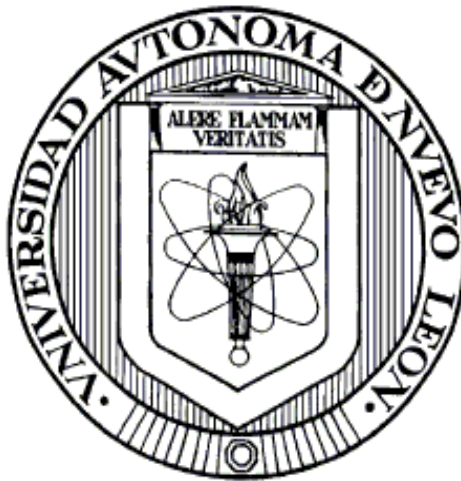


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**



**Aportaciones al mecanismo de acción del ácido *meso*-dihidroguaiarético
sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

Por

QFB ALDO FRANCISCO CLEMENTE SOTO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

AGOSTO 2013

Aportaciones al mecanismo de acción del ácido *meso*-dihidroguaiarético sobre
Mycobacterium tuberculosis H37Rv

Aprobación de la tesis

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Presidente

Dr. Isaías Balderas Rentería
Secretario

Dra. Elvira Garza González
Vocal

Dra. María Teresa González Garza
Subdirectora de Estudios de Posgrado

Aportaciones al mecanismo de acción del ácido *meso*-dihidroguaiarético sobre
Mycobacterium tuberculosis H37Rv

Revisión de la tesis

Comité tutorial

Dr. Isaías Balderas Rentería

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Dra. Elizabeth Orozco Beltrán

Dra. María Teresa González Garza

Subdirectora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Aldo Francisco Clemente Soto

Fecha de Graduación: Agosto 2013

Universidad Autónoma Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Nombre del proyecto:

Aportaciones al mecanismo de acción del ácido *meso*-dihidroguaiarético sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Número de páginas: 78

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia

Área de estudio: Biotecnología aplicada al campo de la farmacognosia

Propósito y método del estudio: La tuberculosis es una de las afecciones humanas más antiguas de las que se tenga evidencia, sin embargo persiste como una de las principales causas de muerte en el mundo conducidas por infecciones, esto debido a su facilidad para transmitirse y a su capacidad para resistir a las actuales terapias, lo que conlleva al desarrollo racional de nuevos agentes antituberculosos, donde el conocimiento de la genética y la fisiología de *Mycobacterium tuberculosis* resulta fundamental, así como la interacción patógeno-hospedero. El objetivo principal de este trabajo fue encontrar blancos farmacológicos de esta bacteria después de la exposición al lignano ácido *meso*-dihidroguaiarético que fue previamente aislado y caracterizado de *Larrea tridentata*. Este lignano posee una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 50 y de 12.5 a 50 µg/ml µg/ml en contra de *M. tuberculosis* H37Rv y tres aislados clínicos multifármaco resistentes, respectivamente. *M. tuberculosis* H37Rv fue expuesto al lignano, para obtener una condición tratada que pudiera compararse con una condición control en el microarreglo, con el objetivo de analizar junto con herramientas informáticas, una expresión génica completa y representativa de dicho tratamiento, que permitiera predecir un posible

mecanismo de acción del ácido *meso*-dihidroguaiarético. Posteriormente la validación de los resultados del microarreglo se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real usando SYBR Green y empleando el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta C_T$.

Contribuciones y conclusiones: Se ha propuesto que el ácido *meso*-dihidroguaiarético actúa sobre la enzima CoA transferasa (Rv3551) implicada en la vía de degradación del geraniol y del 2-metilnaftaleno. Se presume que al impedirse la degradación del geraniol, la acumulación de este en el interior de *M. tuberculosis* H37Rv ocasiona desestabilización de la estructura de la membrana celular debido a que altera la temperatura de transición de fase de las vesículas de liposomas. Lo anterior provoca un aumento en la fluidez de la bicapa de lípidos trayendo como consecuencia el aumento de la velocidad de escape de potasio de la célula culminando con la alteración de diversos procesos celulares y la muerte de la micobacteria. Así mismo, hemos atribuido que la alta proporción de genes sobreexpresados (21.34%) de la categoría de pared celular y procesos celulares, a la cual pertenecen los genes de membrana, son consecuencia del daño que se está presentando sobre la membrana de la micobacteria.

En el microarreglo fueron sobreexpresados entre otros genes, los codificantes de la mencionada CoA transferasa y una proteína cinasa, lo cual tiene sentido cuando encontramos reportes que el AmDG en hepatocitos humanos activa una proteína cinasa, la que a su vez inactiva a una CoA transferasa.

Lo propuesto deriva de la expresión génica resultante del microarreglo, misma que fue validada por PCR en tiempo real, coincidiendo ambas técnicas que la expresión génica es igualmente regulada negativa o positivamente en 10 genes que fueron seleccionados. En base a lo anterior se concluye que los resultados de la expresión génica del microarreglo fueron validados lo que da mayor confiabilidad al mecanismo propuesto del AmDG en *M. tuberculosis* H37Rv.

AGRADECIMIENTOS

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Por haberme brindado todo su apoyo para realizar a cabo este proyecto

Dr. Isaías Balderas Rentería

Por haberme guiado en la parte metodológica de este proyecto

Facultad de Medicina UANL

A la doctora Elvira Garza González, por haber brindado el uso de su laboratorio para la manipulación de *M. tuberculosis*

Instituto de Fisiología Celular UNAM

Al doctor Jorge Ramírez y su equipo de trabajo por haberme apoyado con la lectura y la cuantificación del microarreglo

University of Arizona

A los doctores Richard Friedman and David Galbraith por su hospitalidad en sus respectivos laboratorios

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Por la gestión ante la University of Arizona para hacer posible mi estancia en dicha institución

Facultad de Ciencias Químicas UANL

Por haberme abierto las puertas de esta casa de estudios donde se llevó a cabo la realización de este proyecto.

CONACYT

Por haber brindado beca nacional y beca mixta en el extranjero, así como por haber financiado este proyecto (Proyecto 106107 Ciencia Básica)

Dedicatoria

Este trabajo ha sido realizado con el entusiasmo de iniciarme en el noble mundo de la ciencia, esperando que este sea largo y próspero, pero siempre en compañía de mi familia, amigos y compañeros, con los cuales deseo compartir mis logros.

El actual trabajo, es dedicado a todas aquellas personas que estuvieron siempre a mi lado durante este trayecto, a las que me impulsaron y motivaron a culminar mi proyecto. En primer lugar a mi esposa Marcela Martínez Valenzuela, que con su gran amor, su comprensión, su amistad, su ternura y sus comidas hizo más llevadera mi estancia en esta ciudad, gracias a Marcelita sobre todo porque me ha dado la ilusión de esperar una hermosa bebé, que llevará por nombre: Coral, que por su bien y por mi amor hacia ella espero se parezca a su mamá. Como dejar de agradecer a mis padres que no solo desde esta estancia he recibido su apoyo, sino que desde siempre me han inculcado el deseo de estudiar y progresar en mi vida.

Gracias también a mis hermanos, Daniel y José Alberto, con los que comparto tantas cosas en común y siempre están al pendiente de mí, gracias a Lilián que ha traído alegría a la familia.

Agradezco también al doctor Isaías, a la doctora Rayito y a la doctora Elvira por ser siempre tan accesibles en cuanto a sus conocimientos y en cuanto a sus instalaciones, pero sobre todo, la accesibilidad que me brindaron en sus corazones, pues siempre recibí el mejor trato hacia mí, de verdad mil gracias.

Agradezco a todos mis amigos y compañeros que siempre directa o indirectamente me motivaron, en primer lugar al señor Juan Manuel que me brindó sus valiosos conocimientos, manías y técnicas para la trabajar con la mico, al igual que Alma, Lucy y Carlitos. Gracias a mis compañeros y amigos

de posgrado, Adri Romo, Adri Hdez, Fabián, Wendy, Eder, Ivette, Panchito, Tere, Antonio López y al Quiquín que siempre me facilitó material y algo de su tiempo y fotos a mis geles. Agradezco también a mis amigas de medicina, Samantha, Paola y Soraya.

Como no mencionar a mis maestros, los doctores: Lucy Cantú, Aurora Hernández, Tere Garza, Omar González, Xristo Zárate, Eugenio Hernández, Alfaro, Isaías y Rayito y a mi comité conformado por Alberto Gómez y Elizabeth Orozco. Por último y no me nos importante, a la licenciada y muy amiga Karina Navarro, que siempre tan eficiente y exageradamente amable, una persona con un noble corazón y que ama su trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
CAPÍTULO I	
1. Introducción	1
1.1 Tuberculosis	1
1.2 Epidemiología	3
1.3 Diagnóstico	3
1.4 Tratamiento	5
1.5 Microarreglos	7
1.6 Problemática y tendencia actual contra tuberculosis	9
CAPÍTULO II	
2. Antecedentes	10
2.1 Uso de plantas medicinales como agentes antituberculosos- <i>Larrea tridentata</i>	10
2.2 Caracterización estructural y determinación de la CMI del ácido meso-dihidroguaiarético como agente antituberculoso	10
2.3 Plantas poseedoras de <i>AmDG</i>	11
2.4 Actividades farmacológicas del <i>AmDG</i>	11
2.5 Otros lignanos con actividad antituberculosa	12
CAPÍTULO III	
3. Hipótesis y objetivos	14
3.1 Hipótesis	14
3.2 Objetivo general	14
3.3 Objetivos específicos	14
CAPÍTULO IV	
4. Materiales	15
4.1 Compuesto a evaluar	15

4.2 Determinación de las condiciones de exposición del <i>AmDG</i> sobre <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	15
4.3 Cultivo micobacteriano	15
4.4 Extracción del ARN total	15
4.4.1 Análisis de la calidad del ARN total	16
4.5 Síntesis y marcaje del ADNc	16
4.6 Hibridación del microarreglo	16
4.7 Lavado y secado del microarreglo	17
4.8 Lectura y cuantificación del microarreglo	17
4.9 Análisis bioinformático del microarreglo	17
4.10 Validación del microarreglo mediante PCR en tiempo real	17
4.10.1 Diseño de primers	17
4.10.2 Extracción del ARN y síntesis del ADNc	18
4.10.3 Estandarización de la reacción de PCR en punto final	18
4.10.4 PCR en tiempo real	18
 CAPÍTULO V	
5. Métodos	19
5.1 Determinación de las condiciones de exposición del <i>AmDG</i> sobre <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	19
5.2 Cultivo micobacteriano	20
5.3 Extracción del ARN total	20
5.3.1 Análisis de la calidad del ARN total	21
5.4 Síntesis y marcaje del ADNc	22
5.5 Hibridación del microarreglo	24
5.6 Lavado y secado del microarreglo	25
5.7 Lectura y cuantificación del microarreglo	25
5.8 Análisis bioinformático del microarreglo	26
5.9 Validación del microarreglo mediante PCR en tiempo real	27
5.9.1 Diseño de oligos	27
5.9.2 Extracción del ARN y síntesis del ADNc	28

5.9.3 Estandarización de la reacción de PCR en punto final	29
5.9.4 PCR en tiempo real	30
CAPÍTULO VI	
6. Resultados y discusiones	35
6.1 Curva de crecimiento	35
6.2 Extracción del ARN	37
6.3 Lectura y cuantificación del microarreglo	38
6.4 Análisis bioinformático	39
6.4.1 Posible Mecanismo de acción	46
6.5 Validación del microarreglo mediante PCR en tiempo real	55
6.5.1 Estandarización de la reacción por PCR punto final	55
6.5.2 PCR en tiempo real	57
CAPÍTULO VII	
7 Conclusiones	62
CAPÍTULO VIII	
8 Perspectivas	64
CAPÍTULO IX	
9 Referencias	65
APÉNDICE I	74
APÉNDICE II	78

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Pared celular de micobacterias	2
2.	Tinción Ziehl-Neelsen	4
3.	Ácido <i>meso</i> -dihidroguaiarético	11
4.	Rampa de temperaturas de reacciones de PCR en tiempo real	33
5.	Gráfica de crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv expuesta a distintas concentraciones del AmDG	36
6.	Electroforesis en gel de agarosa 1% del ARN total de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	37
7.	Imágenes del microarreglo	38
8.	Zscore de todos los genes y Zscore de genes con desviación estándar de +/-1.5	39
9.	Estructuras moleculares del geraniol y 2-metilnaftaleno.	46
10.	Vía metabólica de degradación del geraniol	48
11.	Vía metabólica de degradación del 2-metilnaftaleno	49
12.	Subunidad alfa de la CoA transferasa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	50
13.	Mecanismos de reacción de transferencia de CoA	51
14.	Electroforesis de amplificación de 10 los genes de interés y el gen de referencia	56
15.	Comparación de la cuantificación relativa de los genes sobreexpresados entre muestras tratada y control	59
16.	Comparación de la cuantificación relativa de los genes inhibidos entre muestras tratada y control	60

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Características de antituberculosos de primera y segunda línea	6
2.	Mecanismo de acción de fármacos antituberculosos y genes relacionados a resistencia de <i>M. tuberculosis</i>	7
3.	Secuencia de oligos para PCR en tiempo real	28
4.	Componentes de reacción para la síntesis de ADNc	29
5.	Componentes de reacción empleados en PCR punto final	29
6.	Distribución de un experimento del gen sobreexpresado Rv3551	32
7.	Composición de la reacción de PCR en tiempo real	34
8.	DO de cultivos de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv a diferentes concentraciones del AmDG	35
9.	Genes sobreexpresados ($Zscore \geq 1.5$)	40
10.	Genes inhibidos ($Zscore \leq 1.5$)	44
11.	Proporción de genes sobreexpresados e inhibidos por categoría funcional	46
12.	Oligos estandarizados en PCR punto final	57
13.	Cálculo de la cuantificación relativa del gen sobreexpresado Rv3551	57
14.	Cálculo de la cuantificación relativa del gen sobreexpresado Rv0176	58
15.	Cálculo de la cuantificación relativa del gen sobreexpresado Rv0849	58
16.	Cálculo de la cuantificación relativa del gen sobreexpresado Rv1066	58

17.	Cálculo de la cuantificación relativa de los genes sobreexpresados Rv0584 y Rv3903c	58
18.	Cálculo de la cuantificación relativa de los genes inhibidos Rv0954 y Rv3692	59
19.	Cálculo de la cuantificación relativa del gen inhibido Rv2895c	60
20.	Cálculo de la cuantificación relativa del gen inhibido Rv2780	60
21.	Comparación entre cuantificación relativa de la expresión génica por microarreglo y por PCR en tiempo real	61

ABREVIACIONES

A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
<i>AmDG</i>	Ácido <i>meso</i> -dihidroguaiaarético
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin trifosfato
ATPasa	Adenosin trifosfatasa
BAAR	Bacilo ácido-alcohol resistente
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CoA	Coenzima A
C _T	Cycle treshold (ciclo umbral)
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
DAVID	Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery
DE	Desviación estándar
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNasa	Desoxirribonucleasa
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ExFR	Extensivamente fármacorresistente
HEPES	HydroxyEthyl PiperazineEthaneSulfonic acid
HPLC	High-Performance Liquid Cromatography
h	Hora
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
Kg	Kilogramo
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Molar
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MCE	Mammalian Cell Entry
MEP/MODX pathway	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate/1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway
MFR	Multifármacorresistente
mg	Miligramos
min	Minuto
mL	Mililitros
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida adenina
NADPH	Dinucleótido fosfato de nicotinamida adenina
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	nanómetro

OADC	Ácido oleico-albumina-Dextrosa-Catalasa
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Peptidoglicanos
PMNs	Polimorfonucleares
RQ	Relative Quantitation
s	Segundos
SNC	Sistema nervioso central
SSPE	Saline-sodium phosphate-EDTA
TB	Tuberculosis
TBDB	Tuberculosis databases
TBE	Tris base-Boric acid-EDTA, sodium
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV-VIS	Ultravioleta-visible
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
λ	Longitud de onda
ΔΔC _T	Delta C _T comparativo

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis es un bacilo aerobio, ampliamente estudiado por ser el agente causal de tuberculosis (TB) pulmonar y extrapulmonar en el humano, enfermedad que es transmitida mediante aerosoles de saliva, como consecuencia, de la tos de personas con TB pulmonar, alcanzando las vías respiratorias de individuos que pueden desarrollar la enfermedad, si las condiciones inmunológicas no son las adecuadas para combatir la infección, por ejemplo, personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).¹

M. tuberculosis es un microorganismo difícil de combatir, esto se debe en gran parte a la composición de la pared celular (Figura 1), donde se encuentra la mayoría de biomoléculas responsables de inducir la enfermedad. La arquitectura de la pared celular está conformada por peptidoglicanos (PG) que se encuentran justo después de la membrana plasmática, unidos covalentemente a arabinogalactanos, y estos se unen de la misma manera a ácidos micólicos, los cuales forman una barrera lipídica fundamental en los procesos patogénicos y fisiológicos de *M. tuberculosis*. En la parte más externa se encuentran los llamados lípidos libres, como son: fosfatidilinositol manósido y lipoarabinomanano,² siendo este último una de las moléculas que intervienen en la patogenia y en la supervivencia del patógeno.³

El proceso patogénico inicia con la fagocitosis de la bacteria por macrófagos alveolares, que posteriormente inducen inflamación localizada atrayendo a más células hospederas mononucleares al sitio de infección/inflamación, que finalmente forman el granuloma característico en esta enfermedad, con la finalidad de aislar a la bacteria y controlar su expansión.⁴

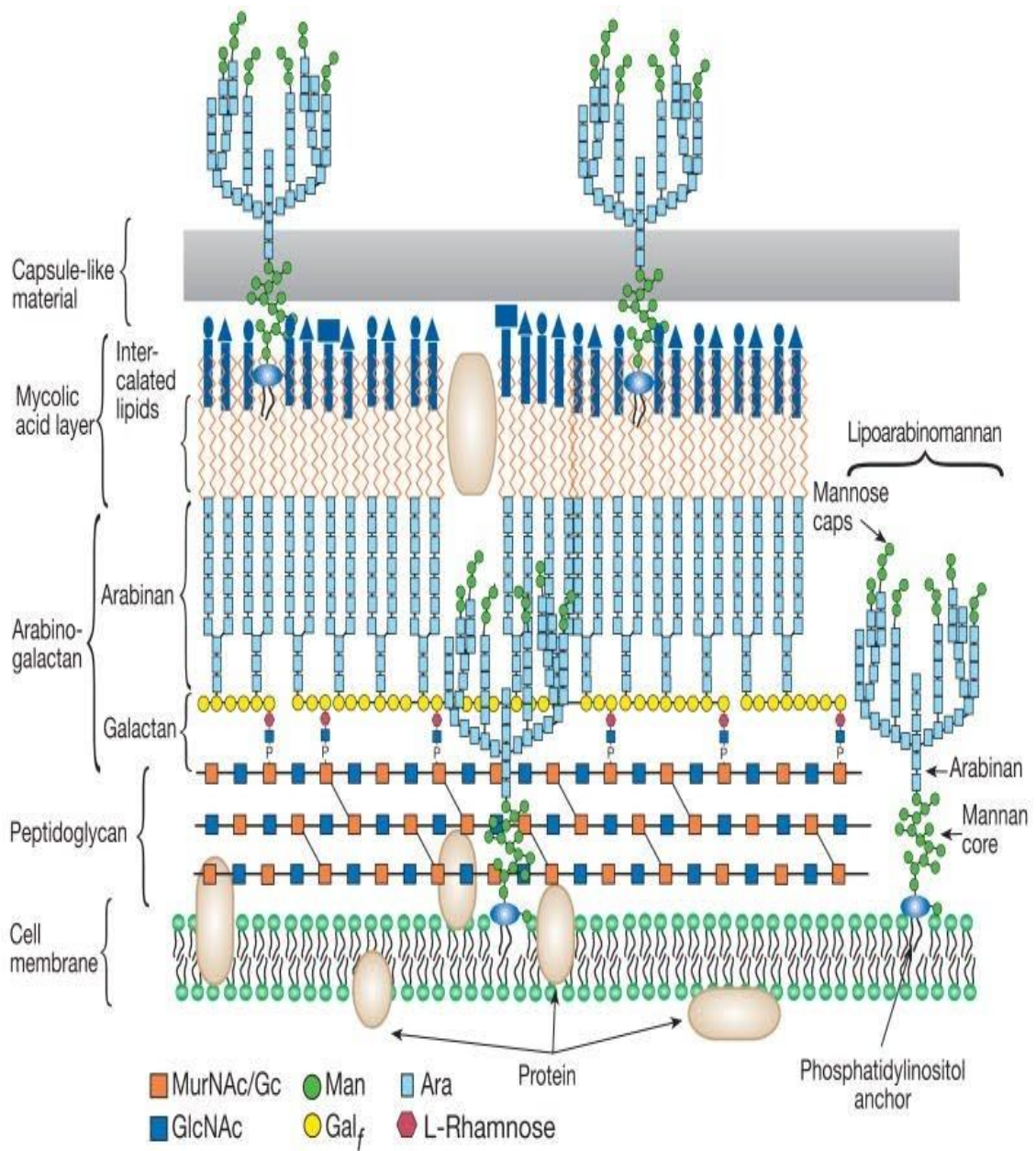


Figura 1. Pared celular de micobacterias.⁵

La probabilidad de desarrollar la enfermedad después de haber sido infectado, se incrementa con la coexistencia de otras enfermedades que deterioran la eficacia funcional del sistema inmune, como diabetes, silicosis, y en primer lugar la infección con el VIH.³

1.2 Epidemiología

Aproximadamente una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada por *M. tuberculosis*. La tuberculosis es considerada la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas en el mundo, solamente después del VIH. La Organización Mundial de la Salud reportó que en el año 2011 hubo 8.7 millones de personas con tuberculosis y 1.4 millones de muertes por tuberculosis asociada al VIH y no asociada al mismo.¹

En México, la Secretaría de Salud reportó que en el año 2010, hubo 2,2414 defunciones debidas a tuberculosis, y 19,445 nuevos casos en todas las formas de esta enfermedad. Entre los estados más afectados se encuentran Baja California Norte, Tamaulipas, Guerrero, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Chiapas.⁶

La tuberculosis tiene la característica de afectar más a hombres que a mujeres y lo hace en grupos de edad económicamente productivas. Dos terceras partes de los casos ocurren en edades entre 15-59 años.

