



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

**Determinación de la posible relación entre la
proteína MfpA de *Mycobacterium smegmatis* y la
resistencia “*in vivo*” a ciprofloxacina.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela por el bachiller David
José Fernández Salvatierra como requisito
parcial para optar por el título de Licenciado
en Biología.

Tutora: Dra. Aura Falco

Asesor académico: Dra.
Guillermina Alonso

CARACAS, VENEZUELA

NOVIEMBRE - 2013

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, mi padre y mis tíos Edgar y Zobeida por el apoyo recibido durante toda mi carrera.

A mi tutora la Dra. Aura Falco por guiarme durante la realización de este trabajo.

A mi co-tutora la Dra. Guillermina Alonso, por toda su ayuda y orientación.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), especialmente al Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Biología Celular y Microbiología y al Dr. Howard Takiff por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme hacer ciencia.

A la Universidad Central de Venezuela, mi casa de estudio y a la Facultad de Ciencias, mi segundo hogar.

A mis compañeros de laboratorio Roque, Liseth, Luis, Whendys, Yaritza, Andreina, Gleinys, Carlos, Dr. Oscar, Dra. Elba, Dra. Claudia, Dr. Gustavo por toda la colaboración y compañerismo.

A mis amigos Rafael, Hiran y Gabriel por hacerme más amenos los ratos libres en el IVIC.

A mis compañeros de residencia Miguel, Raquel y Estefy por su apoyo y amistad.

A mis amigas Brenda, Alejandra, María Gabriela, Lubelis, Daniela, Ruth, Mariana, Mayelí, Emily, Gabriela y Gaby González por todas sus risas, sus regaños, sus consejos y sus locuras.

A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La tuberculosis	1
1.2 Reseña histórica de la tuberculosis	2
1.3 Biología de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
1.4 Tratamientos contra la tuberculosis	8
1.4.1 Las fluoroquinolonas (FQs).....	9
1.4.2 Mecanismo de acción de las fluoroquinolonas.....	11
1.4.3 Mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas.....	11
1.4.3.1 Mutaciones que alteran el blanco de acción.....	12
1.4.3.2 Bombas de eflujo.....	13
1.4.4.3 La familia de pentapéptidos repetidos.....	15
2. ANTECEDENTES.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. OBJETIVOS.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1 Cepas bacterianas.....	24
5.2 Plásmidos.	25
5.3 Medios de cultivo.....	26

5.4 Selección de cepas de <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 resistentes a ciprofloxacina.....	26
5.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI de ciprofloxacina en cepas mutantes de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	27
5.6 Ensayos de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido.....	27
5.7 Preparación de lisado celular de <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 para PCR.....	28
5.8 Amplificación del gen <i>gyrA</i> de cepas mutantes de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155....	28
5.9 Purificación de productos de PCR y aislamiento de ADN plasmídico.....	29
5.10 Secuenciación del ADN.....	29
5.11 Análisis de secuencia de nucleótidos.....	29
5.12 Transformación en <i>E. coli</i>	30
5.13 Transformación de <i>M. smegmatis</i> mediante electroporación.....	32
5.14 Ensayos de sobreexpresión de la proteína MfpA.....	32
6. RESULTADOS	34
6.1 Ensayos de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido.....	34
6.2 Amplificación por PCR y secuenciación la región QRDR del gen <i>gyrA</i> de cepas resistentes.....	40
6.3 Ensayos de sobreexpresión de la proteína MfpA.....	42
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	52
9. BIBLIOGRAFIA	53
10. ANEXOS	60

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I: Concentraciones y volúmenes necesarios de los reactivos para PCR.....	29
Tabla II: Condiciones de temperatura a las que se ajustó el termociclador para realizar el PCR.....	29
Tabla III: Resultados de la sobreexpresión con acetamida en diferentes cepas de <i>M. smegmatis</i>	45
Tabla IV: Concentración Mínima inhibitoria de ciprofloxacina para cepas mutantes de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Estructura de la pared celular de una micobacteria.....	5
Figura 2: Modelo de la envoltura celular de micobacterias propuesto por Hoffmann y col. (2008).....	6
Figura 3: Estructura molecular de: (a) quinolona, (b) ácido nalidíxico y (c) ciprofloxacina.....	10
Figura 4: Representación de la estructura cristalina de la proteína ADN Girasa.....	13
Figura 5: Comparación esquemática de las Cinco Familias de bombas de eflujo.....	14
Figura 6: Diagrama de cinta del dímero <i>Efs Qnr</i> de <i>Enterococcus faecalis</i>	17
Figura 7: a) Diagrama de cinta del dímero <i>MfpA</i> de <i>M. tuberculosis</i> . b) Interacción entre <i>MfpA</i> y la ADN girasa.....	18
Figura 8: Mapa del vector pALACE.....	25
Figura 9: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 06 (cepa 06).....	35
Figura 10: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 08 (cepa 08).....	36
Figura 11: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 09 (cepa 09).....	36
Figura 12: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 10 (cepa 10).....	37
Figura 13: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 17 (cepa 17).....	37
Figura 14: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 62 (cepa 62).....	38
Figura 15: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 64 (cepa 64).....	38
Figura 16: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 65 (cepa 65).....	39

Figura 17: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 67 (cepa 67).....	39
Figura 18: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 88 (cepa 88).....	40
Figura 19: Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación por PCR del gen <i>gyrA</i> de cepas mutantes de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.....	41
Figura 20: Análisis de secuencias de la región QRDR del gen <i>gyrA</i> tanto de la cepa silvestre <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 (QRDR_mc2_155_WT) como de las cepas mutantes seleccionadas en este trabajo.....	42
Figura 21: Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación por PCR del gen <i>mfpA</i> clonado en el vector de sobreexpresión pALACE....	43
Figura 22: a) Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % del vector de sobreexpresión pALACE digerido con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I. b) Representación esquemática del plásmido pALACE indicando los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Xho</i> I.....	44
Figura 23: a) Modelo de la estructura en 3-D de la ADN girasa. b) dominio N-terminal de la girasa de <i>E. coli</i>	50

ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

ABC: ATP Binding Cassette.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

DO: Densidad Óptica.

FPR: Familia de Pentapéptidos Repetidos.

FQs: Fluoroquinolonas.

INH: Isoniacida.

LfrA: Low-level Fluoroquinolone Resistance.

MATE: Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family.

MFS: Mayor Facilitators Superfamily.

MfpA: Mycobacterial Fluoroquinolone resistance Protein.

OAD: Oleico-Albúmina-Dextrosa.

PAS: Ácido para-amino-salicílico.

PZA: Piracinamida.

QnrA: Quinolone-Resistance.

QRDR: Quinolone Resistance Determining Región.

RIF: Rifampicina.

RND: Resistance Nodulation Cell Division Family.

SMR: Small Multidrug Resistance Family.

STR: Estreptomycin.

TAES: Tratamiento Acordado Estrictamente Supervisado.

TB: Tuberculosis

TB-MDR: Tuberculosis Multidrogo Resistentes.

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, la cual se caracteriza por tener una morbilidad y mortalidad elevada. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada con el bacilo tuberculoso y cada año se producen entre 8 y 10 millones de casos nuevos, con una mortalidad anual de 2 millones de personas. La incidencia de la tuberculosis se ha mantenido constante en el tiempo debido a las carencias en los servicios de salud, a la selección de bacilos multirresistentes a las drogas utilizadas como tratamiento y a la co-infección de los pacientes con VIH/SIDA. Muchos estudios han destacado la importancia del uso de las fluoroquinolonas en el tratamiento contra la tuberculosis debido a su capacidad de inhibir a la enzima ADN girasa. Sin embargo, el problema con el uso de estos antibióticos es la rápida selección de mutantes resistentes. Se han reportado tres mecanismos asociados con la resistencia a fluoroquinolonas: mutaciones en el blanco de acción, disminución de la concentración intracelular de las drogas por la presencia de bombas de eflujo y la presencia de proteínas pertenecientes a la familia de los pentapéptidos repetidos. Dentro de esta familia se encuentra la proteína MfpA de *Mycobacterium smegmatis*, la cual se ha relacionado con el desarrollo de resistencia a FQs. El objetivo de este trabajo fue determinar si hay una relación entre la proteína MfpA y la expresión del fenotipo de resistencia “*in vivo*” a ciprofloxacina en cepas de *Mycobacterium smegmatis* mutantes en el gen *gyrA*. Para ello, se seleccionaron cepas de *M. smegmatis* resistentes a ciprofloxacina y se descartó que dicha resistencia esté mediada por bombas de eflujo. Seguidamente se procedió a electroporar las cepas resistentes con un vector que permite regular la expresión del gen *mfpA* al agregar el inductor (acetamida) al medio de cultivo. Los resultados indican que el aumento en la expresión del gen *mfpA* provoca el incremento de resistencia a ciprofloxacina en las cepas *Mycobacterium smegmatis* mc²155, *Mycobacterium smegmatis* mc²155GM1 y *Mycobacterium smegmatis* mc² 1255 apoyando la hipótesis de que posiblemente MfpA protege a la girasa de *Mycobacterium smegmatis* del efecto inhibitor de las fluoroquinolonas. Por otro lado, la cepa mutante *Mycobacterium smegmatis* mc²155 62 no expresó variaciones en su concentración mínima inhibitoria con el aumento “*in vivo*” de la expresión del gen *mfpA*, lo indica que mutaciones en el residuo A91 de la girasa de *M. smegmatis* afectan la interacción entre MfpA y la ADN girasa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La tuberculosis:

La tuberculosis (TB) ha sido descrita como una enfermedad infectocontagiosa crónica, producida por especies del género *Mycobacterium*. Es una enfermedad principalmente del tipo pulmonar, sin embargo, la diseminación del bacilo desde los pulmones infectados a través de los sistemas sanguíneo y linfático, puede afectar diversos órganos y sistemas incluyendo el sistema nervioso central, el tracto urogenital, la piel, el sistema digestivo y los huesos (Gutiérrez *et al.*, 1998). Es una enfermedad de distribución desigual en la población ya que en ciertos grupos existe una elevada incidencia, principalmente en habitantes del continente Africano, Asiático y algunas islas del Pacífico (Zinsser, 1999).

La infección con *M. tuberculosis* ocurre por vía aérea cuando un individuo sano se expone a los aerosoles de un paciente que expulsa los bacilos al toser, hablar, estornudar o escupir (Schaechter *et al.*, 1994). Una vez que se han inhalado los bacilos, estos alcanzan los espacios alveolares donde son fagocitados por macrófagos. La bacteria se multiplica en los macrófagos de los alvéolos pulmonares, sitio inicial de la infección, luego se dispersa en los nódulos linfáticos locales, los cuales se inflaman y aumentan de tamaño, produciendo una adenopatía hiliar denominada complejo primario (García y González, 2001; Smith, 2003).

La respuesta inmunitaria se establece de 4 a 6 semanas después de la infección primaria. Aproximadamente el 90% de los pacientes controla la infección inicial persistiendo la enfermedad en estado de latencia, mientras que en el 10% restante, la infección primaria no es controlada y se produce la tuberculosis activa (Parrish *et al.*, 1998).

1.2 Reseña histórica de la tuberculosis:

La tuberculosis ha cobrado muchísimas vidas en la historia de la humanidad. Es una enfermedad muy antigua que se ha reconocido incluso en esqueletos procedentes de la edad de piedra y en huesos de las primeras momias egipcias, así como en restos humanos de periodo neolítico (Rossman *et al.*, 1996; Zinsser, *et al.*, 1999).

A partir del siglo XVI y hasta por lo menos el siglo XVIII, la tuberculosis fue la principal causa de muerte en países europeos debido al incremento de la población, la industrialización y al desarrollo de grandes centros urbanos (Volk, 1996; Smith, 2003). No fue hasta aproximadamente la segunda mitad del siglo XIX que la epidemia disminuyó debido principalmente a las mejoras en la calidad de vida y en las condiciones sanitarias (Smith, 2003).

En el año 1865, el francés Jean Antoine Villemin logró establecer la naturaleza infecciosa de la tuberculosis. Él demostró que cuando se inoculan conejos con pus de las cavidades pulmonares de enfermos, éstos desarrollaban tubérculos, pero fue en el año 1882 que Robert Koch logró aislar por primera vez el agente causal de la TB (Daniel *et al.*, 1994; Zinsser *et al.*, 1999; Cole *et al.*, 2002; Smith., 2003). Desde entonces se empezó a buscar la vacuna contra la misma, y fue en el año 1921, cuando se implementó por primera la vacunación con el bacilo *M. bovis* de Calmette-Guérin (BCG) (De la Parte *et al.*, 2001; Smith, 2003). Pocos años después se empezaron a usar antibióticos para el tratamiento de la TB, iniciándose así la quimioterapia contra esta enfermedad. El uso de drogas como la isoniazida y la pirazinamida permitieron un avance importante en el control de la TB lográndose un decline continuo de la morbilidad y mortalidad causada por esta enfermedad. Sin embargo, a mediados de los años 80, la tasa de TB incrementó en los Estados Unidos y Europa, debido al desplazamiento poblacional y al urbanismo. En Estados Unidos

ocurrieron varios brotes de TB ocasionados por bacterias resistentes a múltiples drogas (MDR). Estos brotes tenían una estrecha relación con el incremento de la epidemia de VIH, la pobreza en centros urbanos y la inmigración a partir de países en vías de desarrollo donde la incidencia de la tuberculosis era alta (De la Parte *et al.*, 2001; Raviglione, 2003). Actualmente la tuberculosis continúa siendo una causa de muerte importante a nivel mundial ocasionando aproximadamente entre 8 y 10 millones de nuevas infecciones y casi un millón de muertes anuales (OMS, 2012). La Organización Mundial de la Salud (OMS), predice que durante el período comprendido entre los años 2002 al 2020, 36 millones de personas morirán a causa de la tuberculosis (Hasan *et al.*, 2006). En América, los países con mayor tasa de incidencia son Haití, Bolivia, Brasil y Perú. En Venezuela, con una incidencia media en relación con el resto del continente, la tuberculosis ocupa el tercer lugar de enfermedades infecciosas con mayor incidencia, después del dengue y la malaria, y ocupa la posición 19 dentro de las primeras 25 causas de mortalidad en el país (OMS, 2012). La tasa de incidencia para el año 1997 fue de 24,9 casos por cada 100.000 habitantes (Guilarte, 2001; Piñate, 2001), mientras que para el 2006 fue de 34 casos por cada 100.000 habitantes, con una mortalidad de 5,5 casos por cada 100.000 habitantes. Datos más recientes indican que para el año 2011, la incidencia de tuberculosis reportada en el país fue de 64 casos por cada 100.000 habitantes, con una tasa de mortalidad de 2,3 por cada 100.000 habitantes (OMS, 2012).

1.3 Biología de *Mycobacterium tuberculosis*:

Mycobacterium tuberculosis es un bacilo inmóvil, aeróbico y no esporulado que pertenece a la Familia *Mycobacteriaceae*, Orden *Actinomycetales*, Clase *Actinomycetes*, Género *Mycobacterium* (Velez, 2003). Este microorganismo pertenece a un grupo de especies

fuertemente relacionadas que son las causantes de tuberculosis en hospederos disímiles. Este grupo se denomina Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y comprende siete especies que son:

Myobacterium bovis: afecta generalmente al ganado vacuno.

La cepa atenuada *Mycobacterium bovis* BCG utilizada para la vacunación.

Mycobacterium microti: responsable de la enfermedad en ratones de campo.

Mycobacterium africanum: causante de la tuberculosis humana en África.

Mycobacterium canetti: variante de *Mycobacterium tuberculosis* capaz de provocar una neumonía menos severa que la tuberculosis clásica en humanos.

Mycobacterium pinnipedii: causante de la enfermedad en focas.

Mycobacterium tuberculosis: responsable de la tuberculosis en humanos (Cole, 2002; Cousins *et al.*, 2003; Fabre *et al.*, 2004).

M. tuberculosis es un bacilo que no se tiñe con facilidad con colorantes básicos como los utilizados en la coloración Gram, motivo por el cual se utiliza la fucsina fenicada para la tinción de estos microorganismos. Una vez que captan dicho colorante, resisten a la decoloración con alcohol acidificado y por ello se les llama bacilos ácido-alcohol resistentes. Esta es una de las principales características de las micobacterias y se debe a la composición de su pared celular, rica en lípidos de alto peso molecular (Llop *et al.*, 2001), ácidos grasos de cadenas largas (ácidos micólicos) y un polisacárido único llamado arabinogalactano (Hong y Hopfinger, 2004).

La envoltura de *M. tuberculosis* consiste en tres capas, la más interna es la membrana plasmática, seguida de la pared celular, constituida por una amplia red de carbohidratos y lípidos unidos de forma covalente y no covalente; y por último la capa más externa,

llamada cápsula, constituida por polisacáridos, proteínas y una pequeña cantidad de lípidos (Daffe *et al.*, 1998; Hong y Hopfinger, 2004; Rezwan *et al.*, 2007).

La pared se localiza por debajo de la cápsula, posee un elevado contenido lipídico (~50-60%) y está compuesta por tres macromoléculas unidas covalentemente: el peptidoglicano, el arabinogalactano y los ácidos micólicos (Figura 1). El peptidoglicano, también llamado mureina, es un polímero formado por moléculas de N-acetilglucosamina y N-glucorilmurámico (Chatterjee *et al.*, 1997). Esta capa es el esqueleto de la bacteria y le proporciona su forma y rigidez, aunque se sabe que los componentes de la pared celular de las micobacterias tienen diferentes funciones además de las puramente estructurales. Así por ejemplo, los ácidos micólicos son importantes para el crecimiento, sobrevivencia y patogenicidad de *M. tuberculosis*. Tiene un papel muy importante como barrera de permeabilidad contribuyendo a la profunda resistencia intrínseca de las micobacterias a los antibióticos, deshidratación y daño químico. El arabinogalactano, que constituye una base a la que van unidos los ácidos micólicos, también cumple un rol de inmunogenicidad y en la permeabilidad de antibióticos (Casal *et al.*, 1999; Hong y Hopfinger, 2004; Scherr y Nguyen, 2009).

