



Universidad
Zaragoza



DISCOVERY & DEVELOPMENT
ANTIMICROBIALS
MECHANISMS OF RESISTANCE

ESTUDIOS INICIALES DE LA CARACTERIZACIÓN DEL MODO DE ACCIÓN MOLECULAR DE LAS AVERMECTINAS COMO AGENTES ANTI-TUBERCULOSOS

JOSÉ MANUEL EZQUERRA AZNÁREZ

Trabajo Fin de Grado

2018

Director: Santiago Ramón García

Ponente: José Antonio Aínsa Claver

Equipo D²AMR. Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Situación actual de la tuberculosis	2
2.2. Tratamiento de la tuberculosis y resistencia a antibióticos.....	3
2.3. El desarrollo de nuevos antimicrobianos.....	4
2.4. Las avermectinas	6
3. OBJETIVOS.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
4.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo	8
4.2. Antibióticos	8
4.3. Caracterización de la actividad de los distintos antimicrobianos frente a <i>M. smegmatis mc²155</i>.....	8
4.3.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por microdilución	8
4.3.2. Determinación de la CIM en medio sólido	9
4.3.3. Cinética de muerte de <i>M. smegmatis</i>	9
4.3.4. Test de sinergia “checkerboard”	10
4.4. Aislamiento de mutantes resistentes a selamectina	10
5. RESULTADOS	12
5.1. Caracterización de la actividad de la selamectina frente a <i>M. smegmatis mc²155</i>.....	12
5.1.1. Determinación de la CIM de la selamectina en medio líquido y sólido ...	12
5.1.2. Cinética de muerte de <i>M. smegmatis</i>	13
5.1.3. Ensayo de sinergia “checkerboard”.....	15
5.2. Aislamiento de mutantes resistentes a selamectina en medio sólido.....	16
6. DISCUSIÓN GLOBAL DE RESULTADOS.....	19
7. CONCLUSIONES	22
7. CONCLUSIONS	22
8. REFERENCIAS	23
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO	25

1. RESUMEN

Debido a la creciente incidencia de las cepas multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* y a la escasez de fármacos para su tratamiento, surge la necesidad de buscar nuevos compuestos activos. Una de las alternativas al largo y costoso proceso de desarrollo de antimicrobianos es el reposicionamiento, es decir, encontrar nuevos usos para fármacos ya aprobados en clínica. Utilizando esta aproximación se ha descrito que las avermectinas son activas frente a distintas cepas de *M. tuberculosis*.

En este trabajo se ha caracterizado la actividad de la selamectina, avermectina seleccionada como modelo para los experimentos, frente a *Mycobacterium smegmatis*; y se han determinado las condiciones experimentales para aislar cepas resistentes en medio sólido utilizando una colección de mutantes generada por transposición. Las colonias aisladas presentan una sensibilidad similar a la cepa silvestre tras un pase en ausencia de selamectina, pese a que las condiciones utilizadas han permitido aislar mutantes resistentes a isoniazida.

1. ABSTRACT

Due to the increasing incidence of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and treatment shortage, new active compounds are needed. An alternative approach to the long and expensive drug discovery process is repurposing, finding new uses for old existing drugs. By using this approach, avermectins were described to be effective against different strains of *M. tuberculosis*.

In this thesis we have characterized the activity of selamectin, the avermectin selected as model for our studies, against *Mycobacterium smegmatis*. We have determined the experimental conditions to isolate mutants resistant to selamectin in solid medium from a transposition mutant library. Colonies isolated display a sensitivity profile similar to the wild-type strain, despite the fact that isoniazid-resistant mutants have been isolated under the same conditions.

2. ANTECEDENTES

2.1. Situación actual de la tuberculosis

La tuberculosis es la novena causa de muerte a nivel mundial, y la primera entre las enfermedades infecciosas. Se estima que en 2016 hubo 10,4 millones de casos, y se reportaron 1,7 millones de muertes por tuberculosis. Además, se estima que 1.700 millones de personas presentan infección latente por *Mycobacterium tuberculosis*, el agente infeccioso causante de la tuberculosis, y están en riesgo de desarrollar la enfermedad activa en cualquier momento de su vida y especialmente cuando el sistema inmunitario se encuentra debilitado, como en enfermos de VIH o en la vejez (1).

La incidencia de la tuberculosis activa no es igual en todo el mundo. Existe una serie de factores que comprometen el sistema inmunitario e incrementan el riesgo de padecer la enfermedad, entre los que destacan la malnutrición, la infección por VIH/SIDA y el tabaquismo. Por ello, la incidencia es especialmente alta en las zonas en las que concurren varias de estas circunstancias, como el sur de África (más de 300 casos/100.000 habitantes) (1). Por el contrario, la incidencia es mucho menor en los países occidentales, aunque la tuberculosis sigue siendo un problema de salud global debido a los movimientos migratorios desde zonas con elevada prevalencia, que permiten la diseminación de *M. tuberculosis* por todo el mundo (2).

En Europa, la incidencia de la tuberculosis es relativamente baja (32 casos/100.000 habitantes), aunque en 2016 se registraron 26.000 muertes. A pesar de esta baja incidencia, Europa tiene la mayor tasa de tuberculosis multirresistente (MDR-TB), debido a la elevada prevalencia de estas cepas en los países de la antigua Unión Soviética (por ejemplo, en Rusia, más de la mitad de los casos son MDR-TB) (1).

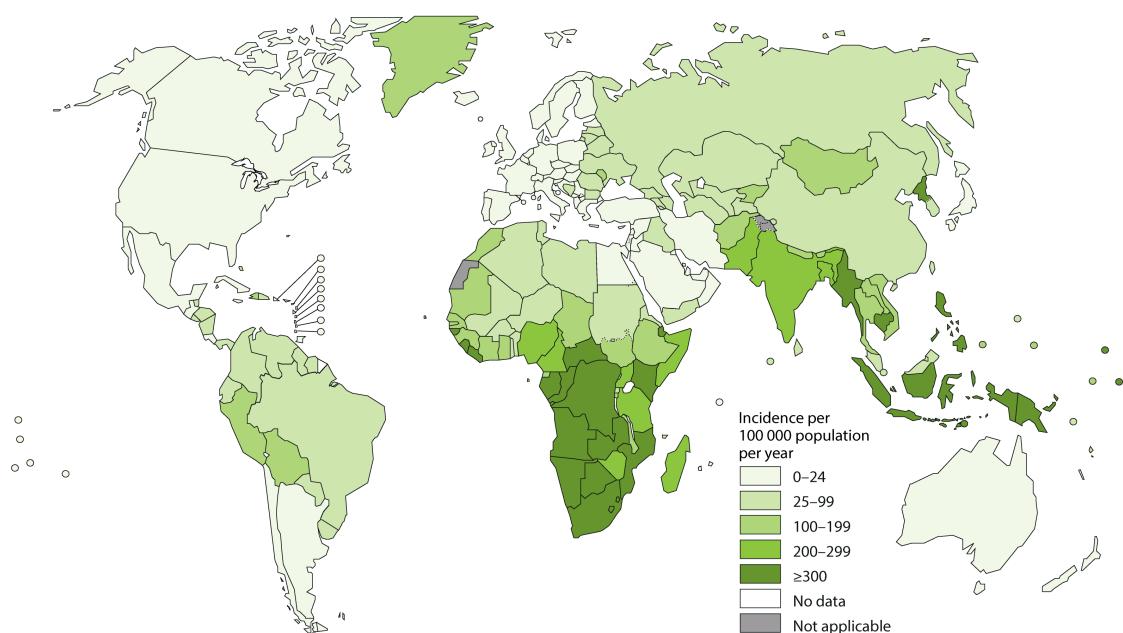


Figura 1. Mapa de la incidencia de la tuberculosis a nivel mundial estimada por la OMS (1).

En España, la tuberculosis es una enfermedad de declaración obligatoria desde principios del siglo XX. En 2015 se diagnosticaron 4.916 casos (10,59/100.000 habitantes) de tuberculosis: 3.946 de tuberculosis respiratoria, 60 de meningitis tuberculosa y 910 casos de tuberculosis en otras localizaciones. Las tasas de incidencia de tuberculosis presentan una tendencia descendente cercana al 10% anual. Del total de casos, el 80% son nuevos. De los casos notificados, el 76% tuvo resultados satisfactorios, mientras que se registraron 325 defunciones (6%) (3).

En Aragón, la incidencia es superior a la media española: en 2016 se declararon 174 casos (12,9 casos/100.000 habitantes), siendo la más frecuente la tuberculosis respiratoria. En los últimos 20 años hay una tendencia ligeramente descendente (4).

2.2. Tratamiento de la tuberculosis y resistencia a antibióticos

La estreptomicina, el primer antibiótico activo frente a *M. tuberculosis*, fue descubierta en 1944 por Waksman y Schatz. Entre 1946 y 1948 se llevó a cabo el primer ensayo clínico con enfermos de tuberculosis, en el que se observó una mejoría de los pacientes, pero también la rápida adquisición de resistencia a estreptomicina por las bacterias. Ello hizo que los distintos regímenes para el tratamiento de la tuberculosis desarrollados a lo largo del siglo XX se basaran en la combinación de varios fármacos antituberculosos para disminuir el riesgo de aparición de resistencias. El descubrimiento de la rifampicina en 1965 fue un hecho clave en el tratamiento de la tuberculosis, pues permitió reducir los tratamientos de 18 a 9 meses (5).