1.3 Diagnóstico

La tuberculosis puede ser diagnosticada mediante las manifestaciones clínicas del paciente. En el caso de tuberculosis pulmonar, que es la más común, se presenta fiebre y sudoración nocturna, pérdida de peso, debilidad y tos seca o acompañada de expectoración purulenta. La sospecha de la enfermedad se incrementa cuando se cuenta con una radiografía de tórax anormal. Para un diagnóstico más certero se cuentan con técnicas de laboratorio, como la tinción ácido alcohol resistente, el cultivo de micobacterias, y prueba cutánea de tuberculina.

Examen microscópico con tinción ácido-alcohol resistente. Es el método más solicitado junto además del cultivo de micobacterias para un diagnóstico de tuberculosis. A partir de muestras de esputo o tejido se realiza un frotis y se realiza una tinción Ziehl-Neelsen para observar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes, ya que las micobacterias no desprenden de su pared el colorante fucsina después de la aplicación de alcohol-ácido (característica otorgada por los ácidos micólicos), y se observan al microscopio, bacilos de color rojo intenso cuando hay micobacterias presentes en las muestras (Figura 2).

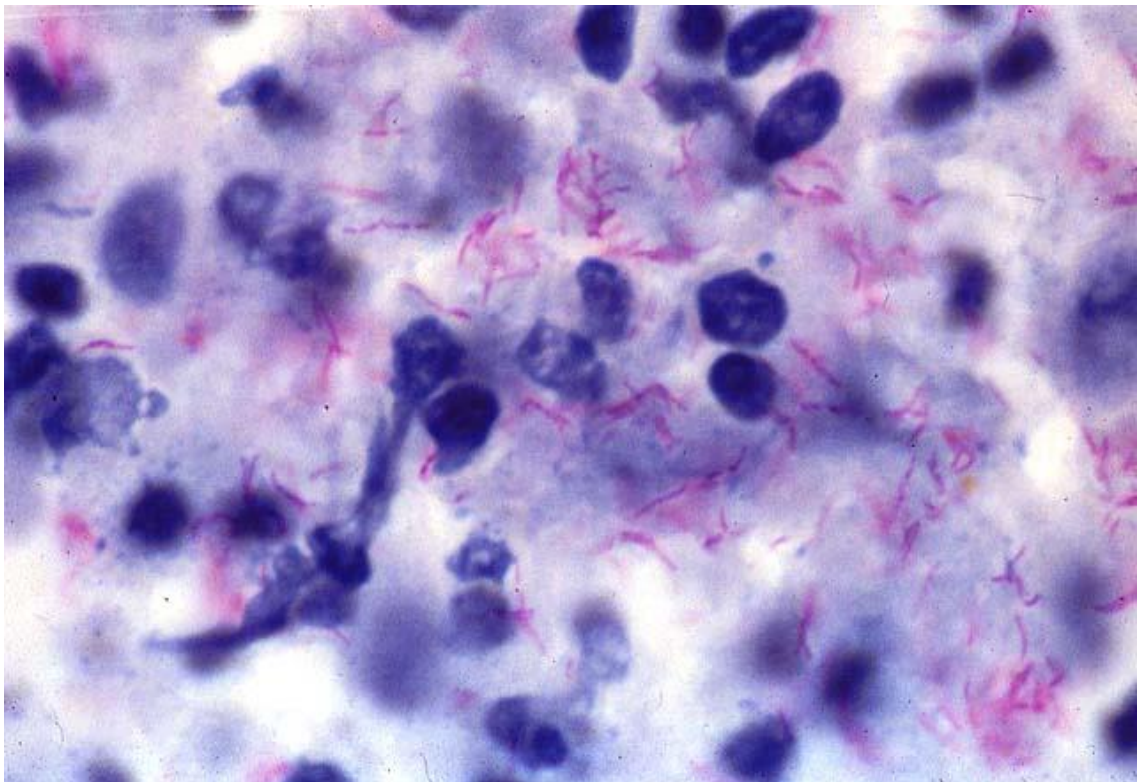


Figura 2. Tinción Ziehl-Neelsen.⁷

Prueba cutánea de tuberculina. Consiste en administrar subcutáneamente un derivado proteico purificado de micobacterias, con la finalidad de determinar si el paciente tiene una respuesta inmune de tipo celular contra los antígenos de *M. tuberculosis*. Como prueba diagnóstica, la tuberculosis activa tiene poco valor por su baja sensibilidad y especificidad.

Cultivo de micobacterias. Un diagnóstico definitivo depende del aislamiento e identificación de *M. tuberculosis* proveniente de muestras de esputo, de líquido cefalorraquídeo (LCR) o líquido pleural, etc. En este sentido, el medio Löwestein-Jensen y el medio Middlebrook son útiles para el aislamiento de especies de micobacterias, incluyendo *M. tuberculosis*. Los medios se incuban a una temperatura de 37°C, por un tiempo de cuatro a ocho semanas, el cual es necesario para su crecimiento y su posterior identificación de especie mediante pruebas bioquímicas. Al haber aislado a *M. tuberculosis* es necesario valorar la sensibilidad ante antifímicos como isoniazida, rifampicina y etambutol. Una técnica que va en creciente uso para determinar resistencia a este bacilo es la reacción en cadena de la polimerasa, al ser altamente sensible y rápida.³ con el fin de indicar el tratamiento más adecuado.

1.4 Tratamiento

Las micobacterias presentan resistencia natural a numerosos antibacterianos, debido a su pared hidrofóbica poco permeable. Por tal motivo, el tratamiento de la tuberculosis debe ser específico con fármacos antituberculosos de primera línea y segunda línea, los cuales se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de antituberculosos de primera y segunda línea.

Fármaco	Dosis diaria en adultos	CMI (µg/mL)	Efectos adversos
*Isoniacida	5 mg/kg	0.05-0.2	Hepatitis clínica, polineuritis periférica
*Rifampicina	10 mg/kg	<0.5	Molestias gastrointestinales, afectación hepática
*Piracinamida	15-30 mg/kg	20	Hiperuricemia, hepatotoxicidad
*Etambutol	15-25 mg/kg	1-5	Neuritis óptica
*Estreptomicina	15 mg/kg	8	Alteraciones vestibulares y auditivas
**Ácido para-aminosalicílico	300-600 mg/kg	1	Intolerancia gastrointestinal
**Cicloserina (péptidos cíclicos)	15-20 mg/kg	5-20	Neuropatía periférica, alteraciones del SNC, reacciones psicóticas
**Etionamida	10-20 mg/kg	0.6-2.5	Intolerancia digestiva, hepatotoxicidad, neurotoxicidad
**Ciprofloxacino (fluoroquinolona)	15-20 mg/kg	0.25-3	Exantema, prurito, urticaria
**Amikacina (aminoglucósido)	15-20 mg/kg	1	Ototoxicidad, nefrotoxicidad

* Antituberculosos de primera línea, **antituberculosos de segunda línea.⁸

Cuando la cepa de *M. tuberculosis* responsable del padecimiento se determina sensible a todos los fármacos antituberculosos, la terapia se inicia con isoniazida, rifampicina y pirazinamida durante dos meses y se continúa con isoniazida y rifampicina por un periodo de cuatro a seis meses más. En ocasiones, resulta necesaria la administración de un cuarto antimicobacteriano, etambutol en adultos y estreptomicina en niños.⁸ Esta terapia llega a ser muy efectiva cuando es administrada de manera adecuada. Sin embargo, cuando el paciente no concluye el tratamiento,⁹ es común la aparición de *M. tuberculosis* multifármaco resistente (MFR), que resiste al menos a isoniazida y rifampicina, haciendo ineficiente esta primera terapia. Surge entonces, la necesidad de combatir la enfermedad ocasionada por *M. tuberculosis* MFR empleando antituberculosos de segunda línea, hacia los cuales también se ha reportado que *M. tuberculosis* MFR ha adquirido

resistencia, estas cepas se les denomina *M. tuberculosis* extensivamente fármaco resistente (EFR).¹⁰ Cabe mencionar, que la resistencia es adquirida por la mutación en genes que expresan blancos terapéuticos de fármacos antituberculosos. El mecanismo de acción así como los genes involucrados en la resistencia a estos medicamentos se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Mecanismo de acción de fármacos antituberculosos y genes relacionados a resistencia de *M. tuberculosis*.

Fármaco	Mecanismo de acción	Gen de resistencia
Isoniazida	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos	<i>katG, inhA</i>
Rifampicina	Inhibición de la polimerasa de ARN y por consiguiente inhibe el proceso de transcripción	<i>rpoB</i>
Pirazinamida	Baja los niveles óptimos de pH celular, inhibiendo así la ácido graso sintasa y el transporte de membrana. ¹¹	<i>PncA</i>
Etambutol	Inhibición de la síntesis de arabinogalactanos y arabinomananos	<i>embcAC</i>
Estreptomina	Inhibe la síntesis de proteínas uniéndose a un sitio de ARNr 16S en la subunidad ribosomal 30S ¹²	<i>rpsL</i> <i>rrs</i>
Ácido p-aminosalicílico	Se le atribuye la inhibición de la síntesis de ácido fólico, del metabolismo ácido salicílico y del transporte de hierro.	Desconocido
Fluoroquinolonas	Inhibición de la replicación y de la transcripción, al inhibir la ADN girasa ¹³	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i>
Cicloserina	Es un análogo de D-alanina, que inhibe a la alanina racemasa, enzima responsable de la síntesis de peptidoglicanos de pared celular.	Desconocido

1.5 Microarreglos

La importancia de conocer el mecanismo de acción de fármacos radica en poder realizar diseño racional de los mismos. Por lo cual, es necesario contar con herramientas que ayuden a lograrlo. En este sentido, la técnica de microarreglos juega un papel muy importante ya que tiene la facultad de

monitorear la expresión de miles de genes en paralelo. La primera condición para poder aplicar un análisis de microarreglos es contar con un chip de ácido desoxirribonucleico (ADN) que contenga el genoma de la especie de interés. *M. tuberculosis* H37Rv, es una cepa virulenta de la cual se ha logrado secuenciar su genoma, e integrarlo a un chip de ADN. Este chip se ha introducido al mercado, y brinda la posibilidad de comparar el perfil de expresión génica de esta especie cuando se expone a dos condiciones distintas una de tratamiento con el agente que se desea evaluar y otra condición que es el control sin tratar. En nuestro caso en particular, se somete la bacteria a la presencia de un lignano con actividad antituberculosa y, otro cultivo en ausencia del mismo lignano. Posteriormente, el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de ambas condiciones es extraído y a partir de este se sintetiza el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) empleando una transcripción inversa. Así mismo, es necesario marcar cada una de las muestras con fluoróforos diferentes (mayormente empleados Cy3 y Cy5) que emita fluorescencia a una longitud de onda distinta. Ambas muestras ya marcadas se aplican sobre un mismo chip de ADN en cantidades iguales para que sean hibridadas. Este chip, contiene amplicones de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u oligonucleótidos que representan el marco abierto de lectura del genoma de la especie en cuestión. El conocimiento de la ubicación e identidad de cada uno de los oligonucleótidos, en el chip permite que puedan ser identificados después del escaneo de ambas imágenes (tratado y sin tratar) que emiten fluorescencia a distinta longitud de onda y que se empalman. Posteriormente, se realiza el análisis de la expresión génica mediante softwares disponibles en la red de internet, que son capaces de correlacionar la implicación de los genes inducidos o reprimidos en las vías metabólicas del microorganismo. De tal forma que puede proponerse un mecanismo de acción de un principio activo.

Cabe mencionar, que los datos de un análisis estadístico de microarreglos por sí solos no son suficientes para confirmar la expresión génica, por tal motivo es

necesario validar los resultados con un ensayo de PCR en tiempo real, de los genes representativos y que han sido considerados más importantes.¹⁴

1.6 Problemática y tendencia actual contra tuberculosis

Las personas VIH positivos son alrededor de 21 a 34 veces más susceptibles a desarrollar tuberculosis en comparación con personas VIH negativos. Así mismo, una de cada 10 personas que padecen la enfermedad está infectada con VIH. Por otro lado, la aparición de cepas de *M. tuberculosis* MFR, conllevan a una prolongación del tratamiento hasta por tres veces el tiempo de un tratamiento contra una cepa sensible.¹ Adicionalmente, se ha reportado que los fármacos de segunda línea interactúan con fármacos antirretrovirales usados en el tratamiento de pacientes VIH positivos.¹⁵ De acuerdo a lo mencionado anteriormente es necesario buscar nuevos fármacos que acorten y simplifiquen la terapia, mejorando la eficacia y tolerancia del tratamiento para *M. tuberculosis* MFR, así como permitir la administración del tratamiento simultáneo en personas VIH positivo con tuberculosis. En este sentido, los esfuerzos se multiplican, tanto que 11 fármacos antituberculosos nuevos y reutilizados se encuentran en ensayos clínicos, siete de ellos en fase clínica I, y II (AZD-5847, bedaquilina, linezolid, PA824, rifapentina, SQ-109 y sutezolid) y cuatro en fase III (delamanida, gatifloxacino, moxifloxacino y rifapentina), que están siendo evaluados para reducir los regímenes del tratamiento y para combatir ambos tipos de cepas resistentes. Entre estos, destacan dos fluoroquinolonas y una rifamicina en fase III y linezolid en fase II.

En cuanto a la profilaxis, nueve vacunas se encuentran en ensayos de las tres fases clínicas, determinando que sean candidatas seguras para evaluar las reacciones inmunológicas, para establecer niveles de dosis óptimos y el tiempo de vacunación, así como su eficacia protectora. De las vacunas en evaluación clínica, la que se encuentra en un estadio más avanzado es la MVA85A que está siendo evaluada también en personas con VIH.¹

CAPÍTULO II

2. ANTECEDENTES

2.1 Uso de plantas medicinales como agentes antituberculosos-*Larrea tridentata*

Los intentos por descubrir nuevos compuestos que presenten actividad contra *M. tuberculosis* han sido constantes alrededor del mundo, ya que es un padecimiento mundial. Por tal motivo en el 2008, Camacho Corona y colaboradores en la Universidad Autónoma Nuevo León, publicaron un estudio donde se evaluó la actividad antituberculosa de nueve plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para tratar enfermedades respiratorias. En este estudio se prepararon cuatro extractos: hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso, de cada una de las plantas. Los 36 extractos obtenidos se ensayaron en contra de una cepa sensible y cuatro cepas mono-resistentes de *M. tuberculosis* H37Rv usando el método de Alamar azul. Los resultados mostraron que el extracto clorofórmico de *Larrea tridentata* inhibía el crecimiento de una cepa sensible (CMI= 200 µg/mL) y cuatro cepas mono-resistentes (CMI = 100-200 µg/mL) de *M. tuberculosis* H37Rv⁹.

2.2 Caracterización estructural y determinación de la CMI del ácido meso-dihidroguaiarético como agente antituberculoso

Debido a que la mejor actividad antituberculosa se presentó en el extracto clorofórmico se decidió aislar y purificar los principios activos mediante cromatografía en columna y cromatografía en capa fina, mientras que la caracterización se llevó a cabo empleando Resonancia Magnética Nuclear. Se encontró que el agente antituberculoso fue el ácido meso-dihidroguaiarético (AmDG, Figura 3)¹⁶ el cual resultó activo en contra de una cepa de *M. tuberculosis* H37Rv sensible a los fármacos de primera línea (CMI=50 µg/mL) y

tres cepas de aislados clínicos MFR de *M. tuberculosis*: M15 (CMI=50 µg/mL), M20 (CMI=12.5 µg/mL) y M26 (CMI=25 µg/mL).¹⁷

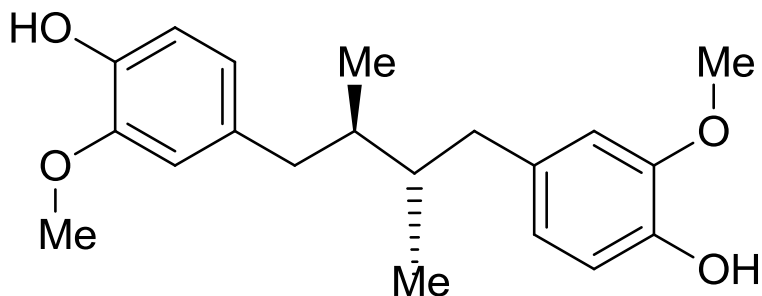


Figura 3. Ácido meso-dihidroguaiarético¹⁶

2.3 Plantas poseedoras de AmDG

Tras realizar una búsqueda completa en la literatura en relación al AmDG se encontró que además de ser aislado de *L. tridentata*,¹⁸ también se ha obtenido de *Beilshmedia tsangii*,¹⁹ *Machilus wangchiana*,²⁰ *Myristica fragrans*,^{21,22} *Saururus chinensis*,²³ *Schizandra propinqua Sinensis*,²⁴ *Machilus thunbergii*,^{25, 26} *Kadsura ananosma*,²⁷ *Kadsura heteroclita*,²⁸ *Kadsura angustifolia*,²⁹ *Cinnamomum philippinense*,³⁰ *Porlieria chilensis*,³¹ *M. argentea*,³² *Pycnanthus angolensis*,³³ *Aristolochia taliscana*,³⁴ *Schisandra sphenanthera*,³⁵ *S. chinensis*,³⁶ *Saruma henryi*,³⁷ *S. propinqua var propinqua*,³⁸ *Leucas aspera*,³⁹ *K. longepedunculata*,⁴⁰ *Endiandra anthropophagorum*.⁴¹

2.4 Actividades farmacológicas del AmDG

El AmDG ha demostrado además, poseer actividades biológicas como: anti-VIH,⁴² antibacteriana,^{33,43} antifúngica,^{22,44,45} antioxidante,^{32,46,47,48,39} antitumoral,^{32,49,50,51,52} neuroprotectora,^{27,53,54,55} hepatoprotectora,^{56,47} antihelmíntica,^{57,58,59} además es capaz de inducir la diferenciación de osteoblastos,⁶⁰ la fragmentación de ADN internucleosomal en células HL-60⁶¹ y

de inhibir la ciclooxigenasa-2, la 5-lipoxigenasa,⁶² la acil-CoA,⁶³ así como la inhibición de la protein-tirosina fosfatasa 1B⁶⁴ y la liberación de β -glucoronidasa en leucocitos polimorfonucleares (PMNs) *in vitro*. Por otro lado, actúa como agente de escisión del ADN,²⁷ y retardante del envejecimiento de la piel,^{25,65} podría actuar como antigluceante,⁶³ se le conoce actividad hemolítica de eritrocitos,⁶⁶ y es un inhibidor de las ADN topoisomerasas I y II.⁶⁷

2.5 Otros lignanos con actividad antituberculosa

Se ha reportado que otros lignanos habían sido ensayados en contra de *M. tuberculosis*, por ejemplo Jian Gu y cols en el 2004 extrajeron de *Valeriana laxiflora* el lignano (+)-1-hydroxy-2,6-bis-epi-pinoresinol al que le fue determinada la actividad antituberculosa *in vitro* por el método de Alamar azul.⁶⁸

Chen y cols, en el 2007 aislaron y caracterizaron 12 lignanos de tipo epoxifuranoide y tetrahidrofurano provenientes de *Beilschmiedia tsangii*. A todos los lignanos se les determinó su actividad antituberculosa frente a *M. tuberculosis* y encontró que dos lignanos tetrahidrofuranos, conocidos como beilschmin A y B, resultaron ser los más potentes con CMI de 2.5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.¹⁹

En el 2008 se reportó que a partir del tallo de *Microtropis japonica* se aisló entre otros compuestos, un nuevo lignano nombrado 9-9'-O-di-(Z)-feruloil(-)-secoisolariciresinol, al cual le fue evaluada su actividad antituberculosa en contra de *M. tuberculosis* H37Rv, obteniendo una CMI de 122 $\mu\text{g/mL}$.⁶⁹

Marcio y cols, en el 2009, reportaron que el lignano hinokinin reveló actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv a una CMI de 62.5 $\mu\text{g/ml}$.⁷⁰

Coy y cols, en 2009, aislaron cuatro nuevos neolignanos de *Pleurothyrium cinereum*, a los que determinaron su actividad antituberculosa por el método de Alamar azul, contra *M. tuberculosis* H37Rv, presentando mejor actividad el neolignano cinerin C, con una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 50 µg/mL.⁷¹

Díaz y cols, en 2010, realizaron un estudio, en el que a partir de *Aristolochia taliscana* aislaron nuevos lignanos como licarin A, licarin B y eupomatenoide-7, los cuales fueron ensayados en contra de las siguientes cepas de *M. tuberculosis*: H37Rv (27294), cuatro variantes monorresistentes, H37Rv resistente a isoniazida (35822); H37Rv resistente a estreptomicina (35820); H37Rv resistente a rifampicina (35838); H37Rv resistente a etambutol (35837) y 12 aislados clínicos MFR, usando el método de Alamar azul. Los resultados indicaron que Licarin A (CMI entre 3.12-12.5 µg/ml) resultó ser el compuesto más potente en contra de todas las cepas evaluadas.³⁴

En 2011, Baquero y cols, evaluaron la actividad del lignano etoxicubebina, proveniente de la planta *Virola flexouosa*, contra *M. tuberculosis* H37Rv. La CMI se logró a 62.4µg/mL.⁷²

En 2011, de Souza y cols evaluaron la actividad antituberculosa de trece análogos sintéticos de neolignanos y se encontró que LS-2 fue el lignano más efectivo en contra de *M. tuberculosis* H37Rv con una CMI de 6 µM, pero además el menos tóxico en hepatocitos y más efectivo.⁷³

En 2012, Garza y cols mostraron resultados sobre un nuevo furanolignano de nombre 2',5"-dimetoxisesamina que presentó frente a *M. tuberculosis* H37Rv una CMI de 63 µg/mL.⁷⁴

Como se ha observado, en la literatura se ha reportado la actividad antituberculosa de varios lignanos incluyendo la del AmDG. Sin embargo, no se ha descrito su mecanismo de acción sobre *M. tuberculosis*, por lo que se plantea la siguiente hipótesis.

