoma de *M. tuberculosis*: 1) la presencia y ausencia de espaciadores de secuencia única ubicados en el locus de DR, y 2) el número y localización del elemento de inserción IS6110 mediante los métodos de spoligotyping y RFLP-IS6110, respectivamente. Los resultados obtenidos por spoligotyping mostraron que la cepa H37Rv y sus clonas carecen de los espaciadores 20 y 21, mientras que la cepa CIBIN99 y sus clonas carecen del espaciador 18. Todas las cepas y clonas analizadas carecen de los espaciadores 33 al 36 (Figura 12, panel

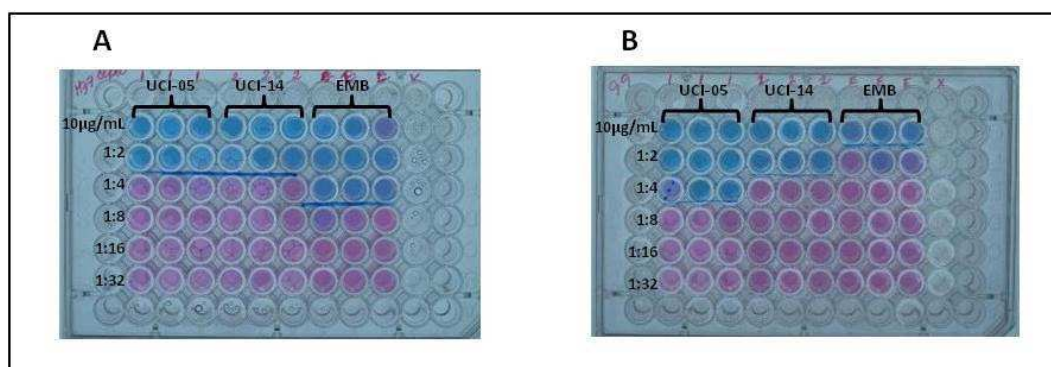




**Figura 13. Patrones de RFLP-IS6110 de cepas y clonas H37Rv sensibles y CIBIN99 multifármacorresistentes.** La cepa H37Rv y sus clonas presentan 15 copias del elemento de inserción IS6110 (Panel A), mientras que la cepa CIBIN99 y sus clonas presentan 4 copias de este elemento (Panel B). Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*.

## 7.2. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los Compuestos UCI-05 y UCI-14

Con la finalidad de determinar la CMI de los compuestos UCI en cada una de las cepas y clonas sensibles y multifármacorresistentes, y utilizar dicha concentración en los ensayos de expresión posteriores, se utilizó el método de alamar azul en microplaca para determinar las CMIs de los compuestos UCI-05 y UCI-14 en las cepas y clonas H37Rv y CIBIN99. La CMI del compuesto UCI-05 fue de 5  $\mu\text{g/mL}$  en la cepa H37Rv y sus clonas, y de 2.5  $\mu\text{g/mL}$  en la cepa CIBIN99 y sus clonas. Para el compuesto UCI-14, la CMI fue de 5  $\mu\text{g/mL}$  en la cepa H37Rv y 2 de sus clonas (C-2 y C-3), y para la clona H37Rv C-1 la CMI fue de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Para el mismo compuesto UCI-14, la CMI en la cepa CIBIN99 y sus tres clonas fue de 5  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 4, tabla 6).



**Figura 14. Determinación de la CMI de los compuestos UCI-05 y UCI-14.** Imagen representativa de los resultados obtenidos por el método de microdilución en placa utilizando el compuesto alamar azul para la obtención de las concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos UCI-05, UCI-14 utilizando el fármaco etambutol (EMB) como control. El panel A representa las CMIs obtenidas en la cepa H37Rv, y en el panel B se muestran las CMIs obtenidas en el aislado clínico CIBIN99 multifármacorresistente.

**Tabla 6**

**Concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos UCI-05 y UCI-14 en cepas y clonas de *M. tuberculosis***

Cepa/Clona	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	UCI-05	UCI-14
H37Rv cepa	5	5
H37Rv C-1	5	10
H37Rv C-2	5	5
H37Rv C-3	5	5
CIBIN99 cepa	2.5	5
CIBIN99 C-1	2.5	5
CIBIN99 C-2	2.5	5
CIBIN99 C-3	2.5	5

CMI: Concentración mínima inhibitoria  
 C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas  
 1, 2 y 3 de cada cepa de *M.*  
*tuberculosis*.

**7.3. Estandarización del Método de Extracción de RNA Total en *M. tuberculosis***

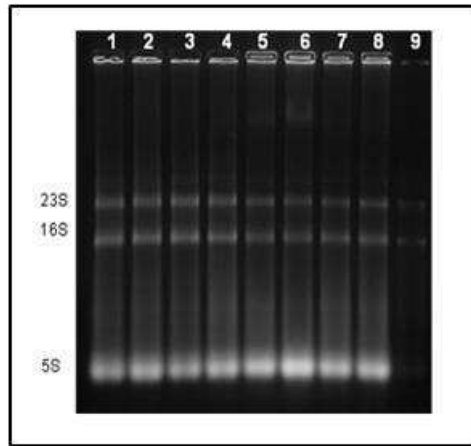
Con la objetivo de obtener RNA total de *M. tuberculosis* con una concentración y pureza apropiadas para su utilización en los ensayos de microarreglos y PCR en tiempo real, se utilizaron diferentes protocolos de extracción en cultivos líquidos de la cepa H37Rv (Tabla 7).



**Tabla 7****Métodos utilizados en este estudio para la extracción de RNA total de M. tuberculosis**

Protocolo utilizado	Obtención de RNA	Referencia
TRIzol + Kit de purificación de RNA Invitrogen	No	TRIzol Plus RNA Purification Kit. Invitrogen. Hoja técnica.
TRIzol	No	TRIzol Reagent. Invitrogen. Hoja técnica.
Cloroformo:metanol	No	Mahenthiralingam, 1998
TRIzol + solución de lisis	No	Este estudio
TRIzol + SDS + Lisozima + Proteinasa K	No	Este estudio
Kit Qiagen + Fast-Prep	No	Este estudio
RNAlater + TRIzol + Fast-Prep	Si	Fu L. and Shinnick T. 2007. Con modificaciones.
RNAlater + PBS 1× + TRIzol + Fast-Prep	No reproducible	RNA later. Ambion. Hoja técnica.
TRIzol + Fast-Prep	Si	Este estudio

El método que brindó los mejores resultados fue utilizando el reactivo TRIzol en combinación con el sistema de agitación FastPrep, el cual demostró ser reproducible (Figura 15 y Tabla 8). La integridad del RNA total aislado de la cepa M. tuberculosis H37Rv se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 15) y se determinó la concentración y pureza por espectrofotometría con luz UV (Tabla 8).



**Figura 15. Imagen del RNA total obtenido a partir de cultivos de las cepas H37Rv y CIBIN99 en ausencia y presencia de dimetilsulfóxido (DMSO).** Carriles 1,3: Cepa H37Rv sin tratamiento, carriles 2,4: Cepa H37Rv tratada con DMSO, carriles 5,7: cepa CIBIN99 sin tratamiento, carriles 6,8: cepa CIBIN99 tratada con DMSO, carril 9: muestra control de RNA total de *M. tuberculosis*. Del lado derecho de la imagen se señalan las subunidades del RNA ribosomal 23S, 16S y 5S.

**Tabla 8**

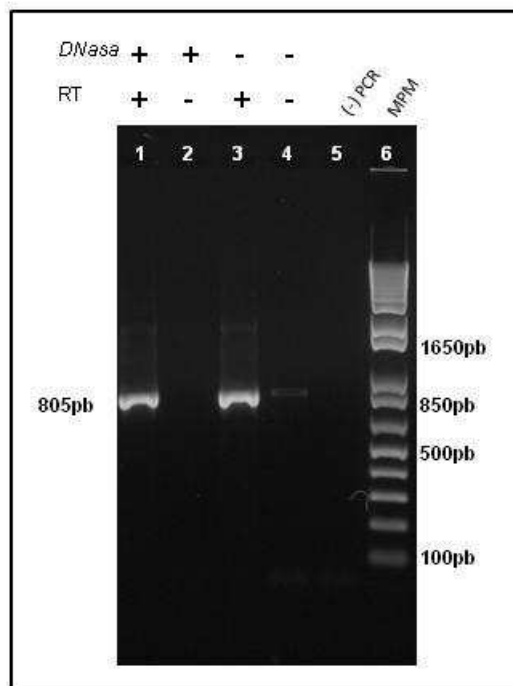
**Valores de cuantificación y pureza del RNA total aislado a partir de las cepas H37Rv y CIBIN99 en ausencia y presencia de DMSO**

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pureza ( $A_{260/280 \text{ nm}}$ )
H37RV sin tratamiento (1)	2.54	1.99
H37RV DMSO (1)	2.521	2.0
H37RV sin tratamiento (2)	2.43	2.01
H37RV DMSO (2)	2.44	1.98
CIBIN99 sin tratamiento (1)	2.82	1.89
CIBIN99 DMSO (1)	3.27	1.86
CIBIN99 sin tratamiento (2)	2.35	1.86
CIBIN99 DMSO (2)	2.73	1.86

Los números entre paréntesis corresponden al primero (1) y segundo (2) ensayo independiente.

### 7.3.1. Funcionalidad del RNA Total Obtenido de la Cepa H37Rv

Para verificar la funcionalidad del RNA total de *M. tuberculosis* obtenido por el método mencionado, se llevó a cabo la amplificación del gen constitutivo *rrs* por PCR. El RNA total aislado se trató con DNasa I con la finalidad de eliminar el DNA genómico presente en la muestra; posteriormente se realizó una reacción de transcripción reversa para la obtención de DNA complementario (cDNA). A partir del cDNA sintetizado se llevó a cabo la amplificación del gen constitutivo *rrs*, obteniendo un producto de 805 pb (Figura 16, carril 1). Las muestras que no fueron tratadas con DNasa I generaron un producto de amplificación (Figura 16, carriles 3 y 4). Con estos resultados se demostró que la amplificación del gen constitutivo se genera a partir RNAm.



**Figura 16. Amplificación del gen constitutivo *rrs* de *M. tuberculosis* por PCR.** Se observó la obtención de un producto de amplificación (805 pb) proveniente del RNA mensajero del gen *rrs*. Los símbolos + y - se refiere a la adición o no adición de las enzimas DNasa I o transcriptasa reversa (RT); MPM significa marcador de peso molecular y (-) PCR representa al control negativo del ensayo.

#### **7.4. Extracción de RNA Total de Clonas de M. tuberculosis Tratadas con los Compuestos UCI-05 y UCI-14**

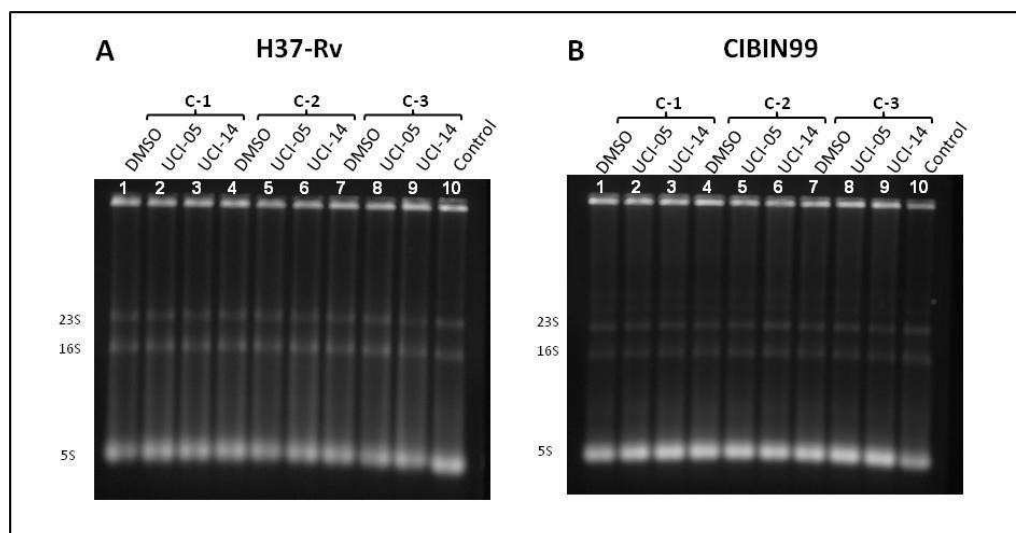
Con la finalidad de obtener el RNA total de las clonas de M. tuberculosis tratadas con los compuestos UCI, las clonas H37Rv y CIBIN99 se sembraron en medio líquido y se cultivaron hasta alcanzar la fase logarítmica a una turbidez de entre 2.8 y 4 unidades de McFarland (Tabla 9, Peñuelas-Urquides et al., 2013).

**Tabla 9**

**Condiciones del cultivo de las clonas H37Rv y CIBIN99 utilizadas para la extracción de RNA total**

<b>Clonas</b>	<b>Días de incubación</b>	<b>Turbidez McF)</b>
H37Rv	9	2.8 - 3.2
CIBIN99	11	3.3 - 3.4

Posteriormente los cultivos fueron tratados por 4 h con los compuestos UCI-05 y UCI-14 utilizando las CMIs obtenidas previamente (Tabla 6); como control las clonas fueron tratadas con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO), vehículo en el cual están resuspendidos los compuestos UCI. El RNA total extraído de cada muestra presentó una integridad, concentración y pureza adecuadas para su utilización en la hibridación de microarreglos Affymetrix (Figura 17 y Tabla 10). Además, la funcionalidad del RNA total fue evaluada mediante la amplificación por PCR del gen constitutivo rrs, obteniendo una banda de amplificación de 805 pb en todas las muestras (Figura 18).

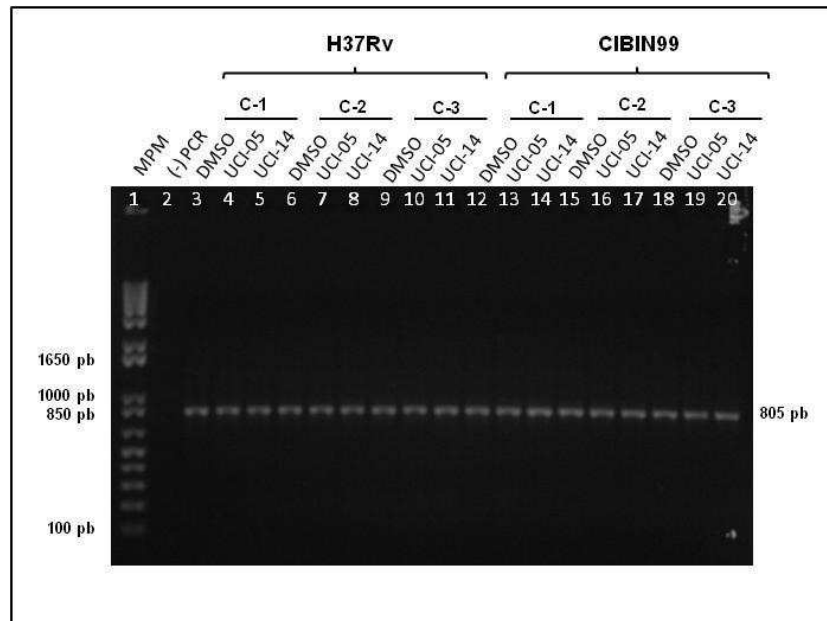


**Figura 17. Imágenes representativas de los geles con el RNA total extraído de los cultivos de las clonas de *M. tuberculosis* tratados con UCI-05, UCI-14 y dimetilsulfóxido (DMSO).** En el panel A se observan las muestras de RNA total de las clonas H37Rv y el panel B se observan las muestras correspondientes a las clonas CIBIN99. Se señalan las subunidades ribosomales 23S, 16S y 5S. C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa.

**Tabla 10**

**Concentración y pureza del RNA total extraído de los cultivos de clonas de *M. tuberculosis* tratados con dimetilsulfóxido (DMSO), UCI-05 y UCI-14**

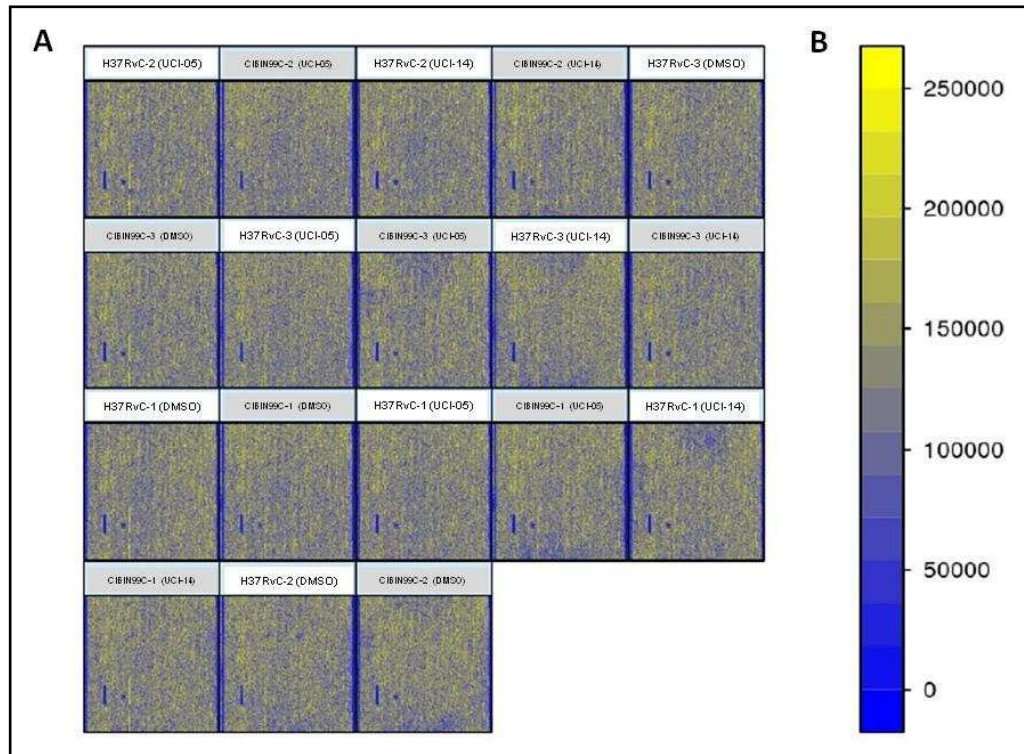
Clona	Tratamiento	Concentración (µg/mL)	Pureza ( $A_{260/280 \text{ nm}}$ )
H37Rv C-1	DMSO	1.368	2.00
	UCI-05	1.30	1.95
	UCI-14	1.42	1.97
H37Rv C-2	DMSO	1.31	1.91
	UCI-05	1.35	2.00
	UCI-14	1.12	1.97
H37Rv C-3	DMSO	1.42	2.07
	UCI-05	1.51	1.90
	UCI-14	1.92	1.89
CIBIN99 C-1	DMSO	1.60	2.01
	UCI-05	1.734	2.20
	UCI-14	1.62	1.99
CIBIN99 C-2	DMSO	1.53	1.99
	UCI-05	1.84	1.93
	UCI-14	1.64	1.99
CIBIN99 C-3	DMSO	1.51	2.03
	UCI-05	1.88	1.99
	UCI-14	1.67	2.02



**Figura 18. Amplificación por PCR del gen constitutivo rrs de las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con UCI-05, UCI-14 y dimetilsulfóxido (DMSO).** Se muestra el producto de amplificación por PCR correspondiente a un fragmento del gen rrs de 805 pb. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. El símbolo (-) PCR se refiere al control negativo de la PCR y MPM al marcador de peso molecular.

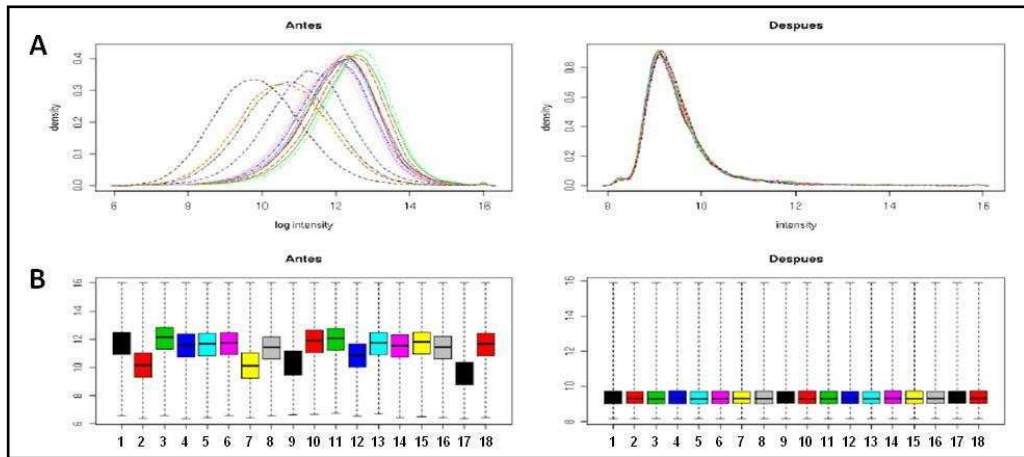
### 7.5. Microarreglos Genómicos de *M. tuberculosis*

Las muestras de RNA total extraídas de cada ensayo fueron enviadas al INMEGEN para su marcaje e hibridación en microarreglos genómicos utilizando la plataforma Affymetrix. Los resultados de la hibridación generaron patrones de intensidad de señal para cada uno de los microarreglos (Figura 19).

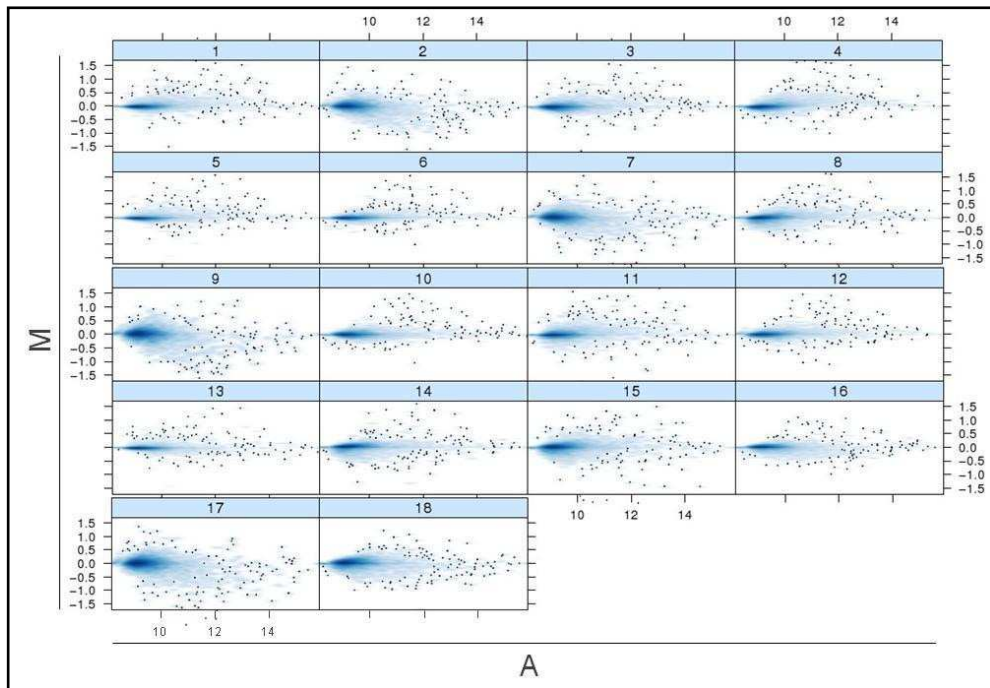


**Figura 19. Imagen de los rangos de intensidad de señal de los microarreglos.** (A) Paneles que representan los datos de intensidad de señal en cada una de las muestras después de la hibridación, (B) Rango de intensidad de señal.

Se llevó a cabo el pre-procesamiento de las muestras que consiste en la corrección de fondo, normalización y cálculo sintetizado de la señal mediante la aplicación del algoritmo MAS5 y rma [robust microarray analysis;(Irizarry et al., 2003)]. Las diferencias entre posición y dispersión de intensidad de señal, así como la dispersión de los datos en los estadísticos de los resultados arrojados por microarreglos quedaron ajustadas después del pre-procesamiento (Figura 20). Se visualizó la variabilidad de los datos obtenidos mediante gráficas MvA, las cuales permiten una comparación de la señal de los microarreglos mostrando el comportamiento de los datos respecto a una referencia definida, y para este caso se utilizó la media de intensidad de señal de los datos totales (Figura 21).



**Figura 20. Imagen de la distribución de la intensidad de señal de los microarreglos antes y después de la normalización de datos.** El panel A muestra la distribución de la intensidad de señal para cada uno de los microarreglos antes y después de la normalización, y el panel B muestra el comparativo de los análisis estadísticos por intensidad de la señal. Las muestras 11, 17 y 5 corresponden a las clonas 1, 2 y 3 de H37Rv tratadas con DMSO; las muestras 13, 1 y 7 a las clonas 1, 2 y 3 de H37Rv tratadas con el compuesto UCI-05; las muestras 15, 3 y 9 a las clonas 1, 2 y 3 de H37Rv tratadas con el compuesto UCI-14; las muestras 12, 18 y 6 a las clonas 1, 2 y 3 de CIBIN99 tratadas con DMSO; las muestras 14, 2 y 8 a las clonas 1, 2 y 3 de CIBIN99 tratadas con el compuesto UCI-05 y finalmente las muestras 16, 4 y 10 corresponden a las clonas 1, 2 y 3 de CIBIN99 tratadas con el compuesto UCI-14.



**Figura 21. Gráficas MvA de los datos de microarreglos.** Cada gráfica representa la relación de cambio a lo largo del rango de intensidades en escala logarítmica ( $\log_2$ ), en donde  $M = \log_2$  del microarreglo  $-\log_2$  de la referencia, y  $A$  es la media de todos los datos (referencia) representada por la fórmula  $A = 1/2 (\log_2 \text{ del microarreglo} + \log_2 \text{ de referencia})$ . Los paneles 1-18 representan los datos de intensidad de señal de los microarreglos de las clonas H37Rv y CIBIN99 comparados con la referencia.



## 7.6. Expresión Diferencial de Genes en Clonas de *M. tuberculosis* Tratadas con los Compuestos UCI-05 y UCI-14

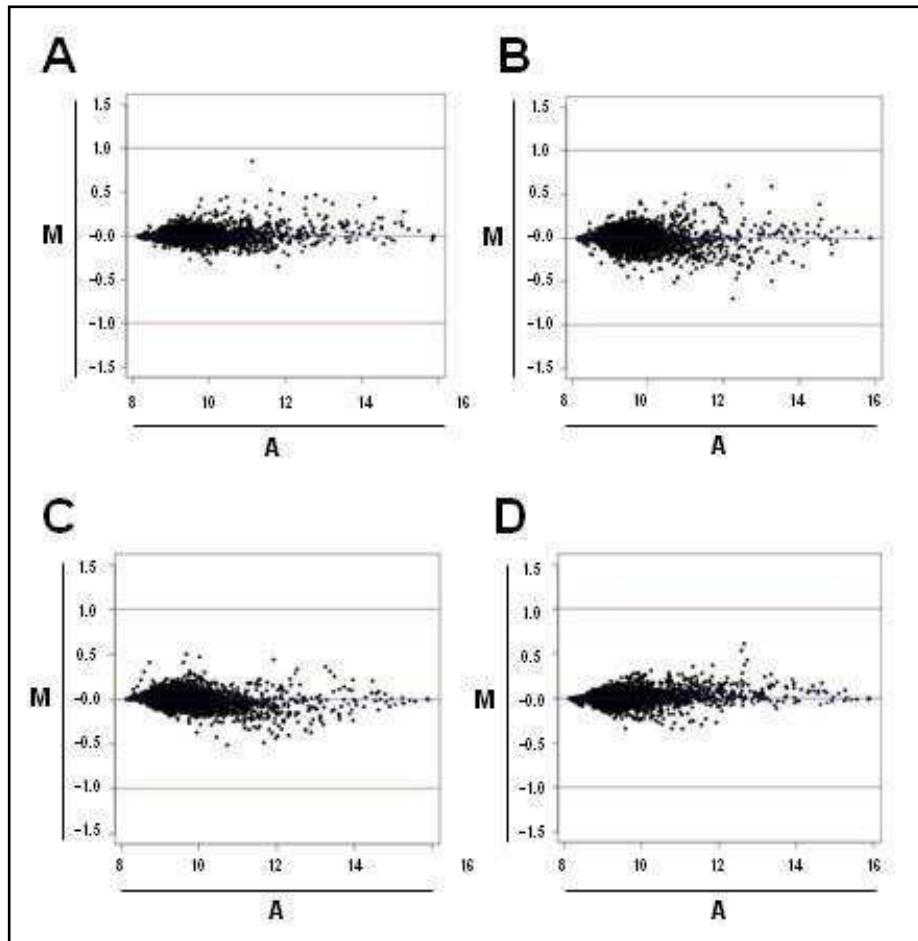
Con el objetivo de identificar diferencias en expresión génica debido al tratamiento con los compuestos UCI-05 y UCI-14 en *M. tuberculosis*, los datos normalizados de microarreglos fueron analizados utilizando el modelo lineal limma [limma package, (Smyth, 2004)]. Se seleccionaron los genes con diferencia en sus niveles de expresión de por lo menos 2 veces ( $\log\text{-Fch} \geq 1.0$ ) y con una certidumbre de al menos 50% ( $\log\text{ odds} > 0$ ). Siguiendo los parámetros antes mencionados, se realizaron comparaciones de las clonas tratadas con el control (DMSO) vs las clonas tratadas con los compuestos UCI-05 o UCI-14 (Tabla 11).

**Tabla 11**

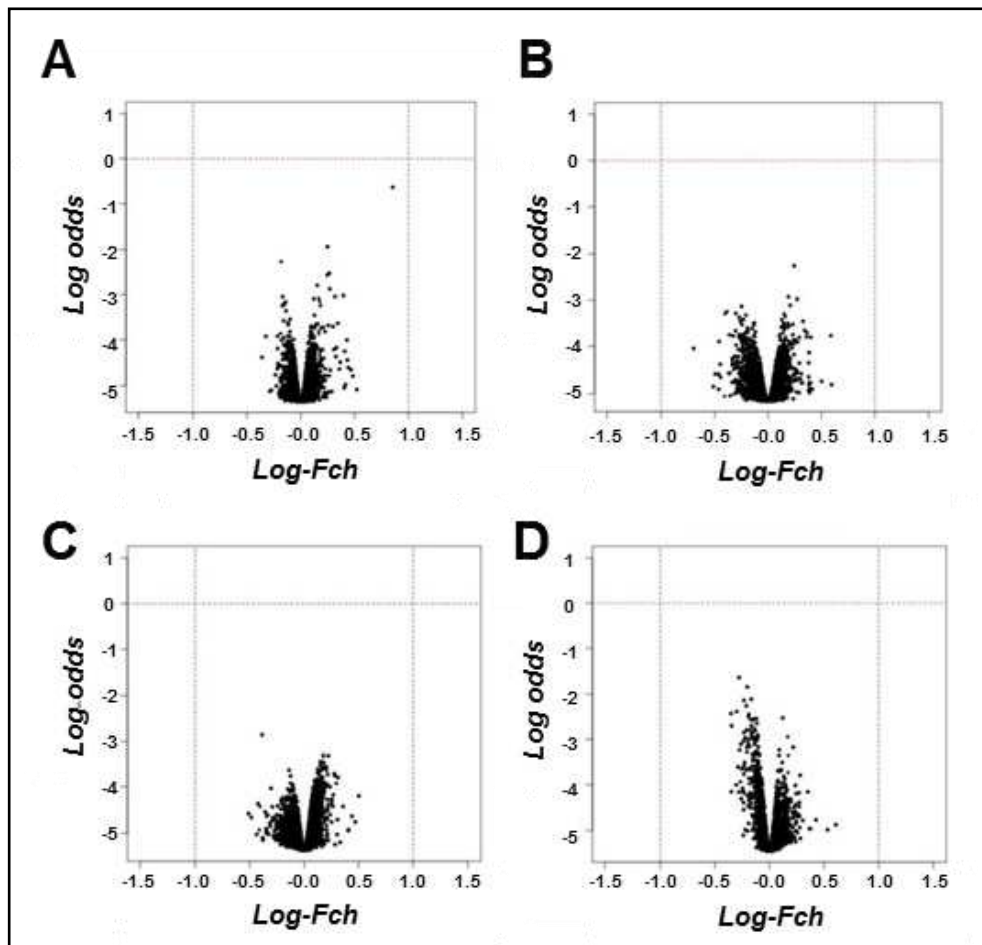
### Comparaciones por tratamiento con compuestos UCI-05 y UCI-14

Grupo	Clonas	Comparación
1	H37Rv C-1, C-2 y C-3	DMSO vs UCI-05
2	H37Rv C-1, C-2 y C-3	DMSO vs UCI-14
3	CIBIN99 C-1, C-2 y C-3	DMSO vs UCI-05
4	CIBIN99 C-1, C-2 y C-3	DMSO vs UCI-14

Tomando los parámetros antes mencionados, al realizar las comparaciones de las clonas por grupo de tratamiento y graficar los datos obtenidos en gráficas MvA y de volcán, no se observaron genes expresados de manera diferencial debido al tratamiento con los compuestos UCI (Figura 22 y 23).



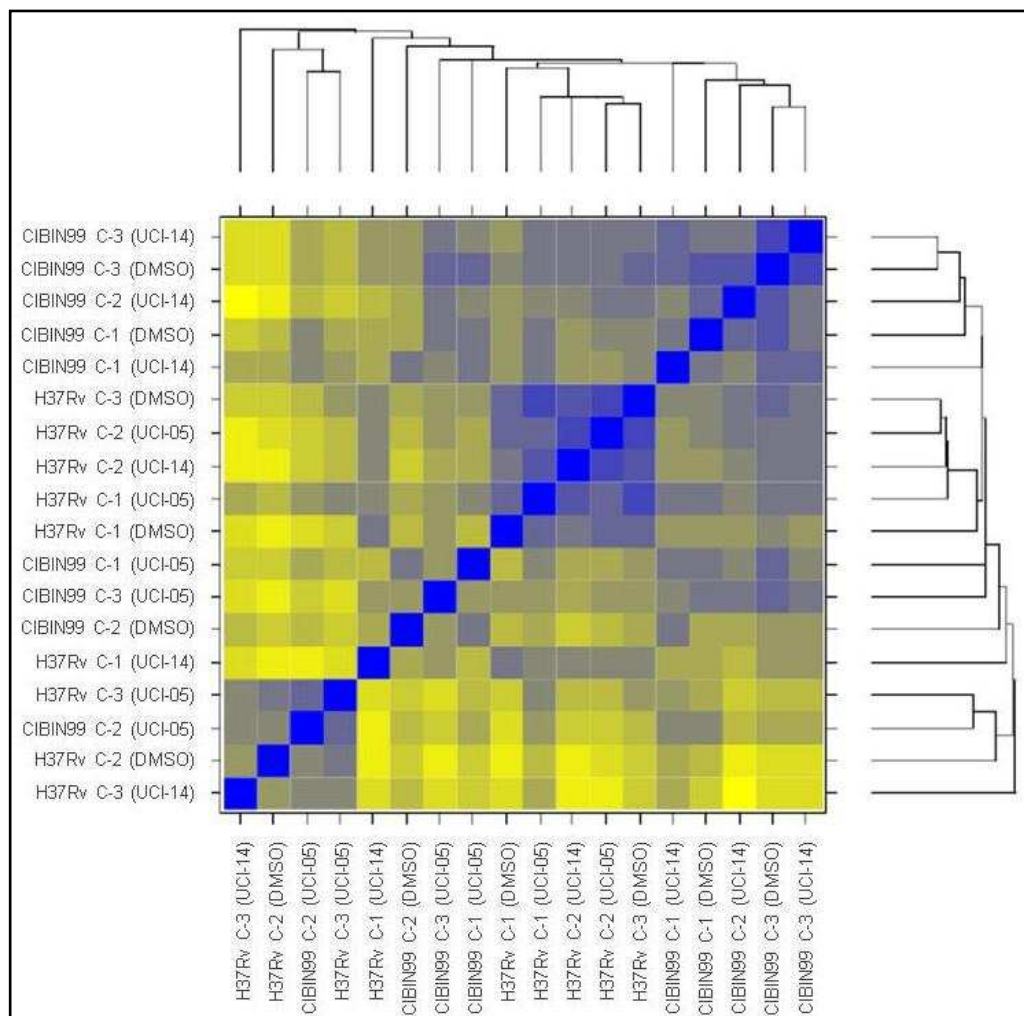
**Figura 22. Gráficas MvA de las comparaciones de la intensidad de señal de las clonas H37Rv y CIBIN99 agrupadas por tratamiento.** Cada gráfica representa la relación de cambio a lo largo del rango de intensidades en escala logarítmica ( $\log_2$ ), en donde  $M = \log_2$  del microarreglo -  $\log_2$  de la referencia, y  $A$  es la media de todos los datos (referencia) representada por la fórmula  $A = 1/2 (\log_2 \text{ del microarreglo} + \log_2 \text{ de referencia})$ . En el panel A se muestra la comparación de las clonas H37Rv tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) vs UCI-05; en el panel B se muestra la comparación de las clonas H37Rv tratadas con DMSO vs UCI-14; en el panel C se muestra la comparación de las clonas CIBIN99 tratadas con DMSO vs UCI-05; y en el panel D se muestra la comparación de las clonas CIBIN99 tratadas con DMSO vs UCI-14.