El régimen de tratamiento actual, implementado en la década de los 90, consiste en una primera fase intensiva de dos meses con rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol, seguida de cuatro meses con rifampicina e isoniazida. Este régimen presenta una tasa de éxito elevada en el tratamiento de la tuberculosis susceptible a fármacos (DS-TB) (95% en condiciones óptimas) y una toxicidad relativamente baja (6).

El desarrollo de resistencias a los fármacos dio lugar a la aparición de cepas MDR, que presentan, al menos, resistencia a los dos fármacos de primera línea más potentes: rifampicina e isoniazida. La aparición de las cepas MDR es el resultado de un tratamiento inadecuado, incompleto o con fármacos en mal estado, que facilita la selección de los individuos resistentes, así como de variaciones farmacocinéticas interpersonales en la capacidad de metabolizar los fármacos, lo cual puede llevar a tratamientos sub-óptimos (7).

El tratamiento de la MDR-TB incorpora los fármacos de segunda línea, siendo los más importantes las fluoroquinolonas (gatifloxacina, levofloxacina o moxifloxacina) y los antibióticos inyectables (kanamicina, amikacina o capreomicina). El tratamiento de segunda línea presenta una menor eficacia (54% de éxito), un mayor coste y efectos adversos más graves y con mayor frecuencia. El tratamiento es individual para cada paciente y puede durar hasta 18-24 meses, aunque se está ensayando un régimen de corta duración (9-12 meses) (7,8).

Las cepas MDR pueden adquirir resistencias adicionales a los fármacos de segunda línea. Las cepas extensamente resistentes (XDR-TB) son cepas MDR con resistencia a, al menos, una fluoroquinolona y uno de los inyectables. La supervivencia es muy inferior a los casos de MDR-TB, ya que las opciones de tratamiento son muy limitadas (7).

Dada la situación actual, son necesarios nuevos fármacos que permitan acortar el tratamiento de la DS-TB y mejorar la eficacia de los tratamientos frente a cepas MDR y XDR.

2.3. El desarrollo de nuevos antimicrobianos

La búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos puede realizarse siguiendo dos estrategias distintas: buscar compuestos que inhiban el crecimiento microbiano o buscar inhibidores específicos de alguna proteína bacteriana que previamente se haya demostrado que es esencial para la supervivencia de la bacteria bajo diferentes condiciones de crecimiento.

La **primera estrategia**, y la más antigua, se basa en enfrentar el microorganismo que queremos inhibir a distintos compuestos, ya sean de origen natural o sintetizados químicamente. Esta estrategia fue muy utilizada durante el siglo pasado, enfrentando microorganismos aislados del suelo a una serie de especies patógenas representativas para ver si inhibían su crecimiento. Gracias a esta estrategia se descubrieron la mayoría de las familias de antibióticos de las que disponemos actualmente, como los β-lactámicos, los aminoglicósidos o los macrólidos (9).

La metodología de estos ensayos es conceptualmente sencilla, pero presenta el inconveniente de que no se conoce la diana ni el mecanismo por el que se produce la inhibición del crecimiento bacteriano. Por ello, el desarrollo de antimicrobianos por esta aproximación requiere en primer lugar identificar y confirmar la diana sobre la que actúa el antimicrobiano.

La **segunda estrategia** consiste en la búsqueda de compuestos que inhiban alguna proteína esencial para el crecimiento de la bacteria. La aplicación de esta estrategia a la búsqueda de compuestos antibacterianos presenta complicaciones adicionales con respecto a la búsqueda de fármacos para otras indicaciones clínicas, ya que las bacterias presentan una pared celular que puede impedir el acceso de los compuestos a sus diañas y, por tanto, no hay correlación entre inhibición de la diana y actividad antimicrobiana (10).

En ambos casos, el primer paso en el desarrollo de un nuevo antibacteriano es encontrar un **hit**, es decir, una molécula que inhibe el crecimiento bacteriano o la acción de la diana molecular. El *hit* se puede buscar por medio de cribados de alta eficacia y, solo en la segunda aproximación, por diseño racional si se conoce la estructura de la proteína diana.

Una vez definido un *hit*, se deben realizar una serie de experimentos para confirmar que la molécula es adecuada para su posterior desarrollo como antimicrobiano. Estos

experimentos están orientados a estudiar la actividad del compuesto, la citotoxicidad y la selectividad frente a dianas humanas.

Tras estos ensayos se selecciona un compuesto cabeza de serie (*lead*), que será el punto de partida para la fase de optimización. Esta fase consiste en modificar la estructura química del *lead* para hacerlo más efectivo y seguro.

Se pueden llegar a sintetizar centenares de derivados del *lead*. Los derivados se examinan de nuevo en los ensayos biológicos y, en base a los resultados se pueden modificar de nuevo hasta establecer una relación entre la actividad del compuesto y su estructura (*Structure Activity Relationship, SAR*). Estos estudios pueden dar lugar a la selección de un candidato que pasa a ensayos de fase preclínica.

En la **fase preclínica**, se realizan ensayos *in vitro* e *in vivo*, para evaluar aspectos como la farmacocinética y la farmacodinámica, la eficacia de los compuestos frente a otros de referencia, toxicidad y las dosis adecuadas (11).

Si el candidato seleccionado pasa todos los criterios preclínicos se plantean entonces **ensayos clínicos**, que se dividen en cuatro fases:

- **Fase 1.** Los fármacos se ensayan en un grupo pequeño (entre 20 y 100) de voluntarios sanos. En esta fase se analiza la seguridad del fármaco y los parámetros farmacocinéticos ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad). Los pacientes se monitorizan para determinar qué dosis es la adecuada para los ensayos posteriores.
- **Fase 2.** En esta fase se analiza la efectividad del fármaco en un número mayor de pacientes enfermos (100 – 500). Se examina la farmacodinamia, es decir, los efectos del fármaco en pacientes infectados. También se analiza la dosis óptima y la posología.
- **Fase 3.** El fármaco se analiza en grupos grandes (más de 1.000 pacientes), para generar datos representativos de seguridad, eficacia y relación beneficio-riesgo. En esta fase se compara la eficacia del candidato con la del fármaco más eficaz disponible para la misma indicación clínica. Si el candidato supera esta fase, se puede aprobar para su comercialización.
- **Fase 4.** Tras su aprobación y comercialización, el fármaco entra en la fase de farmacovigilancia, en la que se analiza la seguridad y eficacia en toda la población.

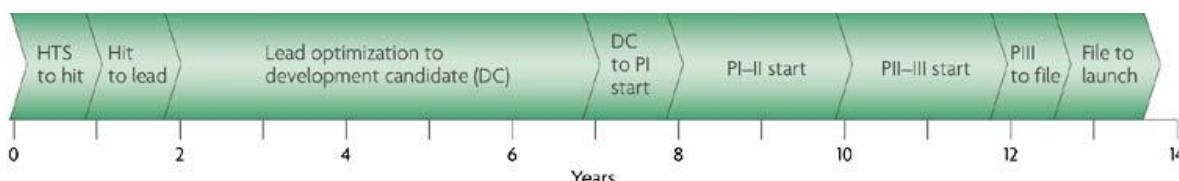


Figura 2. Etapas en el desarrollo de un fármaco. Imagen adaptada de (12).

El proceso desde que se encuentra un *hit* hasta la comercialización del antimicrobiano es largo (unos 14 años en promedio) y costoso (más de 2.000 millones de euros) (13,14). Esto supone un freno muy importante para la inversión en el desarrollo de

antimicrobianos, que se suma a la inevitable aparición de cepas resistentes. Además, los tratamientos antimicrobianos son puntuales y su uso se debe limitar para evitar la aparición de resistencias, a diferencia de los tratamientos para enfermedades crónicas, que proporcionan unas ventas prolongadas en el tiempo. Por ello, y pese a que la resistencia a antibióticos se está convirtiendo en un problema de salud mundial, muchas compañías farmacéuticas están dejando de invertir en este ámbito.

Una aproximación alternativa a la búsqueda de nuevos tratamientos es el **reposición-namiento**, es decir, la búsqueda de nuevas indicaciones médicas a fármacos ya aprobados para su uso en humanos y cuyas propiedades farmacológicas se conocen. El reposicionamiento de fármacos permite acelerar el proceso y reducir los costes de desarrollo, ya que los conocimientos previos sobre el fármaco permiten omitir o acelerar muchas fases previas a los ensayos clínicos (15).

El ejemplo de reposicionamiento por excelencia es el sildenafil, comercializado bajo el nombre de Viagra®. Este fármaco se diseñó para el tratamiento de la angina de pecho y la hipertensión arterial. Sin embargo, no pasó los criterios de superioridad. Finalmente, después de reevaluar sus propiedades, se comercializó para tratar la disfunción eréctil (15).

2.4. Las avermectinas

Las avermectinas son una familia de compuestos antiparasitarios de amplio espectro, producidos por *Streptomyces avermitilis*. Fueron descubiertas en la década de 1970 en una campaña de búsqueda de antihelmínticos llevada a cabo por el Instituto Kitasato y la fármacéutica Merck, Sharpe and Dohme (MSD) (16).

Las avermectinas son activas frente a ectoparásitos y endoparásitos, en dosis muy bajas. La ivermectina, la avermectina más conocida y de amplio uso clínico para el tratamiento de la oncocercosis, o ceguera de los ríos, es un derivado semisintético de dos de las avermectinas producidas por *S. avermitilis*.

Desde su aprobación en 1987, la ivermectina es uno de los fármacos más utilizados (más de 2.000 millones de dosis solo en las campañas de prevención de oncocercosis y filariasis linfática) y, pese a su uso en monoterapia durante varias décadas, no se han encontrado resistencias en parásitos humanos.