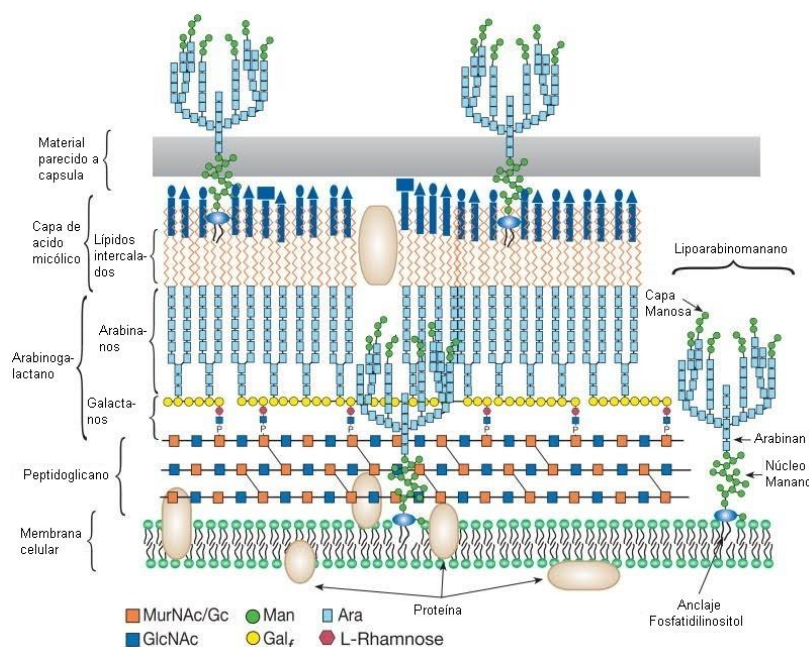


Figura 1: Estructura de la pared celular de una micobacteria. Tomado y modificado de <http://egamor.blogspot.com/2010/06/pared-celular-mycobacterium.html>

Estudios más recientes dan a conocer nuevos detalles acerca de la estructura de envoltura de las micobacterias. Por medio de imágenes obtenidas a través de técnicas de microscopía electrónica se lograron hacer reconstrucciones en 3D de criosecciones ultrafinas de muestras deshidratadas y congeladas (Figura 2). En estas imágenes se revela que la capa más externa está compuesta por una bícapa lipídica morfológicamente simétrica, siendo los ácidos micólicos moléculas esenciales para la formación de esta bícapa. Esto último es un factor importante al estudiar los procesos de transporte a través de la membrana (Hoffmann y col., 2008; Niederweis y col. 2010).

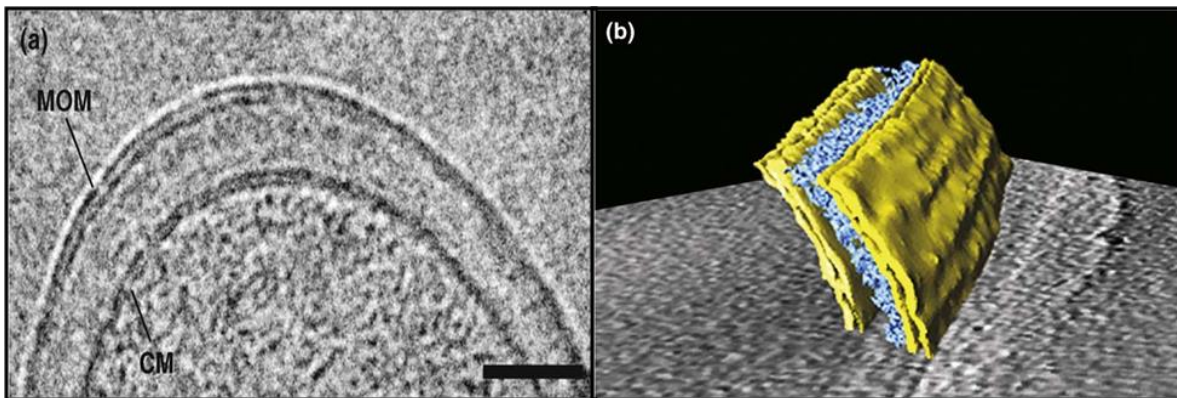


Figura 2: Modelo de la envoltura celular de micobacterias propuesto por Hoffmann y col. (2008). (a) Crio microscopía electrónica de la envoltura celular micobacteriana. La membrana externa de *M. bovis* BCG (MOM), es visualizada por crioseccionamiento y por tomografía (reconstrucción tridimensional). (b) El espacio periplasmático entre MOM y CM (membrana plasmática) contiene capas del polímero de arabinogalactano-peptidoglicano (en azul). Barra de escala de 50 nm (Hoffmann y col. 2008; Niederweis y col. 2010).

De esta manera, la capa de lípidos que forma parte de la envoltura micobacteriana, sería más similar a la membrana externa de las bacterias Gam-negativas, formando una bícapa lipídica que funciona como una barrera de permeabilidad externa y forma un espacio periplasmático. Considerando la estructura de múltiples capas de la pared celular de

micobacterias, esta se asemeja más a la pared celular de las bacterias Gram-negativas que a la pared de una sola capa de otras bacterias Gram-positivas (Scherr y Nguyen, 2009).

En base a su tasa de crecimiento, *M. tuberculosis* está clasificada como una especie de crecimiento lento debido a que su tiempo de duplicación es de 18 a 24 horas (Kubica y Wayne, 1984).

M. tuberculosis posee un cromosoma en forma circular de aproximadamente 4.411.529 pb de longitud y un alto contenido de G+C (65,6%) (Cole *et al.*, 1998). El genoma contiene aproximadamente 4.000 genes, clasificados en 11 grupos funcionales de los cuales a un 52 % se les ha descrito una función precisa o putativa, mientras que al otro 48% restante son genes hipotéticamente conservados o cuya función se desconoce (Falco, 2010). El 57% de los genes codifican para funciones asociadas al metabolismo de ácidos grasos, lo cual indica que estas proteínas tienen un papel importante en la capacidad del microorganismo para crecer y sobrevivir en el tejido de su hospedero, donde los ácidos grasos son la principal fuente de carbono (Smith *et al.*, 2003).

Otra de las características que posee *M. tuberculosis* es su capacidad de generar una infección aguda así como una infección latente, y puede mantenerse en este estado durante años antes de activarse y ocasionar la enfermedad. Los individuos que albergan la infección en estado latente tienen el riesgo de por vida de desarrollar la enfermedad, siendo este precisamente el principal obstáculo para controlar la tuberculosis. Esto también es debido a que los principales tratamientos están diseñados para atacar al bacilo tuberculoso en su fase activa, siendo ineficientes en al utilizarlos como terapia en la fase latente de la enfermedad.

1.4 Tratamientos contra la tuberculosis:

El comienzo de la quimioterapia contra la tuberculosis moderna se remonta al año 1924 cuando hizo su entrada al mercado el antibiótico estreptomicina (STR). Esta droga fue utilizada en la terapia contra la TB luego de observarse que reducía la mortalidad y la mayoría de los pacientes se curaban. Sin embargo, la monoterapia muy pronto comenzó a asociarse con resistencia a la droga, trayendo como consecuencia una falla terapéutica evidente (Schatz *et al.*, 1994, Blondal *et al.*, 2007, Harrison, 2008). Posteriormente, en el año 1946, se empezó a administrar una droga sintética, llamada ácido para-amino-salicílico (PAS), que demostró una gran mejoría en pacientes con TB en combinación con estreptomicina (Zhang *et al.*, 2005). Luego en el año 1952, se incorporó al mercado la isoniacida (INH) y la pirazinamida (PZA), mientras que el etambutol y la rifampicina (RIF) fueron introducidos en el año 1961 y 1966, respectivamente (Zhang, 2007).

El tratamiento contra esta enfermedad es diferente a cualquier otro tratamiento para bacterias debido a que *M. tuberculosis* tiene un tiempo de generación largo y una capacidad de latencia. Además, puede alojarse en cavidades pulmonares, pus o material sólido caseoso donde la penetración del antibiótico es difícil o el pH es suficientemente bajo como para inhibir la actividad de la mayoría de las drogas (Zhang, 2007).

Actualmente la terapia estándar que se aplica a nivel mundial se denomina TAES (Tratamiento Acordado Estrictamente Supervisado), fue establecida por la OMS en el año 1995 y que tiene una efectividad aproximada del 95% (Zhang, 2005). TAES es una terapia de larga duración pues se aplica durante aproximadamente 6 meses. El tratamiento consta de una fase inicial de dos meses y medio en el que se suministran cuatro drogas de primera línea: isoniacida, pirazinamida, rifampicina y etambutol, seguida de una segunda fase en la que se aplican isoniacida y rifampicina durante otros 4 meses y medio. Es importante

mencionar que la estrategia TAES no es efectiva en muchos pacientes que están infectados con bacilos resistentes a múltiples drogas (TB-MDR). En este caso, la OMS recomienda la estrategia TAES-Plus, que consiste en el empleo de drogas de segunda línea como: etionamida, cicloserina, kanamicina así como las fluoroquinolonas (FQs), que últimamente han demostrado tener una importancia fundamental en el tratamiento contra la tuberculosis. Algunas de las desventajas de este tratamiento es que tiene una duración de dos años, es costoso y es altamente tóxico para el paciente (Zhang, 2005; Cox *et al.*, 2008).

1.4.1 Las fluoroquinolonas (FQs):

Las quinolonas son antibióticos sintéticos derivados del ácido nalidíxico, un agente antimicrobiano natural identificado por Lesher en 1962 (Mella *et al.*, 2000). El ácido nalidíxico, ha sido modificando en su estructura siendo una de las modificaciones más relevantes la incorporación de un átomo de flúor en el carbono 6 de las quinolonas, dando origen a las fluoroquinolonas (Figura 3) (Ginsburng *et al.*, 2003). Las FQs se consideran una clase relativamente nueva de antimicrobianos con un espectro de acción amplio y potente. En comparación con el ácido nalidíxico, las nuevas fluoroquinolonas han mejorado las propiedades farmacocinéticas, incluyendo una mayor absorción oral, un incremento de la concentración máxima en el suero, concentraciones mayores en los tejidos y tiempos de vida media más largos (Martínez, 2005).

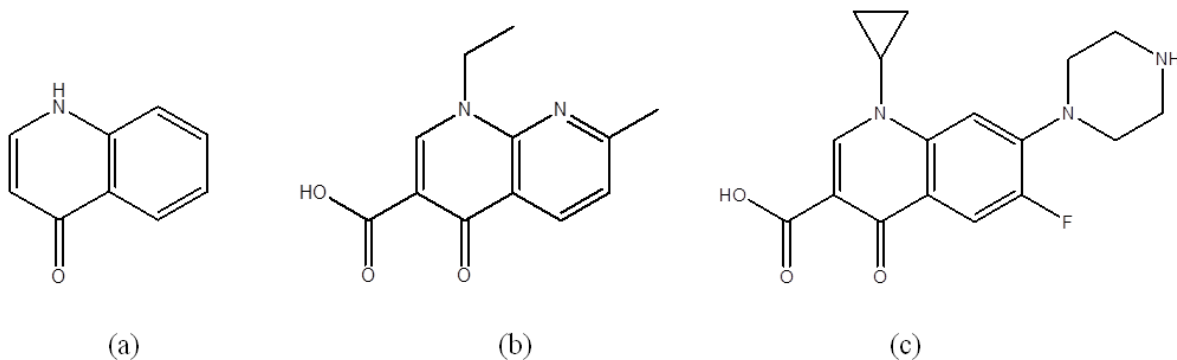


Figura 3: Estructura molecular de: (a) quinolona, (b) ácido nalidíxico y (c) ciprofloxacina.

El primer grupo de antibióticos de este tipo se ha utilizado mayormente para tratar enfermedades del tracto urinario y está representado por el ácido nalidíxico, ácido oxolinico, cinoxacina y pipemidina. El segundo grupo incluye agentes muy potentes contra bacterias Gram negativa tales como la ciprofloxacina (Figura 3c), la cual se sintetizó por primera vez en el año 1983, y ha sido hasta ahora uno de los antibióticos más utilizados en la clínica (Rodríguez, 2009). Dentro de este grupo también se ubican norfloxacina, lomefloxacina, difloxacina y ofloxacina (King *et al.*, 2000; Hooper, 2001). Comparados con los de primera generación, estos agentes tienen una aplicación clínica más amplia en el tratamiento de infecciones del tracto urinario y de pielonefritis, enfermedades de transmisión sexual, ciertas neumonías y enfermedades de la piel (Martínez, 2005). El tercer grupo, que incluye a temafloxacina, tiene un amplio espectro de actividad contra bacterias Gran negativas, Gran positivas, antianaeróbicos y *Pseudomonas* (Rodríguez, 2009). También pertenecen a este grupo la esperfloxacina, levofloxacina, grepafloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina (King *et al.*, 2000). El cuarto grupo incluye antibióticos contra patógenos respiratorios (Martínez, 2005). Este grupo está constituido por el antibiótico trovafloxacina, que añade una actividad antimicrobiana frente a anaerobios,

mientras que mantiene la actividad de las quinolonas de tercera generación frente a Gram positivos y Gram negativos (Martínez, 2005).

1.4.2 Mecanismo de acción de las fluoroquinolonas:

Las fluoroquinolonas interfieren en el metabolismo del ADN bacteriano debido a que son capaces de inhibir a la ADN girasa y a la topoisomerasa IV. Las ADN topoisomerasas son enzimas que controlan y modifican la topología del ADN en las células. La enzima ADN girasa es una topoisomerasa tipo II que cataliza el superenrollamiento negativo del ADN a expensas del ATP. Así pues, la ADN girasa introduce superenrollamientos en la doble hélice dando lugar a la estructura tridimensional altamente condensada del ADN (Martínez, 2005). El blanco de las FQs en *M. tuberculosis* es la enzima ADN girasa, la cual está constituida por dos subunidades α y dos subunidades β , codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente (De La Campa *et al.*, 2004; Falco, 2010).

En general, las fluoroquinolonas se unen reversiblemente al complejo de ruptura ADN-girasa, estabilizando las cadenas de ADN que han sido previamente cortadas por la girasa, creando un complejo terciario constituido por el ADN, la enzima y la FQ, impidiendo así el avance del complejo de replicación del ADN. Esto produce la acumulación de fragmentos de ADN doble que han sido cortados, interrumpiéndose todos los procesos dependientes de la topología del ADN, como la replicación y la transcripción, provocando así la muerte celular (Ramaswamy *et al.*, 2003; Vetting *et al.*, 2006).

1.4.3 Mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas:

La resistencia a las FQ se determinó poco después que estas drogas fueron introducidas en el mercado. Hoy en día, la mayoría de patógenos clínicos han desarrollado resistencia a estas drogas, razón por la cual el estudio de los mecanismos de resistencia a estos fármacos

ha resultado de importancia a nivel mundial (Rodríguez, 2005). El desarrollo de la resistencia a las fluoroquinolonas es un proceso complejo que asocia tres mecanismos fundamentales descritos hasta ahora: mutaciones que alteran el blanco de acción, bombas de eflujo que reducen la cantidad intracelular de la droga y proteínas pertenecientes a la Familia de Pentapéptidos Repetidos (FPR) (Falco, 2010; Rodríguez, 2009; Martínez, 2005).

1.4.3.1 Mutaciones que alteran el blanco de acción: un patrón general de resistencia para la mayoría de las FQs son mutaciones en el blanco de acción. En el cromosoma micobacteriano existe una región, llamada QRDR (Quinolone Resistance Determining Región) (Figura 4), ubicada tanto en el gen *gyrA* como en el gen *gyrB*. Estas regiones están involucradas en la interacción entre la fluoroquinolona y la ADN girasa. Se ha identificado que mutaciones en dicha región están asociadas con la resistencia a estos fármacos. En aislados clínicos de *M. tuberculosis* se ha encontrado que la resistencia a FQs ocurre comúnmente por mutaciones en la región QRDR de *gyrA*, que generalmente involucran una sustitución del codón 94, convirtiéndolo en el mecanismo de resistencia más importante a estos antibióticos (Coll *et al.*, 2003; Falco, 2010). Sin embargo, no todos los aislados clínicos resistentes a fluoroquinolonas tienen mutaciones en *gyrA* ni en *gyrB*, lo cual indica que la resistencia a estos antibióticos no está mediada sólo por mutaciones en la región QRDR, sino que deben existir otros mecanismos asociados a la resistencia a estos fármacos (Falco, 2010; Yew *et al.*, 2002). Estos mecanismos incluyen mutaciones ubicadas fuera de la región QRDR de los genes *gyrA* y *gyrB*, mecanismos activos de transporte de la droga hacia el exterior celular como bombas de eflujo y/o la presencia de pentapéptidos repetidos que mimifican el ADN (Falco, 2010).

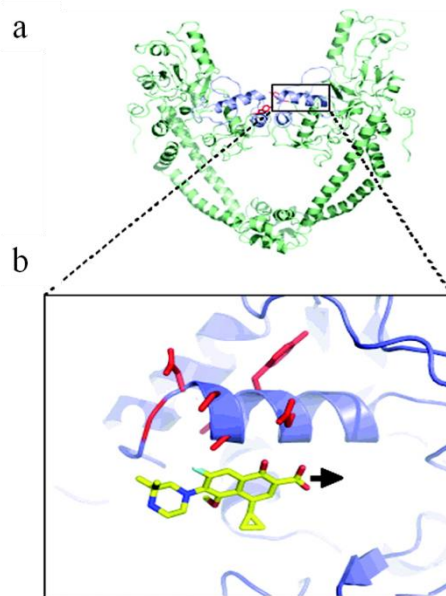


Figura 4: Representación de la estructura cristalina de la proteína ADN Girasa. La región QRDR está en azul y el sitio activo (Tyr¹²²) está e rojo (a). En (b) se muestra en primer plano la región QRDR, destacando la posición de la fluoroquinolona en el dominio hélice $\alpha 4$ de GyrA. La fluoroquinolona utilizada para el modelo es gatifloxacina (tomado de Matrat S. *et al.*, 2006).

1.4.3.2 Bombas de eflujo: Otro de los mecanismos que se ha asociado con la resistencia a las FQs involucra bombas de eflujo, proteínas de membrana que se encargan de expulsar de forma inespecífica varias sustancias hacia el exterior celular (Rodríguez, 2009). Las bombas de eflujo son un grupo grande de proteínas que cumplen varias funciones en las células bacterianas, como la expulsión de moléculas tóxicas producidas por el organismo hospedador.

Las bombas de eflujo se clasifican en 5 familias: la familia ABC (ATP Binding Cassette), MFS (Major Facilitators Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance Family), MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family) y RND (Resistance Nodulation Cell Division Family) (Figura 5) (Rodríguez, 2009).

