



# Trabajo Fin de Máster

Caracterización fenotípica de posibles determinantes genéticos de resistencia a las avermectinas en micobacterias  
Phenotypic characterization of possible avermectin resistance genetic determinants in mycobacteria

**Autor**

Darío Bazco Marco

**Director**

José Manuel Ezquerra Aznárez

**Co-Director**

Santiago Ramón García

Departamento de Microbiología, Pediatría, Radiología y Salud Pública  
de la Universidad de Zaragoza

Facultad de Medicina

Curso 2021/2022

# Índice

RESUMEN .....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
Historia de la tuberculosis .....	6
Tratamiento de la tuberculosis y resistencia antimicrobiana .....	8
Desarrollo de fármacos.....	10
Ensayos preclínicos .....	11
Fases del desarrollo clínico .....	13
Reposiciónamiento de fármacos .....	15
Avermectinas .....	16
Pared bacteriana.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
3.1) Cepas, condiciones de cultivo e incubación .....	21
3.1.1) Cepas utilizadas .....	21
3.1.2) Condiciones de cultivo.....	22
3.2) Compuestos .....	23
3.3) Ingeniería genética .....	23
3.3.1) Estrategias de clonaje y plásmido utilizado.....	23
3.3.2) Diseño de oligonucleótidos .....	24
3.3.3) Extracción de DNA genómico .....	25
3.3.4) Proceso de amplificación por PCR, digestión, ligación y transformación .....	26
3.3.5) Preparación de bacterias termocompetentes de <i>E. coli</i> y transformación por choque térmico .....	28
3.3.6) Preparación de bacterias electrocompetentes de <i>M. smegmatis</i> y transformación por electroporación .....	28
3.4) Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos .....	29
3.4.1) Determinación de la CMI por microdilución .....	29
3.4.2) Checkerboards.....	30
3.4.3) Ensayos de sinergia.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
4.1) Clonaje de vector e insertos .....	33
4.2) Amplificación por PCR, digestión, ligación y transformación.....	33
4.3) Electroporación en <i>M. smegmatis</i> .....	36

4.4) Caracterización de las cepas de sobreexpresión de <i>M. smegmatis</i> .....	36
4.5) Caracterización de las distintas cepas de expresión de EmbB.....	40
5. Discusión .....	42
6. CONCLUSIONES.....	44
6. CONCLUSIONS.....	44
7. REFERENCIAS.....	46

## Índice de tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio y sus principales rasgos. ....	22
Tabla 2. Antimicrobianos utilizados .....	23
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para el clonaje.....	25
Tabla 4. Genes digeridos enzimáticamente y condiciones. ....	27
Tabla 5. Valores de las CMI para cada compuesto distinguiendo las cepas estudiadas en ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos, comparadas con la cepa wildtype.)....	37
Tabla 6. Distintas CIF entre cepas.....	38
Tabla 7. Ratios de variación entre la CMI.....	39
Tabla 8. Ratios de la variación entre la CMI de cada compuesto.....	40
Tabla 9. Valores de las CMI para los distintos compuestos estudiados.....	40
Tabla 10. Distintas CIF entre diferentes cepas de expresión del gen <i>embB</i> . .....	41

## Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Cálculo de CIF. ....	31
Ecuación 2. Ratios de las CMI para determinar el perfil de sinergia.....	32

## Índice de figuras

Figura 1. Mapa mundial de la incidencia de la tuberculosis en 2021 .....	7
Figura 2. Etapas y fases del desarrollo preclínico y clínico de fármacos .....	15
Figura 3. Estructura de la ivermectina y selamectina.....	17
Figura 4. Mapa circular del plásmido pMV261.....	24
Figura 5. Electroforesis de los productos de la PCR de colonia de las cepas de sobreexpresión de MurC-MurF y Ddl. ....	34

## RESUMEN

*Mycobacterium tuberculosis* es el patógeno causante de la tuberculosis, enfermedad que lleva afectando miles de años a la humanidad. Desde su identificación como la causante de un gran número de muertes en todo el mundo se ha buscado eliminarla de múltiples maneras. Pese a los esfuerzos realizados por la comunidad científica para desarrollar nuevos fármacos, esta bacteria continúa matando debido a su habilidad para generar resistencia a los medicamentos que se administran a los afectados. Estas resistencias muestran la necesidad de desarrollar nuevos fármacos en la lucha contra la tuberculosis. Una aproximación para acelerar este proceso es el reposicionamiento de fármacos, la búsqueda de nuevas indicaciones para fármacos ya aprobados. En este concepto se ha basado el trabajo realizado.

Basándose en este concepto, se ha descubierto que las avermectinas, una familia de antihelmínticos, son activas frente a micobacterias. Sobre esta base ha trabajado el Grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza, que han realizado ensayos previos a este trabajo que sugieren que las avermectinas pueden actuar sobre la síntesis de la pared bacteriana. De entre todas las avermectinas, se ha elegido la selamectina como modelo experimental. Para estudiar esta característica de las avermectinas, se han construido mutantes de sobreexpresión de varios genes implicados en la síntesis de la pared de micobacterias (*murD*, *murE* y *ddl*) y se han estudiado junto a *embB* en pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. De estos ensayos, se ha concluido que la selamectina no necesita atravesar la pared celular para actuar contra micobacterias, y que la sobreexpresión de los genes implicados en la síntesis de pared no afectan a su actividad. También se ha visto que la mutación R307H del gen *embB* confiere resistencia a etambutol, y que la delección del mismo aumenta la permeabilidad de la membrana a otros compuestos. Por último, se han detectado perfiles de sinergia entre la vancomicina, rifampicina y etambutol con la selamectina.

## ABSTRACT

*Mycobacterium tuberculosis* is the pathogen that causes tuberculosis, a disease that has been affecting humanity for thousands of years. Since its identification as the cause of a large number of deaths throughout the world, it has been sought to be eradicated in multiple ways. Due to this, the search and development of drugs with which to eliminate this disease is a primary goal in the field of research. Despite the efforts made by the scientific community, this bacterium continues to kill due to its ability to generate resistance to the drugs that are administered to those affected. These resistances show the need to develop new drugs in the fight against tuberculosis. Drug repositioning has emerged as an alternative to the canonical drug discovery process. The work carried out has been based on this concept.

Based on this concept, it was discovered that avermectins, a family of broad-spectrum anthelmintics, are active against mycobacteria. The Mycobacterial Genetics Group at the University of Zaragoza has been working on this basis, carrying out tests prior to this work that suggest that avermectins may be involved in the synthesis of the bacterial cell wall. Among all the avermectins, selamectin has been chosen as experimental model.

To study this characteristic of avermectins, overexpression mutants of several genes involved in the synthesis of the mycobacterial wall (*murD*, *murE* and *ddl*) have been constructed and have been studied together with *embB* in antimicrobial susceptibility tests. From these tests, it has been concluded that selamectin does not need to cross the cell wall to act against mycobacteria, and that genes involved in cell wall synthesis do not affect its mechanism of action. It has also been found that the R307H mutation of the *embB* gene confers resistance to ethambutol, and that its deletion increases membrane permeability to other compounds. Finally, synergy profiles between vancomycin, rifampicin and ethambutol with selamectin have been detected.

## 1. INTRODUCCIÓN

### Historia de la tuberculosis

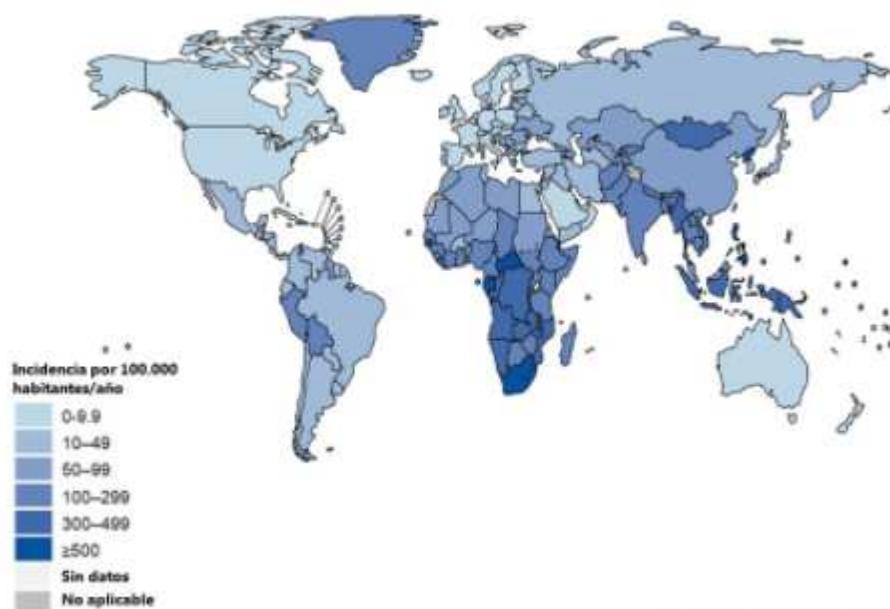
La tuberculosis es una enfermedad causada por una bacteria denominada *Mycobacterium tuberculosis*. Esta patología lleva afectando a la humanidad desde antes incluso de que pudiera ser demostrada la presencia de este microorganismo. Tal es su antigüedad que se han llegado a descubrir momias egipcias y restos humanos del período del Neolítico con señales inequívocas de haber sufrido esta afección, probablemente unida al comienzo de la domesticación de la ganadería. Este patógeno es el causante del mayor número de muertes humanas en la historia de los microorganismos(1).

Pese a ello, no fue hasta el siglo XIX cuando la tuberculosis experimentó su pico de incidencia y muertes provocadas. Debido a la elevada prevalencia de la enfermedad, se buscaba una cura o tratamiento contra la tuberculosis desde que se identificó el patógeno que la provoca. Pese a estos esfuerzos por lidiar con la tuberculosis, esta continuaba indescifrable para los médicos hasta que, a finales del siglo XIX (1882), Robert Koch saca a la luz sus estudios sobre el agente causante de la tuberculosis, un bacilo que él mismo inoculaba en animales para desarrollar y estudiar la enfermedad(1). A partir de este momento se vieron incrementadas las posibilidades de búsqueda de tratamientos y diagnósticos contra esta enfermedad. El tratamiento o medida preventiva por excelencia en este siglo fue la construcción de sanatorios para derivar a los enfermos de tuberculosis a espacios amplios donde pudieran respirar aire fresco y recibir un tratamiento más adecuado(2).

Desde 1936, se probaron varias sulfonas y sulfonamidas, así como la penicilina; pero no fue hasta el año 1944 cuando Selman Waksman y Albert Schatz identificaron el primer antibiótico contra la tuberculosis, la estreptomicina, aislada de una cepa de *Streptomyces griseus*. La estreptomicina resultó ser bastante eficaz, al mismo tiempo que generaba muy rápidamente cepas de tuberculosis resistentes al antibiótico. Debido a esta resistencia, se comenzaron a desarrollar nuevos antibióticos como el ácido para-aminosalicílico (descartado pronto por su alta toxicidad) o la isoniazida, descubierta en 1952 y primer fármaco oral micobactericida que presentaba una mayor

actividad que la estreptomicina(1). Más adelante surgieron otros como la pirazinamida, cicloserina, etambutol o rifampicina.

Gracias a estos numerosos descubrimientos se logró frenar el avance de la enfermedad durante varias décadas, hasta finales del siglo XX, cuando se anunció la vuelta a niveles de alerta debido a la aparición de cepas multirresistentes, el VIH o las malas condiciones sanitarias de algunos países. Por todo esto, la tuberculosis ha sido la primera causa de muerte entre las enfermedades infecciosas en las últimas décadas. En 2020, 10 millones de personas contrajeron la enfermedad y murieron 1,5 millones de personas a causa de la misma, sobre todo en países como India, Indonesia o China, cifras solo superadas por la pandemia de COVID-19(3,4).



**Figura 1.** Mapa mundial de la incidencia de la tuberculosis en 2021. Los datos se muestran en casos por 100.000 habitantes al año. Fuente: mapa de la incidencia de la tuberculosis(2021).Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/PlanTuberculosis/mapas.htm> (5).

Debido a todos estos avances y cambios en el desarrollo de la enfermedad surgió un nivel de alerta establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para controlar y tratar de eliminar la tuberculosis(1).

Los síntomas más comunes de esta enfermedad pueden incluir tos, dolor torácico, debilidad, fiebre, pérdida de peso, falta de apetito o sudores nocturnos(6,7). Pero lo

más destacable de esta enfermedad es la posibilidad de desarrollarla de forma latente, sin síntomas ni transmisión, posiblemente a lo largo de toda la vida. Esta latencia surge de la capacidad del sistema inmune del organismo para impedir que las bacterias se desarrolle. Se estima que el 25% de la población mundial padece infección latente por tuberculosis y, aunque la enfermedad únicamente llega a desarrollarse en su forma activa en el 5-10% de los casos, constituye un reservorio que mantiene activa la progresión de la enfermedad de forma indeterminada (6,8). El desarrollo de la enfermedad hacia su forma activa y peligrosa es más común en niños, personas inmunodeprimidas o pacientes que están recibiendo tratamientos biológicos (9).