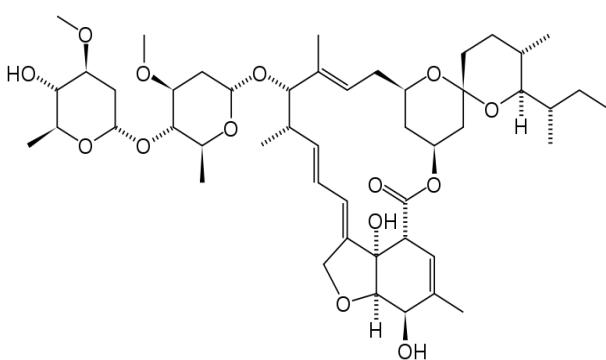


Figura 3. Estructura química de la ivermectina B1a

Su mecanismo de acción consiste en la unión selectiva a los canales de cloro regulados por glutamato de las células nerviosas y musculares de los invertebrados. Como consecuencia, se produce la entrada de cloro, la hiperpolarización de las células nerviosas y, en última instancia, la parálisis y la muerte del parásito (16).

Las avermectinas son compuestos seguros, con un margen terapéutico amplio. Esto se debe a que los mamíferos solo presentan canales de cloro regulados por glutamato en el sistema nervioso central, a los que no pueden acceder libremente. Las avermectinas no pueden atravesar la barrera hematoencefálica, ya que son sustrato de la glicoproteína-P (también conocida como ABCB1 o MDR1), aunque en dosis suficientemente elevadas pueden acceder al sistema nervioso central y ser neurotóxicas.

Además de sus aplicaciones como parasitarios, se proponen potenciales aplicaciones de las avermectinas en el control de vectores de parásitos humanos, como antivirales o antibacterianos (16). Se ha demostrado que distintos miembros de la familia de las avermectinas son capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de *M. tuberculosis*, incluyendo cepas clínicas clasificadas como MDR y XDR (17).

La avermectina de mayor actividad frente a *M. tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium* es la selamectina (17,18). La selamectina se utiliza únicamente en medicina veterinaria, para el tratamiento de parásitos en perros y gatos. Además de ser más eficaz que la ivermectina, presenta menor toxicidad en animales, por lo que el riesgo de efectos adversos es potencialmente menor (19).

Usando selamectina como modelo representativo de la familia de las avermectinas, en este TFG se pretende realizar estudios iniciales para elucidar su mecanismo de acción molecular contra las micobacterias y para ello (i) se ha caracterizado la actividad antimicrobiana de estos compuestos frente a *Mycobacterium smegmatis*, modelo no patógeno y de crecimiento rápido de *M. tuberculosis*; y (ii) se ha establecido una metodología para aislar mutantes resistentes a la selamectina.

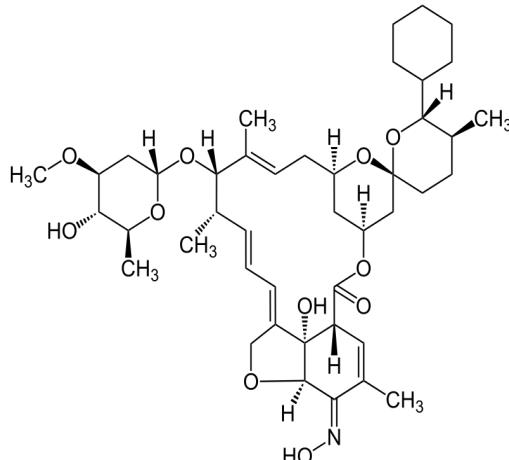


Figura 4. Estructura química de la selamectina

3. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Grado se ha planteado con el objetivo final de establecer las condiciones de ensayo que permitan aislar mutantes de *M. smegmatis* resistentes a selamectina. Para ello se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterización de la actividad de la selamectina frente a *M. smegmatis*, por medio de ensayos de determinación de la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) y cinéticas de muerte.
2. Determinación de las condiciones microbiológicas para aislar mutantes de *M. smegmatis* resistentes a selamectina.
3. Aislamiento de mutantes resistentes a selamectina de una colección de mutantes generada por transposición y validación del fenotipo de resistencia de los posibles mutantes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

La cepa de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 y la colección de mutantes de *M. smegmatis* TnSPAZ se cultivaron a 37 °C en medio líquido Middlebrook 7H9 (BD Difco) con 0,2% glicerol, suplementado con ADC (albúmina sérica bovina-dextrosa-catalasa) (BD Difco) siguiendo las instrucciones del fabricante y 0,05% tyloxapol; o en medio sólido Middlebrook 7H10 (BD Difco) suplementado con OADC (ácido oleico-albúmina sérica bovina-dextrosa-catalasa) (BD Difco).

Para estandarizar los experimentos se prepararon alícuotas de 500 µL de un cultivo líquido y se conservaron a -20 °C. A continuación, 100 µL de diluciones seriadas 1:10 fueron inoculados en placas de agar LB (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl, 17 g/L agar) y se incubaron a 37 °C. Al cabo de 72 horas se determinó la concentración de las alícuotas expresado en unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (UFC/mL).

Para realizar el ensayo de determinación de la CIM por microdilución se utilizaron además los medios líquidos LB (sin agar), Müller-Hinton II (Müller-Hinton suplementado con 22 mg/L Ca²⁺ y 12 mg/L Mg²⁺) y NE (10 g/L glucosa, 2 g/L extracto de levadura, 2 g/L Casamino Acids y 1 g/L Lab Lemco Powder).

4.2. Antibióticos

Se prepararon disoluciones stock de los distintos antibióticos a una concentración de 10 mg/mL. La selamectina se disolvió en etanol absoluto; la isoniazida y el etambutol, en agua estéril. Los stocks de isoniazida y etambutol se almacenaron a -20 °C y el de selamectina, a -80 °C para minimizar la evaporación del etanol.

Tabla 1. Antibióticos utilizados en los experimentos

Antibiótico	Referencia
Selamectina	Y0000814 (European Pharmacopoeia)
Selamectina	32476 (Sigma)
Etambutol	E-4630 (Sigma)
Isoniazida	I3377 (Sigma)

4.3. Caracterización de la actividad de los distintos antimicrobianos

4.3.1. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por microdilución

Los ensayos de determinación de la CIM por microdilución se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (TPP), en un volumen final de 150 µL y realizando duplicados técnicos. En cada placa se incluyó un control de crecimiento positivo (inóculo sin antimicrobiano) y un blanco (medio sin bacterias), ambos por cuadriplicado. También se realizó la CIM a etambutol como control de susceptibilidad de la cepa.

Las placas se prepararon con diluciones seriadas 1:2 del antibiótico correspondiente, utilizando una concentración máxima de 64 µg/mL para selamectina y etambutol y 256 µg/mL para isoniazida. Una vez hechas las diluciones, las placas se inocularon con 10^5 UFC/mL de *M. smegmatis* y se incubaron a 37 °C durante 72 horas.

Para determinar el crecimiento bacteriano se utilizó el método del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol]. Este método se basa en que la reducción del MTT (amarillo) por las enzimas oxidorreductasas de las bacterias da lugar a una sal de formazán de color violeta.

En cada pocillo se añadieron 30 µL de una disolución de MTT 5 mg/mL con un 20% de Tween-80, para disolver el precipitado de formazán. Tras añadir la disolución de MTT, las placas se incubaron a 37 °C durante 3 horas y se midió la densidad óptica a 580 nm.

Finalmente, se calculó el porcentaje de conversión de MTT con respecto al control sin antibiótico. Se definió la CIM como la concentración de antibiótico mínima que produce una inhibición de la conversión de MTT a formazán mayor o igual al 90% con respecto al control sin antibiótico.

4.3.2. Determinación de la CIM en medio sólido

La determinación de la CIM en medio sólido se hizo en placas de 24 pocillos (TPP) en un volumen final de 2,5 mL, realizando duplicados técnicos. Las placas se prepararon con diluciones 1:2 de los antibióticos en agar 7H10 con OADC. La concentración máxima ensayada fue 128 µg/mL para selamectina e isoniazida y 32 µg/mL para etambutol.

Los antibióticos se añadieron al medio sólido todavía fundido, pero atemperado, para evitar su descomposición. Este paso es de especial importancia a la hora de ensayar la actividad de la selamectina, debido a su baja solubilidad en agua. Por ello, la selamectina y el agar fundido se mezclaron cuidadosamente en tubos de 15 mL antes de verterlo en los pocillos. Para facilitar la mezcla del stock de selamectina con el agar, se hicieron diluciones seriadas 1:10 del stock, de forma que las mezclas se hicieron con un volumen de 10-50 µL del stock de la concentración adecuada.

Las placas se inocularon con 10^3 UFC de *M. smegmatis* totales por pocillo (10 µL de una suspensión 100 veces más concentrada) y se incubaron durante 72 horas a 37 °C. La CIM se definió en este caso como la concentración mínima de antibiótico para la que visualmente no se observa crecimiento bacteriano.

Para comprobar si la actividad antimicrobiana de los compuestos era dependiente del inóculo inicial, se determinó la CIM frente a inóculos mayores (10^5 y 10^7 UFC totales), siguiendo el mismo procedimiento.

4.3.3. Cinética de muerte de *M. smegmatis*

El ensayo de cinética de muerte se realizó con el objetivo de determinar el tipo de inhibición ejercida por los antibióticos sobre el crecimiento de *M. smegmatis*, es decir, para definir si son bacteriostáticos o bactericidas.