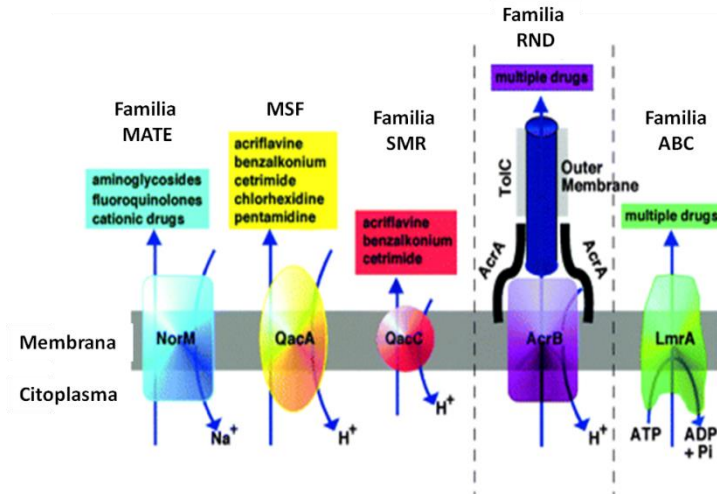


Figura 5: Comparación esquemática de las cinco familias de bombas de eflujo (Tomado y modificado de Pidcock L., 2006).

En micobacterias se han descrito algunas bombas de eflujo dentro de la que se encuentra LfrA (Low-level Fluoroquinolone Resistance) que pertenece a la familia MFS. Fue reportada en el año 1996 para *M. smegmatis* y está involucrada en el transporte de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos e inositol, bromuro de etidio, rodamina y acriflavina, así como ha sido relacionada con la resistencia a FQs hidrofílicas como ciprofloxacina y ofloxacina (Takiff *et al.*, 1996).

En el análisis de la secuencia genómica de *M. tuberculosis*, realizado por De Rossi y colaboradores en el año 2002, se identificaron 16 marcos de lectura abiertos que codifican para presuntas bombas de eflujo. Una de estas bombas, codificada por el gen *Rv1634*, incrementa la resistencia a varias fluoroquinolonas como norfloxacina y ciprofloxacina cuando se sobreexpresa en *M. smegmatis*.

Por otro lado, se demostró que la resistencia a ofloxacina en una cepa mutante de laboratorio de *M. smegmatis*, está relacionada con los altos niveles de transcripción del gen *pstB*. Este gen codifica para una subunidad de unión a nucleótido putativa que forma parte de un sistema de transporte del tipo ABC específico para fosfato. Cuando el gen *pstB* es

inactivado, disminuye la entrada de fosfato al interior celular y hay una hipersensibilidad a ofloxacina. Esto sugiere que el sistema Pst, además de estar involucrado en el transporte de fosfato, está relacionado con la expulsión activa de esta fluoroquinolona.

1.4.4.3 La familia de pentapéptidos repetidos: Las proteínas pertenecientes a la familia de los pentapéptidos repetidos están definidas por 5 aminoácidos que se repiten en tanda, [Ser, Thr, Ala, o Val], [Asp o Asn], [Leu o Phe], [Ser, Thr, o Arg], [Gly]. Hasta la fecha, se sabe que ésta familia está compuesta por más de 500 proteínas que se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas, sin embargo, la función de la gran mayoría de éstas es desconocida (Vetting *et al.*, 2006).

McbG y Qnr (Quinolone-Resistance) son proteínas pertenecientes a la Familia de Pentapéptidos Repetidos que han sido relacionadas con la resistencia a microcinaB17 y a FQs en Enterobacterias. Se ha reportado que la proteína McbG, en conjunto con McbE y McbF, es responsable de la resistencia a microcinaB17 en *E. coli*, además de conferir bajo nivel de resistencia a fluoroquinolonas como la esparfloxina. El gen *mbcG* que codifica para la proteína McbG, se encuentra hacia el extremo 3' de los genes *mbcE* y *mbcF* y se cree que en conjunto exportan la microcinaB17 desde el citoplasma hacia el exterior celular (Heddle *et al.*, 2001; Jacoby *et al.*, 2003).

En el año 1998 se reporta por primera vez la existencia de una forma transmisible de la resistencia a fluoroquinolonas mediada por plásmidos. QnrA es una proteína perteneciente a la familia de pentapéptidos repetidos que esta codificada por el gen *qnrA* ubicado en un plásmido conjugativo que fue aislado de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en EUA. Martínez-Martínez y colaboradores (1998) demostraron que dicha proteína estaba involucrada en el aumento de la resistencia al ácido nalidixico y a la ciprofloxacina. Estos

resultados fueron de gran relevancia ya que para la fecha sólo se había reportado que la resistencia a fluoroquinolonas estaba mediada por mutaciones en los genes que codifican para las topoisomerasas tipo II o por la sobreexpresión de bombas de eflujo que reducen la concentración intracelular de dichas drogas (Martínez-Martínez *et al.*, 1998; Vetting *et al.*, 2006).

Debido a que el blanco principal de las quinolonas en bacterias Gram negativas es la ADN-girasa, Tran y Jacoby (2002) determinaron si Qnr sería capaz de revertir la inhibición de la actividad de la girasa debido a acción de las FQs. Estos autores demostraron que Qnr protege a la ADN-girasa de *E. coli* de la inhibición por ciprofloxacina (Tran y Jacoby, 2002).

2. ANTECEDENTES

En el año 2001, Montero y colaboradores lograron identificar un gen, denominado *mfpA*, en *Mycobacterium smegmatis*, que al ser expresado en un plásmido multicopia, era capaz de incrementar de 2 a 8 veces los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para ciprofloxacina y esparfloxacina (Montero *et al.*, 2001). Para confirmar el efecto de MfpA en la resistencia a fluoroquinolonas en *M. smegmatis*, el gen *mfpA* fue inactivado, lo cual trajo como consecuencia que la cepa fuera hasta 4 veces más sensible a ciprofloxacina y esparfloxacina. Aunque el mecanismo de esta resistencia no estaba establecido para la fecha, se determinó que MfpA no era una bomba de eflujo ya que no tuvo efecto sobre la acumulación de ciprofloxacina marcada con C¹⁴ (Montero *et al.*, 2001).

En el año 2002, Tran y Jacoby clonaron el gen *qnrA* a partir del plásmido pMG252 de *E. coli* y lograron purificar y caracterizar la proteína perteneciente a la familia de los pentapéptidos repetidos. Dichos investigadores encontraron que QnrA posee 218 residuos de aminoácidos, y está constituida por 40 dominios de pentapéptidos que se repiten en tanda. Además, estos autores demostraron que Qnr protege a la ADN girasa de *E. coli* de la inhibición por ciprofloxacina (Tran y Jacoby, 2002). Trabajos posteriores sobre plásmidos que exhiben resistencia transferible a quinolonas llevaron al descubrimiento de cuatro proteínas similares, QnrS (Hata *et al.*, 2005), QnrB (Jacobby *et al.*, 2006), EfsQnr (Figura 6) (Arsene y Leclercq, 2007), QnrC (Wang *et al.*, 2009), y QnrD (Cavaco *et al.*, 2009).

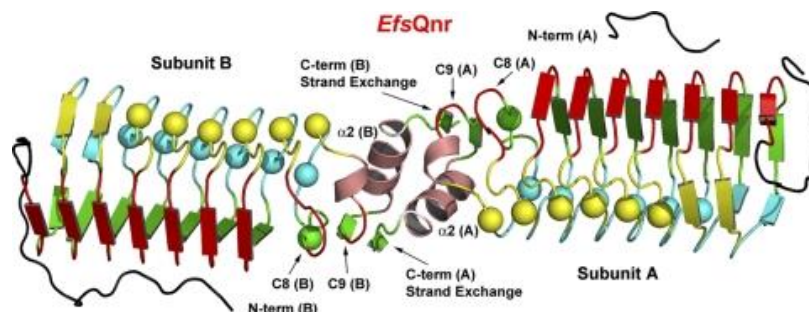


Figura 6: Diagrama de cinta del dímero *Efs Qnr* de *Enterococcus fecalis* (Tomado y modificado de Arsene y Leclercq, 2007).

Por otro lado, en el año 2005, Hedge y colaboradores identificaron un gen llamado *Rv3361* en *M. tuberculosis*, que codifica para una proteína de 183 aminoácidos, designada como MtMfpA. Esta proteína tiene un 67 % de identidad con la proteína MfpA de *M. smegmatis* y posee motivos de pentapéptidos repetidos. Estos investigadores sugieren que esta proteína podría competir con el ADN por la girasa, debido a que es una hélice con tamaño, forma y distribución de cargas que mimifica al ADN en forma B (Figura 7). La unión de MtMfpA a la ADN girada podría evitar la formación del complejo ADN-girasa lo que explicaría el fenotipo de resistencia a las fluoroquinolonas (Hegde *et al.*, 2005).

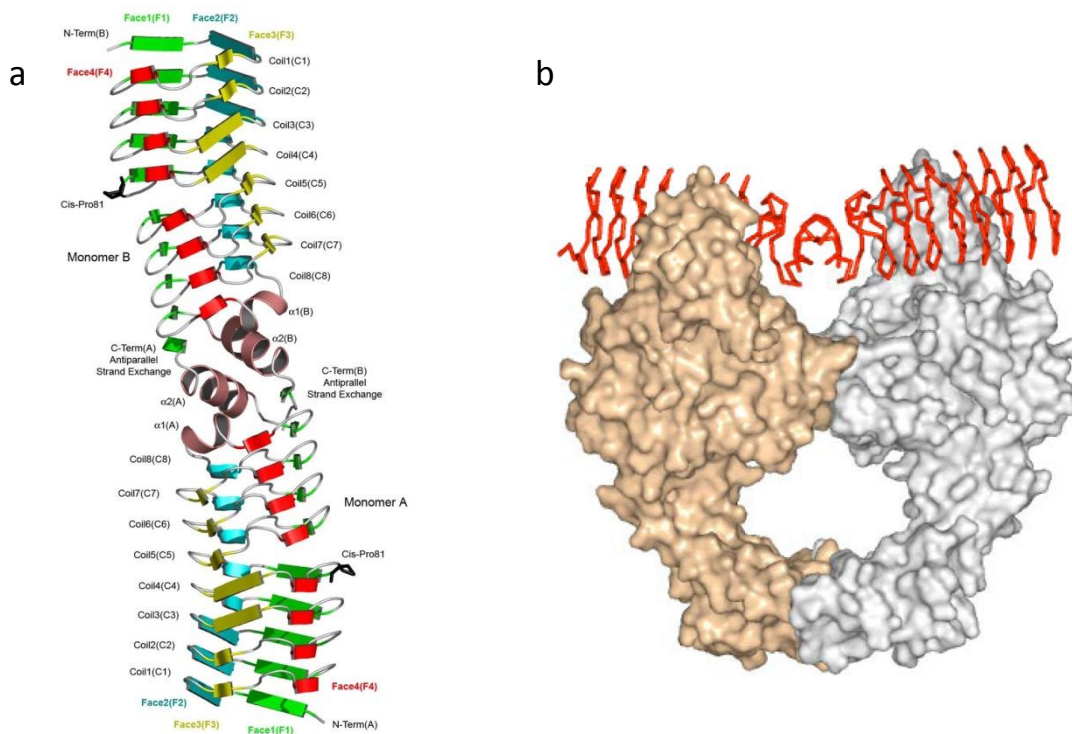


Figura 7: a) Diagrama de cinta del dímero MfpA de *M. tuberculosis*. b) Interacción entre MfpA y la ADN girasa (Tomado de Hegde *et al.*, 2005)

El año 2009, Merens y colaboradores compararon el efecto de MfpA_{Mt} sobre la girasa de *M. tuberculosis* y de QnrB4 sobre la girasa de *E. coli*. Estos investigadores reportaron que QnrB4 revierte el efecto inhibitorio de las fluoroquinolonas sobre la girasa de *E. coli* y que la unión de QnrB4 a dicha girasa, tiene un efecto protector sobre la inhibición de la ciprofloxacina. Sin embargo, reportan que MfpA_{Mt} tiene un efecto contrario por lo que proponen que esta proteína tiene un efecto inhibitorio sobre las actividades de superenrollamiento y relajación de la girasa de *M. tuberculosis* y no un efecto protector sobre la inhibición de la ciprofloxacina como lo observado con QnrB4 en *E. coli*. Este trabajo también indica que el mecanismo de estas proteínas puede ser girasa específico ya que QnrB4 protege a la girasa de *E. coli* del efecto inhibitorio de las fluoroquinolonas pero no protege a la girasa de *M. tuberculosis*. Estos autores también evaluaron el sitio de interacción entre MfpA_{Mt} y la girasa de *M. tuberculosis*. Para esto emplearon cepas con mutaciones en *gyrA* y encontraron que el residuo D87 de la girasa, es probablemente un residuo de gran importancia para que se de la interacción entre MfpA_{Mt} y la girasa (Merens *et al.*, 2009).

La caracterización molecular del gen *mfpA* en *Mycobacterium smegmatis* fue llevada a cabo por Falco en el año 2010. En este trabajo se demostró que el gen *mfpA* forma parte de la misma unidad transcripcional con los genes *mfpB*, *mfpC*, *mfpD*, *mfpE* y a su vez, que la expresión de los genes *mfpEA* ocurre lo largo del crecimiento micobacteriano. Además se logró determinar que hay una región que contiene los elementos promotores necesarios que podrían permitir la expresión de estos genes. Por otro lado, también se demostró que el aumento en la expresión de la proteína MfpA, aumenta los niveles de resistencia a fluoroquinolonas tanto en la cepa silvestre mc²155, como en las siguientes mutantes:

- mc²1255, cepa mutante que presenta el gen *mfpA* interrumpido por el gen *aph* (*mfpA* ::*aph*), que confiere resistencia a kanamicina.
- mc²155 *GMI*, cepa mutante que presenta una mutación en la región QRDR del gen *gyrA* (D94G), que codifica para la subunidad A de la girasa micobacteriana.
- mc²552, cepa mutante que presenta una mutación en la región QRDR del gen *gyrA* (D94G) y otra en el gen *lfrR*, que permite la expresión constitutiva del gen *lfrA* que codifica para una bomba de eflujo perteneciente a la Superfamilia de los MFS. Siendo éste el primer reporte que confirma una posible relación *in vivo*, entre la proteína MfpA y el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas en *M. smegmatis* (Falco., 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

Mycobacterium tuberculosis es el agente etiológico de la tuberculosis y puede causar tanto una infección aguda como una infección latente asintomática, que puede activarse principalmente bajo condiciones inmunosupresoras. La tuberculosis es una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo y aun cuando es una enfermedad antigua, continúa representando un problema de salud pública a nivel mundial (Parish *et al.*, 1998).

La tuberculosis ha sido una de las enfermedades más difíciles de erradicar debido principalmente al desarrollo y dispersión de cepas resistentes. La principal razón para la emergencia de cepas resistentes ha sido debido a varios factores que incluyen: incumplimiento del protocolo de tratamiento por parte del paciente, suministro de drogas de baja eficiencia e inadecuada supervisión por las autoridades de salud (Pyffer., 2001).

Muchos estudios en los últimos años han destacado la importancia del uso de las fluoroquinolonas en el tratamiento contra la tuberculosis (Nuermberger *et al.*, 2004; Pletz *et al.*, 2004). Sin embargo, el uso de éstos antibióticos ha traído como consecuencia la selección de mutantes resistentes. Hasta ahora, se han reportado tres mecanismos asociados a la resistencia fluoroquinolonas, dentro de los que destaca, la presencia de proteínas pentapéptidos repetidos.

Se ha reportado que en *M. smegmatis* hay una proteína perteneciente la familia de pentapéptidos repetidos, que es codificada por el gen *mfpA*, la cual se ha evidenciado está involucrada en la resistencia a fluoroquinolonas (Montero, 2001). Merens y colaboradores (2009) evaluaron mediante ensayos “*in vitro*” el efecto de MfpA de tuberculosis sobre la interacción del complejo girasa-ADN-fluoroquinolona obteniendo como resultado que MfpA no aumenta los niveles de resistencia a FQs en *M. tuberculosis* (Merens *et al.*, 2009).

Sin embargo, hay evidencia en *M. smegmatis* que indica que el aumento de la expresión de MfpA “*in vivo*” aumenta los niveles de resistencia a ciprofloxacina (Falco, 2010). Es por ello que en este trabajo se desea determinar si existe una interacción “*in vivo*” entre MfpA y la ADN girasa de *M. smegmatis* que traiga como consecuencia un aumento en los niveles de resistencia a FQs. De cumplirse esta hipótesis de trabajo, se apoyarían los resultados de Jacoby y colaboradores (2006) y los de Falco (2010), los cuales sugieren que la unión del pentapéptido repetido MfpA a la girasa tiene un efecto protector sobre la inhibición de la ciprofloxacina, lo que explicaría resistencia intrínseca de *M. smegmatis* y posiblemente de *M. tuberculosis* a estas drogas.

Considerando que la tuberculosis es una enfermedad de gran importancia ya que constituye un problema de salud pública a nivel mundial y que las fluoroquinolonas han tomado una gran relevancia y están siendo ampliamente empleadas como terapia en personas infectadas con MTB resistentes a múltiples drogas, es de gran importancia establecer el papel que desempeña la proteína MfpA en el desarrollo resistencia de estos antibióticos.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la posible relación entre la proteína MfpA de *Mycobacterium smegmatis* y la resistencia “*in vivo*” a ciprofloxacina.