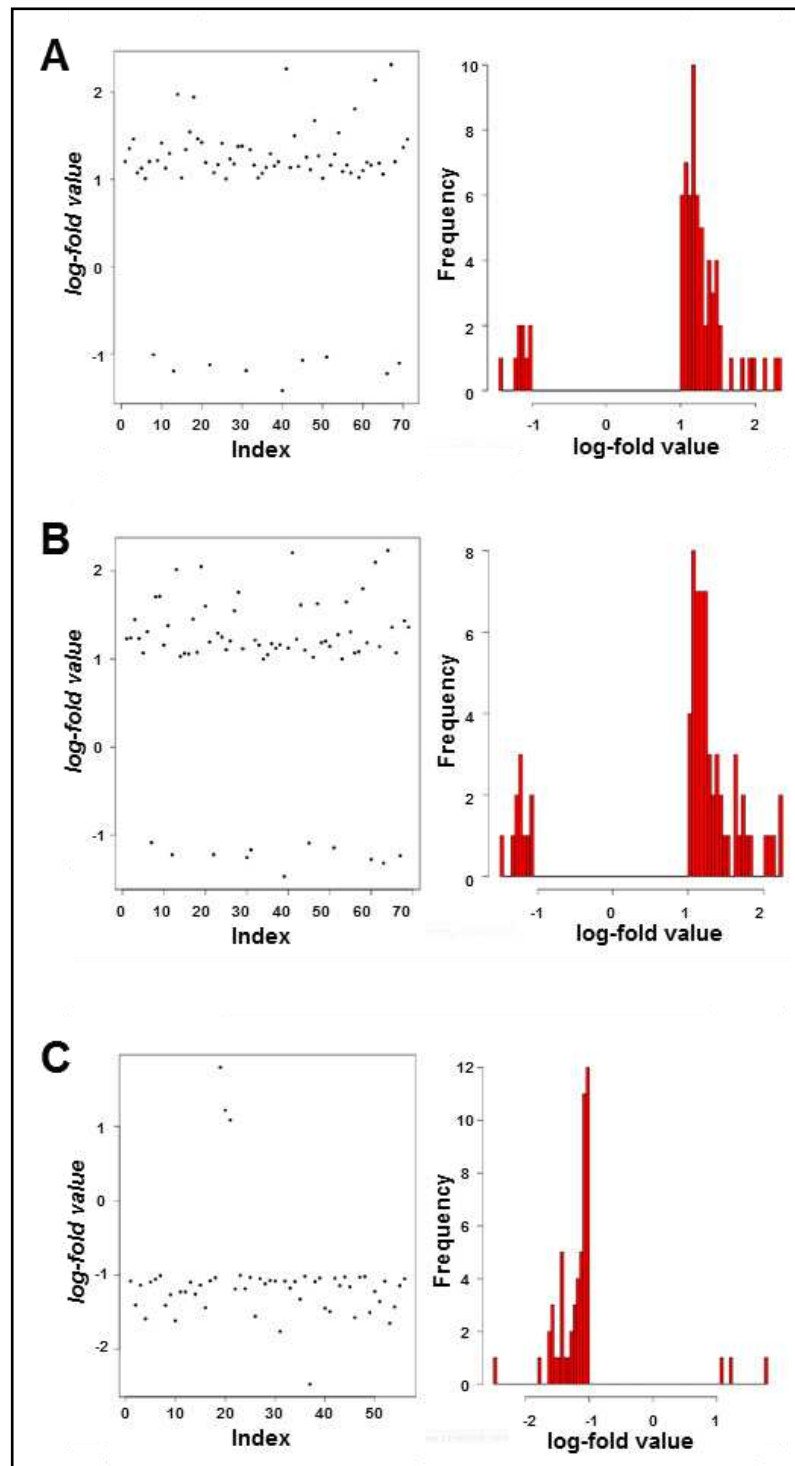
**Figura 23. Gráficas de volcán de las comparaciones de la intensidad de señal de las clonas H37Rv y CIBIN99 agrupadas por tratamiento.** En el eje de las abscisas se grafica la tasa de cambio en escala logarítmica (log-Fch) y en eje de las ordenas se grafica el valor del estadístico B (log odds). El panel A representa la comparación de las clonas H37Rv tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) vs UCI-05; el panel B muestra la comparación de las clonas H37Rv tratadas con DMSO vs UCI-14; el panel C muestra la comparación de los datos obtenidos para las clonas CIBIN99 tratadas con DMSO vs UCI-05; y en el panel D se muestra la comparación de datos de las clonas CIBIN99 tratadas con DMSO vs UCI-14.

Con la finalidad de observar las diferencias en expresión génica en cada clona en particular, se analizó la intensidad de señal de los microarreglos de cada una de las clonas comparada con el resto (Figura 24). Se observaron diferencias en la expresión de genes en tres condiciones de tratamiento: condición 1: clona 2 de H37Rv tratada con el compuesto UCI-05; condición 2: clona 2 de H37Rv tratada con el compuesto UCI-14; condición 3: clona 3 de H37Rv tratada con el compuesto UCI-14. Específicamente, en la clona 2 de H37Rv tratada con el compuesto UCI-05 se observaron diferencias en la expresión de 71 regiones genéticas, de las cuales 22 corresponden a genes anotados (Tabla 12, Figura 25), 29 a potenciales genes que codificarían para proteínas hipotéticas, 13 a regiones intergénicas y 7 a genes que

codifican para tRNAs (Anexo B); en la misma clona al tratarse con el compuesto UCI-14 se observó la expresión diferencial en 69 regiones genéticas, de las cuales 19 corresponden a genes anotados (Tabla 13, Figura 25), 26 a potenciales genes que codificarían para proteínas hipotéticas, 17 a regiones intergénicas y 7 a genes que codifican para tRNAs (Anexo B). En la clona 3 de H37Rv tratada con el compuesto UCI-14 se observaron 56 regiones genéticas con expresión diferencial, de estas, 25 corresponden a genes anotados (Tabla 14, Figura 25), 12 a potenciales genes que codificarían para proteínas hipotéticas, 14 a regiones intergénicas y 5 a genes que codifican para tRNAs (Anexo B).



**Figura 24. Representación del agrupamiento de datos de microarreglos para cada clona y condición de tratamiento y su comparación con el resto de los ensayos.** El mapa de calor está representado por recuadros amarillos, que significan una mayor diferencia en la expresión de genes entre las muestras comparadas, los recuadros grises que indican niveles de expresión similares entre las muestras comparadas, y los recuadros azules que representan niveles de expresión idénticos.



**Figura 25. Representación de los genes con expresión diferencial en las clonas H37Rv C-2 y C-3 por el tratamiento con los compuestos UCI.** Las gráficas de la izquierda de cada panel muestran con puntos los genes expresados diferencialmente. Un valor en la tasa de cambio en escala logarítmica mayor a 1 representa una inducción de al menos 2 veces con respecto al control, y una menor a 1(-1) representa una represión de al menos 2 veces con respecto al control. Las gráficas de la derecha muestran los genes expresados diferencialmente con barras. El panel A representa la comparación de la clona 2 de H37Rv tratada con DMSO vs UCI-05; el panel B muestra la comparación de la clona 2 de H37Rv tratada con DMSO vs UCI-14; el panel C muestra la comparación de la clona 3 de H37Rv tratada con DMSO vs UCI-14.

**Tabla 12**

**Genes con expresión diferencial observados en la clona H37Rv C-2 por efecto del compuesto UCI-05**

<b>ID<sup>a</sup></b>	<b>Gen</b>	<b>Categoría funcional<sup>b</sup></b>	<b>Tasa de cambio (log)</b>
885837	cspA	Virulencia, detoxificación, adaptación	1.2044804
886604	esxG	Pared celular y procesos celulares	2.2663764
886603	esxH	Pared celular y procesos celulares	1.1355039
888299	esxI	Pared celular y procesos celulares	1.1092253
886132	fbpA	Metabolismo lipídico	1.4612467
888949	gltA1	Metabolismo intermediario y respiración	1.0731726
887583	groES	Virulencia, detoxificación y adaptación	1.1275915
887081	gyrB	Vías de información	1.0080694
887325	infA	Vías de información	1.973641
887167	lprQ	Pared celular y procesos celulares	1.1469107
888056	mmaA4	Metabolismo lipídico	1.0154067
887724	mpt70	Pared celular y procesos celulares	1.340343
888884	nrdH	Vías de información	1.5426636
888345	rplD	Vías de información	1.1625807
888531	rplO	Vías de información	1.0159246
888421	rplX	Vías de información	1.0677359
885919	rpmA	Vías de información	1.1366585
886955	rpmE	Vías de información	1.2921303
885145	rpmI	Vías de información	1.1524387
888455	rpsO	Vías de información	1.2013342
888086	tatA	Pared celular y procesos celulares	1.0716296
887980	whiB1	Proteínas regulatorias	1.4593367

<sup>a</sup> De acuerdo al banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

<sup>b</sup> De acuerdo a la base de datos tuberculist ( <http://tuberculist.epfl.ch/>)

**Tabla 13****Genes con expresión diferencial observados en la clona H37Rv C-2 por efecto del compuesto UCI-14**

<b>ID<sup>a</sup></b>	<b>Gen</b>	<b>Categoría funcional<sup>b</sup></b>	<b>Tasa de cambio (log)</b>
885837	cspA	Virulencia, detoxificación, adaptación	1.2317799
885339	desA2	Metabolismo lipídico	1.2428939
886604	esxG	Pared celular y procesos celulares	2.2118556
886603	esxH	Pared celular y procesos celulares	1.2250868
888299	esxI	Pared celular y procesos celulares	1.1860899
886132	fbpA	Metabolismo lipídico	1.2344693
887583	groES	Virulencia, detoxificación y adaptación	1.0686743
887325	infA	Vías de información	2.0185057
886097	lpqH	Pared celular y procesos celulares	1.0310545
887167	lprQ	Pared celular y procesos celulares	1.1023502
887724	mpt70	Pared celular y procesos celulares	1.0638291
888869	nrdE	Vías de información	1.0586911
888884	nrdH	Vías de información	1.4545398
888345	rplD	Vías de información	1.0007626
885919	rpmA	Vías de información	1.0507271
886955	rpmE	Vías de información	1.1775105
885145	rpmI	Vías de información	1.1244438
888455	rpsO	Vías de información	1.1633809
887980	whiB1	Proteínas regulatorias	1.3630296

<sup>a</sup> De acuerdo al banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

<sup>b</sup> De acuerdo a la base de datos tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>)

**Tabla 14****Genes con expresión diferencial observados en la clona H37Rv C-3 por efecto del compuesto UCI-14**

<b>ID<sup>a</sup></b>	<b>Gen</b>	<b>Categoría funcional<sup>b</sup></b>	<b>Tasa de cambio (log)</b>
888272	acpM *	Metabolismo lipídico	-1.082755
885339	desA2	Metabolismo lipídico	-1.403493
886604	esxG	Pared celular y procesos celulares	-2.467824
886603	esxH	Pared celular y procesos celulares	-1.090794
888299	esxI	Pared celular y procesos celulares	-1.142914
888372	esxJ	Pared celular y procesos celulares	-1.025387
887579	hspX	Virulencia, detoxificación, adaptación	-1.137043
887325	infA	Vías de información	-1.615604
886518	iniB	Pared celular y procesos celulares	-1.039994
885754	lldD2	Metabolismo intermediario y respiración	-1.22633
887167	lprQ	Pared celular y procesos celulares	-1.492553
888056	mmaA4	Metabolismo lipídico	-1.225985
888869	nrdE	Vías de información	-1.096825
888884	nrdH	Vías de información	-1.257501
888923	rbfA	Vías de información	-1.076848
888043	rplA	Vías de información	-1.183853
888341	rplB	Vías de información	-1.03226
888345	rplD	Vías de información	-1.555052
888045	rplK	Vías de información	-1.048204
888353	rplW	Vías de información	-1.117305
888421	rplX	Vías de información	-1.073252
885919	rpmA	Vías de información	-1.081521
886955	rpmE	Vías de información	-1.759269
888455	rpsO	Vías de información	-1.082668
888391	rpsQ	Vías de información	-1.177348

<sup>a</sup> De acuerdo al banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

<sup>b</sup> De acuerdo a la base de datos tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>)

\*Dato proporcionado por el microarreglo el cual corresponde a acpP



### 7.7. Validación por PCR Cuantitativa de Genes con Expresión Diferencial en Clonas de *M. tuberculosis* Tratadas con los Compuestos UCI-05 y UCI-14

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos por microrreglos, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real con 17 genes, donde se utilizó otra alícuota de la misma muestra de RNA total empleada para los ensayos de microarreglos (Tabla 15). El criterio de selección de los 17 genes fue el siguiente: 1) genes que estuvieran modificados en las 3 condiciones que mostraron expresión diferencial por microrreglos, 2) genes que estuvieran modificados únicamente en dos de las condiciones descritas y 3) genes que estuvieran modificados en una de las condiciones previamente mencionadas (Tablas 12, 13 y 14).

**Tabla 15**

#### Genes seleccionados para su validación por PCR cuantitativa

No.	ID <sup>a</sup>	Gen	Categoría funcional <sup>b</sup>
1	885339	desA2	Metabolismo lipídico
2	886604	esxG	Pared celular y procesos celulares
3	886603	esxH	Pared celular y procesos celulares
4	888299	esxI	Pared celular y procesos celulares
5	888949	gltA1	Metabolismo intermediario y respiración
6	887583	groES	Virulencia, detoxificación y adaptación
7	887579	hspX	Virulencia, detoxificación, adaptación
8	887325	infA	Vías de información
9	886518	iniB	Pared celular y procesos celulares
10	885754	lldD2	Metabolismo intermediario y respiración
11	887167	lprQ	Pared celular y procesos celulares
12	888056	mmaA4	Metabolismo lipídico
13	888884	nrdH	Vías de información
14	885145	rpmI	Vías de información
15	888455	rpsO	Vías de información
16	888086	tatA	Pared celular y procesos celulares
17	887980	whiB1	Proteínas regulatorias

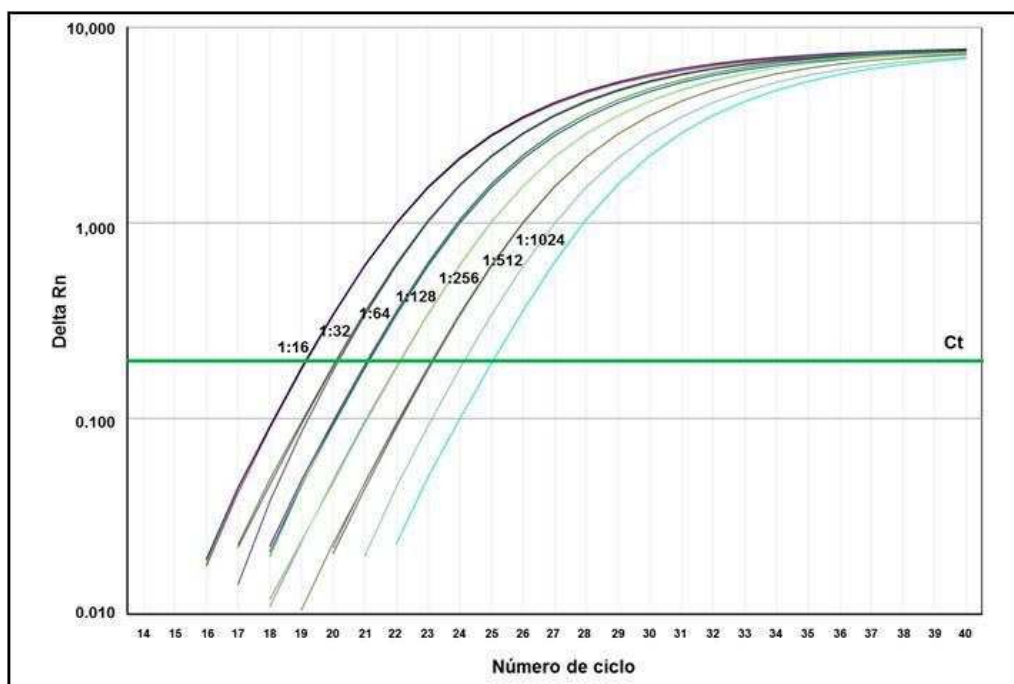
<sup>a</sup> De acuerdo al banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

<sup>b</sup> De acuerdo a la base de datos tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>)

Para la normalización de los ensayos de PCR en tiempo real cuantitativa se utilizó como control endógeno el gen constitutivo *rrs*, el cual codifica para la subunidad ribosomal 16S. Los resultados obtenidos fueron procesados utilizando el método comparativo ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) propuesto por Livak y Schmittgen (2001) (Livak and Schmittgen, 2001).

### **7.7.1 Rango Dinámico de Amplificación**

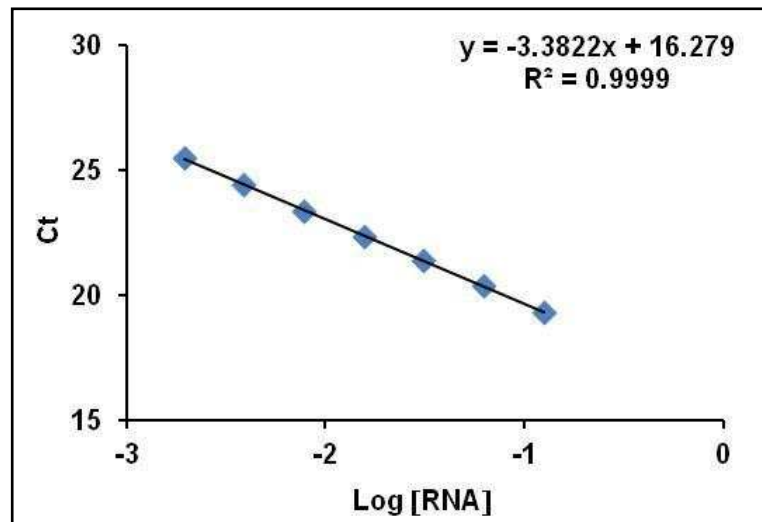
Con la finalidad de seleccionar la concentración de cDNA óptima para observar una inducción o una represión en la expresión de los genes, se realizó una curva con diluciones seriales del cDNA de cada muestra (diluciones 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 y 1:1024), cuya concentración inicial fue de 2 µg del RNA total extraído de los cultivos de *M. tuberculosis*. Para la interpretación de la modificación de la expresión genética por PCR cuantitativa se determina una inducción del gen cuando se visualiza un desplazamiento de la curva de amplificación a la izquierda de la referencia (i.e., muestra control), y por lo tanto se observa una disminución en el umbral de detección (Ct); mientras que una represión en la expresión se visualiza con un desplazamiento de la curva de amplificación a la derecha de la referencia, y se observa un incremento del Ct (Figura 26). El rango dinámico de amplificación fue realizado utilizando una muestra de RNA total de H37Rv y el análisis representativo que se muestra en la figura 26 fue utilizando al gen *esxH* como ejemplo. El rango dinámico de amplificación se llevó a cabo para los genes *desA2*, *esxG*, *esxH*, *esxI*, *gltA1*, *groES*, *hspX*, *infA*, *iniB*, *lldD2*, *lprQ*, *mmaA4*, *nrdH*, *rpmI*, *rpsO*, *tatA* y *whiB1* (Anexo C). Se seleccionó la dilución 1:128 en todos los casos, ya que ésta permitió observar el incremento o disminución del Ct de las diluciones anteriores y posteriores del cDNA, manifestadas con un desplazamiento en la curva de amplificación a la izquierda y derecha, respectivamente.



**Figura 26. Rango dinámico de amplificación para el gen esxH de *M. tuberculosis*.** Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen esxH (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.

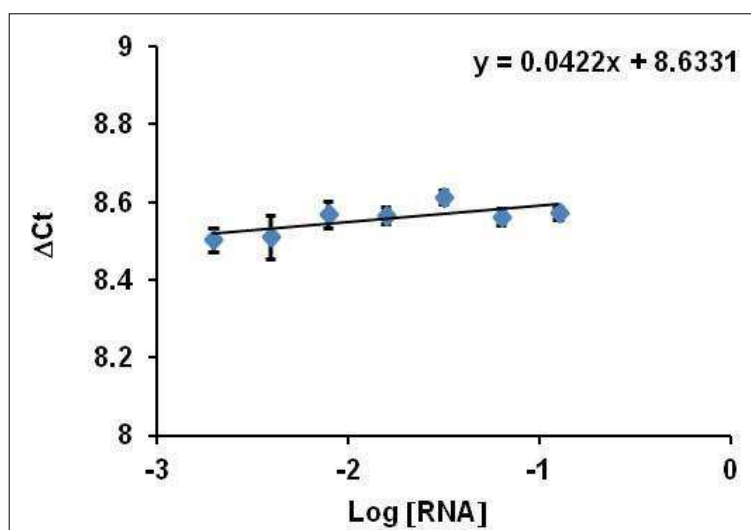
### 7.7.2 Eficiencia de la Amplificación

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de amplificación de los ensayos de PCR en tiempo real, se llevaron a cabo análisis de regresión lineal del logaritmo de la concentración de RNA vs el umbral de detección o Ct. Con los resultados obtenidos se calculó la pendiente de la curva y la  $R^2$ . Una eficiencia de amplificación del  $100\% \pm 10\%$  se ve reflejada por la obtención de una pendiente de la curva de  $-3.3 \pm 10\%$ ; y una  $R^2 > 0.99$  proporciona un alto grado de confianza en la correlación de dos valores. En todas las curvas de los genes analizados se obtuvieron valores de pendiente y  $R^2$  dentro de los rangos adecuados, lo cual garantizó una eficiencia de amplificación cercana al 100% en cada uno de los casos. En la figura 27 se representan los resultados de este análisis tomando como ejemplo al gen esxH. Los análisis para el resto de los genes se muestran en el anexo D.



**Figura 27. Curva de regresión lineal de la evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *esxH* de *M. tuberculosis*.** Se muestra el valor de Ct (ciclo umbral) con respecto a la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente (y) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.

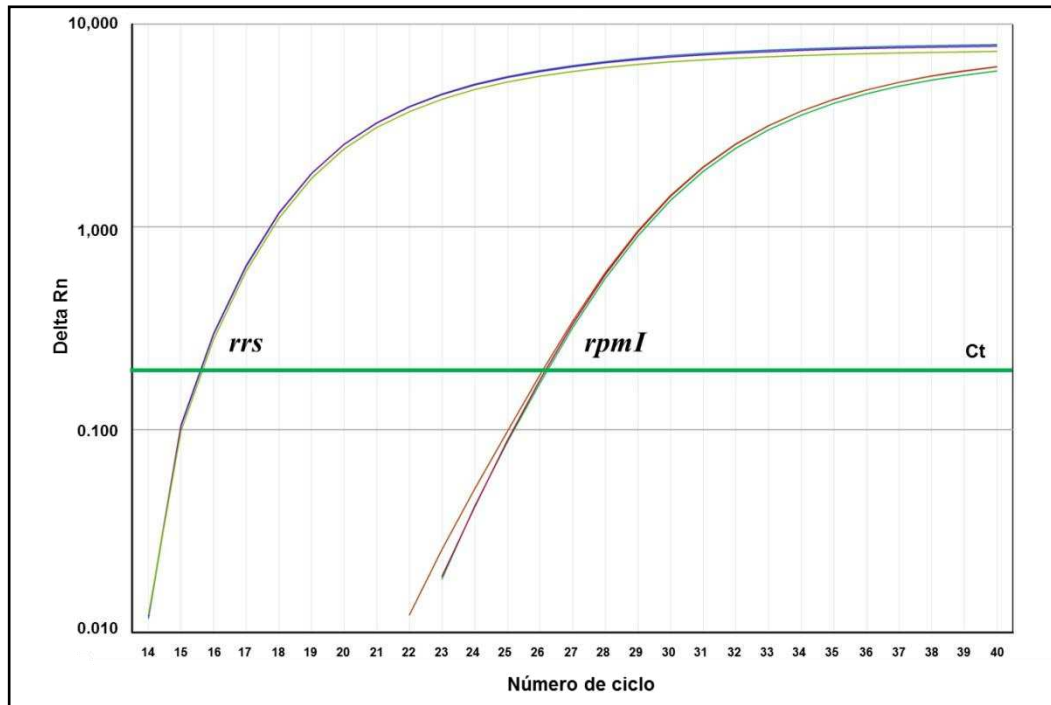
Para la normalización de los datos obtenidos es necesario calcular si la eficiencia de amplificación tanto del gen de interés (e.g., *lldD2* figura 28) como del gen de referencia (i.e., *rrs*) es aproximadamente igual. Por tal razón, se realizaron curvas de regresión lineal del logaritmo de la concentración de RNA vs la diferencia del Ct ( $\Delta Ct$ ) entre el gen de interés y el gen *rrs*; el valor de la pendiente de la curva debe ser  $< 0.1$ . En la figura 28 se muestra la comparación de la eficiencia de amplificación de los genes *lldD2* y *rrs* obteniendo un valor de la pendiente de 0.0422.



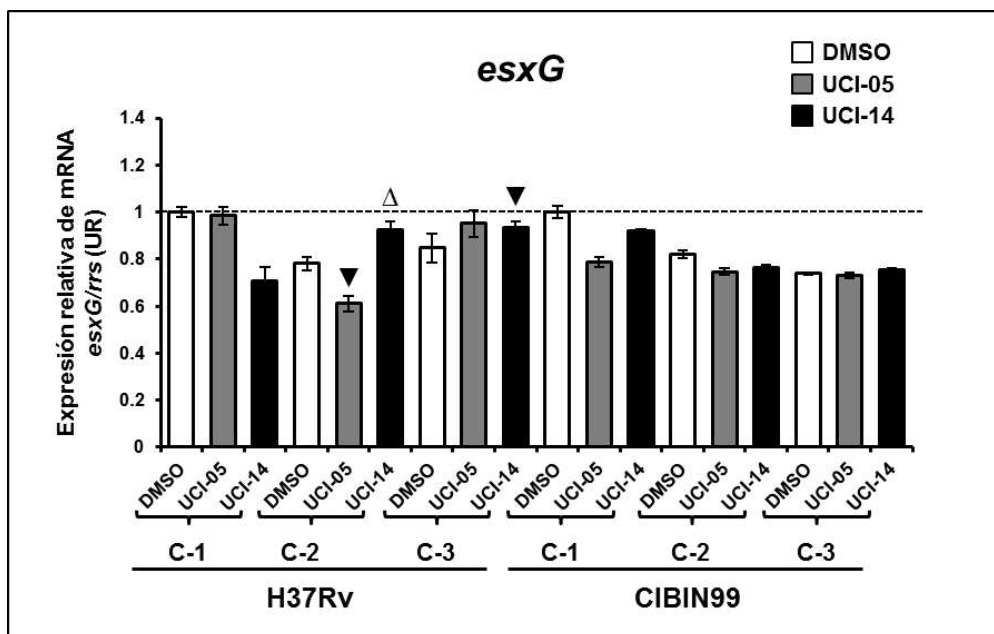
**Figura 28.** Curva de regresión lineal de la evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *lldD2* en relación al gen de referencia *rrs* de *M. tuberculosis*. El valor de  $\Delta Ct$  representa la diferencia entre el ciclo umbral (Ct) del gen *lldD2* y el Ct del gen *rrs*, y se grafica con respecto a la concentración de cDNA utilizado (Log [RNA]). Se muestra la pendiente (y) menor a 0.1.

### 7.8. Cuantificación Relativa de la Expresión de Genes de *M. tuberculosis* en Clonas Tratadas con los Compuestos UCI-05 y UCI-14

Una vez analizados todos los parámetros de calidad correspondientes, se llevaron a cabo los ensayos de cuantificación relativa de los genes *desA2*, *esxG*, *esxH*, *esxI*, *gltA1*, *groES*, *hspX*, *infA*, *iniB*, *lldD2*, *lprQ*, *mmaA4*, *nrdH*, *rpmI*, *rpsO*, *tatA* y *whiB1* utilizando el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Con la finalidad de ejemplificar este análisis, en la figura 29 se muestra la expresión relativa del gen *rpmI* en la clona 1 de H37Rv tratada con el compuesto UCI-14. La expresión diferencial por microarreglos de los genes mencionados se observó en las condiciones anteriormente descritas (tabla 12, 13 y 14); sin embargo, la validación por PCR cuantitativa se realizó en todas las clonas H37Rv y CIBIN99 en las dos condiciones de tratamiento (UCI-05 y UCI-14), así como en las clonas control tratadas con 0.1 % del vehículo DMSO. Los resultados del análisis de la expresión relativa de los genes seleccionados en cada una de las clonas y sus diferentes condiciones de tratamiento se representan en la figura 30 utilizando como ejemplo al gen *esxG*. El análisis de los resultados para el resto de los genes se muestran en el anexo E.



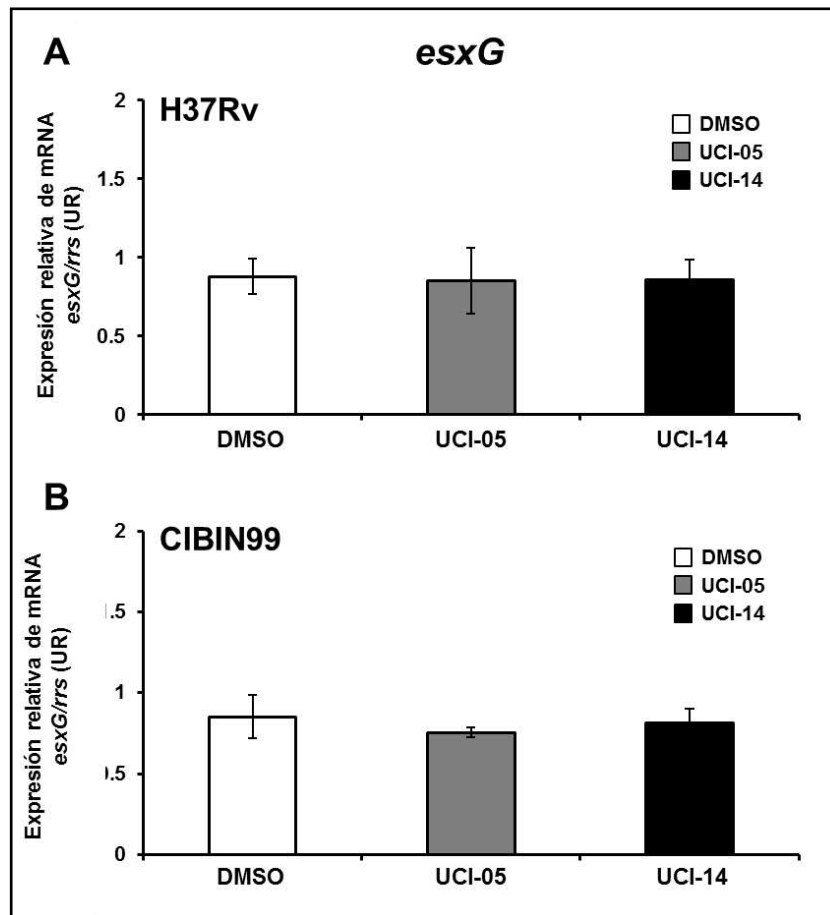
**Figura 29. Expresión de los genes *rpmI* y *rrs* de *M. tuberculosis*.** En este ensayo representativo se utilizó el cDNA (dilución 1:128) obtenido de la clona 1 de H37Rv tratada con el compuesto UCI-14. Se muestran las curvas de amplificación correspondientes a los genes *rpmI* y del gen *rrs* (referencia). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de las sondas que reconocen al gen *rpmI* o *rrs* (marcadas con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos. Los valores Ct fueron utilizados para realizar el análisis de la expresión genética por medio del método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .



**Figura 30. Expresión relativa del gen *esxG* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*.** Los cultivos fueron tratados con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos, mientras que el símbolo  $\blacktriangledown$  indica una discordancia con aquellos generados por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99, ambas tratadas con DMSO.

Los datos obtenidos mediante el análisis de microarreglos fueron comparados con los resultados obtenidos por PCR cuantitativa, y la concordancia de resultados de los 17 genes fue de 28%.

Por otro lado, con la finalidad de conocer la expresión diferencial en las cepas H37Rv y CIBIN99 por efecto de los compuestos UCI, los valores de expresión génica obtenidos en las clonas H37Rv y CIBIN99 fueron analizados mediante la obtención de un promedio de los triplicados biológicos (clonas) agrupados por condición de tratamiento para cada gen. Este análisis se representa en la figura 31 tomando como ejemplo los resultados obtenidos para el gen *esxG*. Los resultados obtenidos para el resto de los genes evaluados se muestran en el anexo F.



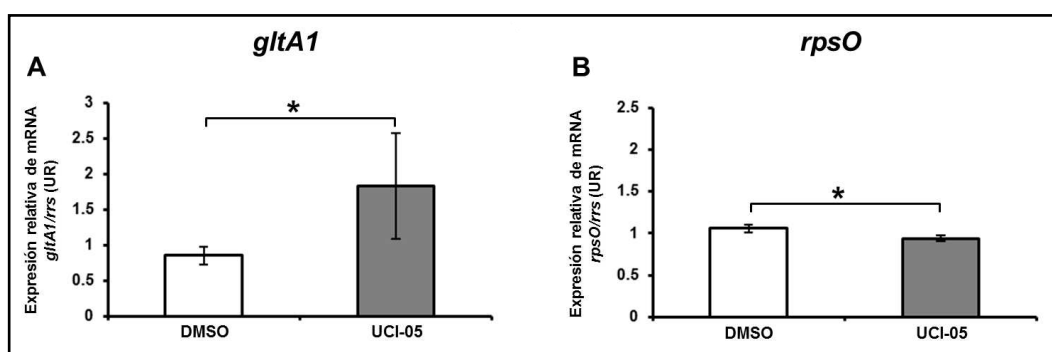
**Figura 31. Expresión relativa del gen *esxG* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).

De manera simultánea a estos ensayos, con la finalidad de identificar si el DMSO modifica la expresión génica en *M. tuberculosis*, se analizó el perfil de expresión de genes de las cepas H37Rv y CIBIN99 sin tratamiento y tratadas con 0.1% DMSO por 4 h utilizando microarreglos Affymetrix (González-Escalante, 2011). La validación por PCR cuantitativa de los resultados obtenidos por microarreglos están referidos en el anexo A. Los resultados muestran que el tratamiento con 0.1% de DMSO por 4 h no afecta la expresión génica en *M. tuberculosis*.

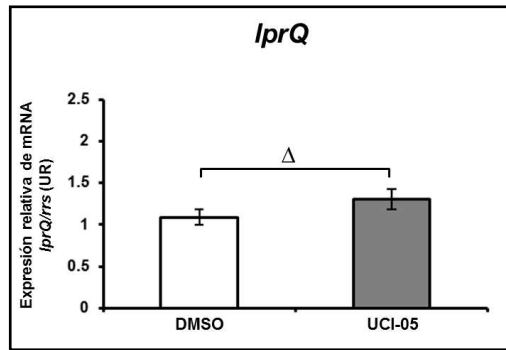


## 7.9. Expresión Génica Diferencial Debido al Tratamiento por el Compuesto UCI-05 en las Clonas de *M. tuberculosis* H37Rv y CIBIN99

Tomando como base la expresión diferencial promedio obtenida en las clonas H37Rv y CIBIN99 por PCR cuantitativa, se observaron genes con expresión diferencial significativa debido al tratamiento con el compuesto UCI-05. En las clonas H37Rv el gen *gltA1* mostró un aumento de 2.15 veces en la expresión ( $p = 0.05$ , Figura 32, panel A), mientras que el gen *rpsO* mostró una disminución en su expresión del 11.08% ( $p=0.02$ , Figura 32, panel B). En lo referente a las clonas CIBIN99, el gen *lprQ* presentó una tendencia, mostrando un 20% de aumento en su expresión (Figura 33).



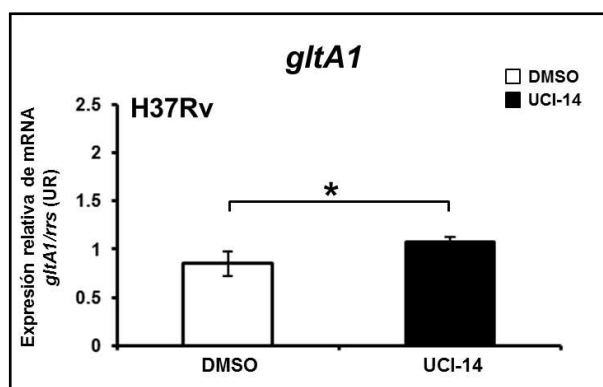
**Figura 32. Expresión relativa de los genes *gltA1* y *rpsO* en las clonas H37Rv de *M. tuberculosis* expuestas al compuesto UCI-05.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas tratadas con el compuesto UCI-05 (barras grises) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR). En el panel A se muestran la expresión relativa del gen *gltA1* y en el panel B la expresión relativa del gen *rpsO*. El símbolo \* indica una expresión diferencial significativa ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 33. Expresión relativa del gen *IprQ* en las clonas CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas al compuesto UCI-05.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas CIBIN99 tratadas con el compuesto UCI-05 (barras grises) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica una tendencia en la modificación de la expresión relativa del gen, la cual no fue estadísticamente significativa.

### 7.10. Expresión Génica Diferencial Debido al Tratamiento por el Compuesto UCI-14 en las Clonas de *M. tuberculosis* H37Rv y CIBIN99

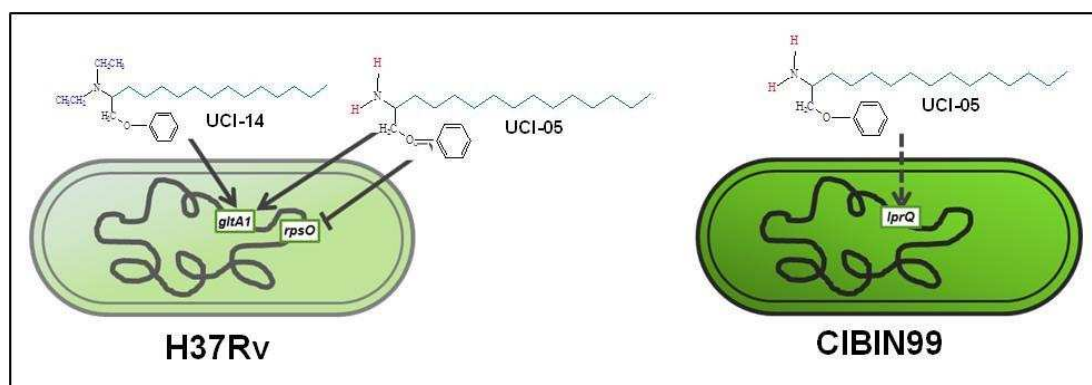
La expresión relativa promedio de las clonas H37Rv durante el tratamiento con el compuesto UCI-14 mostró un incremento significativo del 26% en el gen *gltA1* ( $p=0.04$ , Figura 34). Las clonas CIBIN99 no mostraron expresión diferencial en ninguno de los genes evaluados al ser tratadas con este mismo compuesto.



**Figura 34. Expresión relativa del gen *gltA1* en las clonas H37Rv de *M. tuberculosis* expuestas al compuesto UCI-14.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv tratadas con el compuesto UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR). El símbolo \* indica una expresión diferencial significativa ( $p= 0.04$ ).

## 7.11. Integración de los Datos para Identificar los Procesos Celulares y Rutas Metabólicas Modificadas por Efecto de los Compuestos UCI-05 y UCI-14 en Clonas de *M. tuberculosis* Pansensibles y Multifármacorresistentes

En la figura 35 se resume el efecto de los compuestos UCI-05 y UCI-14 sobre la expresión de genes en clonas de *M. tuberculosis* pansensible (H37Rv) y multifármacorresistente (CIBIN99).



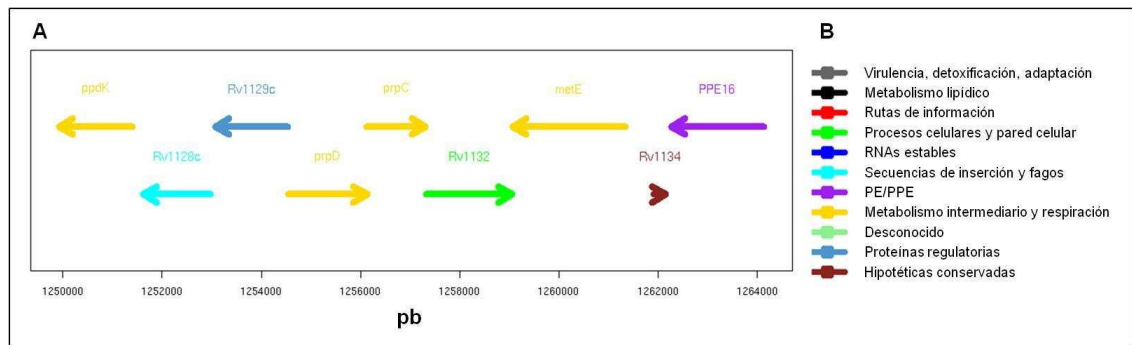
**Figura 35. Esquema general del efecto de los compuestos UCI sobre la expresión diferencial de genes en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*.** El tratamiento con el compuesto UCI-05 mostró una sobreexpresión significativa del gen *gltA1* y una represión significativa del gen *rpsO* en las clonas H37Rv, así como una tendencia en la sobreexpresión del gen *lprQ* en las clonas CIBIN99. El tratamiento con el compuesto UCI-14 mostró una sobreexpresión significativa del gen *gltA1* en las clonas H37Rv.

