
**ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS EN GENES QUE CODIFICAN
BOMBAS DE EXPULSIÓN TIPO ABC Y SU NIVEL DE EXPRESIÓN CON LA
RESISTENCIA A LEVOFLOXACINA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
Mycobacterium tuberculosis MDR Y XDR. MEDELLÍN, COLOMBIA. 2017-2018**

JENNY SANTIAGO CUESTA B.Sc

**UNIVERSIDAD CES
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN MEDICINA TROPICAL
MEDELLÍN
2019**

**ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS EN GENES QUE CODIFICAN
BOMBAS DE EXPULSIÓN TIPO ABC Y SU NIVEL DE EXPRESIÓN CON LA
RESISTENCIA A LEVOFLOXACINA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
Mycobacterium tuberculosis MDR Y XDR. MEDELLÍN, COLOMBIA. 2017-2018**

JENNY SANTIAGO CUESTA B.Sc

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Medicina Tropical, CES

**UNIVERSIDAD CES
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN MEDICINA TROPICAL
MEDELLÍN
2019**

ASESOR CIENTÍFICO

Nataly Álvarez Zuluaga

Bacterióloga, PhD (c) en Ciencias Médicas área Microbiología.

Investigadora

Unidad de Bacteriología y Micobacterias

Corporación para investigaciones Biológicas-CIB

ASESOR METODOLÓGICO

Dra. Berta Nelly Restrepo Jaramillo

Médica, PhD en Epidemiología

Docente de investigación

Facultad de Medicina

Universidad CES

Medellín – Colombia

COMITÉ ASESOR DE TRABAJO DE GRADO

Dr. Jaime Robledo Restrepo. Médico, PhD
Docente Titular Interno
Escuela de Ciencias de la Salud
Universidad Pontificia Bolivariana

Jefe

Unidad de Bacteriología y Micobacterias
Corporación para Investigaciones Biológicas - CIB

Teresa Realpe Quintero, MSc

Docente Titular Interno

Escuela de Ciencias de la Salud

Universidad Pontificia Bolivariana

Investigadora

Unidad de Bacteriología y Micobacterias
Corporación para Investigaciones Biológicas - CIB

Juan David Puerta, MSc

Microbiólogo, PhD (c) en Ciencias Médicas área Microbiología.

Investigador

Unidad de Micología Médica y Experimental
Corporación para investigaciones Biológicas-CIB

INSTITUCIONES PARTICIPANTES

Corporación Para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín - Colombia
Unidad de Bacteriología y Micobacterias

Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín -Colombia

Universidad CES, Medellín - Colombia

Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco
José de Caldas” COLCIENCIAS, Bogotá - Colombia
Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de la Salud.
Código: 221371250788

Yo declaro que esta tesis, ni variaciones de la misma han sido presentadas para obtener un título en esta universidad ni en otra.

CONTENIDO

Contenido

INSTITUCIONES PARTICIPANTES	5
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABLAS	12
ABREVIACIONES	13
GLOSARIO	15
RESUMEN	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 Mecanismo de resistencia de MTB	20
1.2 Otros mecanismos de resistencia en MTB.....	25
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
1.4 JUSTIFICACIÓN.....	35
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	38
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo general.....	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. METODOLOGÍA	40
4.1 Selección de la muestra.....	40
4.2 Pruebas de susceptibilidad	41
4.3 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	42
4.4 Identificación de bombas de expulsión tipo ABC relacionadas con la resistencia a medicamentos anti-TB y sus genes reguladores.....	43

4.5 Extracción de ADN genómico de aislamientos clínicos de MTB-MDR y MTB-XDR	44
4.6 Secuenciación y análisis de secuencias	45
4.7 Diseño de cebadores para la cuantificación de los niveles de expresión de genes que codifican bombas de expulsión tipo ABC	45
4.8 Exposición de aislamientos clínicos de MTB- MDR y MTB-XDR a LVX...	46
4.9 Extracción de ARN de aislamientos clínicos de MTB-MDR y MTB-XDR..	46
4.10 Cuantificación de los niveles de expresión de genes que codifican bombas de expulsión tipo ABC usando PCR en Tiempo Real	47
5. RESULTADOS.....	50
5.2 Identificación de genes que codifican para bombas de expulsión tipo ABC y sus genes reguladores.....	51
5.3 Secuenciación y análisis de polimorfismos en genes blanco <i>gyrA-gyrB</i> , en genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC y sus genes reguladores presentes en los aislamientos clínicos MTB-MDR y MTB-XDR .	52
5.4 Análisis de la expresión de 29 genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en condiciones basales y post - tratamiento con LVX.	54
6. DISCUSIÓN.....	77
6.1 Análisis de CIM y presencia de mutaciones en los genes <i>gyrA</i> y <i>gyrB</i> y en genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC.....	77
6.2 Análisis de expresión relativa de 29 genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC en aislamientos de MTB-MDR y MTB-XDR	81
6.3 Presencia de mutaciones en los 42 genes reguladores de genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC	93
7. CONCLUSIONES.....	97
8. PERSPECTIVAS	99