Se prepararon cultivos en medio 7H9 con 0,2% glicerol y ADC con distintas concentraciones de antibiótico (equivalentes a 0,25; 1; 4 y 10 veces la CIM) y un inóculo inicial de 10^5 UFC/mL de *M. smegmatis* mc²155.

Para analizar la viabilidad de los cultivos, se tomaron alícuotas del cultivo cada 24 horas y se hicieron diluciones seriadas 1:10 en PBS con 0,1% tyloxapol. Para cada dilución se inocularon duplicados de 100 µL en placas de agar LB y se incubaron durante 72 horas a 37 °C. Pasadas las 72 horas, se determinaron las UFC/mL del cultivo original y se representaron las curvas de muerte [log(UFC/mL) frente a tiempo].

4.3.4. Test de sinergia “checkerboard”

El ensayo “checkerboard” se utiliza para estudiar la interacción entre dos compuestos frente a una cepa determinada. Permite calcular las concentraciones inhibitorias fraccionarias (CIF) y la CIF índice, que indican si hay sinergia, antagonismo o ausencia de interacción entre los compuestos (20).

Para la realización de este ensayo se inocularon 10^5 UFC/mL de *M. smegmatis* en una placa con una matriz bidimensional de diluciones seriadas 1:2 de dos antibióticos distintos. Las placas se incubaron durante 36 o 72 horas a 37 °C. El crecimiento se determinó utilizando el método del MTT descrito previamente.

Las CIM relativas en los pocillos se utilizaron para determinar qué tipo de interacción existe entre los dos antibióticos. Se definió la CIF como la CIM del compuesto A en presencia del compuesto B dividida por la CIM del compuesto A solo (Ecuación 1). Posteriormente se representó en un isobolograma la relación entre las CIF para los compuestos A y B. Una curva cóncava representa sinergismo; una línea recta, ausencia de interacción; y una curva convexa, antagonismo.

$$CIF_A = \frac{CIM \text{ de } A \text{ en presencia de } B}{CIM \text{ de } A} \quad (\text{Ecuación 1})$$

4.4. Aislamiento de mutantes resistentes a selamectina

Una de las estrategias empleadas para caracterizar el mecanismo de acción de un antimicrobiano es seleccionar individuos resistentes al mismo y analizar los determinantes genéticos de la resistencia. Por esta razón, dadas las particularidades de la selamectina (descritas más abajo) ha sido necesario determinar las condiciones experimentales específicas para seleccionar mutantes de *M. smegmatis* resistentes a selamectina en medio sólido

Se utilizó la colección de mutantes de *M. smegmatis* TnSPAZ, cedida amablemente por la Dra. Ainhoa Lucía. Esta colección se generó por inserción al azar de un transposón en el cromosoma de *M. smegmatis*. El transposón contiene un promotor fuerte de expresión constitutiva (β -lactamasa de *Mycobacterium fortuitum*) orientado hacia fuera del transposón y un gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección.

El uso de esta colección nos permite seleccionar mutantes que, al insertarse el transposón en el genoma, sean resistentes al antibiótico por delección de un gen o por sobreexpresión del gen que quede situado a continuación del promotor fuerte del transposón.

Para el aislamiento de mutantes de *M. smegmatis*, se sembró la colección de mutantes TnSPAZ en placas de agar 7H10 con OADC con concentraciones inhibitorias de antibiótico equivalentes a 1, 2,5, 4 y 10 veces la CIM del compuesto en sólido. Las placas se prepararon añadiendo el antibiótico sobre el medio fundido, pero atemperado y mezclando cuidadosamente. Para asegurar una distribución homogénea de los antibióticos, las placas se dejaron al menos una noche a 4 °C antes de inocularlas.

Las placas se sembraron con distintas densidades de inóculo, en un rango de 10^5 a 10^8 UFC por placa. Para sembrar las placas se inocularon 500 µL de suspensión bacteriana y se repartieron uniformemente por la superficie de la placa con un asa Drigalsky. Las suspensiones bacterianas se prepararon realizando diluciones de la colección TnSPAZ en PBS. En el caso de la selamectina también se realizó el ensayo de selección de mutantes utilizando la cepa *M. smegmatis* mc²155, con un inóculo de 10^8 UFC/placa.

Para determinar el número real de UFC sembradas por placa, se sembraron placas de agar LB con diluciones seriadas 1:10 de los inóculos iniciales.

El experimento de aislamiento de mutantes se realizó también utilizando la estrategia de co-selección con concentraciones subinhibitorias de etambutol (0,2 veces la CIM de etambutol), siguiendo la metodología descrita previamente.

Las colonias aisladas se propagaron en medio 7H9 con 0,2% glicerol, 0,05% tyloxapol y ADC. A partir de los cultivos líquidos se determinó la CIM por microdilución, usando como concentración máxima 64 µg/mL, y se sembró una réplica en las mismas condiciones de las que se había aislado la colonia para verificar el fenotipo de resistencia.

Para validar que las condiciones utilizadas en la selección de mutantes eran adecuadas, se realizó en paralelo la selección de mutantes resistentes a isoniazida, un antimicrobiano cuyo modo de acción y mecanismos de resistencia son bien conocidos (21).

Tabla 2. Resumen de las condiciones experimentales utilizadas en los experimentos de selección de mutantes. Los inóculos se inocularon en placas con concentraciones equivalentes a 1, 2,5 (solo en el caso de la selamectina), 4 y 10 veces la CIM del antimicrobiano correspondiente.

Antibiótico	Cepa	Inóculos (UFC/placa)
Selamectina	<i>M. smegmatis</i> TnSPAZ	10^6 , 10^7 , 10^8
	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	10^8
Selamectina + Etambutol (0,2x CIM)	<i>M. smegmatis</i> TnSPAZ	10^6 , 10^7 , 10^8
	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	10^8
Isoniazida	<i>M. smegmatis</i> TnSPAZ	10^5 , 10^6 , 10^7

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de la actividad de la selamectina frente a *M. smegmatis* mc²155

5.1.1. Determinación de la CIM de la selamectina en medio líquido y sólido

La actividad de las avermectinas se había determinado previamente en medio 7H9 (17). Por ello, en primer lugar, nos propusimos determinar la actividad en diferentes medios para identificar las condiciones óptimas de ensayo.

Se determinó la CIM en medio líquido por microdilución, utilizando distintos medios de cultivo, puesto que la composición del medio puede influir en la actividad (Tabla 3). La CIM fue de 4 µg/mL en todos los medios, a excepción del medio 7H9 con tyloxapol, para el que se obtuvo una CIM de 64 µg/mL.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de la selamectina frente a *M. smegmatis* en los distintos medios de cultivo ensayados.

Medio	CIM (µg/mL)
7H9-0,2% glicerol-ADC	4
7H9-0,2% glicerol-ADC + 0,05% tyloxapol	64
LB	4
Müller-Hinton II	4
NE	4

El tyloxapol es un detergente que se añade a los medios de cultivo para micobacterias, para evitar la formación de agregados. La formación de estos agregados se debe a la hidrofobicidad de la pared celular de las micobacterias, y resulta problemática en algunos ensayos (como las diluciones seriadas o la determinación de la CIM por microdilución). A la vista de los resultados, se decidió utilizar medios sin tyloxapol para los ensayos posteriores.

La CIM en sólido se determinó frente a distintos inóculos de *M. smegmatis* (Tabla 4). Se utilizaron distintos inóculos con el objetivo de averiguar si la actividad de la selamectina dependía de la densidad bacteriana. Los resultados obtenidos indican una clara dependencia entre actividad inicial e inóculo.

Tabla 4. Actividad de la selamectina en medio sólido (agar 7H10 con OADC) frente a distintos inóculos de *M. smegmatis*

Inóculo inicial (UFC totales)	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL) en presencia de etambutol 0,2 µg/mL
10 ³	4	ND
10 ⁵	8	2
10 ⁷	16-32	8-32

Dado que se disponía de resultados experimentales previos (comunicación personal de Santiago Ramón García; resultados sin publicar) que sugerían una interacción sinérgica entre selamectina y etambutol, se determinó la CIM de la selamectina en presencia de concentraciones subinhibitorias de etambutol (0,2 veces la CIM).

Antes de realizar este experimento se determinó la CIM de etambutol para 10^5 y 10^7 UFC totales, obteniéndose un valor de 1 $\mu\text{g/mL}$ en ambos casos.

La presencia de etambutol disminuye 4 veces la CIM para 10^5 UFC (Figura 5, A). En el caso de 10^7 UFC, la disminución de la CIM no es tan clara, aunque sí que se observa inhibición del crecimiento en las concentraciones más altas (Figura 5, B).

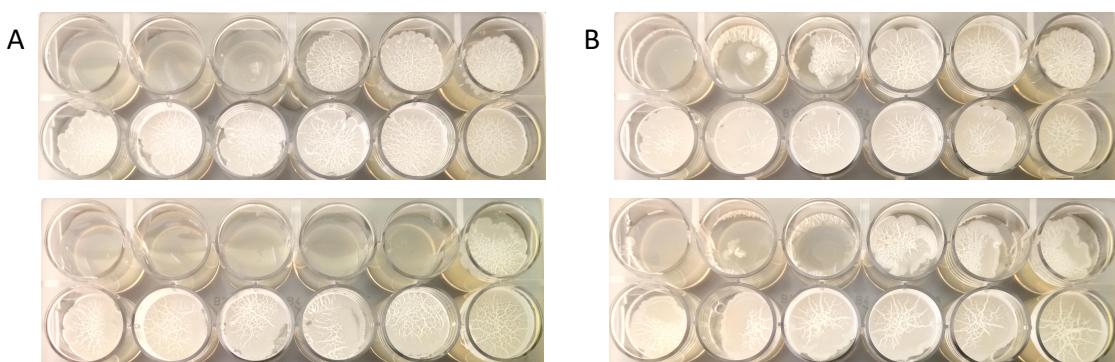


Figura 5. Ensayos de determinación de la CIM de selamectina frente a *M. smegmatis* en medio sólido. (A) CIM frente a 10^5 UFC por pocillo en medio sin etambutol (arriba) y con 0,2 $\mu\text{g/mL}$ etambutol (abajo). La concentración máxima ensayada en ambas placas es 32 $\mu\text{g/mL}$ (pocillo superior izquierdo); el pocillo inferior derecho corresponde el control de crecimiento sin selamectina. (B) CIM frente a 10^7 UFC por pocillo. Mismas concentraciones que en (A).