Con la finalidad de integrar la información generada por los análisis de expresión genética, se realizó una búsqueda de información en las bases de datos bioinformáticas Tuberculist y TBdatabase, acerca de los genes modificados por efecto de los compuestos UCI.

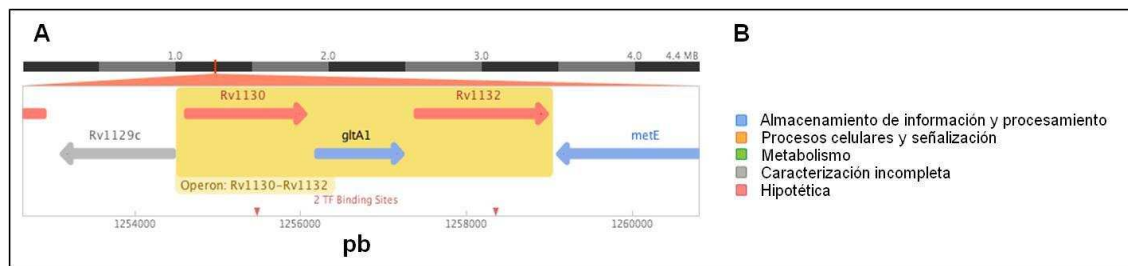
A continuación se describe la información generada acerca de los genes diferencialmente expresados.

### 7.11.1. Gen *gltA1*

El gen *gltA1*, cuyo sinónimo es *prpC*, se localiza en el locus Rv1131 y pertenece a la categoría funcional del metabolismo intermediario y respiración según la base de datos genómica Tuberculist (Figura 36) (Lew et al., 2011). Este gen forma parte del operón Rv1130-1132 (Figura 37) (Reddy et al., 2009).

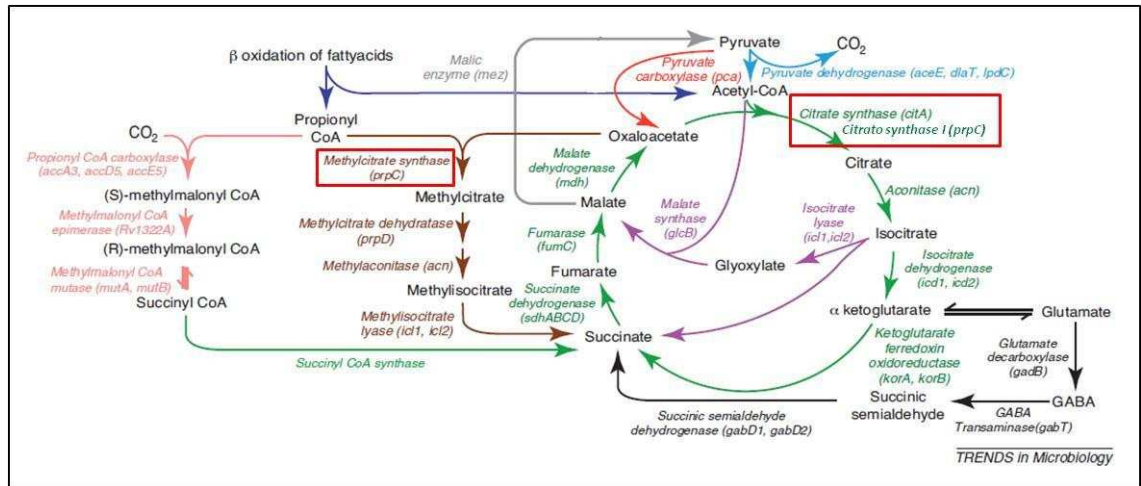


**Figura 36. Localización del gen *gltA1* (*prpC*) según la base de datos genómicos Tuberculist.** En el panel A se muestra la localización del gen dentro del genoma de *M. tuberculosis*. La orientación de las flechas indica el sentido de la transcripción, el color de las flechas indica la categoría funcional del gen, y pb significa pares de bases. En el panel B se muestra el código de colores para la categoría funcional génica según la base de datos Tuberculist.



**Figura 37. Localización del operón *Rv1130-Rv1132* según la plataforma integral de tuberculosis, TBdatabase.** Se muestra la localización del operón *Rv1130-Rv1132* dentro del genoma de *M. tuberculosis*. La orientación de las flechas indica el sentido de la transcripción, el color de las flechas indica la categoría funcional del gen, y pb significa pares de bases. En el panel B se muestra el código de colores para la categoría funcional génica según la plataforma TBdatabase.

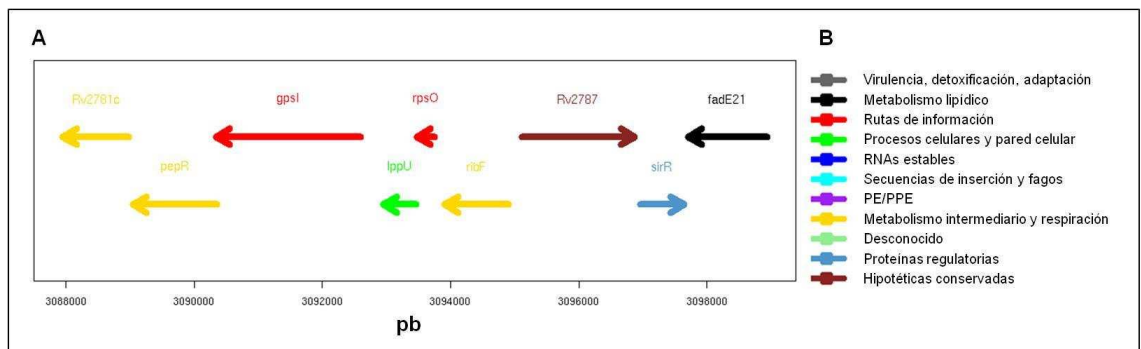
El gen *gltA1* codifica para la enzima citrato sintasa I, la cual participa en el metabolismo central del carbono en *M. tuberculosis*. Por un lado, la enzima participa en el ciclo del 2 metil-citrato, catalizando la conversión de oxaloacetato más propanoyl-CoA en (2S, 3S)-2-metilcitrato más coenzima A. Por último, la enzima citrato sintasa I está involucrada en los procesos celulares de respiración anaeróbica, fermentación ácida y en el ciclo del ácido tricarboxílico (variaciones I y IX), en los cuales cataliza la conversión de oxaloacetato más acetyl-CoA en citrato más coenzima A (Figura 38).



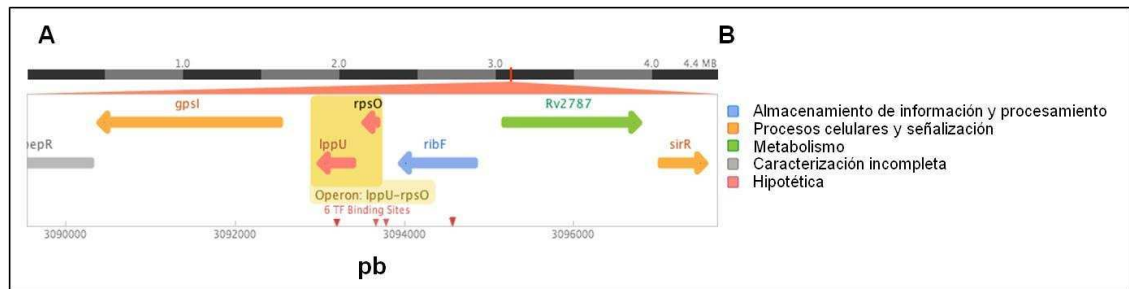
**Figura 38. Reconstrucción bioinformática de los ciclos del glioxilato y del metilcitrato en *M. tuberculosis* donde participa la enzima citrato sintasa I, codificada por el gen *gltA1* (Tomado de Rhee et al., 2011, con modificaciones). Los recuadros de color rojo señalan a la enzima citrato sintasa I, también llamada metilcitrato sintasa.**

### 7.11.2. Gen *rpsO*

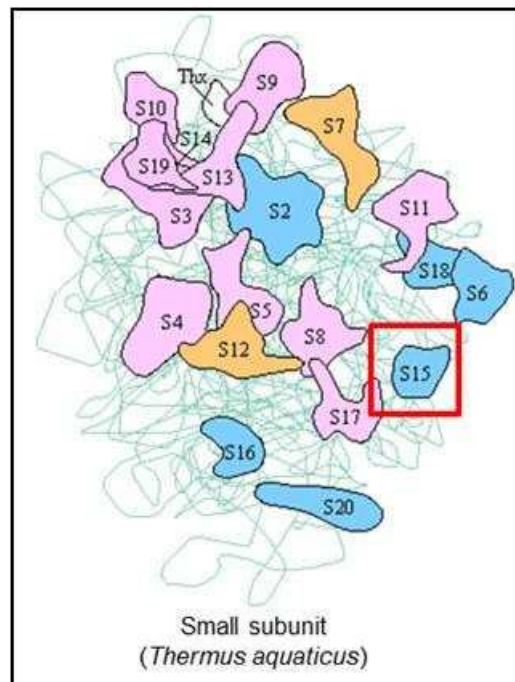
El gen *rpsO* se localiza en el locus Rv2785c y pertenece a la categoría funcional de rutas de información según la base de datos genómica Tuberculist (Figura 39) (Lew et al., 2011). Este gen forma parte de un operón en conjunto con el gen *lppU* (Figura 40) (Kendall et al., 2007; Reddy et al., 2009) y codifica para la proteína ribosomal S15 (Figura 41).



**Figura 39. Localización del gen *rpsO* según la base de datos genómicos de *M. tuberculosis*, Tuberculist. En el panel A se muestra la localización del gen dentro genoma de *M. tuberculosis*. La orientación de las flechas indica el sentido de la transcripción, el color de las flechas indica la categoría funcional del gen, y pb significa pares de bases. En el panel B se muestra el código de colores para la categoría funcional génica según la base de datos Tuberculist.**



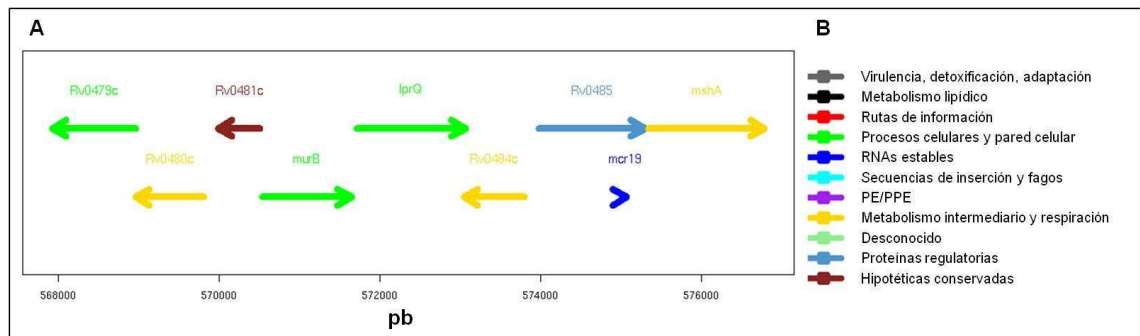
**Figura 40. Localización del operón lppU-rpsO según la plataforma integral de tuberculosis, TBdatabase.** Se muestra la localización del operón Rv1130-Rv1132 dentro del genoma de *M. tuberculosis*. El sentido de la transcripción se indica con la orientación de las flechas, el color de las flechas indica la categoría funcional del gen, y pb significa pares de bases. En el panel B se muestra el código de colores para la categoría funcional génica según la plataforma TBdatabase.



**Figura 41. Representación esquemática de la subunidad ribosomal pequeña de *Thermus aquaticus*.** Se utiliza como referencia al microorganismo *Thermus aquaticus* para señalar la localización de la proteína ribosomal S15 debido a que no existe información publicada para *M. tuberculosis*.

### 7.11.3. Gen lprQ

El gen lprQ se localiza en el locus Rv0483, pertenece a la categoría de procesos celulares y pared celular según la base de datos genómica Tuberculist (Figura 42) (Lew et al., 2011). Este gen codifica para la lipoproteína LprQ, la cual no ha sido completamente caracterizada, y no se encontraron reportes acerca de su participación en procesos celulares o rutas metabólicas.



**Figura 42. Localización del gen *lprQ* según la base de datos genómicos de *M. tuberculosis*, Tuberculist.** En el panel A se muestra la localización del gen dentro genoma de *M. tuberculosis*. El sentido de la transcripción está indicado por la orientación de las flechas, el color de las flechas indica la categoría funcional del gen, y pb significa pares de bases. En el panel B se muestra el código de colores para la categoría funcional génica según la base de datos Tuberculist.



## 8. DISCUSIÓN

El aislamiento de clonas de *M. tuberculosis* sensibles y multifármacorresistentes provenientes de la cepa H37Rv y del aislado clínico CIBIN99 respectivamente fue realizado para evaluar los perfiles de expresión génica en respuesta al tratamiento con los compuestos UCI-05 y UCI-14 con la finalidad de obtener resultados provenientes de individuos independientes ya que se ha reportado que existe una alta heterogeneidad en poblaciones bacterianas, incluso cuando estas son poblaciones genéticamente idénticas (Longo and Hasty, 2006). Se ha descrito que dentro de las condiciones que pueden contribuir a esta variabilidad se encuentran el ruido y fluctuaciones al azar de la expresión génica, pudiendo estos cambios enmascarar el comportamiento de células individuales y afectando la identificación de procesos celulares de importancia biológica (Raser and O'Shea, 2005; Longo and Hasty, 2006). La existencia de la heterogeneidad presente en cepas ha sido descrito en *M. tuberculosis* utilizando la cepa de referencia H37Rv (Andreu and Gibert, 2008). En nuestros resultados, la caracterización genotípica de las clonas aisladas mostró que existe una diferencia en los patrones de spoligotyping y de RFLP-IS6110 entre las clonas y cepas sensibles con respecto a las clonas y cepas multifármacorresistentes, pero la cepa sensible y sus clonas, así como la cepa multifármacorresistente y sus clonas comparten el mismo patrón genotípico entre sí, conservando el perfil de las cepas de origen. Estos resultados permiten considerar a las clonas aisladas aptas para su utilización en el estudio de expresión diferencial en respuesta a nuevos compuestos anti-TB. Sin embargo, al determinar las CMI de los compuestos UCI en cada una de las clonas, la clona 1 de H37Rv presentó una CMI para el compuesto UCI-14 de 10 µg/mL mientras que la cepa H37Rv y sus clonas 2 y 3 presentaron una CMI de 5 µg/mL para este mismo compuesto. Estos resultados confirman la presencia de poblaciones variables existentes en una misma cepa.

Durante la caracterización fenotípica de las clonas aisladas, en los análisis de determinación de sensibilidad o resistencia a los fármacos de primera línea mediante el sistema BACTEC 960, la cepa y clonas CIBIN99 multifármacorresistentes presentaron resistencia a los fármacos estreptomicina, isoniazida, rifampicina y etambutol pero sensibilidad a pirazinamida. Se ha reportado que la resistencia a

pirazinamida utilizando este sistema algunas veces no es detectada por el sistema BACTEC 960 (Aono et al., 2002; Zhou et al., 2011), o bien en algunos casos los resultados no son reproducibles. Una de las posibles razones puede ser el rango de concentración del fármaco al cual las cepas presentan resistencia (Werngren et al., 2011), por tal motivo se realizó la determinación de la sensibilidad o resistencia a pirazinamida utilizando el método de pirazinamidasa, donde los resultados obtenidos confirmaron la resistencia a este fármaco en la cepa y clonas CIBIN99, así como la sensibilidad a este mismo fármaco en la cepa y clonas H37Rv.

Durante la medición del crecimiento micobacteriano en cultivos líquidos por 27 días se observó un crecimiento más lento en las cepas y clonas CIBIN99. Previamente se ha reportado que durante el crecimiento las cepas de *M. tuberculosis* fármacorresistentes pueden presentar una fase lag más prolongada, esto debido a que su capacidad para adaptarse a los componentes de un medio sin fármacos es menor que las cepas sensibles. Una explicación puede ser que las cepas fármacorresistentes presentan mutaciones en los genes *katG* y *rpoB*, y dichas mutaciones confieren resistencia a los fármacos isoniazida y rifampicina. Los genes *katG* y *rpoB* codifican para enzimas con importancia biológica que podrían alterar su funcionamiento, dando lugar a un costo de fitness (i.e. reducción de la tasa de crecimiento en ausencia de fármaco) (Mariam et al., 2004; von Groll et al., 2010b). Aunque en este trabajo no se realizó un análisis de las mutaciones, en un estudio realizado por nuestro grupo se reveló que la cepa CIBIN99 posee mutaciones en los genes *katG* y *rpoB* (González-Escalante, comunicación personal), lo que concuerda con la observación de que la cepa y clonas CIBIN99 mostraron una fase lag de 12-15 días, la cual fue mayor a la observada en la cepa y clonas H37Rv sensibles, con una duración de 9 días. Además, se ha reportado que el índice de crecimiento es menor en las cepas resistentes que en las sensibles (von Groll et al., 2010a). Esta disminución en el índice de crecimiento puede restablecerse una vez que estas cepas se han adaptado a su ambiente probablemente debido a la generación de mutaciones compensatorias (O'Sullivan et al., 2010). Estos hallazgos han sido reportados en infecciones de *M. tuberculosis* (Davies et al., 2000; Dave et al., 2009; Gagneux, 2009) así como en cultivos *in vitro* (Mariam et al., 2004). En los resultados de este estudio, la fase logarítmica de la cepa y clonas H37Rv alcanzaron un crecimiento equivalente a una turbidez de McFarland entre 4.0 y 5.0, mientras que la cepa y clonas CIBIN99, aunque presentaron una fase

lag más tardía alcanzó un crecimiento equivalente a una turbidez de McFarland entre No. 3.5-4.5, mostrando así una turbidez similar a la observada en los cultivos de clonas sensibles.

El conocer la densidad bacteriana alcanzada por las clonas durante su crecimiento permitió establecer la fase logarítmica, que como fase de crecimiento activa fue la apropiada para realizar los tratamientos con los compuestos UCI. La fase de crecimiento logarítmica permite observar los cambios en la expresión de por lo menos la mitad de los genes de *M. tuberculosis*, los cuales se encuentran activos (Fu and Fu-Liu, 2007); por el contrario, durante la fase estacionaria, un alto porcentaje de genes se encuentran reprimidos (Voskuil et al., 2004), lo cual podría haber enmascarado el posible efecto de los compuestos UCI sobre la expresión genética.

Por otro lado, debido a la problemática de la tuberculosis farmacorresistente, diversos grupos de investigación se han enfocado en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento. Se ha reportado un nuevo compuesto orgánico anti-TB denominado plumbagina, la cual se obtiene de una planta del género *Plumbago*. Dicho compuesto tiene una CMI de 2.5 µg/mL en la cepa H37Rv (Ye et al., 2011). La CMI establecida para la plumbagina es similar a la encontrada en nuestros resultados para el compuesto UCI-05 en las clonas CIBIN99 multifármacorresistente; mientras que la CMI establecida para las clonas H37Rv sensibles de nuestro estudio fue mayor para este mismo compuesto (5 µg/mL). En lo que respecta al compuesto UCI-14, la CMI observada fue de 5 µg/mL para la cepa y clonas CIBIN99, y un rango de 5-10 µg/mL para la cepa y clonas H37Rv sensibles. Las CMI descritas para los compuestos UCI se encuentran dentro de las concentraciones críticas establecidas como parámetro para la detección de cepas resistentes a los fármacos anti-TB de primera línea utilizando el sistema MGIT BACTEC 960 (estreptomina 1.0 µg/mL, isoniazida 0.1 µg/mL, rifampicina 1.0 µg/mL o etambutol 5.0 µg/mL y pirazinamida 100 µg/mL; (BACTEC, MGIT 960 PZA Kit and SIRE Kit). Las CMI de los compuestos UCI fueron reportadas en el 2009 (como compuesto 3 para el UCI-05 y como compuesto 4b para el UCI-14), con un valor de CMI de 1.25 µg/mL en ambos compuestos para la cepa H37Rv, así como para la cepa CIBIN99 (Del Olmo et al., 2009). Las inconsistencias presentadas en las CMI reportadas previamente y las

observadas en nuestros resultados se pueden deber probablemente a la diferencia en el lote de síntesis de los compuestos UCI.

Durante el análisis del perfil de expresión génica de las clonas de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14 utilizando microarreglos, se observaron diferencias en la expresión de genes en tres condiciones de tratamiento: para el compuesto UCI-05 se observó una expresión génica diferencial en la clona 2 de H37Rv y para el compuesto UCI-14 se observó una diferencia en la expresión génica en las clonas 2 y 3 de H37Rv. De los resultados obtenidos por microarreglos se seleccionó un grupo representativo de 17 genes para su validación por PCR cuantitativa. En la comparación de ambas técnicas moleculares se observó una concordancia del 28%. La baja correlación entre los resultados obtenidos por la técnica de microarreglos y la de PCR en tiempo real evidencia la necesidad de confirmar siempre los resultados obtenidos por microarreglos con otra técnica molecular más sensible y específica como lo es la PCR cuantitativa (Park and Stegall, 2007; Castorena-Torres et al., 2008).

Los resultados validados mostraron una sobre-expresión significativa del gen *gltA1* y una tendencia en el gen *lprQ*, así como una represión del gen *rpsO*. El gen *gltA1* sobre-expresado significativamente en las clonas H37Rv sensibles tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI 14, también ha sido reportado durante el tratamiento de *M. tuberculosis* con el compuesto natural plumbagina utilizando concentraciones subinhibitorias (Ye et al., 2011). El gen *gltA1* codifica para la enzima citrato sintasa I, la cual cataliza dos reacciones: por un lado, la conversión de oxaloacetato más acetil-CoA en citrato más coenzima A en el ciclo del glioxilato (Reddy et al., 2009) y por otro lado la conversión de oxaloacetato más propanoyl-CoA en (2S, 3S)-2-metilcitrato más coenzima A en el ciclo del metil-citrato. Ambos procesos están involucrados en el metabolismo central del carbono de *M. tuberculosis* (Reddy et al., 2009; Rhee et al., 2011). Particularmente el ciclo del metil-citrato metaboliza propionil Co-A (Munoz-Elias et al., 2006), mientras que el ciclo del glioxilato metaboliza acetil-CoA ambos generados durante la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Rhee et al., 2011). A partir de los resultados obtenidos en este estudio, sugerimos que la sobreexpresión del gen *gltA1* durante el tratamiento con los compuestos UCI-05 y UCI-14 podría deberse a un mecanismo de respuesta de *M. tuberculosis*, donde

se incrementa la actividad en las rutas de degradación de lípidos con la finalidad de eliminar el exceso de los mismos y previniendo así su acumulación a niveles tóxicos (Munoz-Elias et al., 2006; Upton and McKinney, 2007), puesto que los compuestos UCI presentan una cadena lipídica derivada de la dihidroesfingosina (Del Olmo et al., 2009).

Las clonas H37Rv sensibles tratadas con el compuesto UCI-05 mostraron una represión significativa del gen *rpsO*. Este gen se ha reportado como parte del grupo de los 100 genes más expresados durante la fase logarítmica de *M. tuberculosis* (Fu and Fu-Liu, 2007). El gen *rpsO* codifica para la proteína ribosomal S15, que previamente ha sido identificada como parte de la subunidad 16S ribosomal en *Bacillus stearothermophilus*, y donde su función está vinculada a la unión del ribosoma al RNAm blanco independiente de su secuencia (Scott and Williamson, 2005). Con la disminución en la expresión del gen *rpsO* por efecto del compuesto UCI-05 encontrado en este estudio, se sugiere que el proceso de traducción estaría afectado en *M. tuberculosis* al ser tratadas con este compuesto como respuesta a una condición de estrés.

Las clonas CIBIN99 multifármacorresistente mostraron una respuesta distinta en el perfil de expresión génica al presentado en las clonas H37Rv sensibles en respuesta al tratamiento con los compuestos UCI, ya que al ser tratadas con el compuesto UCI-05 se observó una tendencia en la sobreexpresión del gen *lprQ* (Rv0483) sin llegar a ser estadísticamente significativa. El gen *lprQ* codifica para una lipoproteína, la cual pertenece a la familia ErfK/YbiS/YcfS/YnhG (Pfam PF03734) (Sutcliffe and Harrington, 2004). Previamente se ha descrito a las lipoproteínas como blancos para nuevos fármacos en bacterias Gram positivas (Hutchings et al., 2009), y en *M. tuberculosis* se ha reportado que mutaciones en genes involucrados en la ruta de síntesis de lipoproteínas reduce el crecimiento dentro de macrófagos en estudios in vitro, así como una atenuación de su virulencia (Sander et al., 2004). Particularmente se ha descrito que la lipoproteína LprQ posee una secuencia twin-arginina (Tat) que permite su exportación celular mediante la ruta de translocación Tat (McDonough et al., 2008). Hasta la fecha la lipoproteína LprQ no ha sido completamente caracterizada y su función aún se desconoce (Sutcliffe and Harrington, 2004; Reddy et al., 2009).

## 9. CONCLUSIONES

Los compuestos UCI-05 y UCI-14 alteran la expresión del gen *gltA1*, que codifica a la enzima citrato sintasa I, la cual está involucrada en el metabolismo central del carbono. Un incremento en la expresión de la citrato sintasa I permitiría aumentar la actividad de las rutas del glioxilato y del metilcitrato en las cepas pansensibles de *M. tuberculosis*.

El compuesto UCI-05 reprimió la expresión del gen *rpsO*, el cual codifica para la proteína ribosomal S15. Esta disminución en la expresión del gen *rpsO* podría alterar el proceso de traducción en cepas pansensibles de *M. tuberculosis*.

El compuesto UCI-05 redujo la expresión del gen *lprQ* en las clonas multifármacorresistentes. El gen *lprQ* codifica para la lipoproteína LprQ, la cual no ha sido caracterizada en *M. tuberculosis*.

## RECOMENDACIONES

1. Evaluar la expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ* en otras cepas de *M. tuberculosis* con diferentes fenotipos de resistencia y tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14.
2. Evaluar los niveles de las proteínas citrato sintasa I, S15 y lipoproteína Q en cepas de *M. tuberculosis* por efecto de los compuestos UCI-05 y UCI-14.
3. Realizar ensayos de represión o sobre-expresión de los genes *gltA1*, *lprQ* y *rpsO* en cepas de *M. tuberculosis*, y evaluar el efecto en presencia de los compuestos UCI y fármacos de primera línea.
4. Evaluar in vivo a las cepas de *M. tuberculosis* modificadas en la expresión de los genes *gltA1*, *rpsO* y *lprQ*, usando a ratones infectados y tratados con los compuestos UCI-05, UCI-14 y fármacos de primera línea.

**Anexo A.**

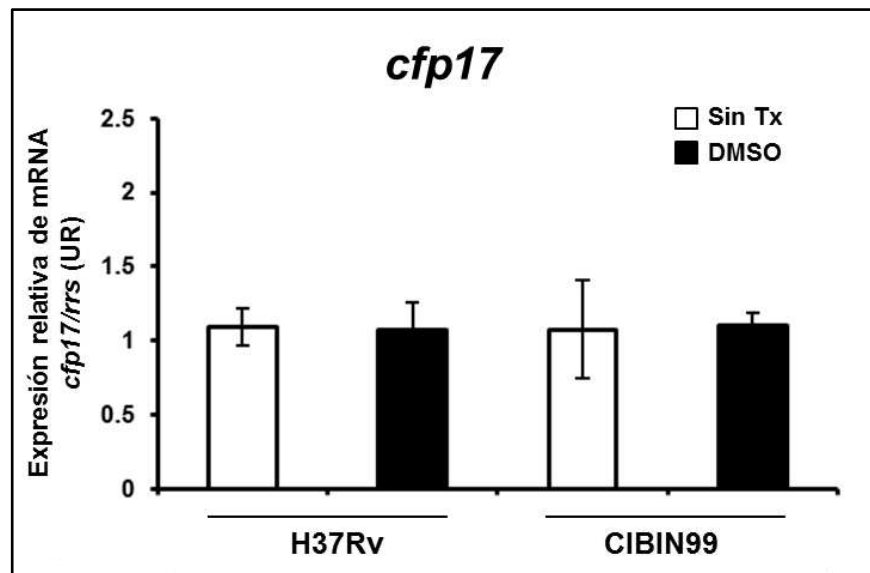
**Ensayos de RT-PCR en tiempo real en las cepas H37Rv y CIBIN99 de  
M. tuberculosis**



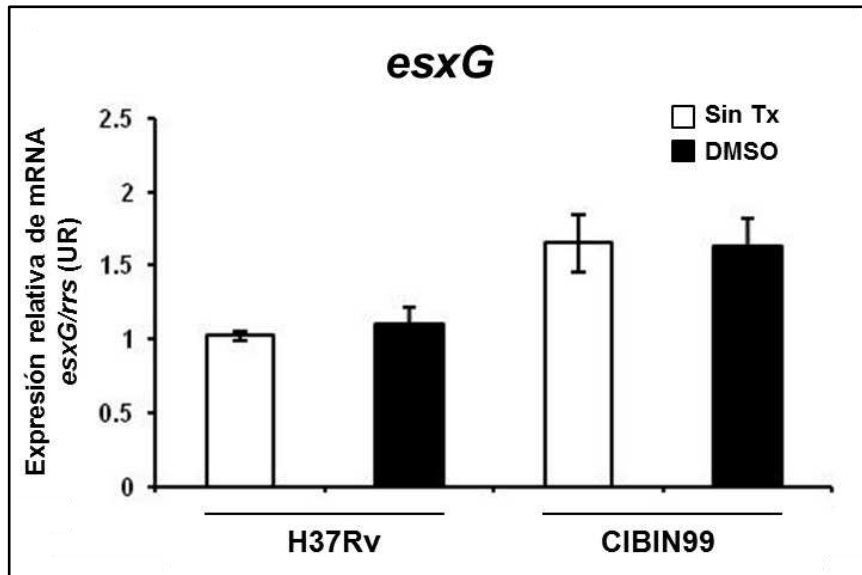
## Anexo A.

### Ensayos de RT-PCR en tiempo real en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*

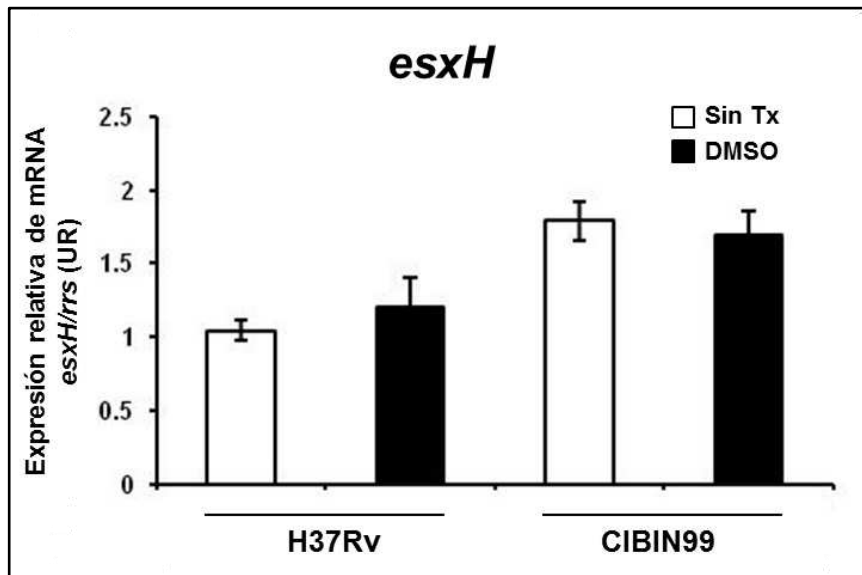
Simultáneamente al desarrollo de esta tesis se realizó el análisis de expresión genética de las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* por medio de microarreglos usando la plataforma Affymetrix. El cultivo de las cepas se realizó en presencia y ausencia de dimetilsulfóxido (DMSO) (González-Escalante 2011). Los ensayos de validación de todos los genes con expresión diferencial entre las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* fueron realizados por medio RT-PCR en tiempo real, y fueron ejecutados por la M. en C. Katia Peñuelas Urquides.



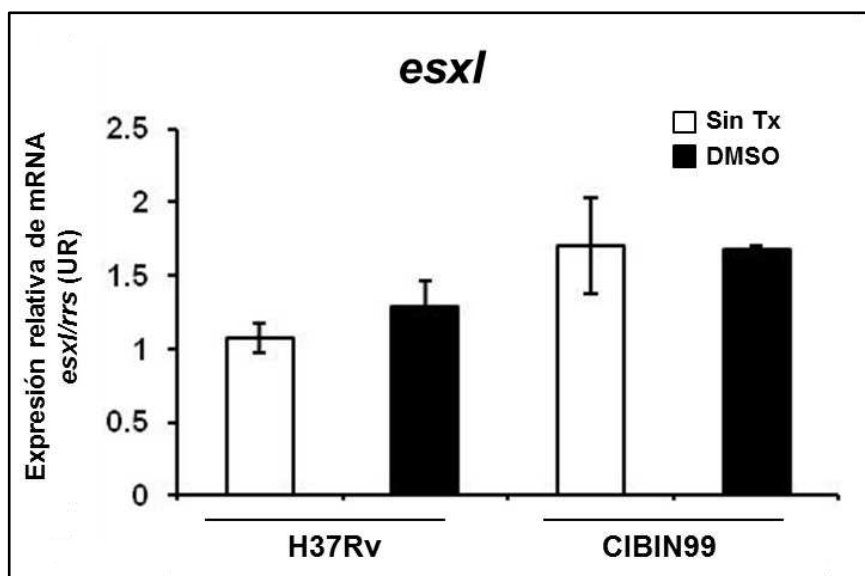
**Figura A-1.** Expresión relativa del gen *cfp17* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



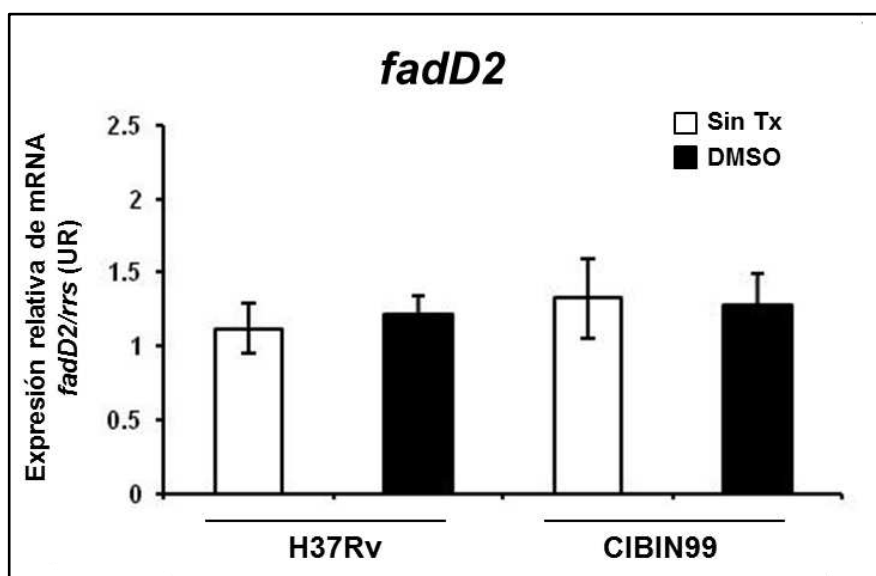
**Figura A-2.** Expresión relativa del gen *esxG* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



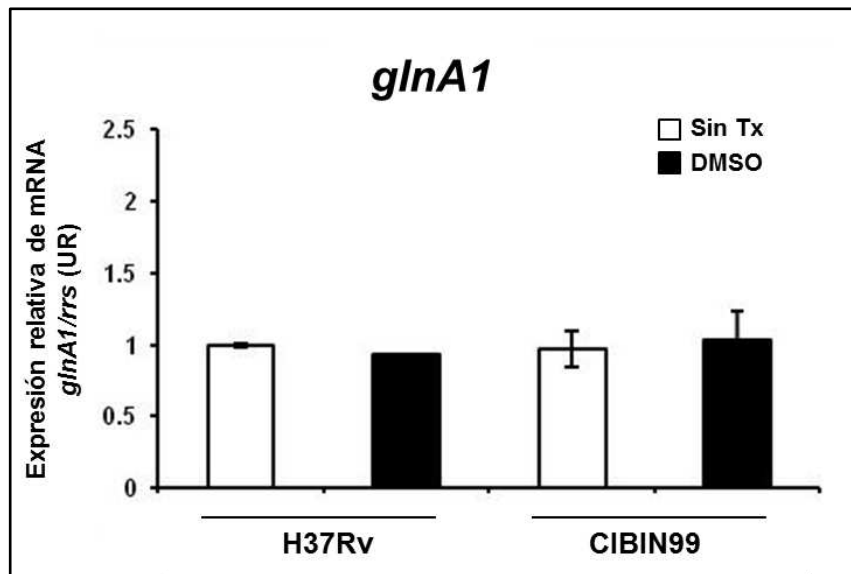
**Figura A-3.** Expresión relativa del gen *esxH* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



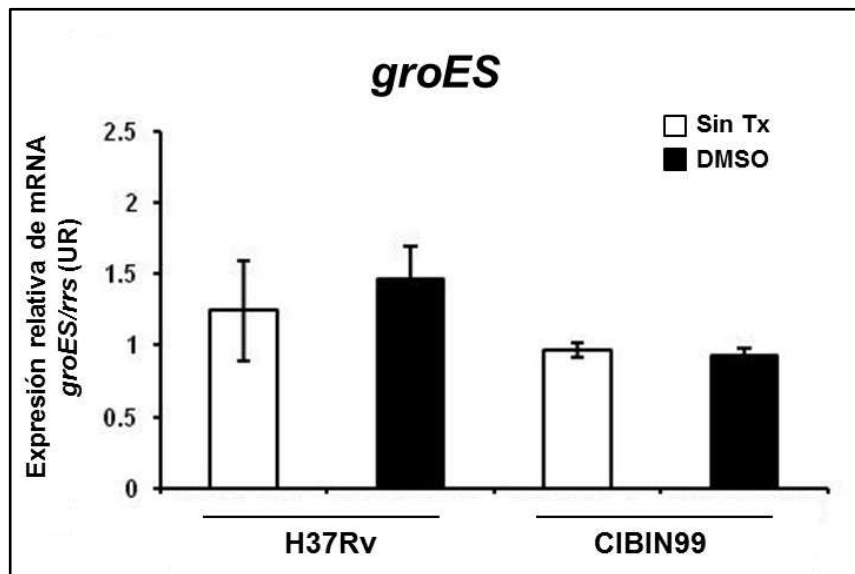
**Figura A-4.** Expresión relativa del gen *esxI* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