9. REFERENCIAS..... 100

10. ANEXOS..... 116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organización de los dominios conservados de las subunidades de ADN girasa.

Figura 2. Mecanismo de acción de ADN girasa.

Figura 3. Estructura de las bombas de expulsión tipo ABC.

Figura 4. Mecanismo de acción de los transportadores Tipo ABC.

Figura 5. Metodología utilizada para la resolución de los objetivos planteados.

Figura 6. Distribución de la CIM de 10 aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 7. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1217c* y *Rv1218c* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 8. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv2936-drrA*, *Rv2937-drrB* y *Rv2938-drrC* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 9. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1272c* y *Rv1273c* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 10. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv2686c*, *Rv2687c* y *Rv2688c* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 11. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1348* y *Rv1349* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 12. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1456c*, *Rv1457c* y *Rv1458c* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 13. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1667c* y *Rv1668c* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 14. Análisis de la expresión relativa del gen *Rv1819c-bacA* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 15. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv0194* (a) y *Rv2477* (b) de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 16. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1747* (a) y *Rv3781* (b) de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 17. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1463* (a) y *Rv1473* (b) de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 18. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1686c* (a) y *Rv1687c* (b) de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 19: Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv3000* (a), *Rv2136c* (b) y *Rv2209* (c) de *Mycobacterium tuberculosis*.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* seleccionados a conveniencia del cepario de la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la CIB.

Tabla 2. Concentraciones críticas de los medicamentos antituberculosos de primera y segunda línea.

Tabla 3. Mutaciones y expresión relativa de los principales genes codificantes en bombas de expulsión en los aislamientos TBGL-140, TBR-152 y TBR-103.

ABREVIACIONES

ABC: ATP-binding cassette

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

ATP: Adenosín trifosfato

CIM: Concentración inhibitoria mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards institute.

FQS: Fluoroquinolonas

GU: Unidades de crecimiento

INH: Isoniacida

LVX: Levofloxacin

MXF: Moxifloxacin

MGIT: Mycobacterial Growth Indicator Tubes

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

MTBC: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

MUT: Mutado

NBD: Nucleotide-binding domains

OADC: Ácido oleico, dextrosa, albúmina, catalasa y estearato de polioxietileno.

OFX: Ofloxacin

OMS: Organización mundial de la salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RAM: Resistencia antimicrobiana

RIF: Rifampicina

TB: Tuberculosis

TB-MDR: Tuberculosis Multifármaco-resistente

TB-XDR: Tuberculosis con resistencia extendida

TMD: Transmembrane domains.

TMs: Segmentos transmembranales

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

WT: *Wild-type*

GLOSARIO

Concentración inhibitoria mínima: concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación.

Tuberculosis Multifármaco-resistente (TB-MDR): tuberculosis que es resistente a los dos medicamentos más potentes de primera línea: isoniazida y rifampicina.

Tuberculosis con resistencia extendida (TB-XDR): tuberculosis resistente a isoniazida y rifampicina, más a cualquier fluoroquinolona y a por lo menos uno de los tres medicamentos inyectables de segunda línea (amikacina, kanamicina o capreomicina).

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Se estima que la tercera parte de la población mundial está infectada y para el año 2017 se reportó una incidencia de 10.0 millones casos. El tratamiento de la tuberculosis consiste en dos fases; una inicial que tiene una duración de dos meses con los medicamentos de primera línea isoniacida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB), seguida de una segunda fase de tratamiento continuo de cuatro meses con INH y RIF.