## **Tratamiento de la tuberculosis y resistencia antimicrobiana**

El tratamiento de primera línea que se ha seguido para la tuberculosis consta de cuatro medicamentos (isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida) durante 6 meses. Este régimen ha resultado exitoso en el 85% de los pacientes, pero la aparición de resistencias cada vez más difíciles de tratar ha supuesto un problema añadido en el tratamiento de esta enfermedad.

Además, teniendo en cuenta la gran variedad de respuesta farmacológica en la población, pueden generarse efectos adversos inesperados. Esta variedad farmacocinética se debe a las diferencias fisiológicas de los pacientes, tales como la edad, el género o el peso, factores genéticos y ambientales o la situación clínica(7,10–12). Todas estas diferencias metabólicas en la población pueden generar una variabilidad en la que no todos los pacientes van a disponer de las concentraciones buscadas del fármaco, pudiendo aparecer resistencias o una menor respuesta al tratamiento.

Esta aparición de cepas de tuberculosis resistentes ha implicado una necesidad de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de la tuberculosis, e incluso combinarlos en un mismo paciente para lograr resultados en el tratamiento(9). Las cepas de tuberculosis multirresistente a fármacos (MDR) son aquellas que son resistentes a al menos isoniazida y rifampicina, los fármacos de primera línea más eficaces. Los casos de cepas multirresistentes pueden ser tratados con medicamentos de segunda línea, un tratamiento de mayor duración, mayor precio y mayor riesgo de toxicidad. Por ello, no toda la población tiene acceso a estos tratamientos; de hecho,

en 2020 sólo uno de cada tres afectados con tuberculosis farmacorresistente tuvo acceso a ellos aunque el tratamiento contra las cepas MDR resulte efectivo en el 50% de los casos(13).

Por otro lado, la tuberculosis extensamente resistente (XDR) es un tipo de multirresistente que, además de ser resistente a isoniazida y rifampicina, también lo es a las fluoroquinolonas y a otro fármaco del grupo A (bedaquilina o linezolid)(14). Los grupos de medicamentos contra la tuberculosis están definidos por la OMS, entre los que se encuentra el grupo A (fármacos de primera línea), que incluye los ya nombrados además de etambutol y pirazinamida. Debido a la ineficacia de los tratamientos contra estas cepas, que muestran éxito en el 30% de los casos, presentan un mayor riesgo para pacientes con afecciones paralelas a la tuberculosis. En estos casos, han surgido nuevas posibilidades en el siglo XXI en forma de medicamentos como la bedaquilina (2012), delamanid (2014) o pretomanid (2019), fármacos que después de muchos años han surgido como un posible tratamiento de última opción en casos de resistencia. El tratamiento consta de la administración de bedaquilina, pretomanid y linezolid en casos de tuberculosis extensamente resistente(3). Sin embargo, han sido descubiertas resistencias incluso contra estos medicamentos, lo que desvanece su efectividad en el 100% de los casos y demuestra una vez más la urgencia por investigar posibles nuevos fármacos contra esta patología(15–17).

La OMS ha redefinido recientemente el tratamiento a seguir recomendado en casos de MDR/XDR, en un comunicado que muestra de dos opciones de tratamiento(3):

- Régimen de tratamiento de 6 meses: administración de bedaquilina, pretomanid, linezolid y moxifloxacina en pacientes con MDR/XDR que no hayan tenido contacto previo con estos fármacos (más de un mes de exposición). Este régimen sustituye al tratamiento previo de 9 meses, así como al de 18. En casos en los que el paciente padezca tuberculosis resistente a fluoroquinolonas, existe la posibilidad de administrar únicamente los otros 3 medicamentos nombrados, siempre y cuando se pueda alargar el tratamiento hasta los 9 meses y con una menor respuesta a la terapia. También se está estudiando la posibilidad de añadir el pretomanid a este tipo de tratamiento sin que genere demasiados efectos secundarios.

- Régimen de tratamiento de 9 meses: no recomendado para niños menores de 6 años o formas severas de la enfermedad, pero sí permite tratar a la gran mayoría de afectados que comparten esta patología con el VIH. Se trata de la administración de bedaquilina, fluoroquinolonas y linezolid, con posibilidad de combinar con otros medicamentos en caso de resistencia a las fluoroquinolonas. Además, se ha estudiado con éxito la posibilidad de sustituir 4 meses de tratamiento con etionamida por 2 meses de linezolid, resultando en una eficacia y seguridad similares. Este tipo de régimen es utilizado para sustituir los tratamientos de más de 18 meses en casos en los que no ha habido contacto previo con los medicamentos de segunda línea nombrados.

## DESARROLLO DE FÁRMACOS

Debido a su naturaleza y sus características, las bacterias siempre van a acabar generando resistencias a los tratamientos disponibles a los que se expongan(18).

Esta resistencia puede generarse debido a las características estructurales o funcionales de la bacteria, gracias a las cuales esta es capaz de eliminar el fármaco o impedir que actúa, o por resistencia adquirida, mediante la cual los antimicrobianos dejan de actuar contra la bacteria debido a mutaciones o cambios en el genoma de esta que le permiten sobrevivir en su presencia. Dentro de estas posibilidades, la bacteria o bien inactiva enzimáticamente el fármaco, como ocurre por ejemplo con las  $\beta$ -lactamasas, o bien modifica la propia diana del medicamento para que no sea tan efectivo provocando cambios estructurales de la diana, o bien sobreexpresa esta diana para reducir el efecto del fármaco para la misma concentración(19).

Esta serie de recursos que las bacterias poseen para hacer frente a los antimicrobianos complica en ocasiones el tratamiento de las distintas enfermedades. Todo esto deriva en una necesidad urgente de buscar nuevos antimicrobianos para las cepas resistentes que se han ido generando en las últimas décadas. Para llevar a cabo este desarrollo de nuevos compuestos existen varias posibilidades de afrontar las investigaciones(20).

## **ENSAYOS PRECLÍNICOS**

Todos los posibles fármacos estudiados en la lucha contra la tuberculosis pueden no resultar tan efectivos con el tiempo, debido a la aparición de estas resistencias o a pérdida de eficacia de los mismos. De hecho, uno de los mayores retos en la salud pública global de la actualidad es la resistencia antimicrobiana, responsable de unas 700.000 muertes anuales, cifra que aumenta año tras año(21). Esta resistencia a los antimicrobianos no se presenta sólo en el caso de tuberculosis, sino que es innegable una necesidad global de desarrollar nuevos antibióticos para todas las enfermedades. En el proceso de desarrollo de nuevos fármacos han surgido nuevas estrategias para combatir la dificultad y lentitud del proceso en sí.

El primer paso para los ensayos en la búsqueda de nuevos antimicrobianos es encontrar una molécula activa que tenga el efecto deseado. Para ello, se utilizan dos aproximaciones:

Por un lado, la **búsqueda de compuestos que inhiben el crecimiento bacteriano (whole-cell screening)** es un método para identificar antimicrobianos según la respuesta física que generan en las bacterias cuando son aplicados. Sin embargo, pese a haber sido el método más utilizado en las últimas décadas del siglo XX para la búsqueda de nuevos fármacos, no aporta ningún tipo de información sobre el mecanismo molecular que genera la reacción bacteriana. El hecho de que se desconozca la diana sobre la que actúa el compuesto administrado resulta ser un cuello de botella en esta aproximación(18,22,23).

En cambio, desde hace unas décadas existe la **búsqueda de inhibidores de proteínas diana (target-based screening)**, que suele necesitar una previa recopilación en forma de librerías de los compuestos ya probados y sus dianas, así como el conocimiento de la estructura tridimensional de la diana, todo ello para partir de una base sobre la que intentar nuevas combinaciones. Es un método que exige un trabajo previo laborioso, pero que produce resultados bastante exactos y reproducibles. Cabe destacar que, sorprendentemente, todavía no se han encontrado nuevas familias de antimicrobianos utilizando esta aproximación. Posiblemente, esto se deba a la impermeabilidad de la bacteria, que no deja pasar el compuesto en ocasiones. (22,24).

Existe en ambos casos la posibilidad, incluso, de crear moléculas artificiales que realicen la función inhibidora buscada.

El primer paso ya comentado es la búsqueda e identificación de la diana sobre la que se quiere actuar con la acción del fármaco. Tras la identificación de una serie de compuestos que actúan sobre la diana deseada, se elige el más efectivo y más seguro para realizar los ensayos preclínicos(25). Para escoger la molécula más efectiva se realizan distintos ensayos, como los High throughput screening (HTS). En la actualidad se utiliza la técnica HTS para ambas aproximaciones, lo que implica un cribado de una librería con el ensayo que más interese (ya sea actividad enzimática, unión a una proteína, ensayos contra bacterias completas,...).

En segundo lugar, para el desarrollo de antimicrobianos, una vez identificada una serie de moléculas de interés que actúan exitosamente hay que llevar a cabo la elección de una entre todas ellas como nuevo fármaco para realizar los ensayos clínicos. Los ensayos HTS consisten en poner en contacto una gran cantidad de moléculas con la diana para determinar cuáles son las de mayor actividad, además de ensayos secundarios para estudiar el sitio de acción de las más interesantes. Todos estos ensayos HTS están enfocados a la identificación de moléculas que interactúen con la diana, así como sus propiedades fisicoquímicas, además de la generación de hipótesis sobre la eficacia del medicamento contra la enfermedad en cuestión. Este tipo de experimentos pueden llevarse a cabo de forma virtual, simulando las moléculas deseadas para ver una posible interacción(20,22,23).

Más adelante, se llevan a cabo ensayos con líneas celulares de mamíferos que sobreexpresen la diana de interés para aumentar la eficacia del medicamento. Esto es posible en receptores de membrana, canales iónicos o receptores nucleares sobre los que el fármaco actúa. Durante estos ensayos se miden una serie de parámetros tales como la relevancia del mismo, su reproducibilidad, coste y calidad o ensayos sobre los efectos de los compuestos (para asegurarse de que no hay efectos adversos) (25).

Una vez que se han identificado una serie de moléculas a partir del screening virtual o HTS, lo más importante es definir los compuestos que mejor actúan y tratar de describir su mecanismo de acción. También tiene lugar la fase de refinamiento de los

compuestos para tratar de optimizar su potencia y selectividad en modelos *in vivo* (fase hit to lead)(26).

Como consecuencia de estas estrategias para la búsqueda de dianas y compuestos que actúen en ellas, surge una cantidad determinada de moléculas activas contra esas dianas. De entre todas ellas, sólo algunas van a tener los efectos deseados sin presentar problemas derivados de su administración y metabolización. Para asegurar la eficacia y seguridad de una molécula como fármaco, primero se deben realizar distintos ensayos preclínicos *in vitro* para confirmar la acción del fármaco. Seguidamente, en ocasiones se realizan pruebas clínicas con animales para comprobar los efectos y la acción *in vivo* de la molécula en cuestión. Una vez se ha encontrado un compuesto o molécula que, o bien ataca a una proteína o bien frena el crecimiento bacteriano y se sabe que actúa en el sitio adecuado, es el momento de iniciar las fases clínicas del desarrollo del fármaco a nivel comercial. A estas fases clínicas únicamente acceden las moléculas que han superado ensayos de estabilidad y otras pruebas biológicas y químicas(27).

## FASES DEL DESARROLLO CLÍNICO

Puesto que cualquier modelo animal de laboratorio está dotado de una variabilidad biológica limitada, los estudios que se realizan con ellos no son suficientes para saber con certeza que un fármaco de interés posee las características necesarias para ser seguro y eficaz en humanos, por lo que son necesarios ensayos en poblaciones humanas(26–28).

**Fase I:** es el primer contacto del fármaco con humanos, por lo que no se realiza con más de 100 personas como norma general. El objetivo de esta fase es conocer la tolerancia y la seguridad en pacientes, que pueden no ser iguales que las demostradas *in vitro*.