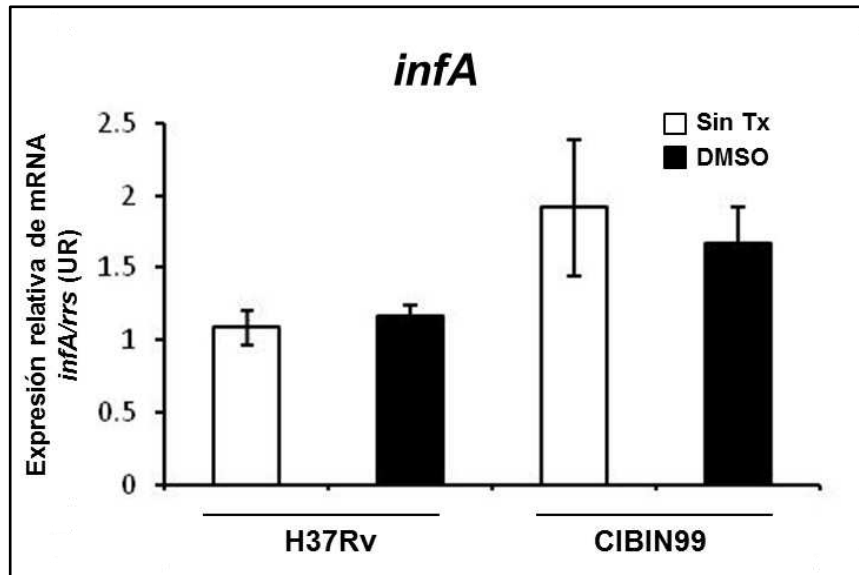
**Figura A-5.** Expresión relativa del gen *fadD2* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



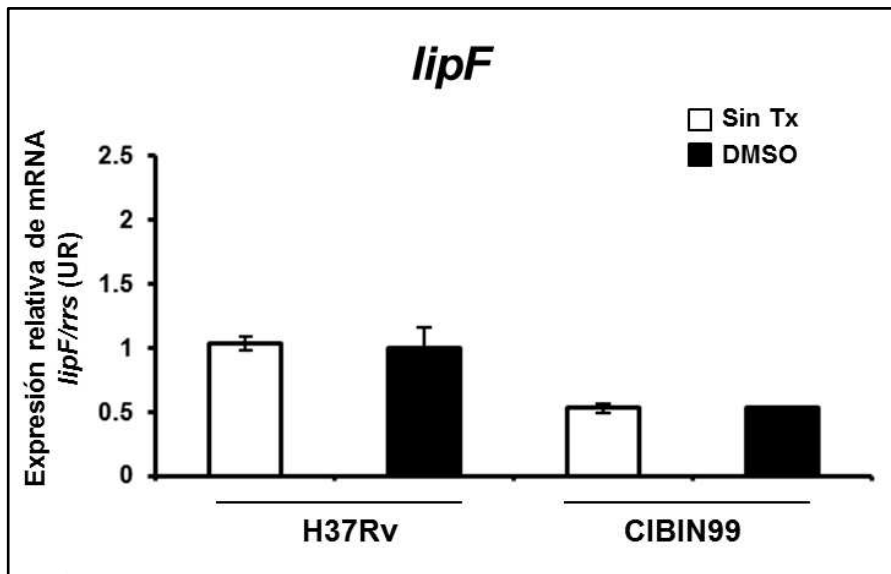
**Figura A-6.** Expresión relativa del gen *glnA1* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



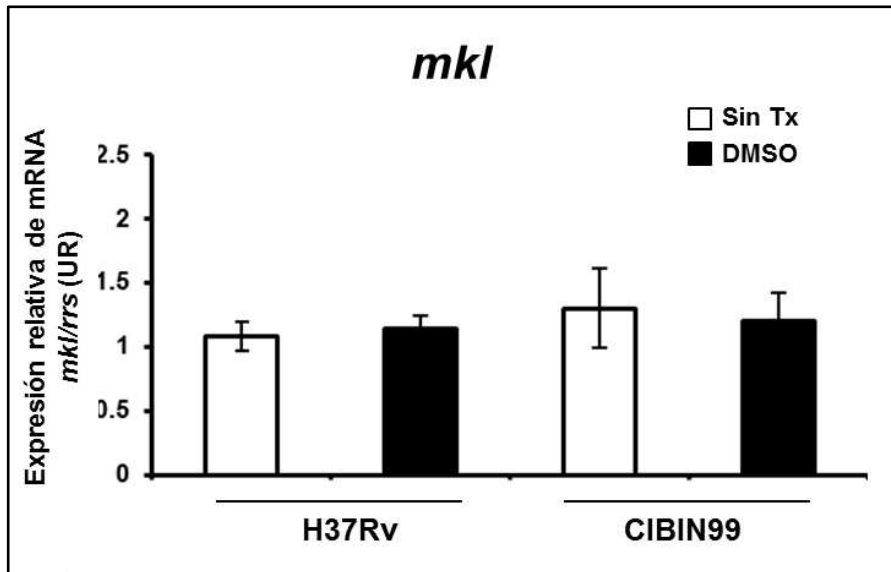
**Figura A-7.** Expresión relativa del gen *groES* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



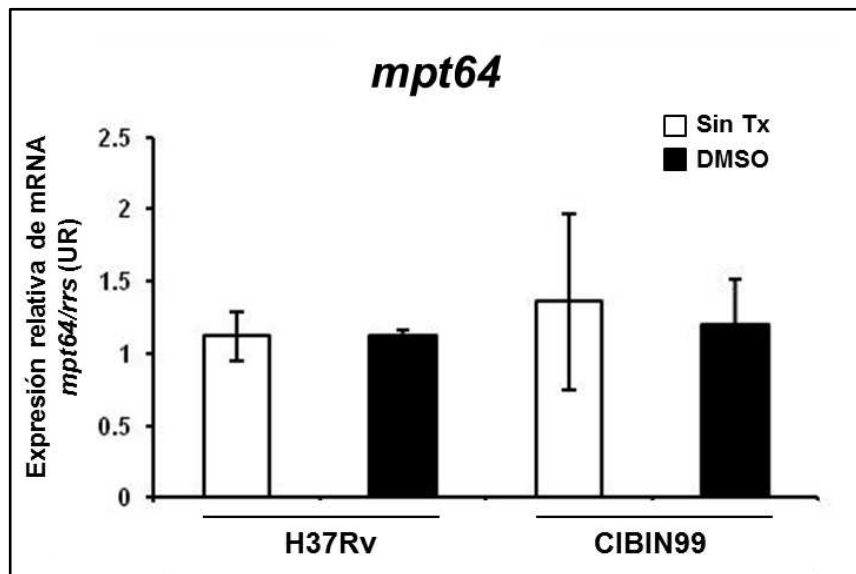
**Figura A-8.** Expresión relativa del gen *infA* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



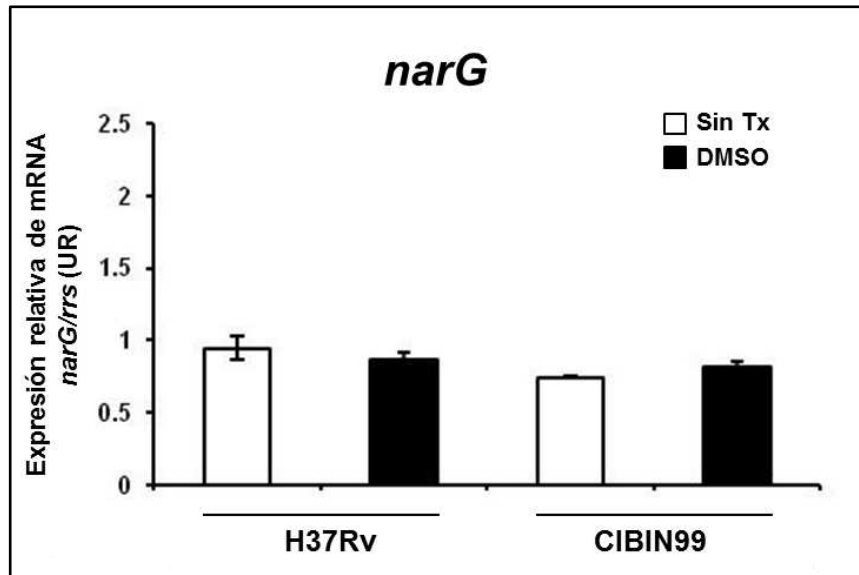
**Figura A-9.** Expresión relativa del gen *lipF* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



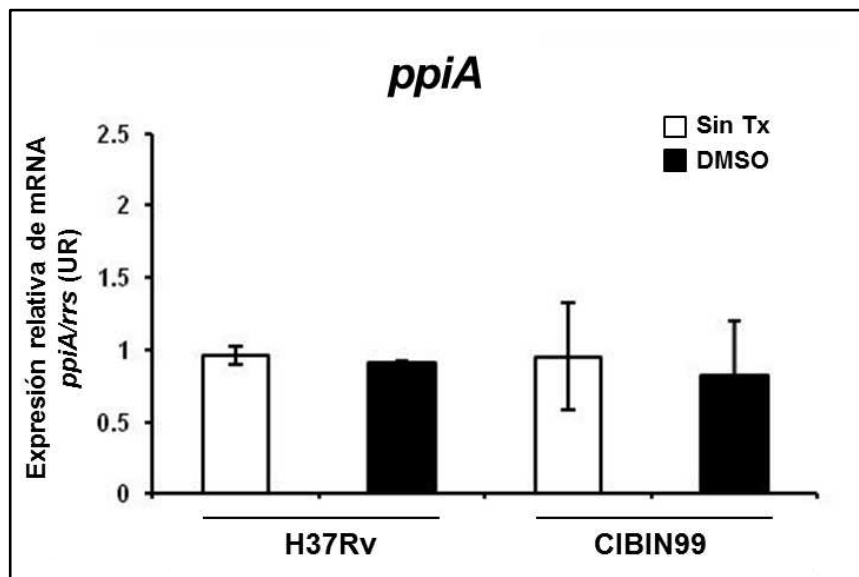
**Figura A-10.** Expresión relativa del gen *mkl* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



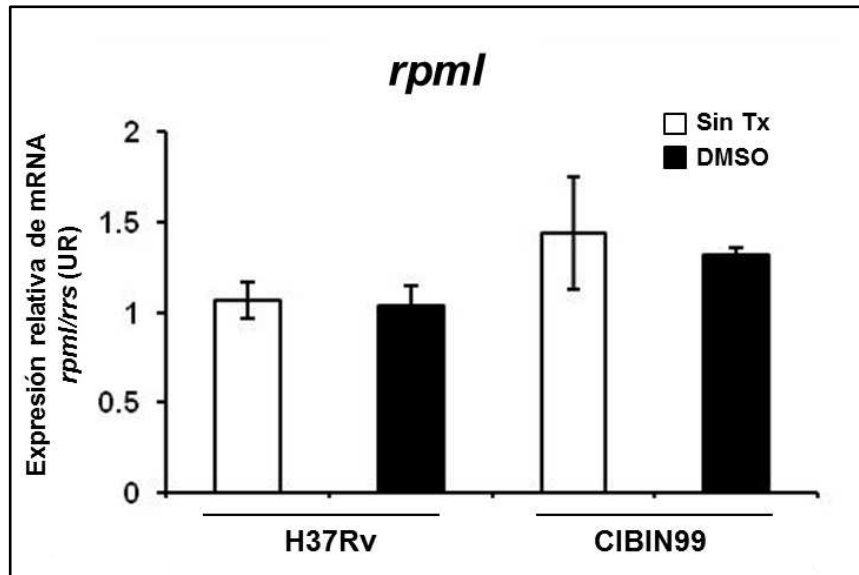
**Figura A-11.** Expresión relativa del gen *mpt64* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



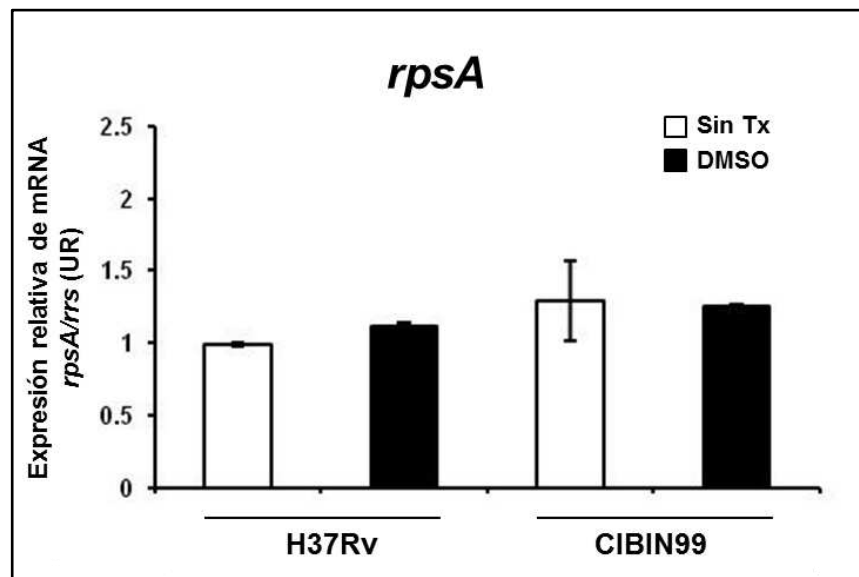
**Figura A-12.** Expresión relativa del gen *narG* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



**Figura A-13.** Expresión relativa del gen *ppiA* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).

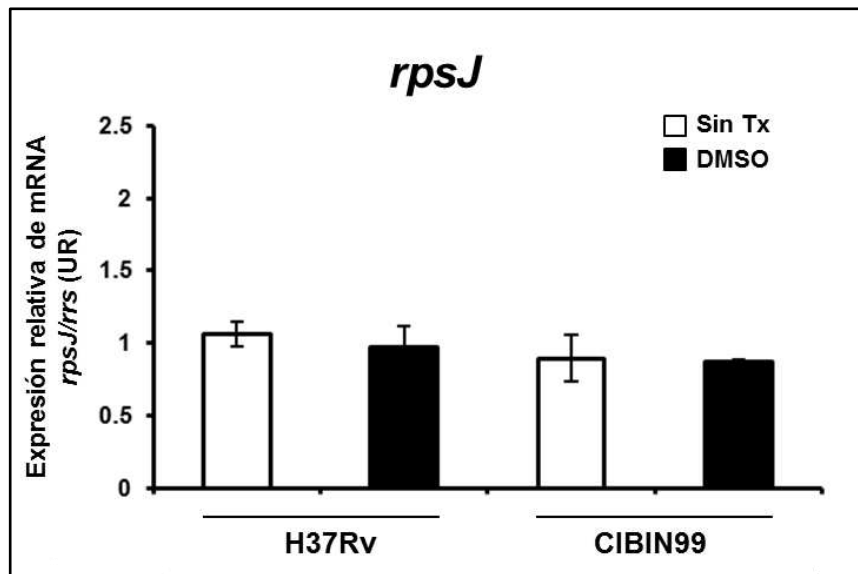


**Figura A-14.** Expresión relativa del gen *rplI* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).

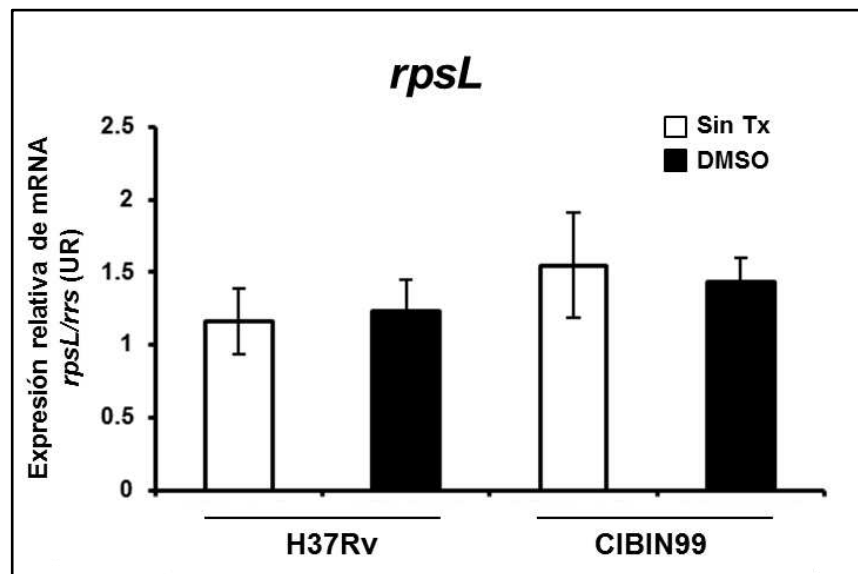


**Figura A-15.** Expresión relativa del gen *rpsA* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).

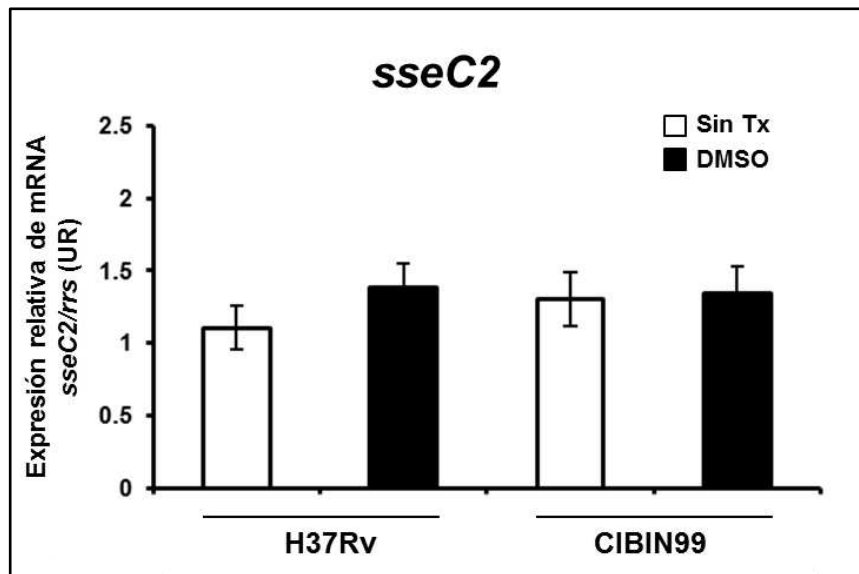




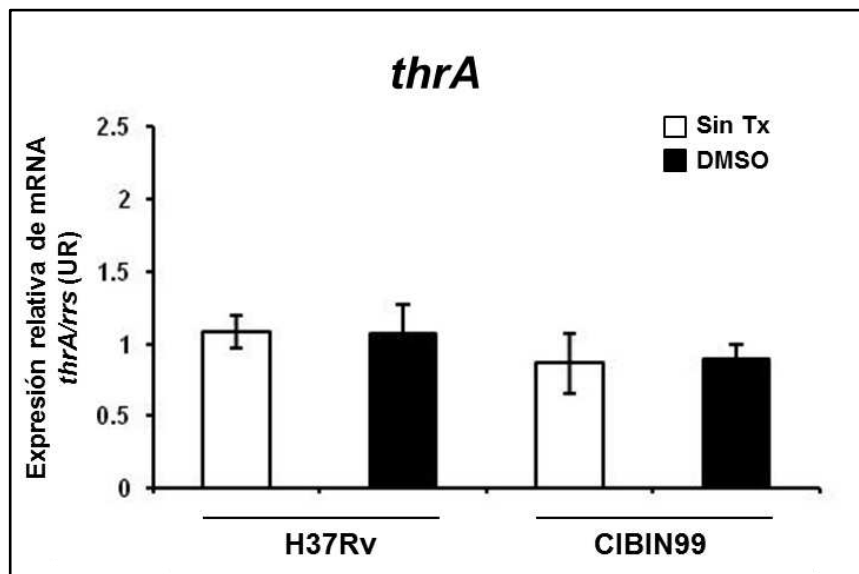
**Figura A-16.** Expresión relativa del gen *rpsJ* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



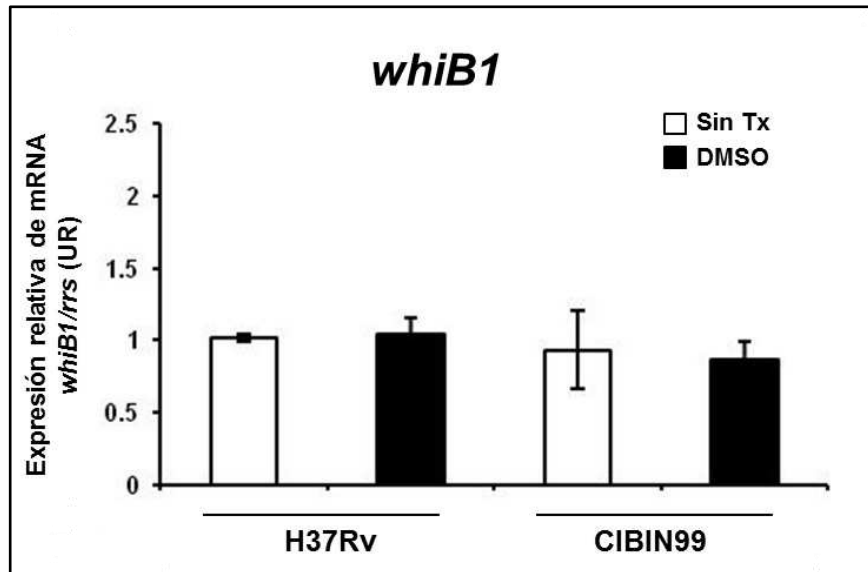
**Figura A-17.** Expresión relativa del gen *rpsL* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



**Figura A-18.** Expresión relativa del gen *sseC2* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



**Figura A-19.** Expresión relativa del gen *thrA* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



**Figura A-20.** Expresión relativa del gen *whiB1* en las cepas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de dos experimentos independientes. Las cepas fueron tratadas por 4 h con 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO, barras negras), las cepas sin tratamiento (Sin Tx, barras blancas) fueron establecidas como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).

## **Anexo B**

**Regiones genéticas que mostraron una expresión diferencial por microarreglos**

## Anexo B

### Regiones genéticas que mostraron una expresión diferencial por microarreglos

**Tabla B-1. Regiones genéticas con expresión diferencial en la clona H37Rv C-2 por efecto del compuesto UCI-05**

ID	Descripción	Log fold change
<b>Proteínas hipotéticas</b>		
esat6-4352606-4352893_at	Sin anotación	1.3517638
rRNA-1471844-1473380_3_st	Sin anotación	-1.421624
Rv0455c-545373-545819_at	Proteína hipotética	1.4980907
Rv0666-759134-759307_at	Posible proteína de membrana	-1.075464
Rv0796-889393-890331_s_at	Transposasa putativa para el elemento de inserción IS6110	1.2539065
Rv1072-1196277-1197113_at	Probable proteína transmembrana conservada	1.6728169
Rv1194c-1337246-1338511_at	Proteína hipotética	1.2670697
Rv1463-1650714-1651514_at	Proteína de unión a ATP conservada. Transportador ABC.	1.0113884
Rv1520-1711026-1712066_at	Probable azúcar transferasa	-1.038415
Rv1572c-1779192-1779275_at	Proteína hipotética	1.1615437
Rv1588c-1789166-1789834_s_at	Proteína parcial conteniendo un repetido REP13E12	1.2874472
Rv1987-2231024-2231452_at	Posible quitinasa	1.5338832
Rv2015c-2261814-2263070_at	Proteína hipotética	1.0886843
Rv2091c-2348556-2349290_at	Probable proteína de membrana	1.1650527
Rv2348c-2626652-2626978_at	Proteína hipotética	1.8059351
Rv2666-2983068-2983871_s_at	Transposasa IS1081 truncada	1.0205631
Rv2708c-3021545-3021793_at	Proteína hipotética	1.099716
Rv2840c-3147956-3148255_at	Proteína hipotética	1.1942626
Rv2876-3187660-3187974_at	Posible proteína transmembrana conservada	1.1622057
Rv3407-3826248-3826547_at	Proteína hipotética	2.1351659
PE_PGRS-3945790-3950259_2_at	Sin anotación	1.9420442
PE_PGRS-3945790-3950259_at	Sin anotación	1.4653249
PE-1339001-1339300_at	Sin anotación	1.4222513
PE-1561462-1561770_at	Sin anotación	1.1905216
PE-2651751-2651936_i_at	Sin anotación	-1.126312
PE-3894089-3894385_at	Sin anotación	1.0741959
PPE-1339347-1340522_at	Sin anotación	1.1700972
PPE-1561767-1563386_at	Sin anotación	1.4119785
PPE-3501331-3501729_at	Sin anotación	1.0051669
<b>Regiones intergénicas</b>		
ig1035-1452946-1453201_at	Sin anotación	1.2030836
ig1357-1960486-1960771_at	Sin anotación	-1.010655
ig2284-3239468-3239825_at	Sin anotación	1.214485
ig2516-3594233-3594464_f_at	Sin anotación	1.4149626
ig2516-3594233-3594464_r_at	Sin anotación	1.1284146
ig499-731675-731927_at	Sin anotación	1.2957627
ig772-1093143-1093358_r_at	Sin anotación	-1.19745
rc_ig1061-1485277-1485859_at	Sin anotación	1.2331302
rc_ig1917-2759487-2759776_at	Sin anotación	1.1769665
rc_ig2200-3119034-3120562_g_at	Sin anotación	1.3759691
rc_ig2284-3239468-3239825_at	Sin anotación	1.3793912
rc_ig2516-3594233-3594464_f_at	Sin anotación	-1.192404
rc_ig2705-3880067-3880281_at	Sin anotación	1.339046
<b>tRNAs</b>		
tRNA-2581762-2581835_at	Sin anotación	1.1832273

**Tabla B-1 (continuación)**

<b>ID</b>	<b>Descripción</b>	<b>Log fold change</b>
tRNA-2619405-2619477_i_at	Sin anotación	1.0592253
tRNA-2765329-2765402_r_at	Sin anotación	-1.225951
tRNA-2794174-2794247_at	Sin anotación	2.3094485
tRNA-2969750-2969822_i_at	Sin anotación	1.2021879
tRNA-4222578-4222664_f_at	Sin anotación	-1.107673
tRNA-733522-733594_at	Sin anotación	1.3666683

**Tabla B-2. Regiones genéticas con expresión diferencial en la clona H37Rv C-2 por efecto del compuesto UCI-14**

ID	Descripción	Log fold change
<b>Proteínas hipotéticas</b>		
esat6-4352606-4352893_at	Sin anotación	1.4495581
rRNA-1471844-1473380_3_st	Sin anotación	-1.472669
Rv0094c-103708-104661_s_at	Proteína hipotética	1.1264249
Rv0455c-545373-545819_at	Proteína hipotética	1.6162677
Rv0750-842031-842276_at	Proteína hipotética	-1.093224
Rv0795-889070-889396_s_at	Transposasa putativa para la inserción de la secuencia del elemento IS6110 (fragmento)	1.0206802
Rv0796-889393-890331_s_at	Transposasa putativa para la inserción de la secuencia del elemento IS6110	1.630221
Rv1072-1196277-1197113_at	Probable proteína transmembrana conservada	1.2049812
Rv1194c-1337246-1338511_at	Proteína hipotética	1.1464718
Rv1520-1711026-1712066_at	Probable azúcar transferasa	-1.146826
Rv1572c-1779192-1779275_at	Proteína hipotética	1.2791957
Rv1584c-1786305-1786526_at	Posible proteína del fago phiRv1	1.0010166
Rv1588c-1789166-1789834_s_at	Proteína parcial conteniendo un repetido REP13E12	1.6504721
Rv1987-2231024-2231452_at	Posible quitinasa	1.309322
Rv2015c-2261814-2263070_at	Proteína hipotética	1.069868
Rv2091c-2348556-2349290_at	Probable proteína membrana	1.0852278
Rv2348c-2626652-2626978_at	Proteína hipotética	1.8014061
Rv2666-2983068-2983871_s_at	Transposasa IS1081 truncada	1.1845035
Rv3355c-3769510-3769803_r_at	Proteína hipotética	-1.278039
Rv3407-3826248-3826547_at	Proteína hipotética	2.101444
PE_PGRS-1093359-1094354_at	Sin anotación	1.0777994
PE_PGRS-3945790-3950259_2_at	Sin anotación	2.0522664
PE_PGRS-3945790-3950259_at	Sin anotación	1.6025854
PE-1339001-1339300_at	Sin anotación	1.1942325
PE-2651751-2651936_i_at	Sin anotación	-1.222197
PPE-1561767-1563386_at	Sin anotación	1.2942153
<b>Regiones intergénicas</b>		
ig1035-1452946-1453201_at	Sin anotación	1.3128693
ig1357-1960486-1960771_at	Sin anotación	-1.086958
ig2284-3239468-3239825_at	Sin anotación	1.7097508
ig2516-3594233-3594464_f_at	Sin anotación	1.7148787
ig2516-3594233-3594464_r_at	Sin anotación	1.1589003
ig499-731675-731927_at	Sin anotación	1.3806693
ig772-1093143-1093358_r_at	Sin anotación	-1.223922
rc_ig1034-1451778-1451994_r_at	Sin anotación	1.2519345
rc_ig1061-1485277-1485859_at	Sin anotación	1.1073563
rc_ig1917-2759487-2759776_at	Sin anotación	1.2071324
rc_ig2200-3119034-3120562_g_at	Sin anotación	1.5498701
rc_ig2284-3239468-3239825_at	Sin anotación	1.76053
rc_ig2325-3336503-3336792_at	Sin anotación	1.1165955
rc_ig2516-3594233-3594464_f_at	Sin anotación	-1.257004
rc_ig2516-3594233-3594464_r_at	Sin anotación	-1.169614
rc_ig2705-3880067-3880281_at	Sin anotación	1.215421
rc_ig772-1093143-1093358_i_at	Sin anotación	1.1586368
<b>tRNAs</b>		
tRNA-2619405-2619477_i_at	Sin anotación	1.1454259
tRNA-2765329-2765402_r_at	Sin anotación	-1.320774

**Tabla B-2 (continuación)**

tRNA-2794174-2794247_at	Sin anotación	2.2341573
tRNA-2969750-2969822_i_at	Sin anotación	1.3617506
tRNA-3431837-3431909_i_at	Sin anotación	1.0709795
tRNA-4222578-4222664_f_at	Sin anotación	-1.235702
tRNA-733522-733594_at	Sin anotación	1.4359943



**Tabla B-3. Regiones genéticas con expresión diferencial en la clona H37Rv C-3 por efecto del compuesto UCI-14**

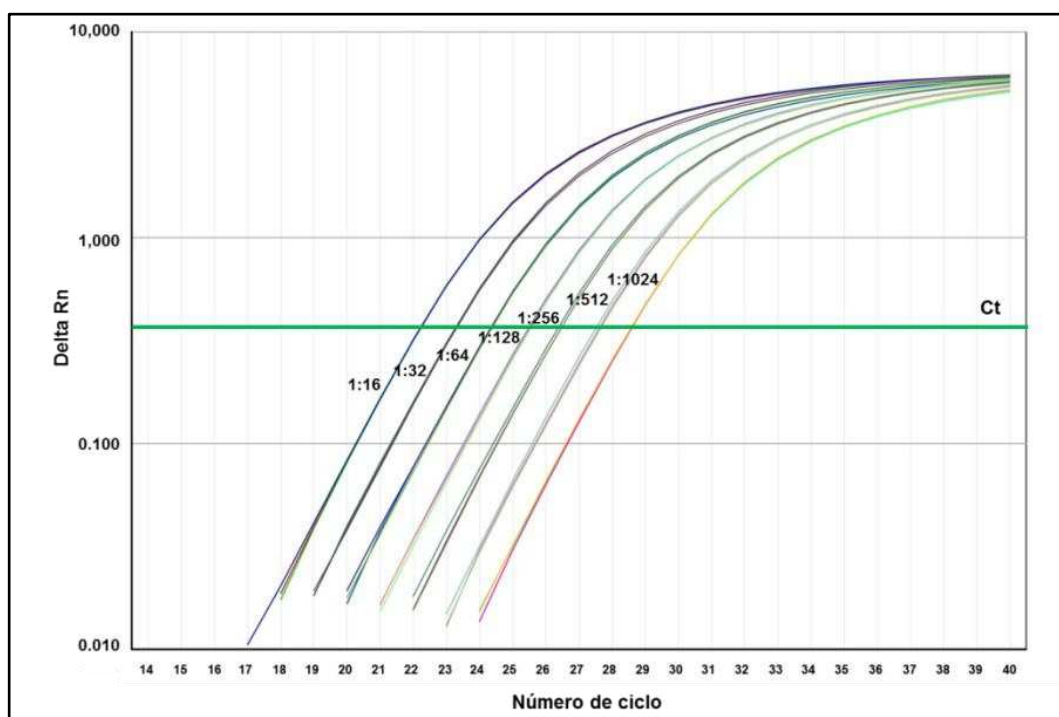
<b>ID</b>	<b>Descripción</b>	<b>Log fold change</b>
<b>Proteínas hipotéticas</b>		
Rv0250c-301733-302026_at	Proteína hipotética	-1.088411
Rv0282-342128-344023_at	Proteína hipotética	-1.325854
Rv0283-344020-345636_at	Posible proteína de membrana conservada	-1.016107
Rv0455c-545373-545819_at	Proteína hipotética	-1.445608
Rv0805-898829-899785_at	Proteína hipotética	-1.042595
Rv1072-1196277-1197113_at	Probable proteína transmembrana conservada	-1.15718
Rv1871c-2121493-2121882_at	Proteína hipotética	-1.573045
Rv1987-2231024-2231452_at	Posible quitinasa	-1.027873
Rv2159c-2420629-2421663_at	Proteína hipotética	-1.019585
Rv2348c-2626652-2626978_at	Proteína hipotética	-1.504695
Rv2840c-3147956-3148255_at	Proteína hipotética	-1.221994
Rv3407-3826248-3826547_at	Proteína hipotética	-1.353572
<b>Regiones intergénicas</b>		
ig1035-1452946-1453201_at	Sin anotación	-1.588157
ig1293-1852034-1852270_at	Sin anotación	-1.094866
ig229-341905-342127_at	Sin anotación	-1.056194
ig2516-3594233-3594464_f_at	Sin anotación	-1.00867
ig499-731675-731927_at	Sin anotación	-1.407531
ig501-733324-733521_at	Sin anotación	-1.265251
PE-349622-349930_at	Sin anotación	-1.136853
PPE-1561767-1563386_at	Sin anotación	-1.438719
rc_ig1061-1485277-1485859_at	Sin anotación	-1.036493
rc_ig2487-3551042-3551277_at	Sin anotación	1.7920592
rc_ig2516-3594233-3594464_f_at	Sin anotación	1.2170469
rc_ig2583-3690935-3691136_f_at	Sin anotación	1.0844289
rc_ig2705-3880067-3880281_at	Sin anotación	-1.186981
rc_ig863-1205797-1205981_at	Sin anotación	-1.005322
<b>tRNAs</b>		
tRNA-1512726-1512809_at	Sin anotación	-1.083997
tRNA-2794174-2794247_at	Sin anotación	-1.648411
tRNA-2835492-2835564_i_at	Sin anotación	-1.429207
tRNA-731601-731674_at	Sin anotación	-1.1437
tRNA-733522-733594_at	Sin anotación	-1.049977

## **Anexo C**

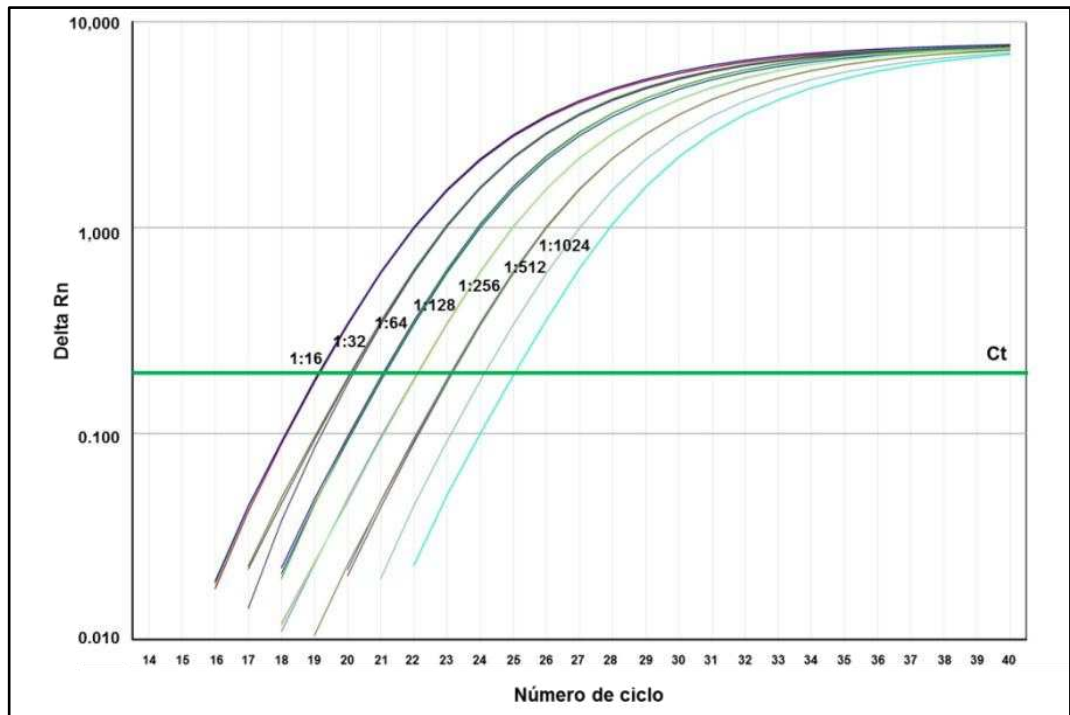
**Rango dinámico de amplificación de genes de *M. tuberculosis* seleccionados para su validación por PCR cuantitativa**

## Anexo C

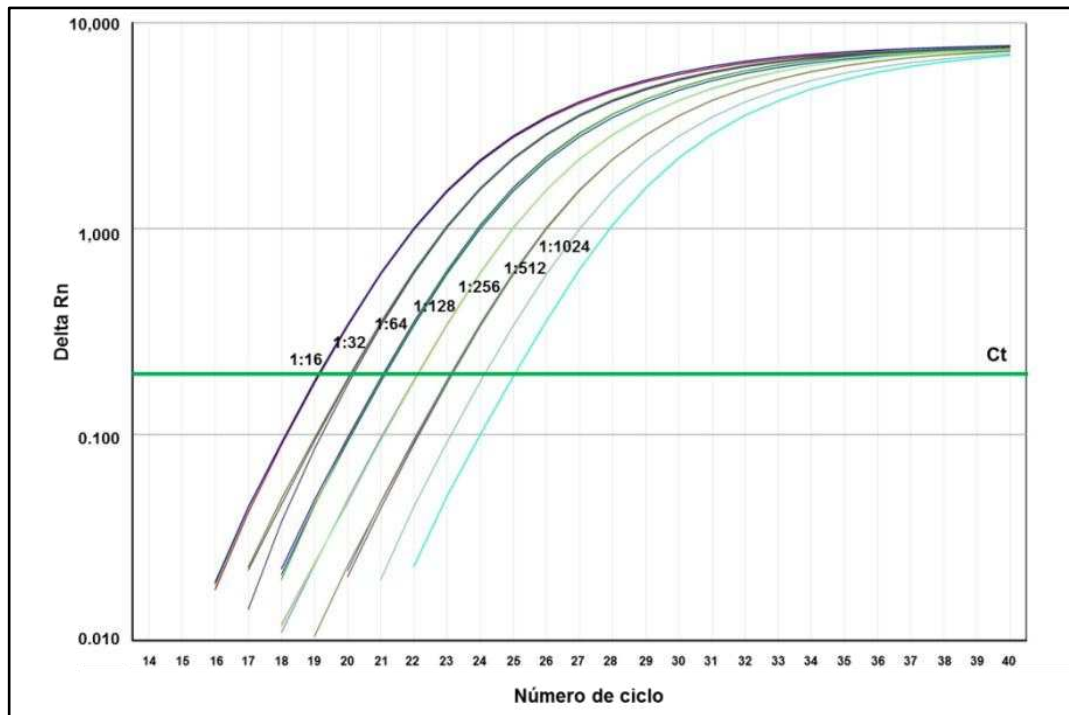
### Rango dinámico de amplificación de genes de *M. tuberculosis* seleccionados para su validación por PCR cuantitativa



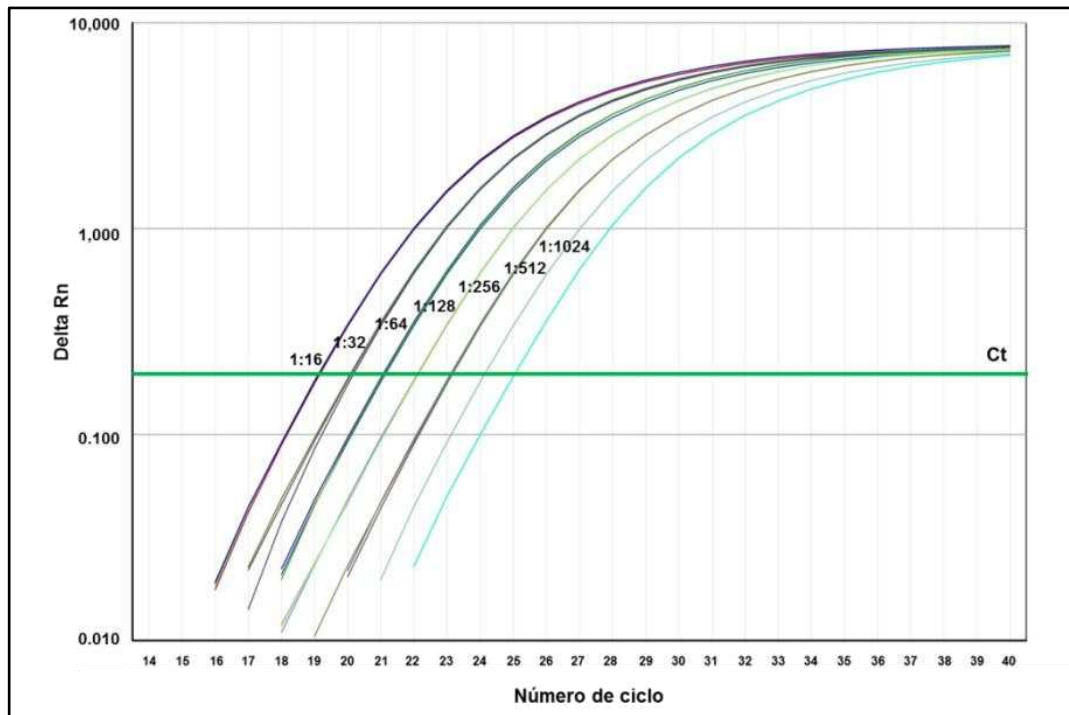
**Figura C-1.** Rango dinámico de amplificación para el gen *desA2* de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *desA2* (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.