5.1.2. Cinética de muerte de *M. smegmatis*

Para determinar si la selamectina es bacteriostática o bactericida frente a *M. smegmatis* se realizaron curvas de muerte utilizando distintas concentraciones de selamectina (1, 4, 16, 40 $\mu\text{g/mL}$, correspondientes a 0,25, 1, 4 y 10 veces la CIM) (Figura 6, A).

El perfil de las curvas de muerte muestra que el tipo de inhibición depende de la dosis de selamectina: dosis inferiores a la CIM dan lugar a curvas de crecimiento similares a las del control; concentraciones en el rango de la CIM tienen un efecto bacteriostático; y concentraciones muy superiores a la CIM presentan efecto bactericida.

En las concentraciones bactericidas, la máxima inhibición del crecimiento se observa a las 48 horas, momento en el que el número de UFC/mL se encuentra por debajo del límite de detección. A partir de este punto se observa una reanudación del crecimiento bacteriano.

Este fenómeno podría deberse a la selección de mutantes resistentes a selamectina o a la adquisición de tolerancia. La tolerancia es la capacidad de las bacterias de sobrevivir a una exposición transitoria a concentraciones inhibitorias de un antimicrobiano.

Para confirmar la sinergia observada con etambutol en sólido se hicieron curvas de muerte para las concentraciones de selamectina de 1 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de etambutol, concentración que corresponde a 0,25 veces la CIM en líquido de etambutol (Figura 6, B).

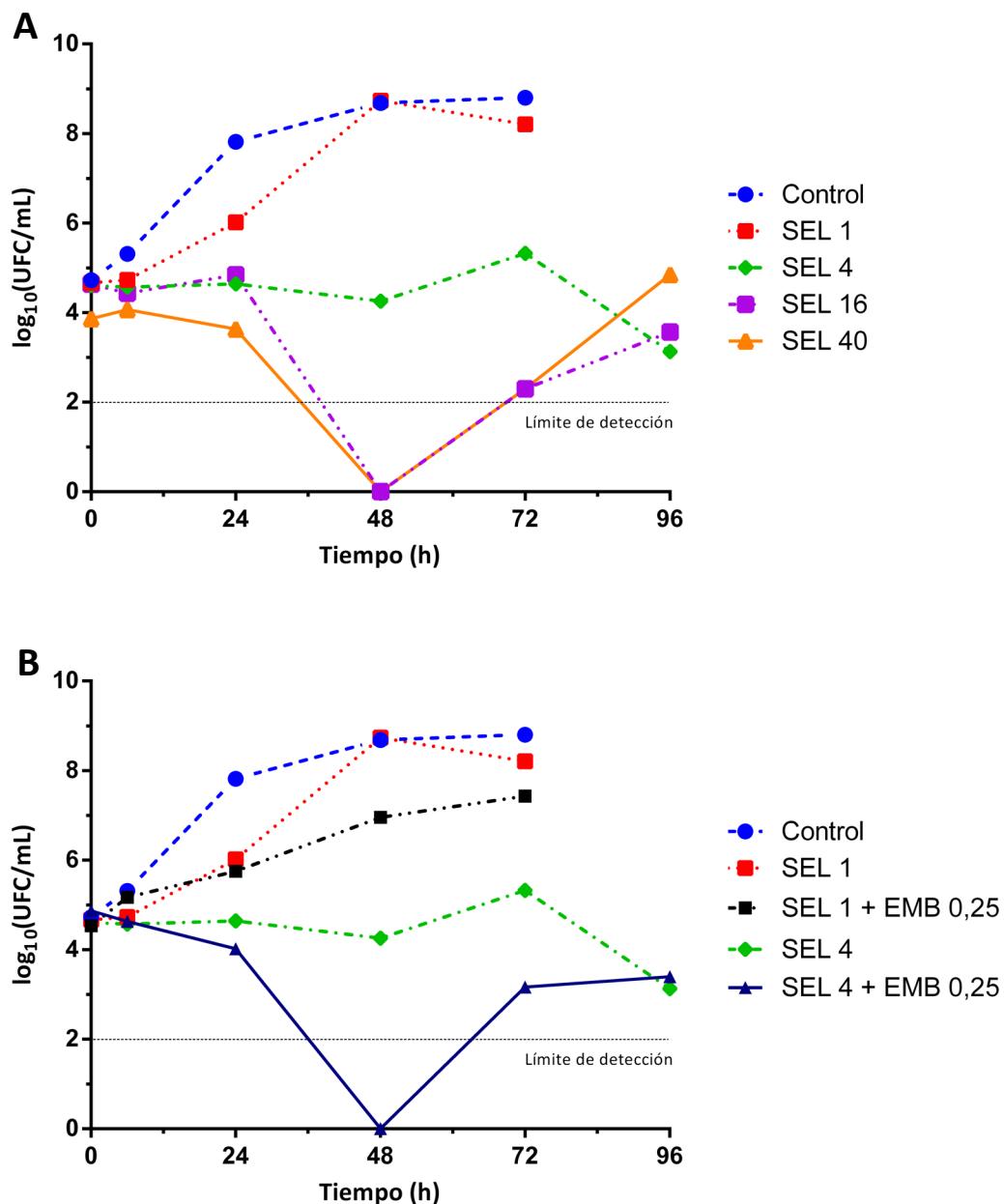


Figura 6. Cinética de muerte de la selamectina frente a *M. smegmatis* (inóculo procedente de un stock almacenado a -20 °C). Los antimicrobianos se añadieron al mismo tiempo que las bacterias. (A) Curvas de muerte para distintas concentraciones de selamectina. (B) Curvas de muerte en presencia de concentraciones subinhibitorias de etambutol.

En ambos casos, la adición de etambutol resulta en un menor crecimiento comparado con la misma concentración de selamectina. El efecto sinérgico se observa especialmente en la curva de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de selamectina: la adición de etambutol hace que esta

concentración pase de tener un efecto bacteriostático a ser bactericida. El comportamiento de la combinación es similar al de concentraciones superiores de selamectina.

Para averiguar si el efecto de la selamectina es dependiente de la fase de crecimiento, se repitió el ensayo de cinética de muerte utilizando como inóculo bacterias procedentes de un cultivo en fase de crecimiento exponencial ($DO_{600\text{ nm}} \approx 0,5$). Se analizó la respuesta de *M. smegmatis* frente a 4 y 16 $\mu\text{g/mL}$ de selamectina, y las mismas concentraciones en combinación con 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de etambutol (Figura 7).

En este caso, las curvas de muerte muestran una menor inhibición del crecimiento que en el caso de los inóculos procedentes de glicerol. La máxima inhibición del crecimiento se sigue produciendo a las 48 horas y, a partir de este punto, se produce la reanudación del crecimiento, que es más lenta cuanto mayor es la concentración de selamectina.

La menor inhibición observada en este caso puede deberse a que la mayor actividad metabólica de las bacterias previa a la exposición al antibiótico, que podría favorecer la puesta en marcha de los mecanismos de tolerancia con mayor rapidez.

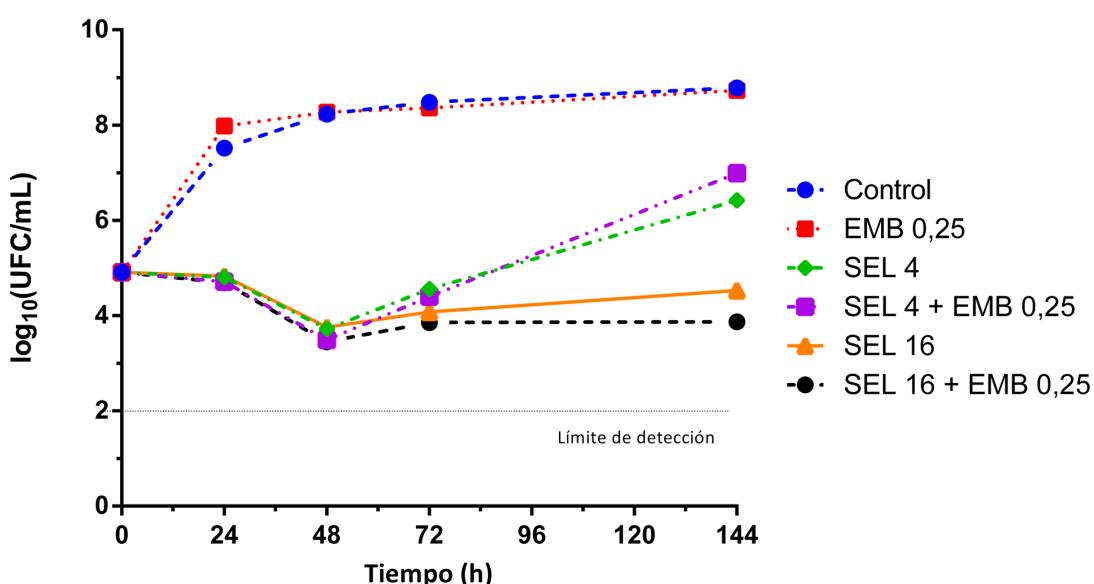


Figura 7. Cinética de muerte de la selamectina frente a inóculos de *M. smegmatis* procedentes de inóculos en fase exponencial. El volumen de inóculo inicial se determinó asumiendo que un valor de $DO_{600} = 0,125$ corresponde a 10^7 UFC/mL. Los antimicrobianos se añadieron al mismo tiempo que las bacterias.