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

El patrón de expresión génica en *M. tuberculosis* H37Rv será alterado por efecto del ácido *meso*-dihidroguaiarético en genes asociados a la síntesis de la pared celular, la síntesis del ARN o la síntesis del ADN.

3.2 Objetivo general

Determinar el posible mecanismo de acción del ácido *meso*-dihidroguaiarético sobre *M. tuberculosis* H37Rv.

3.3 Objetivos específicos

- Determinar condiciones de concentración y tiempo de exposición de *M. tuberculosis* H37Rv al AmDG
- Cultivar *M. tuberculosis* H37Rv con y sin tratamiento del AmDG
- Extraer y analizar la calidad y rendimiento del ARN total
- Sintetizar y marcar con fluoróforos, el ADNc
- Hibridar el ADNc marcado en el microarreglo
- Realizar la lectura y cuantificación del microarreglo
- Realizar el análisis bioinformático del microarreglo
- Diseñar oligos para PCR en tiempo real
- Estandarizar la técnica de PCR en tiempo real para validar resultados del microarreglo

CAPÍTULO IV

4. MATERIALES

4.1 Compuesto a evaluar

Ácido *meso*-dihidroguaiarético (AmDG) del extracto clorofórmico de *L. tridentata*.

4.2 Determinación de las condiciones de exposición del AmDG sobre *M. tuberculosis* H37Rv

Para determinar las condiciones de exposición se realizó una cinética de crecimiento de cultivo micobacteriano y se monitoreó por 5 días a λ de 600 nm mediante un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800 (UV-VIS).

4.3 Cultivo micobacteriano

Para el cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv de American Type Culture Collection (ATCC) 27294 sensible a isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, se preparó medio Middlebrook 7H9 complementado con Tween 80 (0.05%) y glicerol (0.2%) y enriquecido con 10% de ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa (OADC) de la casa comercial Becton Dickinson.

4.4 Extracción del ARN total

Se realizó la extracción del ARN total a partir del cultivo de micobacterias empleando el kit RiboPure-Bacteria AM1925 de AMBION.

4.4.1 Análisis del ARN total

Para determinar la calidad del ARN se aplicó una electroforesis en agarosa al 1% y se analizó en un fotodocumentador BIO-RAD mediante el programa gel Doc XR. La pureza y el rendimiento se determinaron a $\lambda^{260}/_{280}$ y a 260 nm respectivamente, en un biofotómetro Eppendorf.

4.5 Síntesis y marcaje del ADNc

A partir del ARNm que forma parte del ARN total obtenido, nos fue posible la síntesis *in vitro* del ADNc mediante una retrotranscripción siguiendo el protocolo del kit amino allyl cDNA Labeling AM1705 de AMBION, para el marcaje se usaron Amersham CyDye Post-labelling Reactive Dye Pack RPN5661 de GE Healthcare.

4.6 Hibridación del Microarreglo

Para la hibridación del ADNc marcado, se emplearon los siguientes elementos:

- a) Microarreglo (CAT-30K *M. tuberculosis* H37Rv-gene MYcroarray)
- b) Cámara de hibridación y laminillas de empaque (Agilent Technologies)
- c) Solución de hibridación:
 - i. SSPE 6X (NaCl 3M, EDTA 20mM, NaH₂PO₄ 118.2mM y Na₂HPO₄ 81.8mM)
 - ii. Formamida (10%)
 - iii. Albúmina de suero bovino acetilada (0.01mg/mL)
 - iv. Tween-20 (0.01%)
 - v. Oligo control (1%)
 - vi. Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC)

Se realizó una hibridación dinámica a 50°C por un tiempo de 24 horas.

4.7 Lavado y secado del microarreglo

Después de la hibridación del microarreglo, se procedió al lavado con SSPE 1X y 0.25X, después fue secado por centrifugación.

4.8 Lectura y cuantificación del microarreglo

La lectura del microarreglo se llevó a cabo en un GenPix 4400A Microarray Scanner empleando para su análisis estadístico el genArise package.

4.9 Análisis bioinformático del microarreglo

Los resultados obtenidos del microarreglo fueron analizados en bases de datos de acceso libre, como: The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery v6.7 (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), TB Databases (TBDB, <http://www.tbdb.org/>), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>), National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *M. tuberculosis* databases (tuberculist, <http://tuberculist.epfl.ch/>).

4.10 Validación del microarreglo mediante PCR en tiempo real

4.10.1 Diseño de oligos

Para el diseño de oligos de interés y de referencia fueron empleadas herramientas informáticas, tales como: primer express 3.0, AmplifX 1.5.4, Primer 3 (v.0.4.0). Las secuencias de genes fueron tomadas del NCBI, con número de referencia de secuencia genómica "NC_000962.3". La síntesis de oligos fue realizada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

4.10.2 Extracción del ARN y síntesis del ADNc

La extracción del ARN total se realizó empleando el kit RiboPure™-Bacteria (número de parte, AM1925). En cuanto a la síntesis del ADNc, fue utilizado el kit SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis (número de parte 11754050), ambos kit de la marca Invitrogen.

4.10.3 Estandarización mediante PCR de punto final

La estandarización de la temperatura de alineamiento y tiempos para la reacción de PCR fue realizada en el termociclador Corbett Research CG1-96 mediante PCR de punto final empleando GoTaq® Green Master Mix 2X (número de parte M7122).

4.10.4 PCR en tiempo real

La cuantificación de la expresión génica se realizó en el equipo StepOne™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems, empleando el kit EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR Supermix Universal de invitrogen (número de parte 11784200), además de los siguientes accesorios: tapas para tubo (MicroAmp® Optical 8-Cap Strip, número de parte 4323032), placas de 48 pocillos (MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate, número de parte 4375816), adaptador (MicroAmp® 96-Well Support Base, número de parte 4379590) y tiras de tubos (MicroAmp® Fast 48-Well Tray, número de parte 4375282) de Applied Biosystems.

CAPÍTULO V

5. MÉTODOS

5.1 Determinación de las condiciones de exposición del *AmDG* sobre *M. tuberculosis* H37Rv

Se ha dado a conocer que uno de los desafíos a los que muchos investigadores se enfrentan, en el ámbito de los microarreglos, es definir las condiciones de estrés que se aplicarán a un cultivo celular, es decir, el tiempo y la concentración del compuesto a la que deberá de exponerse.¹⁴ En nuestro caso, las condiciones de estrés se determinaron evaluando una cinética de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv en su etapa exponencial de desarrollo. La bacteria fue cultivada en medio Middlebrook 7H9 y después de 15 días la suspensión bacteriana fue ajustada a una densidad óptica (DO) inicial de 0.5. Se prepararon 300 µL de una solución stock de *AmDG* con una concentración de 50000 µg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1 mL del cultivo bacteriano en fase exponencial y se distribuyeron en tubos de 12 x 100 mm, obteniendo un total de 14 tubos con suspensión bacteriana, a los cuales se le adicionaron seis concentraciones diferentes de *AmDG*. Las concentraciones ensayadas fueron: 12.5, 25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL, cada concentración se realizó por duplicado. En cuanto a los cuatro tubos restantes, dos de ellos fueron exentos de *AmDG*, representando el control sin tratar y los otros dos fueron expuestos a 40 µL de DMSO. Las DO de la suspensión de micobacterias con diferentes concentraciones del lignano se monitorearon en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, durante cinco días por intervalos de 24 horas. La concentración de 50 µg/mL por un tiempo de 24 horas fue la condición de estrés elegida ya que, esta fue la concentración mínima que inhibió totalmente el crecimiento del cultivo micobacteriano después de 24 horas de exposición al lignano.

5.2 Cultivo micobacteriano.

Después que se establecieron las condiciones de estrés para *M. tuberculosis* H37Rv, la micobacteria fue cultivada en tubos de 16 x125 mm conteniendo 5 mL de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con 10% de OADC, Tween-80 (0.05%) y glicerol (0.2%) e incubada a 37°C. Después de transcurrir 5 días, el caldo en los tubos se analizó mediante una tinción BAAR para determinar pureza del cultivo. Solo aquellos tubos con *M. tuberculosis* H37RV libres de otras bacterias se transfirieron a botellas de vidrio de 100 mL con tapa rosca, para ajustar el volumen a 100 mL con el medio antes mencionado.

Las bacterias en las botellas se cultivaron por 10 días adicionales. Finalizado este tiempo el cultivo bacteriano fue llevado a una DO de 0.5 y dividido en dos partes equitativas. Una de ellas permaneció sin ser sometida a estrés pero la otra en cambio se incubó por 24 horas con una concentración de 50 µg/mL del AmDG. Finalizado este tiempo, la suspensión bacteriana que recibió el tratamiento (muestra tratada) como la que no fue tratada (muestra control), se centrifugaron por separado para obtener el botón bacteriano a partir del cual se realizó la extracción del ARN.

5.3 Extracción del ARN total

La extracción del ARN total del botón bacteriano de ambas condiciones, se realizó mediante el kit AM1925 de ambion. Cabe mencionar, que desde el aislamiento del ARN total hasta el marcaje del ADNc ambas muestras fueron procesadas de manera similar pero de manera independiente. Los botones bacterianos se transfirieron por separado a un tubo estéril para microcentrífuga de 1.5 mL, se añadieron 350 µL de RNAwiz y agitaron en vortex hasta homogeneizar. Por otro lado, en un tubo con tapa de rosca se agregó una cantidad aproximada de 250 µL de perlas de zirconia, a este tubo se le añadió

las bacterias en RNAwiz y se dejaron agitando 10 minutos en vortex, para provocar la lisis bacteriana.

El lisado bacteriano se centrifugó para separar las perlas de zirconia, el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril libre de nucleasas. Al volumen del lisado (sobrenadante), se le añadieron 0.2 volúmenes de cloroformo grado HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), se mezcló vigorosamente por 30 segundos y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla anterior se centrifugó a 13500 rpm durante 5 minutos, la fase acuosa fue recuperada y transferida a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL donde se le añadieron 0.5 volúmenes de etanol al 100% y se mezcló vigorosamente. Luego esta muestra se hizo pasar a través de un cartucho con filtro colocado dentro de un tubo colector, con el objetivo de que todo aquello que no fuera ARN, pudiera atravesar el filtro y ser descartado. Al ARN adsorbido en el filtro se lavó tres veces, una con la solución de lavado 1 y dos veces con la solución de lavado 2/3. El filtro con el ARN se depositó en un nuevo tubo colector de 2 mL y se recuperó con una solución de elución precalentada a 94°C. Posteriormente, se adicionaron 4 µL de DNasa I, 11 µL de solución amortiguadora de DNasa y se incubó por 30 min a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se le agregó a la reacción 0.2 volúmenes de inactivador de DNasa I, y se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 min agitándose dos veces durante este tiempo.

5.3.1 Análisis del ARN total.

El ARN total fue analizado mediante electroforesis de agarosa al 1%, utilizando como buffer TBE 1X. Se depositaron en cada pocillo la cantidad de 10 µL de muestra, que contenía 5 µL de ARN total, 2 µL de buffer de carga (jugo azul) y 3 µL de agua libre de nucleasas, y se aplicó una corriente de 70 Volts durante 5 min para permitir el adecuado depósito de las muestras en sus respectivos pocillos. Posteriormente, se incrementó a 115 volts y se dejó correr en el gel

durante 30 min. El objetivo de aplicar electroforesis a las muestras de ARN total es para observar las bandas de ARN ribosomal que ocupan entre el 80 al 90% de la composición total de la muestra, así que dos bandas compactas y ligeramente separadas entre ellas son representativas de una buena integridad del total de la muestra incluyendo el ARN mensajero, que resulta ser la muestra de interés ya que, a partir de este se sintetizarán los ADNc que serán hibridados en el microarreglo. Para lo anterior no resulta indispensable usar indicador de peso molecular.

Se determinó la pureza del ARN total al medir la relación de absorbancias a 260/280 y el rendimiento se calculó a una absorbancia de 260 nm empleando la siguiente formula:

$$A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 40 \mu\text{g/mL} = [\text{ARN}]$$
$$\text{Rendimiento} = [\text{ARN}] \times \text{volumen}$$

5.4 Síntesis y marcaje del ADNc

Después de haber obtenido una cantidad adecuada de ARN total, se prosiguió a emplear 12 μL para la síntesis del ADNc, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se incubó en un eppendorf de 1.5 mL una mezcla de decámeros de nucleótidos al azar con el ARN total a 75°C por 7 min, después se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 segundos y se mantuvo a temperatura ambiente mientras se añadieron los siguientes componentes de reacción: 2 μL de buffer 10x, 1 μL de inhibidor de ribonucleasas, 1 μL de mezcla de desoxirribonucleótidos excepto timina, 1 μL de mezcla de timina y aminoalil uridina y finalmente 2 μL de enzima transcriptasa reversa M-MLV. Se homogeneizó la mezcla de reacción en un vortex, se centrifugó para coleccionar lo remanente en las paredes para después incubarse 1.5 horas a 42 °C.

En este paso el ADNc fue sintetizado y el ARN total que sirvió de molde, fue degradado mediante una posterior hidrólisis alcalina con 4 μL de NaOH 1M a 65°C por 15 min. La reacción de hidrólisis fue neutralizada con 10 μL de buffer HEPES 1M; al ADNc sintetizado se le añadió 100 μL de etanol 100% y 3.4 μL de acetato de sodio 3M y después de mantenerlo 30 min a -20°C, se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm, para obtener el precipitado de ADNc y descartar el sobrenadante. Al precipitado se le añadió 0.5 mL de etanol al 75%, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante para obtener el ADNc listo para el marcaje.

La preparación de ambos colorantes fluorescentes Cy3 y Cy5 consistió en disolver todo el contenido en cada uno de los viales provistos por el kit, en 3 μL de DMSO y dejarlos incubar en la oscuridad a temperatura ambiente por una hora. Mientras la incubación de los fluoróforos se llevaba a cabo, dos columnas NucAway fueron preparadas adicionando 650 μL de agua libre de nucleasas sobre un polvo contenido dentro de las columnas NucAway, que al estar en contacto con el agua tiene la capacidad de formar una cama de gel después de incubarse por aproximadamente 1.5 horas; después se eliminó el exceso de agua libre de nucleasas mediante centrifugación a 3000 rpm por dos minutos y quedaron listas para la purificación del ADNc que se marcó posteriormente.

Por otro lado, cuando la incubación de los colorantes concluyó, se prosiguió al marcaje del ADNc, de la siguiente manera: en un eppendorf de 1.5 mL que contenía al ADNc, se le añadieron 4 μL de buffer de acoplamiento, se aplicó vortex para facilitar la disolución del ADNc y se centrifugó a 2000 rpm durante 15 s para colectar todo el ADNc adherido a las paredes en el fondo del tubo. Después de centrifugar se le añadió 2.5 μL de agua libre de nucleasas y se repitió el paso de vortex y centrifugación con el mismo objetivo. Finalmente los 3 μL de colorantes disueltos en DMSO fueron añadidos a su respectivo ADNc e incubados durante una hora protegidos de la luz a temperatura ambiente. La reacción de acoplamiento fue detenida mediante la adición de 6 μL de

hidroxilamina 4M y una posterior incubación de la reacción en la obscuridad por 15 min, dando como resultado el marcaje de la muestra control con Cy3 y la muestra tratada con Cy5.

Cada muestra fue llevada a un volumen de 85 μ L con agua libre de nucleasas, y se depositaron sobre la cama de gel formada en las columnas de purificación NucAway. Cada columna se colocó en un tubo colector estéril de 1.5 mL y se eluyó centrifugando a una velocidad de 3000 rpm durante dos minutos. El ADNc marcado se filtró a través de la columna, quedando retenido el exceso de fluoróforo libre en el gel de la columna y depositándose en el tubo el ADNc marcado. Las columnas anteriores se colocaron nuevamente dentro de otro tubo colector de 1.5 mL y se les adicionó a cada una 100 μ L de agua libre de nucleasas y se centrifugaron en las condiciones previamente descritas para recuperar la mayor cantidad posible de ADNc marcado. Las eluciones obtenidas del ADNc de la condición tratada y sin tratar fueron reunidas e incubadas por separado cada una con 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y tres volúmenes de etanol 100% a -20°C por 30 min. Posteriormente, se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 minutos, y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 0.5 mL de etanol 75%, nuevamente se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente el precipitado obtenido se diluyó en 10 μ L de agua libre de nucleasas.

5.5 Hibridación del microarreglo

La hibridación del ADNc de ambas muestras sobre el chip de ADN, se realizó preparando una mezcla de reacción a un volumen final de 300 μ L la cual contenía SSPE 6X, 10% de formamida, 0.01 mg/mL albúmina de suero bovino acetilada, 0.01% de Tween 20, 1% de oligo control, 10 μ L de cada ADNc marcado, completando el volumen de reacción con agua DEPC. Previo a la hibridación la muestra se incubó 5 minutos a 65 °C y de igual manera la cámara de hibridación, el chip de ADN y una laminilla de vidrio con empaque.

Inmediatamente después de esta incubación la muestra se llevó a -20 °C durante 5 min.

Una vez concluido el tiempo de incubación, el chip de ADN se colocó sobre la cámara de hibridación y se le depositaron los 300 µL de la mezcla de reacción, para posteriormente cubrirse con la laminilla de vidrio, dejando una burbuja de aire que permitiera el contacto del ADNc sobre todos los genes del chip, consiguiendo así una mejor hibridación entre sondas complementarias. La cámara con el chip se sometieron a una incubación a 42 °C durante 24 horas protegidos de la luz.

5.6 Lavado y secado del microarreglo

Al final de la incubación el chip con la laminilla se sumergieron en una solución SSPE 1X durante 3 min para permitir la separación cuidadosa de ambos. Ya separado, el chip se sumergió nuevamente durante 3 min en una nueva solución SSPE 1X, se repitió este paso una vez más y después se sumergió en SSPE 0.25X durante 30 S. Inmediatamente, el chip se secó mediante una ligera centrifugación (menor a 1000 rpm durante 2 minutos) para impedir que queden manchas de sales o cualquier artefacto presente que pudiera alterar la posterior lectura del microarreglo.

5.7 Lectura del y cuantificación microarreglo.

El microarreglo fue colocado en el lector, con la cara de impresión hacia abajo y con el uso del Scanner de microarreglos se hizo la lectura para cada uno de los fluoróforos a su longitud de onda de excitación correspondiente (Cy3 a 555 nm, Cy5 a 647nm), dando click sobre el ícono *adquisición de imágenes*. Habiéndose realizado esta lectura, el equipo generó tres imágenes, una correspondiente a la lectura de longitud de onda de 555 nm, otra para 647 nm y la última fue la combinación de ambas (555/647 nm). Las imágenes se

guardaron dándoles un nombre deseado. Posteriormente se creó una retícula con la que se hizo coincidir cada cuadro con cada punto de las imágenes previamente generadas del arreglo, con el fin de reducir el espacio de búsqueda para la lectura. Se seleccionó el comando *Grid* y se insertaron los datos del archivo del arreglo de los genes de *M. tuberculosis* H37Rv sobre el chip proporcionados por el proveedor. El archivo contiene la información sobre la localización de cada uno de los genes impresos en el arreglo, de manera que puede conocerse con exactitud el gen correspondiente a cierto punto. Habiendo alineado automáticamente la retícula con las imágenes del arreglo se prosiguió a separar la intensidad de los puntos de la intensidad de fondo, ya que esta última afectaría la calidad de la información de la expresión génica y, que a su vez impactaría en las conclusiones biológicas derivadas de los datos.

La siguiente etapa fue hacer el análisis estadístico de forma automática de todas las medias de cada gen a las dos intensidades (555 nm y 647 nm) y a la relación entre ellas (555/647 nm), empleando el software genArise. A partir de las medias de cada gen se calculó la desviación estándar (DE) y a partir de ella se calculó el Zscore de cada gen, que representa el número de DE. Se obtuvo una lista de genes con diferentes valores de Zscore, de los cuales se consideraron significativos para el análisis bioinformático aquellos que presentaran un número de DE (Zscore) menor de -1.5 y mayor de 1.5.

5.8 Análisis bioinformático de la expresión génica.

Una vez que se obtuvo la lista de los genes que se regulan positiva y negativamente, se procedió a realizar el análisis bioinformático empleando bases de datos mencionadas en el apartado 4.10, en las cuales la lista de genes con un Zscore mayor a 1.5 y menor a -1.5 fueron analizados. Los resultados se comentan en la sección 6.4.

5.9 Validación del microarreglo mediante PCR en tiempo real

5.9.1 Diseño de oligos

Para el diseño de oligos se utilizaron las herramientas bioinformáticas mencionadas en el apartado 4.10.1. Estos oligos fueron diseñados a partir de las secuencias de los genes seleccionados a evaluar en PCR en tiempo real, tomando como criterio de elección de estos genes, aquellos que presentaran desviaciones estándar más dispersas de acuerdo a las listas de genes sobreexpresados e inhibidos del microarreglo. Fueron elegidos seis genes sobreexpresados y cuatro genes inhibidos. Además se eligieron dos genes de referencia con el fin de probar cuál de ellos podría amplificar a la temperatura misma de los genes de interés y también cuál de ellos mantendría constante su nivel de expresión en ambas condiciones. A partir de la secuencia de uno de los genes de referencia (Rv1436, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa) se diseñó un par de oligos. En cuanto al par de oligos del otro gen de referencia (RvDB_6066, ARN ribosomal 16s) fue elegido de trabajos publicados de PCR en tiempo real de *M. tuberculosis* H37Rv.