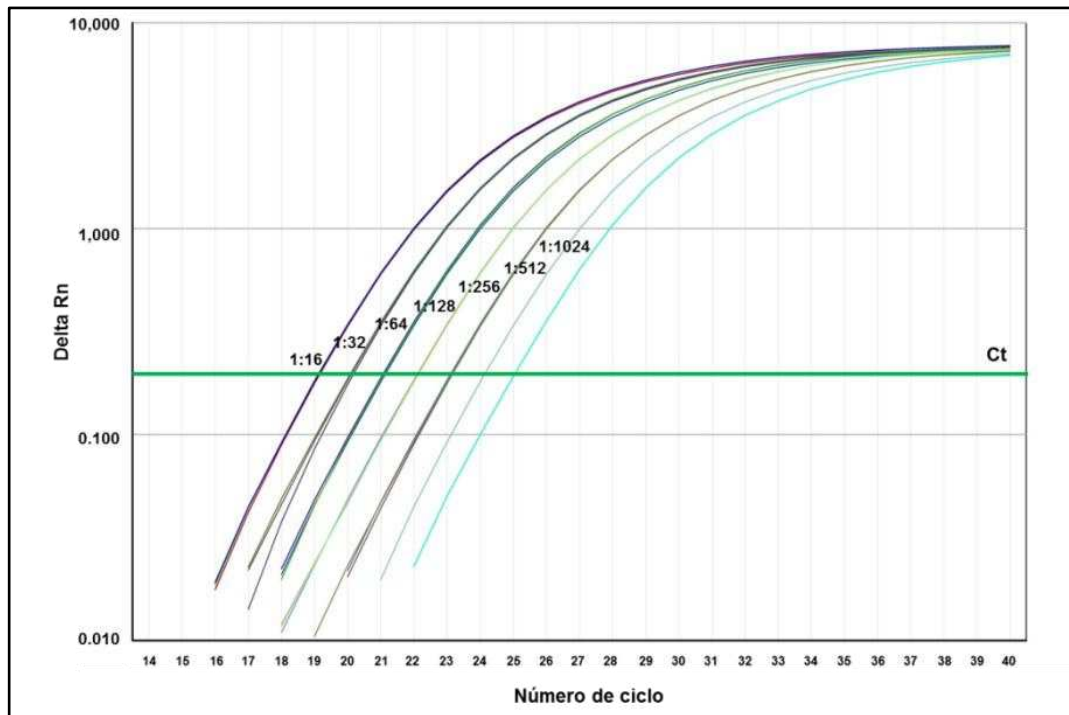
**Figura C-2.** Rango dinámico de amplificación para el gen esxG de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen desA2 (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.



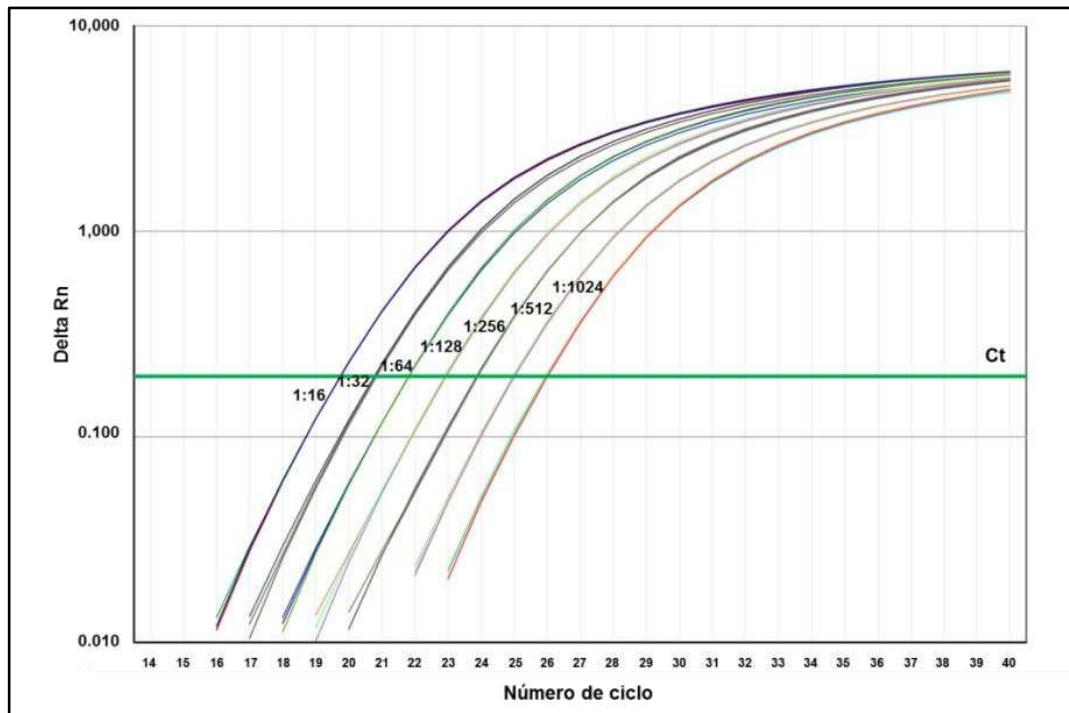
**Figura C-3.** Rango dinámico de amplificación para el gen *esxH* de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *esxH* (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.



**Figura C-4.** Rango dinámico de amplificación para el gen *esxI* de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *esxI* (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.

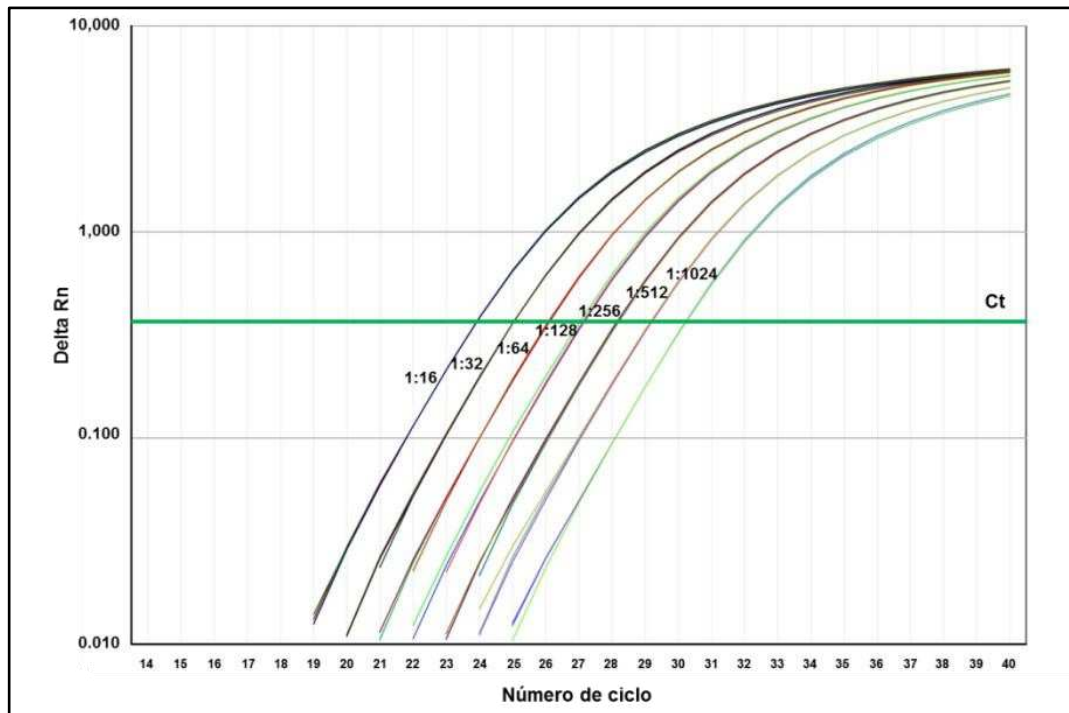


**Figura C-5.** Rango dinámico de amplificación para el gen *gItA1* de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *desA2* (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.

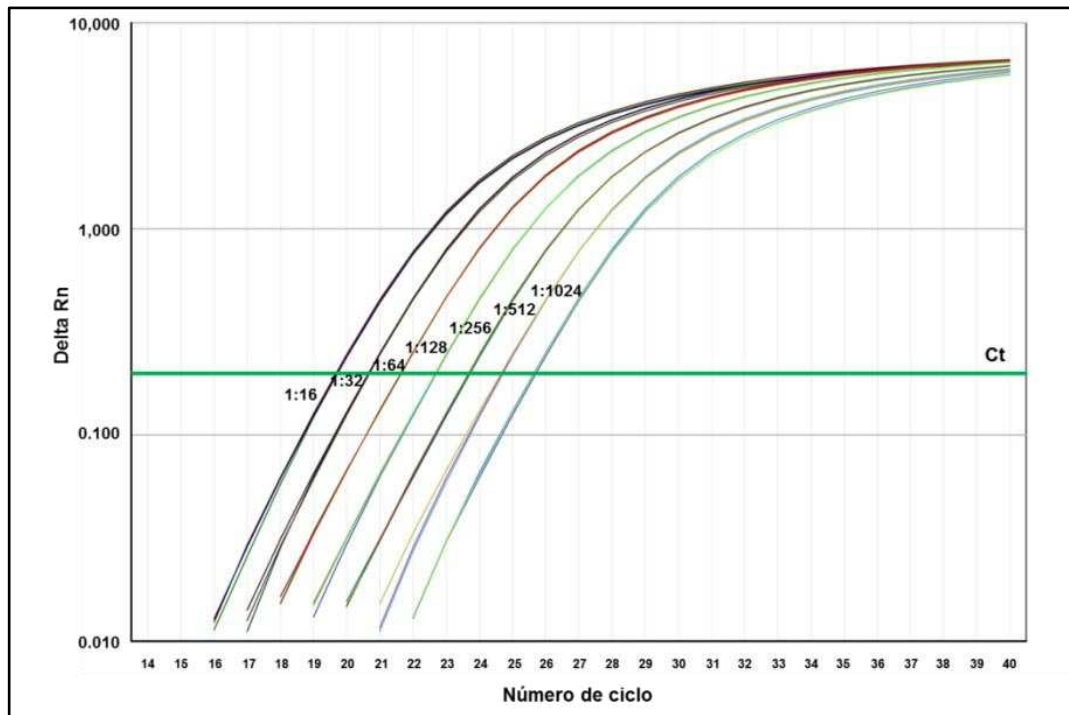


**Figura C-6.** Rango dinámico de amplificación para el gen groES de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen desA2 (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.

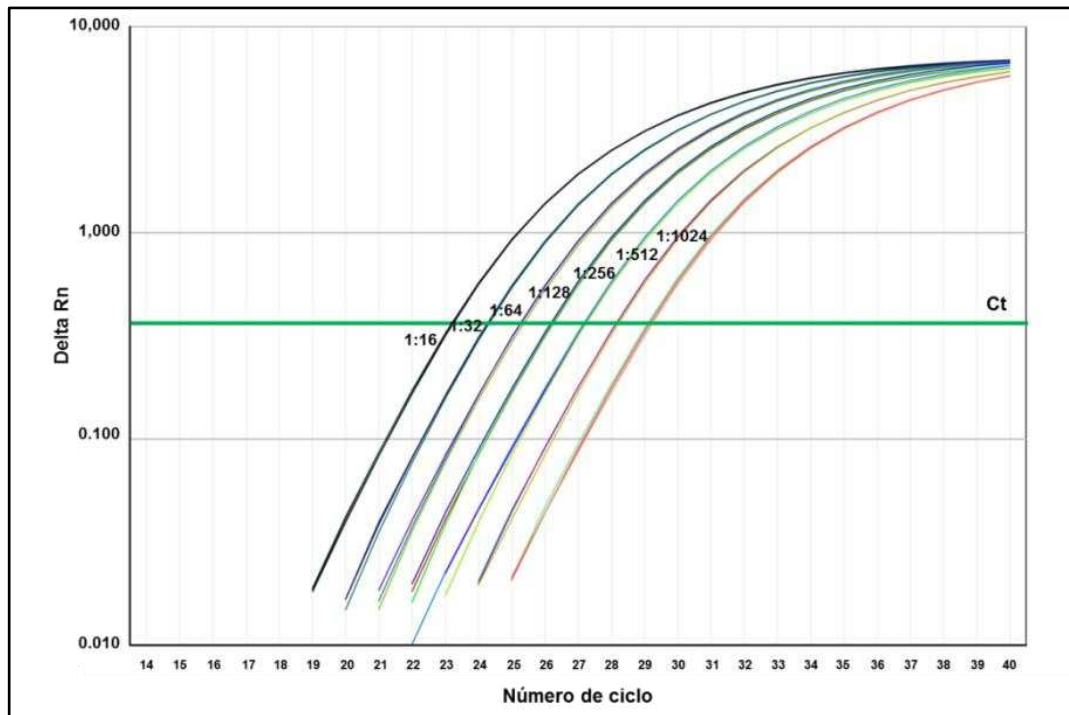




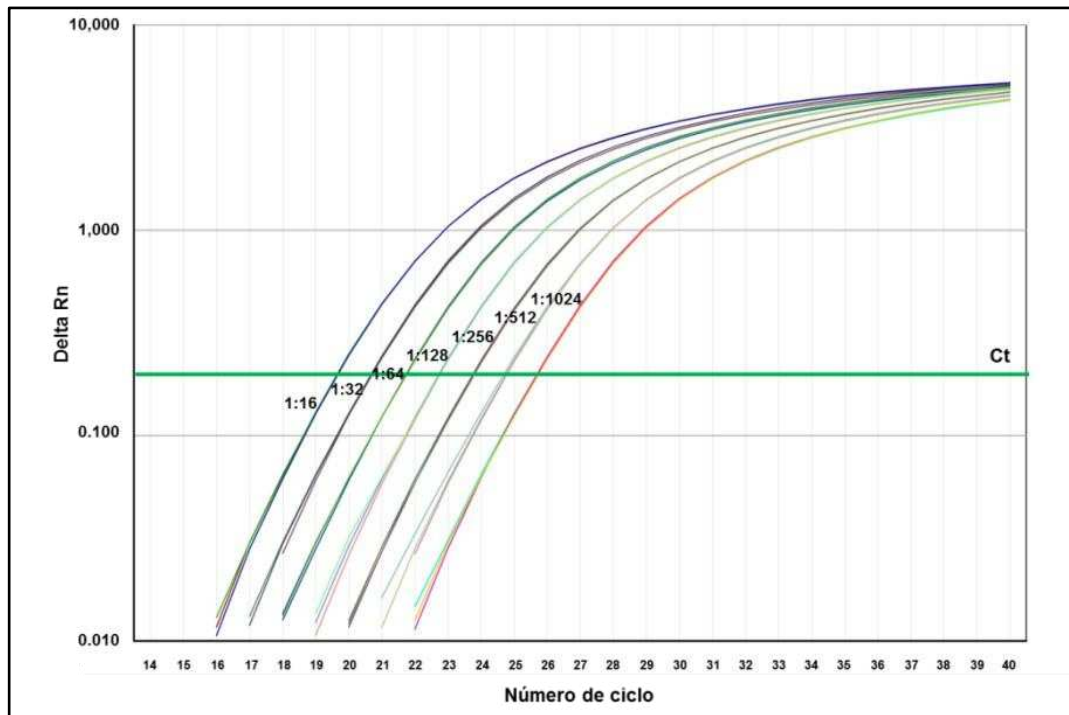
**Figura C-7.** Rango dinámico de amplificación para el gen hspX de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen desA2 (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.



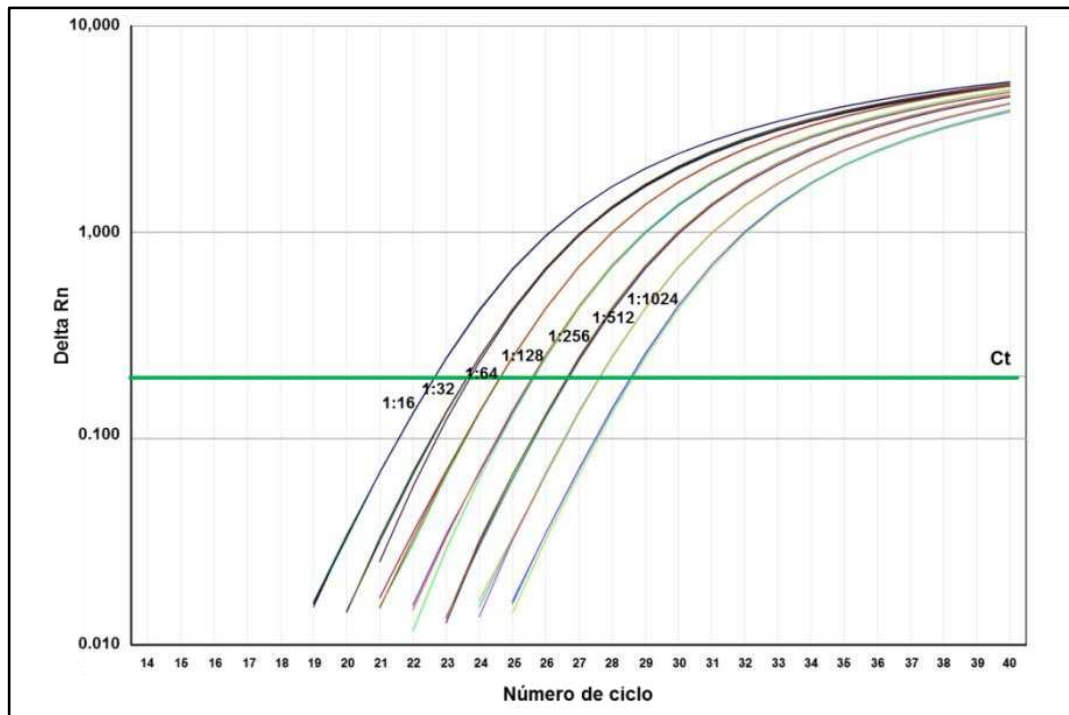
**Figura C-8.** Rango dinámico de amplificación para el gen infA de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen desA2 (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.



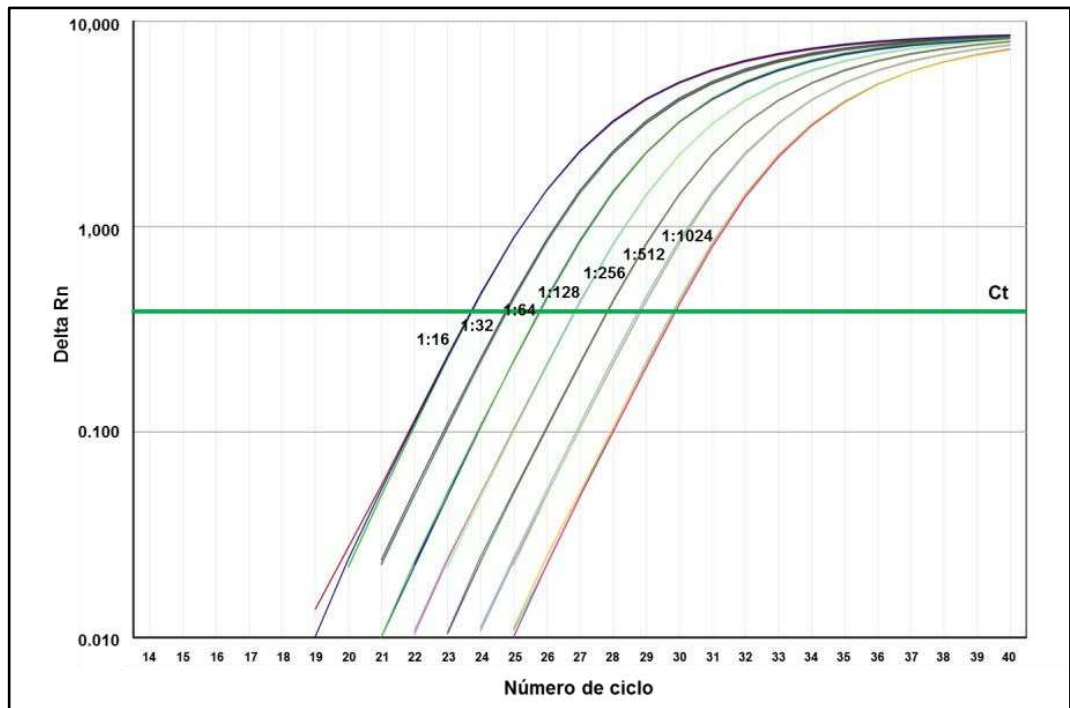
**Figura C-9.** Rango dinámico de amplificación para el gen *iniB* de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *desA2* (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.



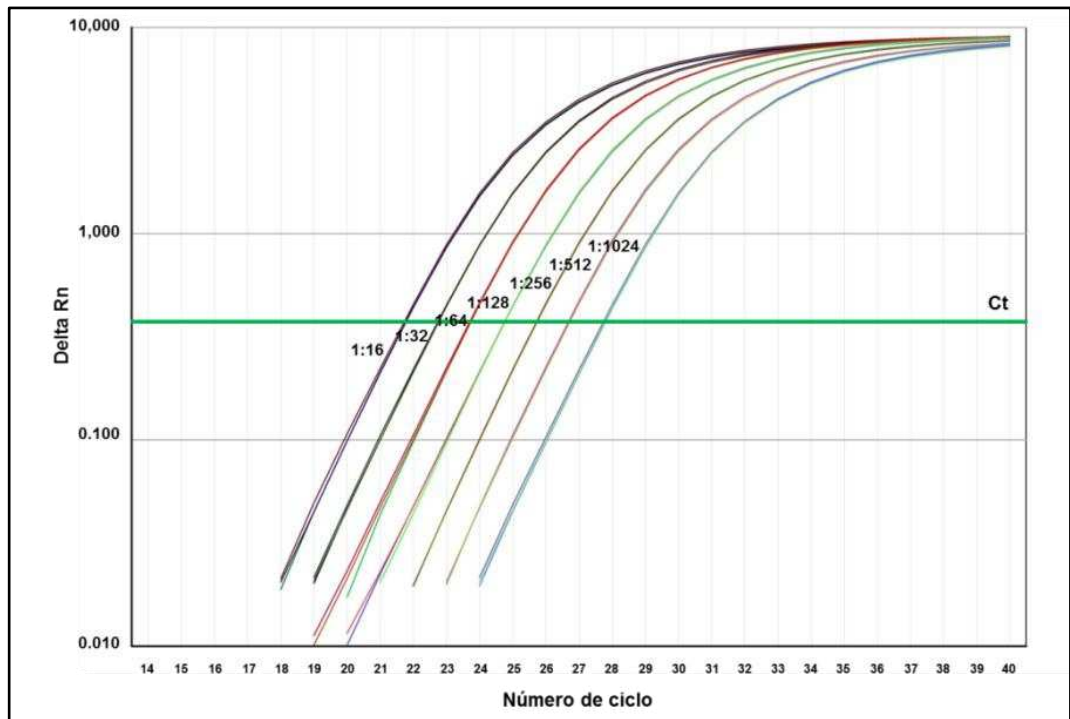
**Figura C-10.** Rango dinámico de amplificación para el gen *lldD2* de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *desA2* (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.



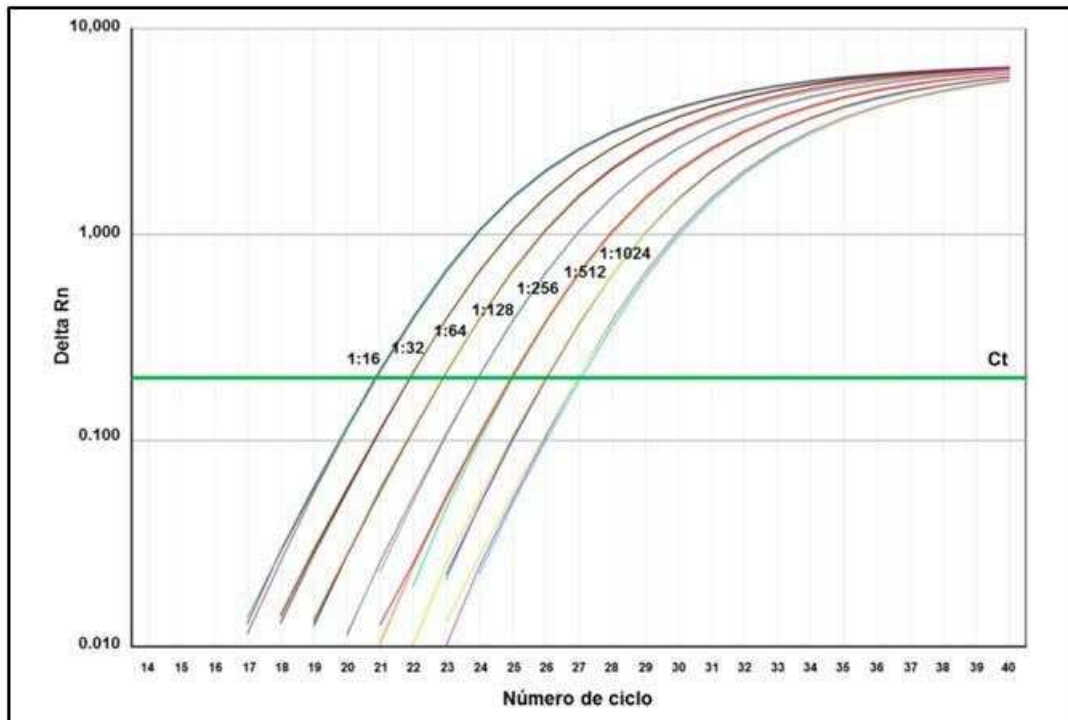
**Figura C-11.** Rango dinámico de amplificación para el gen *lprQ* de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *desA2* (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.



**Figura C-12.** Rango dinámico de amplificación para el gen *mmaA4* de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *desA2* (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.

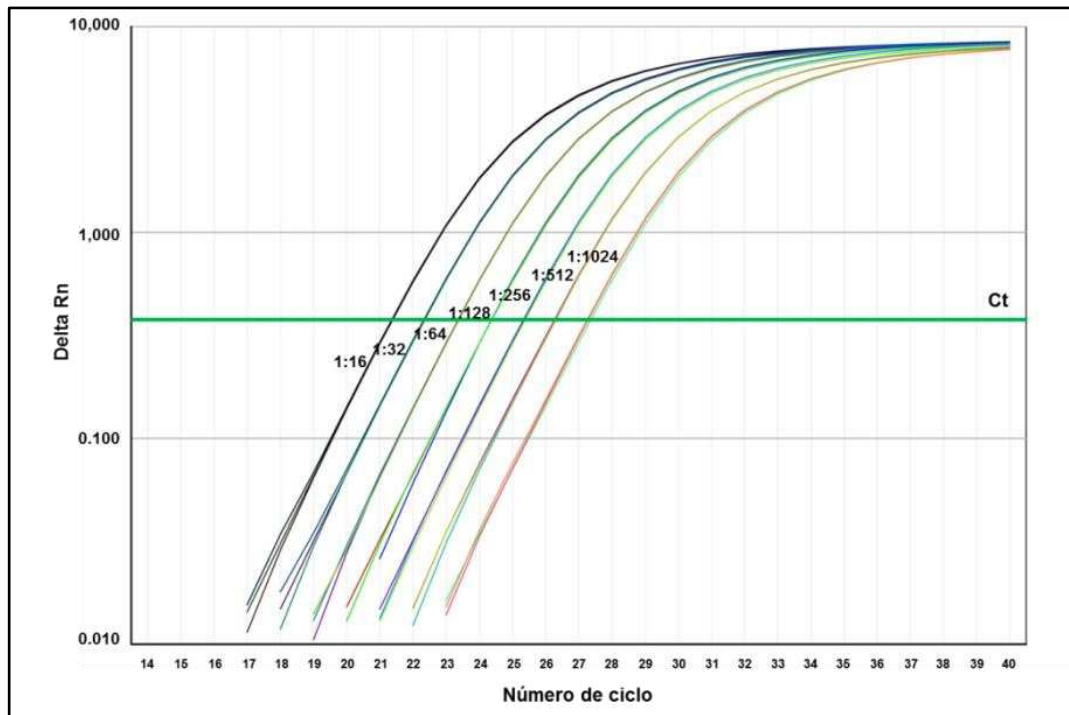


**Figura C-13.** Rango dinámico de amplificación para el gen *nrdH* de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *desA2* (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.

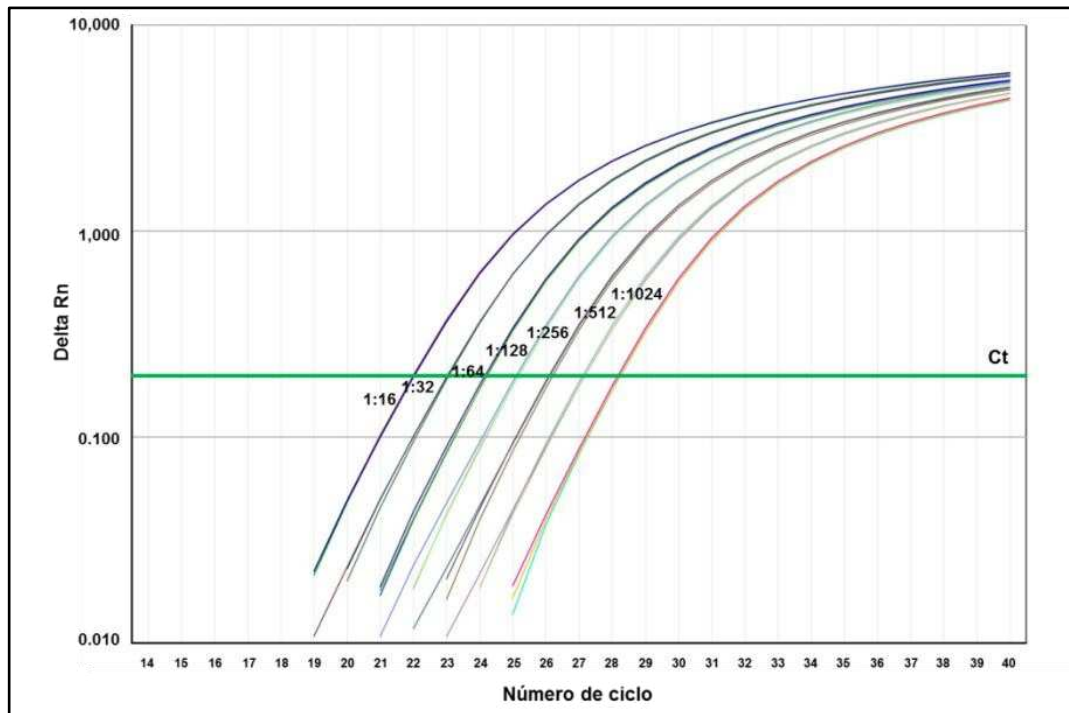


**Figura C-14.** Rango dinámico de amplificación para el gen rpmI de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen desA2 (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.

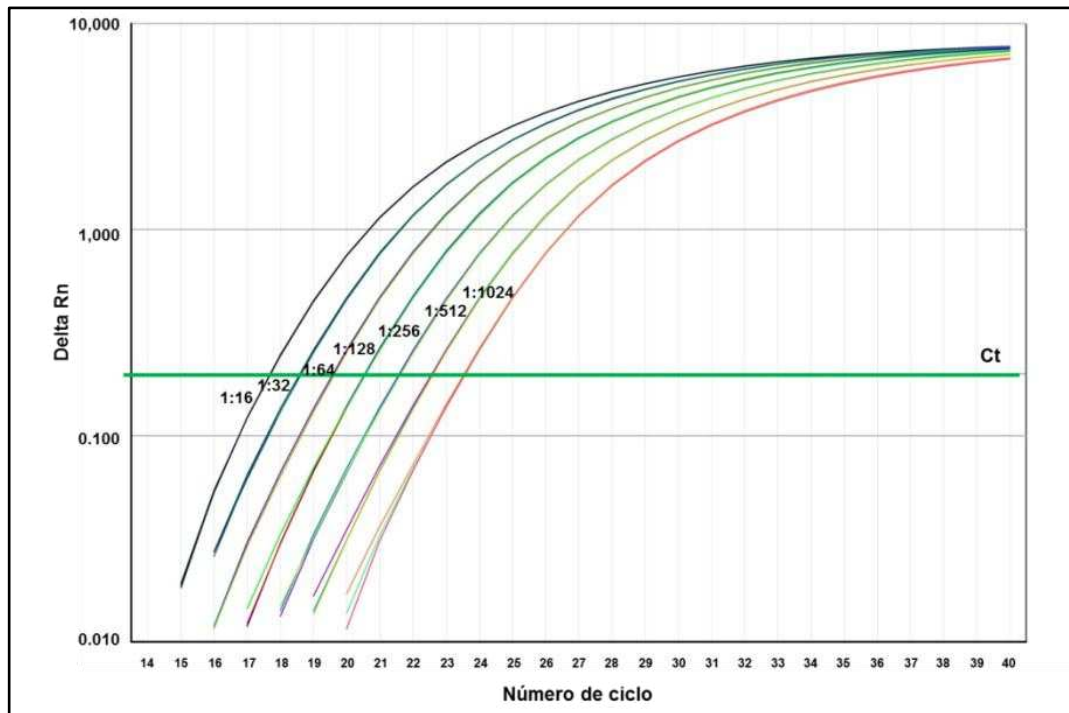




**Figura C-15.** Rango dinámico de amplificación para el gen rpsO de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen desA2 (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.



**Figura C-16.** Rango dinámico de amplificación para el gen *tatA* de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *desA2* (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.



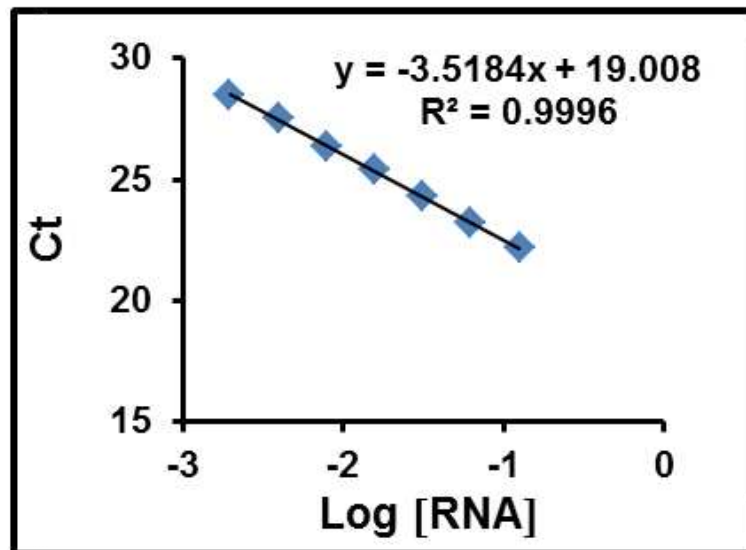
**Figura C-17.** Rango dinámico de amplificación para el gen *whiB1* de *M. tuberculosis*. Se muestran las curvas de amplificación de las diluciones seriales del cDNA (de 1:16 a 1:1024). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda que reconoce al gen *desA2* (marcada con el fluoróforo FAM®) sobre la intensidad de fluorescencia del control pasivo (fluoróforo ROX®) menos la línea basal. La línea verde representa la intersección del ciclo umbral (Ct) utilizado para los análisis cuantitativos.