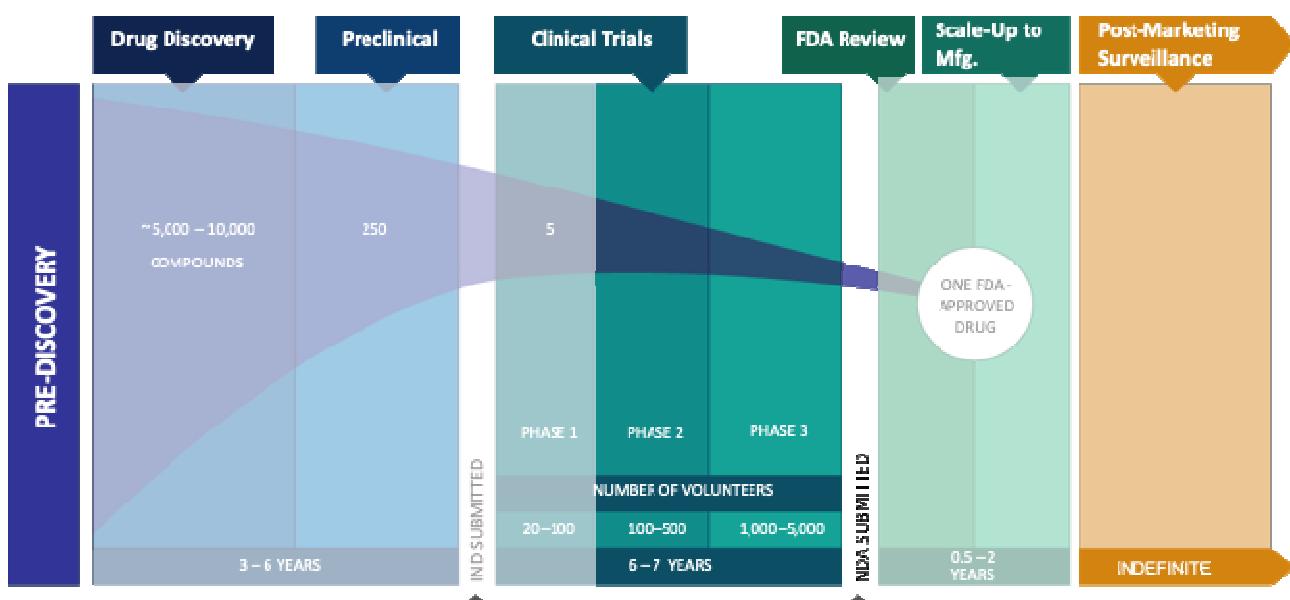
**Fase II:** si la fase I ha sido superada con éxito, en esta fase II se administra el fármaco a individuos que padecen la enfermedad para la que se ha desarrollado el fármaco. Para estos ensayos se eligen entre 300 y 1000 pacientes enfermos, grupo que debe ser lo más homogéneo posible, es decir, poseer el mínimo número de afecciones posibles a

parte de la enfermedad. En esta fase se compara el fármaco con otros ya existentes contra esa enfermedad o, en caso de que no los haya, con algún placebo. El fin de estos ensayos es establecer unos valores de eficacia, toxicidad y dosis adecuada.

**Fase III:** en la fase III se aumenta la masa poblacional de los pacientes a tratar, llegando a cientos o incluso miles con el fin de estudiar la eficacia y la toxicidad previamente analizadas en la fase II. Una vez acabada esta fase, los datos son enviados a las autoridades sanitarias (FDA, EMA) para aprobar el fármaco y poder comercializarlo.

**Fase IV:** conocidos como los estudios de farmacovigilancia, consisten en el seguimiento del fármaco una vez ha sido puesto en venta en el mercado. Se buscan toxicidades nuevas que no hayan aparecido antes en las fases previas, así como reacciones adversas raras a largo plazo. Además de la necesidad de invertir cantidades de tiempo y dinero relativamente elevadas, existen una serie de circunstancias específicas de los antimicrobianos que limitan sus beneficios potenciales:

- Las infecciones bacterianas son enfermedades agudas, por lo que los antimicrobianos se utilizan de manera puntual.
- Los nuevos antimicrobianos se suelen utilizar como último recurso.
- La resistencia antimicrobiana amenaza la vida útil de los nuevos fármacos antimicrobianos.



**Figura 2. Etapas y fases del desarrollo preclínico y clínico de fármacos nuevos.** Las etapas sombreadas en blanco pueden ser omitidas en el proceso de reposicionamiento de fármacos. Disponible en: Understanding the R&D Process, [www.innovation.org](http://www.innovation.org). CBO, *Research and Development in the Pharmaceutical Industry*, 2006

## REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS

El desarrollo de un nuevo fármaco, desde la idea original a partir de la cual se comienzan los ensayos hasta la comercialización del mismo, comprende un periodo de tiempo largo (12-15 años)(27) y costoso (1000 millones de dólares aproximadamente)(29).

Ante esto, ha surgido un nuevo concepto, el reposicionamiento de fármacos. El reposicionamiento de fármacos consiste en buscar nuevas indicaciones terapéuticas para fármacos ya aprobados. Esto es posible gracias a que esos fármacos pueden poseer unas determinadas características que hagan que sean activos frente a otras dianas previamente no descritas en su mecanismo de acción. Este concepto permite utilizar determinados compuestos en el tratamiento de enfermedades nuevas.

La principal **ventaja** de este método es que es más barato que el desarrollo de un fármaco *de novo*, debido a que estos medicamentos ya han sido aprobados para otra enfermedad y sólo hay que redirigir el estudio. Esto significa que gran parte de los estudios preclínicos y fases clínicas necesarios para comercializar el fármaco ya han sido superados. La ventaja de poder evitar parte de las fases clínicas permite ahorrar tiempo (pasa de estar entre los 10-17 años a incluso 3)(21) y dinero, los dos mayores problemas en el desarrollo de fármacos. Este concepto está apoyado por dos características de las moléculas que las hacen más versátiles y aptas para el reposicionamiento. Por un lado, los fármacos destinados al reposicionamiento pueden actuar sobre dianas similares pero no idénticas, lo que ofrece mayores posibilidades en la investigación de la nueva diana. Sin embargo, también puede implicar una serie de inespecificidades que disminuyan la eficacia del fármaco, ya que previamente a los ensayos no se sabe con exactitud sobre qué moléculas va a presentar mayor afinidad(30).

Sin embargo, un fármaco que actúa como nuevo candidato para el reposicionamiento presenta una serie de **riesgos**, por lo que hay que crear un programa que establezca unas pautas a seguir hasta su comercialización con ese nuevo fin y de manera segura. Por todo esto, para su uso en un nuevo ámbito serán necesarios numerosos ensayos tales como la determinación del nuevo mecanismo de acción, toxicidad o posibles efectos secundarios. Además, en la medida de lo posible, se debe tratar de mantener la dosis ya aprobada para ese medicamento para evitar realizar ensayos específicos para ajustarla. Por todo esto, la variabilidad de perfiles farmacocinéticos en la población puede suponer un reto extra en el reposicionamiento de fármacos, puesto que los fármacos se encuentran optimizados para su acción contra la diana original, y habría que redirigirlos hacia nuevas dianas(31).

A partir de las últimas décadas se han incrementado los ejemplos de reposicionamiento de fármacos, como Sildenafil (Viagra), creado en un principio para la angina de pecho y que ha acabado siendo el medicamento líder del mercado para tratar la disfunción eréctil unos años después. Otro ejemplo claro es el uso de Minoxidil para el tratamiento de la caída del cabello, fármaco que en un principio estaba destinado a tratar la hipertensión y que en 2016 facturó más de 800 millones de dólares(21).

## AVERMECTINAS

Las avermectinas son una familia de antihelmínticos producidos por *Streptomyces avermitilis*, actinomicetos que generan 8 componentes distintos pertenecientes a este grupo. En esta familia de las avermectinas se encuentran la ivermectina o la selamectina, que presentan una estructura similar a la de macrólidos antibacterianos y debido a su acción antihelmíntica e insecticida han sido utilizadas como pesticidas y antiparasitarios(32,33).

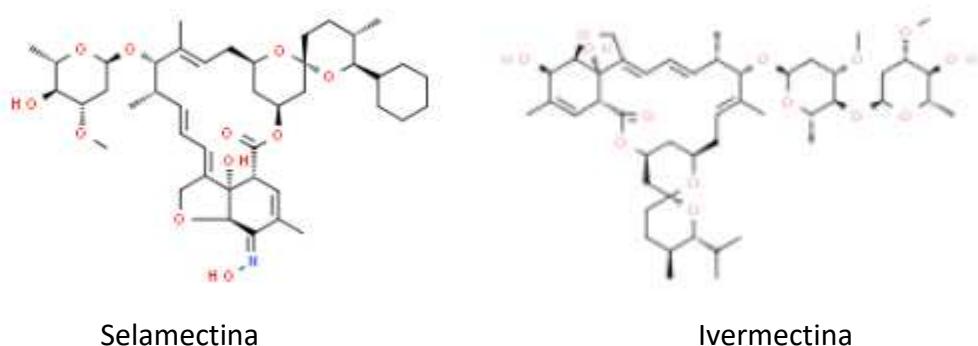
El primer componente de las avermectinas fue aislado en 1978, cuando un actinomiceto se aisló de una muestra en Japón y fue llevado a analizar con muestras de nematodos, mostrando entonces un efecto antihelmíntico(34). El mecanismo de síntesis de las avermectinas en *S. avermitilis* está presente en un cluster de genes que

ya ha sido secuenciado, puesto que codifica enzimas que están envueltas en varios de los pasos de la vía de síntesis de avermectinas(34,35).

Los tipos de compuestos de avermectinas se diferencian estructuralmente en la posición número 13 del anillo macrólido, pero normalmente todas son solubles en solventes orgánicos y tienen unas propiedades como la hidrofobicidad y la afinidad por la materia orgánica que hacen que sean fácilmente acumulables en el entorno. Entre las avermectinas, cabe destacar para este trabajo la ivermectina y la selamectina(34).

Por un lado, la **ivermectina** (derivado más común de las avermectinas) es de naturaleza lipofílica, lo que hace que se acumule en tejidos animales. Sin embargo, esta naturaleza lipofílica tiene que ver con el peso molecular elevado que presenta, razón que dificulta su paso a través de membranas biológicas. Ha sido muy utilizada para el tratamiento de la oncocercosis o ceguera de los ríos, una enfermedad crónica dérmica y ocular causada por el nematodo *Onchocerca volvulus*, que se transmite entre humanos por la picadura de moscas. La estrategia elegida para la eliminación de esta enfermedad se basa en la administración masiva de la ivermectina por vía oral con el fin de erradicarla mediante un alto porcentaje de cobertura en la población(32).

Por su parte la **selamectina** es otro tipo de avermectina que se utiliza para prevenir infecciones de ectoparásitos en perros y gatos(36,37).



**Figura 3. Estructura de la ivermectina y selamectina, las dos avermectinas más utilizadas en la lucha antimicrobiana.** Fuente: las estructuras se han generado en la web ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>)(34,36).

El **mecanismo de acción** de las avermectinas estudiado hasta la fecha (en parásitos, para el uso con el que fueron empleadas desde su descubrimiento) consiste en el bloqueo de la transmisión del impulso nervioso en los músculos y nervios de los

invertebrados. Este efecto tiene lugar por la acción del glutamato sobre los canales de cloro de los invertebrados, que los abre para producir impulso nervioso. Las avermectinas se unen a estos canales de cloro regulados por glutamato, haciendo que la apertura de los canales resulte excesiva y causando una hiperpolarización que acabe en un bloqueo del impulso nervioso por inhibición. La ventaja de estos antiparasitarios es que la dosis necesaria para ejercer su efecto no es tóxica para humanos.

Recientemente, se ha descubierto que las avermectinas pueden actuar contra *Mycobacterium tuberculosis*, incluyendo las cepas MDR/XDR, así como otras micobacterias(32,33). Esto resulta ser un hecho sorprendente, ya que las avermectinas no presentan actividad contra las bacterias Gram + y Gram -, pero sí que han demostrado tener actividad anti-micobacterias(38).

Sin embargo, aún queda mucho por estudiar en el campo de las avermectinas como fármacos contra las micobacterias, y su estudio es de vital importancia para un futuro desarrollo clínico de estos componentes(38). Resultados previos del grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo han demostrado que las avermectinas inhiben la enzima decaprenilfosforribosa-2'-epimerasa (DprE1), involucrada en la síntesis de la pared celular (33). Asimismo, se ha observado en experimentos de marcaje metabólico que el tratamiento con selamectina inhibe la incorporación de D-alanina marcada con <sup>14</sup>C, lo que sugiere que el mecanismo de acción de las avermectinas podría estar relacionado con la pared celular (Resultados no publicados obtenidos en colaboración con la Dra Jana Korduláková de la Universidad Comenius de Bratislava).

## PARED BACTERIANA

La pared bacteriana comparte características comunes a todas las bacterias, por lo que resulta un componente celular interesante para ser utilizado como diana por los antimicrobianos. Esta característica ha sido utilizada para desarrollar antimicrobianos contra *M. tuberculosis*, llegando a suponer la aparición de gran cantidad de antimicrobianos.