En la tabla 3 se muestran los oligos diseñados a partir de los genes seleccionados del microarreglo para la validación por PCR en tiempo real. La secuencia de los genes fueron copiadas del GenBank, y pegadas en el programa Primer3 o Primer Express version 3. Posteriormente, se modificaron solo algunos parámetros para la obtención de oligos, dichos parámetros fueron: temperatura media del oligo (55-63 °C), longitud del oligo (entre 17-22, óptima 20 nucleótidos) y longitud del segmento a amplificar (entre 90-250 pares de bases), el resto de los parámetros preestablecidos en cada programa (Primer3 y Primer Express versión 3) no se modificaron. Finalmente se dio “click en pick primers” para que el programa arrojara varias opciones de oligos. Cada opción emitida fue analizada en el programa amplifx 1.5.4 probando los posibles dímeros que pudieran formarse entre oligos, de manera que el par de oligos más estable, es decir, aquel que no formara ningún tipo de

dímeros, era seleccionado. Así mismo, con el programa Amplifx fue realizada una PCR virtual para cada par de oligos con su secuencia de gen correspondiente para conocer la longitud del amplicón y temperatura de alineamiento sugerida.

Tabla 3. Secuencia de oligos para PCR en tiempo real.

Gen ID	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'	Zscore
Rv3551	CTTGAATCTCGGTGACAGCC	ACCGATTTGACCAGTTCCTC	2.473
Rv3903c	AGGAGATGCTGACTGGGAT	CTAGCGCCTCATTAGGGTT	3.549
Rv0584	CACCCACTACGCCAATTTCT	AGCGGTACCACACTGTCTC	2.824
Rv0849	GAGTCCTCGTCGGAAATCTG	GAACCCGAGGTGAATGTGTC	3.461
Rv0176	GTTTGTGGGTTGGCTGTG	CGGTTTGCCATTCATTGACG	2.967
Rv1066	GCTAGTGATCGAGCGCAA	CAACCCCAAGTCCAGCA	2.979
Rv2780	TCCACACTCGCTACTCATCG	TATCCACCAGTACCGCACCT	-3.285
Rv2895c	CTTTGAGGTTGTCGCTACCC	CGACGAACACCAGCTTGAT	-4.931
Rv0954	ACTCGGCGTATTTCTGATGG	CTGTCCATACGGGTGCGAACT	-3.311
Rv3692	GAGCGTCAAGTCAGTGTGGA	CAACTGATAGGTGCCCTCGT	-4.234
RvDB_6066	CAAGGCTAAAACCTCAAAGGA	GGACTTAACCCAACATCTCA	A
Rv1436	GGCGTGGATGGTGGTCAT	ATCATCTCCAATGCGTCGTG	B

a,b genes de referencia

5.9.2 Extracción del ARN y síntesis del ADNc

La extracción del ARN de *M. tuberculosis* H37Rv, así como el análisis de la calidad fueron realizados de igual manera que para los experimentos del microarreglo 5.3 y 5.3.1, respectivamente. Por su parte, la síntesis del ADNc fue realizada empleando el kit SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis y, siguiendo el protocolo del fabricante, los componentes de reacción listados en la tabla 4, se reunieron y fueron sometidos a temperaturas de 25°C, 42°C y 85°C por 10, 60 y 5 minutos, respectivamente.

Después de haber obtenido el ADNc se procedió a evaluar los oligos mediante PCR punto final con la finalidad de determinar las temperaturas de

alineamiento y las concentraciones de oligos para ser empleadas en PCR en tiempo real.

Tabla 4. Componentes de reacción para la síntesis de ADNc

Componente de reacción	Volumen por reacción
5X VILO™ Reaction Mix	4 µL
10X SuperScript® Enzyme Mix	2 µL
ARN total	Arriba de 2.5 µg
Agua libre de nucleasas para aforar	20 µL

5.9.3 Estandarización mediante PCR de punto final

Las reacciones de PCR punto final, se realizaron empleando el kit GoTaq® Green Master Mix 2X, incluyendo en la reacción los siguientes componentes:

Tabla 5. Componentes de reacción empleados en PCR punto final

Componentes de reacción	Volumen por reacción (µL)
GoTaq® Green Master Mix 2X	10
ADNc	1.5 (450 ng)
Oligo forward	1 (0.1-0.5 µM)
Oligo reverse	1 (0.1-0.5 µM)
Agua estéril	6.5
Volumen final	20

Se probaron diferentes temperaturas de alineamiento (oscilaron entre 55 y 61 °C) y diferentes concentraciones para cada par de oligos, hasta que se logró obtener las óptimas, en las que es posible observar en un gel de agarosa después de una electroforesis, una banda bien definida de un producto de PCR, del tamaño esperado y sin exceso de oligos tal como se muestra en la Figura 12 en la sección de resultados y discusión. Únicamente, el par de oligos que no mostró una buena amplificación fue el Rv1436, ya que a la temperatura de alineamiento de 57 °C, mostraba dimerización de oligos, cuando el resto de

los genes, presentaban una óptima amplificación a esta temperatura. Por tal motivo fue descartado para ser empleado como gen de referencia en el análisis de PCR en tiempo real.

5.9.4 PCR en tiempo real

Después de haber estandarizado la temperatura de alineamiento de cada par de oligos así como sus concentraciones en la reacción final de PCR punto final, proseguimos a cuantificar mediante PCR en tiempo real, la expresión de cada uno de los genes seleccionados.

Habiendo descartado la posibilidad de probar el gen de referencia Rv1436, debido a su mala amplificación en PCR punto final, fue solo el gen de referencia RvDB_6066 (subunidad 16s ribosomal) el que fue sometido a prueba para saber si después de haber mostrado muy buena amplificación en PCR punto final, en PCR en tiempo real era apropiado para ser empleado como gen de referencia en nuestro experimento, para lo cual se prepararon por duplicado reacciones de PCR en tiempo real para el gen de referencia empleando por separado el ADNc obtenido de la condición tratada y el ADNc obtenido de la condición control, también se emplearon para cada reacción de PCR en tiempo real, los componentes enlistados en la Tabla 7. Ambas reacciones fueron iniciadas en el termociclador de tiempo real y, durante la reacción mostraron gráficas de amplificaciones muy similares y un C_T muy cercano entre la muestra tratada y control.

Así fue que comprobamos que el gen de la subunidad del ARN ribosomal 16s fue adecuado ya que se mantuvo un nivel de expresión independientemente del tratamiento al que fue sometido *M. tuberculosis* H37Rv con el AmDG.

Posteriormente fue diseñado el experimento para iniciar la cuantificación de la expresión génica. Se eligió como tipo de cuantificación, "Cuantificación

Relativa”; el método de cuantificación relativa seleccionado fue “ $\Delta\Delta C_T$ (método de C_T comparativo)”. Posteriormente elegimos “SYBR green”, como el tipo de fluoróforo; y “ADNc” como tipo muestra. Se estableció el número de genes a analizar, que en nuestro caso fueron de uno o dos genes de interés por reacción, además del gen de referencia. El criterio de trabajar con cierto número de genes fue de acuerdo al número de pocillos disponibles en una placa de 48 pocillos, tal como la que se ejemplifica en la Figura 6, después se identificó a cada gen con su correspondiente ID (identificación en genbank). Las muestras se identificaron como control y tratada. Se eligió el gen de referencia que para todos nuestros ensayos siempre fue el RvDB_6066 (16s) independientemente si se estaban analizando los genes sobreexpresados o inhibidos. La muestra de referencia fue la muestra control para la cuantificación de los genes sobreexpresados y la tratada para los genes inhibidos. Todos los genes tanto de interés como el de referencia fueron ensayados por triplicado en ambas muestras, de manera que el valor de C_T (ciclo umbral, número del ciclo en el que la gráfica de amplificación alcanza el umbral, en otras palabras, cuando es detectado por el equipo un incremento significativo de fluorescencia) de todos los genes, es promediado y el $C_{T\text{medio}}$ es obtenido.

Hasta este punto del diseño del experimento, el StepOne Software v2.1 exhibe una distribución de los genes y las muestras en una placa de 48 pocillos (Tabla 6, ejemplo de una distribución de un gen sobreexpresado), que representa el acomodo que deben tener las muestras en la placa al momento de ser cargadas.

Tabla 6. Distribución del experimento del gen sobreexpresado Rv3551 (CoA)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Control 16s	Control 16s	Control 16s	Control CoA	Control CoA	Control CoA	Tratada 16s	Tratada 16s
B	Tratada 16s	Tratada CoA	Tratada CoA	Tratada CoA				
C								
D								
E								
F								

Control 16s: ADNc de muestra control + oligos del gen de referencia, 16s; **Tratada 16s:** ADNc de muestra tratada + oligos del gen de interés, CoA transferasa; **Control CoA:** ADNc de muestra control + oligos de gen de referencia, 16s; **Tratada CoA:** ADNc de muestra tratada + oligos del gen de interés.

El siguiente paso fue definir en el equipo las temperaturas y el tiempo de la reacción. La temperatura y el tiempo de la etapa de alineamiento fueron tomadas a partir de lo obtenido en PCR punto final y el resto de las temperaturas fueron tomadas de las recomendadas por el fabricante del kit de PCR en tiempo real.

La primera etapa de la reacción fue el calentamiento para la activación de la enzima platinum[®] Taq DNA polymerase a 50°C por dos minutos y 95°C por dos minutos, seguida de una etapa de amplificación de 40 ciclos de 15 s a 95°C en la etapa de desnaturalización; 57°C por 30 s, en la etapa de alineamiento y 60°C durante 60 s para la etapa de extensión.

La Figura 4 muestra la rampa de temperaturas con sus respectivos tiempos así como el número de ciclos en la etapa de amplificación.

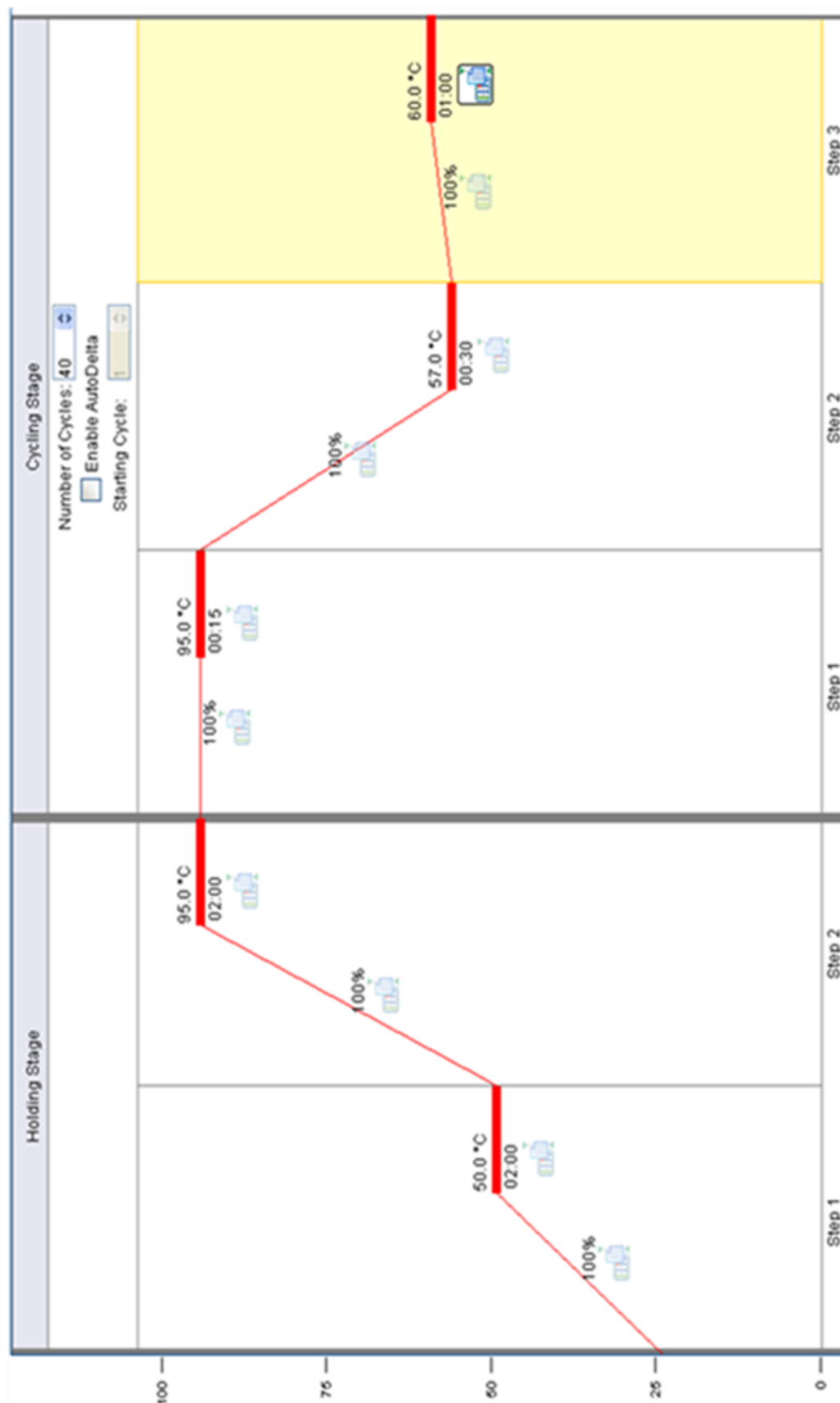


Figura 4. Rampa de temperatura de reacciones de PCR en tiempo real

Las reacciones para cada gen fueron conformadas por los mismos componentes ocupando un mismo volumen de 10 μL en la reacción final, variando únicamente entre cada una de las reacciones el tipo de muestra, tratada o control según sea el caso y el tipo de oligos y las concentraciones de estos. La concentración de los oligos fue tomada a partir de los resultados de PCR punto final (se muestran en el capítulo de resultados y discusión).

Tabla 7. Composición de la reacción de PCR en tiempo real

Componente de reacción	Volumen por reacción (μL)
Master Mix 2x	5
Rox	0.2
Oligo forward	0.5
Oligo reverse	0.5
ADNc tratado o ADNc control	1 (100 ng)
Agua libre de nucleasas	2.8
Volumen final	10

Después de preparar y distribuir las reacciones en el pocillo correspondiente estas fueron ejecutadas para PCR en tiempo real y al término de las reacciones, el StepOne Software v2.1 automáticamente realiza la cuantificación relativa de la expresión génica de ambas muestras (control y tratada) a partir del número del $C_{T\text{medio}}$, empleando las siguientes fórmulas:

$$\Delta C_T \text{ tratada} = C_{T\text{medio}} \text{ gen interés tratado} - C_{T\text{medio}} \text{ gen referencia tratado}$$

$$\Delta C_T \text{ control} = C_{T\text{medio}} \text{ gen interés control} - C_{T\text{medio}} \text{ gen referencia control}$$

$$\Delta\Delta C_T \text{ tratada} = \Delta C_T \text{ tratada} - \Delta C_T \text{ control}$$

$$\Delta\Delta C_T \text{ control} = \Delta C_T \text{ control} - \Delta C_T \text{ control}$$

$$\text{RQ (Cuantificación relativa)} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación de las condiciones de exposición del AmDG sobre *M. tuberculosis* H37Rv

El bacilo de *M. tuberculosis* H37Rv fue sometido a seis diferentes concentraciones del AmDG en un tiempo total de 120 h y se registró la lectura de la DO del cultivo bacteriano por periodos de 24 horas a partir del tiempo cero (Tabla 8). La concentración de 50 µg/mL de AmDG por un periodo de 24 horas fueron las condiciones mínimas necesarias para causar inhibición del crecimiento de la micobacteria como se aprecia en la Figura 5. Empleando estas condiciones de estrés puede verse reflejada una alteración de la expresión génica sobre el microarreglo y de aquí ser analizado para plantear un probable mecanismo de acción. Por lo tanto, fueron estas las condiciones de estrés elegidas para tratar a *M. tuberculosis* H37Rv.

Tabla 8. DO de cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv a diferentes concentraciones del AmDG

Horas	Cepa	DMSO	12.5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL
	Densidad Óptica							
0	0.4861 ±.015	0.4772 ±.002	0.5080 ±.015	0.5003 ±.019	0.5029 ±.001	0.5033 ±.007	0.5048 ±.008	0.4876 ±.010
24	0.5240 ±.088	0.4859 ±.014	0.5346 ±.011	0.5321 ±.009	0.5112 ±.007	0.5062 ±.006	0.6096 ±.007	0.6569 ±.010
48	0.5544 ±.017	0.5560 ±.014	0.5528 ±0	0.5531 ±.017	0.4965 ±.003	0.4892 ±.006	0.5561 ±.005	0.5699 ±.003
72	0.6035 ±.015	0.5936 ±.006	0.5845 ±.003	0.5687 ±.015	0.4578 ±.006	0.4496 ±.004	0.5074 ±.002	0.4977 ±.012
96	0.6262 ±.021	0.6157 ±.006	0.6088 ±.006	0.5926 ±.020	0.4543 ±.005	0.4396 ±.012	0.4942 ±.009	0.4854 ±.011
120	0.6388 ±.011	0.6502 ±.007	0.6278 ±.002	0.6106 ±.035	0.4470 ±.002	0.4137 ±.013	0.4875 ±.001	0.4603 ±.010

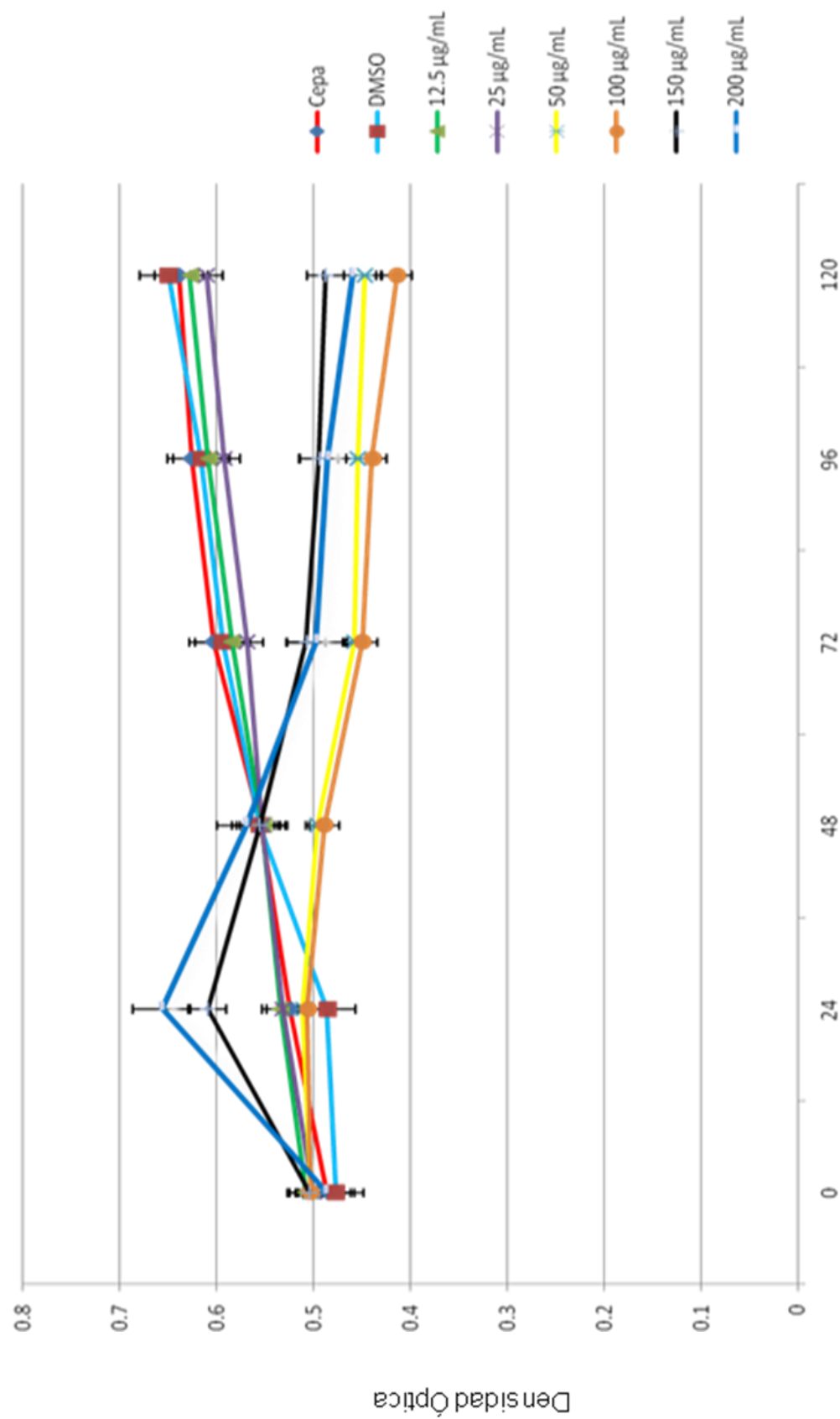


Figura 5. Gráficas de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv expuesta a distintas concentraciones del AmDG

6.2 Extracción del ARN

Un cultivo de micobacteria en fase exponencial de crecimiento fue dividido en partes equitativas y a una de ellas se le adicionó una cantidad de *AmDG* para obtener una concentración de 50 µg/mL del compuesto en el cultivo y a la otra parte se le adicionó el compuesto (ver sección 5.3). A partir de estos cultivos, de manera independiente se les realizó una extracción de ARN total, este fue cuantificado y las cantidades de ambas condiciones fueron igualadas a 12 µg. Para determinar la integridad del ARN total se hizo una electroforesis en gel de agarosa 1% y se analizó observando por transiluminador UV (Figura 6).