Diferentes estudios se han enfocado en los mecanismos de resistencia de MTB a fluoroquinolonas, en el cual, las mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*, son el principal mecanismo de resistencia, sin embargo, toda la resistencia no es explicable por este mecanismo, por lo que se ha reportado que la superfamilia ATP-binding cassette (ABC), desempeña un papel crítico en el transporte de diferentes medicamentos anti-TB. El presente estudio se enfocó en evaluar el papel de las bombas de expulsión tipo ABC en la resistencia fenotípica de MTB a FQs, específicamente levofloxacina (LVX).

Se analizaron 10 aislamientos clínicos de MTB (5 MTB-MDR y 5 MTB-XDR), y se encontró que 4/5 aislamientos MTB-XDR tenían mutación asociada con resistencia a FQs en el gen *gyrA*. Un aislamiento MTB-XDR no presentó mutaciones en *gyrA* ni en *gyrB*, pero mostró mutaciones únicas en genes codificantes para bombas de expulsión (*Rv1217c*, *Rv1458c* y *Rv1463*) y sus genes reguladores. Adicionalmente mostró un perfil de expresión de estos genes diferente al obtenido para otros aislamientos. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que mutaciones en algunos genes codificantes para bombas de expulsión podrían contribuir con el fenotipo resistente a LVX, sin embargo, se requieren más estudios que permitan aclarar el papel de estas

bombas de expulsión en la resistencia a LVX.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, bombas de expulsión tipo ABC, resistencia, fluoroquinolonas.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB). It is estimated that one third of the world's population is infected and by 2017 an incidence of 10.0 million cases and 1.3 million deaths was reported. The treatment of tuberculosis consists of two phases; the initial lasts two months with first-line isoniazid, rifampin, pyrazinamide and ethambutol, followed by a four-month continuous treatment with INH and RIF.

Different studies have focused on the mechanisms of resistance of MTB to fluoroquinolones. It is known that mutations in the genes, *gyrA* and *gyrB*, are the main mechanism of resistance, however, all the resistance is not explained by this mechanism, which is why it has been reported that the ATP-binding cassette superfamily (ABC) plays a critical role in anti-TB drugs transport. The present study focusses on evaluating the role of ABC type efflux pumps in the phenotypic MTB's resistance to fluoroquinolones, specifically levofloxacin.

We analyzed 10 clinical isolates of MTB (5 MTB-MDR and 5MTB-XDR), where it was found that 4/5 MTB-XDR isolates had mutation associated with resistance to FQs in *gyrA* gene. An MTB-XDR isolate did not present mutations neither in *gyrA* nor in *gyrB* but showed unique mutations in coding efflux pumps genes (Rv1217c, Rv1458c and Rv1463) and in their regulatory genes. Additionally, it showed an expression profile of these genes different from the obtained for other isolates.

The results obtained in this work suggest that mutations in some effluxes pumps coding genes could contribute to the LVX-resistant phenotype, however, further studies are required to clarify the role of these effluxes pumps in LVX resistance.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; ATP binding cassette transport system, resistance, fluoroquinolones.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) se trasmite mediante la inhalación de aerosoles producidos por las secreciones respiratorias de una persona enferma. El 12% de la población expuesta a MTB desarrolla la enfermedad (1).

Cuando la bacteria es inhalada y llega a los alvéolos, es capturada por macrófagos y empieza la formación del granuloma al ser reclutados más macrófagos y otras células como los linfocitos T CD4, estos inician la producción de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (2,3). El bacilo puede quedar alojado en el granuloma o ser diseminado por vía linfática o sanguínea a otros órganos, generando TB latente (2).

La presentación clínica más común es la afección pulmonar, la cual también es la forma clínica que disemina con mayor facilidad (4). Las personas cursan con cuadros respiratorios con síntomas como fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna y tos por más de dos semanas (1,2,4).

La OMS en las guías de manejo de la enfermedad, expone los diferentes métodos diagnósticos, siendo la baciloscopia y el cultivo del microorganismo la prueba de oro (5). A través del tiempo se han ido desarrollando nuevas pruebas, las cuales buscan la disminución en el tiempo de diagnóstico. El sistema comercial Xpert MTB/Rif®, es una metodología molecular donde se hace la detección del ADN de la micobacteria y la resistencia a Rifampicina (RIF) por medio de una PCR en tiempo real (4). Para el diagnóstico de la TB latente, se utilizan diferentes pruebas como la prueba cutánea de tuberculina o la cuantificación de interferón gamma (QuantiFERON-TB Gold Plus -QFT-Plus) en suero (2).