Por un lado, la membrana interna de *Mycobacterium tuberculosis* es una bicapa de fosfolípidos que contiene adheridos glicolípidos dispuestos hacia el espacio

periplásmico. Por otro lado, la pared celular es mucho más compleja que esta membrana interna, y está formada por 3 componentes principales: un polímero entrecruzado de peptidoglicano, polisacáridos de arabinoglactano altamente ramificados y ácidos micólicos de cadena larga. También se encuentran en la capa de ácidos micólicos una serie de glicofosfolípidos unidos no covalentemente y ceras inertes intercalándose y formando así la membrana externa de la bacteria. Por último, la membrana más externa de la célula se denomina cápsula y está compuesta principalmente por proteínas, polisacáridos y ácidos micólicos(39).

a) Peptidoglicano. Es el mayor componente de la pared celular. Se trata de un polímero que alterna residuos de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico mediante enlaces  $\beta\ 1\rightarrow4$  y que contienen cadenas laterales de aminoácidos entrecruzadas por puentes transpeptídicos. Además, entre otras cosas contiene residuos adicionales de glicina o serina, que distinguen esta pared micobacteriana de la estructura típica de otras(40).

La síntesis de peptidoglicano comienza con la generación de uridina difosfato-N-acetilglucosamina, reacción catalizada por una enzima con acción acetiltransferasa y uridiltransferasa. El siguiente paso consiste en la conversión de esta primera molécula en el pentapéptido ácido UDP-N-acetilmurámico, el cual se sintetiza mediante una serie de reacciones catalizadas por las ligasas MurA a MurF. Mur A y MurB se encargan de sintetizar ácido UDP-N-acetilmurámico (UDP-MurNAc ), tras lo cual la enzima NamH va a llevar a cabo la conversión de este UDP-MurNAc en ácido UDP-N-glicolilmurámico. Esta última se trata de una reacción prescindible en *Mycobacterium smegmatis* pero que aumenta la fuerza del peptidoglicano, sin embargo, la desaparición de esta enzima NamH conlleva una mayor susceptibilidad a  $\beta$  lactámicos; por tanto, se trata de una diana interesante(39,41). Los siguientes pasos consisten en la adición de residuos al polímero formado gracias a las enzimas MurC (23), MurD (42), MurE y MurF. MurF cataliza el paso final de la síntesis del precursor de la mureína, la adición del dipéptido de D-alanina-D-alanina, previamente sintetizado por la enzima Ddl. Esta enzima es la diana de la D-cicloserina, un fármaco de segunda línea en el tratamiento de la tuberculosis (43,44).

b) Arabinoglactano. Es el mayor polisacárido de la pared celular, y está compuesto por residuos de galactosa y arabinosa. Sus extremos no reductores en las cadenas actúan como sitio de unión para los ácidos micólicos, así como fracciones de galactosamina.

La biosíntesis del arabinoglactano se inicia en el citoplasma, donde se sintetiza la unidad de enlace que lo conecta al peptidoglicano. Esta unidad de enlace funciona como un punto de unión para la polimerización de la cadena de glactano, proceso que tiene lugar en el citoplasma gracias a las galactofuranosiltransferasas (Glft1 y Glft2). El resto de la reacción de síntesis de arabinoglactano ocurre en el exterior de la célula, donde el donador de arabinosa decaprenilfosforil-D-arabinosa (DPA) transfiere los residuos de arabinosa a la cadena de galactano, en una serie de reacciones catalizadas por las arabinosiltransferasas EmbA y EmbB. El DPA se sintetiza en el citoplasma mediante una vía de síntesis que engloba una serie de reacciones susceptibles de ser dianas de fármacos, como las nitro-benzotiazinonas (BTZ043), una familia de compuestos que se encuentra en fase II de ensayos clínicos(45). El DPA es sintetizado por una reacción que lleva a cabo una decaprenilfosforibosa-2'-epimerasa que consta de dos subunidades (DprE1 y DprE2). Estos fármacos nombrados, así como las dinitrobenzamidas, tienen como diana la subunidad DprE1, por lo que actúan en cepas MDR/XDR de *M. tuberculosis*.(39,40,46). Por otra parte EmbA y EmbB son dianas del etambutol, fármaco de primera línea contra la tuberculosis(47,48).

c) Ácidos micólicos. El componente final de la pared micobacteriana y que distingue de otras paredes celulares son los ácidos micólicos. Se trata de una cadena única de ácidos grasos  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxi unidos covalentemente a la capa de arabinoglactano, así como también está compuesta por otras moléculas como la trehalosa o la glucosa en la parte capsular. La síntesis de los ácidos micólicos tiene lugar en el citoplasma. Existen tres tipos de ácidos micólicos:  $\alpha$ -micolatos (con anillos de ciclopropano en configuración *cis*), metoxi-micolatos y ceto-micolatos (con grupos metoxi o ceto, respectivamente). Los ácidos micólicos aportan permeabilidad a la pared, además de resultar esenciales para la viabilidad celular y la virulencia, lo que los convierte en posibles dianas para fármacos (como la isoniazida, por ejemplo)(39,49).

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este TFM es el estudio del papel de los genes de síntesis de la pared celular de micobacterias en el mecanismo de acción de las avermectinas. Para ello se han definido los siguientes objetivos parciales:

1. Generación de mutantes de sobreexpresión de los genes implicados en la síntesis del pentapéptido de peptidoglicano de la pared de micobacterias en *Mycobacterium smegmatis*, modelo no patógeno y de crecimiento rápido de *M. tuberculosis*. Para dotar de mayor robustez al ensayo, se buscó generar al menos tres mutantes de sobreexpresión de los cinco genes implicados (*murC*, *murD*, *murE*, *murF* y *ddl*).
2. Caracterizar la susceptibilidad antimicrobiana a avermectinas y otros compuestos dirigidos a la pared celular de dichas cepas de sobreexpresión.
3. Caracterizar la susceptibilidad de cepas mutantes de *M. smegmatis* de sobreexpresión y delección del gen *embB* generados previamente en el Grupo de Genética de Micobacterias.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1) Cepas, condiciones de cultivo e incubación**

#### **3.1.1) Cepas utilizadas**

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio están anotadas en la Tabla 1.

**Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio y sus principales rasgos.**

Cepa	Rasgos relevantes
<i>Mycobacterium smegmatis mc<sup>2</sup>155</i>	Cepa de referencia de <i>M. smegmatis</i>
<i>Mycobacterium smegmatis pMV261-murD</i>	Mutante de sobreexpresión de MurD de <i>M. smegmatis</i>
<i>Mycobacterium smegmatis pMV261-murE</i>	Mutante de sobreexpresión de MurE de <i>M. smegmatis</i>
<i>Mycobacterium smegmatis pMV261-ddl</i>	Mutante de sobreexpresión de Ddl de <i>M. smegmatis</i>
<i>Mycobacterium smegmatis ΔembB</i>	Mutante de delección para el gen <i>embB</i>
<i>Mycobacterium smegmatis pMV261- embB</i>	Mutante de sobreexpresión de EmbB de <i>M. smegmatis</i>
<i>Mycobacterium smegmatis embB R307H</i>	Mutante de <i>M. smegmatis</i> con la mutación R307H en <i>embB</i>
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada para clonaje

*Mycobacterium smegmatis* se utilizó como modelo de *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria que requiere laboratorios de bioseguridad de nivel 3 y tiene un tiempo de división de 22 horas. *M. smegmatis* es una micobacteria no patógena de crecimiento rápido, con un tiempo de división de 4 horas (el tiempo de formación de colonias es de 2-3 días frente a 2-3 semanas en el caso de *M. tuberculosis*). (50).

### 3.1.2) Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio LB líquido (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl). También se empleó el medio LB agar (LB con 17 g/L de agar bacteriológico europeo).

Para las cepas de *M. smegmatis* se empleó el medio Middlebrook 7H9 suplementado al 10% (v/v) de Middlebrook ADC (0,085% NaCl, 0,5% albúmina bovina, 0,2% dextrosa y 0,0003% catalasa bovina) y 0,2 % (v/v) de glicerol o 0,05% (v/v) Tween 80. También se empleó para estas cepas el LB agar para el contejo o el aislamiento de colonias.

Todas las cepas fueron cultivadas bajo condiciones aeróbicas a 37 °C. En caso necesario, se añadió kanamicina a una concentración final de 20 µg/mL.

Para su preservación a largo plazo, se mezclaron alícuotas de cultivos saturados con glicerol a una concentración final del 15% (v/v) y se conservaron a -80 °C.

### 3.2) Compuestos

Los compuestos antimicrobianos utilizados para los ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos están detallados en la tabla 2.

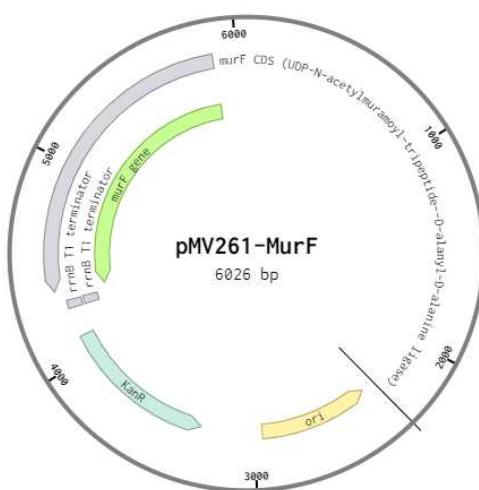
**Tabla 2.** Antimicrobianos utilizados en este trabajo, solvente en el que se almacenan y principales rasgos de su mecanismo de acción descrito.

Compuesto	Referencia	Solvente	Mecanismo de acción
<b>Selamectina</b>	Y0000814 (European Pharmacopoeia)	Etanol	Desconocido
<b>Etambutol</b>	E-4630 (Sigma)	Agua	Inhibe la síntesis de arabinoglactano
<b>D-cicloserina</b>	C-6880 (Sigma)	PBS	Inhibe la síntesis de peptidoglicano
<b>Meropenem</b>	605455 (Kabi)	DMSO	Inhibe la síntesis de pared celular
<b>Vancomicina</b>	V-1130 (Sigma)	Agua	Inhibe la síntesis de peptidoglicano
<b>Rifampicina</b>	R-3501 (Sigma)	DMSO	Inhibe la transcripción bloqueando la RNA polimerasa
<b>Isoniazida</b>	I-3377 (Sigma)	Agua	Inhibe la síntesis de ácido micólico
<b>Cefradina</b>	C-8396 (Sigma)	Agua	Inhibe la síntesis y reparación de la pared
<b>Kanamicina</b>	K-1377 (Sigma)	Agua	Inhibición de síntesis de proteínas

### 3.3) Ingeniería genética

#### 3.3.1) Estrategias de clonaje y plásmido utilizado

El clonaje de los genes de interés (*murC-murF* y *ddl*) se llevó a cabo en el plásmido pMV261. Este vector contiene un gen de resistencia a kanamicina, orígenes de replicación en *E. coli* (OriE) y micobacterias (OriM) y un casete de expresión con un promotor fuerte y de expresión constitutiva en micobacterias, un sitio de clonaje múltiple (MCS) y un terminador de la transcripción(51,52). De esta forma se va a conseguir que los genes clonados se sobreexpresen de forma constitutiva al introducir el plásmido en *M. smegmatis*.



**Figura 4.** Mapa circular del plásmido pMV261 mostrando los orígenes de replicación de *E. coli* y micobacterias, el casete de resistencia a kanamicina y el terminador de la transcripción, así como el inserto del gen *murF* y la longitud total del plásmido. También se encuentra el promotor a lo largo de unas 200 bp después de la marca de 4000 bases. Fuente: plataforma benchling (<https://benchling.com>).

Los clonajes se realizaron utilizando una estrategia de digestión con enzimas de restricción seguida de una ligación. Una vez obtenidos los plásmidos con los correspondientes insertos, se transformaron en *M. smegmatis*.