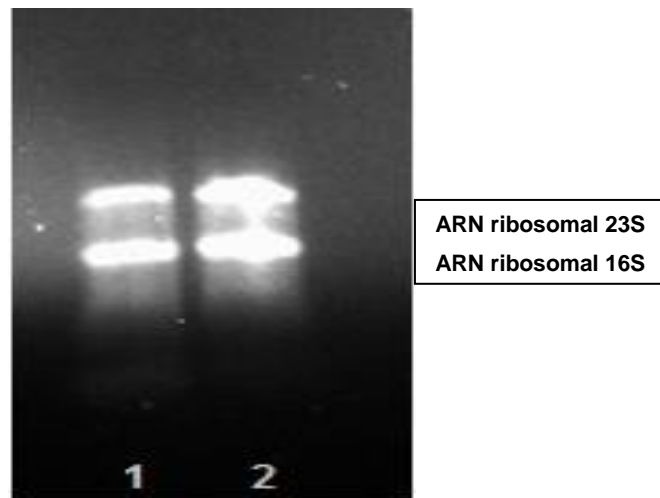


Figura 6. Electroforesis en gel agarosa (1%) de ARN total de la muestra control (carril 1) y la muestra tratada (carril 2)

El ARN total mostró en el gel, bandas de ARN ribosomales definidas, lo que implica una buena integridad tanto del ARN ribosomal como del ARN total el cual incluye al ARNm que es el de nuestro interés porque es el representativo de la expresión génica y a partir de este se generará ADNc que hibridará en el microarreglo a su sonda correspondiente. Por lo tanto, se consideró pertinente continuar con la síntesis del ADNc y el marcaje con fluoróforos para realizar la posterior hibridación del ADNc marcado en el microarreglo de *M. tuberculosis* H37Rv.

6.3 Lectura y cuantificación del microarreglo

El microarreglo hibridado se leyó y de las intensidades de fluorescencia obtenidas de cada punto que representa a un gen, fueron extraídas la media aritmética y la desviación estándar con la ayuda del programa estadístico genArise, para emplearlas en una fórmula con la que es determinado el Zscore de cada gen. El Zscore representa el número de desviación estándar (DE) para un gen que hibridó en el microarreglo. A continuación se muestra la fórmula que para el cálculo del Zscore de los genes.

$$Z_i = (R_i - \text{mean}(R)) / \text{sd}(R)$$

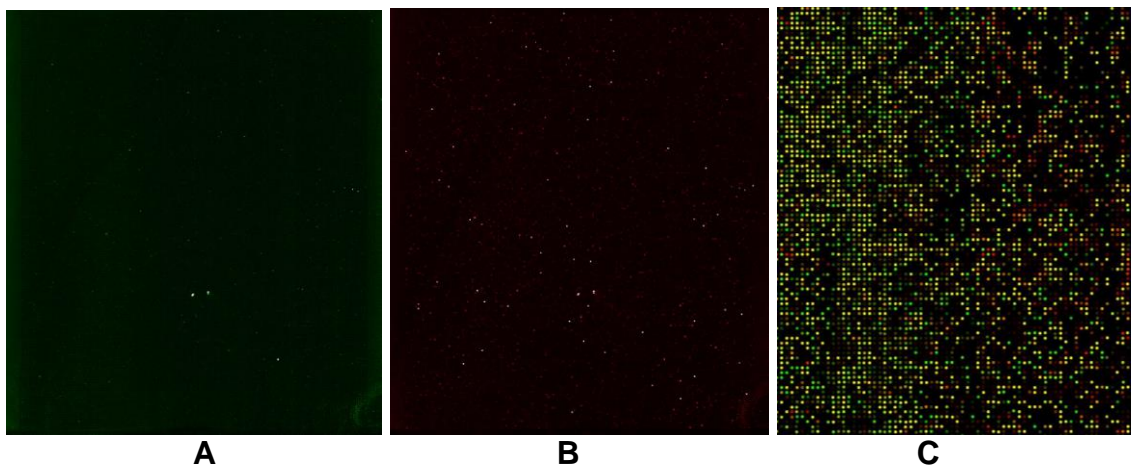


Figura 7. Imágenes del microarreglo de la condición control (A) marcada con Cy5, condición tratada (B) marcada con Cy3 y la relación de ambas condiciones con Cy3/Cy5 (C).

Se puede observar en la imagen A de la Figura 7, representando en color verde debido a Cy5, los genes expresados de *M. tuberculosis* H37Rv, en la condición normal, es decir, sin tratamiento. La imagen B, muestra con color rojo por el colorante Cy3, los genes expresados en la condición tratada con AmDG. Cuando las imágenes de las lecturas de las dos condiciones fueron sobrelapadas, en este caso imagen C, se percibieron tres colores distintos, donde los puntos verdes corresponden a los genes que se expresan únicamente en la condición control y que representan a genes que son

inhibidos por el tratamiento en la condición tratada. Los puntos rojos, corresponden a genes sobre-expresados por el efecto del tratamiento. Mientras que los puntos de color amarillo, se asumen a los genes que se expresan en similar cantidad ambas condiciones y que no son afectados por el *AmDG*.

En cuanto a la cuantificación del microarreglo se obtuvieron 146 genes con un Zscore mayor a 1.0 (genes sobreexpresados) y 81 genes con un Zscore menor a -1.0 (genes inhibidos). Sin embargo, se consideraron relevantes para el análisis bioinformático, aquellos genes que presentaron un Zscore mayor de 1.5 y menor de -1.5. Dando un total de 89 genes sobreexpresados y 17 inhibidos (Figura 8B). Mientras que todos los genes hibridados se representan en la Figura 8A.

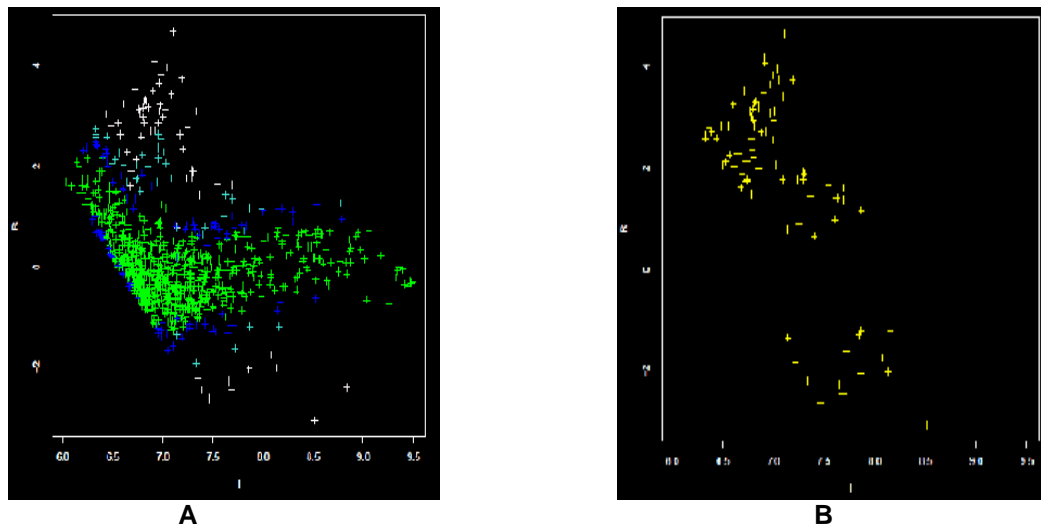


Figura 8. Zscore de todos los genes hibridados (A), Zscore de genes con DE +/-1.5 (B).

6.4 Análisis bioinformático

Los genes inhibidos y sobre-expresados seleccionados para el análisis bioinformático, se sometieron a la base de datos Tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>) y se lograron establecer sus funciones biológicas (en

caso de ser conocida) y la categoría funcional a la que pertenecen. Después fueron agrupados de acuerdo a su categoría funcional correspondiente, tal como se muestra en las tablas 9 y 10, y de las cuales podemos destacar que la categoría funcional de “La pared celular y procesos celulares” presentó un alto porcentaje (22.47%), ocupando el segundo sitio en la lista de genes sobreexpresados, al igual que en la lista de genes inhibidos pero con una proporción del 29.41%.

Tabla 9. Genes sobreexpresados (Zscore ≥ 1.5)

Gen ID	Nombre de gen	Función	Categoría Funcional
Rv3478	PPE60	Desconocida	PE/PPE (Familia de genes altamente conservados en Prolina-Glutamato /Prolina-Prolina-Glutamato)
Rv0578c	PE_PGR S7	Desconocida	
Rv3512	PE_PGR S56	Desconocida	
Rv0286	PPE4	Desconocida	
Rv1196	PPE18	Desconocida	
Rv0980c	PE_PGR S18	Desconocida	
Rv3539	PPE63	Desconocida	
Rv0833	PE_PGR S14	Desconocida	
Rv2371	PE_PGR S40	Desconocida	
Rv0335c	PPE6	Desconocida	
Rv1429	RV1429	Desconocida	Proteína hipotética conservada
Rv2811	RV2811	Desconocida	
Rv3129	Rv3129	Desconocida	
Rv0609A	Rv0609A	Desconocida	
Rv1066	Rv1066	Desconocida	
Rv0345	Rv0345	Desconocida	
Rv1006	Rv1006	Desconocida	
Rv3717	Rv3717	Desconocida	
Rv2240c	RV2240c	Desconocida	
Rv3903c	Rv3903c	Desconocida	
Rv2372c	RV2372c	Desconocida	
Rv3182	RV3182	Desconocida	
Rv1419	RV1419	Desconocida	

Tabla 9. Genes sobreexpresados (Zscore ≥ 1.5)

Continuación

Gen ID	Nombre de gen	Función	Categoría Funcional
Rv1944c	RV1944c	Desconocida	
RV1765c	RV1765c	Desconocida	Proteína hipotética conservada
Rv3205c	Rv3205c	Desconocida	
Rv3686c	Rv3686c	Desconocida	
Rv1628c	RV1628c	Desconocida	
Rv1156	RV1156	Desconocida	
Rv0381c	RV0381c	Desconocida	
Rv1532c	RV1532c	Desconocida	
Rv1069c	RV1069c	Desconocida	
Rv1414	Rv1414	Desconocida	
Rv2920c	Amt	Probable transportador de amonio de la membrana hacia el exterior.	
Rv0176	Rv0176	Probable proteína conservada transmembrana asociada a proteínas Mce (Mammalian Cell Entry) que conducen la entrada de la micobacteria a macrófagos	
Rv1030	kdpB	Uno de los componentes del sistema transportador de potasio de alta afinidad dirigido por ATP.	
Rv2856	nicT	Posible transportador de niquel a través de la membrana al interior	
Rv2796c	lppV	Desconocida	
Rv0882	Rv0882	Desconocida	
Rv0996	Rv0996	Desconocida	
Rv1064c	lpqV	Desconocida	
Rv1236	sugA	Involucrado en el importe activo de azúcar a través de la membrana	
Rv1678	Rv1678	Desconocida	
Rv0955	Rv0955	Desconocida	
Rv0522	gabP	Involucrado en la vía de degradación del 4-aminobutirato	
Rv0615	Rv0615	Desconocida	
Rv0849	Rv0849	Involucrado en el transporte de sustrato a través de la membrana (posiblemente fármacos)	
Rv0935	PstC1	Involucrado en el importe activo de fosfato a través de la membrana. Responsable de la translocación de sustrato a través de la membrana	

Tabla 9. Genes sobreexpresados (Zscore ≥ 1.5)

Continuación

Gen ID	Nombre de gen	Función	Categoría Funcional
Rv0584	Rv0584	Desconocida	
Rv0402c	mmpL1	Parece estar involucrado en el transporte de ácidos grasos	Pared celular y procesos celulares
Rv3878	espJ	Proteína asociada a la secreción de factores de virulencia en el hospedero.	
Rv0219	Rv0219	Desconocida	
Rv3760	Rv3760	Desconocida	
Rv2007c	fdxA	Involucrado en la transferencia de electrones	
Rv3170	aofH	Posiblemente cataliza la desaminación oxidativa	Intermediario del metabolismo y la respiración
Rv3547	Ddn	Convierte nitroimidazol bicíclico candidato a fármaco, a tres metabolitos	
Rv1245c	Rv1245c	Probable reductasa/ deshidrogenasa de alcoholes de cadena corta	
Rv1399c	nlhH	Supuestamente involucrada en el metabolismo de lípidos	
Rv1990A	Rv1990A	Desconocida. Probable deshidrogenasa.	
Rv0897c	Rv0897c	Desconocida. Probable oxido reductasa	
Rv3551	Rv3551	Probable subunidad alfa de CoA-transferasa formada por Rv3551/Rv3552	
Rv0527	ccdA	Posiblemente involucrada en la síntesis del Citocromo C. Podría transferir equivalentes reductores a través de la membrana citoplásmica, promoviendo eficientes puentes disulfuro en la isomerización de proteínas de la superficie de la membrana externa	
Rv2713	sthA	Convierte NADPH a NADH, el cual puede entrar a la cadena respiratoria para generar energía	
Rv0536	galE3	Posiblemente involucrado en el metabolismo de galactosa	
Rv3309c	Upp	Involucrado en la vía de recuperación de piridina, posible fosforribosiltransferasa	
Rv0808	purF	Involucrado en la biosíntesis de novo de purinas	
Rv1105	Rv1105	En combinación con Rv1104, cataliza la hidrólisis de varias betalactamas PNB (<i>para</i> -nitrobencilo) ésteres, al correspondiente ácido y alcohol PNB	

Tabla 9. Genes sobreexpresados (Zscore ≥ 1.5)

Continuación

Gen ID	Nombre de gen	Función	Categoría Funcional
Rv1796	mycP5	Probable micosin anclado a la membrana rica en prolina. Parece tener actividad proteolítica	Intermediario del metabolismo y la respiración
Rv1653	argJ	Involucrada en la biosíntesis de arginina	
Rv0757	Pop	Involucrada en el mecanismo transcripcional. PhoP es parte del sistema regulatorio de los dos componentes PhoP/PhoQ, que funcionan como factores sensoriales y adaptativos en respuesta a estímulos ambientales PHOP/PHOQ. Parece ser un regulador positivo para el regulón fosfato requerido para el crecimiento intracelular	Proteínas reguladoras
Rv3133c	devR	DevR, Parte del sistema regulador de dos componentes. DevR/DevS DEVR/DEVs, controla la expresión de la proteína de choque térmico, HspX HSPX	
Rv3080c	pknK	Involucrada en la transducción de señal. Involucrada en mecanismos regulatorios transcripcionales y en la regulación de metabolitos secundarios	
Rv3759c	proX	Parece estar involucrado en el transporte activo de osmoprotectores a través de la membrana	Virulencia, adaptación y detoxificación
Rv1952	VapB14	Desconocida	
Rv0351	grpE	Estimula junto con DNAJ, la actividad ATPasa de DNAK	
Rv0251c	Hsp	Posiblemente una chaperona involucrada en los pasos de iniciación de la traducción a altas temperaturas	
Rv2863	VapC23	Posible toxina que compone el complejo toxina-antitoxina	
Rv0262c	Aac	Confiere resistencia a aminoglicósidos	
Rv2836c	dinF	Desconocida. Inducible por daño al DNA	Vías de información
RV1020	Mfd	Involucrado en la reparación de excisión de nucleótido. Necesario para reparar cadena específica	
Rv1650	pheT	Cargador de tRNA-feniltransferasa	

Tabla 9. Genes sobreexpresados (Zscore ≥ 1.5)

Continuación

Gen ID	Nombre de gen	Función	Categoría Funcional
Rv0006	gyrA	DNA girasa enrolla negativamente el DNA de doble cadena circular de manera dependiente de ATP y puede catalizar también la interconversión de otros isómeros topológicos de anillos de DNA de doble cadena	Vías de información
Rv0704	rplB	Es una proteína primaria de unión al ARN ribosomal 23S. Tiene actividad peptidiltransferasa	
Rv1390	rpoZ	Promueve ensamblaje de la ARN polimerasa	
Rv1094	desA2	Parece catalizar la conversión principal de ácidos grasos saturados a ácidos grasos insaturados	Metabolismo de lípidos
Rv2612c	pgsA1	Cataliza la transferencia de un alcohol libre (inositol) en un diacilglicerol.	
Rv3804c	fbpA	Proteína del complejo antígeno 85 responsable de la alta afinidad a fibronectina. Posee una actividad micoliltransferasa. Involucrada en la micolilación de la pared celular	
Rv2746c	pgsA3	Biosíntesis de fosfolípidos ácidos	
Rv2979c	Rv2979c	Previene la cointegración de ADN no propio antes de la integración en el cromosoma	Inserción de secuencias y fagos

Tabla 10. Genes inhibidos (Zscore ≤ 1.5)

ID Gen	Nombre de gen	Función	Categoría Funcional
Rv1975	Rv1975	Desconocida	Proteína hipotética conservada
Rv3188	Rv3188	Desconocida	
Rv1043c	Rv1043c	Desconocida	
Rv0518	Rv0518	Desconocida. Posible proteína exportada	Pared celular y procesos celulares
Rv0296c	lppR	Desconocida. Posible lipoproteína conservada lppR	
Rv0954	RV0954	Desconocida. Probable proteína transmembrana conservada	
Rv1097c	Rv1097c	Desconocida. Probable proteína de membrana rica en glicina y prolina	

Tabla 10. Genes inhibidos (Zscore ≤ 1.5)

(continuación)

Gen ID	Nombre de gen	Función	Categoría Funcional
Rv1704c	cycA	Permeasa, involucrada en el transporte a través de la membrana citoplasmática de D-alanina, D-serina y glicina	Pared celular y procesos celulares
Rv2497c	bkdA	Participa en el metabolismo de energía, el complejo deshidrogenasa de cadena ramificada alfa-ceto ácido, cataliza la conversión de cadenas ramificadas alfa-ceto ácidos a acil-CoA y CO ₂	Intermediario del metabolismo y la respiración
Rv0296c	Rv0296c	Probable sulfatasa involucrada en el metabolismo celular	
Rv2780	Ald	Puede jugar un papel en la síntesis de la pared celular como L-alanina es un constituyente importante de la capa de peptidoglicanos	
Rv2225	panB	Involucrada en la síntesis de pantotenato	
Rv1880	cyp140	Oxida una variedad de compuestos no relacionados estructuralmente, incluyendo esteroides, ácidos grasos y xenobióticos	
Rv2895c	viuB	Se piensa que está involucrada en la remoción intracelular de hierro del complejo mycobactin-hierro	
Rv0043c	Rv0043c	Involucrada en el mecanismo transcripcional	Proteínas regulatorias
Rv3692	moxR2	Involucrada en el mecanismo transcripcional, regula la enzima metanol deshidrogenasa	
Rv2866	relG	Desconocida. Toxina RelG	Virulencia, adaptación y detoxificación

La proporción de genes sobreexpresados para cada categoría funcional fue calculada con respecto al total de genes sobreexpresados, lo mismo fue hecho para los genes inhibidos y los resultados se muestran en la Tabla 11.

Una de las categorías funcionales que presentó alta proporción en los genes sobreexpresados, fue la de “pared celular y procesos celulares”, de lo cual se hace énfasis en el apartado 6.4.1

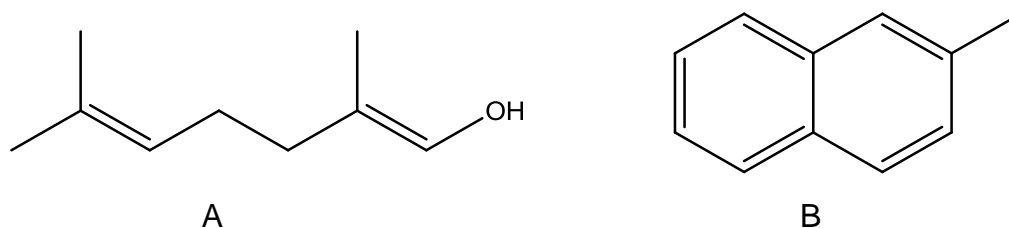
Tabla 11. Proporción de genes sobreexpresados e inhibidos por categoría funcional.

Categoría funcional	Proporción de genes sobreexpresado	Proporción de genes inhibidos
PE/PPE	11.23%	---
Proteínas hipotéticas conservadas	25.84%	17.64%
Pared celular y procesos celulares	22.47%	29.41%
Intermediarios del metabolismo y la respiración	17.99%	35.29%
Proteínas regulatorias	3.37%	11.76%
Virulencia, detoxificación y adaptación	6.74%	5.88%
Vías de información	6.74%	---
Metabolismo de lípidos	4.49%	---
Inserción de secuencias y fagos	1.12%	

6.4.1 Posible mecanismo de acción del AmDG sobre *M. tuberculosis* H37Rv

Al igual que en tuberculist, ambas listas de genes inhibidos y de genes sobreexpresados fueron sometidas al análisis bioinformático en la base de datos DAVID 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), sin embargo, fue solamente a partir de los genes sobre-expresados, de los cuales DAVID desplegó información sobre dos vías metabólicas denominadas como: degradación de geraniol y degradación del 2-metilnaftaleno.

La Figura 9 representa a las estructuras químicas con las que da inicio la ruta de degradación de geraniol (Figura 9A) y la ruta de degradación del 2-metilnaftaleno (Figura 9B).



Figuras 9. Estructuras químicas del geraniol (A) y 2-metilnaftaleno (B).

Analizando a detalle ambas vías, se encontró que comparten una enzima, que lleva por nombre CoA transferasa. En la ruta de degradación del geraniol (Figura 10), la CoA transferasa tiene la función de convertir el ácido geránico a trans-geranil-CoA. En el caso de la ruta de degradación del 2-metilnaftaleno (Figura 11), la CoA transferasa cataliza dos reacciones, la primera, la conversión del naftil-2-metil ácido succínico a naftil-2-metil succinil-CoA y la segunda, la transformación del 2-naftoil-CoA a 2-naftoato.