Objetivos específicos:

- Seleccionar cepas de *M. smegmatis* mc²155 resistentes a diferentes concentraciones de ciprofloxacina.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de cada una de las cepas resistentes.
- Determinar la presencia de bombas de eflujo que expulsan activamente ciprofloxacina a través de ensayos de acumulación.
- Amplificar por PCR y secuenciar la región QRDR del gen *gyrA* de las cepas resistentes obtenidas.
- Seleccionar aquellas mutantes de *M. smegmatis* mc²155 resistentes a ciprofloxacina que tengan mutaciones en la región QRDR y no tengan bombas de eflujo que expulsan activamente ciprofloxacina.
- Electroporar un vector de expresión que contiene clonado el gen *mfpA* en las diferentes cepas de *M. smegmatis* mc²155 seleccionadas.
- Determinar si el incremento de la expresión del gen *mfpA* aumenta los niveles de resistencia a ciprofloxacina en cepas mutantes para el gen *gyrA* de *M. smegmatis* mc²155.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas:

- *M. smegmatis* mc²155: Para llevar a cabo este trabajo, se seleccionó como material biológico a *M. smegmatis* mc²155, debido a que existe evidencia que sugiere que hay un porcentaje elevado de identidad (67%) entre MfpA de *M. tuberculosis* y MfpA de *M. smegmatis*. Además, *M. smegmatis* es un modelo atractivo de estudio debido a que su tasa de crecimiento es 10 veces más rápida (3-4 horas) en comparación con micobacterias de crecimiento lento como *M. tuberculosis* (24 horas). A diferencia de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* es una bacteria no patógena lo que permite que pueda ser empleada de manera segura en condiciones estándar de laboratorio. Esta cepa es transformada con ADN foráneo con alta tasa de eficiencia y es muy útil para la sobreexpresión de genes de *M. leprae* y *M. tuberculosis* lo que la convierte en una herramienta valiosa para la investigación en micobacterias (Gupta y Chatterji, 2005).
- *M. smegmatis* mc²1255: Cepa mutante de *M. smegmatis* derivada de mc²155. Dicha cepa presenta el gen *mfpA* interrumpido por el gen *aph* (*mfpA::aph*) que confiere resistencia a kanamicina. Esta cepa fue obtenida en el laboratorio de Genética Molecular, CBCM-IVIC por Montero y col., 2001.
- *M. smegmatis* mc² 552: Cepa mutante de *M. smegmatis* derivada de mc²155. Esta cepa presenta una mutación en la región QRDR del gen *gyrA* (D94G) y otra en el gen *lfrR*, que permite la expresión constitutiva del gen *lfrA* que codifica para la bomba de eflujo perteneciente a la Superfamilia de los MFS (Mayor Facilitator

Superfamily). Esta cepa fue obtenida en el laboratorio de Genética Molecular, CBCM-IVIC por Takiff, 1996.

- *M. smegmatis* mc²155 GM1: Cepa mutante de *M. smegmatis* derivada de mc²155. Esta cepa presenta una mutación en la región QRDR del gen *gyrA* (D94G). Dicha cepa fue aislada en el Laboratorio de Genética Molecular, CBCM-IVIC.
- *M. smegmatis* mc²155 62: Cepa mutante de *M. smegmatis* derivada de mc²155 que presenta una mutación en el codón 91 de la región QRDR del gen *gyrA* (A91V). Esta cepa fue obtenida en este trabajo.
- *E. coli* K12: esta cepa se caracteriza por no poseer el gen *dam*, que codifica para una enzima que expresa actividad metilasa. Esta cepa es apta para la transformación y permiten el clonamiento de diferentes construcciones plasmídicas.

5.2 Plásmidos:

- pALACE: Vector de sobreexpresión (8221 pb) con un promotor fuerte (P_{ace}) y cuyo inductor es la acetamida, tiene un origen de replicación para *E. coli* (*oriE*) y para micobacterias (*oriM* AL5000). Confiere resistencia a higromicina (Figura 8).

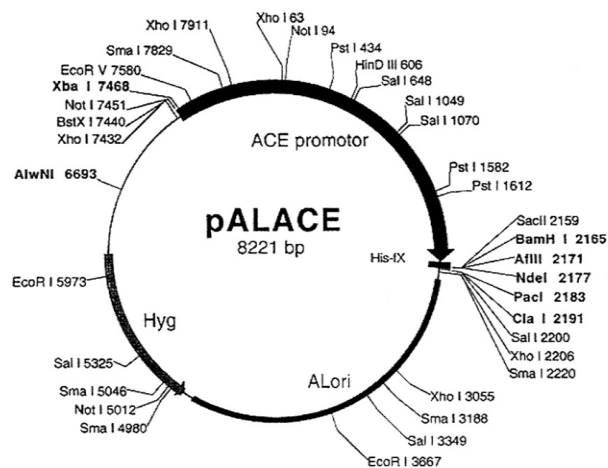


Figura 8: Mapa del vector pALACE mostrando el origen de replicación para micobacterias (*ALori*), el marcador de selección (*Hyg*) y la región promotora

inducida por acetamida (ACE promotor) ubicada hacia el extremo 5' del sitio de múltiple clonamiento (tomado de Lakshminarayan y col., 2008).

- pALACE-*mfpA*: Vector de sobreexpresión (pALACE) el cual tiene clonado el gen *mfpA* (Falco, 2010).

5.3 Medios de cultivo:

- Medios para cultivar *M. smegmatis*:

Para llevar a cabo los experimentos se utilizó el medio líquido Middlebrook 7H9 y el medio sólido Middlebrook 7H10. Ambos fueron suplementados con OAD (Oleico-Albúmina-Dextrosa) (10%). Los medios fueron autoclavados a 15 lb, 121°C durante 15 minutos.

- Medios para cultivar *E. coli*:

Las células bacterianas se crecieron en caldo Luria-Bertani (LB) o en medio sólido LB. Los medios fueron autoclavados a 15 lb, 121°C durante 15 minutos.

5.4 Selección de cepas de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 resistentes a ciprofloxacina:

Se realizó un preinóculo a partir de una colonia de *M. smegmatis* mc²155. Se tomó una alícuota de este preinóculo y se inoculó en 5 ml de medio líquido 7H9 suplementado. Éste se incubó con agitación constante a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 1 (1x10⁸ cel/ml). Una vez que el cultivo alcanzó dicha DO, se tomaron 100 ul y se sembraron con un rastrillo en placas de agar 7H10 suplementadas con ciprofloxacina a distintas concentraciones (0,125 ug/ml; 0,25 ug/ml; 0,5 ug/ml; 1 ug/ml; 2 ug/ml; 4 ug/ml; 8 ug/ml), además de una placa control sin el antibiótico.

Por otra parte, partiendo del inóculo a $DO_{600nm} = 1$ (1×10^8 cel/ml) se hicieron diluciones seriadas (desde 10^{-1} hasta 10^{-7}) y se sembraron por rastrilleo 100ul de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} en placas de agar 7H10, con el fin de calcular el título del cultivo.

Las placas fueron colocadas en incubación a $37^{\circ}C$ durante 3 días.

5.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI de ciprofloxacina en cepas mutantes de *M. smegmatis* mc²155:

Para determinar la CMI de ciprofloxacina de las cepas mutantes de *M. smegmatis* mc²155 seleccionadas previamente se utilizaron placas de 7H10 suplementadas con ciprofloxacina a concentraciones de: 0,5 ug/ml; 1 ug/ml; 2 ug/ml; 4ug/ml; 8 ug/ml, además de la placa control sin el antibiótico. Las placas se incubaron a $37^{\circ}C$ durante 3 días.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se observó hasta que concentración del antibiótico dejó de crecer cada una de las cepas mutantes, siendo esta concentración la CMI de dicha cepa. Este experimento se realizó por triplicado.

5.6 Ensayos de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido:

Se prepararon preinóculos de las cepas de interés, a partir de ellos se hicieron cultivos de dichas cepas en un volumen de 100 ml de medio líquido 7H9 y fueron incubados a $37^{\circ}C$, con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 1 (1×10^8 cel/ml). A partir de allí, se centrifugaron a 2509 g durante 20 min a $4^{\circ}C$. El sedimento se resuspendió en buffer fosfato de sodio (50 mM) y se centrifugó bajo las mismas condiciones.

Las células se resuspendieron en 5 ml de buffer fosfato de sodio y se incubaron a $37^{\circ}C$ con agitación durante 10 min. Se tomó una alícuota de 500 ul de la suspensión para el control negativo de la fluorescencia. A los 4,5 ml restantes del cultivo se le agregó ciprofloxacina a una concentración final de 10 ug/ml. La suspensión se colocó a $37^{\circ}C$ con agitación constante y se tomaron alícuotas de 500 ul del cultivo a intervalos de tiempo apropiados (0,

2, 5, 10 y 15 minutos). Una vez tomada la muestra, se debe mantener a 4°C. Las alícuotas se centrifugaron a 3920 g durante 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de buffer fosfato de sodio. Luego se centrifugó nuevamente a 3920 g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células fueron lisadas al resuspender el sedimento en 1 ml de buffer glicina/HCl (0,1M pH 3), dejando esta mezcla toda la noche a 37°C con agitación constante. Las muestras se centrifugaron a 26499 g durante 5 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a tubos de microcentrifuga. La fluorescencia de los sobrenadantes fue medida en un fluorímetro (SpectraMax GeminiXS, Molecular Divices) a 279 nm de excitación y 447 nm de emisión. Estos ensayos se hicieron por triplicado.

5.7 Preparación de lisado celular de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 para realizar PCR:

Con el fin de obtener ADN genómico de las cepas resistentes a ciprofloxacina, las células fueron crecidas en medio líquido 7H9 durante tres días con agitación constante a 37°C. Una vez transcurrido los 3 días de incubación, se tomaron 200 ul del cultivo y se centrifugaron a 2509 g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 ul de H₂O estéril. Luego se colocó en ebullición durante 10 minutos en baño de María para luego ser centrifugado a 35280 g durante 1 minuto. Por último, el sobrenadante se trasvasó a otro tubo debidamente rotulado y se guardó a una temperatura de -20°C.

5.8 Amplificación del gen *gyrA* de cepas mutantes de *M. smegmatis* mc²155:

La amplificación de la región QRDR del gen *gyrA* de las cepas mutantes de *M. smegmatis* mc²155 se realizó a través de la técnica PCR. Para esto se utilizaron los iniciadores GyrA3: 5'AGCTACATCGACTACGCCATGAG 3' y GyrA4: 5' TCGCGCTTGGGTGTAACGC 3'.

La polimerasa utilizada en la reacción de PCR fue la *Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs). Se hizo una mezcla con los reactivos de PCR de acuerdo a la tabla I.

Tabla I: Concentraciones y volúmenes necesarios de los reactivos para PCR.

Reactivos	[] final
Buffer	1X
dNTPs	200 uM
Iniciador GyrA 3	2 uM
Iniciador GyrA 4	2 uM
Taq polimerasa	0,025 U/ µl
DMSO	2,5 µl
Agua	Completar hasta alcanzar el volumen adecuado.

A un volumen final de 25 µl se le agregaron 5 µl del lisado de ADN de *M. smegmatis* mc²155 y a la alícuota correspondiente al control negativo se le agregaron 5 µl de agua. Se colocaron los tubos en un termociclador (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler), el cual fue programado con las condiciones que se indican en la tabla II.

Tabla II: Condiciones de temperatura a las que se ajustó el termociclador para realizar el PCR.

T	Temperatura	Tiempo	Función
T1	95°C	30s	Calentamiento
T2	95°C	30s	Desnaturalización
T3	61,5°C	1 min.	Hibridación

T4	68°C	1 min.	Extensión
T5	68°C	5 min.	Extensión final

T2, T3 y T4 corresponden a un ciclo. El termociclador será programado para un total de 30 ciclos.

5.9 Purificación de productos de PCR y aislamiento de ADN plasmídico:

Para la purificación de productos de PCR se empleó el estuche de la casa comercial Qiagen Sciences USA: QIAquick PCR Purification Kit. En el caso del aislamiento de ADN plasmídico se empleó el estuche QIAprep Spin Miniprep Kit. Los estuches comerciales se emplearon siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

5.10 Secuenciación del ADN:

La secuencia de los productos de PCR fue realizado por la compañía MACROGEN-Korea, utilizando un secuenciador AB3730XL (<http://www.macrogen.com>).

5.11 Análisis de secuencia de nucleótidos:

Se empleó el algoritmo BLAST (***B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool*) del portal “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), vía internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), con el fin de buscar homología con secuencias nucleotídicas reportadas en la base de datos GenBank. Para llevar a cabo los alineamientos de secuencias, se empleará el programa “MultAlign”, consultándolo vía internet (<http://multain.toulouse.inra.fr/multain/multain.html>).

5.12 Transformación en *E. coli*:

- Preparación de células competentes:

- Para la preparación de células competentes, se inoculó una colonia aislada de *E. coli* K12 en 2 ml de medio líquido LB suplementado con estreptomicina (25 µg/ml) en un tubo de ensayo estéril. Esto se incubó a 37 °C con agitación constante durante toda la noche y al día siguiente se le agregaron 8 ml de medio LB suplementado con estreptomicina (25 µg/ml) dejándose incubar dicho cultivo a 37 °C durante una hora. Se transfirió el cultivo a un tubo estéril de 15 ml y se centrifugó durante 10 minutos a 2509 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 2 ml de solución salina (0,85 %) para luego completar a un volumen 10 ml. Se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 10 ml de CaCl₂ (50 mM). Se incubó durante 1 hora en hielo, luego se centrifugó a 2509 g a 4°C durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de CaCl₂ 50 mM y se guardó a 4 °C.
- Transformación:
Para la transformación se tomaron 200 µl de las células competentes y se mezclaron con 2 µl de ADN plasmídico (pALACE ó pALACE-*mfpA*) y se dejó incubando 10 minutos en hielo. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla se incubó 45 segundos en baño de María a 42 °C para luego colocar las muestras en hielo durante 2 minutos. Después se agregó 1 ml de caldo LB y se incubó durante una hora a 37 °C. Por último se tomaron 50 µl del cultivo y se sembraron en placas de LB suplementadas con higromicina (50 µl). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 18 horas.

5.13 Transformación de *M. smegmatis* mediante electroporación:

Se prepararon preinóculos de las cepas de interés y a partir de ellos se hicieron cultivos de dichas cepas en un volumen de 50 ml de medio líquido 7H9 suplementado con OAD. Estos cultivos fueron incubados a 37°C, con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,7. Luego los cultivos fueron centrifugados a 2280 g durante 15 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se lavó con 40 ml glicerol (10%). Después, se repitió el paso anterior y luego las células se resuspendieron en 5 ml de glicerol frío (10%). Se tomaron 400 ul de esta suspensión para agregarlos en una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad, Richmond, USA), previamente enfriada en hielo. Se añadió una alícuota de ADN en la cubeta y se incubó la mezcla en hielo durante 10 minutos. Para llevar a cabo la electroporación se utilizó el equipo Gene Pulser de Bio-Rad (modelo 1652098), empleando las siguientes condiciones: 2,5 kV de voltaje, 1000 Ω de resistencia y 25 uF de capacitancia. Después el pulso eléctrico, las células se transfirieron a tubos estériles de 50 ml con 5ml de 7H9.OAD, se incubaron a 37 °C durante 3 horas y se sembraron 100 ul del cultivo por rastrilleo en placas de 7H9 suplementadas con higromicina (50 ug/ml). Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C durante 3 días.

5.14 Ensayos de sobreexpresión de la proteína MfpA:

La estrategia consistió en aumentar la expresión del gen *mfpA*, el cual fue clonado en un vector llamado pALACE (Falco, 2010). Este vector contiene un promotor fuerte cuya expresión es inducida por acetamida (Lakashminarayan *et al.*, 2008).

Para realizar el ensayo se partió de un preinóculo de cada una de las cepas de interés, los cuales se mantuvieron en incubación a 37°C con agitación constante durante 3 días en medio 7H9 suplementado con higromicina (50 ug/ml). Una vez transcurrido este tiempo, se

inoculó 1 ml del preinóculo en 100 ml de medio líquido 7H9 suplementado con glucosa (1%) y se dejó en incubación a 37°C con agitación constante durante toda la noche. El exceso de fuente de carbono fue removido centrifugando los cultivos a 1000 g durante 15 minutos, para luego resuspender el sedimento celular en medio líquido 7H9 hasta ajustarlos a una DO_{600nm} de 1 (1×10^8 cel/ml). Luego el cultivo celular fue dividido en 2, a uno de ellos se les agregó la acetamida a una concentración final de 0,02%, mientras que el otro cultivo se tomó como control bajo condiciones de no inducción. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante la noche. Una vez transcurrido este tiempo, los cultivos con y sin acetamida fueron diluidos 10^{-4} y 10^{-5} y se sembraron 20 ul de cada uno de ellos en placas de agar 7H10 suplementados con higromicina (50 ug/ml) y diferentes concentraciones de ciprofloxacina (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; y 64 ug/ml) en presencia o ausencia de acetamida (0,02%). Adicionalmente, los mismos cultivos fueron diluidos hasta 10^{-7} para realizar la titulación de cada una de las cepas de interés. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 8 días (Lakshminarayan *et al.*, 2008).

6. RESULTADOS

Para llevar a cabo este trabajo se seleccionaron cepas de *M. smegmatis* mc²155 resistentes a ciprofloxacina a las cuales se les determinó la concentración mínima inhibitoria. Luego, se descartó que la resistencia en dichas cepas estuviese mediada por bombas de eflujo ya que lo que se quería evaluar era el aumento de la resistencia al antibiótico por la sobreexpresión de *mfpA* y no por la presencia de otro mecanismo de resistencia o la combinación de varios mecanismos. Para lograr esto, se realizaron ensayos de acumulación de ciprofloxacina. Una vez seleccionadas las cepas de interés, se procedió a amplificar y secuenciar la región QRDR del gen *mfpA* de dichas cepas con la finalidad de determinar en qué codón de dicha región se encuentra la mutación. Luego se procedió a electroporar en las cepas mutantes de *M. smegmatis* mc²155 un vector inducible por acetamida, el cual porta el gen *mfpA* lo que permitió sobreexpresar a MfpA.

6.1 Ensayos de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido:

Se seleccionaron un total de 180 cepas mutantes de *M. smegmatis* mc²155 resistentes a ciprofloxacina. A dichas cepas se les calculó la concentración mínima inhibitoria para ciprofloxacina (ver anexos). Tomando en cuenta los valores de CMI obtenidos, se seleccionaron 52 cepas a las cuales se le realizaron ensayos de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido con el fin de determinar la presencia de bombas de eflujo en dichas cepas mutantes. En estos ensayos se utilizó la cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 como control positivo ya que los niveles de expresión del gen *lfrA*, que codifica para una bomba de eflujo, le permiten tener un bajo nivel de acumulación de ciprofloxacina. Como control negativo se utilizó una cepa silvestre de *M. smegmatis* mc²155 debido que

posee un alto nivel de acumulación de ciprofloxacina.