### 3.3.2) Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para el clonaje de los genes de interés fueron diseñados en la plataforma benchling, que permitió buscar la orientación adecuada de los insertos y los sitios de restricción que más se ajustaban a los parámetros deseados para el clonaje. En concreto, se diseñaron oligonucleótidos con una temperatura de melting (Tm) entre los 58 y los 61 °C y un %GC del 40-60%. Los resultados obtenidos

por benchling y los oligonucleótidos encargados a la casa comercial Thermo Fisher Scientific se encuentran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para el clonaje. En mayúsculas, se indican los sitios de restricción.**

Nombre del oligonucleótido	Primer (F/R- gen)	Secuencia (5' → 3')	Enzima de restricción implicada
DB1	Forward - Ddl	ttaaGAATTGtgactccccgaaccatcc	<i>EcoRI</i>
DB2	Reverse – Ddl	ttAAGCTTtcagcgccaggccgtg	<i>HindIII</i>
DB3	Reverse – MurC	ttccAAGCTTtcacgacgcgcgc	<i>HindIII</i>
DB4	Forward - MurC	ttaaGAATTCatgacggcatctcgctc	<i>EcoRI</i>
DB5	Reverse – MurD	ttccAAGCTTctacccgaccgcagcgc	<i>HindIII</i>
DB6	Forward – MurD	ttaaGAATTGtgccgtacgtgaccggc	<i>EcoRI</i>
DB7	Reverse – MurE	ttccAAGCTTtcatgaactcggcccttgtttcc	<i>HindIII</i>
DB8	Forward – MurE	ttaaGAATTCatggccatgaagctgcgtcc	<i>EcoRI</i>
DB9	Reverse – MurF	ttccAAGCTTtcatcgccgggt	<i>HindIII</i>
DB10	Forward - MurF	ttccAAGCTTcgatgatcgacatgaccatcg	<i>HindIII</i>
DB11	Forward – MurF	cagctgcagaattcgaagctatgatcgacatgaccatcg	/
DB12	Reverse - MurF	tacgtcgacatcgataagcttcatcgccgggtccgtc	/
pMV261-Fw2	Forward- pMV261	ccgcggtaaccagatttaaatctagagg	/

### 3.3.3) Extracción de DNA genómico

Se recolectaron bacterias de cultivos líquidos de 5 mL y se resuspendieron en 400 µL de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). La suspensión fue calentada hasta 85 °C y se añadieron 0.5 mg de lisozima, para posteriormente incubar la mezcla a 37 °C

durante al menos 1 hora. Despues, se añadieron 0,05 mg de proteinasa K disueltos al 10% de SDS y se incubaron las muestras a 65 °C durante 10 minutos. Seguidamente, se añadieron 100 µL de NaCl 5 M y 100 µL de CTAB precalentado (10% CTAB, 0,7 M NaCl) y las muestras fueron incubadas otros 10 minutos a 65 °C.

La extracción del DNA genómico fue llevada a cabo añadiendo 750 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Las muestras se agitaron y fueron centrifugadas 5 minutos a 13500 R.C.F. Se recogió el sobrenadante y se mezcló con otros 750 µL de cloroformo: alcohol isoamílico para centrifugar de nuevo. La fase acuosa se transfirió a tubos con 420 µL de isopropanol frío. La precipitación del DNA fue llevada a cabo a -20°C durante al menos 2 horas, tras lo cual las muestras fueron centrifugadas 5 minutos a 13500 R.C.F. para recoger los ácidos nucleicos. Finalmente, los pellets se disolvieron en 50 µL de agua libre de nucleasas y el DNA se cuantificó con medidas de absorbancia a 260 nm usando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop).

En el caso de la extracción de DNA plasmídico de *E. coli*, partiendo de un cultivo de *E. coli* en medio LB líquido, se obtuvo con el kit de extracción de DNA plasmídico GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific).

### **3.3.4) Proceso de amplificación por PCR, digestión, ligación y transformación**

Una vez se había extraído el DNA se procedió a la amplificación por PCR del producto de esta extracción. Las condiciones para la PCR exigieron un primer ciclo de 7 minutos a 95 °C, y ciclos posteriores de 95°C, 58 °C (temperatura de hibridación de primers) durante 1 minuto y medio y 68°C para la extensión; el ciclo final busca mantener los productos de PCR a 4°C hasta su uso. Para la PCR del plásmido con el inserto, se utilizó la polimerasa PrimeStar de alta fidelidad para la reacción, dNTPs, agua y los oligonucleótidos, además del DNA. Posteriormente, se comprobó el correcto funcionamiento del proceso de la PCR mediante una electroforesis de los productos en gel de agarosa.

Una vez comprobado que la PCR fue llevada a cabo con éxito, se purificaron los productos de la misma mediante el kit PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen).

Tras esta amplificación, es importante digerir entre 500 ng y 1 µg del DNA obtenido y amplificado con las enzimas de restricción correspondientes para obtener el inserto deseado (Tabla 4).

**Tabla 4.** Genes digeridos enzimáticamente y condiciones.

INSERTO	ENZIMAS	CONDICIONES DE REACCIÓN
<i>murC</i>	EcoRI/HindIII	Buffer rojo 37 °C, 1 hora
<i>murD</i>	EcoRI/HindIII	Buffer rojo 37 °C, 1 hora
<i>murE</i>	EcoRI/HindIII	Buffer rojo 37 °C, 1 hora
<i>murF</i>	EcoRI/HindIII	Buffer rojo 37 °C, 1 hora
<i>ddl</i>	EcoRI/HindIII	Buffer rojo 37 °C, 1 hora

Una vez digerido todo el DNA con las correspondientes enzimas, las digestiones se inactivaron a 80 °C durante 20 minutos.

A continuación, se procedió a la ligación de los insertos con el plásmido pMV261. Para ello, los genes o insertos ya digeridos fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% para ser purificados. El primer paso llevado a cabo fue la medición de la concentración de inserto o vector en el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop).

Con esta información, se calcularon los femtomoles de cada molécula necesarios para la ligación (10 fmol de vector y 50 fmol de inserto). Esos femtomoles de inserto y vector fueron mezclados con buffer de enzima ligasa T4, enzima ligasa T4 y agua libre de nucleasas, todo ello siguiendo las instrucciones del kit para ligaciones de Invitrogen.

Tras realizar la mezcla, fueron incubados a temperatura ambiente durante al menos 1 hora antes de ser transformadas por choque térmico en bacterias *E. coli* y sembradas en placas de Petri con LB agar con kanamicina. Estas placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, tras lo cual se realizó una PCR de algunas de las colonias por separado con la polimerasa Taq. Esta PCR sirvió para comprobar si los productos de la PCR de la colonia mostraban el inserto con el peso molecular adecuado.

Las cepas que han sufrido exitosamente la ligación fueron sometidas a una purificación de plásmido mediante el Kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). Los plásmidos resultantes que hayan realizado la ligación correctamente serán transformados en *M. smegmatis* por electroporación.

En el caso de la cepa de sobreexpresión de MurF, también se realizó el ensamblaje de inserto y vector por Gibson assembly, siguiendo las instrucciones del Kit de Gibson de GeneArt Gibson Assembly X (Invitrogen).

### **3.3.5) Preparación de bacterias termocompetentes de *E. coli* y transformación por choque térmico**

Para inducir termocompetencia en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, se utilizó un método basado en el tratamiento de las bacterias con CaCl<sub>2</sub>. 200 mL de un cultivo de *E. coli* en fase de crecimiento logarítmico (D.O. a 600 nm de 0,35-0,45) fueron recolectados por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron en 40 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM (Sigma-Aldrich), MgCl<sub>2</sub> 70 mM (Sigma-Aldrich) y acetato de sodio 40 mM (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se centrifugaron en las mismas condiciones y se resuspendió el pellet en 4 mL de CaCl 2 100 mM y glicerol 15%. Las bacterias competentes se conservaron en el congelador a -80 °C. Por otra parte, para llevar a cabo la transformación el primer paso fue descongelar las muestras en hielo para pipetear alícuotas de 50 µL. Posteriormente, se añadieron 5 µL de la mezcla de ligación y se incubó durante 2 minutos a 37 °C. Por último, se añadieron 950 µL de medio LB fresco (hasta un volumen total de 1 mL) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se sembraron las bacterias en placas de Petri de LB con kanamicina, que se incubaron 24 horas a 37 °C para la formación de colonias. Transcurridas las 24 horas se comprobó la presencia del inserto por PCR de colonia, utilizando los mismos oligonucleótidos que en la amplificación de los insertos.

### **3.3.6) Preparación de bacterias electrocompetentes de *M. smegmatis* y transformación por electroporación**

Para la preparación de bacterias electrocompetentes de *M. smegmatis*, el primer paso es el inicio de un cultivo en 5 mL de LB que se incuba a 37 °C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, inocular un precultivo con una dilución 1/50 en medio 7H9 con 0,05% Tween y 10% de ADC e incubar en agitación hasta una D.O. de 0,5-0,6 durante al menos 3 horas. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, se dejaron 30 minutos en hielo tanto los cultivos como los reactivos que se utilizaron más adelante (agua MiliQ y glicerol al 10% estéril).

Transcurridos los 30 minutos, se pasaron los cultivos a tubos de 50 mL y se centrifugaron 5 minutos a 4 °C a 4000 R.C.F. varias veces. Entre cada centrifugación, primero se añadió agua estéril fría (25mL) al pellet resultante, y después 20 mL de glicerol al 10% estéril frío tras la siguiente centrifugación. Finalmente, se centrifugó

una última vez en las mismas condiciones para resuspender el pellet en un volumen 100 veces menor al cultivo inicial de glicerol 10% estéril frío, y se separaron alícuotas de 50 µL para guardar a -80°C.

Para la transformación por electroporación de las bacterias, se han de transformar unos 500 ng del plásmido de interés a las bacterias descongeladas en hielo en una cubeta de electroporación (0,2 cm). A esta cubeta se le aplicará un pulso de 2500 V (resistencia de 1000 Ω) para transformar las bacterias y se recogerán en 950 µL de LB a un eppendorf de 1,5 mL. Finalmente, se incubarán a 37 °C durante 1 hora y se sembrarán en placas de Petri para la formación de colonias resistentes a lo largo de unas 72 horas a 37 °C. Como resultado de estas transformaciones por electroporación, se obtuvieron cepas de MurD, MurE y Ddl que se guardaron en tubos con el 15% de glicerol a -80 °C. A partir de esos tubos congelados, se realizaron cultivos de medio 7H9 con 0,05% de Tween y ADC en frascos de 25 mL para tener cultivos de cada cepa por separado a 37°C.

### **3.4) Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos**

#### **3.4.1) Determinación de la CMI por microdilución**

Las CMIs son el resultado de pruebas realizadas para calcular la Concentración Mínima Inhibitoria de un compuesto frente a las bacterias, permitiendo relacionar la sensibilidad del microorganismo frente a distintas concentraciones del antimicrobiano. En este trabajo se realizaron determinaciones de CMIs en medio líquido 7H9+glicerol+ADC, en placas de 96 pocillos, siguiendo el protocolo siguiente:

En primer lugar, se prepararon mezclas de antibióticos al doble de la concentración máxima a ensayar. En las placas de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano, se añadieron 100 µL de medio 7H9 fresco en las columnas 2-12 completas, y 200 µL de la mezcla de cada antibiótico en la columna 1. Después, se realizaron diluciones seriadas de 100 µL desde la columna 1 hacia la 11, de la cual se descartaron los últimos 100 µL. A continuación, se preparó un inóculo de  $2 \times 10^5$  bacterias/mL (midiendo previamente la densidad óptica del cultivo del que se parte y teniendo en cuenta que a esa longitud de onda 0,125 de D.O. corresponden a  $10^7$  bacterias/mL). Por último, se añadieron 100 µL de inóculo a cada pocillo, dejando un control negativo y un control positivo. Por tanto, el volumen total de cada pocillo era de 200 µL.

Una vez añadido el inóculo, se incubaron las placas a 37 °C durante 72 horas para dejar crecer los cultivos bacterianos. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 30 µL por pocillo de MTT [bromuro de (3-(4,5-dimetillthiazol-2-il)-2,5-difenilltetrazolio] 5 mg/mL con el 10% de Tween, tras lo cual se incubaron las placas durante 3 horas a 37 °C para que se produjera la reacción buscada. Finalmente, se leyó la densidad óptica de las placas a 580 nm para obtener los valores con los que interpretar los resultados.

El ensayo del MTT es un ensayo de variabilidad colorimétrica que se basa en la reducción enzimática de la molécula de MTT a formazán cuando esta se encuentra expuesta a bacterias viables. La molécula de MTT, perteneciente a la familia de las sales de tetrazolio, es soluble en agua y presenta un color amarillo. Sin embargo, cuando se reduce, pasa a ser un compuesto de la familia de los formazanos, de color violeta, por lo que cambiará de color. Este cambio de color es detectable por el espectrofotómetro, que lo compara con un pocillo control.

Por otro lado, la CMI de un compuesto se define como la concentración mínima inhibitoria del mismo, es decir, la concentración más baja de un compuesto que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana. En este caso, se ha establecido como la concentración mínima de un compuesto antimicrobiano a la que se encuentra un 90% de inhibición en la conversión del MTT a la sal de formazano.

### 3.4.2) Checkerboards

Los ensayos de checkerboards son ensayos de sinergia mediante los cuales se estudia la acción de un antimicrobiano en conjunto con otro contra una cepa de un microorganismo.

Los ensayos de checkerboard se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo plano con medio líquido 7H9 con el 0,5% de glicerol y 10% ADC, con un inóculo de  $2 \times 10^5$  bacterias/mL y realizando dos réplicas por cada cepa. Estos ensayos se han llevado a cabo atendiendo al siguiente protocolo:

El primer paso comprende la preparación de una disolución del antibiótico 4 veces más concentrada que la CMI de cada compuesto. Una vez preparadas las disoluciones de antibiótico, se añadieron 75 µL de medio 7H9 fresco a cada pocillo excepto a los pocillos A2-G2 (segunda columna completa excepto el pocillo H2), y 37,5 µL a los pocillos A2-F2. Seguidamente, se aplicaron 75 µL del primer antibiótico a los pocillos

G1-G12 (fila G completa), y 75 µL del segundo antibiótico a los pocillos G2 y H2. Por último, se añadieron 37,5 µL del segundo antibiótico a los pocillos A2-F2.