5.1.3. Ensayo de sinergia “checkerboard”

Este ensayo se llevó a cabo para confirmar la sinergia en medio líquido entre selamectina y etambutol. Las concentraciones máximas ensayadas fueron 8 y 4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (equivalentes a 2 y 4 veces la CIM de los compuestos por separado). Tras 72 horas de incubación se determinaron las CIF y la CIF índice para cada punto. El isobolo-grama obtenido (Figura 8, derecha) muestra un perfil de no interacción (CIF índice = 1) entre los dos antimicrobianos.

Este resultado es consistente con lo observado en la cinética de muerte de *M. smegmatis* (Figura 6, B): a las 72 horas se reanuda el crecimiento bacteriano y no se observa el efecto sinérgico.

Por ello, se realizó de nuevo el ensayo de sinergia, pero incubando las bacterias únicamente 36 horas antes de añadir el MTT. En este caso sí que se observa un perfil de interacción sinérgica, pese a que no pudo determinarse la CIM para el etambutol. Por ello, para calcular las CIF del etambutol y poder determinar el tipo de interacción (Figura 8, izquierda) se asumió un valor de CIM de 8 µg/mL. La CIF índice obtenida en este caso fue de 0,375, confirmando la interacción sinérgica observada en los ensayos anteriores.

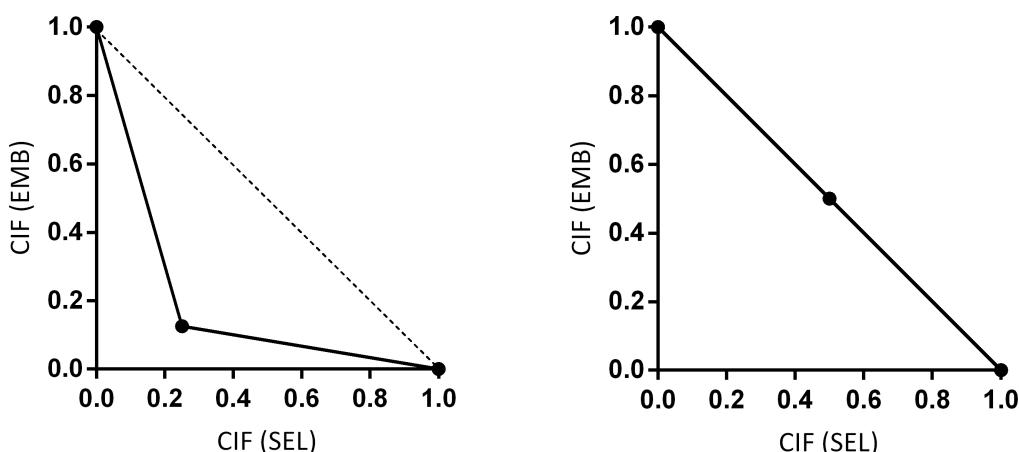


Figura 8. Perfil de interacción entre la selamectina y el etambutol tras 36 (izquierda) o 72 horas de incubación (derecha). Para cada tiempo de incubación se determinaron las CIF y se representaron en forma de isobogramas.

5.2. Aislamiento de mutantes resistentes a selamectina en medio sólido

Una vez caracterizada la actividad de la selamectina frente a *M. smegmatis*, se trató de aislar mutantes resistentes a selamectina en medio sólido. Para determinar las condiciones experimentales del ensayo hubo que tener en cuenta que la selamectina presenta una serie de particularidades que influyen en el diseño experimental.

En primer lugar, hubo que ajustar la concentración de antibiótico al inóculo inicial, dada la dependencia entre la CIM y el inóculo inicial (Tabla 4). Para ajustar la concentración al inóculo inicial se debió tener en cuenta que la densidad superficial de bacterias es diferente en la placa de CIM (las bacterias se reparten en el área de un círculo de unos 9-10 mm de diámetro) y en la placa de Petri de 90 mm de diámetro. Es decir, la densidad bacteriana en la placa de Petri equivale a la de un inóculo 100 veces menor en la placa de CIM.

Para favorecer la aparición de mutantes resistentes a selamectina, se utilizó la colección de mutantes TnSPAZ. El uso de esta colección nos permite ensayar un número elevado de mutantes utilizando inóculos mucho menores que si se utilizase la cepa silvestre (*mc²155*). Por esta razón, se ensayaron inóculos de 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC totales en el caso de la colección TnSPAZ y únicamente 10^8 UFC en el caso de la cepa *mc²155*.

Los distintos inóculos se sembraron en placas de medio sólido 7H10 con OADC con 8, 20, 32 u 80 µg/mL de selamectina (concentraciones equivalentes a 1, 2,5, 4 y 10 veces la CIM frente al inóculo de 10^5 UFC).

También se trató de aislar mutantes resistentes aprovechando la sinergia observada con el etambutol en medio sólido. En este caso, los inóculos se sembraron en agar 7H10 con OADC y 0,2 µg/mL de etambutol, suplementadas con 2, 8 o 20 µg/mL de selamectina (1, 4 y 10 veces la CIM frente a 10^5 UFC).

Se observó crecimiento bacteriano en varias de las placas con selamectina (Figura 9, A), tanto en placas sin etambutol como con etambutol. Sin embargo, ninguna de las 50 colonias tomadas de las placas presenta una CIM mayor a la de la cepa mc²155 (Figura 9, B). Además, los mutantes aislados son incapaces de crecer en placas de agar con concentraciones inhibitorias de selamectina tras su propagación en medio sin selamectina.

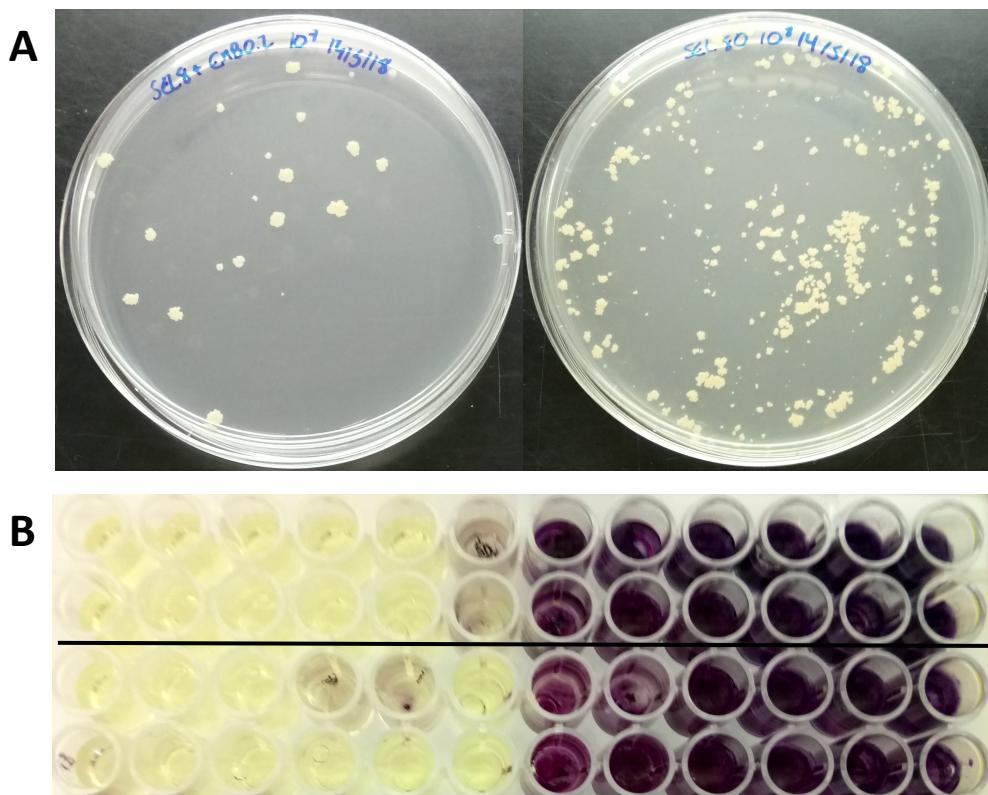


Figura 9. Selección de mutantes resistentes a selamectina. (A) Placas con colonias aisladas en presencia de concentraciones inhibitorias de selamectina. (B) Comparación de la CIM obtenida por microdilución para la cepa silvestre (arriba) y uno de los mutantes aislados (abajo). La concentración máxima de selamectina, situada en la columna de la izquierda, es 64 µg/mL. La última columna corresponde al control de crecimiento sin selamectina.

Como control interno, para validar que las condiciones experimentales eran adecuadas para aislar mutantes resistentes, se realizó el ensayo de aislamiento de mutantes con isoniazida. Para ello, se determinó previamente la CIM en líquido (64 µg/mL) y en sólido (16 µg/mL para el inóculo de 10^5 UFC por pocillo). Los distintos inóculos (10^5 , 10^6

o 10^7 UFC) se sembraron en placas de 7H10 con OADC con 16, 64 o 160 µg/mL de isoniazida (1, 4 o 10 veces la CIM).