Para interpretar los datos obtenidos en estos ensayos se hizo una comparación entre los valores de acumulación de ciprofloxacina expresados por las cepas mutantes y los valores de acumulación de dicho antibiótico que presentaron las cepas control. Aquellas cepas con valores de acumulación cercanos a los expresados por la cepa *M. smegmatis* mc² 552 se consideraron como cepas con bajo nivel de acumulación de ciprofloxacina mientras que las cepas que expresaron valores de acumulación de ciprofloxacina cercanos a la cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 fueron consideradas como cepas con alto nivel de acumulación. Estos ensayos fueron realizados por triplicado a las 52 cepas mutantes (ver anexos) a partir de las cuales se seleccionaron 10 cepas para los ensayos posteriores tomando en cuenta su alto nivel de acumulación de ciprofloxacina y su CMI (Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, y 18).

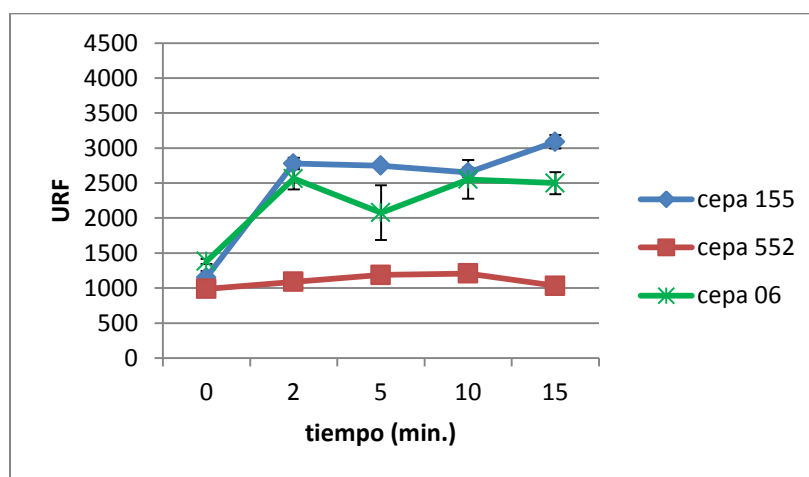


Figura 9: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 06 (cepa 06). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552). En esta figura se observa que la cepa 06 tiene un nivel de acumulación de ciprofloxacina significativamente alto, por encima del valor expresado por el control positivo lo que indica que la resistencia a ciprofloxacina expresada por dicha cepa no se debe a la sobreexpresión de una bomba de eflujo.

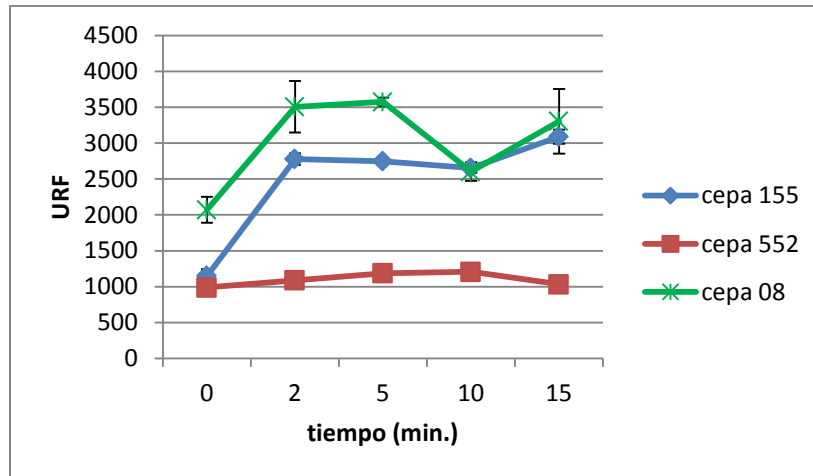


Figura 10: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 08 (cepa 08). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552). En esta figura se observa que la cepa 08 tiene un nivel de acumulación de ciprofloxacina significativamente alto, por encima del valor expresado por el control positivo lo que indica que la resistencia a ciprofloxacina expresada por dicha cepa no se debe a la sobreexpresión de una bomba de eflujo.

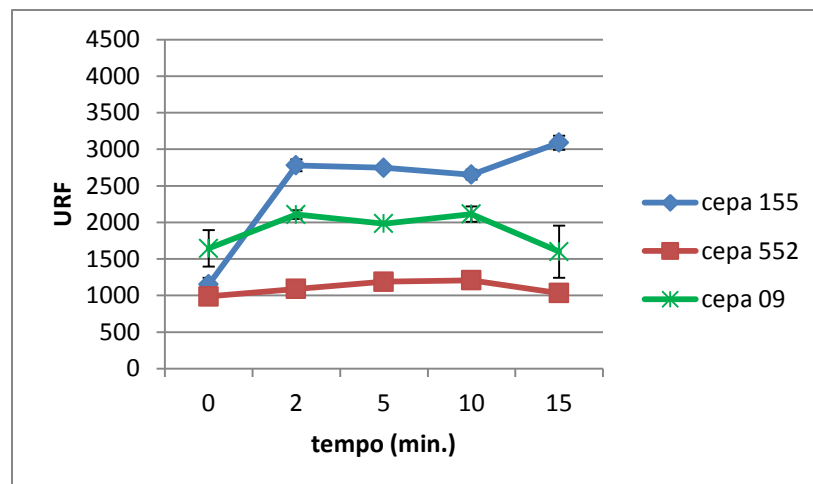


Figura 11: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 09 (cepa 09). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552). En esta figura se observa que la cepa 09 tiene un nivel de acumulación de ciprofloxacina significativamente alto, por encima del valor expresado por el control positivo lo que indica que la resistencia a ciprofloxacina expresada por dicha cepa no se debe a la sobreexpresión de una bomba de eflujo.

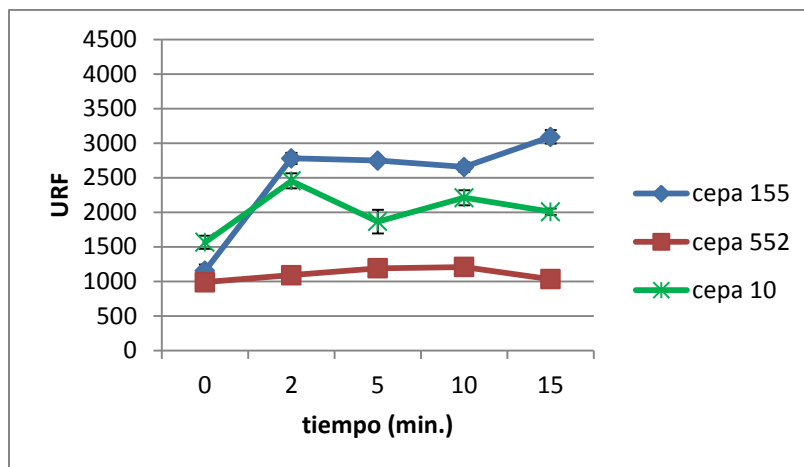


Figura 12: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 10 (cepa 10). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552). En esta figura se observa que la cepa 10 tiene un nivel de acumulación de ciprofloxacina significativamente alto, por encima del valor expresado por el control positivo lo que indica que la resistencia a ciprofloxacina expresada por dicha cepa no se debe a la sobreexpresión de una bomba de eflujo.

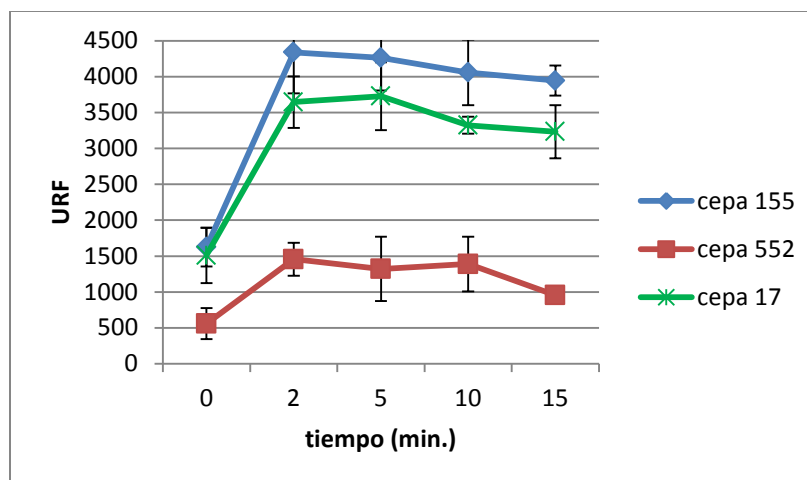


Figura 12: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 17 (cepa 17). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552). En esta figura se observa que la cepa 17 tiene un nivel de acumulación de ciprofloxacina significativamente alto, por encima del valor expresado por el control positivo lo que indica que la resistencia a ciprofloxacina expresada por dicha cepa no se debe a la sobreexpresión de una bomba de eflujo.

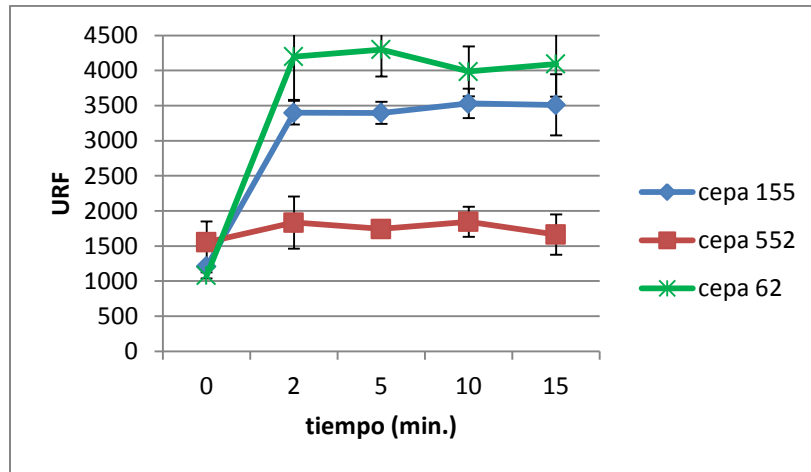


Figura 14: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 62 (cepa 62). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552). En esta figura se observa que la cepa 62 tiene un nivel de acumulación de ciprofloxacina significativamente alto, por encima del valor expresado por el control positivo lo que indica que la resistencia a ciprofloxacina expresada por dicha cepa no se debe a la sobreexpresión de una bomba de eflujo.

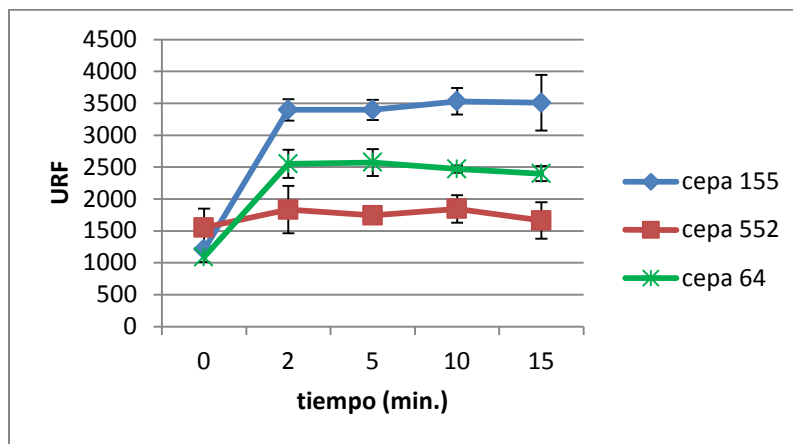


Figura 15: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 64 (cepa 64). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552). En esta figura se observa que la cepa 64 tiene un nivel de acumulación de ciprofloxacina significativamente alto, por encima del valor expresado por el control positivo lo que indica que la resistencia a ciprofloxacina expresada por dicha cepa no se debe a la sobreexpresión de una bomba de eflujo.

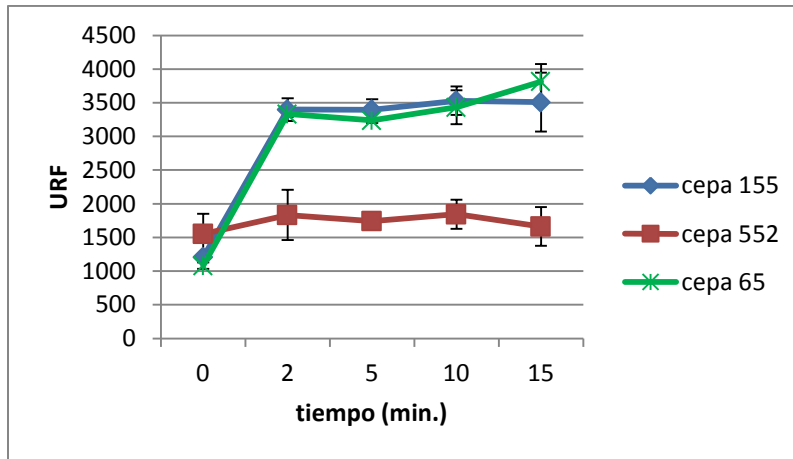


Figura 16: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 65 (cepa 65). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552). En esta figura se observa que la cepa 65 tiene un nivel de acumulación de ciprofloxacina significativamente alto, por encima del valor expresado por el control positivo lo que indica que la resistencia a ciprofloxacina expresada por dicha cepa no se debe a la sobreexpresión de una bomba de eflujo.

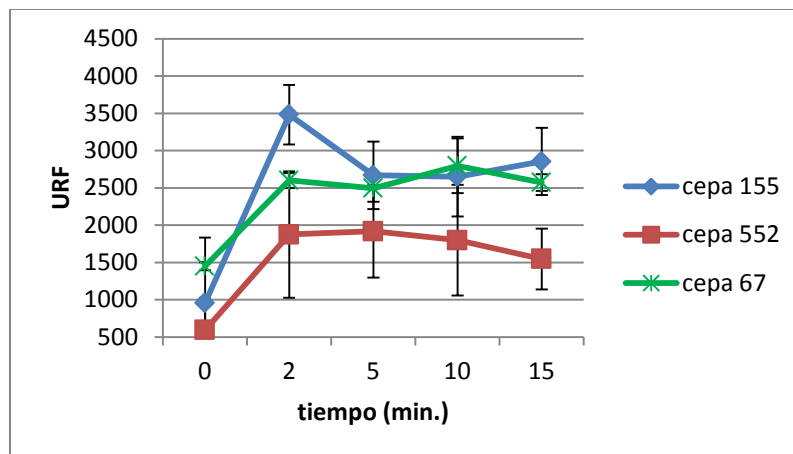


Figura 17: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 67 (cepa 67). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552). En esta figura se observa que la cepa 67 tiene un nivel de acumulación de ciprofloxacina significativamente alto, por encima del valor expresado por el control positivo lo que indica que la resistencia a ciprofloxacina expresada por dicha cepa no se debe a la sobreexpresión de una bomba de eflujo.

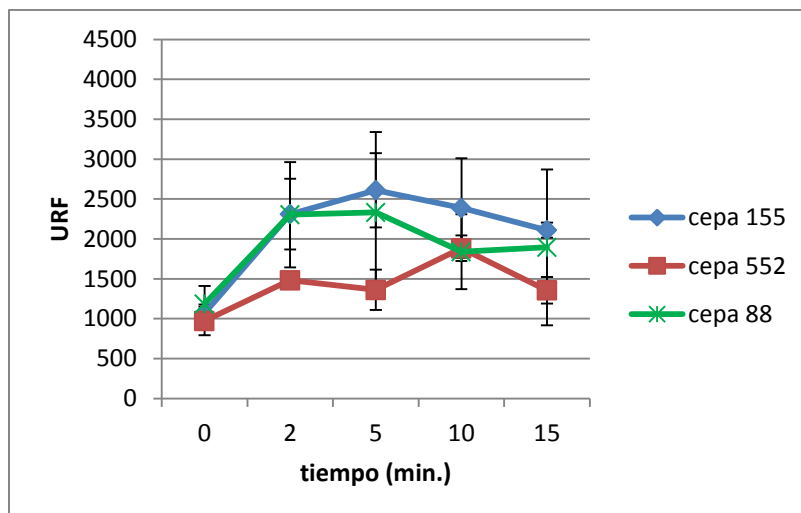


Figura 18: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de la cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 88 (cepa 88). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552). En esta figura se observa que la cepa 88 tiene un nivel de acumulación de ciprofloxacina significativamente alto, por encima del valor expresado por el control positivo lo que indica que la resistencia a ciprofloxacina expresada por dicha cepa no se debe a la sobreexpresión de una bomba de eflujo.

6.2 Amplificación por PCR y secuenciación la región QRDR del gen *gyrA* de cepas resistentes.

Una vez realizados los ensayos de acumulación, se amplificó por PCR la región QRDR del gen *gyrA* de aquellas cepas que expresaron un alto nivel de acumulación de ciprofloxacina (Figura 19). Éstos fueron secuenciados (Figura 20) con el fin de determinar cuáles de las cepas tenían mutaciones en QRDR y en que codón de dicha región se encontraba la mutación.

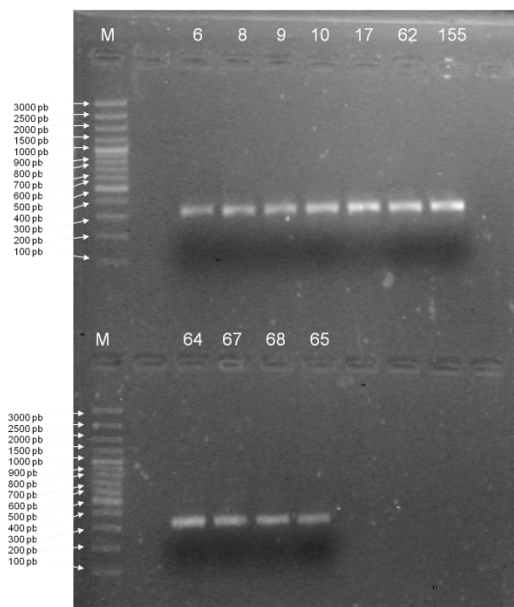


Figura 19: Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación por PCR del gen *gyrA* de cepas mutantes de *M. smegmatis* mc²155. (M) marcador de peso molecular 100 pb ladder (NE Biolabs); (6) cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 06; (8) cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 08; (9) cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 09; (10) cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 10; (17) cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 17; (62) cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 62; (64) cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 64; (67) cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 67; (88) cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 88; (65) cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 65; (155) cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (control positivo). En todos los amplificados se observa la banda de 321 pb correspondiente a la región QRDR del gen *gyrA*.