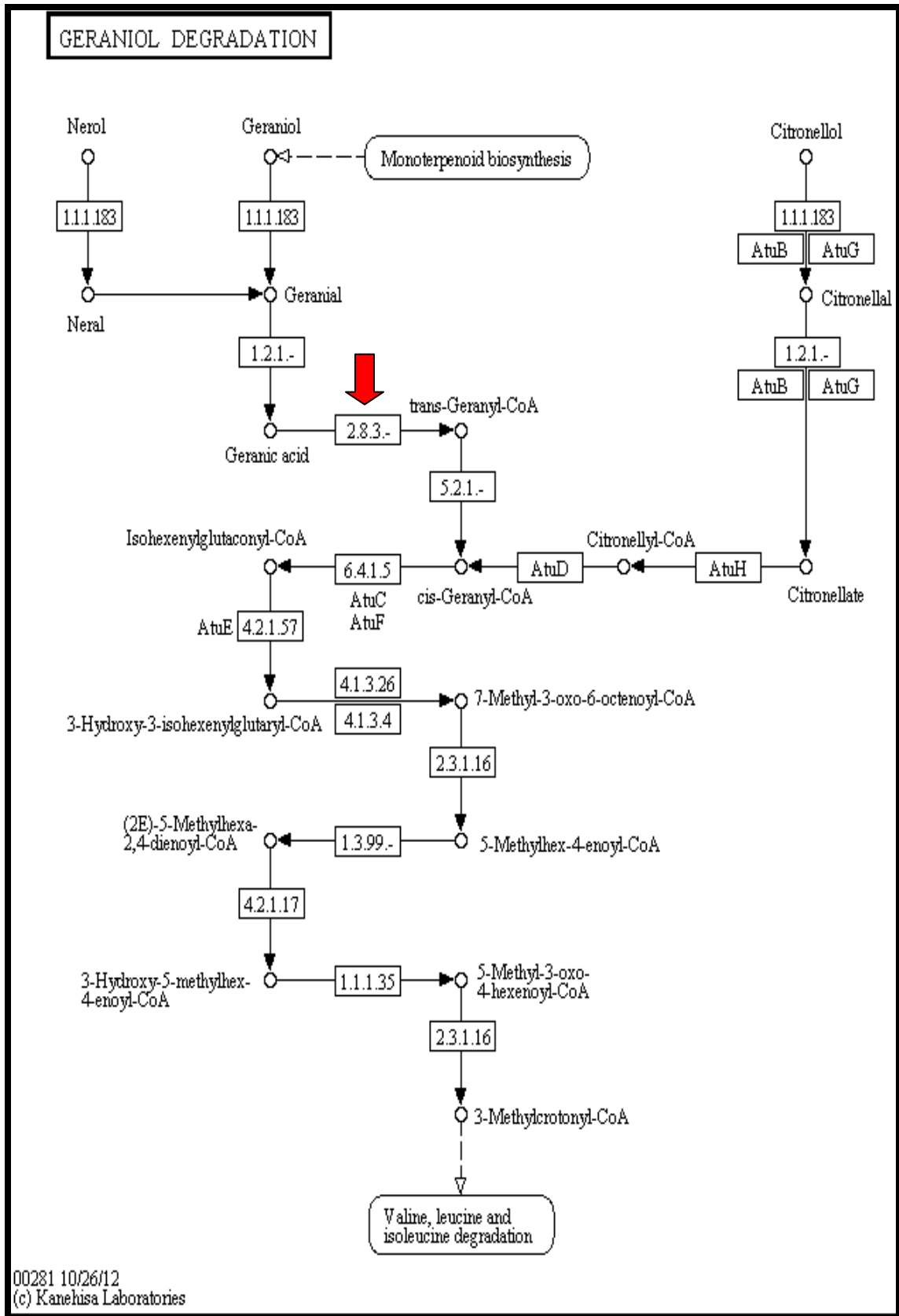


Figura 10. Vía metabólica de degradación de geraniol.⁷⁵

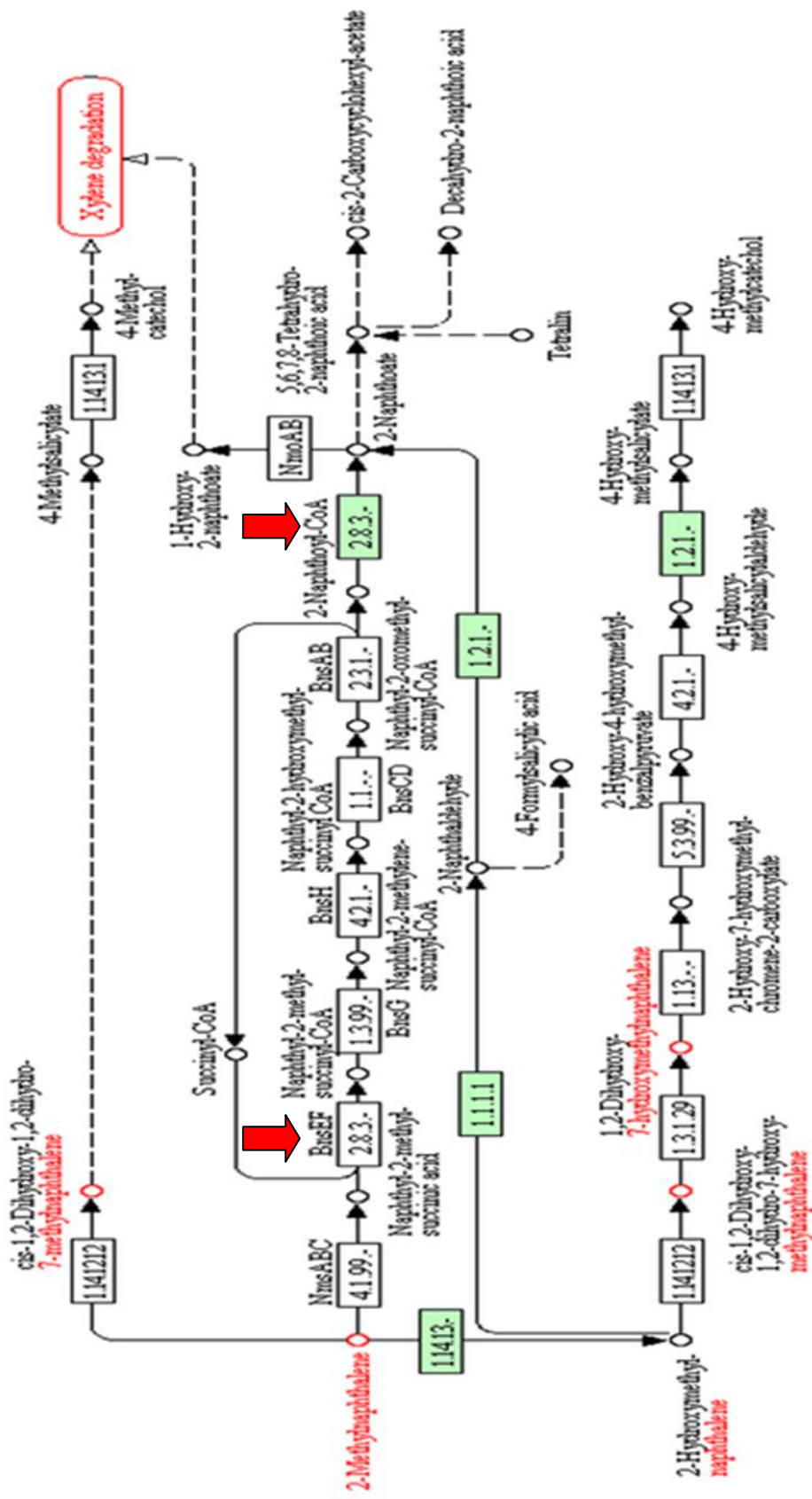


Figura 11. Vía metabólica de degradación del 2-metilnftaleno

Las CoA transferasas son enzimas que se encuentran en organismos de todos los reinos, cumpliendo la función de catalizar la reacción reversible de transferencia de CoA entre un grande y diverso grupo de moléculas. Este tipo de enzimas son agrupadas en tres diferentes familias, que se denominan como familia I, II y III de CoA transferasas, y que difieren entre ellas en su secuencia de aminoácidos y su mecanismo de reacción. La Figura 12 muestra el mecanismo de reacción de las tres familias.⁷⁷

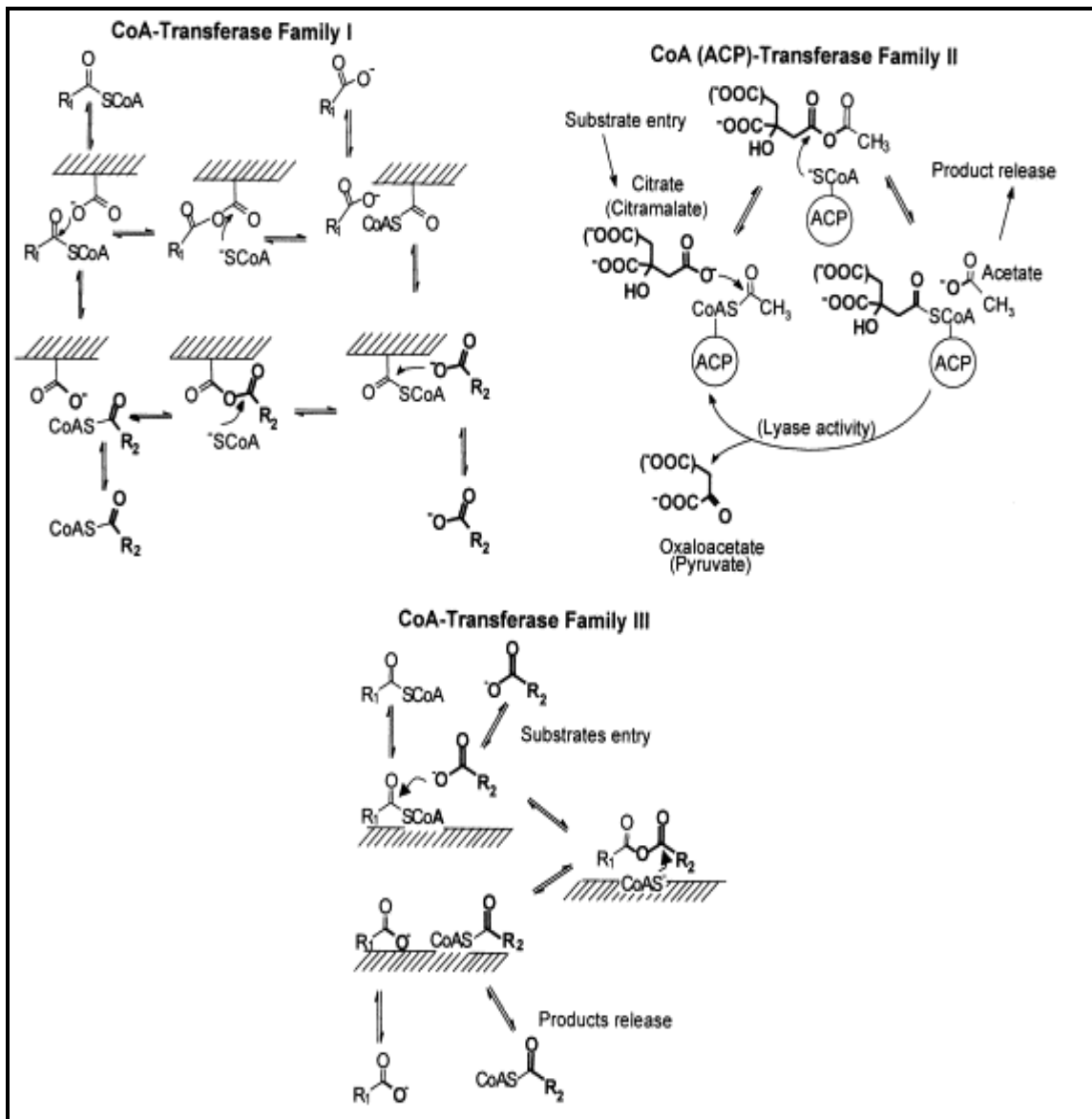


Figura 12. Mecanismos de reacción de transferencia de CoA, de las tres familias de CoA transferasas.⁷⁸

En la ruta del geraniol, la CoA transferasa tiene la función de convertir el ácido geránico a trans-geranil-CoA. En el caso de la ruta de degradación del 2-metilnaftaleno, la CoA transferasa cataliza dos reacciones, la primera es la conversión del naftil-2-metil ácido succínico a naftil-2-metil succinil-CoA y la segunda es la transformación del 2-naftoil-CoA a 2-naftoato.

Esta CoA transferasa pertenece a la familia III, croto-betainil-CoA: carnitina CoA transferasa CaiB, y es conformada por dos subunidades de similar secuencia de aminoácidos y tamaño, una subunidad alfa de 44 kDa (Figura 13) y una subunidad beta de 45 kDa.⁷⁹



Figura 13. Subunidad alfa de la CoA transferasa de *M. tuberculosis* H37Rv

Las CoA transferasas de la familia III están presentes tanto en bacterias, arqueas, y eucariotas. Las especies que poseen este tipo de enzimas son miles, sin embargo, se mencionan como especies clave, o las más relevantes: al humano, el ratón, la mosca de la fruta y *Escherichia coli*. El género *Mycobacterium* posee alrededor de 1220 CoA transferasas de la familia III, el complejo *M. tuberculosis* posee 206, *M. tuberculosis* tipo silvestre posee 163 y particularmente *M. tuberculosis* H37Rv posee cuatro CoA transferasas⁸⁰, entre ellas se encuentra la CoA transferasa conformada por las subunidades alfa y beta, con ID de gen Rv3551 y Rv3552 respectivamente. Esta enzima fue sobreexpresada en el microarreglo, y se encuentra presente en las vías de degradación del geraniol y degradación del 2-metilnaftaleno.

Tras estudios *in silico* realizados por Amineni y cols. (2010), se reportó que tales vías metabólicas resultaron ser específicas de patógenos bacterianos. Por tal razón, se convierten en vías atractivas debido a que poseen blancos farmacológicos, que no estarían presentes en humanos.⁸¹

El geraniol es sintetizado principalmente en plantas, aunque no exclusivo de éstas ya que bacterias como *M. tuberculosis*, son capaces de sintetizar geraniol a partir de la vía del mevalonato y la vía del no mevalonato (MEP/DOXP; 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato/1-deoxi-D-xylulosa 5-fosfato). Por otro lado, hemos investigado la importancia que pueda haber para *M. tuberculosis* el sintetizar geraniol, debido a que este mismo en altas concentraciones puede ocasionar su muerte como lo hace en otros microorganismos. Después de observar las interconexiones que este lignano presenta con otros metabolitos y con otras vías metabólicas hemos encontrado que el geraniol además de entrar a su vía de degradación, puede conectar con la ruta de biosíntesis de indol alcaloides. Encontramos también, que al geraniol le precede el geranil pirofosfato del cual deriva la biosíntesis de todos los monoterpenos, además geranil pirofosfato conecta con otras vías de vital importancia para *M. tuberculosis*, por mencionar algunas se encuentran la

“biosíntesis de ubiquinona y otras quinonas terpenoides” y la síntesis de preniles, entre los que destaca el undecaprenil que forma parte de la estructura de peptidoglicanos de la pared celular.⁸² Con lo anterior podemos suponer que sintetizar geraniol o geranil pirofosfato, el predecesor de la vía metabólica, es de vital importancia para *M. tuberculosis*.

A pesar de ser sintetizado en bacterias, el geraniol es capaz de poseer actividad antibacteriana y antifúngica. Hasta el momento, no se ha reportado de qué manera el geraniol puede llevar a cabo su efecto tóxico en bacterias. Sin embargo, la acción antifúngica en *Candida* y *Saccharomyces*, fue propuesta por Bard y cols (1988). Estos investigadores reportaron que este alcohol monoterpénico (geraniol) actúa como un desestabilizante de la estructura de membrana al disminuir la temperatura de transición de fase, lo que provoca un aumento en la fluidez de la bicapa de lípidos trayendo como consecuencia el aumento de la velocidad de escape de potasio de la célula ocasionando alteración de diversos procesos celulares, que conducen a la muerte de la micobacteria.⁸³ Así como el geraniol lleva a cabo su efecto tóxico en hongos, fue reportado por Togashi y cols (2008) que un efecto similar de daño a la membrana de *Staphylococcus aureus* es ocasionado por farnesol, un alcohol sesquiterpénico con estructura similar al geraniol pero con un isopreno adicional.^{84, 85}

En base a lo mencionado anteriormente, se propone que el AmDG actúa sobre *M. tuberculosis* teniendo como blanco farmacológico la CoA transferasa (Rv3551). El AmDG inhibe a esta enzima, lo que provoca que geraniol no pueda ser degradado, haciendo que este último se acumule al interior de la micobacteria a altos niveles que llegan a ser tóxicos, debido a que altas concentraciones de este monoterpeno ocasionan daño a nivel de la membrana celular generando alteración de los procesos celulares y la posterior muerte del microorganismo, de manera similar que ocurre en *C. albicans* y *S. cerevisiae*. Aunque la técnica de microarreglos no nos permite determinar si la CoA

transferasa está siendo inhibida directa o indirectamente por el *AmDG*, hemos encontrado en la literatura que este lignano es capaz de inhibir indirectamente a una CoA transferasa de hepatocitos, haciéndolo de la siguiente manera, cuando el *AmDG* es administrado a los hepatocitos, este es capaz de activar a la proteína reguladora, proteína cinasa, y ésta a su vez inactiva a una acetil-CoA carboxilasa.²⁵ De manera similar, en los resultados de nuestro microarreglo obtuvimos la sobreexpresión de una proteína cinasa con función regulatoria. En este sentido es probable que el *AmDG* inhiba a la CoA transferasa de manera indirecta por medio de la activación de la proteína cinasa, la que a su vez causa la inhibición de ésta última sobre la CoA transferasa.

Hemos propuesto, que la alta proporción de genes sobre-expresados de la categoría funcional de “La pared celular y procesos celulares” en *M. tuberculosis* H37Rv fue debido a la acumulación de geraniol al interior de la membrana lo que ocasionó alteraciones sobre la bicapa lipídica, y como respuesta al daño se estimuló la sobre-expresión de estos genes.

Con respecto a la vía metabólica del 2-metilnaftaleno se desconoce el efecto que una alteración en ella pudiera ocasionar sobre bacterias patógenas.

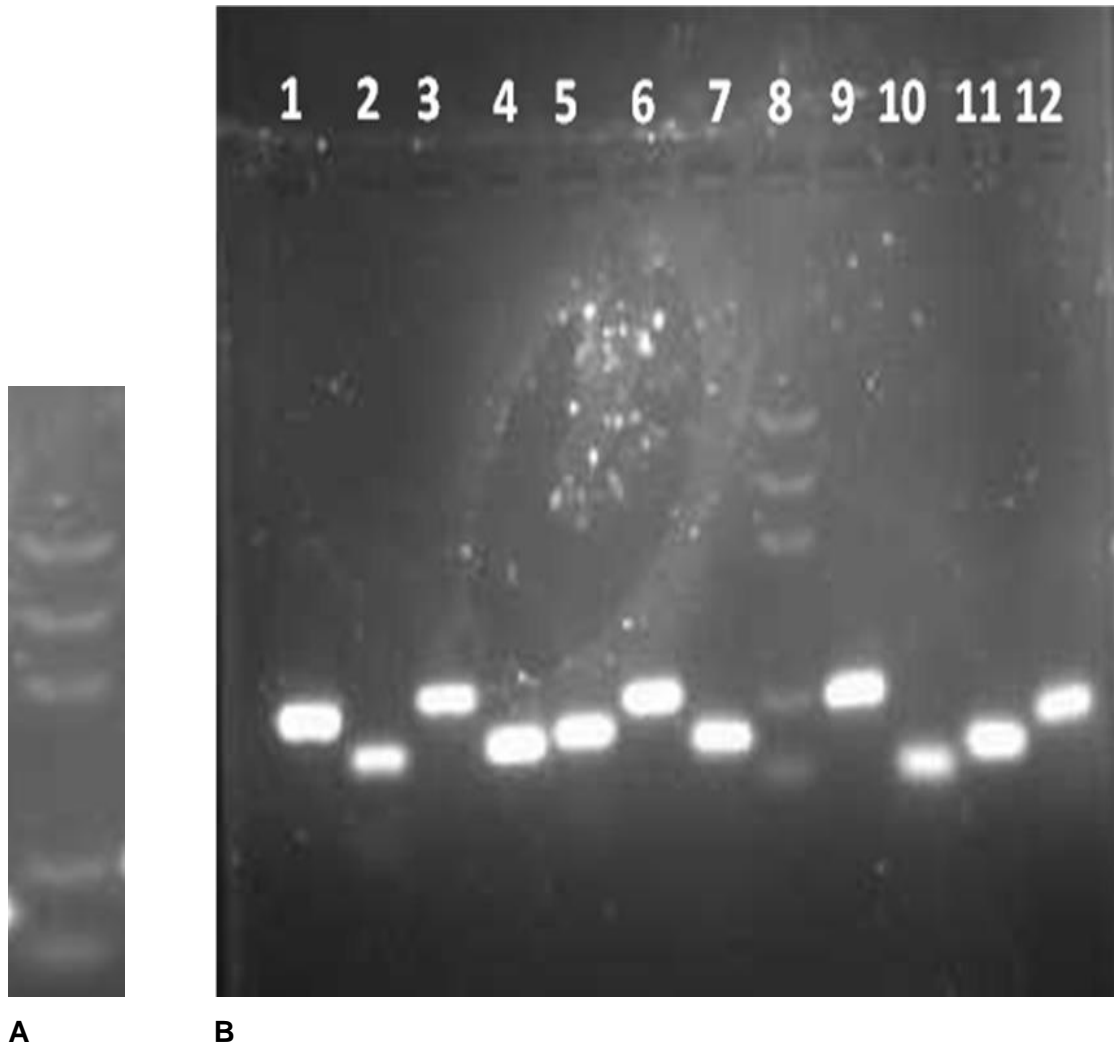
Estos resultados son de gran valor ya que en la actualidad los genes codificantes de los blancos farmacológicos de los fármacos antituberculosos empleados clínicamente han mutado y, por lo tanto han generado cepas resistentes a estas terapias. Sin embargo nosotros proponemos un nuevo blanco farmacológico del *AmDG* en *M. tuberculosis*, la CoA transferasa la cual está presente en las vías metabólicas de la degradación de geraniol y la degradación del 2-metilnaftaleno. Cabe mencionar que esta enzima no se ha reportado como blanco para agentes antituberculosos. Lo anterior, hace al *AmDG* un potencial fármaco antituberculoso que pudiera contribuir en un futuro a la disminución de la problemática actual de tuberculosis.