En las placas de isoniazida se consiguió aislar mutantes resistentes en 7 de las 9 condiciones ensayadas (Figura 10, A). Se seleccionaron 7 colonias al azar entre las que habían crecido en las placas de 64 µg/mL. Todas ellas crecieron en placas de agar con la misma concentración de isoniazida tras un pase en medio líquido sin isoniazida y la CIM de isoniazida fue superior a 256 µg/mL, confirmando la viabilidad de la técnica a la hora de identificar mutantes.

En la Tabla S1 se muestra un resumen de las condiciones utilizadas en los ensayos de selección de mutantes resistentes a selamectina e isoniazida y los resultados obtenidos para cada condición.

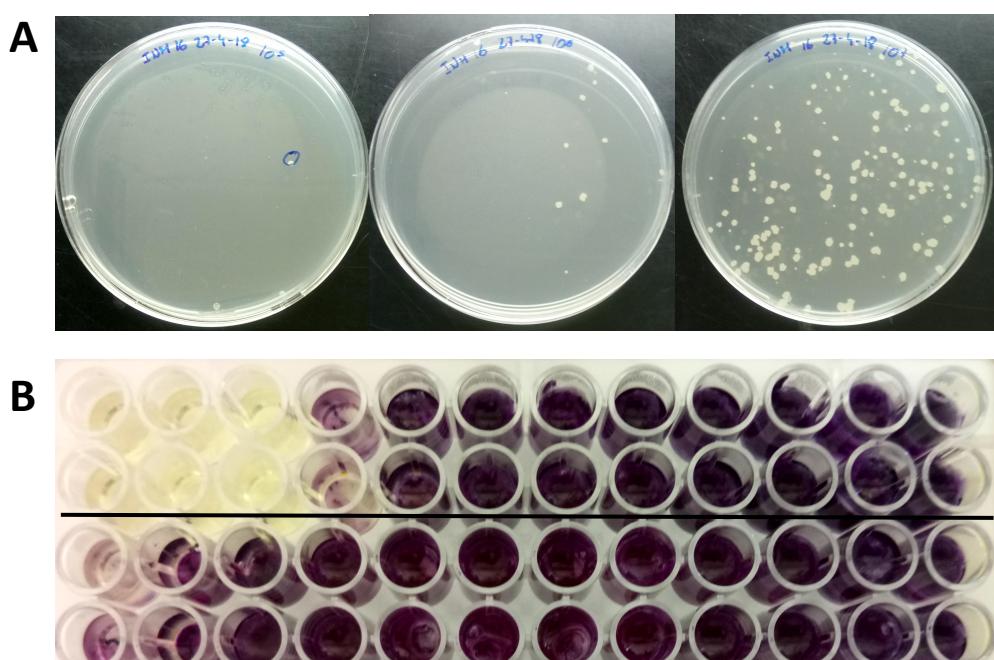


Figura 10. Selección de mutantes resistentes a isoniazida. (A) Placas con colonias aisladas en presencia de concentraciones inhibitorias de isoniazida. Las placas contienen la misma concentración de isoniazida (16 µg/mL) e inóculos crecientes de izquierda a derecha (10^5 , 10^6 y 10^7 UFC totales). (B) Comparación de la CIM obtenida por microdilución para la cepa silvestre (arriba) y uno de los mutantes aislados (abajo). La concentración máxima de isoniazida, situada en la columna de la izquierda, es 256 µg/mL. La última columna corresponde al control de crecimiento sin isoniazida.

6. DISCUSIÓN GLOBAL DE RESULTADOS

Siete décadas después del descubrimiento de los primeros antimicrobianos activos frente a *M. tuberculosis*, la tuberculosis sigue siendo un problema de salud global. Hoy en día, las opciones de tratamiento para la tuberculosis son limitadas, debido a que *M. tuberculosis* presenta resistencia intrínseca a la mayoría de los antimicrobianos de uso clínico (22).

Además, la creciente incidencia de cepas MDR y XDR representa una limitación adicional de los tratamientos disponibles en la actualidad. Por ello, los esfuerzos se centran actualmente en el desarrollo de antimicrobianos que sean eficaces frente a todas las cepas de tuberculosis y mejoren la eficacia de los tratamientos actuales (23).

En una campaña de descubrimiento de compuestos activos frente a *M. tuberculosis* se encontró que las avermectinas, una familia de antiparasitarios de amplio espectro que se habían considerado inactivos frente a bacterias, presentaban actividad frente a distintas cepas de *M. tuberculosis*, incluyendo cepas MDR y XDR. Por ello se propusieron como candidatas para ser reposicionadas para el tratamiento de la tuberculosis (17).

Hoy en día se desconoce el mecanismo de acción molecular de las avermectinas frente al género *Mycobacterium*. Conocer su modo de acción es un punto clave para su reposicionamiento, puesto que permitirá establecer las bases para futuros estudios de las relaciones entre estructura y actividad y, en base a estas, modificar los compuestos para aumentar su actividad frente a micobacterias y disminuir su toxicidad.

Para caracterizar el modo de acción de un nuevo antimicrobiano, se pueden utilizar distintas aproximaciones experimentales. Una estrategia muy utilizada es la selección de mutantes (espontáneos o generados previamente) resistentes en medio sólido y la posterior caracterización del genotipo de resistencia (24). Otras aproximaciones que se pueden emplear son la selección de mutantes hipersensibles en bibliotecas de mutantes y la confirmación de las mutaciones que incrementan la sensibilidad; la selección de mutantes resistentes en medio utilizando pasos seriados en concentraciones crecientes de antibiótico y secuenciación de genoma completo (25); y el uso de herramientas de transcriptómica (RNAseq) y proteómica (26).

Para aislar mutantes resistentes a selamectina se escogió la estrategia de selección en medio sólido utilizando una colección de mutantes generados por transposición, ya que estudios previos utilizando la técnica de selección de mutantes en medio sólido a partir de la cepa silvestre no resultó fructífera (Santiago Ramón García, datos no publicados). Antes de llevar a cabo este ensayo fue necesario establecer las condiciones experimentales y caracterizar la actividad *in vitro* de la selamectina frente a *M. smegmatis*.

La actividad de la selamectina se caracterizó por medio de ensayos de CIM por microdilución y en medio sólido y cinéticas de muerte. Los valores de CIM obtenidos en los

medios de micobacterias (7H9 y 7H10) son reproducibles entre sí y comparables con los descritos previamente (17).

La presencia de tyloxapol en los medios de cultivo reduce de forma significativa la actividad de la selamectina. La selamectina es un compuesto muy poco soluble en agua, por lo que el tyloxapol, que es un detergente, podría interactuar con la selamectina y disminuir la concentración efectiva a la que se encuentra expuesta la bacteria.

La relación observada entre la actividad de la selamectina y el inóculo inicial fue un hecho clave en el diseño experimental del ensayo de selección de mutantes. Habitualmente, estos ensayos se realizan con inóculos de hasta 10^9 bacterias en placas de menor tamaño, tomando además como valores de referencia de CIM los determinados para inóculos bajos (entre 10^3 y 10^5 bacterias) (24). En este ensayo, sin embargo, no se utilizaron inóculos tan elevados para facilitar el aislamiento de colonias resistentes, ya que además los valores de CIM de la selamectina aumentaban a inóculos altos.

El ensayo de selección de mutantes permitió aislar colonias en placas con concentraciones elevadas de selamectina (hasta 10 veces la CIM). Sin embargo, ninguna de las colonias propagadas para validar su fenotipo de resistencia presentó una menor susceptibilidad a la selamectina. La presencia de estas colonias puede deberse a la puesta en marcha de mecanismos de tolerancia a la selamectina.

El género *Mycobacterium* presenta una serie de mecanismos de tolerancia a los antibióticos, responsables de que muchos de ellos no se puedan utilizar en clínica. Entre los mecanismos de tolerancia se encuentran la pared celular propia de las micobacterias, que dificulta el acceso de los antimicrobianos a sus dianas; las bombas de eflujo, transportadores que expulsan los antimicrobianos que son capaces de acceder al citoplasma; enzimas que modifican o degradan los antimicrobianos; y enzimas que modifican la diana haciéndola insensible a la acción del compuesto (22).

La metodología empleada para la selección de mutantes resistentes a selamectina sí permitió aislar mutantes resistentes a isoniazida, validando la adecuación de la técnica para seleccionar individuos resistentes.

La isoniazida se emplea en el tratamiento de primera línea de la tuberculosis y presenta una frecuencia de aparición de resistencias relativamente alta (10^{-6} para *M. smegmatis in vitro*) (27). Por el contrario, los resultados sugieren que la frecuencia de aparición de resistencias a la selamectina es mucho menor, hecho ventajoso en el uso del compuesto como antimicrobiano.

En el futuro se plantea la posibilidad de utilizar concentraciones de selamectina mucho más altas para tratar de evitar la aparición de colonias de bacterias tolerantes y seleccionar únicamente aquellas con mutaciones que proporcionen un fenotipo de resistencia permanente.

También se plantea la posibilidad de utilizar otro modelo para la selección de mutantes. El uso de *M. smegmatis* como modelo de *M. tuberculosis* se basa en dos razones: no es patógeno y su crecimiento es mucho más rápido que *M. tuberculosis* (tiempo de duplicación de 3 horas, frente a 24 horas de *M. tuberculosis*), aunque más lento que otros modelos como *Escherichia coli*, cuyo tiempo de duplicación es de 20 minutos. Sin embargo, *M. smegmatis* puede no ser el mejor modelo para estudiar el modo de acción de un fármaco frente a tuberculosis, puesto que su genoma contiene casi 3.000 genes más (el genoma de *M. tuberculosis* contiene cerca de 4.000). Un modelo más adecuado podría ser *M. bovis* BCG (cepa atenuada utilizada actualmente como vacuna), con un genoma mucho más parecido al de *M. tuberculosis*.