En la Figura 20 se muestra en análisis de las secuencias correspondientes a la región QRDR del gen *gyrA* obtenidas empleando el iniciador GyrA3. El análisis de las secuencias arrojó como resultado la presencia de una mutación en la región QRDR de *gyrA* de la cepa mc²155 62 (QRDR_mc2_155_62) la cual consiste en la sustitución de una Citosina por una Timina, lo que implica el cambio de un residuo de alanina por una valina en la posición 91 de la girasa de *M. smegmatis* (A91V).

QRDR_mc2_155_WT	GTGCTGTACGCGATGTACGACTCGGGCTTCCGTCCGGATCGCAGCCACGCCAAATCCGCG
QRDR_mc2_155_10	GTGCTGTACGCGATGTACGACTCGGGCTTCCGTCCGGATCGCAGCCACGCCAAATCCGCG
QRDR_mc2_155_09	GTGCTGTACGCGATGTACGACTCGGGCTTCCGTCCGGATCGCAGCCACGCCAAATCCGCG
QRDR_mc2_155_67	GTGCTGTACGCGATGTACGACTCGGGCTTCCGTCCGGATCGCAGCCACGCCAAATCCGCG
QRDR_mc2_155_88	GTGCTGTACGCGATGTACGACTCGGGCTTCCGTCCGGATCGCAGCCACGCCAAATCCGCG
QRDR_mc2_155_64	GTGCTGTACGCGATGTACGACTCGGGCTTCCGTCCGGATCGCAGCCACGCCAAATCCGCG
QRDR_mc2_155_62	GTGCTGTACGCGATGTACGACTCGGGCTTCCGTCCGGATCGCAGCCACGCCAAATCCGCG
QRDR_mc2_155_08	GTGCTGTACGCGATGTACGACTCGGGCTTCCGTCCGGATCGCAGCCACGCCAAATCCGCG
QRDR_mc2_155_17	GTGCTGTACGCGATGTACGACTCGGGCTTCCGTCCGGATCGCAGCCACGCCAAATCCGCG

QRDR_mc2_155_WT	CGCTCCGTTGCCGAGACGATGGGTAACCTACCATCCGCACGGCGACGCCCTCGATCTACGAC
QRDR_mc2_155_10	CGCTCCGTTGCCGAGACGATGGGTAACCTACCATCCGCACGGCGACGCCCTCGATCTACGAC
QRDR_mc2_155_09	CGCTCCGTTGCCGAGACGATGGGTAACCTACCATCCGCACGGCGACGCCCTCGATCTACGAC
QRDR_mc2_155_67	CGCTCCGTTGCCGAGACGATGGGTAACCTACCATCCGCACGGCGACGCCCTCGATCTACGAC
QRDR_mc2_155_88	CGCTCCGTTGCCGAGACGATGGGTAACCTACCATCCGCACGGCGACGCCCTCGATCTACGAC
QRDR_mc2_155_64	CGCTCCGTTGCCGAGACGATGGGTAACCTACCATCCGCACGGCGACGCCCTCGATCTACGAC
QRDR_mc2_155_62	CGCTCCGTTGCCGAGACGATGGGTAACCTACCATCCGCACGGCGACGCCCTCGATCTACGAC
QRDR_mc2_155_08	CGCTCCGTTGCCGAGACGATGGGTAACCTACCATCCGCACGGCGACGCCCTCGATCTACGAC
QRDR_mc2_155_17	CGCTCCGTTGCCGAGACGATGGGTAACCTACCATCCGCACGGCGACGCCCTCGATCTACGAC

QRDR_mc2_155_WT	ACCCTGGTCCGCATGGCCCAGCCGTGGTCGTTGCGCTACCCGCTGGTGGACGGCCAGGGC
QRDR_mc2_155_10	ACCCTGGTCCGCATGGCCCAGCCGTGGTCGTTGCGCTACCCGCTGGTGGACGGCCAGGGC
QRDR_mc2_155_09	ACCCTGGTCCGCATGGCCCAGCCGTGGTCGTTGCGCTACCCGCTGGTGGACGGCCAGGGC
QRDR_mc2_155_67	ACCCTGGTCCGCATGGCCCAGCCGTGGTCGTTGCGCTACCCGCTGGTGGACGGCCAGGGC
QRDR_mc2_155_88	ACCCTGGTCCGCATGGCCCAGCCGTGGTCGTTGCGCTACCCGCTGGTGGACGGCCAGGGC
QRDR_mc2_155_64	ACCCTGGTCCGCATGGCCCAGCCGTGGTCGTTGCGCTACCCGCTGGTGGACGGCCAGGGC
QRDR_mc2_155_62	ACCCTGGTCCGCATGGCCCAGCCGTGGTCGTTGCGCTACCCGCTGGTGGACGGCCAGGGC
QRDR_mc2_155_08	ACCCTGGTCCGCATGGCCCAGCCGTGGTCGTTGCGCTACCCGCTGGTGGACGGCCAGGGC
QRDR_mc2_155_17	ACCCTGGTCCGCATG-----

Figura 20: Análisis de secuencias de la región QRDR del gen *gyrA* tanto de la cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (QRDR_mc2_155_WT) como de las cepas mutantes seleccionadas en este trabajo. Cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 10 (QRDR_mc2_155_10); cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 09 (QRDR_mc2_155_09); cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 67 (QRDR_mc2_155_67); cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 88 (QRDR_mc2_155_88); cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 64 (QRDR_mc2_155_64); cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 62 (QRDR_mc2_155_62); cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 08 (QRDR_mc2_155_08); cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 17 (QRDR_mc2_155_17). En color verde se representa la región QRDR del gen *gyrA* de la cepa mutante *M. smegmatis* mc²155 62 (QRDR_mc2_155_62). En color rojo se resalta la sustitución de una Citosina por una Timina en el codón 91(subrayado).

6.3 Ensayos de sobreexpresión de la proteína MfpA:

La estrategia consistió en aumentar la expresión del gen *mfpA*, el cual fue clonado en un vector llamado pALACE (en lo sucesivo denotado como pALACE-*mfpA*) (Falco, 2010). Este vector contiene un promotor fuerte cuya expresión es inducida por acetamida

(Lakashminarayan *et al.*, 2008). Dicho plásmido fue electroporado en una cepa de *E. coli* K12. Seguido de esto, se aisló el ADN plasmídico de las cepas transformantes obtenidas y se procedió a amplificar por PCR el gen *mfpA* (612 pb) empleando los iniciadores *mfpA* 16 y 17) (Figura 21).

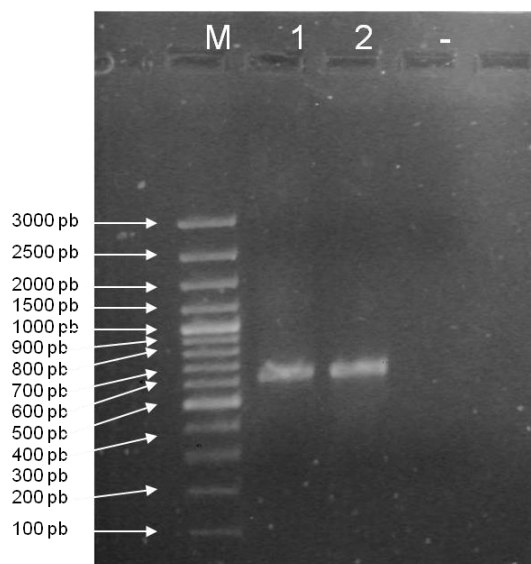


Figura 21: Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación por PCR del gen *mfpA* clonado en el vector de sobreexpresión pALACE. (M) marcador de peso molecular 100 pb ladder (NE Biolabs); (1 y 2) amplificados de *mfpA*; (-) control de reactivos de PCR. En los amplificados se observa claramente la banda de 612 pb correspondiente al gen *mfpA*.

Una vez realizada la verificación por PCR de pALACE-*mfpA*, se procedió a electroporar dicho plásmido en 5 cepas diferentes de *M. smegmatis*: mc² 155, mc² 552, mc²1255, mc² 155 GM1 y mc² 1255 descritas anteriormente (página 24) además de la cepa mc² 155 62, cepa mutante que presenta una mutación en la región QRDR del gen *gyrA* (A91V) y que fue obtenida en este trabajo.

Una vez obtenidas las transformantes de cada una de las cepas, se realizaron los ensayos de sobreexpresión con acetamida (0,02 %) por triplicado, empleando como controles negativos

a estas mismas cepas electroporadas con el plásmido pALACE (Figura 22) y como control positivo una cepa silvestre mc² 155 electroporada con el plásmido pGADIV, que posee un fragmento de ADN que incluye a los genes *mfpC*, *mfpB* y *mfpA* (Montero y col., 2001).

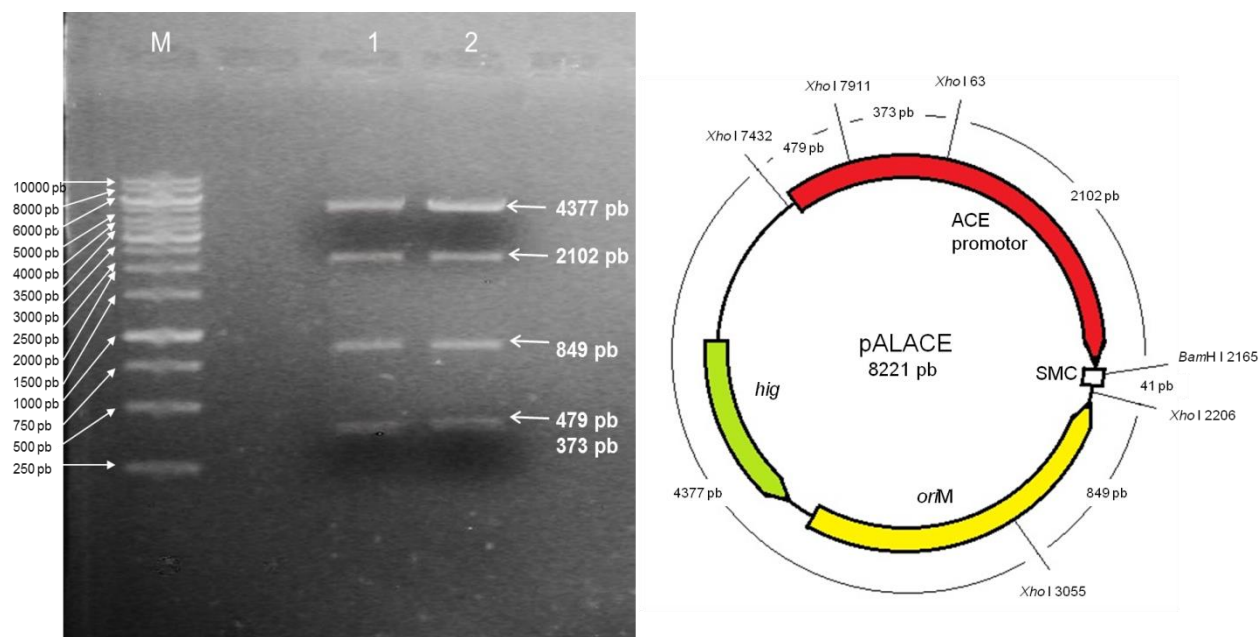


Figura 22: a) Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % del vector de sobreexpresión pALACE digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xho*I. (M) marcador de peso molecular 1kb ladder (NE Biolabs). (1 y 2) pALACE digerido con *Bam*HI y *Xho*I. Es esta figura se observa el patrón de bandas generado por las enzimas de restricción utilizadas. b) Representación esquemática del plásmido pALACE indicando los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla III. En la columna señalada con el numero 1, se destacan los valores correspondientes a las concentraciones mínimas inhibitorias para ciprofloxacina de cada una de las cepas utilizadas, mientras que la columna señalada con el numero 2 corresponde a las CMI para las cepas transformadas con pALACE-*mfpA* bajo condiciones de inducción. Finalmente, en la columna señalada con el numero 3, se

muestran los valores correspondientes a los cambios relativos en las CMI, los cuales fueron calculados realizando la relación entre los datos de la columna (2)/(1).

Tabla III: Resultados de la sobreexpresión con acetamida en diferentes cepas de *M. smegmatis*.

Cepa	CMI ($\mu\text{g/ml}$) Ciprofloxacina ⁽¹⁾	pALACE- <i>mfpA</i> ⁽²⁾	Cambios relativos en la CMI (veces) ⁽³⁾
mc ² 155	0,25	1	4
mc ² 552	16	16	1
mc ² 155 GM1	2	4	2
mc ² 155 62	4	4	1
mc ² 1255	0,0625	1	16

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados indican que el aumento en la expresión del gen *mfpA* provoca el incremento de resistencia a ciprofloxacina en las cepas mc²155, mc²155GM1 y mc² 1255 al igual que los resultados obtenidos por Falco en el 2010. Por otro lado, para las cepas mc² 552 y mc² 155 62 las CMI se mantienen constantes.

Es importante mencionar que los valores de las CMI de las cepas transformadas con pALACE y evaluadas bajo condiciones de no inducción, se corresponden con los valores indicados en la columna denotada con el número 1 de la tabla III.

Para la cepa mc²155 se determinó que los cambios relativos en la CMI para ciprofloxacina son los mismos si *mfpA* está sobreexpresado o si contiene al plásmido pGADIV.

7. DISCUSIÓN

Los genes *qnr* están asociados a plásmidos pero se pueden encontrar homólogos en el genoma de bacterias Gran positivas y Gran negativas. El gen *qnrA* fue identificado en un plásmido y una vez establecida su secuencia, se buscaron homólogos, poniéndose en evidencia la relación de dicha secuencia con algunos genes ubicados cromosomas (Martínez *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 2002). Uno de estos genes fue *mfpA*, el cual se encuentra en el genoma de las micobacterias, y se relacionó con la resistencia a fluoroquinolonas (Montero *et al.*, 2001).

Inicialmente, MfpA fue descrita como una proteína relacionada con la resistencia a fluoroquinolonas en *M. smegmatis*. Mientras que tiempo después, la proteína correspondiente en *M. tuberculosis*, MfpAMt, se propuso como determinante de resistencia intrínseca a quinolonas. Además, su similitud con las proteínas Qnr condujo a la hipótesis de que pueden mediar resistencia a fluoroquinolonas al ejercer un efecto protector sobre la girasa. Es justo por este motivo que en este trabajo se propuso determinar la posible relación entre la proteína MfpA de *Mycobacterium smegmatis* y la resistencia “*in vivo*” a ciprofloxacina.

El primer paso a seguir para lograr los objetivos planteados en este trabajo fue la selección de cepas mutantes de *Mycobacterium smegmatis* resistentes a ciprofloxacina y la determinación de la CMI para cada una de ellas. Esto permitió evaluar cuales mutantes podrían tener mutaciones en la región QRDR del gen *gyrA*, debido a que está ampliamente reportado que mutaciones en dicha región están implicadas con altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas.

Una vez seleccionadas las mutantes y debido a que se ha reportado que hay una relación

entre la acumulación de mutaciones y el nivel de resistencia a las fluoroquinolonas (Ginsburg y col., 2003), se realizaron ensayos de acumulación de ciprofloxacina a las cepas mutantes que expresaron altos niveles de resistencia a ciprofloxacina (altas CMI) y se seleccionaron aquellas cepas cuyo nivel de acumulación de ciprofloxacina estaba cercano al expresado por la cepa silvestre (Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18). Descartándose así que dicha resistencia se deba a la presencia de la sobreexpresión de bombas de eflujo como LfrR. De esta manera se aseguró que la variación en los niveles de resistencia a ciprofloxacina en las cepas utilizadas en este trabajo era consecuencia de la sobreexpresión de *mfpA* y no de un efecto aditivo consecuencia de la combinación de dicha proteína con la sobreexpresión de bombas de eflujo.

Una vez realizados los ensayos de acumulación y seleccionadas aquellas mutantes con altas CMI y altos niveles de acumulación, se amplificó por PCR la región QRDR del gen *gyrA* de aquellas cepas que expresaron un alto nivel de acumulación de ciprofloxacina (Figura 19). Dicha región fue secuenciada, el análisis de las secuencias arrojó como resultado la presencia de una mutación en la región QRDR de *gyrA* en la cepa mc²155 (62). En la Figura 20 se muestra el análisis de la secuencia de esta cepa y se puede observar la sustitución de una Citosina por una Timina, lo que implica el cambio de un residuo de alanina por una valina en la posición 91 de la girasa de *M. smegmatis* (A91V). Es importante mencionar que mutaciones espontáneas (incluyendo aquellas encontradas en aislados clínicos de *M. tuberculosis*) relacionadas con altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas, recaen con frecuencia en la posición S83 (equivalente al codón 91 de *M. smegmatis*) lo que indica que dicho residuo juega un papel importante en la unión de las FQs al complejo ADN-girasa (Tavio *et al.*, 1999; Bardnard *et al.*, 2001).

Para establecer si existe una posible relación entre el aumento de la expresión del gen *mfpA* y el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas, se procedió a electroporar un vector inducible por acetamida que contenía clonado el gen *mfpA* (pALACE-*mfpA*), en diferentes cepas de *M. smegmatis*:

- mc²155, cepa silvestre.
- mc²1255: Cepa mutante de *M. smegmatis* que presenta el gen *mfpA* interrumpido por el gen *aph* (*mfpA*::*aph*) que confiere resistencia a kanamicina.
- mc² 552: Cepa mutante que presenta una mutación en la región QRDR del gen *gyrA* (D94G) y otra en el gen *lfrR*, que permite la expresión constitutiva del gen *lfrA* que codifica para la bomba de eflujo perteneciente a la Superfamilia de los MFS (Mayor Facilitator Superfamily).
- mc²155 GM1: Cepa mutante que presenta una mutación en la región QRDR del gen *gyrA* (D94G).
- mc²155 (62): Cepa mutante de que presenta una mutación en el codón 91 de la región QRDR del gen *gyrA* (A91V), la cual fue obtenida en este trabajo.

Los resultados mostrados en la tabla III indican que el aumento de la expresión del gen *mfpA* provoca “*in vivo*” un aumento en los niveles de resistencia a ciprofloxacina en las cepas mc²155, mc²155 GM1 y mc²1255. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Montero y colaboradores en el año 2001 y Falco en el año 2010, en los que se reportó que un aumento en la expresión del gen *mfpA* aumentó los niveles de resistencia a ciprofloxacina en cepas de *M. smegmatis*.