6.5 Validación del microarreglo mediante PCR en tiempo real

6.5.1 Estandarización de la reacción por PCR punto final

Como se mencionó en el apartado 5.3.2, las condiciones de trabajo para la amplificación de todos y cada uno de los genes fueron estandarizadas por PCR de punto final. Se obtuvo la amplificación de cada uno de los genes al tamaño esperado y sin amplificación inespecífica. Lo que denota que se realizó un buen diseño de oligos para las reacciones de PCR, dando como resultado una generación y una detección de fluorescencia, producto de una amplificación específica del gen de estudio en PCR en tiempo real, ya que cualquier amplificación inespecífica también puede interferir en señal de fluorescencia detectada por el equipo. Lo anterior, debido a que el SYBR Green se une indistintamente a ADN de doble cadena.

En la Figura 14 se presenta una electroforesis en gel de agarosa al 2% que presenta productos de PCR ideales, correspondientes a su tamaño de amplificación esperado, cuyos tamaños están mencionados en la Tabla 12. En el orden descendente que aparecen los genes en la Tabla 12, en ese mismo orden aparecen de izquierda a derecha en el gel de agarosa, así podemos notar que el tamaño de amplificación corresponde al esperado.



A **B**
Figura 14. Marcador de peso molecular de carril 8 (A). Electroforesis de PCR punto final de 10 genes de interés (carriles 2-7 y 9-12) y el gen de referencia (carril 1) ARN ribosomal 16s (B).

Tabla 12. Oligos estandarizados en PCR punto final.

Gen ID	Temperatura de alineamiento	Concentración μM de oligos Forward/Reverse	Tamaño de amplicón en nucleótidos (pb)
RvDB_6066	57°C	0.188/0.185	197
Rv3551	57°C	0.162/0.167	141
Rv0176	57°C	0.189/0.181	212
Rv0849	57°C	0.174/0.178	148
Rv1066	57°C	0.169/0.159	157
Rv0584	57°C	0.166/0.164	195
Rv3903c	57°C	0.171/0.184	138
Rv0954	57°C	0.177/0.164	187
Rv3692	57°C	0.185/0.181	102
Rv2895c	57°C	0.169/0.174	125
Rv2780	57°C	0.161/0.159	156

6.5.2 PCR en tiempo real

Los datos de C_T fueron determinados automáticamente por el software, y a partir de cada triplicado de C_T fue calculado el $C_{T\text{ medio}}$ para el posterior cálculo del $\Delta\Delta C_T$ del cual finalmente se obtienen los RQ (del inglés, relative quantitation). Los datos emitidos por el equipo de PCR tiempo real de los genes sobreexpresados son presentados en las Tablas 13 a la 17 a continuación.

Tabla 13. Cálculo de la cuantificación relativa del gen sobreexpresado Rv3551

Muestra	Gen	$C_{T\text{ medio}}$	$\Delta C_{T\text{ medio}}$	$\Delta\Delta C_T$	RQ_{min}	RQ	RQ_{max}
Control	16s	12.217	—	—	—	—	—
Control	Rv3551	28.713	16.496	0	0.917	1	1.083
Tratada	16s	9.503	—	—	—	—	—
Tratada	Rv3551	24.524	15.024	-1.472	2.193	2.78	3.367

Tabla 14. Cálculo de la cuantificación relativa del gen sobreexpresado Rv0176

Muestra	Gen	$C_{T\text{medio}}$	$\Delta C_{T\text{medio}}$	$\Delta\Delta C_T$	RQ_{min}	RQ	RQ_{max}
Control	16s	10.690	—	—	—	—	—
Control	Rv0176	25.640	14.95	0	.765	1	1.235
Tratada	16s	12.925	—	—	—	—	—
Tratada	Rv0176	26.705	13.78	-1.17	1.95	2.25	2.55

Tabla 15. Cálculo de la cuantificación relativa del gen sobreexpresado Rv0849

Muestra	Gen	$C_{T\text{medio}}$	$\Delta C_{T\text{medio}}$	$\Delta\Delta C_T$	RQ_{min}	RQ	RQ_{max}
Control	16s	11.235	—	—	—	—	—
Control	Rv0849	27.854	16.619	0	0.646	1	1.354
Tratada	16s	10.971	—	—	—	—	—
Tratada	Rv0849	26.626	15.655	-0.963	1.688	1.949	2.21

Tabla 16. Cálculo de la cuantificación relativa del gen sobreexpresado Rv1066

Muestra	Gen	$C_{T\text{medio}}$	$\Delta C_{T\text{medio}}$	$\Delta\Delta C_T$	RQ_{min}	RQ	RQ_{max}
Control	16s	12.496	—	—	—	—	—
Control	Rv0176	34.833	22.337	0	0.789	1	1.211
Tratada	16s	10.739	—	—	—	—	—
Tratada	Rv0176	30.363	19.624	-2.713	5.599	6.557	7.515

Tabla 17. Cálculo de la cuantificación relativa de los genes sobreexpresados Rv0584 y Rv3903c

Muestra	Gen	$C_{T\text{medio}}$	$\Delta C_{T\text{medio}}$	$\Delta\Delta C_T$	RQ_{min}	RQ	RQ_{max}
Control	16s	14.258	—	—	—	—	—
Control	Rv0584	33.319	19.061	0	0.851	1	1.149
Control	Rv3903c	32.791	18.532	0	0.641	1	1.359
Tratada	16s	12.858	—	—	—	—	—
Tratada	Rv0584	27.819	14.961	-3.574	11.318	11.89	12.462
Tratada	Rv3903c	27.704	14.846	-4.215	14.359	18.58	22.801

La Figura 15 muestra la comparación de los niveles de expresión de los genes sobreexpresados entre las muestras tratada y control.

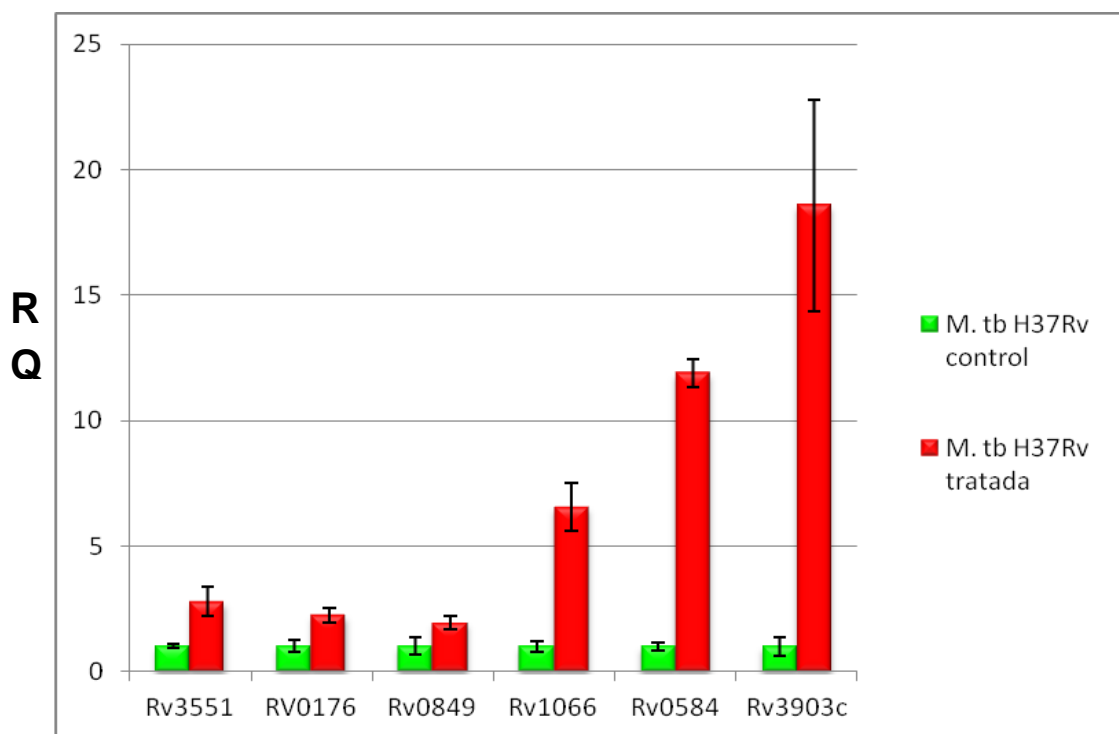


Figura 15. Comparación de la cuantificación relativa de los genes sobreexpresados entre muestras tratada y control

Los genes que presentaron inhibición en el microarreglo fueron también validados por PCR en tiempo real, logrando la cuantificación relativa y siendo esta expresada en las Tablas 18 a la 20.

Tabla 18. Cálculo de la cuantificación relativa de los genes inhibidos Rv0954 y Rv3692

Muestra	Gen	$C_{T\text{medio}}$	$\Delta C_{T\text{medio}}$	$\Delta\Delta C_T$	RQ_{min}	RQ	RQ_{max}
Tratada	16s	9.045	_____	_____	_____	_____	_____
Tratada	Rv0954	25.929	16.884	0	0.785	1	1.215
Tratada	Rv3692	22.951	13.906	0	0.933	1	1.067
Control	16s	11.569	_____	_____	_____	_____	_____
Control	Rv0954	26.623	15.054	-1.83	2.38	3.556	4.732
Control	Rv3692	24.333	12.764	-1.142	1.478	2.207	2.936

Tabla 19. Cálculo de la cuantificación relativa del gen inhibido Rv2895c

Muestra	Gen	$C_{T\text{medio}}$	$\Delta C_{T\text{medio}}$	$\Delta\Delta C_T$	RQ_{min}	RQ	RQ_{max}
Tratada	16s	10.069	_____	_____	_____	_____	_____
Tratada	Rv2895c	22.497	12.428	0	0.729	1	1.271
Control	16s	11.896	_____	_____	_____	_____	_____
Control	Rv2895c	22.869	15.054	-1.45	2.561	2.741	2.921

Tabla 20. Cálculo de la cuantificación relativa del gen inhibido Rv2780

Muestra	Gen	$C_{T\text{medio}}$	$\Delta C_{T\text{medio}}$	$\Delta\Delta C_T$	RQ_{min}	RQ	RQ_{max} x
Tratada	16s	10.917	_____	_____	_____	_____	_____
Tratada	Rv2780	22.989	12.073	0	0.83	1	1.117
Control	16s	12.706	_____	_____	_____	_____	_____
Control	Rv2780	23.925	11.219	-0.854	1.654	1.95	2.246

En la Figura 16 son comparados gráficamente los niveles de expresión de los genes inhibidos entre ambas muestras.

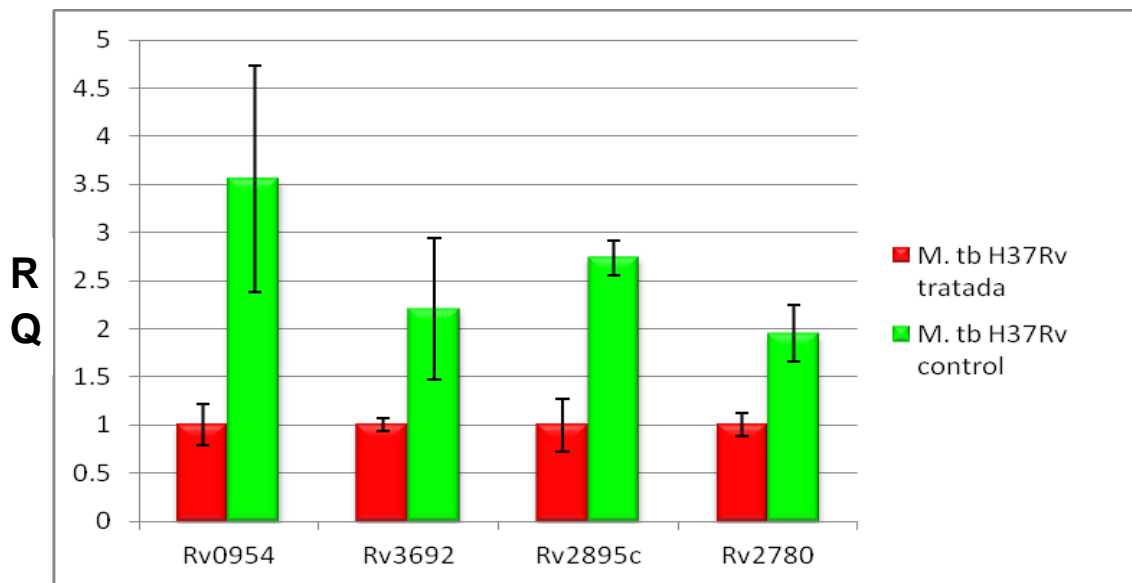


Figura 16. Comparación de la cuantificación relativa de los genes inhibidos entre muestras tratada y control

Al comparar los resultados del microarreglo con los del análisis de PCR en tiempo real, observamos que en general, los genes analizados mostraron un grado similar de expresión en ambas técnicas, excepto para tres genes (Rv1066, Rv0584 y Rv3903c) que presentaron un alto valor de cuantificación en PCR en tiempo real en comparación al microarreglo, lo cual puede ser reflejo de la alta sensibilidad y el amplio rango dinámico del análisis de PCR en tiempo real.⁸⁶ En la Tabla 21 se comparan las expresiones cuantificadas por microarreglo contra las expresiones cuantificadas por PCR en tiempo real

Tabla 21. Comparación entre cuantificación relativa de la expresión génica por microarreglo y por PCR en tiempo real

Gen ID	(Zscore) Microarreglo	(RQ) PCR en tiempo real
Rv3551	2.473	2.78
Rv3903c	3.549	18.58
Rv0584	2.824	11.89
Rv0849	3.461	1.949
Rv0176	2.967	2.25
Rv1066	2.979	6.557
Rv2780	-3.285	-1.95
Rv2895c	-4.931	-2.74
Rv0954	-3.311	-2.207
Rv3692	-4.234	-3.556

CAPÍTULO VII

7. CONCLUSIONES

La concentración y el tiempo necesarios para causar una alteración en la expresión génica de *M. tuberculosis* H37Rv fue 50 µg/mL y una hora de exposición con el AmDG

La lectura y cuantificación del microarreglo resultó en 89 genes sobreexpresados y 17 genes inhibidos con un Zscore de +/-1.5.

El análisis bioinformático de la expresión génica de *M. tuberculosis* frente al AmDG indicó una alta expresión de genes que codifican proteínas de la membrana, correspondientes a la categoría funcional de “La pared celular y procesos celulares”

Se propone que el AmDG actúa sobre las vías metabólicas de degradación de geraniol y degradación del 2-metilnaftaleno, teniendo como posible blanco terapéutico la CoA transferasa.

La CoA transferasa es un blanco terapéutico diferente a los reportados para los fármacos antituberculosos que se emplean actualmente de lo cual nace un blanco terapéutico novedoso para desarrollar nuevos fármacos antituberculosos.

Los resultados del microarreglo se validaron por PCR en tiempo real, ya que los genes seleccionados de *M. tuberculosis* H37Rv que presentaron sobreexpresión o inhibición en el análisis del microarreglo, lo hicieron del mismo modo en el ensayo de PCR en tiempo real.

CAPÍTULO VIII.

8. PERSPECTIVAS

Realizar el docking del lignano con la proteína CoA transferasa para conocer si pudieran presentarse interacciones entre ellos y, así junto con la PCR en tiempo real le otorguen mayor sustento a los resultados del microarreglo, de esta manera se pudiera conocer si el lignano actúa de manera directa o indirecta sobre la CoA transferasa

Mediante una microscopia electrónica de barrido sobre *M. tuberculosis* H37Rv tratada con el AmDG a las mismas condiciones usadas en el análisis del microarreglo, pudiéramos observar si el daño realmente se está presentando sobre la membrana celular, tal como se ha propuesto.

Realizar modificaciones en la estructura del lignano daría la posibilidad de obtener una o varias moléculas con mayor actividad antituberculosa en comparación a la actual.

CAPITULO IX

9. REFERENCIAS

- (1) http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf revisada el 05/Abril/2013
- (2) Russell, D., Barry, C., Flynn, J. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. *Science*. 328: 852-856. (2010)
- (3) Harrison. *Medicina interna*. Vol.1: 1006-1020 (2008)
- (4) http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf revisada el 05/Abril/2013
- (5) <http://egamor.blogspot.mx/2010/06/pared-celular-mycobacterium.html> Revisada 25/Junio/2013
- (6) http://www.cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/casos_total.pdf revisada 05/Abril/2013
- (7) http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/anatomiapatologica/imagenes_ap/patologia273-280.html Revisada el 25/jun/2013
- (8) Pere Coll. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*: 21(6):299-308. (2003)
- (9) Camacho, M.; Ramírez, M.; González, O.; Garza, E.; De Paz, I.; Luna, J. Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytoteraphy Research*. 22: 82-85. (2008)

- (10) Kathryn E.; Loughheed, D.; Taylor, S.; Osborne, J.; Bryans, R.; Buxton R. New antituberculosis agents amongst known drugs. Europe PMC Funders Group. 89 (5): 364-370 (2009)
- (11) Pyrazinamide. Tuberculosis. 88 (2): 141-144. (2008)
- (12) Streptomycin. Tuberculosis. 88 (2): 162-163. (2008)
- (13) Dover, L.; Coxon, G. Current Status and Research Strategies in Tuberculosis Drug Development. Journal of medicinal Chemistry. 54: 6157-6165. (2011)
- (14) Provedi, R.; Palu, G.; Manganelli, R. Use of DNA Microarrays to Study Global Patterns of Gene Expression. (2008)
- (15) Burman, W.; Gillicano, K.; Peloquin, C. Therapeutic Implications of Drug Interactions in the Treatment of Human Immunodeficiency Virus–Related Tuberculosis. Clinical Infectious Diseases (28): 419-430. (1999)
- (16) Salinas, C.; Camacho M.; Bernes S. Waksman N. 2, 2'-Dimethoxy-4,4'-[rel-(2R, 3S)-2,3-dimethylbutane-1,4-diyl] diphenol. Acta Crystallography. E 65(6), o1279. (2009)
- (17) Favela, j.; García, A.; Garza, E.; Rivas, V.; Camacho R. Antibacterial and Anti-tuberculosis Lignans and Flavonoids from *Larrea tridentata*. Phytotherapy Research (2012)
- (18) <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2006/np23/en/index.html>. 10/06/2012
- (19) Chen, J.; Chou, E.; Peng, C.; Chen, I.; Yang, S.; Huang, H. Novel epoxyfuranoid lignans and antitubercular constituents from the leaves of *Beilschmiedia tsangii*. Planta Med. 73: 567-571. (2007)

- (20) Cheng, W.; Zhu, C.; Xu, W.; Fan, X.; Yang, Y.; Li, Y.; Chen, X.; Wang, W.; Shi, J. Chemical Constituents of the Bark of *Machilus wangchiana* and their Biological Activities. *J. nat. prod.* 12(Suppl 72): 2145-2152. (2009)
- (21) Kim, Y.; Yoo, S.; Yeon, G.; Hong, G.; Min, Y.; Kim, S.; Lee, B.; Choi, Y.; Choi, J. Composition containing extract or active compounds separated from *Myristica fragrans* extract for preventing or treating osteoporosis. Repub Korea. 22pp. (2008)
- (22) Cho, J.; Choi, G.; Son, S.; Jang, K.; Lim, H.; Lee, S.; Sung, N.; Cho, K.; Kim, J. Isolation and antifungal activity of lignans from *Myristica fragrans* against various plant pathogenic fungi. *Pest Management Science.* 63(9): 935-940. (2007)
- (23) Lee, Y.; Seo, C.; Lee, C.; Lee, K.; Kang, S.; Jahng, Y.; Chang, H.; Son, J. Inhibition of DNA topoisomerases I and II and cytotoxicity by lignans from *Saururus chinensis*. *Archives of Pharmaceutical Research.* 10(32), 1409-1415. (2009)
- (24) Li, X.; Pu, J.; Du, X.; Yang, L.; An, H.; Lei, C.; He, F.; Luo, X.; Zheng, Y.; Lu, Y.; Xiao, W.; Sun, H. Lignans with anti-HIV activity from *Schisandra propinqua* var. *sinensis*. *J. nat. prod.* 72(6): 1133-1141. (2009)
- (25) Moon, H.; Jung, J. Effect of meso- dihydroguaiaretic acid from *Machilus thunbergii* Sieb et Zucc on MMP-1 expression in heat shock-induced cultured primary human fibroblasts. [Retraction of document cited in CA146:414996]. *Phytotherapy Research.* 21(6): 599. (2007)
- (26) Ma, C.; Kim, S.; Kim, J.; Kim, Y. meso-dihydroguaiaretic acid and licarin A of *Machilus thunbergii* protect against glutamate-induced toxicity in primary cultures of rat cortical cells. *British Journal of Pharmacology.* 146(5): 752-759. (2005)
- (27) Chen, Y.; Song, X.; Hai, L.; Lv, Y.; Fang, A.; Halaweish, F.; Liao, X. Compounds with DNA cleaving activity from *Kadsura ananosma*. *Rep. China Pharmazie.* 81(10): 891-892. (2006)