Las avermectinas son fármacos antiparasitarios ampliamente utilizados, con unas ventas anuales cercanas a los 1.000 millones de dólares. La selamectina, la avermectina más activa frente a *M. tuberculosis*, no está aprobada para su uso humano, por lo que, al igual que los potenciales derivados obtenidos tras conocer el mecanismo de acción, debería evaluarse en ensayos clínicos.

La ruta biosintética de producción de las avermectinas es bien conocida y se está planteando el uso de biología sintética para producir derivados de las avermectinas en microorganismos recombinantes (28,29). Esto facilitaría el uso a gran escala en el tratamiento de la tuberculosis.

En resumen, en este TFG se han establecido las bases iniciales para la determinación del mecanismo de acción de la selamectina, como molécula modelo de la familia de las avermectinas. Conocer esta información permitirá optimizar el desarrollo de estos fármacos como potenciales antibióticos contra la tuberculosis.

7. CONCLUSIONES

1. El uso de medios de cultivo con tyloxapol reduce la actividad de la selamectina frente a *M. smegmatis*.
2. La actividad de la selamectina frente a *M. smegmatis* depende del inóculo bacteriano al que se enfrente.
3. La combinación de selamectina con concentraciones subinhibitorias de etambutol potencia su actividad.
4. La metodología empleada permite aislar colonias resistentes a selamectina, pero el fenotipo resistente es transitorio.
5. Ha sido posible aislar mutantes resistentes a isoniazida, lo cual confirma la viabilidad de la metodología empleada y sugiere una frecuencia de aparición de mutantes resistentes a la selamectina muy baja, lo cual es beneficioso desde el punto de vista de su aplicación terapéutica.

7. CONCLUSIONS

1. The use of culture media with tyloxapol reduces the activity of selamectin against *M. smegmatis*.
2. The activity of selamectin against *M. smegmatis* depends on the inoculum it is faced.
3. Combination of selamectin with sub-inhibitory doses of ethambutol enhances its activity.
4. The methodology used allows for isolating colonies resistant to selamectin, but the resistant phenotype is transient.
5. Mutants resistant to isoniazid have been isolated, which confirms the viability of the methodology used and suggests that mutants resistant to selamectin appear at a very low rate, which is beneficial from the standpoint of its clinical application.

8. REFERENCIAS

1. WHO. Global Tuberculosis Report. 2017.
2. Pareek M, Greenaway C, Noori T, Munoz J, Zenner D. The impact of migration on tuberculosis epidemiology and control in high-income countries: A review. *BMC Med.* 2016;14(1):48.
3. Cano-Portero R, Amillategui-dos Santos R, Boix-Martínez R, Larrauri-Cámara A. Epidemiología de la tuberculosis en España. Resultados obtenidos por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en el año 2015. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2018;36(3):179–86.
4. Dirección General de Salud Pública, Gobierno de Aragón. Informe de Vigilancia Epidemiológica de la Tuberculosis en Aragón. 2016.
5. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):354–73.
6. Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature.* 2011;469(7331):483–90.
7. WHO. Companion handbook to the WHO guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis. 2014.
8. WHO, Global Tuberculosis Programme. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis : 2016 update. 2016.
9. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature.* 2016;529(7586):336–43.
10. Fernandes P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? *Nat Biotechnol.* 2006;24(12):1497–503.
11. S.Chorhade M. Drug Discovery and Development. 2006.
12. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: Confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(1):29–40.
13. DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: New estimates of drug development costs. *J Health Econ.* 2003;22(2):151–85.
14. DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ.* 2016;47:20–33.
15. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(8):673–83.
16. Omura S, Crump A. Ivermectin: Panacea for resource-poor communities? Vol. 30, Trends in Parasitology. 2014. p. 445–55.
17. Lim LE, Vilchèze C, Ng C, Jacobs WR, Ramón-García S, Thompson CJ. Anthelmintic avermectins kill *Mycobacterium tuberculosis*, including multidrug-resistant clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(2):1040–6.

18. Scherr N, Pluschke G, Thompson CJ, Ramón-García S. Selamectin is the avermectin with the best potential for Buruli ulcer treatment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(8):1–10.
19. Gupta RC. Ivermectin and selamectin. *Veterinary Toxicology*. Elsevier Inc.; 2007.
20. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(1):1–1.
21. Vilchèze C, Jacobs JR, WR. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr* 2014;2(4):1–21.
22. Nguyen L, Thompson CJ. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. *Trends Microbiol.* 2006;14(7):304–12.
23. Wallis RS, Cohen T, Menzies NA, Churchyard G. Pan-tuberculosis regimens: an argument for. *Lancet Respir Med.* 2018;6(4):239–40.
24. Ioerger TR, O’Malley T, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Mohaideen N, et al. Identification of New Drug Targets and Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2013;8(9):1–13.
25. Leeds JA, Sachdeva M, Mullin S, Whitney Barnes S, Ruzin A. In vitro selection, via serial passage, of *Clostridium difficile* mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(1):41–4.
26. Pulido MR, García-Quintanilla M, Gil-Marqués ML, McConnell MJ. Identifying targets for antibiotic development using omics technologies. *Drug Discov Today.* 2016;21(3):465–72.
27. Heym B, Cole ST. Isolation and characterization of isoniazid-resistant mutants of *Mycobacterium smegmatis* and *M. aurum*. *Res Microbiol.* 1992 Sep;143(7):721–30.
28. Ōmura S. A Splendid Gift from the Earth: The Origins and Impact of the Avermectins (Nobel Lecture). *Angew Chemie - Int Ed.* 2016;55(35):10190–209.
29. Thuan NH, Pandey RP, Sohng JK. Recent advances in biochemistry and biotechnological synthesis of avermectins and their derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(18):7747–59.

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S5. Resumen de las condiciones experimentales utilizadas en el ensayo de selección de mutantes resistentes a selamectina e isoniazida

Concentración de antimicrobiano (veces CIM)	Inóculo inicial	Se han aislado colonias en medio sólido	La CIM ¹ frente a los mutantes es mayor que frente a la cepa silvestre	Los mutantes replican el crecimiento en medio sólido ²
Aislamiento de mutantes resistentes a selamectina (colección TnSPAZ)				
8 µg/mL (1x)	10 ⁶ UFC	Sí	ND	ND
	10 ⁷ UFC	Sí	No	No
	10 ⁸ UFC	Sí	ND	ND
20 µg/mL (2,5x)	10 ⁷ UFC	Sí	ND	ND
	10 ⁸ UFC	Sí	ND	ND
32 µg/mL (4x)	10 ⁶ UFC	No	-	-
	10 ⁷ UFC	Sí	No	No
80 µg/mL (10x)	10 ⁶ UFC	No	-	-
	10 ⁷ UFC	No	-	-
	10 ⁸ UFC	Sí	No	No
2 µg/mL + 0,2 µg/mL EMB ³ (1x)	10 ⁶ UFC	Sí	ND	ND
	10 ⁷ UFC	Sí	ND	ND
8 µg/mL + 0,2 µg/mL EMB (4x)	10 ⁶ UFC	Sí	No	No
	10 ⁷ UFC	Sí	No	No
20 µg/mL + 0,2 µg/mL EMB (10x)	10 ⁶ UFC	No	-	-
	10 ⁷ UFC	Sí	No	No
	10 ⁸ UFC	Sí	No	No
Aislamiento de mutantes resistentes a selamectina (cepa silvestre)				
8 µg/mL (1x)	10 ⁸ UFC	Sí	ND	ND
20 µg/mL (2,5x)	10 ⁸ UFC	Sí	ND	ND
80 µg/mL (10x)	10 ⁸ UFC	Sí	ND	ND
8 µg/mL + 0,2 µg/mL EMB (4x)	10 ⁸ UFC	Sí	ND	ND
20 µg/mL + 0,2 µg/mL EMB (10x)	10 ⁸ UFC	Sí	ND	ND

Concentración de antimicrobiano (veces CIM)	Inóculo inicial	Se han aislado colonias en medio sólido	La CIM ¹ frente a los mutantes es mayor que frente a la cepa silvestre	Los mutantes replican el crecimiento en medio sólido ²
Aislamiento de mutantes resistentes a isoniazida (colección TnSPAZ)				
16 µg/mL (1x)	10 ⁵ UFC	Sí	ND	ND
	10 ⁶ UFC	Sí	ND	ND
	10 ⁷ UFC	Sí	ND	ND
64 µg/mL (4x)	10 ⁵ UFC	Sí	Sí	Sí
	10 ⁶ UFC	Sí	Sí	Sí
	10 ⁷ UFC	Sí	Sí	Sí
160 µg/mL (10x)	10 ⁵ UFC	No	-	-
	10 ⁶ UFC	No	-	-
	10 ⁷ UFC	Sí	ND	ND

¹La CIM de la selamectina frente a los mutantes seleccionados al azar se ha determinado utilizando las mismas condiciones que la cepa silvestre (medio 7H9, con 0,2% glicerol y ADC, 72 horas de incubación a 37 °C y 3 horas de incubación con MTT). El inóculo inicial procede en todos los casos de un cultivo líquido sin antimicrobiano en fase estacionaria.

²Las réplicas en medio sólido proceden del cultivo líquido utilizado para la determinación de la CIM.

³EMB: etambutol