Varios autores sugieren que el mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas mediado por proteínas pertenecientes a la familia de petapéptidos repetidos implica la unión específica

de dichas proteínas a la ADN girasa. Estudios *in vitro* revelaron que las proteínas pentapéptidos repetidos QnrA1 y QnrB1 son capaces de proteger a la ADN girasa y la topoisomerasa tipo IV de *E. coli* del efecto inhibitor de las fluoroquinolonas de una manera dependiente de la concentración y se demuestra que este mecanismo de resistencia esta mediado justamente por la unión del pentapéptido repetido a la ADN girasa (Tran *et al.*, 2002, 2005; Jacoby *et al.*; 2006). Además, estos autores sugieren que la formación del complejo QnrB-girasa podría ocurrir antes de la unión del ADN a la girasa por lo que la formación de dicho complejo no dependería de los cambios conformacionales inducidos por la unión del ATP, el ADN o la fluoroquinolona (Tran *et al.*, 2005).

En el año 2009, Merens y colaboradores compararon el efecto de MfpA_{Mt} sobre la girasa de *M. tuberculosis* y de QnrB4 sobre la girasa de *E. coli*, valiéndose de ensayos que involucran reacciones de superenrollamiento y al igual que Jacoby y colaboradores (2006), reportaron que QnrB revierte el efecto inhibitorio de las fluoroquinolonas sobre la girasa de *E. coli*. Sin embargo, reportan que MfpA_{Mt} no protege a la ADN girasa del efecto inhibitorio de la ciprofloxacina y proponen que esta proteína tiene un efecto inhibitorio sobre las actividades de superenrollamiento y relajación de la girasa de *M. tuberculosis*. Por otro lado, estos autores proponen que la región de interacción entre MfpA_{Mt} y la girasa debe incluir el dominio QRDR de GyrA, en la que los residuos S83 (equivalente al residuo A91 en *M. smegmatis*) y D87 (equivalente al residuo A95 en *M. smegmatis*) están fuertemente implicados en la interacción quinolona-girasa. Para demostrar esto, Merens y colaboradores realizaron ensayos de superenrollamiento utilizando girasas modificadas en los residuos A83 y D87 en la girasa de *M. tuberculosis* (A83S, D87H y D87G). Estos autores revelan que el efecto inhibitor que ejerce MfpA_{Mt} sobre la girasa es completamente abolido cuando

ocurre una sustitución del ácido aspártico por una glicina en el residuo 87, lo que indica que probablemente este aminoácido tiene un papel importante en la interacción MfpA_{Mt}-girasa. En contraste, se observa que dicha proteína sigue ejerciendo un efecto directo sobre la girasa con la modificación A83S, similar al efecto ejercido sobre la girasa tipo silvestre. Vale la pena destacar que la posición 87 en GyrA y la posición equivalente en ParC (residuo 84) de la topoisomerasa tipo IV, están implicadas con la interacción de dichas proteínas con el ADN por lo que mutaciones en estos codones podrían interferir con la interacción entre el ADN y la girasa.

La región QRDR está dentro del dominio N-terminal de GyrA, cerca de la tirosina catalítica Tyr¹²², por lo que los residuos que componen esta región pueden estar implicados en la unión al ADN. La posición del residuo 83 en la superficie de la hélice α_4 y su estrecha proximidad con la Tyr¹²² podría conducir a la formación de un enlace de hidrógeno entre la girasa y el ADN (Figura 23.b) (Morais *et al.*, 1997).

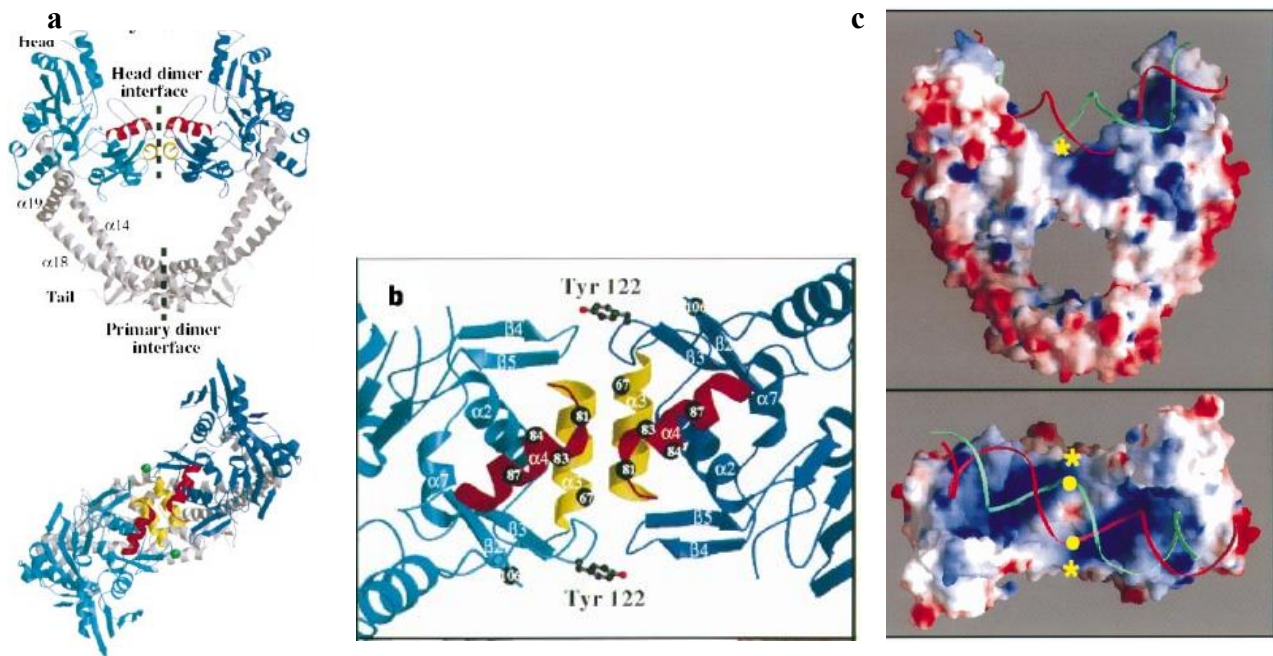


Figura 23: a) Modelo de la estructura en 3-D de la ADN girasa. b) dominio N-terminal de la girasa de *E. coli*. Las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$ se representan con los colores amarillo y rojo respectivamente. Los residuos de aminoácidos posiblemente involucrados con la interacción del ADN se encuentran representados por un círculo negro. c) modelo de la interacción entre el ADN y la girasa (tomado y modificado de Morais *et al.*, 1997).

Debido a que MfpA_{Mt} es una hélice con tamaño, forma y distribución de cargas similar al ADN en forma B (Hegde *et al.*, 2005), los sitios de interacción entre dicha proteína y la ADN girasa podrían coincidir con los sitios de interacción entre el ADN y la girasa. Por lo tanto, mutaciones en esta región podrían interferir con la unión de MfpA_{Mt} a la girasa. Esto podría explicar los resultados obtenidos en este trabajo con la cepa mutante mc²155 (62) la cual no expresó variaciones en su concentración mínima inhibitoria con el aumento “*in vivo*” en la expresión del gen *mfpA* (Tabla III). Basándose en la estructura de los aminoácidos alanina y valina, es probable que la sustitución de un aminoácido relativamente pequeño como Ala por un aminoácido de mayor tamaño como Val en el residuo 91 de la girasa de *M. smegmatis* puede estar causando modificaciones en la estructura tridimensional de la ADN girasa así como un mayor impedimento estérico, dificultando de esta manera la interacción entre MfpA y la ADN girasa. Los resultados obtenidos en este trabajo con la cepa mutante mc²155 (62) indican que el residuo A91 de la girasa de *M. smegmatis* es un sitio de interacción probable entre MfpA y la ADN girasa. Sería interesante estudiar el efecto que tiene la proteína MfpA en cepas con mutaciones en otros codones de la región QRDR a parte de los ya estudiados en este trabajo a fin de comprender un poco más el papel que desempeñan cada uno de estos residuos en la interacción MfpA-girasa y su posible relación con la resistencia a fluoroquinolonas. Además, la cristalización de girasas con mutaciones en la región QRDR podría revelar los cambios conformacionales que pueden ocurrir en la estructura tridimensional de la girasa

como consecuencia de dichas mutaciones y de esta manera se podría entender un poco más las interacciones que se pueden dar entre la girasa y MfpA.

8. CONCLUSIONES:

- De las 10 cepas mutantes secuenciadas, sólo la cepa *M. smegmatis* mc²155 62 presentó una mutación en la región QRDR de *gyrA*, la cual consiste en la sustitución de una Citosina por una Timina, lo que implica el cambio de un residuo de alanina por una valina en la posición 91 de la girasa de *M. smegmatis* (A91V).
- El aumento en la expresión del gen *mfpA* aumenta los niveles de resistencia a ciprofloxacina tanto en la cepa silvestre *Mycobacterium smegmatis* mc²155, como en las cepas mutantes *Mycobacterium smegmatis* mc²155GM1 y *Mycobacterium smegmatis* mc² 1255.
- La cepa mutante *Mycobacterium smegmatis* mc²155 62 no expresó variaciones en su concentración mínima inhibitoria con el aumento “*in vivo*” de la expresión del gen *mfpA*, lo indica que posiblemente mutaciones en el residuo A91 de la girasa de *M. smegmatis* afectan la interacción entre MfpA y la ADN girasa.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Blondal 2007. Barriers to Reaching the Targets for Tuberculosis Control: Multidrug-resistant tuberculosis Bulletin of the World Health Organization. 85(5).
2. Bernard F., Maxwell A. 2001. Interaction between DNA Gyrase and Quinolones: Effects of Alanine at GyrA Subunit Residues Ser⁸³ and Asp⁸⁷. Antimicrob. Agents Chemother. 45(7).
3. Casal 1999. Diagnostico Microbiologico de las Infecciones por Micobacterias. <http://www.seimc.org/protocolos/cap9.htm>intro (Consultado en septiembre del 2012).
4. Chatterjee D.1997. The mycobacterial cell Wall: structure, Biosynthesis and sites of drug action. Curr Opin Chem Biol. 1 (4): 579-88.
5. Cole S., Brosch R., parkhill J. 1998. Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the Complete Genome Sequence. Nature 393: 537-544.
6. Cole S. 2002. Comparative and Funtional Genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology. 148: 2919-2928.
7. Cousins D., Bastida R., Cataldi A., Quese V., Redrobe S., Dow S., Duignan P. Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D., Butler W., Dawson D., Rodriguez D., Loureiro J., Romano M., Alito A., Zumarraga M., Bernardelli A. 203. Tuberculosis in Seals Caused By a Novel Member of *Mycobacterium tuberculosis*

Complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov. Int. J. Syst. Evol. Microbio. 53_1305-14.

8. Cox H. *et al.* 2008. Long Term Efficacy of DOTS Regimens for Tuberculosis: Systematic Review. JBM 336: 484-487.

9. Daffe M. 1998. The Envelope Layers of Mycobacteria With Reference to Their Pathogenicity. Advances in Microbial Physiology. 39: 13-203.

10. Daniel T., Bates J., Downes K. 1994. History of tuberculosis, In Tuberculosis, Pathogenesis, Protection and Control. Edited by Barry R. Bloom. ASM Press. Washington, USA.

11. De la Campa A., Balsalobre L., Ardanuy C., Fenoll A., Perez-Trallero E, Linares J. 2004. Fluoroquinolone resistance in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones, Spain, Emerg.Infect.Dis., 10: 1751-1759.

12. De la Parte M., Hurtado M., Rivera M. 2001. Tuberculosis en el Nuevo Milenio. Revista de la Facultad de Medicina. 24(2):104-119.

13. De rossi E., Ainsa J., Ricardi G. 2002. The Multidrug Transporters Belonging To Major Facilitated Superfamily (MFS) In Mycobacterium tuberculosis. Molecular Medicin. 8: 714-724.

14. Fabre M., Koeck J., Le Fleche P., Simon F., Hervé V., Vergnaud G., Pourcel C., 2004. High Genetic Diversity Revealed by Variable-Number Tandem Repeat Genotyping and Analysis of *hsp65* Gene Polymorphism in a Large Collection of

“*Mycobacterium canettii*” Strains Indicates that the *M. tuberculosis* Complex is a Recently Emerged Clone of “*M. canettii*”. *J. clin. Microbiol.* 42(7): 3248-255.

15. Falco A. 2010. Caracaterización Molecular del Gen *mfpA* en *M. smegmatis* y su Posible Relacion Con el Desarrollo de Resistencia a Fluoroquinolonas. Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas. Centro de Estudios Avanzados. Altos de Pipe, Venezuela.

16. García J., González A. 2001. Tuberculosis: Patogenia y Manifestaciones Clínicas. *Acta Científica Venezolana.* 52: 5-9.

17. Ginsburg A. Grosset J. y Bishai W. 2003. Fluoroquinolones, tuberculosis and resistance. *Lancet Infect Dis.* 3: 432-42.

18. GuilarteA. 2001. Programa Nacional de Tuberculosis. *Atc. Cient. Ven.* 52: 2-4.

19. Gutiérrez J., Torres C., Latorre P., y Verano R. 1998. Tuberculosis. Guías de Práctica Clínica Basadas en la Evidencia. ISS (Instituto de Seguros Sociales) ASCOFAME (Asociación Colombiana de Facultades de Medicina). <http://www.ascofame.org.co/guiasmbe.php> (consultado en Septiembre del 20012).

20. Hasan 2006. Prioritizing Genomic Drug argert in Pathogens: Aplication to *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos Computational Biology.* Volume 2. 6: 539-50.

21. Hegde S., Vetting M., Roderick S. Mitchenall L. Maxwell A., Takiff H. Blanchard J. 2005. A Fluoroquinolone Resistance Protein from *Mycobacteiium tuberculosis* That Mimics DNA. *Science.* 308: 1480-1483.

22. Hong X y Hopfinger A. 2004. Construction, Molecular Modeling, and Simulation of *Mycobacterium tuberculosis* Cell Walls. *Biomacromolecules*. 5: 1052-1065.
23. Hooper D. 2001. Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*. 32: S9-S15.
24. Hooper D., Devasthale P., Zavod R. 1993. Structure-activity relationships, in: D.C.Hooper, J.S.Wolfson (Eds.), *Quinolone Antimicrobial Agents*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 3-52.
25. Jacoby G., Chow N., Waites K., 2003. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*. 47:559-562.
26. Jacoby G., Walsh K., Millis D., Walter V., Oh H., Robicsek A., Hooper D. 2006. *qnrB*, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*. 50(4): 1178-1182.
27. King D., Malone R., Lilley S. 2000. New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *Am Fam Physician*. 61(9): 2741-8.
28. Kubica G., Wayne L. 1984. *The Mycobacteria. A Sourcebook*. Marcel Dekker. Inc. New York.
29. Llop A., Valdés-Dapena M, Zuazo J. 2001. *Microbiología y Paracitología Médicas* Editorial Ciencias Médicas. La Habana.
30. Martinez-Martinez L., Pascual A. Jacoby G. 1998. Quinolone Resistance from a Transferble Plasmid. *Lancet*. 351:797-799.

31. Martínez G. 2005. Contribución al Estudio de los Mecanismos Moleculares de Resistencia a Ciprofloxacina en *Streptococcus pneumoniae*. Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
32. Mella S., Acuña g., Muñoz M., Perez C., Labarca J., Gonzalez G. Bello H., Dominguez M. y Zemelman R. 2000. Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clacificación. Rev Chil Infec; 17 (1): 53-66.
33. Merens A., Matrat S., Aubry S., Lascols C., Jarlier V., Soussy C., Cavallo J., Cambau E. 2009. The Pentapeptide Repeat Proteins MfpAMt and QnrB4 Exhibit Opposite Effects on DNA Gyrase Catalytic Reactions and on the Ternary Gyrase-DNA-Quinolone Complex.J. Bacteriol. 191(5): 1587-1594.
34. Montero C., Mateu G., Rodriguez R., Takiff H., 2001. Intrinsic Resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 3387-3392.
35. Morais C., Jackson A., Smith C., Shikotra A., Maxwell A., Liddington R. 1997. Structure of the DNA breakage-reunion domain of DNA girasa. Nature 388: 903-906.
36. Nuermberger E. 2004. Moxifloxacin-containing regimens of reduced duration produce a stable cure in murine tuberculosis. American Journal Respirate Critical Care Medicine 170: 1131-4.
37. Parrish N., Dick J., Bishai W., 1998. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. Trends Microbiol. 6(3): 107-112.

38. Piñate F. 2001. Situación Actual de la Tuberculosis. Gac. Med. Caracas. 109(4): 547-549.
39. Plezt M. 2004. Early Bactericidal Activity of Moxifloxacin in Treatment of Pulmonary Tuberculosis: A Prospective, Randomized Study. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48: 780-782.
40. Raviglione M. 2003. The TB Epidemic from 1992 to 2002. Tuberculosis 83: 4-14.
41. Rezwan M., Lanéelle M., Sander p., Daffé M. 2007. Breking down the Wall: Fraction of Mycobacteria. J. Microbiol Methods. 68(1): 32-9.
42. Rodriguez R. 2009. Caracaterización Parcial de Cepas de Mycobacterium smegmatis y Mycobacterium bovis BCG Resistentes a los Fluoroquinolonas: Niveles de resistencia, Mutaciones en la Girasa, y Acumulación de Fluoroquinolonas. Istituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Centro de Estudios Avanzados. Altos de Pipe, Venezuela.
43. Rossman M. 1996. Tuberculosis Clínica y nuevos Desafios. Editorial McGraw-Hill Panamericana.
44. Schaechter 1994. Microbiología. 2da Edición. Editorial Panamericana.
45. Schatz 1994. Streptomcin, a Sustance Exhibiting Antibiotic ctivity Against Gram-positive an Gram-nrgative Bacteria. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 55:66-69.
46. Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. Clinical Microbioly Reviews. 16: 463-496.