## **Anexo D**

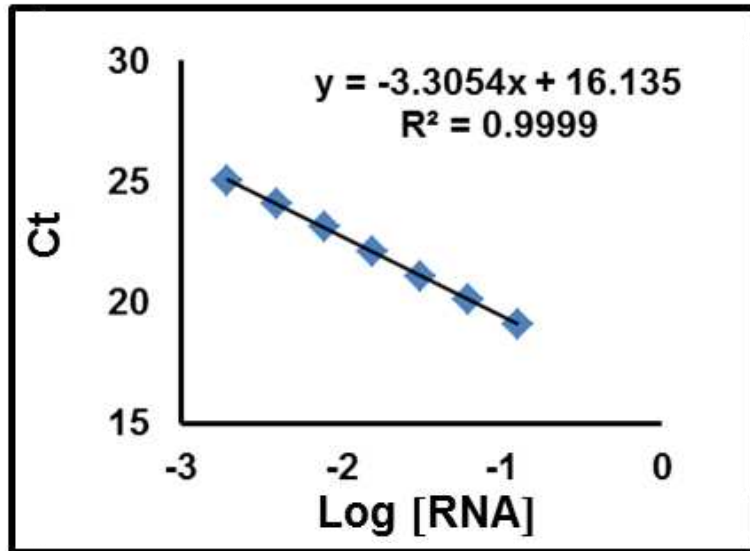
**Evaluación de la eficiencia de amplificación de los genes de *M. tuberculosis* seleccionados para su validación PCR cuantitativa**

## Anexo D

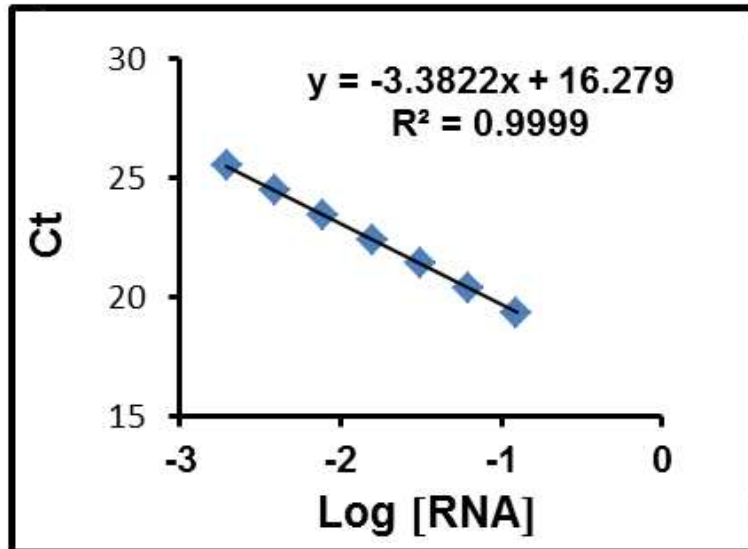
### Evaluación de la eficiencia de amplificación de los genes de *M. tuberculosis* seleccionados para su validación PCR cuantitativa



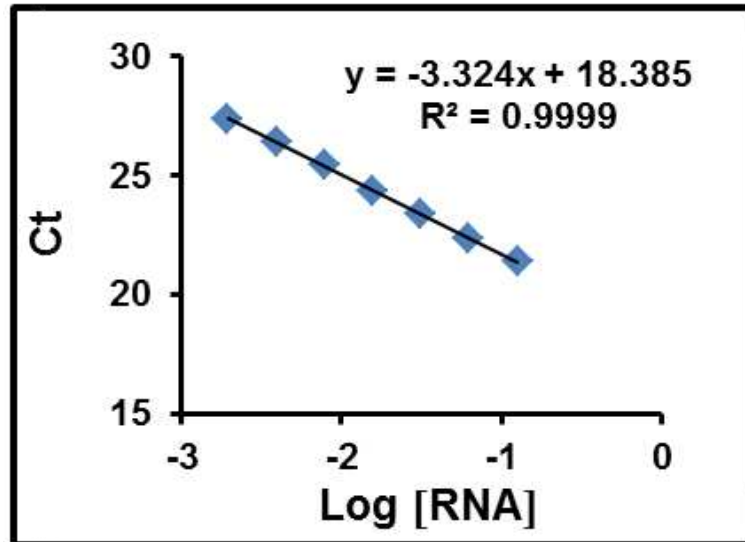
**Figura D-1.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen desA2 de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.



**Figura D-2.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *esxG* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.

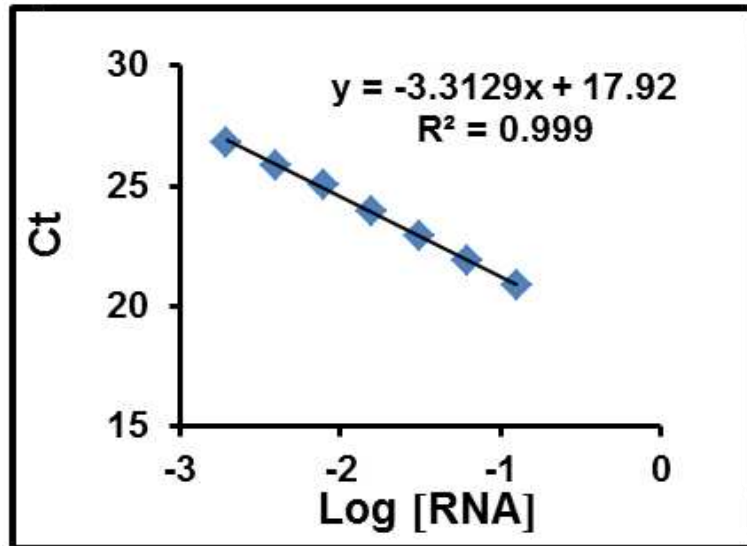


**Figura D-3.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *esxH* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.

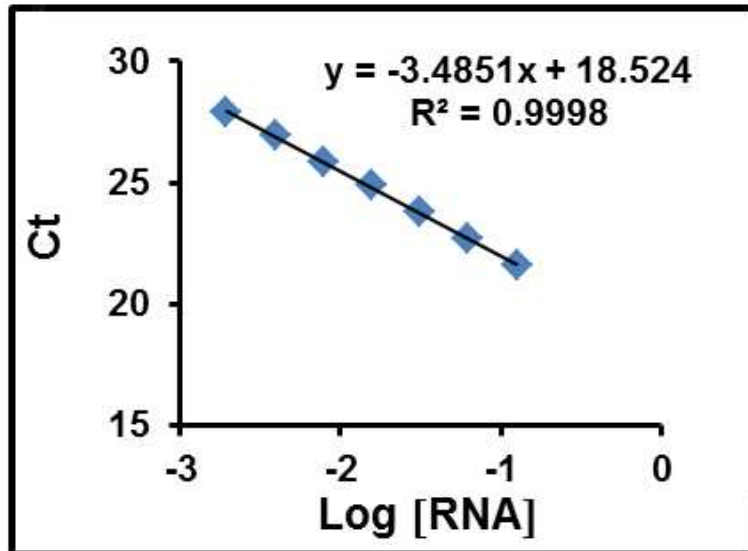


**Figura D-4.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *esxI* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.

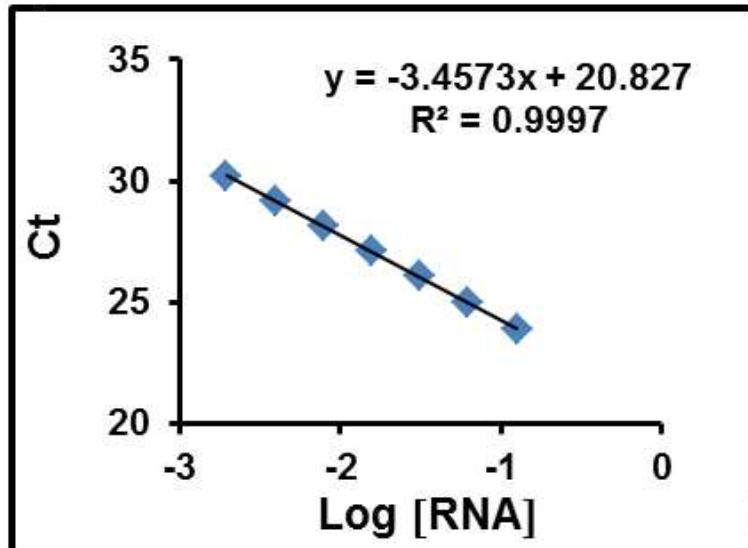




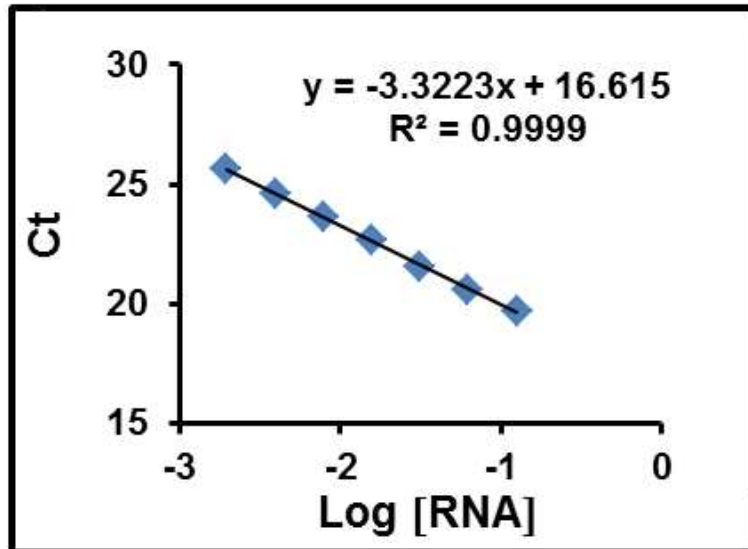
**Figura D-5.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *gltA1* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.



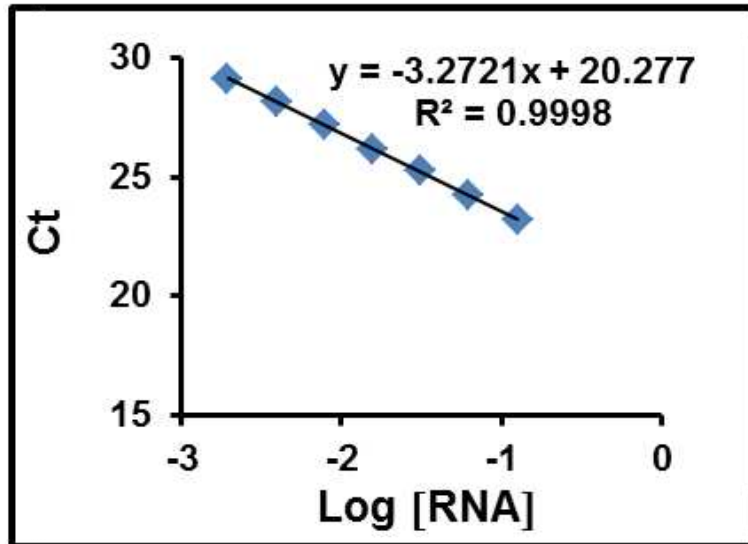
**Figura D-6.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *groES* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.



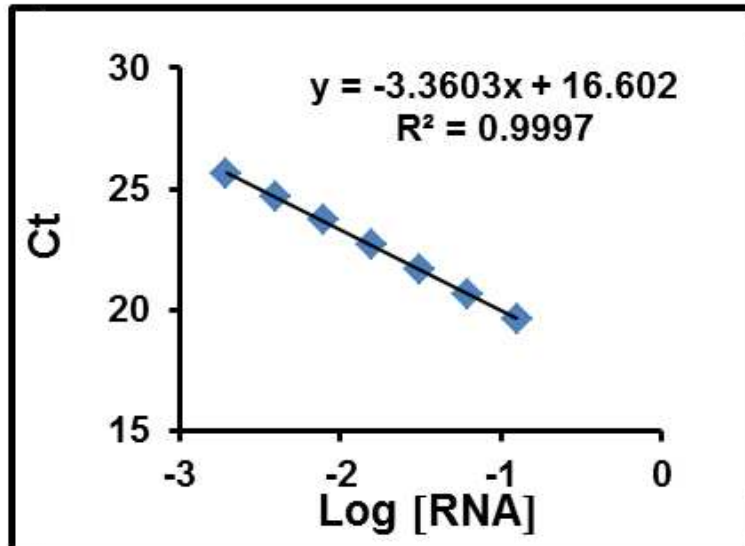
**Figura D-7.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen hspX de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.



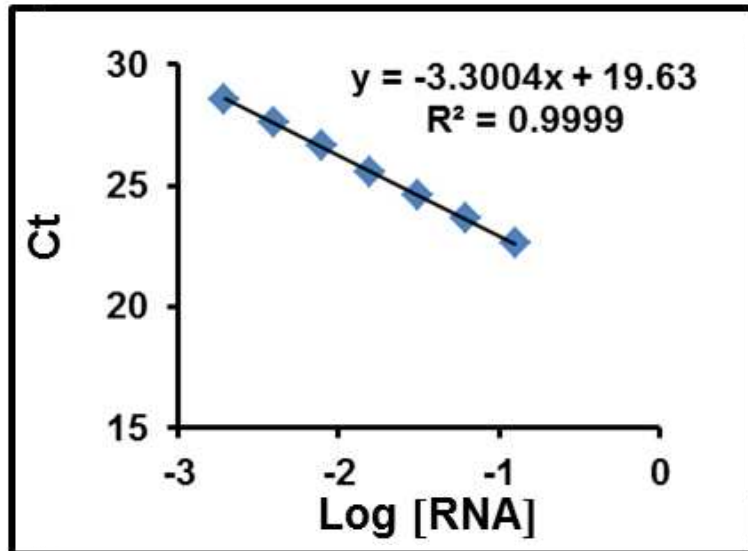
**Figura D-8.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen infA de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.



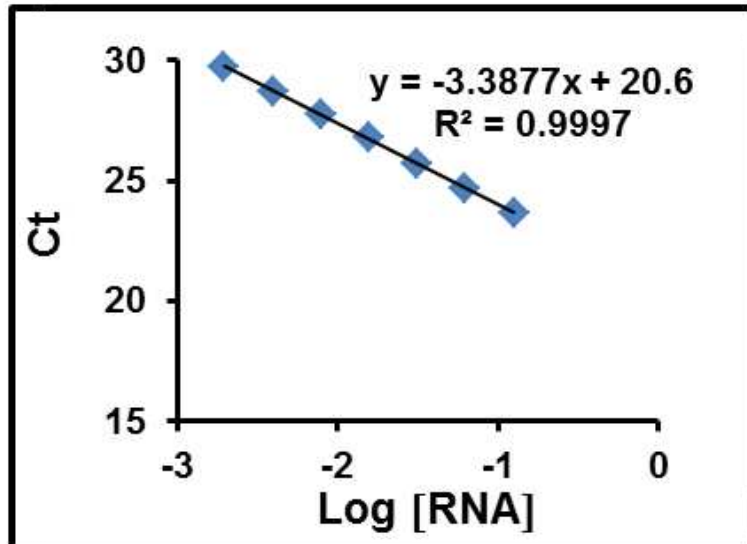
**Figura D-9.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *iniB* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.



**Figura D-10.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *hldD2* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.

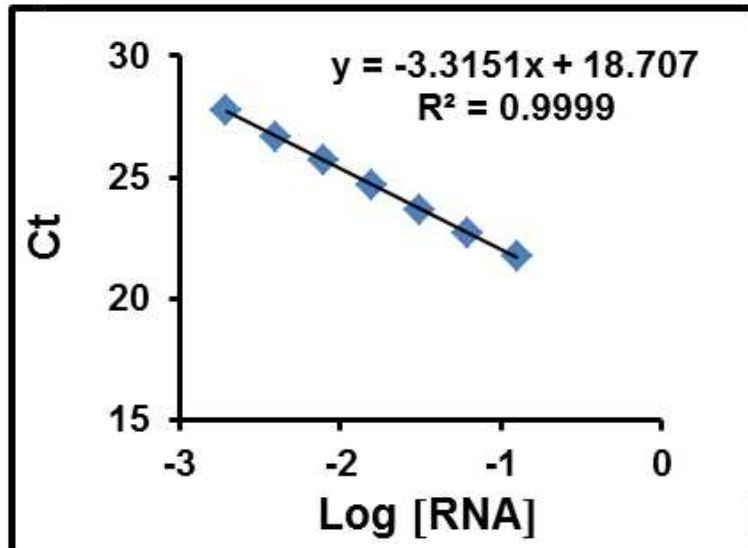


**Figura D-11.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *lprQ* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.

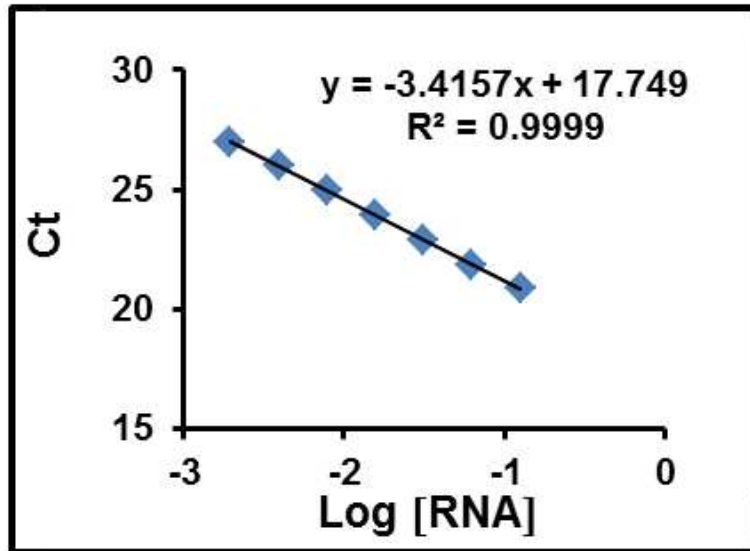


**Figura D-12.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *mmaA4* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.

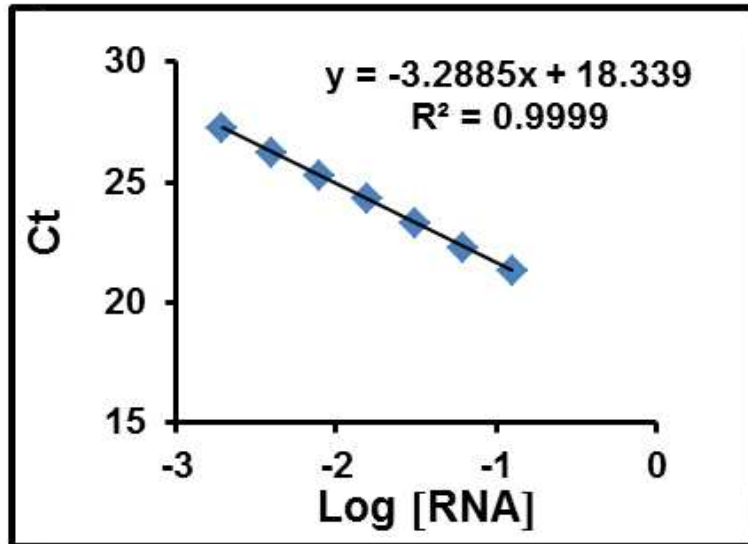




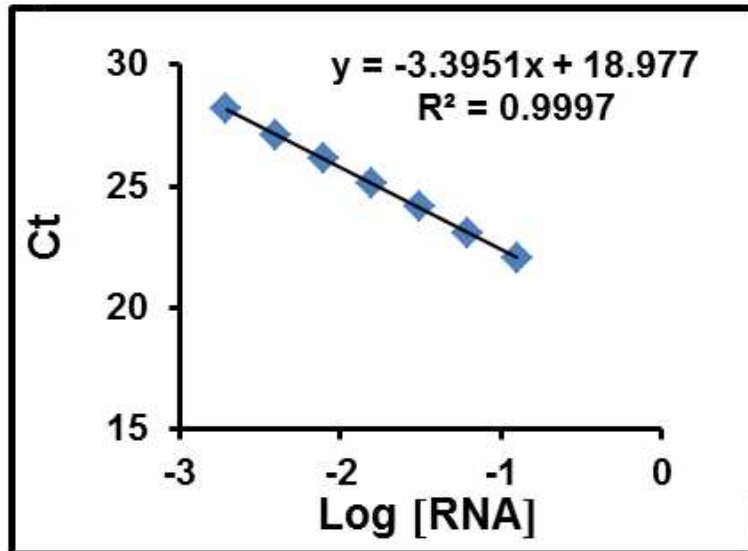
**Figura D-13.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *nrhH* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.



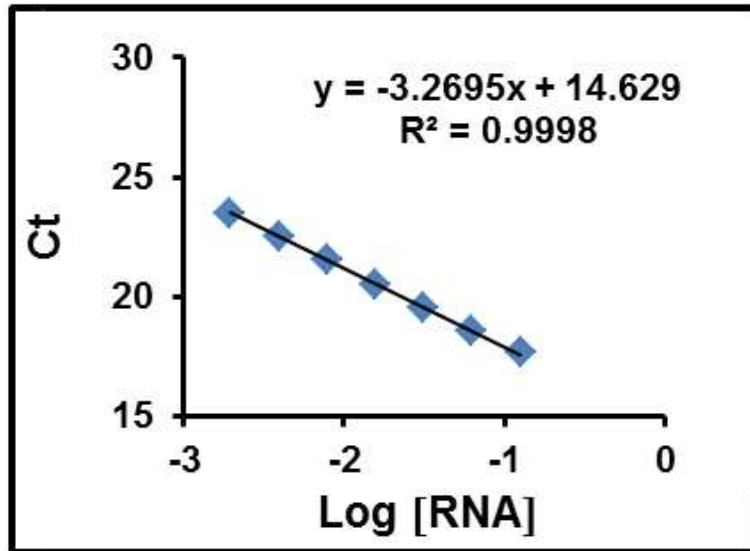
**Figura D-14.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *rpmI* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.



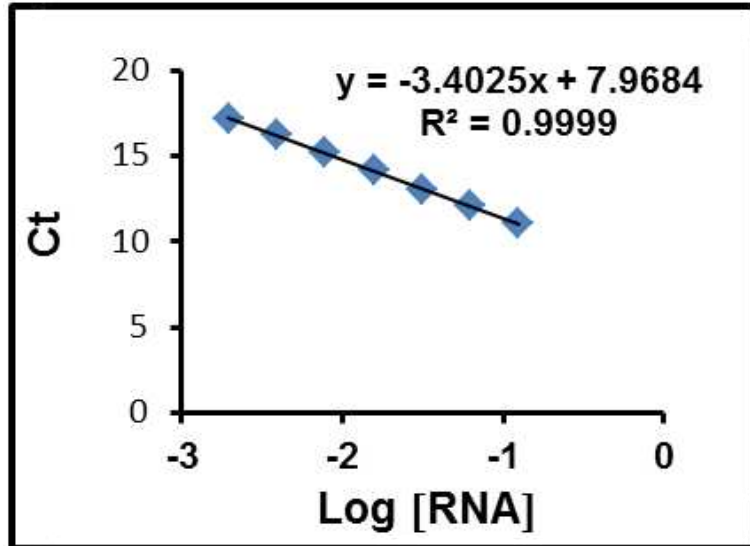
**Figura D-15.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen rpsO de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente (y) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.



**Figura D-16.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *tatA* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.



**Figura D-17.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *whiB1* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.



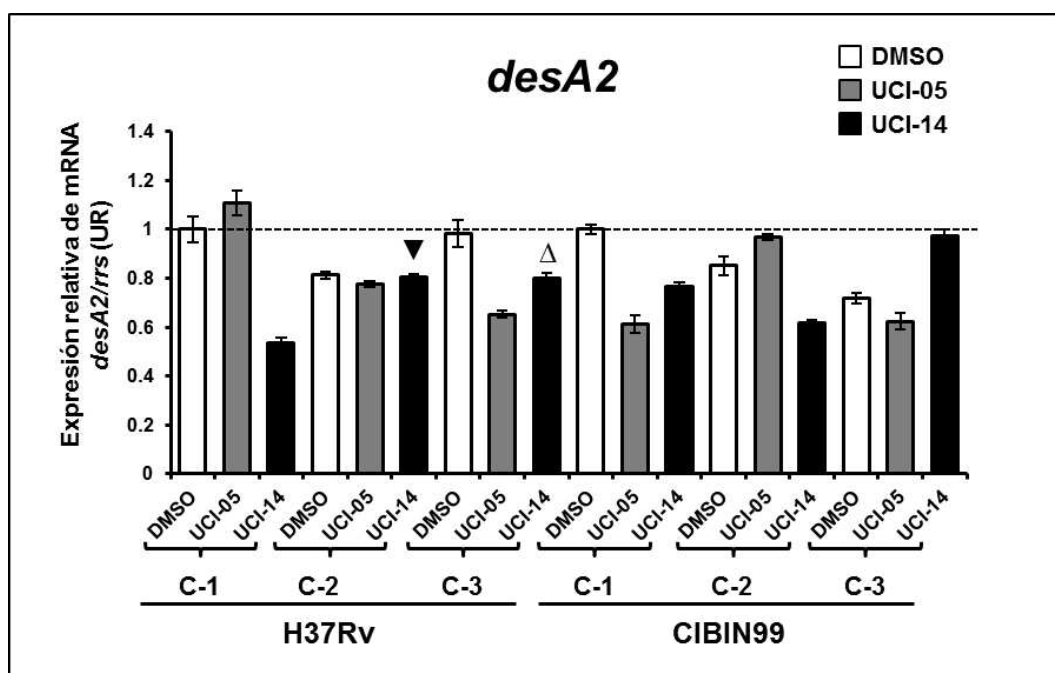
**Figura D-18.** Evaluación de la eficiencia de amplificación del gen *rrs* de *M. tuberculosis*. Se muestra una curva de regresión lineal que conjunta el valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log [RNA]). La pendiente ( $y$ ) y el valor predictivo de confianza ( $R^2$ ) indican una eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el Ct y la concentración de cDNA, respectivamente.

## **Anexo E**

**Análisis de la cuantificación relativa de los genes utilizando el  
método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$**

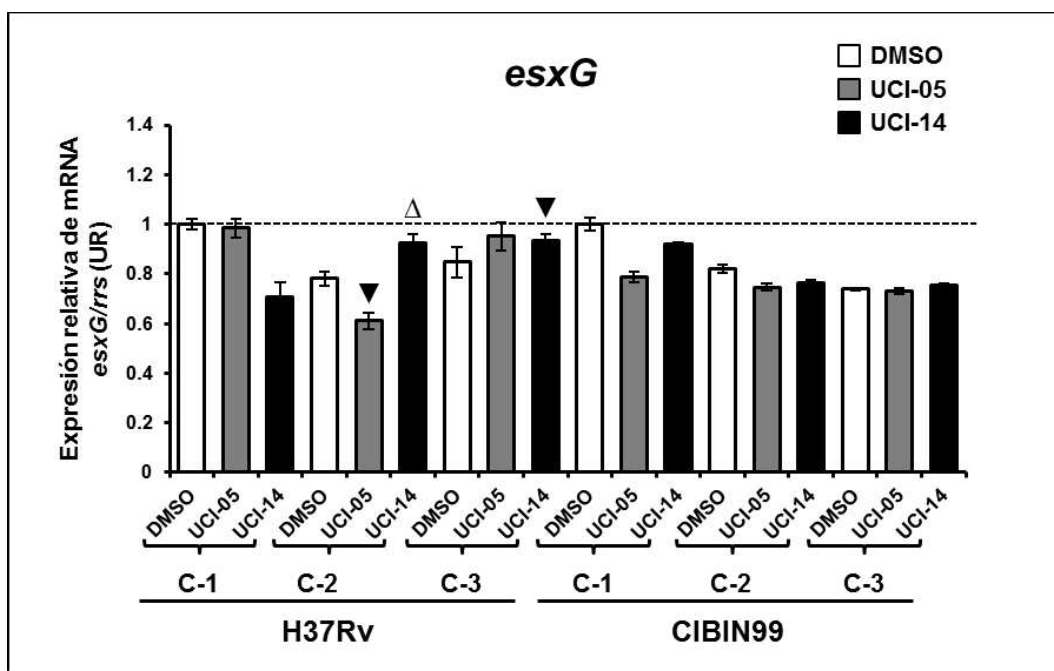
## Anexo E

Análisis de la cuantificación relativa de los genes *desA2*, *esxG*, *esxH*, *esxI*, *gltA1*, *groES*, *hspX*, *infA*, *iniB*, *lldD2*, *lprQ*, *mmaA4*, *nrdH*, *rpmI*, *rpsO*, *tatA* y *whiB1* utilizando el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . El análisis se llevó a cabo en las clonas H37Rv y CIBIN99 tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14.

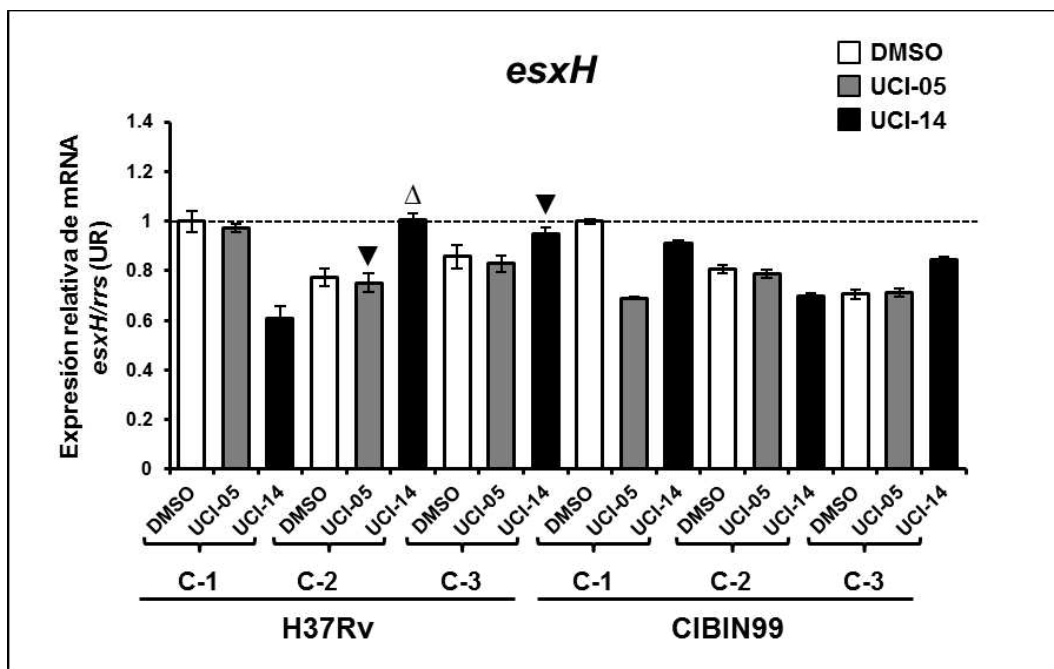


**Figura E-1.** Expresión relativa del gen *desA2* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos, mientras que el símbolo  $\blacktriangledown$  indica una discordancia con aquellos generados por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.

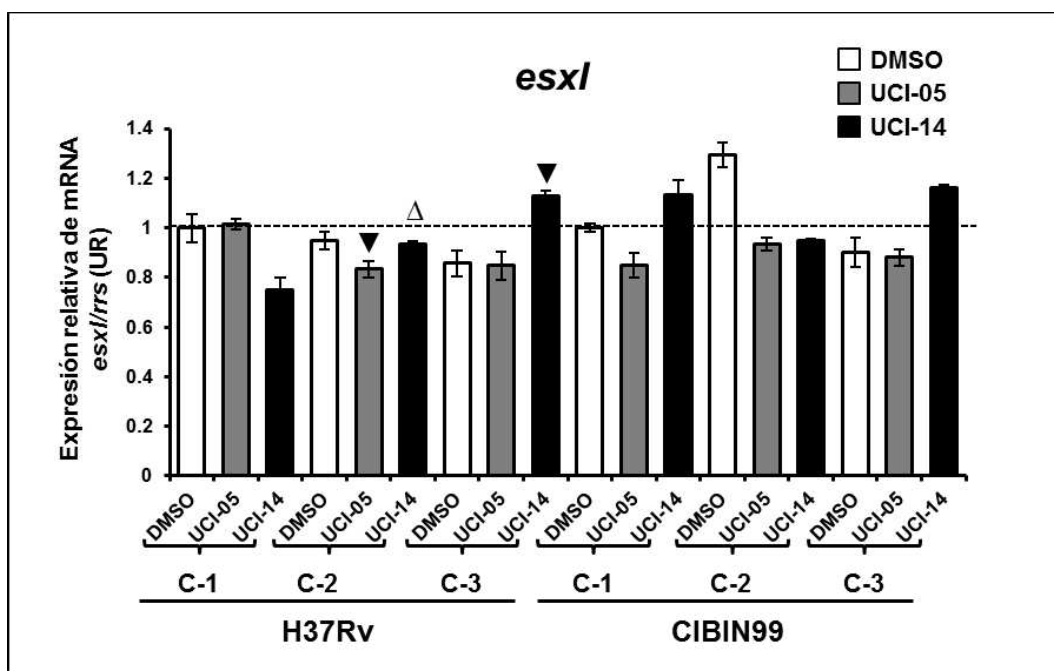




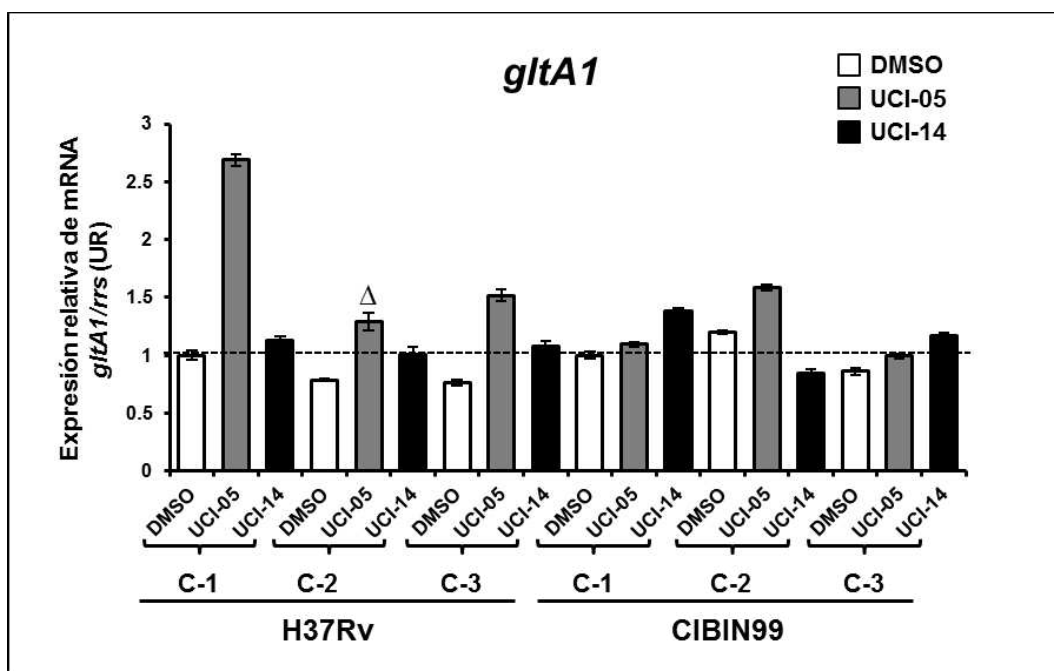
**Figura E-2. Expresión relativa del gen *esxG* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos, mientras que el símbolo  $\blacktriangledown$  indica una discordancia con aquellos generados por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.**



**Figura E-3. Expresión relativa del gen *esxH* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos, mientras que el símbolo  $\blacktriangledown$  indica una discordancia con aquellos generados por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.**



**Figura E-4.** Expresión relativa del gen *esxI* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos, mientras que el símbolo  $\blacktriangledown$  indica una discordancia con aquellos generados por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.



**Figura E-5.** Expresión relativa del gen *gltA1* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.

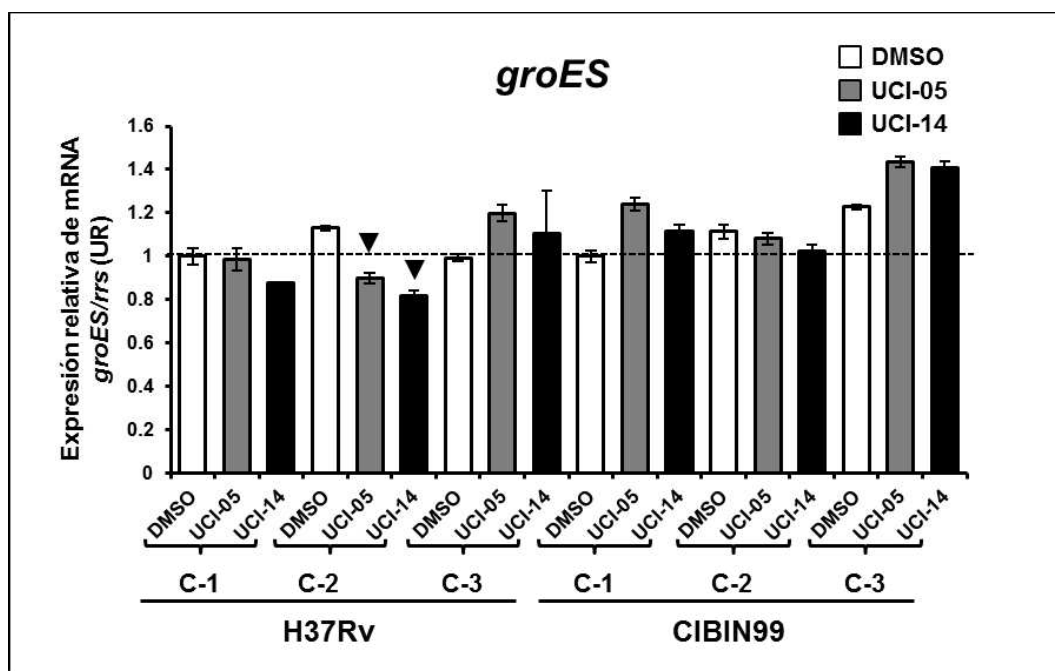
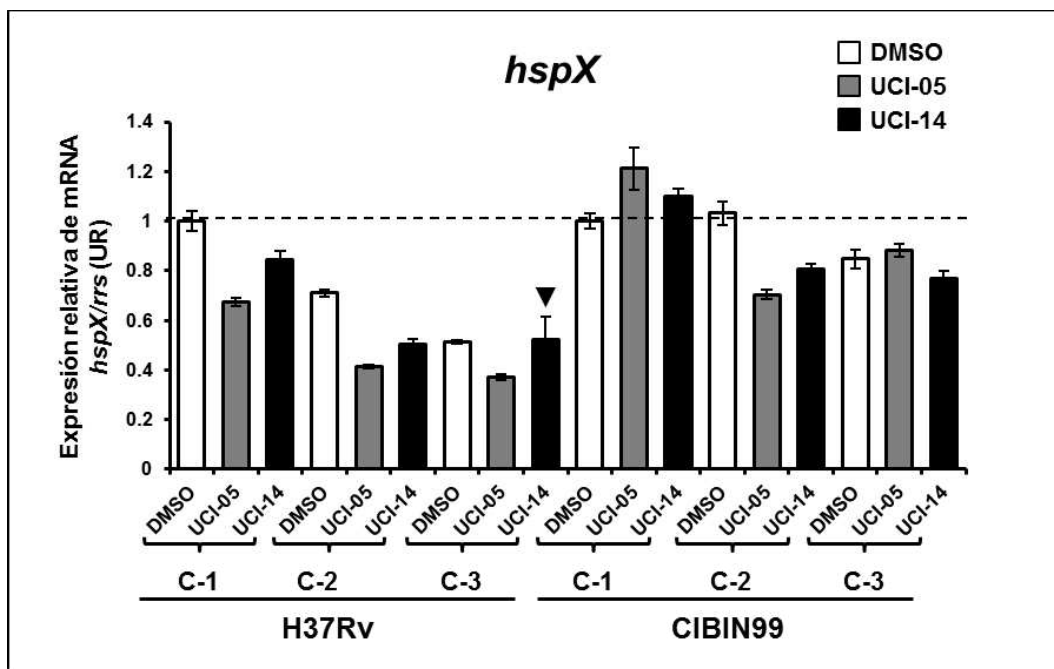


Figura E-6. Expresión relativa del gen *groES* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo ▼ indica una discordancia con los resultados obtenidos por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.