Antes de añadir el inóculo, se realizaron en primer lugar diluciones seriadas de 75 µL desde los pocillos G1-G12 hacia A1-A12, descartando los últimos 75 µL. A continuación, se realizaron diluciones seriadas de los pocillos A2-H2 hacia A12-H12, descartando también los últimos 75 µL. Con las diluciones seriadas completadas, se procedió a añadir 75 µL del inóculo (calculado a partir del cultivo original de cada cepa para obtener  $2 \times 10^5$  bacterias/mL) a cada pocillo, tras lo cual se incubaron las placas a 37°C durante 72 horas.

Al igual que en los ensayos de CMI, transcurrido el tiempo de incubación se añaden 30 µL de MTT con el 10% de Tween a todos los pocillos, se incubaron las placas otras 3 horas a 37 °C y se leyó la densidad óptica a 580 nm.

Una vez interpretados los resultados, las CMI relativas en los pocillos se utilizaron para determinar qué tipo de interacción existe entre los dos antibióticos. Se definió la CIF (Concentración inhibitoria fraccionada) como la CMI del compuesto A en presencia del compuesto B ( $CMI_A^*$ ) dividida por la CMI 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 ( $CIF_{Total} < 0,5$ ); una línea recta, ausencia de interacción ( $0,5 < CIF_{Total} < 4$ ); y una curva convexa, antagonismo ( $CIF_{Total} > 4$ ).

$$CIF_A = \frac{CMI_A^*}{CMI_A}$$

$$CIF_{Total} = CIF_A + CIF_B$$

**Ecuación 1.** Cálculo de la CIF de cualquier compuesto (A) y cálculo de la CIF total para dos compuestos A y B, para estudiar posibles perfiles de interacción sinérgica.

### 3.4.3) Ensayos de sinergia

Estos ensayos de sinergia se realizaron en principio como un ensayo de CMI, excepto por el hecho de que se colocaban distintos antibióticos (en una concentración 4 veces mayor que la de su CMI ya estudiada) en la placa de 96 pocillos. Además, la selamectina estaba anteriormente presente en el medio del inóculo a una concentración determinada. Por lo tanto, al añadir el inóculo bacteriano con la

selamectina, esta entraba en contacto con las distintas concentraciones de cada compuesto por separado, ofreciendo así una visión de las posibles sinergias que pudiera establecer. Se buscan compuestos que, en presencia de una concentración 4 veces menor que la CMI de selamectina, sean capaces de alcanzar una CMI 4 veces también menor.

Cada placa de 96 pocillos se repitió 4 veces para aplicar una concentración de selamectina de 0, ½, ¼ o 1/8 de la Concentración mínima inhibitoria esperada para la selamectina (SEL). Además, la CMI de la SEL se determinó simultáneamente como placa control. Por último, las placas se incubaron 72 horas a 37 °C, se añadió MTT con el 10% de Tween, se incubaron 3 horas a 37°C y se midió su densidad óptica a 580 nm. La sinergia entre dos compuestos se determinará mediante la medición de las CMI para cada compuesto y la ratio expresada en la ecuación 3:

$$Sinergia = \frac{CMI \text{ del compuesto } B \text{ sin compuesto } A}{CMI \text{ compuesto } B \text{ con } \frac{1}{2}, \frac{1}{4} \text{ o } \frac{1}{8} \text{ del compuesto } A} > 4$$

$$Antagonismo = \frac{CMI \text{ del compuesto } B \text{ sin compuesto } A}{CMI \text{ compuesto } B \text{ con } \frac{1}{2}, \frac{1}{4} \text{ o } \frac{1}{8} \text{ del compuesto } A} < 0,25$$

$$No \text{ interacción} = 0,25 < \frac{CMI \text{ del compuesto } B \text{ sin compuesto } A}{CMI \text{ compuesto } B \text{ con } \frac{1}{2}, \frac{1}{4} \text{ o } \frac{1}{8} \text{ del compuesto } A} < 4$$

**Ecuación 2.** Ratios de las CMI de cada compuesto para determinar perfiles de sinergia, no interacción o antagonismo entre los compuestos A y B.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo del trabajo realizado, se ha caracterizado la actividad de la selamectina y otros compuestos con actividad antimicrobiana en la inhibición de la síntesis de la pared de micobacterias. En concreto, se ha estudiado su acción en la función de algunos genes en cepas de *Mycobacterium smegmatis* que sobreexpresaban los genes en cuestión. Los estudios realizados han ido encaminados al estudio de algunos genes involucrados en la síntesis de la pared celular (*murD*, *murE*, *ddl* y *embB*), la mayoría

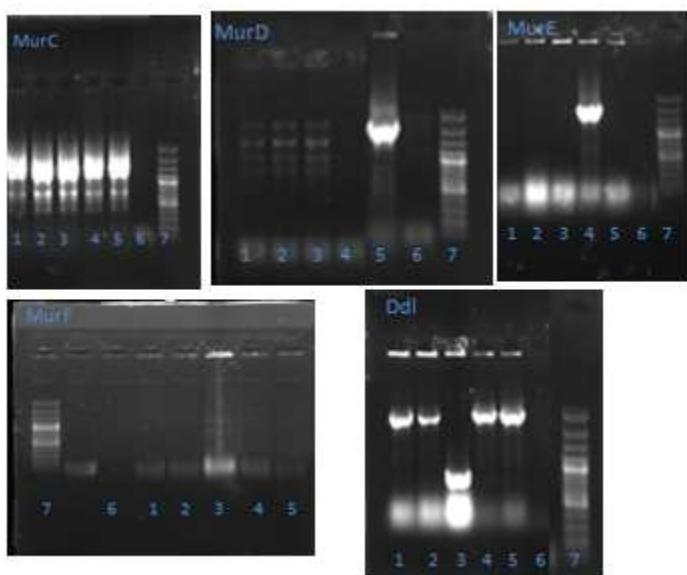
piezas esenciales de una cadena de síntesis de compuestos tales como peptidoglicano, arabinoglactano o ácidos micólicos, que juntos componen la pared de estas micobacterias.

#### **4.1) Clonaje de vector e insertos**

Los genes a estudiar han sido clonados en un plásmido (pMV261) para su posterior ligación con el vector y su transformación final en *M. smegmatis*. Los oligonucleótidos utilizados para el clonaje fueron diseñados con la plataforma benchling, que permitió obtener unos primers que hibridaran con los extremos de los genes para su posterior inserción en el vector. Para ello, la hibridación con el vector se diseñó por medio de enzimas, en concreto *EcoRI* y *HindIII*. En el caso del oligonucleótido diseñado para el clonaje de *murF* no pudo seguir las mismas pautas, puesto que presentaba un sitio de corte para *EcoRI* dentro de la secuencia del gen, y habría cortado el inserto. Por lo tanto, para clonar *murF* se diseñó una estrategia de clonaje en la que estaría flanqueado por dos secuencias de corte para *HindIII*, y la transformación en *E. coli* mostraría qué bacterias han incorporado el inserto en la orientación adecuada.

#### **4.2) Amplificación por PCR, digestión, ligación y transformación**

Los insertos producto de la digestión fueron destinados al proceso de ligación, en el cual cada inserto por separado fue mezclado con el plásmido pMV261 (cortado también por las enzimas *EcoRI* y *HindIII*). Durante la ligación, plásmido e inserto teóricamente hibridan por los sitios de corte de las enzimas y se unen, formando un nuevo plásmido circular esta vez de unos 6000 pares de bases (4488 pb pMV261 y 1500 pb aproximadamente de cada inserto). Posteriormente a la ligación, los productos fueron transformados en bacterias termocompetentes de *E. coli* para después sembrarlas en placas de Petri y obtener colonias. De esas colonias se realizaron una serie de PCR, con las que se obtuvieron unos productos que deberían avanzar en el gel como un plásmido integrado en el genoma de unas 6000 bases. Como resultado de la electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio se obtuvieron los datos de la figura 5.



**Figura 5.** Electroforesis de los productos de la PCR de colonia de las cepas de sobreexpresión de **MurC**, **MurF** y **Ddl**. Se ha realizado electroforesis de 5 colonias de cada cepa (pocillos 1-5), con un pocillo control (6) y otro con el marcador de peso molecular (GeneRuler 100bp Plus) (7). El marcador de peso molecular muestra bandas de 500 y 1000 pares de bases de manera más intensa

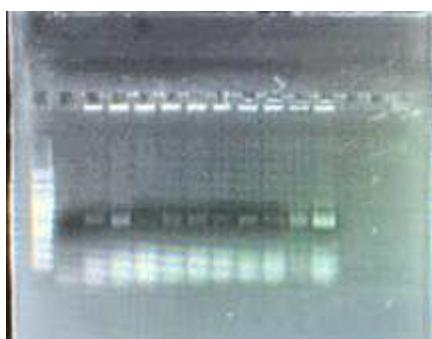
Como podemos comprobar, no todas las ligaciones han resultado exitosas, por lo que únicamente se dan como buenas aquellas que hayan producido un plásmido con el peso molecular deseado. En este caso son: todas las colonias del gen *murC*, la colonia 1 de *murD*, la colonia 4 de *murE* y ninguna de las colonias de *murF* ni *ddl*. En las colonias de la ligación del plásmido con *murF* se ve una alta inespecificidad, por lo que no se pueden considerar válidas ninguna de las colonias. En el caso de *ddl* aparecen bandas cerca de los pesos moleculares de interés, pero están por encima del peso molecular deseado, por lo que también se desechan todas.

Dados los resultados anteriores, se repitió el experimento desde el momento de la ligación para los genes *murF* y *ddl*. El resultado esta vez fue satisfactorio para *ddl*, ya que presentaban ligación exitosa en todas las colonias analizadas. Para *murF* continuó presentando inespecificidad, por lo que no podía concluir el experimento para este gen.

A continuación, tras varios experimentos en los que se trató de buscar colonias de que hubieran internalizado de manera correcta el plásmido de la ligación con *murF*, y repitiendo el proceso incluso desde la digestión enzimática, no se extraían resultados concluyentes (seguía apareciendo inespecificidad al realizar la electroforesis de la PCR de las colonias en el gel). Por tanto, se optó otra estrategia posible para realizar el ensamblaje que no exigiera un corte enzimático que pueda cortar inespecíficamente

en algún lugar del gen. La estrategia escogida para ello fue Gibson Assembly, para la cual se crearon unos nuevos oligonucleótidos que solaparan a ambos lados del sitio de clonaje múltiple para que se insertara el gen en el plásmido por recombinación entre secuencias idénticas. De esta forma, se evitaba la digestión enzimática.

Tras la ligación por Gibson y la consiguiente transformación en *E. coli*, se procedió a la PCR de algunas colonias y el producto se sometió a una electroforesis en gel de agarosa. Los resultados fueron idénticos a las ligaciones realizadas por digestión enzimática, por lo que las inespecificidades continuaban complicando la caracterización de *murF* (Figura 6).



**Figura 6. Electroforesis de los productos de PCR de colonias de MurF obtenidos por Gibson Assembly.**  
Como se observa de izquierda a derecha, se encuentra el marcador de peso molecular, el control negativo y 9 productos de PCR de 9 colonias distintas.

Como última opción, se trató de purificar de banda el plásmido pMV261 digerido con *Hind*III para la cepa de sobreexpresión de MurF, repitiendo los mismos resultados al no identificarse un plásmido que contuviera el inserto de manera correcta.

Con las colonias escogidas con *murC*, *murD*, *murE* y *ddl* en la electroforesis, se inició la purificación de plásmido con el Kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) para cuantificarlo y proceder a la electroporación en *M. smegmatis*.

En el caso de *murC*, debido a la poca cantidad de plásmido detectada con el NanoDrop (4 ng/ $\mu$ L), fue necesario repetir los experimentos de ligación para obtener unas colonias de *E. coli* que expresaran mayor cantidad de plásmido y que, a su vez, tuvieran este ligado de manera correcta. Finalmente, se consiguió una cantidad aceptable de plásmido con el inserto MurC ligado correctamente.

#### **4.3) Electroporación en *M. smegmatis***

Para el caso de las cepas de *E. coli* con el inserto *murC*, tras sembrar en placas de Petri la transformación por electroporación y haber pasado el tiempo de incubación, no aparecieron colonias en la placa de Petri, por lo que no había ninguna colonia con la que trabajar. En cambio, se dispuso de cepas mutantes de sobreexpresión de MurD, MurF y Ddl de *M. smegmatis* para el estudio de la acción de compuestos antimicrobianos.