47. Takiff H., Cimino M., Musso C., Wisbrodi R., Martinez R. Delgado M., Salazar L. Blom B. Jacobs W. 1996. Eflux pum of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. PNAS. 93: 362-366.
48. Tran J., Jacoby G., 2002. Mechanism of Plasmid-Mediated Quinolona Resistance. PNAS. 99(8): 5638-5642.
49. Volk W., 1996. Microbiología Basica. 7ma Edición. Editorial Harla-México.
50. Vélez H., Rojas M., Borrero J., Restrepo J. 2003. Fundamentos de Medicina: Enfermedades Infecciosas. 6ta Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín-Colombia.
51. Vetting M., Hegde S., Fajardo J., Fiser A., Roderick S., Takiff H., Blanchard J. 2006. Pentapeptide Repeat Proteins. Biochemistry. 45(1): 2578-86.
52. Yew W., Can E., Chan C., Cheng A. 2002. Genotypic and phenotypic resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifamycins and fluoroquinolones. Int J. Tuberc Lung Dis. 6: 936-37.
53. Zhang Y. 2005. The Magic Bullets and Tuberculosis Drug Targets. Annual Review Pharmacology Toxicology 45: 529-535.
54. Zhang Y. 2007. In The Treatment of Tuberculosis Clinical Pharmacology and Therapeutic 82: 595-600.
55. Zinsser 1999. Diagnostico Microbiológico. 20^a Edición. Editorial Panamericana.

10. ANEXOS

Tabla IV: Concentración Mínima inhibitoria de ciprofloxacina para cepas mutantes de *M. smegmatis* mc² 155.

cepa	CMI (µg/ml)		cepa	CMI (µg/ml)		cepa	CMI (µg/ml)		cepa	CMI (µg/ml)
1	1		117	1		38	2		143	2
3	1		118	1		39	2		144	2
140	1		119	1		40	2		145	2
12	1		120	1		41	2		147	2
63	1		122	1		42	2		148	2
65	1		123	1		43	2		149	2
66	1		124	1		44	2		150	2
67	1		125	1		45	2		151	2
68	1		126	1		46	2		152	2
69	1		127	1		47	2		153	2
70	1		128	1		49	2		155	2
71	1		129	1		50	2		157	2
72	1		131	1		52	2		157	2
73	1		132	1		53	2		158	2
74	1		133	1		54	2		159	2
75	1		134	1		55	2		160	2
77	1		135	1		59	2		2	4
79	1		136	1		61	2		7	4
80	1		137	1		64	2		51	4
81	1		138	1		76	2		9	4
82	1		139	1		78	2		11	4
83	1		6	2		84	2		16	4
89	1		4	2		85	2		17	4
90	1		5	2		86	2		23	4
91	1		10	2		87	2		27	4
95	1		13	2		88	2		29	4
96	1		14	2		92	2		31	4
98	1		15	2		93	2		33	4
99	1		18	2		94	2		34	4
102	1		19	2		97	2		35	4

104	1	20	2	100	2	36	4
105	1	21	2	101	2	8	8
106	1	22	2	103	2	56	4
107	1	24	2	109	2	57	4
108	1	25	2	110	2	58	4
111	1	26	2	114	2	60	4
112	1	28	2	121	2	62	4
113	1	30	2	130	2	146	4
115	1	32	2	141	2	154	4
116	1	37	2	142	2		

Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido:

En las Figuras 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33 se muestran las graficas correspondientes a las 52 cepas mutantes de *M. smegmatis* a las que se les hicieron ensayos de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido. En estos ensayos se utilizó la cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 como control positivo ya que los niveles de expresión del gen *lfrA*, que codifica para una bomba de eflujo, le permiten tener un bajo nivel de acumulación de ciprofloxacina. Como control negativo se utilizó una cepa silvestre de *M. smegmatis* mc²155 debido que posee un alto nivel de acumulación de ciprofloxacina.

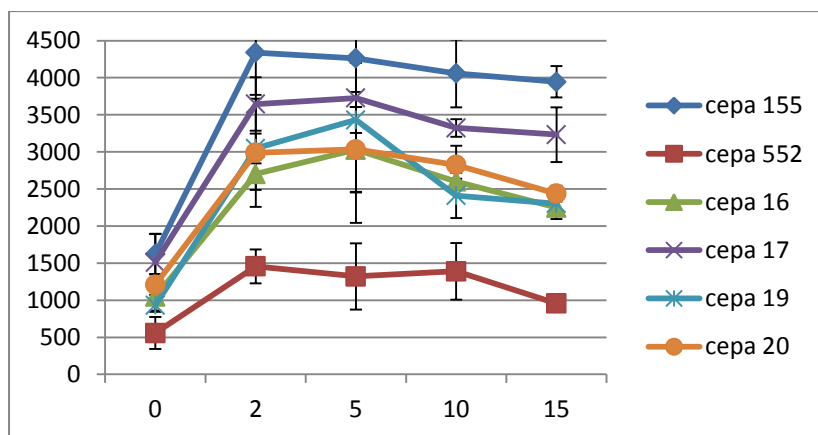


Figura 24: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de las cepas mutantes *M. smegmatis* mc²155 16 (cepa 16); *M. smegmatis* mc²155 17 (cepa 17); *M. smegmatis* mc²155 19 (cepa 19); *M. smegmatis* mc²155 20 (cepa 20). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552).

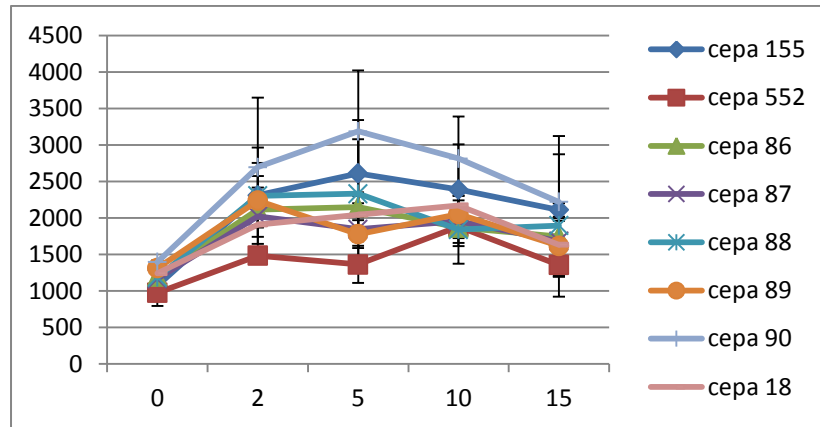


Figura 25: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de las cepas mutantes *M. smegmatis* mc²155 86 (cepa 86); *M. smegmatis* mc²155 87 (cepa 87); *M. smegmatis* mc²155 88 (cepa 88); *M. smegmatis* mc²155 89 (cepa 89); *M. smegmatis* mc²155 90 (cepa 90); *M. smegmatis* mc²155 18 (cepa 18). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552).

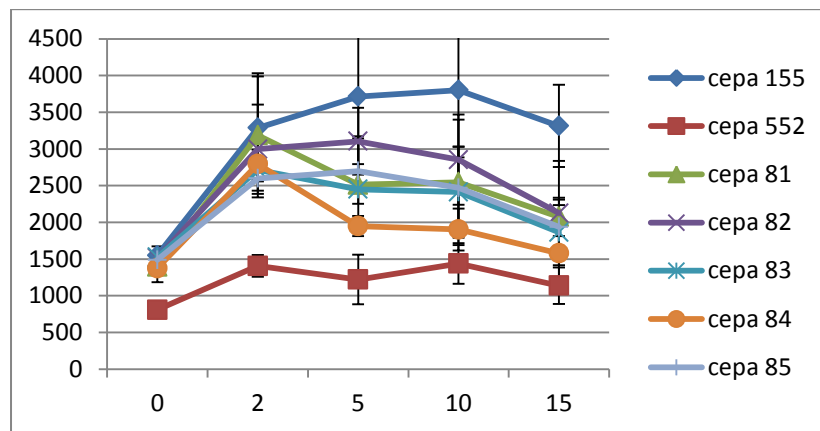


Figura 26: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de las cepas mutantes *M. smegmatis* mc²155 81 (cepa 81); *M. smegmatis* mc²155 82 (cepa 82); *M. smegmatis* mc²155 83 (cepa 83); *M. smegmatis* mc²155 84 (cepa 84); *M. smegmatis* mc²155 85 (cepa 85). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552).

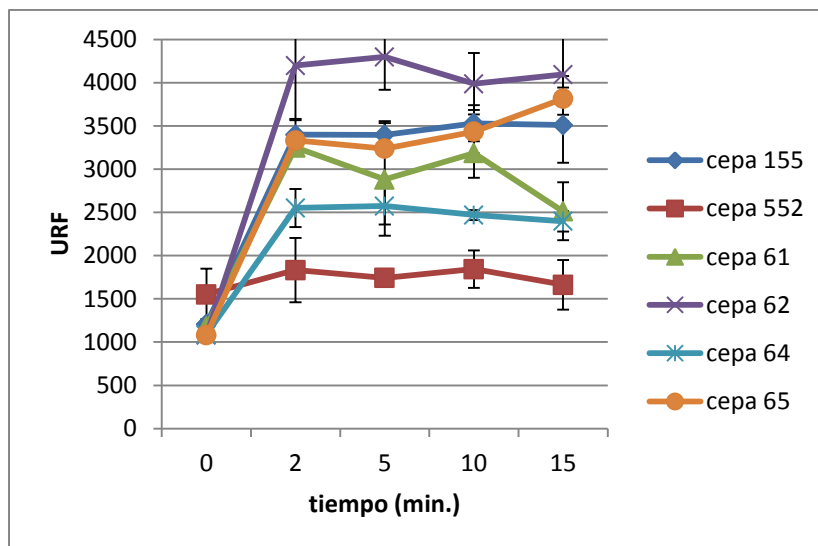


Figura 27: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de las cepas mutantes *M. smegmatis* mc²155 61 (cepa 61); *M. smegmatis* mc²155 62 (cepa 62); *M. smegmatis* mc²155 64 (cepa 64); *M. smegmatis* mc²155 65 (cepa 65). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552).

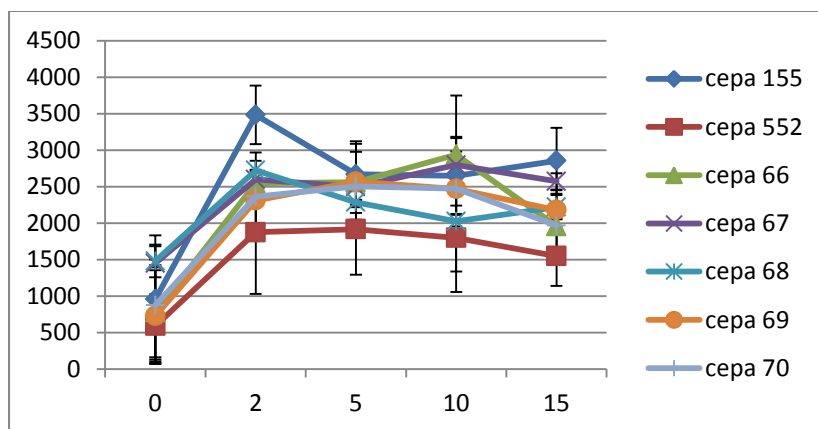


Figura 28: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de las cepas mutantes *M. smegmatis* mc²155 66 (cepa 66); *M. smegmatis* mc²155 67 (cepa 67); *M. smegmatis* mc²155 68 (cepa 68); *M. smegmatis* mc²155 69 (cepa 69); *M. smegmatis* mc²155 70 (cepa 70). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552).

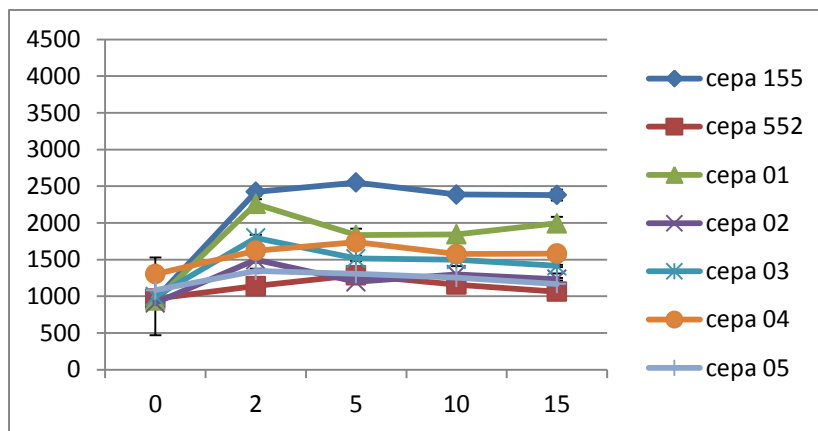


Figura 29: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de las cepas mutantes *M. smegmatis* mc²155 01 (cepa 01); *M. smegmatis* mc²155 02 (cepa 02); *M. smegmatis* mc²155 03 (cepa 03); *M. smegmatis* mc²155 04 (cepa 04); *M. smegmatis* mc²155 50 (cepa 05). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552).

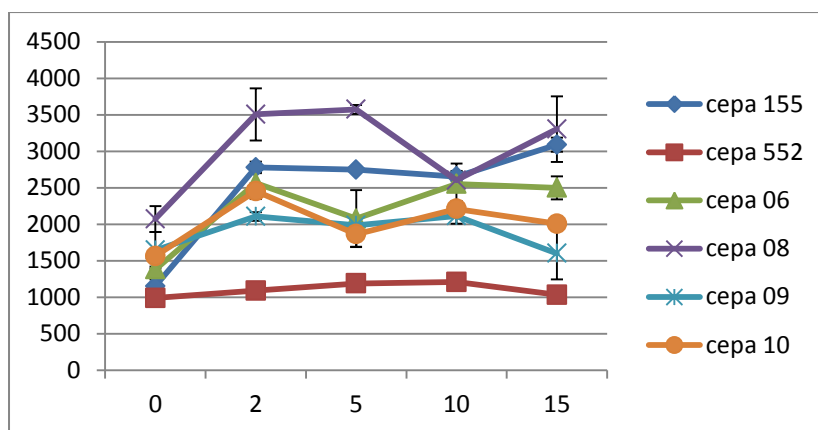


Figura 30: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de las cepas mutantes *M. smegmatis* mc²155 06 (cepa 06); *M. smegmatis* mc²155 08 (cepa 08); *M. smegmatis* mc²155 09 (cepa 09); *M. smegmatis* mc²155 10 (cepa 10); *M. smegmatis* mc²155. Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552).

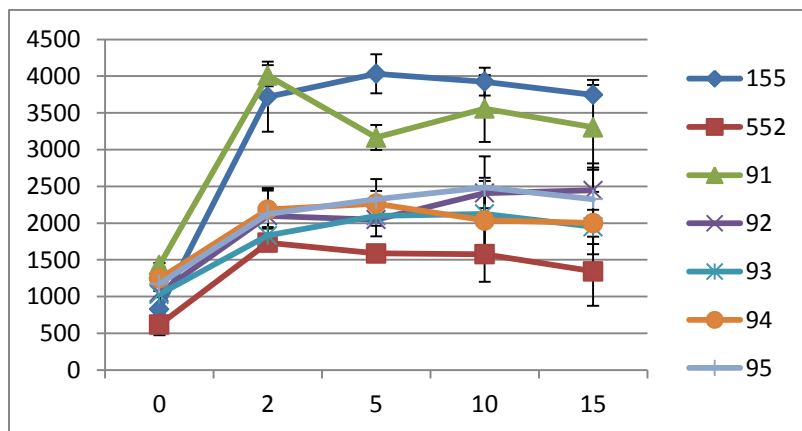


Figura 31: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de las cepas mutantes *M. smegmatis* mc²155 91 (cepa 91); *M. smegmatis* mc²155 92 (cepa 92); *M. smegmatis* mc²155 93 (cepa 93); *M. smegmatis* mc²155 94 (cepa 94); *M. smegmatis* mc²155 95 (cepa 95). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552).

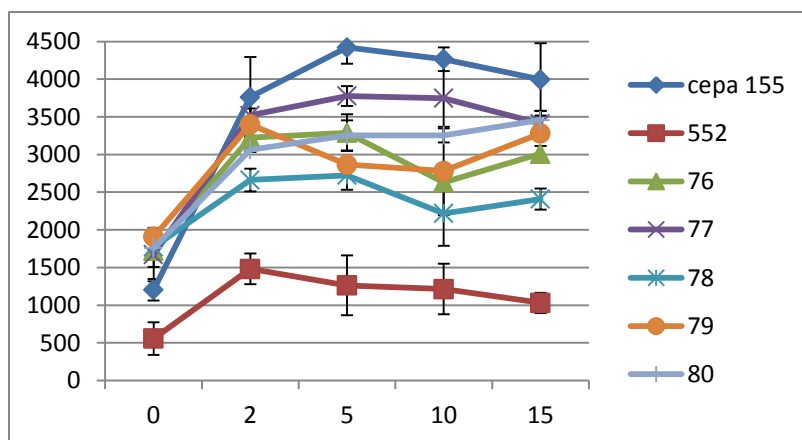


Figura 32: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de las cepas mutantes *M. smegmatis* mc²155 76 (cepa 76); *M. smegmatis* mc²155 77 (cepa 77); *M. smegmatis* mc²155 78 (cepa 78); *M. smegmatis* mc²155 79 (cepa 79); *M. smegmatis* mc²155 80 (cepa 80). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552).

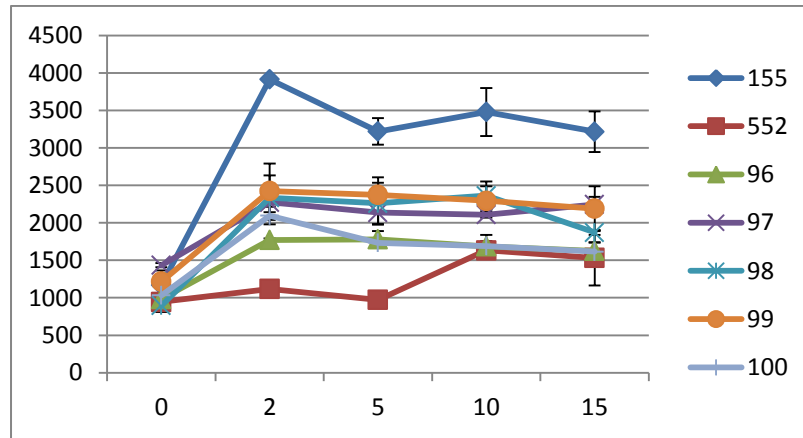


Figura 33: Ensayo de acumulación de ciprofloxacina en medio líquido de las cepas mutantes *M. smegmatis* mc²155 96 (cepa 96); *M. smegmatis* mc²155 97 (cepa 97); *M. smegmatis* mc²155 98 (cepa 98); *M. smegmatis* mc²155 99 (cepa 99); *M. smegmatis* mc²155 100 (cepa 100). Control negativo: cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (cepa 155). Control positivo: cepa mutante *M. smegmatis* mc²552 (cepa 552).