- (28) Ma, C.; Lee, M.; Kim, Y. Meso-dihydroguaiaretic acid attenuates the neurotoxic effect of staurosporine in primary rat cortical cultures. *Neuropharmacology*. 50 (6): 733-740 (2006)
- (29) Chen, Y.; Qin, G.; Xie, Y.; Cheng, K.; Lin, Z.; Sun, H.; Kang, Y.; Han, B. Lignans from *Kadsura angustifolia*. *Journal Asian Natural Products Research*. 1(2): 125-131. (1998)
- (30) Wu, T.; Leu, Y.; Chan, Y.; Yu, S.; Teng, C.; Su, J. Lignans and an aromatic acid from *Cinnamomum philippinense*. *Phytochemistry*. 36(3): 785-788. (1994)
- (31) Torres, R.; Modak, B.; Urzua, A.; Villarroel, L.; Palacios, Y. Guayacasin, a new lignan from *Porlieria chilensis* Johnst.: structure determination and antimicrobial activity. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 40 (5): 1191-1195. (1992)
- (32) Filleur, F.; Le Bail, J.; Duroux, J.; Simon, A.; Chulia, A. Antiproliferative, anti-aromatase, anti-17 β -HSD and antioxidant activities of lignans isolated from *Myristica argentea*. *Planta medica*. 67(8): 700-704. (2001)
- (33) Abrantes, M.; Mil T.; Duarte, N.; Lopes, D.; Cravo, P.; Madureira, M.; Ferreira, M. Antiplasmodial activity of lignans and extracts from *Pycnanthus angolensis*. *Planta medica*. 74(11): 14018-1412. (2008)
- (34) León, R.; Meckes, M.; Said, S.; Molina, G. Atimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 105(1): 45-51. (2010)
- (35) Huang, H.; Lin, Y.; Fazary, A.; Lo, I.; Liaw, C.; Huang, Y.; Liou, S.; Shen, Y. New and bioactive lignans from the fruits of *Schisandra sphenanthera*. *Food chemistry* 128(2): 348-357. (2011)
- (36) Xue, Y.; Zhang Y.; Yang, J.; Du, X.; Pu, J.; Zhao, W.; Li, X.; Xiao, W.; Sun, H. Nortriterpenoids and Lignans from the Fruit of *Schisandra chinensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 58(12): 1606-1611. (2010)

- (37) Dong S.; Shang M.; Wang, X.; Zhang, S.; Li, C.; Cai, S. Chemical constituents isolated from *Saruma henryi*. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences. 18 (2): 146-150 (2009)
- (38) Lei, C.; Huang, S.; Chen, J.; Pu, J.; Yang, L.; Zhao, Y.; Liu, J.; Gao, X.; Xiao, W. Sun, H. Lignans from *Schisandra propinqua* var. *propinqua*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 55(8): 1281-1283 (2007)
- (39) Sadhu, S.; Okuyama, E.; Fujimoto, H.; Ishibashi, M. Separation of *Leucas aspera*, a medicinal plant of Bangladesh, guided by prostaglandin inhibitory and antioxidant activities. Chem. Pharm. Bull. 51(5): 595-598. (2003)
- (40) You, Z.; Liao, M.; Shi, Y.; Chen, Y. Studies on chemical constituents of *Kadsura Longepedunculata*. Yao Xue Xue Bao Journal. 32(6): 455-7 (1997)
- (41) Davis, R.; Barnes, E.; Longden, J.; Avery, V.; Healy, P. Isolation, structure elucidation and cytotoxic evaluation of endiandrin B from the Australian rainforest plant *Endiandra anthropophagorum*. Bioorganical Medicinal Chemistry. 17(3): 1387-1392 (2009)
- (42) Peng, Z.; Xu, L.; Ye, W.; Xiao, P.; Chen, H. Effective components against HIV-1 replicative enzymes isolated from plants. Yaoxue Xuebao. 45(2): 235-240: (2010)
- (43) Nakatani, N.; Ikeda, K.; Kikuzaki, H.; Kido, M.; Yamaguchi, Y. Diaryldimethylbutane lignans from *Myristica argentea* and their antimicrobial action against *Streptococcus mutans*. Elsevier. 27(10): 3127-3129. (1988)
- (44) Miyazawa, M.; Okuno, Y.; Oshiro, K.; Kasahara, H.; Shimamura, H.; Nakamura, S.; Kameoka, H. Suppression of the SOS-inducing activity of Trp-P-1 and aflatoxin B1 by meso- dihydroguaiaretic acid from *Machilus thunbergii* in the *Salmonella typhimurium* TA1535 / pSK1002 umu test. Society for Bioscience, biotechnology and biochemistry 62(7): 1425-1427. (1998)

- (45) Fernandez, S.; Hurtado, L.; Hernandez, F. Fungicidal components of creosote bush (*Larrea tridentata*) resin. *Advances in pesticidal science* 315-355. (1979)
- (46) Yamauchi, S.; Masuda, T.; Sugahara, T.; Kawaguchi, Y.; Ohuchi, M.; Someya, T.; Akiyama, J.; Tominaga, S.; Yamawaki, M.; Kishida, T.; Akiyama, K.; Maruyama, M. Antioxidant activity of butane type lignans, secoisolariciresinol, dihydroguaiaretic acid, and 7,7'-oxodihydroguaiaretic acid. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*. 72(11): 2981-2986. (2008)
- (47) Yu, Y.; Kang, S.; Park, H.; Sung, S.; Lee, E.; Kim, S.; Kim, Y. Antioxidant lignans from *Machilus thunbergii* protect CCl₄-injured primary cultures of rat hepatocytes. *J. Pharmacy and Pharmacology*. 52(9): 1163-1169. (2000)
- (48) Faure, M.; Lissi, E.; Torres, R.; Videla, L. Antioxidant activities of lignans and flavonoids. *Elsevier*. 29(12): 3773-3775. (1990)
- (49) Lee, J.; Choi, Y.; Yoo, M.; Choi, S.; Hong, K.; Lee, B.; Yon, G.; Kim, Y.; Kim, Y.; Ryu, S. Inhibitory effects of the seed extract of *Myristicae semen* on the proliferation of human tumor cell lines. (II). *Korean society of pharmacognosy*. 37(3): 206-211. (2006)
- (50) Park, B.; Min, B.; Kwon, O.; Oh, S.; Ahn, K.; Kim, T.; Kim, D.; Bae, K.; Lee, H. Increase of caspase-3 activity by lignans from *Machilus thunbergii* in HL-60 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 27(8): 1305-1307. (2004)
- (51) Park, S.; Lee, D.; Yang, C. Inhibition of fos-jun-DNA complex formation by dihydroguaiaretic acid and *in vitro* cytotoxic effects on cancer cells. *Elsevier Science Ireland Ltd*. 127(1,2): 23-28. (1998)
- (52) Hirano, T.; Wakasugi, A.; Oohara, Mo.; Oka, K.; Sashida, Y. Suppression of mitogen-induced proliferation of human peripheral blood lymphocytes by plant lignans. *Planta medica*. 57(4): 331-334.(1991)

- (53) Park, E.; Shin, S.; Ma, C.; Kim, Y.; Kim, S. meso-Dihydroguaiaretic acid from *Machilus thunbergii* down-regulates TGF- β 1 gene expression in activated hepatic stellate cells via inhibition of AP-1 activity. *Planta medica*. 71(5): 393-398. (2005)
- (54) Faure, M.; Lissi, E.; Torres, R.; Videla, L. Antioxidant activities of lignans and flavonoids. *Elsevier*. 29(12): 3773-3775. (1990)
- (55) Wei, W.; Jinzhi, L.; Rongxia, L.; Zhengren, X.; Min, Y.; Weixing, W.; Peng, L.; Gular, S.; Xiaoming, W.; Dean, G. Four new lignans from the stems of *Kadsura heteroclita*. *Planta Medica*. 72(3): 284-288 (2006)
- (56) Kim, J.; Kim, S.; Kim, Y.; Lee, E.; Ma, C.; Park, H.; Sung, S. Meso-dihydroguaiaretic acid derivative having activity inhibiting liver fibrosis. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo*. (2003)
- (57) Njoku, C.; Hopp, D.; Alali, F.; Asuzu, I.; McLaughlin, J. Dihydroguaiaretic acid. A bioactive component of the stem bark of *Pycnanthus angolensis*. *Planta medica*. 63(6): 580-581. (1997)
- (58) Ahn, B.; Rhee, J. Anthelmintic activity of natural products and their analogs against *Clonorchis sinensis*. *Yakhak Hoechi*. 30(5): 253-265. (1986)
- (59) Ahn, B.; Ryu, S.; Baek, B.; Rhee, J. The agent responsible for the anthelmintic activity of *Machilus thunbergii* against *Clonorchis sinensis*. *Archive der pharmazie*. 315(10): 894-895. (1982)
- (60) Lee, M.; Yang, H.; Ma, C.; Kim, Y. Stimulatory Activity of Lignans from *Machilus thunbergii* on Osteoblast Differentiation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30(4) 814-817 (2007)
- (61) Park, B.; Min, B.; Kwon, O.; Oh, S.; Ahn, K.; Kim, T.; Kim, D.; Bae, K.; Lee, H. Increase of caspase-3 activity by lignans from *Machilus thunbergii* in HL-60 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27(8): 1305-1307. (2004)

- (62) Moon, T.; Seo, C.; Haa, K.; Kim, J.; Hwang, N.; Hong, T.; Kim, J.; Kim, D.; Son, J.; Chang, H. Meso-dihydroguaiaretic acid isolated from *Saururus chinensis* inhibits cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells. *Pharmaceutical society of Korea*. 31(5): 606-610. (2008)
- (63) Myoung, L.; Kyung, K.; Daeyoung, K.; Kyung, L.; Jae, H. meso-Dihydroguaiaretic Acid Inhibits Hepatic Lipid Accumulation by Activating AMP-Activated Protein Kinase in Human HepG2 Cells. *Biological and pharmaceutical Bulletin*. 34 (10): 1628-1630 (2011)
- (64) Yang, S.; Na, M.; Jang, J.; Kim, K.; Kim, B.; Sung, N.; Oh, W.; Ahn, J. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by lignans from *Myristica fragrans*. *John Wiley & Sons Ltd*. 20(8): 680-682. (2006)
- (65) Moon, H.; Chung, J. Meso- dihydroguaiaretic acid from *Machilus thunbergii* Sieb et Zucc., and its effects on the expression of matrix metalloproteinase-2,9 cause by ultraviolet irradiated cultured human keratinocyte cells (HaCaT). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 28(11): 2176-2179. (2005)
- (66) Sato, M.; Afroze, S.; Fukui, H.; Yamasaki, T. Hemolytic and piscicidal activities of dibenzylbutane- and diaryltetrahydrofuran lignans from *Smilax roxburghiana*. *Japanese society of pharmacognosy*. 58(5): 198-203. (2004)
- (67) Li, G.; Lee, C.; Woo, M.; Lee, S.; Chang, H.; Son, J. Lignans from the bark of *Machilus thunbergii* and their DNA topoisomerases I and II inhibition and cytotoxicity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 27(7): 1147-1150. (2004)
- (68) Gu, J.; Wang, Y.; Franzblau, S.; Montenegro, G.; Yang, D.; Timmermann, B. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta medica*. 70(6): 509-514. (2004)
- (69) Chen, J.; Yang, C.; Peng, C.; Chen, I.; Miaw, C. Dihydroagarofuranoid Sesquiterpenes, a lignan derivative, a benzenoid, and antitubercular constituents from the stem of *Microtropis japonica*. *Journal of. Natural Products*. (71) 1016-1021 (2008)

- (70) Silva, L.; Martins, C.; Lucarini, R.; Sato, D.; Pavan, F. Antimycobacterial activity of natural and semisynthetic lignans. *Z. Naturforsch.* 11/12 (64): 779-784. (2009)
- (71) Coy, E.; Cuca, L.; Sefkow, M. Macrophyllin-type bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from the leaves of *Pleurothyrium cinereum*. *J. nat. prod.* 7(Suppl 72): 1245-1248. (2009)
- (72) Baquero, E.; Quiñones, W.; Ribon, W.; Caldas, M.; Sarmiento, L.; Echeverri, F. Effect of an oxadiazoline and a lignin on mycolic acid biosynthesis and ultrastructural changes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis research and treatment.* (2011)
- (73) de Souza, A.; Alderete, J.; Regazi, P.; da Silva, P.; Ferreira L.; Soares, L.; Lopes, C. Structure activity relationship, acute toxicity and cytotoxicity of antimycobacterial neolignan analogues. *Journal of pharmacy and pharmacology.* 7(63): 936-942. (2011)
- (74) Alanís, B.; Salazar, R.; Ramírez, R.; Garza, E.; Waksman, N. A new antimycobacterial furanolignan from *Leucophyllum frutescens*. *Natural Product Communications.* 7(5): 597-598 (2012)
- (75) http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00281 Revisada el 27/Junio/2013
- (76) http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00626 Revisada el 27/Junio/2013
- (77) <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR003673> revisada el 30/05/2013
- (78) J. Heider. A new family of CoA-transferases. *FEBS Letters.* 509 (3): 345-349 (2001)
- (79) Leutwein, C; Heider J. Succinyl-CoA:(R)-benzylsuccinate CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *Journal of Bacteriology.* 183 (14): 4288-4295 (2001)

(80) <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR003673/taxonomy;jsessionid=729CDEE7178AFA3B1CA953EFCBDD6433> Revisada el 27/Junio/2013

(81) Amineni U.; Pradhan D.; Marisetty H. *In silico* identification of common putative drug targets in *Leptospira interrogans*. Journal of Chemical Biology. 3(4): 165-173 (2010)

(82) http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00900 revisado 30/Mayo/2013

(83) Bard, M.; Albrecht, M.; Gupta, N.; Guyn, C.; Stillwell, W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. Lipids. 23(6): 534-538 (1988)

(84) Togashi, N.; Inoue, Y.; Hamashima, H.; Takano, A. Effects of two terpene alcohols on the antibacterial activity and the mode of action of farnesol against *Staphylococcus aureus*. Molecules. 13(12): 3069-3076. (2008)

(85) Inoue, Y.; Shiraishi, A.; Hada, T.; Hirose, K.; Hamashima, H.; Shimada, J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. Federation of European Microbiological Societies microbiology letters. 237 (2): 325-331 (2004)

(86) Junchao, L.; Xudong, T.; Na, Guo.; Kaiyu, Z.; Aizhen, G.; Xiuping, W.; Xuelin, W.; Zhenhong, G.; Lihui, L.; Fengge, S.; Mingxun, X.; Liqiang, L.; Lei, L.; Lu, Y. Genome-Wide Expression Profiling of the Response to Linezolid in *Mycobacterium tuberculosis*. Current Microbiology. 64 (6) 530-538 (2012)

APÉNDICE I

Molecular Docking of *meso*-dihydroguaiaretic acid on the Coenzyme A transferase of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

G. Rivera-Sánchez‡

‡Instituto Politécnico Nacional, IPN, Centro de Biotecnología genómica, Boulevard del Maestro s/n. Colonia Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, CP 88710, Mexico

Materials and methods

Sequence retrieving, analysis, and homology modeling

The amino acid sequences with accession numbers NP_218068 and NP_218069 were retrieved from National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein database. These sequences correspond to the alpha and beta subunits of the CoA-transferase protein of *Mycobacterium tuberculosis*, respectively. The HHPred server was used to find homologs proteins with known 3-D structures located at Protein Data Bank (PDB). The server suggests that the structures of the glutaconate coA-transferase from *Acidaminococcus fermentans* (PDB ID: 1K6D) and acetate coA-transferase from *Escherichia coli* (PDB ID: 1POI) were the best templates for the homology modeling protocol. The 3D model of the coA-transferase of *Mycobacterium tuberculosis* (CoAt-Mt) was built based on templates with the MODELLER 9v11 program (Sali and Blundell, 1993). The quality of homology model was verified employing the ANOLEA program (Melo and Feytmans, 1998).

Molecular docking

The 3D structure of the *meso*-dihydroguaiaretic acid (MDA) was retrieved from PubChem database (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). The hydrogens and

charges on receptor and ligand were assigned with the Chimera program (Pettersen et al., 2004). The pdbqt files for docking simulations were generated using the AutoDock Tools interface (Sanner, 1999).

The docking of MDA molecule on CoAt-Mt model was performed with Autodock 4.2 program (Morris et al., 2009). In order to identify potential binding sites of MDA on CoAt-Mt, a blind docking procedure was performed.

Firstly, the whole surface of protein receptor was defined as search spaces. The grid size in each dimension (x, y, and z) was 126 Å, with its center at the middle of the protein. The other default optimization parameters were maintained for docking simulation, except for the number of GA runs, population size and maximum number of evaluations, which were set to 100, 250 and 25,000,000, respectively. The predicted binding site for the MDA was used for a second round of docking simulations with smaller search spaces (grids) around of predicted binding site. These grid sizes in each dimension (x, y, and z) were 60 Å, grid points separated by 0.375 Å, with its center in 33, 4, and -14 for x, y and z, respectively. The analysis of Autodock predicted poses was performed with the AutoDock Tools interface and Chimera program.

Results and discussion

Molecular docking studies

In order to evaluate the possible binding mode of the MDA on the CoAt-Mt we built a 3D model by using the protein structures of the glutamate coA-transferase from *Acidaminococcus fermentans* (Jacob et al., 1997) and acetate coA-transferase from *Escherichia coli* as templates (Korolev et al., 2002). The best model according to ANOLEA program was used to perform a blind docking protocol to identify a potential binding site for the MDA. Several authors have used Autodock program to identify putative binding sites in proteins of interest (Hetenyi and van der Spoel, 2002, 2006). Results of the blind docking showed that the MDA molecule binds to a cavity of the CoAt-Mt that belongs to its active site. Thus, this binding site was selected for a focused and intensive docking

calculation. The best pose according to Autodock function scoring (-7.5 kcal/mol) was selected for analyzing its interactions with residues of the CoAt-Mt binding site. The results showed that MDA interacts with the residues Trp25, Phe72, and Asp76 from alpha subunit (a), and Pro24, Thr26, Asn27, Met91, Gly92, Ile104, Phe118, Val120 and Arg121 from beta subunit (b), respectively. For example, the interactions of Asp76a and Asn27b residues with the MDA molecule are mediated by hydrogen bonds, while the other ones by van der Waals contacts (Figure).

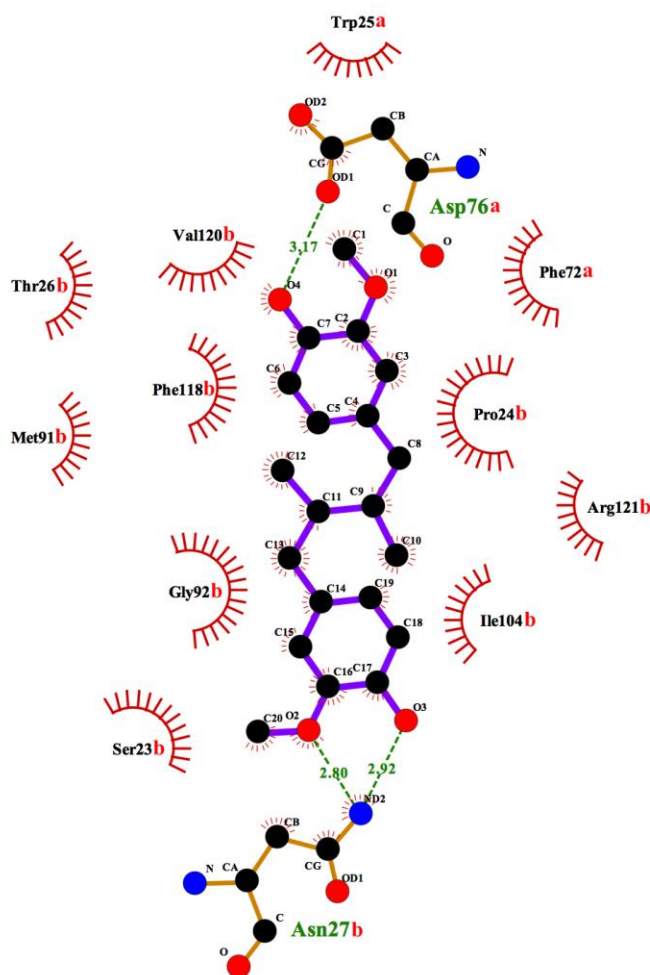


Figure. Predicted interactions of the MDA molecule on the CoAt-Mt binding site by docking studies. The green lines represent hydrogen bond and its distance and the residues with red lines means interactions by Van der Waals contacts.

Structural studies have suggested that residues in equivalent positions of Trp25a, Phe72a, and Asp76a are involved in the substrate binding (Jacob et al., 1997; Korolev et al., 2002). Thus, the results docking analysis suggest that the action mechanism of MDA might be blocking the interaction of CoAt-Mt with its substrate.

References:

Jacob U, Mack M, Clausen T, Huber R, Buckel W, Messerschmidt A. 1997. Glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*: the crystal structure reveals homology with other CoA-transferases. *Structure*. 5(3):415-26.

Korolev S, Koroleva O, Petterson K, Gu M, Collart F, Dementieva I, Joachimiak A. 2002. Autotracing of *Escherichia coli* acetate CoA-transferase alpha-subunit structure using 3.4 Å MAD and 1.9 Å native data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 58(Pt 12):2116-21.

APÉNDICE II

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Candidato para el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: “Aportaciones al mecanismo de acción del ácido *meso*-dihidroguaiarético sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv”

Campo de estudio: Biotecnología aplicada al campo de la Farmacognosia

Biografía: Datos personales: Nacido en la ciudad de Los Mochis, Ahome, Sinaloa, México, el 25 de Julio de 1986. Hijo de Daniel Clemente y Margarita Soto Soto.

Educación: QFB por la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de La Universidad Autónoma de Sinaloa. Obtención de Título y cédula profesional mediante la realización del diplomado en “inmunoparasitología molecular” realizado en el periodo comprendido entre septiembre/diciembre 2009.

Practicante laboratorios DIBA, en departamento de Desarrollo de formulaciones durante el periodo de Febrero-Agosto 2009.

Experiencia profesional: Reactivos y Equipos S. A. de C. V. Isla de Guadalupe 1567, colonia las Quintas, Culiacán, Sinaloa, desempeñando la función de Ejecutivo de ventas. Noviembre 2010- Abril 2011.