#### **4.4) Caracterización de las cepas de sobreexpresión de *M. smegmatis***

En este trabajo, se realizaron distintas pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos para estudiar el posible papel de los genes *murD*, *murE* y *ddl* en el mecanismo de acción de las avermectinas. Para ello, se estudiaron las cepas de sobreexpresión de estos genes de *M. smegmatis* frente a una cepa de referencia de *M. smegmatis* (mc<sup>2</sup>155) con varias combinaciones de compuestos antimicrobianos.

Por medio de la medida de las absorbancias se pudo detectar el pocillo que marcaba la CMI para cada compuesto, y se halló su valor en µg/mL para cada compuesto antimicrobiano.

En los ensayos con las distintas cepas de sobreexpresión surgieron algunas diferencias en las CMI con respecto a las esperadas según la cepa de referencia. Estas diferencias pueden apreciarse en la tabla 5.

**Tabla 5.** Valores de las CMI para cada compuesto distinguiendo las cepas estudiadas en ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos, comparadas con la cepa wildtype. Selamectina (SEL), etambutol (EMB), D-cicloserina (DCS), meropenem (MP), vancomicina (VAN), rifampicina (RIF), isoniazida (INH), cefradina (CEPH) y kanamicina (KM).

CMI <sup>s</sup>				
( $\mu$ g/mL)	<i>Mycobacterium smegmatis mc<sup>2</sup>155</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
		<i>pMV261-murD</i>	<i>pMV261-murE</i>	<i>pMV261-ddl</i>
<b>SEL</b>	2	2	2	2
<b>EMB</b>	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>VAN</b>	4	4	4	4
<b>DCS</b>	256	256	256	512
<b>CEPH</b>	128	128	128	128
<b>INH</b>	64	64	64	64
<b>MP</b>	4	4	2	8
<b>RIF</b>	64	128	64	64

Como se puede comprobar, para la mayoría de cepas las CMI no difieren de las encontradas para la cepa de referencia con los mismos compuestos. Sin embargo, la mayor diferencia la encontramos en el mutante de sobreexpresión de Ddl cuando se pone en contacto con D-cicloserina, puesto que resulta más resistente a este compuesto que las demás cepas. Esto concuerda con la información esperada, ya que se ha estudiado que Ddl es la diana de la D-cicloserina, por lo que si se sobreexpresa la diana el antibiótico tendrá un menor efecto sobre la bacteria. En este caso, la cepa necesita el doble de concentración del antimicrobiano para llegar a la CMI.

También encontramos diferencias más puntuales, como la resistencia de la cepa de sobreexpresión de Ddl a meropenem (MP) o la mayor sensibilidad de la cepa de sobreexpresión de MurE al mismo compuesto, así como una mayor resistencia de la cepa de sobreexpresión de MurD a rifampicina. Sin embargo, estos resultados están menos contrastados y deberían realizarse más ensayos y más específicos para determinar si se trata de una variación puntual de la CMI o en realidad tiene una base científica que provoque esos resultados siempre.

Hasta el momento, los ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas de sobreexpresión de MurD, MurE y Ddl no han mostrado diferencias en cuanto a la susceptibilidad a selamectina, por lo que deberían realizarse más estudios.

Para ello, se realizaron también ensayos de checkerboards en los que se estudiaron posibles perfiles de interacción sinérgica entre la selamectina y otros antibióticos.

Para tener un dato con el que comparar las distintas reacciones de las cepas al antimicrobiano, se realizaron comparaciones entre las CIF calculadas, tal y como muestra la tabla 6.

**Tabla 6.** Distintas CIF entre cepas y distintas combinaciones de antibióticos con selamectina.

Cepas	CIF (SEL+EMB)	CIF (SEL+MP)
	1	1,03
<i>Mycobacterium smegmatis mc<sup>2</sup>155</i>		
	1	1
<i>Mycobacterium smegmatis pMV261-murD</i>	0,75	1
<i>Mycobacterium smegmatis pMV261-murE</i>	0,75	1
<i>Mycobacterium smegmatis pMV261-ddl</i>		

A la vista de estos datos se puede confirmar que ninguno de los compuestos testados ha presentado un perfil de sinergia con la selamectina, simplemente hay una ausencia de interacción entre ellos que hace que sus efectos al combinarse se sumen. Para comprobar todos los compuestos del trabajo con la selamectina habría que realizar una gran cantidad de ensayos de checkerboard, por lo que se ha preferido llevar a

cabo ensayos de sinergia para identificar más rápidamente algún compuesto que muestre este perfil sinérgico en combinación con selamectina.

**Tabla 7.** Ratios de variación entre la CMI de cada compuesto sin selamectina en el medio y la CMI del compuesto con una determinada concentración de selamectina. Las ratios que incluyen a todas las cepas con el mismo compuesto se han calculado a partir de la media de las ratios de cada cepa por separado para ser lo más representativos de cada una posible.

Cepas y compuesto ensayado	Selamectina 1/8 (0,25 µg/mL)	Selamectina 1/4 (0,5 µg/mL)	Selamectina ½ (1µg/mL)
<b>Vancomicina (todas las cepas)</b>	1	4	>4
<b>Rifampicina (todas las cepas)</b>	2	4	>4
<b>Etambutol (cepa de referencia)</b>	4	4	>4
<b>Etambutol (resto de cepas)</b>	2	2	2

Los resultados obtenidos en los ensayos de sinergia para las cepas de sobreexpresión de MurD, MurE y Ddl muestran claramente que la selamectina y la vancomicina presentan un perfil de interacción sinérgica, ya que, en presencia de concentraciones menores a  $\frac{1}{4}$  de la CMI de la selamectina, esta es capaz de hacer que la CMI de la vancomicina para cualquiera de las cepas disminuya cuatro veces o más. Los resultados son similares en todas las cepas, pero están al límite de los valores para considerarse sinergia, por lo que habría que continuar realizando ensayos.

También encontramos un mismo perfil sinérgico en el caso de la rifampicina, que sobre todo presentaba este perfil de sinergia con la selamectina en la cepa Ddl, pero que también lo hace en las demás cepas. Por último, se ha encontrado sinergia entre la selamectina y el etambutol en el caso de la cepa de referencia, mientras que en las cepas de sobreexpresión los resultados no muestran ningún perfil similar al de sinergia con estos compuestos.

El resto de compuestos no ha presentado ningón perfil de interacción sinérgica, como muestran las ratios de la tabla 8.

**Tabla 8.** Muestra los ratios de la variación entre la CMI de cada compuesto sin selamectina en el medio y la CMI del compuesto con una determinada concentración de selamectina. Los ratios que incluyen a todas las cepas con el mismo compuesto se han calculado a partir de la media de los ratios de cada cepa por separado para ser lo más representativos de cada una posible.

Cepas y compuesto ensayado	Selamectina (0,25 µg/mL)	1/8	Selamectina (0,5 µg/mL)	1/4	Selamectina (1µg/mL)	½
D-cicloserina (todas las cepas)	1		2		2	
Cefradina (todas las cepas)	1		0,5		0,5	
Isoniazida (todas las cepas)	1		1		2	

#### 4.5) Caracterización de las distintas cepas de expresión de EmbB

**Tabla 9.** Valores de las CMI para los distintos compuestos estudiados (SEL, EMB, INH y RIF) en las distintas cepas de expresión de EmbB.

CMIs (µg/mL)	<i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>mc<sup>2</sup>155</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i> pMV261- embB	<i>Mycobacterium smegmatis</i> pMV261-embB R307H	<i>Mycobacterium smegmatis</i> pMV261- ΔembB
<b>SEL</b>	2	2	2	2
<b>EMB</b>	1	1	16	2
<b>INH</b>	64	64	64	64
<b>RIF</b>	64	64	64	0,25

La selamectina continúa presentando valores idénticos de CMI en cualquier cepa. Pero, esta vez, se observaron algunas diferencias significativas en cuanto a la diferencia de CMI para el mismo compuesto y entre distintas cepas. La primera de ellas es el claro aumento de la CMI del etambutol para la cepa R307H, que aumenta mucho su valor en comparación con las demás cepas. Por tanto, la mutación R307H en EmbB confiere resistencia a etambutol. En cambio, no son tan lógicos los resultados obtenidos con la cepa de sobreexpresión del gen EmbB o de mutante de delección del mismo, ya que presentan valores de CMI idénticos, indicando que la sobreexpresión del gen diana no ha ayudado a generar resistencia contra este compuesto (al menos en estos ensayos).

También se observó que la cepa  $\Delta embB$  presenta una gran sensibilidad a rifampicina comparada con la del resto de cepas. El hecho de que la cepa tenga el gen *embB* delecionado no debería afectar a la susceptibilidad a rifampicina, puesto que no actúa sobre esa proteína. Por lo tanto, este aumento de la susceptibilidad puede deberse al hecho de que la delección de ese gen provoque que la pared celular sea más permeable y, por tanto, haciendo que la bacteria sea más susceptible a otros antibióticos que no actúan en la pared, pero necesitan traspasarla para actuar en la célula, como es el caso de la rifampicina.

Una vez establecidos unos valores de CMI para distintos compuestos en estas cepas mutantes del gen *embB*, se realizó a realizar un ensayo de checkerboard en el que se combinaban la selamectina y el etambutol en busca de sinergias. Los resultados del mismo están disponibles en la tabla 10.

**Tabla 10.** Distintas CIF entre diferentes cepas de expresión del gen *embB* en combinación de selamectina con etambutol.

SEL+EMB	CIF
<b>Wildtype</b>	1
<b>R307H</b>	0,53
<b><math>\Delta</math>Emb</b>	1
<b>Emb OE</b>	1

Para el caso de las cepas mutantes del gen *embB* no se han visto valores de las CIF que muestren un perfil de interacción sinérgica entre la selamectina y el etambutol. Únicamente la cepa R307H se encuentra cerca de valores representativos de una interacción sinérgica, pero sin llegar a ello. Por tanto, serían necesarios más estudios para detectar algún compuesto que mostrara esta sinergia con la selamectina para estas cepas.

## 5. Discusión

La pared bacteriana ha sido una diana muy explotada en el desarrollo de fármacos nuevos en general. Así es en el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria que lleva miles de años afectando a la humanidad y que está en el punto de mira de muchas investigaciones que buscan desarrollar fármacos nuevos para matar a esta micobacteria. La pared de *M. tuberculosis* ha resultado ser una diana muy estudiada debido a sus propiedades. Entre ellas, se encuentra el hecho de que se presenta como una barrera natural que impide la acción de muchos fármacos contra el patógeno. Sin embargo, esta característica que hace a esta bacteria impermeable contra muchos antimicrobianos resulta ser también el punto de mira sobre el que atacar. Si esta barrera es destruida o traspasada, la bacteria queda muy expuesta a la acción de los antimicrobianos que se administren para erradicarla, por lo que es de gran interés estudiar la estructura y biología de la pared para poder atacarla eficientemente.

Por todo esto, se han estudiado seis genes implicados en la síntesis del pentapéptido del peptidoglicano de la pared de micobacterias (*murC*, *murD*, *murE*, *murF*, *ddl*) mediante la generación de mutantes de sobreexpresión de los mismos y la realización de ensayos de susceptibilidad a antimicrobiano. Se ha trabajado con *Mycobacterium smegmatis*, una micobacteria no patógena de crecimiento rápido que sirve como modelo de estudio de *Mycobacterium tuberculosis*, y sobre la cual hemos estudiado la susceptibilidad a 8 compuestos antimicrobianos distintos en distintos mutantes de sobreexpresión.

Para los clonajes y obtención de las cepas de sobreexpresión de MurC y MurF no se ha encontrado una explicación al respecto. Deberían repetirse los ensayos y buscar el modo de crear mutantes de sobreexpresión de estos genes en *M. smegmatis*. De los resultados obtenidos se ha detectado una resistencia a D-cicloserina de la cepa de sobreexpresión de Ddl frente al resto de cepas. Este resultado ya había sido analizado con anterioridad, ya que Ddl es la diana de la D- cicloserina (39).

También se encontraron en las cepas de sobreexpresión de MurD, MurE y Ddl perfiles de interacción sinérgica entre la vancomicina, rifampicina y etambutol con la selamectina en determinadas cepas y sólo en algunos ensayos. Los ensayos de CMI líquida no habían mostrado diferencias en la CMI de la selamectina entre cepas, pero las sinergias mostraron cambios significativos dependiendo de la concentración de la selamectina. Este hecho podría dar lugar a estudios de la interacción entre estos antibióticos para tratar de alguna manera posibles infecciones bacterianas. Sin embargo, para ello será necesario realizar numerosos estudios en otros modelos bacterianos, tanto para determinar la reproducibilidad de los ensayos como para hacerlo con el mecanismo de sinergia entre los distintos compuestos estudiados. Además, con los resultados de los ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos de la cepa mutante de expresión de *embB*, se puede hipotetizar que la selamectina no necesita entrar a la bacteria para actuar, y que los elementos de la pared bacteriana no limitan su acción. Esto se puede afirmar gracias a las diferencias entre las CMI de rifampicina y selamectina en presencia de otros compuestos que actúen sobre la pared bacteriana.