**Figura E-7.** Expresión relativa del gen *hspX* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo ▼ indica una discordancia con los resultados obtenidos por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.

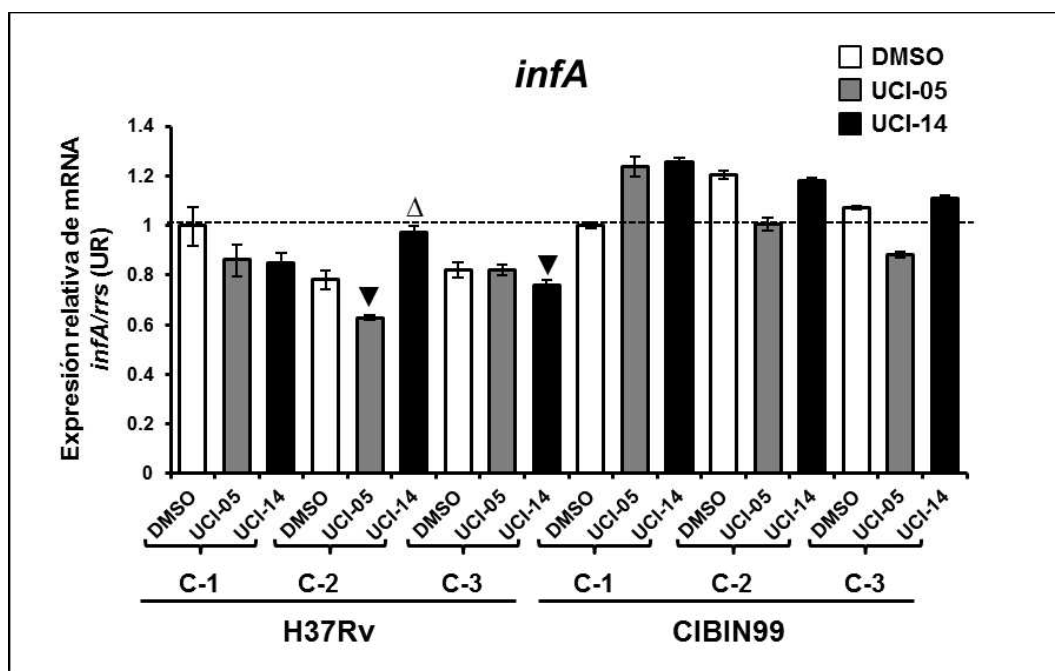
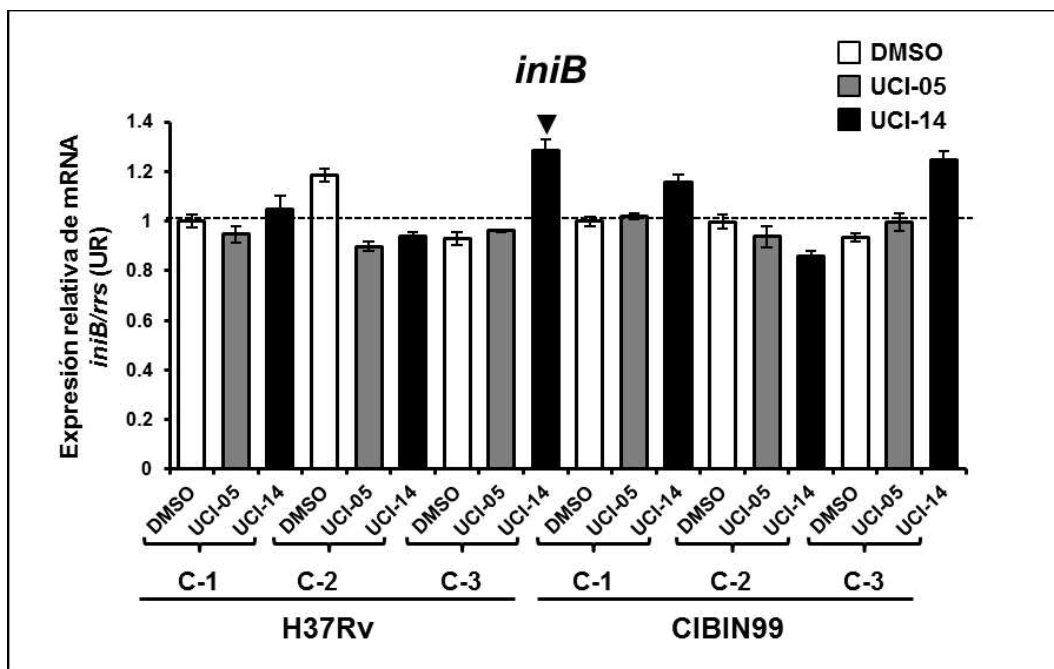
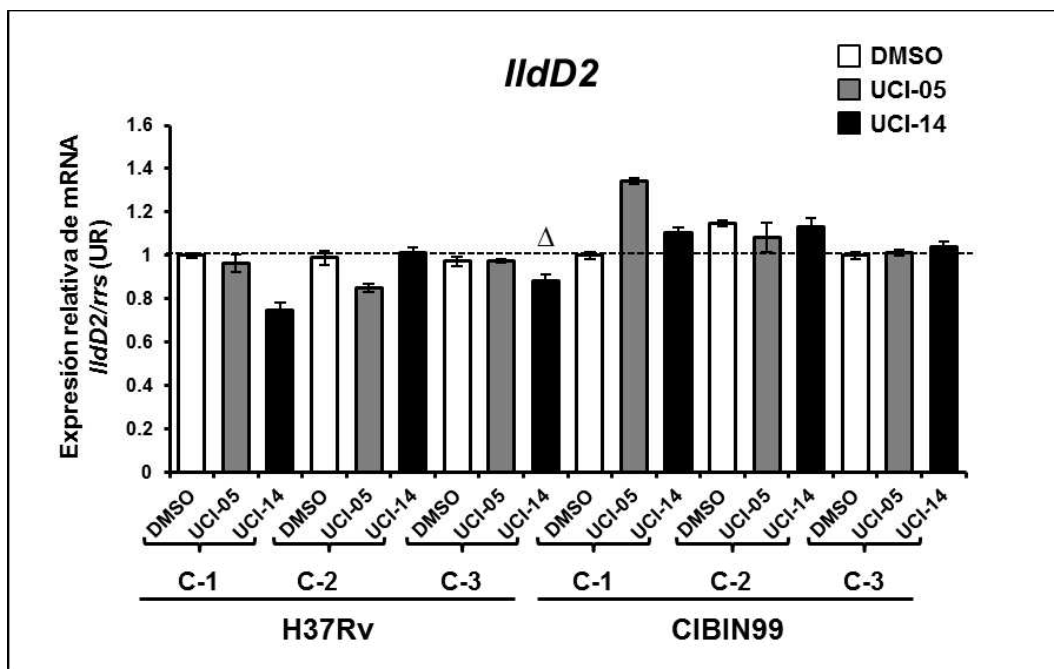


Figura E-8. Expresión relativa del gen *infA* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos, mientras que el símbolo  $\blacktriangledown$  indica una discordancia con aquellos generados por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.

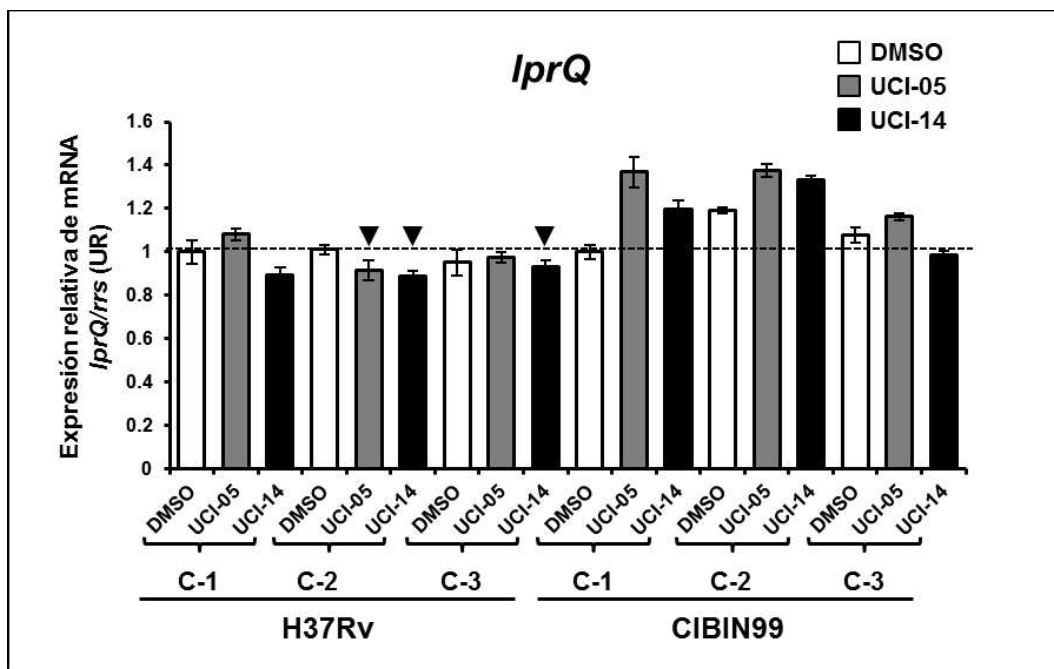


**Figura E-9.** Expresión relativa del gen *iniB* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo ▼ indica una discordancia con los resultados obtenidos por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.

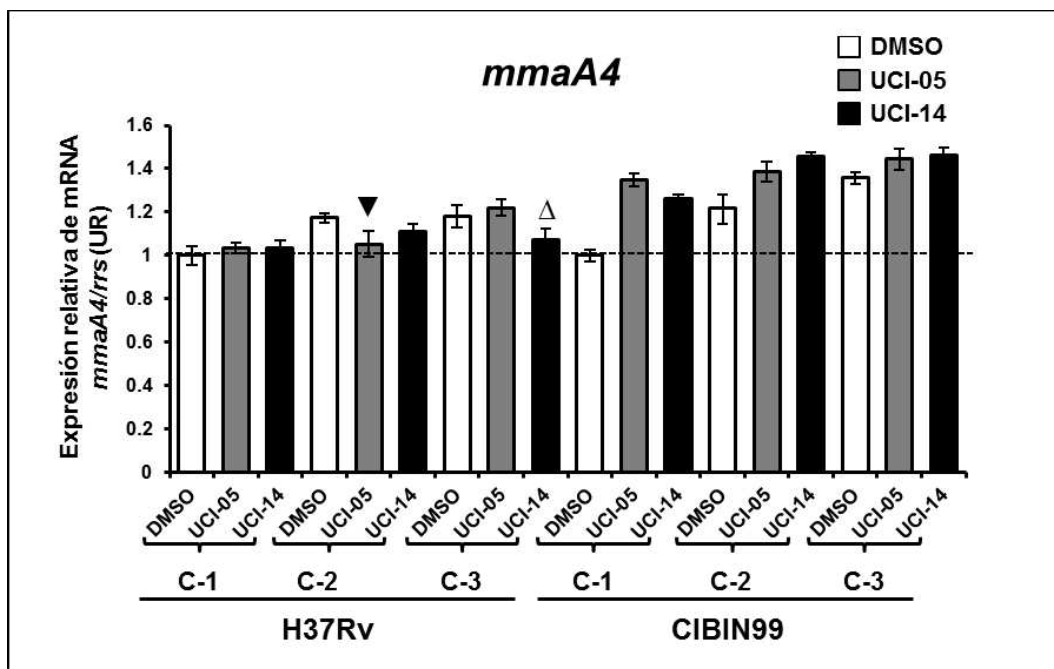




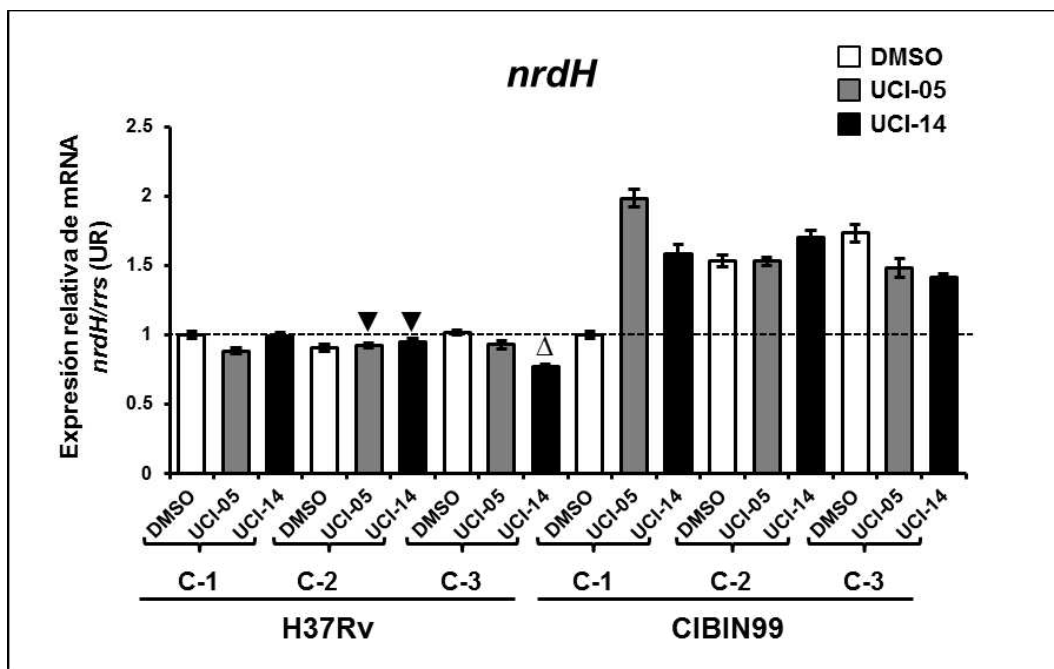
**Figura E-10.** Expresión relativa del gen *lldD2* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.



**Figura E-11.** Expresión relativa del gen *lprQ* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo ▼ indica una discordancia con los resultados obtenidos por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.



**Figura E-12. Expresión relativa del gen *mmaA4* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos, mientras que el símbolo  $\blacktriangledown$  indica una discordancia con aquellos generados por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.**



**Figura E-13.** Expresión relativa del gen *nrdH* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos, mientras que el símbolo  $\blacktriangledown$  indica una discordancia con aquellos generados por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.

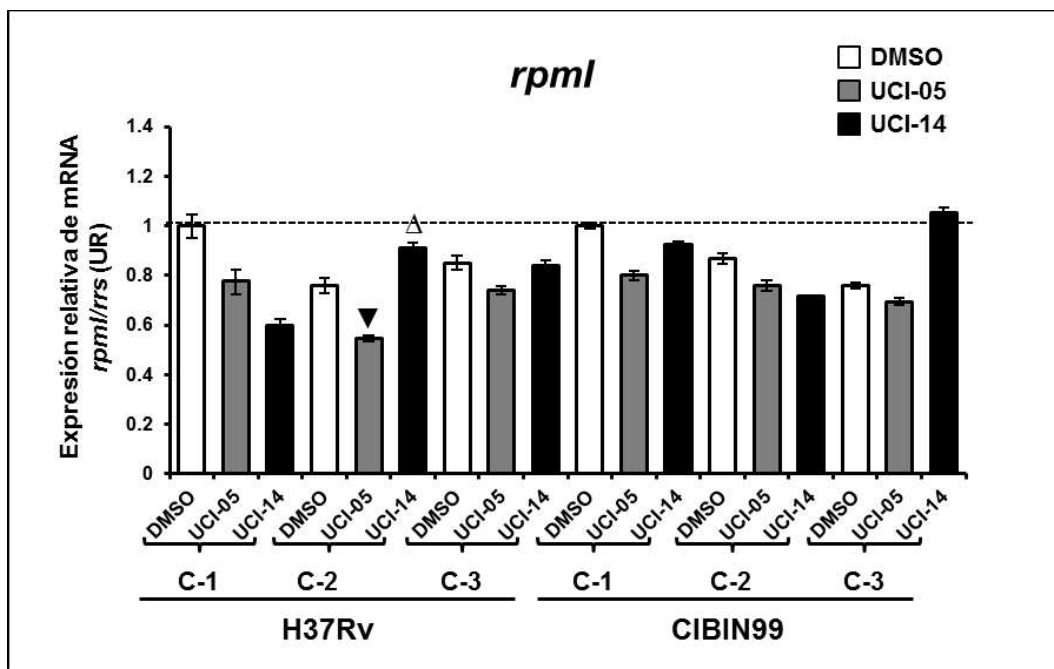
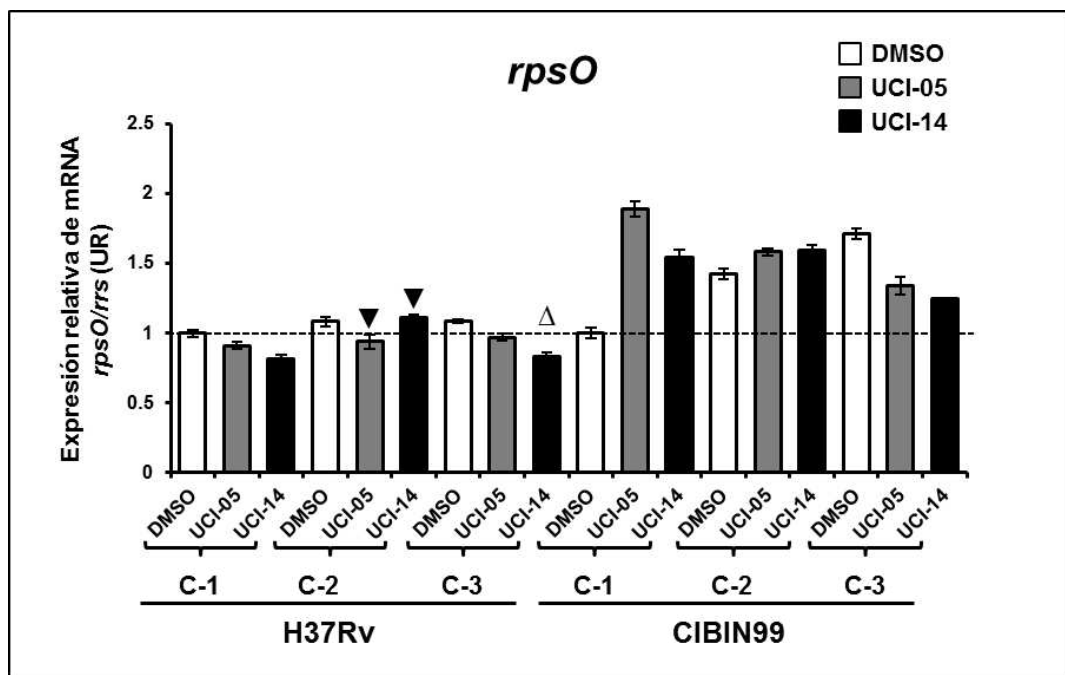
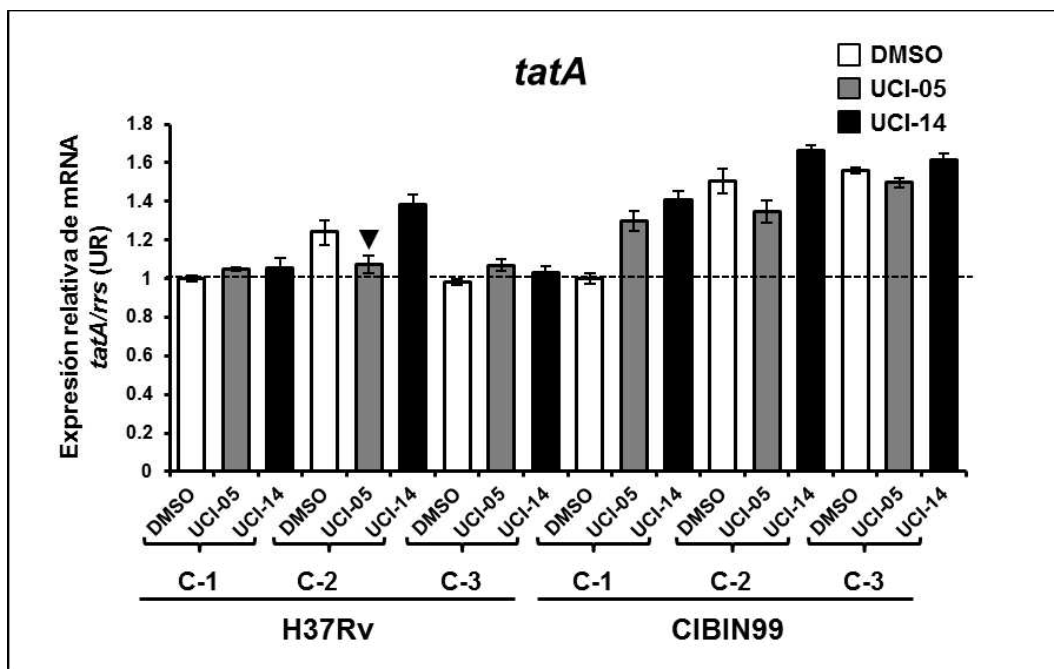


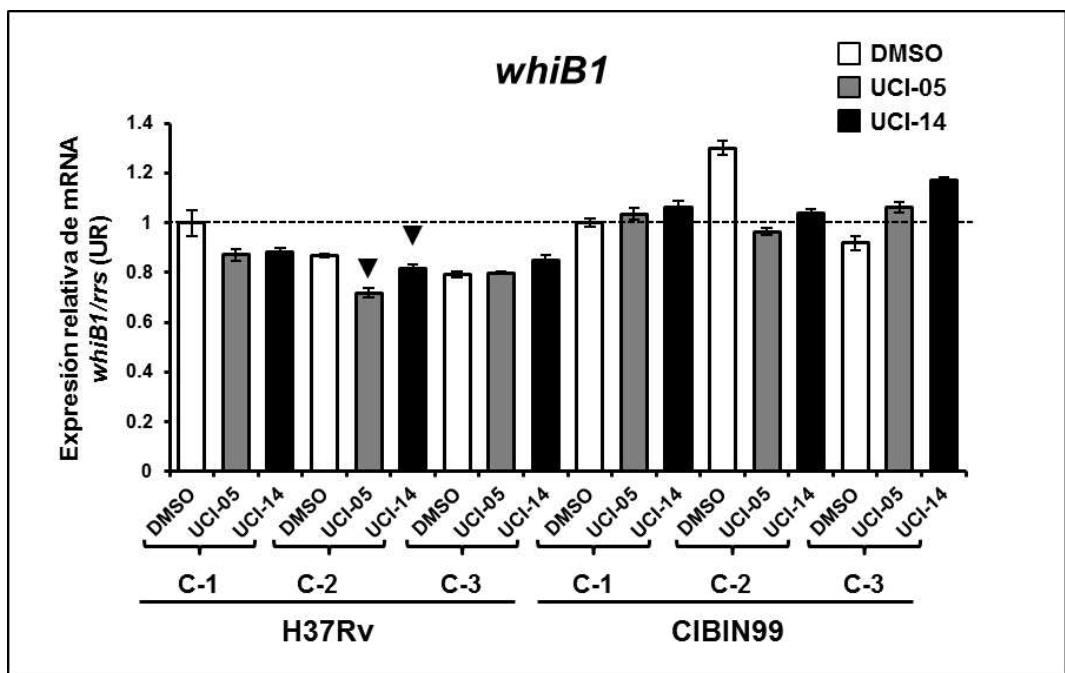
Figura E-14. Expresión relativa del gen *rpmI* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos, mientras que el símbolo  $\blacktriangledown$  indica una discordancia con aquellos generados por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.



**Figura E-15.** Expresión relativa del gen *rpsO* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo  $\Delta$  indica la concordancia con los resultados obtenidos en microarreglos, mientras que el símbolo  $\blacktriangledown$  indica una discordancia con aquellos generados por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO



**Figura E-16.** Expresión relativa del gen *tatA* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo ▼ indica una discordancia con los resultados obtenidos por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.



**Figura E-17.** Expresión relativa del gen *whiB1* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas), como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y están graficados en unidades relativas (UR). El símbolo ▼ indica una discordancia con los resultados obtenidos por microarreglos. El resto de las condiciones no mostró expresión diferencial usando los datos de microarreglos. Las abreviaciones C-1, C-2 y C-3 se refieren a las clonas 1, 2 y 3 de cada cepa de *M. tuberculosis*. La línea punteada representa el umbral de referencia usando las clonas 1 de H37Rv y CIBIN99 tratadas con DMSO.

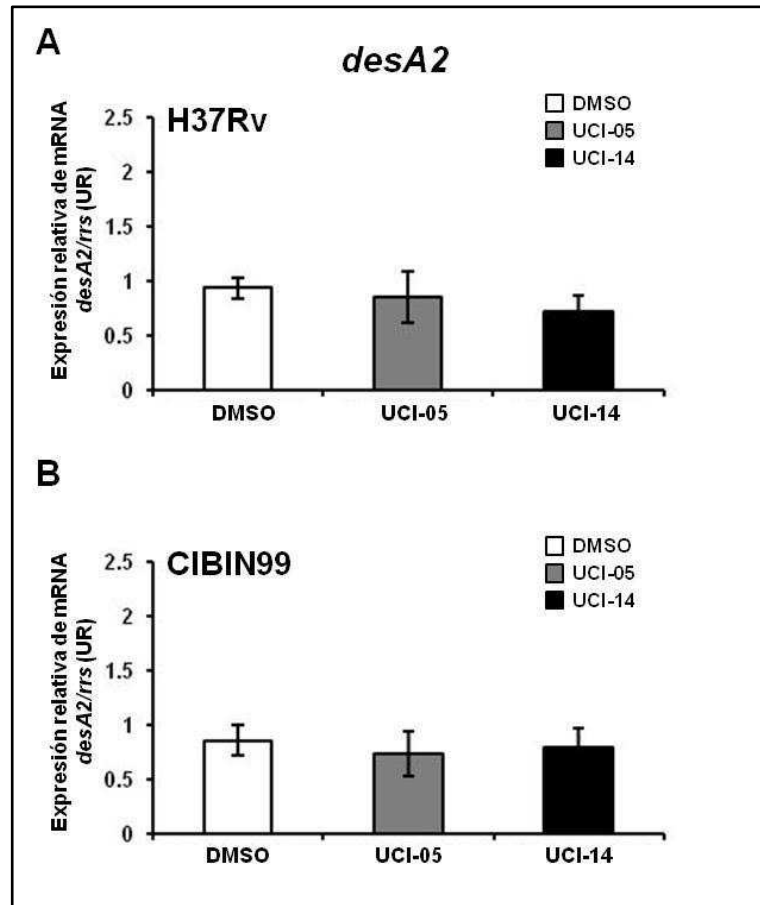


## **Anexo F**

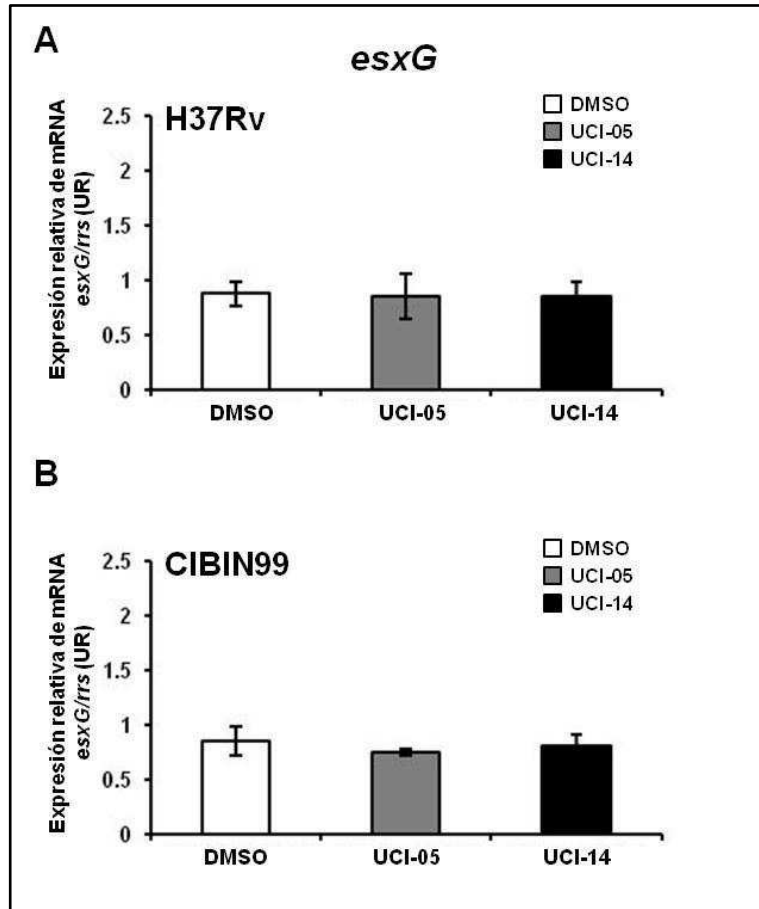
**Análisis por RT-PCR en tiempo real de la expresión génica promedio obtenida de las clonas H37Rv y CIBIN99 tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14**

## Anexo F

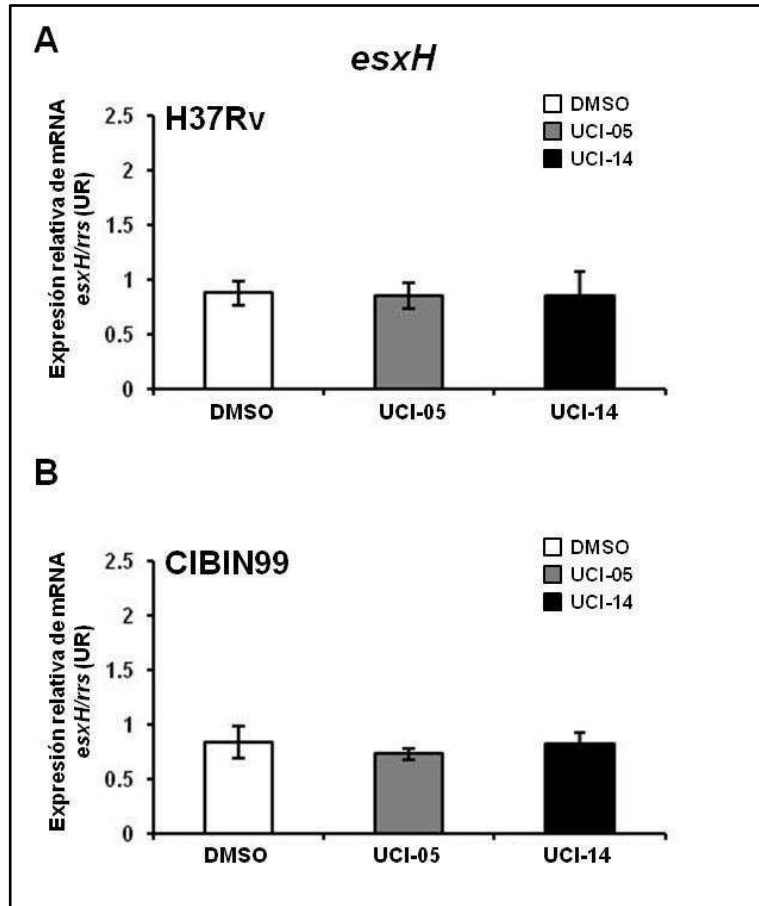
Análisis por RT-PCR en tiempo real de la expresión génica promedio obtenida de las clonas H37Rv y CIBIN99 tratadas con los compuestos UCI-05 y UCI-14



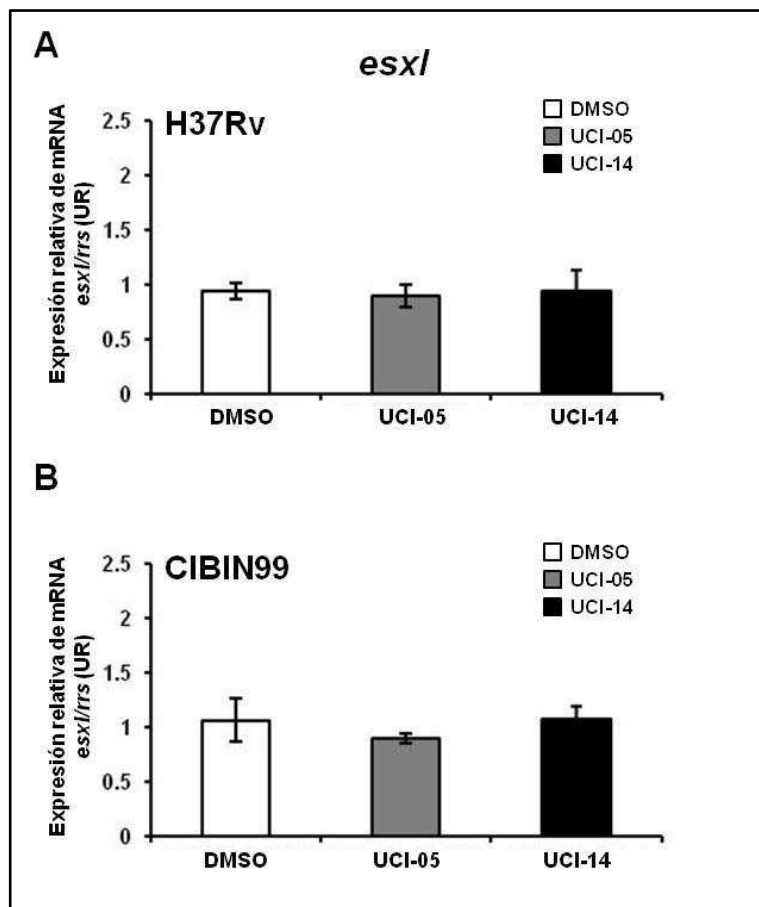
**Figura F-1.** Expresión relativa del gen *desA2* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI. Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



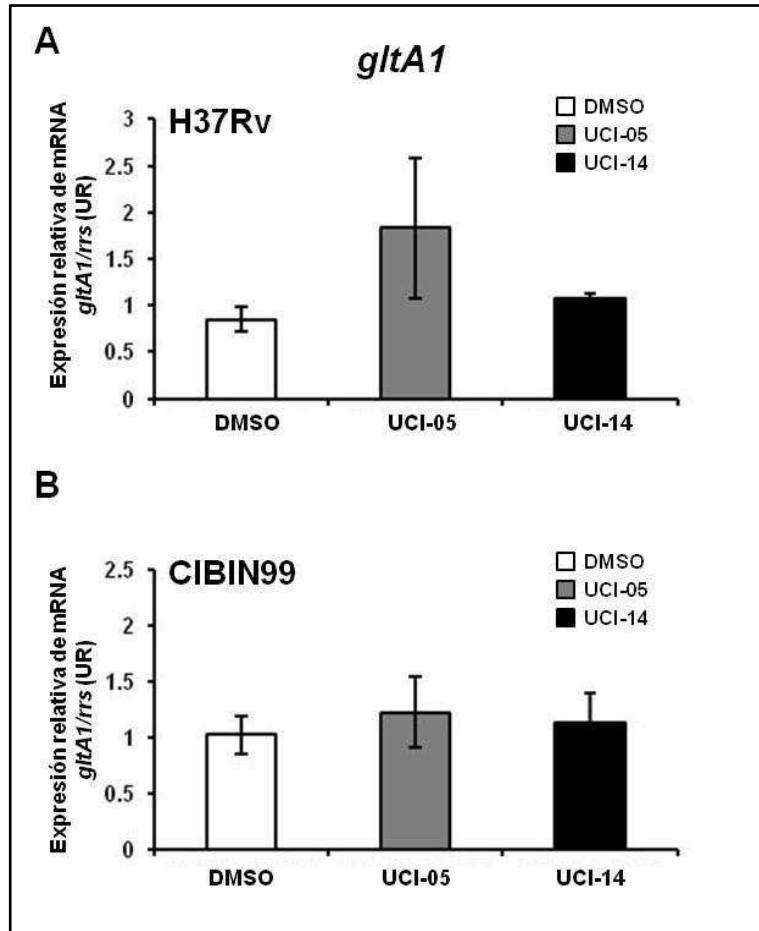
**Figura F-2. Expresión relativa del gen *esxG* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



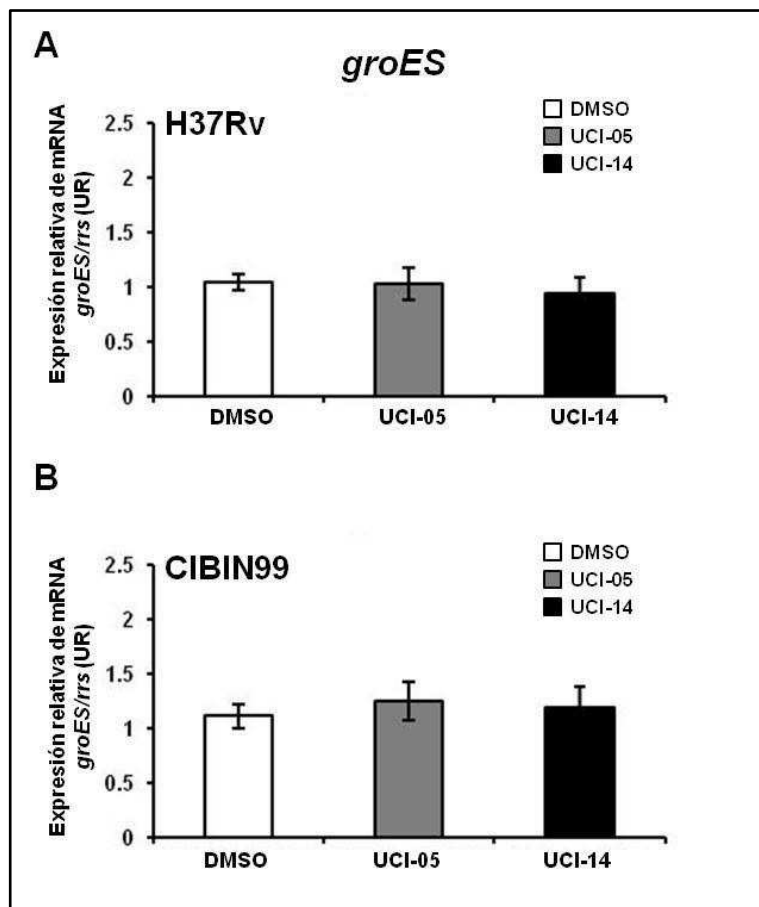
**Figura F-3. Expresión relativa del gen *esxH* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



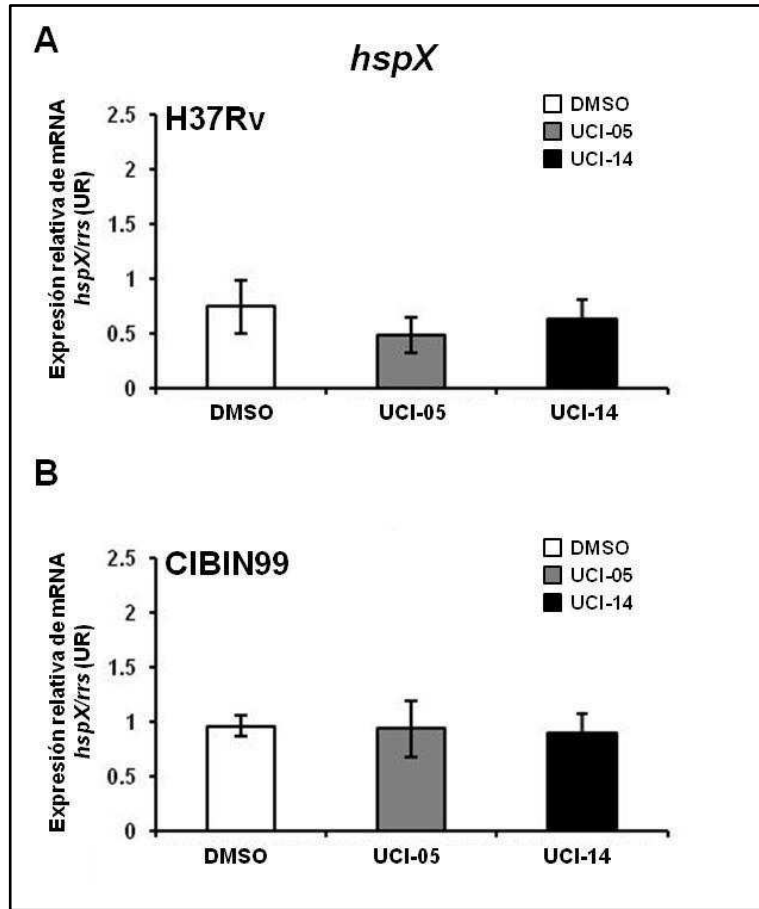
**Figura F-4.** Expresión relativa del gen *esxI* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI. Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



**Figura F-5.** Expresión relativa del gen *gltA1* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI. Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).