Como alternativa al trabajo realizado, existe la posibilidad de delecciónar los genes estudiados para generar mutantes knockout de los mismos. De esta manera, la función e importancia de los genes para la supervivencia de la bacteria puede ser estudiada más a fondo, ya que es posible detectar ausencia de alguna proteína o alguna función mediante determinados ensayos. Sin embargo, la delección de genes implica técnicas de ingeniería genética más avanzadas y más difíciles de llevar a cabo en el tiempo del que se disponía para realizar el trabajo. Otro inconveniente añadido de la delección de genes en nuestro TFM es la esencialidad de los genes de síntesis del peptidoglicano, que imposibilita su eliminación directa y requeriría la complementación con copias del gen reguladas por promotores inducibles para poder estudiar el efecto al reducir su expresión. Por todo esto, las técnicas utilizadas para el estudio de la susceptibilidad a antimicrobianos de los mutantes elegidos se adecuan al tiempo y complejidad necesarios para obtener resultados.

El objetivo con el que se han realizado estos experimentos ha sido conseguido, y pueden ser complementados con ensayos de cinética de muerte, continuar la búsqueda del mecanismo de acción de la selamectina en bacterias, estudios en cepas y especies distintas a micobacterias o estudios en cepas de *M. tuberculosis*. Con todo ello, se continúa el camino hacia el descubrimiento de nuevas dianas frente a *M. tuberculosis*.

## 6. CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión en *M. smegmatis* de los genes *murD*, *murE*, *ddl* y *embB* no confiere resistencia a selamectina.
2. La mutación R307H del gen *embB* confiere resistencia a etambutol.
3. La delección del gen *embB* confiere mayor permeabilidad a la membrana y permite la acción de antimicrobianos que actúen dentro de la bacteria, como la rifampicina.
4. Las cepas de sobreexpresión de MurD, MurE y Ddl no presentan sinergia entre selamectina y etambutol, mientras que la cepa wildtype de *M. smegmatis* sí lo hace. Estos resultados muestran que estos genes pueden afectar a la interacción de estos dos compuestos.
5. En la interacción entre vancomicina y rifampicina con selamectina no hay genes que afecten con su sobreexpresión entre cepas distintas.

## 6. CONCLUSIONS

1. Overexpression in *M. smegmatis* of the *murD*, *murE*, *ddl* and *embB* genes does not confer resistance to selamectin.
2. The R307H mutation of the *embB* gene confers resistance to ethambutol.
3. The deletion of the *embB* gene confers greater permeability to the membrane and allows the action of antimicrobials that act within the bacteria, such as rifampicin.
4. The overexpression strains of MurD, MurE and Ddl do not show synergy between selamectin and ethambutol, while the wildtype strain of *M.*

*smegmatis* does. These results show that these genes may affect the interaction of these two compounds.

5. In the interaction between vancomycin and rifampin with selamectin there are no genes that affect their overexpression between different strains.

## 7. REFERENCIAS

1. Damaliji SF. History of tuberculosis. *Iraqi Med J.* 1974;22(1–2):1–6.
2. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 2006;100(11):1862–70.
3. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. WHO Press. 2022. 98 p.
4. Tuberculosis deaths rise for the first time in more than a decade due to the covid-19 pandemic. Disponible en : <https://www.who.int/news/item/14-10-2021-tuberculosis-deaths-rise-for-the-first-time-in-more-than-a-decade-due-to-the-covid-19-pandemic> [Internet]. 2021.
5. Mapa de la incidencia de la tuberculosis (2021). Disponible en : <https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/PlanTuberculosis/mapas.htm> [Internet]. 2021.
6. Borkowska DI, Napiórkowska AM, Brzezińska SA, Kozińska M, Zabost AT, Augustynowicz-Kopeć EM. From Latent tuberculosis infection to tuberculosis. *News in diagnostics (QuantiFERON-Plus).* Polish J Microbiol. 2017;66(1):5–8.
7. TB incidence statistics. Disponible en : <https://tbfacts.org/> [Internet]. Disponible en : [https://tbfacts.org/tb-statistics/#:~:text=TB%20Incidence%20in%20high%20Burden%20Countries&text=India%20\(26%25\)%2C%20China%20\(Nigeria%26%20TB%20in%20South%20Africa\)](https://tbfacts.org/tb-statistics/#:~:text=TB%20Incidence%20in%20high%20Burden%20Countries&text=India%20(26%25)%2C%20China%20(Nigeria%26%20TB%20in%20South%20Africa))
8. Maciel ELN, Gonçalves Júnior E, Dalcolmo MMP. Tuberculose e coronavírus: o que sabemos? *Epidemiol e Serv saude Rev do Sist Unico Saude do Bras.* 2020;29(2):e2020128.
9. Caminero JA, Cayla JA, García-García JM, García-Pérez FJ, Palacios JJ, Ruiz-Manzano J. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis con resistencia a fármacos. *Arch Bronconeumol.* 2017;53(9):501–9.
10. Soldin OP, Mattison DR. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(3):143–57.
11. Yerramsetti S, Cohen T, Atun R, Menzies NA. Global estimates of paediatric tuberculosis incidence in 2013–19: a mathematical modelling analysis. Vol. 10, *The Lancet Global Health.* 2022. p. e207–15.
12. Fernandez E, Perez R, Hernandez A, Tejada P, Arteta M, Ramos JT. Factors and mechanisms for pharmacokinetic differences between paediatric population and adults. Vol. 3, *Pharmaceutics.* 2011. p. 53–72.
13. WHO. Datos y estadísticas sobre la tuberculosis. Disponible en :

- <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> [Internet].  
Tuberculosis: Key facts. 2021.
14. La OMS anuncia nuevas definiciones para la tuberculosis extensamente resistente [Internet]. Disponible en : <https://www.who.int/news/item/27-01-2021-who-announces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>
  15. Actor P, Sitrin RD, Uri J V. Antibacterial Agents. *Annu Rep Med Chem.* 1980;15(C):106–19.
  16. Bloemberg G V., Keller PM, Stucki D, Trauner A, Borrell S, Latshang T, et al. Acquired Resistance to Bedaquiline and Delamanid in Therapy for Tuberculosis. Vol. 373, *New England Journal of Medicine.* 2015. p. 1986–8.
  17. Andries K, Villellas C, Coeck N, Thys K, Gevers T, Vranckx L, et al. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. Department of Infectious Diseases, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium and Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium; 2014. p. Volume 9.
  18. 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).
  19. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. Vol. 529, *Nature.* 2016. p. 336–43.
  20. 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.
  21. Farha MA, Brown ED. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nat Microbiol* [Internet]. 2019;4(4):565–77. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-019-0357-1>
  22. Abrahams GL, Kumar A, Savvi S, Hung AW, Wen S, Abell C, et al. Pathway-selective sensitization of *mycobacterium tuberculosis* for target-based whole-cell screening. Vol. 19, *Chemistry and Biology.* 2012. p. 844–54.
  23. Isa MA. Comparative modeling and dynamic simulation of UDP-N-acetylmuramoyl-alanine ligase (MurC) from *Mycobacterium tuberculosis* through virtual screening and toxicity analysis. *Life Sci* [Internet]. 2020;262(June):118466. Disponible en : <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118466>

24. Knight S, Gianni D, Hendricks A. Fragment-based screening: A new paradigm for ligand and target discovery. Vol. 27, *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*. 2022. p. 3–7.
25. Hughes J, Rees S, Kalindjian S, Philpott K. Principles of early drug discovery [Internet]. *British Journal of Pharmacology*; 2010. p. 1239–49. Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21091654/>
26. Hughes D, Karlén A. Discovery and preclinical development of new antibiotics. Vol. 119, *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2014. p. 162–9.
27. Phases and stages of drug discovery and development process. Disponible en : <https://www.nebiolab.com/drug-discovery-and-development-process/> [Internet].
28. Pharma. Biopharmaceutical Research & Development: The Process Behind New Medicines. *Pharm Res Manuf Am* [Internet]. 2015;24. Disponible en : [http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/rd\\_brochure\\_022307.pdf](http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/rd_brochure_022307.pdf)
29. Morgan S, Grootendorst P, Lexchin J, Cunningham C, Greyson D. The cost of drug development: A systematic review. *Health Policy (New York)* [Internet]. 2011;100(1):4–17. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.1016/j.healthpol.2010.12.002>
30. Talevi A. Drug Repurposing. *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2021.
31. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. Vol. 18, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018. p. 41–58.
32. 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.
33. Lim LE, Vilchèze C, Ng C, Jacobs WR, Ramón-García S, Thompson CJ. Anthelmintic avermectins kill mycobacterium tuberculosis, including multidrug-resistant clinical strains. Vol. 57, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013. p. 1040–6.
34. Batiha GES, Alqahtani A, Ilesanmi OB, Saati AA, El-Mleeh A, Hetta HF, et al. Avermectin derivatives, pharmacokinetics, therapeutic and toxic dosages, mechanism of action, and their biological effects. Vol. 13, *Pharmaceuticals*. 2020. p. 1–37.
35. Chen J, Liu M, Liu X, Miao J, Fu C, Gao H, et al. Interrogation of *Streptomyces avermitilis* for efficient production of avermectins. Vol. 1, *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2016. p. 7–16.

36. Selamectin | C43H63NO11 | ChemSpider. [cited 2019 Jun 13]. Disponible en : <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.16738655.html> [Internet]. 2015.
37. Revolution -Selamectin. Disponible en: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=8032a1ae-d192-4514-80f1-9a3b50dc2155&type=display> [Internet]. Disponible en : <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=25b2fdbef2f18-4153-835a-7a67bff83ef8&type=display>
38. Muñoz-Muñoz L, Shoen C, Sweet G, Vitoria A, Bull TJ, Cynamon M, et al. Repurposing avermectins and milbemycins against mycobacteroides abscessus and other nontuberculous mycobacteria. Vol. 10, *Antibiotics*. 2021.
39. Abrahams KA, Besra GS. Mycobacterial cell wall biosynthesis: A multifaceted antibiotic target. *Parasitology*. 2018;145(2):116–33.
40. Jackson M. The Mycobacterial Cell Envelope. *The Mycobacterial Cell Envelope*. 2014.
41. Kumar G, Galanis C, Batchelder HR, Townsend CA, Lamichhane G. Penicillin Binding Proteins and β-Lactamases of *Mycobacterium tuberculosis*: Reexamination of the Historical Paradigm. *mSphere*. 2022;7(1):1–10.
42. Isa MA. Homology modeling and molecular dynamic simulation of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine-D-glutamate ligase (MurD) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv using in silico approach. *Comput Biol Chem* [Internet]. 2019;78(November 2018):116–26. Disponible en : <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.11.002>
43. Bruning JB, Murillo AC, Chacon O, Barletta RG, Sacchettini JC. Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* D-alanine:D-alanine ligase, a target of the antituberculosis drug D-cycloserine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(1):291–301.
44. Kovač A, Majce V, Lenaršič R, Bombek S, Bostock JM, Chopra I, et al. Diazenedicarboxamides as inhibitors of d-alanine-d-alanine ligase (Ddl). *Bioorganic Med Chem Lett*. 2007;17(7):2047–54.
45. Makarov V, Lechartier B, Zhang M, Neres J, van der Sar AM, Raadsen SA, et al. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. Vol. 6, *EMBO Molecular Medicine*. 2014. p. 372–83.
46. Escuyer VE, Lety MA, Torrelles JB, Khoo KH, Tang JB, Rithner CD, et al. The Role of the embA and embB Gene Products in the Biosynthesis of the Terminal

- Hexaarabinofuranosyl Motif of *Mycobacterium smegmatis* Arabinogalactan. *J Biol Chem.* 2001;276(52):48854–62.
47. Goude R, Amin AG, Chatterjee D, Parish T. The arabinosyltransferase EmbC is inhibited by ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. Vol. 53, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009. p. 4138–46.
48. Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikušová K, Belisle JT, Brennan PJ, et al. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(21):11919–24.
49. Dulberger CL, Rubin EJ, Boutte CC. The mycobacterial cell envelope — a moving target. *Nat Rev Microbiol [Internet]*. 2020;18(1):47–59. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7>
50. Shiloh MU, DiGiuseppe Champion PA. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? *Curr Opin Microbiol.* 2010;13(1):86–92.
51. Stover et al. pMV261. Novopro laboratories. 1991;(1333):1–2.
52. Stover et al. New use for recombinant BCG for vaccines.