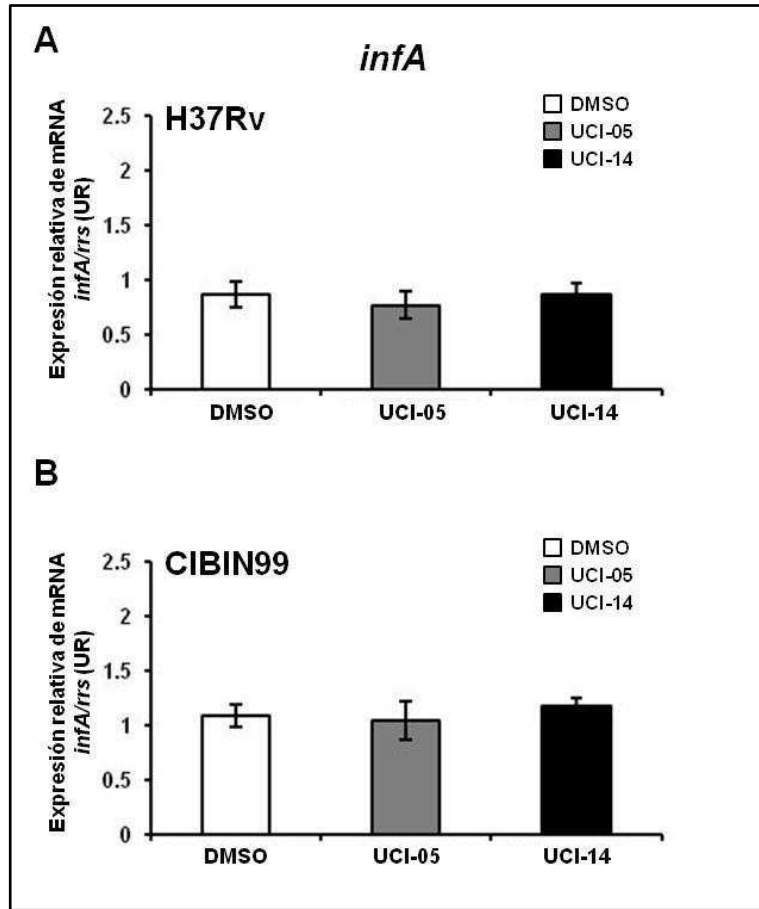


**Figura F-6. Expresión relativa del gen *groES* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).

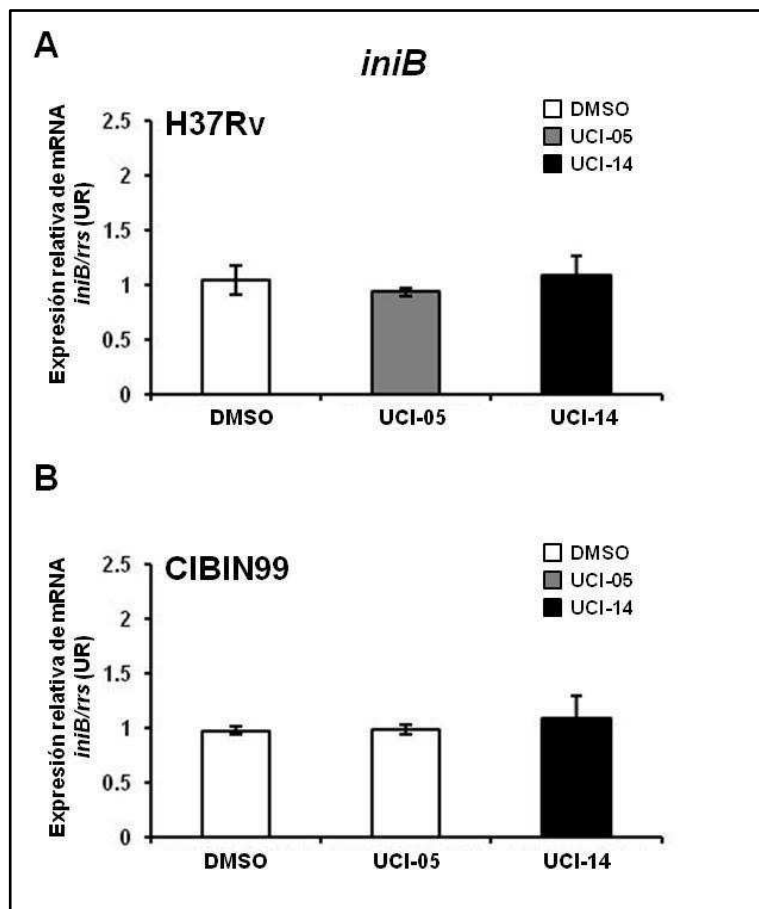


**Figura F-7. Expresión relativa del gen *hspX* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).

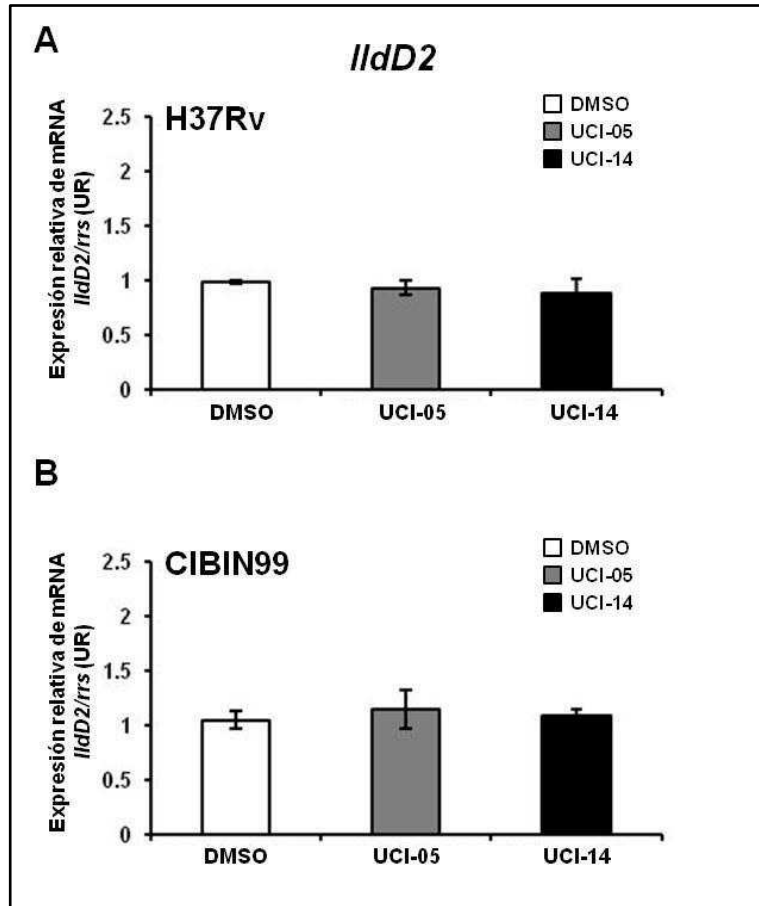




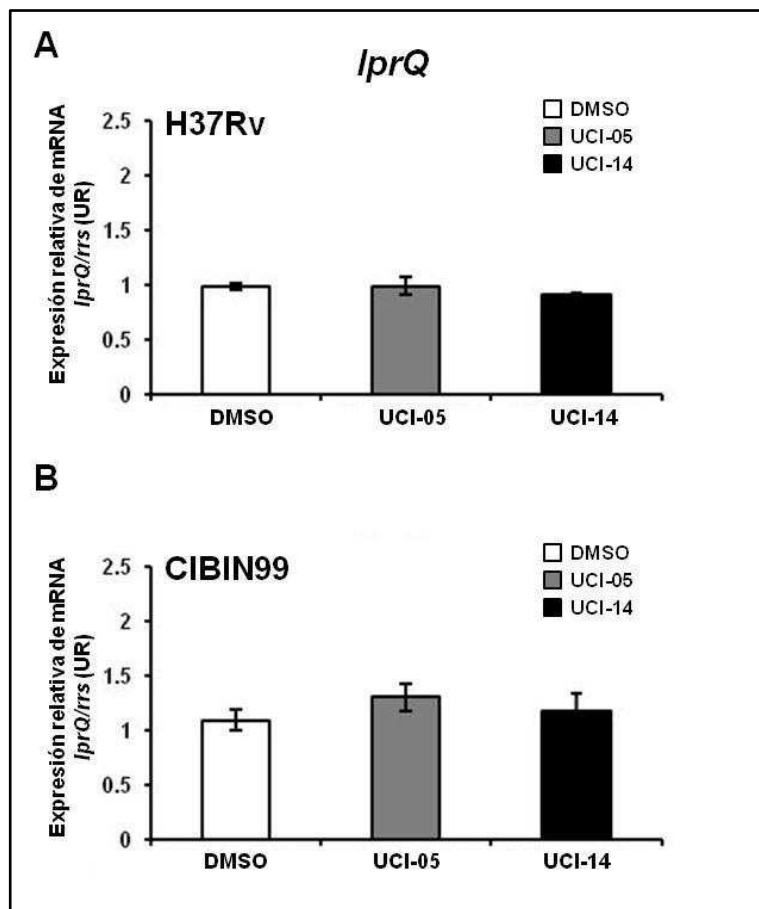
**Figura F-8. Expresión relativa del gen *infA* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



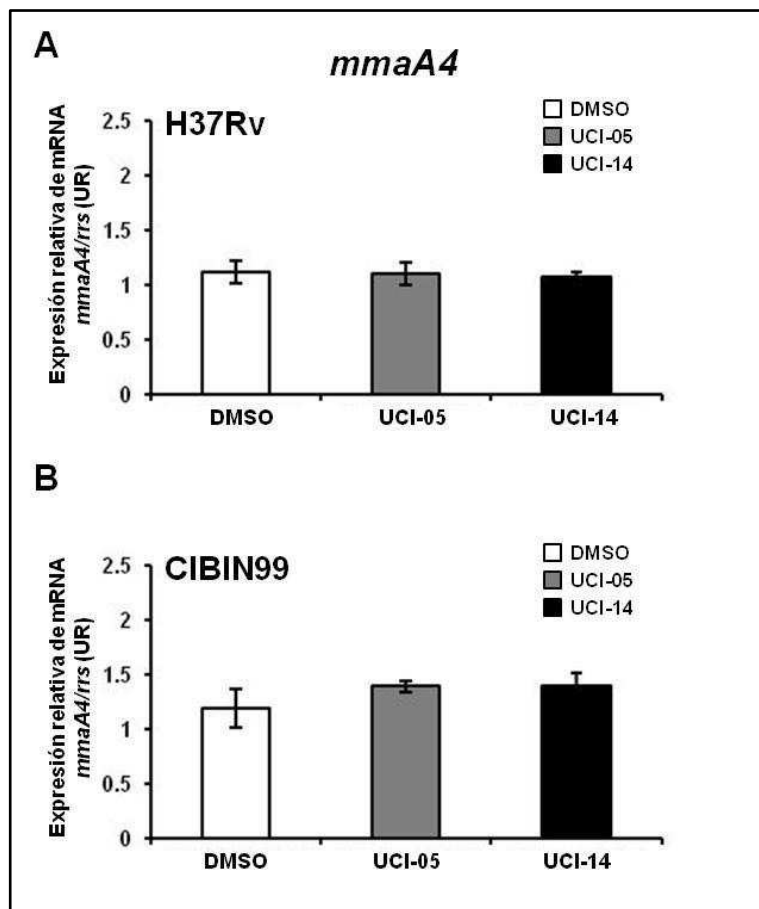
**Figura F-9. Expresión relativa del gen *iniB* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



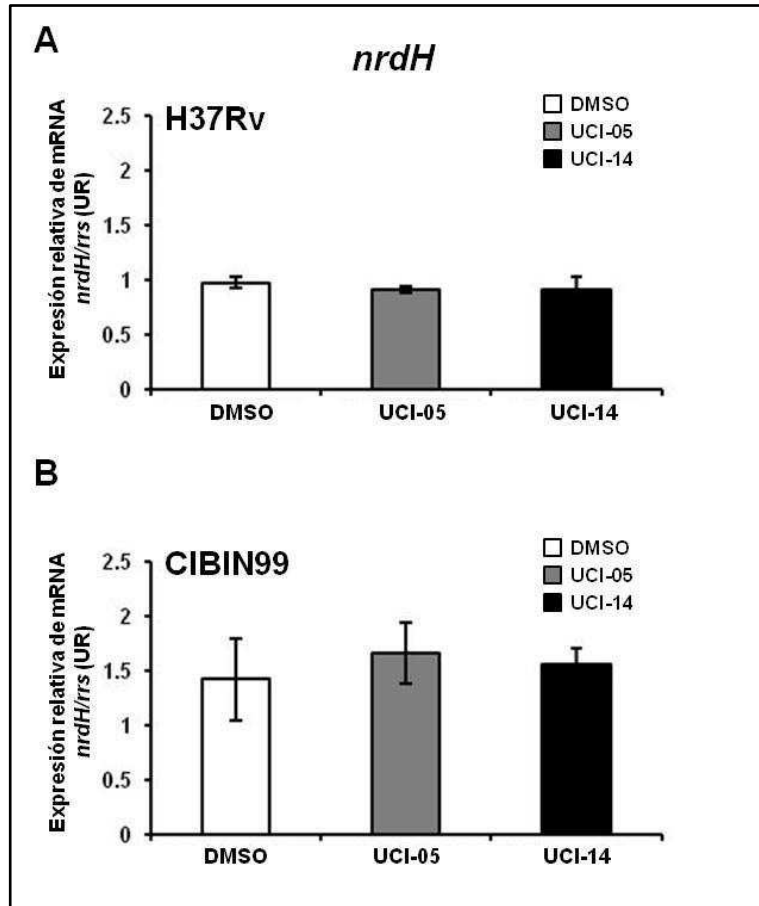
**Figura F-10. Expresión relativa del gen *lldD2* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



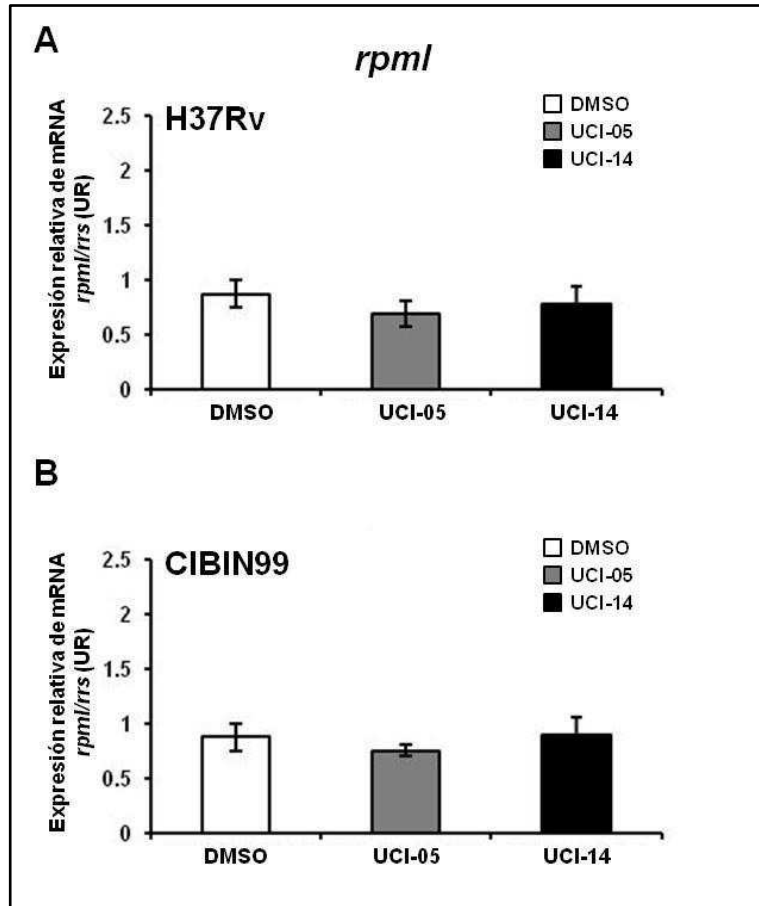
**Figura F-11. Expresión relativa del gen *lprQ* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



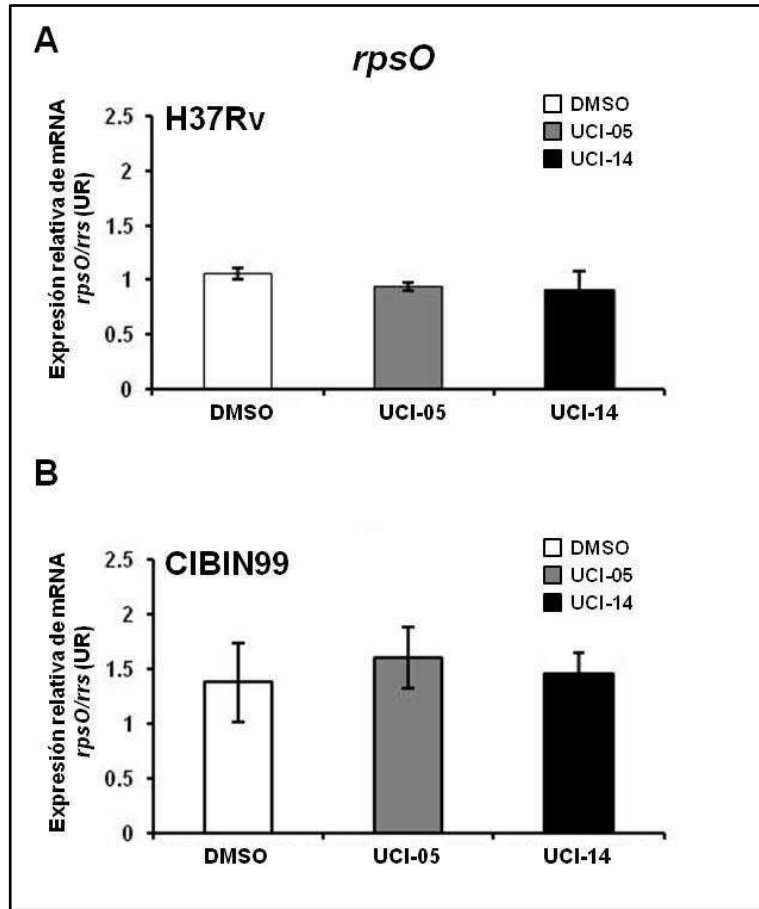
**Figura F-12. Expresión relativa del gen *mmaA4* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



**Figura F-13. Expresión relativa del gen *nrdH* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).

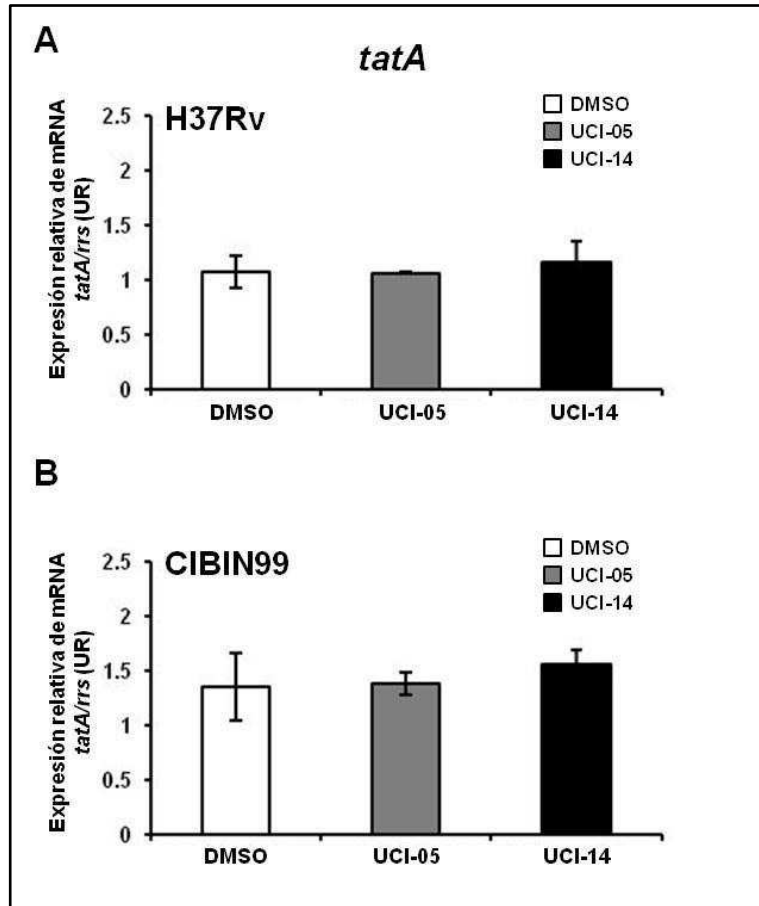


**Figura F-14. Expresión relativa del gen *rpmI* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).

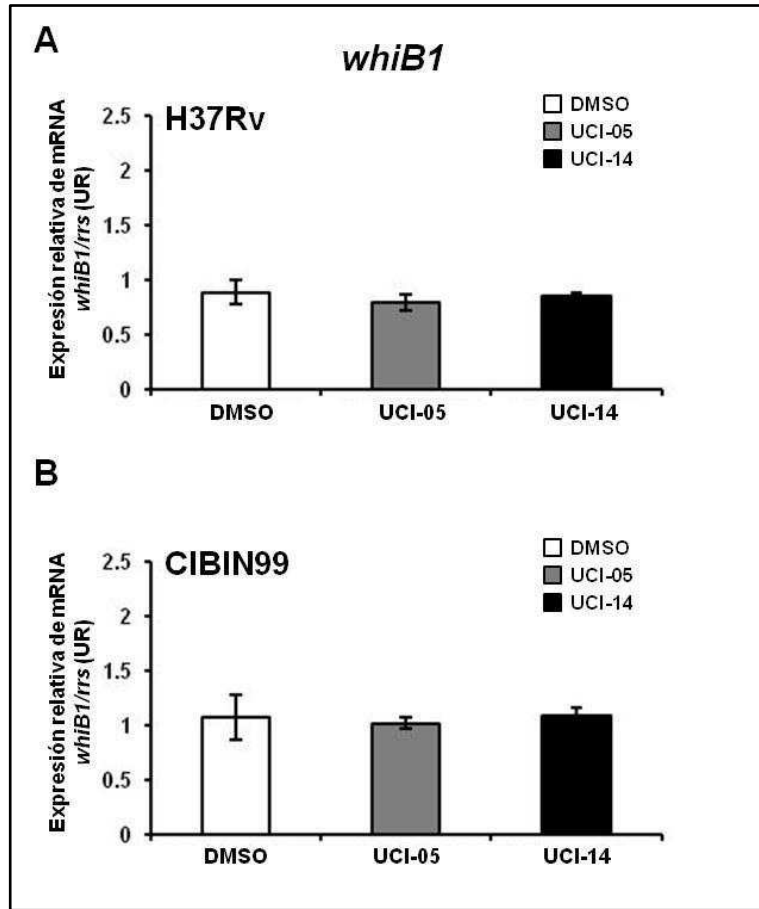


**Figura F-15. Expresión relativa del gen *rpsO* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).





**Figura F-16. Expresión relativa del gen *tatA* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).



**Figura F-17. Expresión relativa del gen *whiB1* en las clonas H37Rv y CIBIN99 de *M. tuberculosis* expuestas a compuestos UCI.** Se muestra el promedio de expresión relativa de las tres clonas H37Rv (Panel A) y de las tres clonas CIBIN99 (Panel B) tratadas con los compuestos UCI-05 (barras grises), UCI-14 (barras negras) y con dimetilsulfóxido (DMSO, barras blancas) como control. Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Livak y Schmittgen (2001) y graficados en unidades relativas (UR).

## LITERATURA CITADA

Acosta Bermudez R, Acosta Blanco P, Anzaldo Flores G, Balandrano Campos S, Barron Rivero C, Casteneda Nava D, Contreras Ramos P, Flisser A, Jaime Anzaldo G, Kuri Morales P, Marquez Fiol A, Olivares Delgado L, Ruiz Matus C, Santaella Solis A, Santos Preciado J, Soriano Miranda F, Tapia Conyer R, Zarate Aguilar A, Fernandez Garate I, Rivera J, Navarrete Espinoza J, Cornejo J, Islas Torres J, Ontiveros D, Robledo Vasquez J, Rodriguez Lomeli M, Romo Rodriguez E, Zimbron A, Volcker M, Beltran Zazueta A, Ferreiro Gastelum P, Llausas Magana E, Pantoja Olvera S, Quinones Mejia E, Aguirre Gordillo F, Castellanos Morales M, Diaz Garcia P, Vasquez Hernandez A. 1998. Population-based survey for drug resistance of tuberculosis--Mexico, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 47:371-375.

Andreu N, Gibert I. 2008. Cell population heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuberculosis (Edinb).* 88:553-559.

Aono A, Hirano K, Hamasaki S, Abe C. 2002. Evaluation of BACTEC MGIT 960 PZA medium for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide (PZA): compared with the results of pyrazinamidase assay and Kyokuto PZA test. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 44:347-352.

BACTEC MGIT 960 SIRE Kit. Sparks, Maryland USA: Beckton Dickinson and Company.

BACTEC MGIT PZA Kit. For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Sparks, Maryland USA: Becton Dickinson and Company.

Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science.* 284:1520-1523.

- Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusova K, Belisle JT, Brennan PJ, Inamine JM. 1996. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:11919-11924.
- Betts JC, McLaren A, Lennon MG, Kelly FM, Lukey PT, Blakemore SJ, Duncan K. 2003. Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thiolactomycin-, and triclosan-treated *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:2903-2913.
- Butcher PD. 2004. Microarrays for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 84:131-137.
- Castorena-Torres F, Bermudez de Leon M, Cisneros B, Zapata-Perez O, Salinas JE, Albores A. 2008. Changes in gene expression induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in the human cell lines HepG2 and A549. *Toxicol In Vitro*. 22:411-421.
- CDC, ATS. 1993. Initial Therapy for Tuberculosis in the Era of Multidrug Resistance -- Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 42:001.
- Coll P. 2003. [Drugs with activity against *Mycobacterium tuberculosis*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 21:299-307; quiz 308, 326.
- Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, Cousins D, Crawford JT, Driscoll J, Heersma H, Lillebaek T, Quitugua T, Rastogi N, Skuce RA, Sola C, Van Soolingen D, Vincent V. 2001. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis*. 5:216-219.

- Dave S, Faujdar J, Kumar P, Gupta P, Das R, Parasher D, Chauhan DS, Natrajan M, Gupta UD, Katoch VM. 2009. Comparative growth pattern of multi drug resistance versus susceptible isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in mice lungs. *Indian J Med Res.* 130:58-62.
- Davies AP, Billington OJ, Bannister BA, Weir WR, McHugh TD, Gillespie SH. 2000. Comparison of fitness of two isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, one of which had developed multi-drug resistance during the course of treatment. *J Infect.* 41:184-187.
- Del Olmo E, Molina-Salinas GM, Escarcena R, Alves M, Lopez-Perez JL, Hernandez-Pando R, Said-Fernandez S, Feliciano AS. 2009. Simple dihydrospingosine analogues with potent activity against MDR-*Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem Lett.* 19:5764-5768.
- Demay C, Liens B, Burguiere T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I, Sola C, Zozio T, Rastogi N. 2012. SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol.* 12:755-766.
- Fu LM. 2006. Exploring drug action on *Mycobacterium tuberculosis* using affymetrix oligonucleotide genechips. *Tuberculosis (Edinb).* 86:134-143.
- Fu LM, Fu-Liu CS. 2007. The gene expression data of *Mycobacterium tuberculosis* based on Affymetrix gene chips provide insight into regulatory and hypothetical genes. *BMC Microbiol.* 7:37.
- Fu LM, Shinnick TM. 2007a. Genome-wide exploration of the drug action of capreomycin on *Mycobacterium tuberculosis* using Affymetrix oligonucleotide GeneChips. *J Infect.* 54:277-284.
- Fu LM, Shinnick TM. 2007b. Understanding the action of INH on a highly INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain using Genechips. *Tuberculosis (Edinb).* 87:63-70.

- Gagneux S. 2009. Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect.* 15 Suppl 1:66-68.
- Garcia-Garcia ML, Sifuentes-Osornio J, Jimenez-Corona ME, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona A, Bobadilla-del Valle M, Palacios-Martinez M, Canales G, Sangines A, Jaramillo Y, Martinez-Gamboa A, Balandrano S, Valdespino-Gomez JL, Small P. 2001. [Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Orizaba, Veracruz. Implications for the tuberculosis prevention and control program]. *Rev Invest Clin.* 53:315-323.
- Goldberg DE, Siliciano RF, Jacobs WR, Jr. 2012. Outwitting evolution: fighting drug-resistant TB, malaria, and HIV. *Cell.* 148:1271-1283.
- González-Escalante L, 2011. Identificación de genes vinculados con la condición de resistencia a fármacos de primera línea en *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis Universidad Autónoma de Nuevo León
- Hutchings MI, Palmer T, Harrington DJ, Sutcliffe IC. 2009. Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em. *Trends Microbiol.* 17:13-21.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 31:e15.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 35:907-914.
- Kendall SL, Withers M, Soffair CN, Moreland NJ, Gurcha S, Sidders B, Frita R, Ten Bokum A, Besra GS, Lott JS, Stoker NG. 2007. A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 65:684-699.

- Kivi M, Liu X, Raychaudhuri S, Altman RB, Small PM. 2002. Determining the genomic locations of repetitive DNA sequences with a whole-genome microarray: IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 40:2192-2198.
- Laszlo A, de Kantor IN. 1994. A random sample survey of initial drug resistance among tuberculosis cases in Latin America. *Bull World Health Organ.* 72:603-610.
- Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. 2011. TubercuList--10 years after. *Tuberculosis (Edinb).* 91:1-7.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method. *Methods.* 25:402-408.
- Longo D, Hasty J. 2006. Dynamics of single-cell gene expression. *Mol Syst Biol.* 2:64.
- Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, Andersson DI. 2004. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:1289-1294.
- McClure WR, Cech CL. 1978. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem.* 253:8949-8956.
- McDonough JA, McCann JR, Tekippe EM, Silverman JS, Rigel NW, Braunstein M. 2008. Identification of functional Tat signal sequences in *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *J Bacteriol.* 190:6428-6438.
- Munoz-Elias EJ, Upton AM, Cherian J, McKinney JD. 2006. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Mol Microbiol.* 60:1109-1122.

- O'Sullivan DM, McHugh TD, Gillespie SH. 2010. Mapping the fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains: a complex picture. *Journal of Medical Microbiology*. 1533-1535.
- Park WD, Stegall MD. 2007. A meta-analysis of kidney microarray datasets: investigation of cytokine gene detection and correlation with rt-PCR and detection thresholds. *BMC Genomics*. 8:88.
- Peñuelas-Urquides Katia V-TL, Silva-Ramírez Beatriz, Rivadeneyra-Espinoza Liliana, Said-Fernández Salvador, Bermúdez de León Mario. 2013. Measuring of *Mycobacterium tuberculosis* growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units. *Brazilian Journal of Microbiology*. En prensa.
- Raser JM, O'Shea EK. 2005. Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science*. 309:2010-2013.
- Rattan A, Kalia A, Ahmad N. 1998. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infect Dis*. 4:195-209.
- Reddy TB, Riley R, Wymore F, Montgomery P, DeCaprio D, Engels R, Gellesch M, Hubble J, Jen D, Jin H, Koehrsen M, Larson L, Mao M, Nitzberg M, Sisk P, Stolte C, Weiner B, White J, Zachariah ZK, Sherlock G, Galagan JE, Ball CA, Schoolnik GK. 2009. TB database: an integrated platform for tuberculosis research. *Nucleic Acids Res*. 37:D499-508.
- Rhee KY, de Carvalho LP, Bryk R, Ehrt S, Marrero J, Park SW, Schnappinger D, Venugopal A, Nathan C. 2011. Central carbon metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: an unexpected frontier. *Trends Microbiol*. 19:307-314.
- San Feliciano-Martín A, del Olmo-Fernández E, López-Pérez J, Rebollo-Andrés O, Said-Fernandez S, González-Hernández S, Molina-Salinas GM, González-Ramírez D, Hernández-Pando R (2006) Antituberculosis agents. In: Salamanca Ud (ed).



- Sander P, Rezwan M, Walker B, Rampini SK, Kroppenstedt RM, Ehlers S, Keller C, Keeble JR, Hagemeyer M, Colston MJ, Springer B, Bottger EC. 2004. Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 52:1543-1552.
- Scorpio A, Zhang Y. 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in *tubercle bacillus*. *Nat Med.* 2:662-667.
- Scott LG, Williamson JR. 2005. The binding interface between *Bacillus stearothermophilus* ribosomal protein S15 and its 5'-translational operator mRNA. *J Mol Biol.* 351:280-290.
- Sensi P. 1983. History of the development of rifampin. *Rev Infect Dis.* 5 Suppl 3:S402-406.
- Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-Leon LA, Camacho-Mezquita FE, Bobadilla-del-Valle JM, Infante-Suarez ML, Ramirez-Fernandez N, Hernandez-Gomez L, Nelson AM. 1995. [Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican patients. I. Clinical features and risk factors]. *Rev Invest Clin.* 47:273-281.
- Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 16:463-496.
- Smyth GK. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 3:Article3.
- Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res.* 2:164-168.

- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Loch C, van Soolingen D. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 44:4498-4510.
- Sutcliffe IC, Harrington DJ. 2004. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *FEMS Microbiol Rev.* 28:645-659.
- Takayama K, Wang C, Besra GS. 2005. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 18:81-101.
- Telenti A. 1998. Genetics and pulmonary medicine. 5. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax.* 53:793-797.
- Todar K. 2012 *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. In: University of Wisconsin.
- Upton AM, McKinney JD. 2007. Role of the methylcitrate cycle in propionate metabolism and detoxification in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology.* 153:3973-3982.
- von Groll A, Martin A, Portaels F, da Silva PE, Palomino JC. 2010a. Growth kinetics of *Mycobacterium tuberculosis* measured by quantitative resazurin reduction assay: A tool for fitness studies. *Brazilian Journal of Microbiology.* 41:300-303.
- von Groll A, Martin A, Stehr M, Singh M, Portaels F, da Silva PE, Palomino JC. 2010b. Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. *PLoS One.* 5:e10191.

- Voskuil MI, Visconti KC, Schoolnik GK. 2004. Mycobacterium tuberculosis gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. *Tuberculosis (Edinb)*. 84:218-227.
- Werngren J, Sturegard E, Jureen P, Angeby K, Hoffner S, Schon T. 2011. Reevaluation of the critical concentration for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against pyrazinamide using wild-type MIC distributions and pncA gene sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. 56:1253-1257.
- WHO (2007) Tuberculosis. In: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/print.html>, pp 1-3.
- WHO (2012) Global Tuberculosis Report 2012. In: Organization WH (ed): World Health Organization.
- Wilson M, DeRisi J, Kristensen HH, Imboden P, Rane S, Brown PO, Schoolnik GK. 1999. Exploring drug-induced alterations in gene expression in Mycobacterium tuberculosis by microarray hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:12833-12838.
- Yang ZH, Rendon A, Flores A, Medina R, Ijaz K, Llaca J, Eisenach KD, Bates JH, Villarreal A, Cave MD. 2001. A clinic-based molecular epidemiologic study of tuberculosis in Monterrey, Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis*. 5:313-320.
- Ye H, Liu Z, Guo A, Liang J, Guo N, Zeng F, Liu L, Li L, Jin J, Wu X, Li Y, Liu M, Yu L. 2011. Global Transcriptional profiles of Mycobacterium tuberculosis treated with plumbagin. *World J Microbiol Biotechnol*.
- Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. 2003. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother*. 52:790-795.

Zhou M, Geng X, Chen J, Wang X, Wang D, Deng J, Zhang Z, Wang W, Zhang XE, Wei H. 2011. Rapid colorimetric testing for pyrazinamide susceptibility of *M. tuberculosis* by a PCR-based in-vitro synthesized pyrazinamidase method. *PLoS One*. 6:e27654.

Zimhony O, Cox JS, Welch JT, Vilcheze C, Jacobs WR, Jr. 2000. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med*. 6:1043-1047.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

Katia Peñuelas Urquides

Candidata para el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología

Tesis: **ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE CEPAS MULTIFÁRMACORESISTENTES DE *Mycobacterium tuberculosis* EXPUESTAS A NUEVOS COMPUESTOS CONTRA TUBERCULOSIS PULMONAR.**

**Campo de estudio:** Microbiología y Biología Molecular.

**Datos Personales:** Nacida en Los Mochis, Sinaloa el 22 de Febrero de 1981.  
Hija de José Luis Peñuelas Acosta y Laura Elena Urquides Villegas.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el año 2004 de la Facultad de Ciencias Biológicas con el grado de Química Bacterióloga Parasitóloga y en el año 2008 de la Facultad de Medicina con el grado de Maestra en Ciencias con acentuación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

**Experiencia profesional:** Técnico en Investigación en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social.

## ARTÍCULOS

### 1.- Artículo aceptado (En prensa):

- **Título:** Measuring of Mycobacterium tuberculosis growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units.
- **Revista:** Brazilian Journal of Microbiology.

### 2.- Artículo enviado a revisión:

- **Título:** Comparison of transcriptome between pansensitive and multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis.
- **Revista:** FEMS Microbiology Letters

### 3.- Artículo en proceso de escritura:

- **Título:** Mechanism of action of two new antituberculosis dihydrosphingosines in pansensitive and multidrug-resistant M. tuberculosis.