1.1 Mecanismo de resistencia de MTB

La resistencia a fármacos anti-TB se ha generado por las mutaciones espontáneas en el genoma de la micobacteria. Se realiza una selección de mutantes por la exposición a antibióticos en un periodo largo, estos mutantes son seleccionados conformando una población de bacterias resistentes y de esta forma se trasmite a un hospedero sin exposición al tratamiento anti-TB (3).

La resistencia a anti-TB puede ser clasificada de la siguiente forma:

- Resistencia natural: la cual es generada por una mutación espontánea, independiente de una exposición previa al fármaco.
- Resistencia primaria: Presencia de una cepa resistente en un paciente que no ha sido expuesto previamente a los fármacos anti-TB.
- Resistencia adquirida: Los pacientes han sido tratados previamente con antibióticos anti-TB, principalmente pacientes con mala adherencia al tratamiento (3).

Es importante conocer y entender los mecanismos asociados a la resistencia de MTB a antibióticos anti-TB, teniendo en cuenta si son de primera o segunda línea:

1.1.1 Primera línea

- ✓ Rifampicina: Su mecanismo de acción es unirse a la subunidad β de la RNA polimerasa, causando una inhibición a la elongación del mRNA. El gen que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa es *rpoB*, el cual, en cepas resistentes, sufre una mutación generando una reducción en la afinidad del blanco por el fármaco (6). Las mutaciones

se ubican en una región llamada región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR) de una longitud de 81pb. Mutaciones en los codones 516, 526 y 531 son las más asociadas con resistencia a este antibiótico (6).

- ✓ Isoniacida: Es un profármaco que requiere ser activado por la enzima KatG (peroxidasa) para realizar su función. Este fármaco inhibe la síntesis de los ácidos micólicos por la vía de NADH- dependiente de la proteína reductasa transportadora de anoil- Acil (ACP), codificada por el gen *inhA*. La resistencia a este fármaco se ha descrito por mutación en los genes *katG* (S315T) e *inhA* y en la región promotora de *inhA*. Mutaciones en el gen *inhA* no solo causa resistencia a isoniacida, sino también genera resistencia cruzada a etionamida (6). La resistencia a isoniacida y rifampicina es catalogada como resistencia múltiple (MDR).
- ✓ Etambutol: Es un fármaco bacteriostático que interfiere con la biosíntesis de arabinogalactan en la pared celular. La enzima que actúa en la síntesis de arabinogalactan es la arabinosil transferasa, codificada por el operón *embCAB*; mutaciones en estos genes, principalmente en *embB* están asociadas con la resistencia a este fármaco. Se reporta que mutaciones en la posición 306 de *embB* posiblemente genera una variabilidad de la micobacteria ante etambutol, pues diferentes cepas ya sea resistentes o sensibles pueden presentar polimorfismos (6,7).
- ✓ Pirazinamida: actúa sobre los bacilos latentes en ambientes ácidos encontrados en las lesiones pulmonares (dentro del granuloma). Este fármaco también es catalogado como una pro-fármaco, necesita ser activado a ácido pirazinoico, por la acción de la enzima pirazinamidasa/nicotinamidasa, que esta codificado por el gen *pncA*.

Al estar activada la pirazinamida, ésta inhibe el transporte de membrana. El mecanismo de resistencia está asociado con mutaciones el gen *pncA* (6).

1.1.2 Segunda línea

- ✓ Fluoroquinolonas (FQs): El mecanismo de acción de las FQs es inhibir la ADN girasa, la cual está codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*. En MTB, está presente sólo la topoisomerasa II (ADN girasa). Las FQs inhiben la ADN girasa impidiendo la transcripción de ADN, es por esto que el mecanismo de resistencia a este tipo de antibióticos es la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las subunidades A (*gyrA*) y b (*gyrB*) de esta proteína. Las mutaciones generan una alteración del blanco del antibiótico y las más frecuentes están ubicadas en las posiciones 90 y 94 en *gyrA*. También se reporta que hay una posible relación entre la resistencia a este fármaco y los mecanismos de expulsión (6–8).

1.1.2.1 ADN girasa

La ADN girasa es una enzima que tiene como función, catalizar la relajación y el enrollamiento del ADN (9) y está conformada por dos subunidades, GyrA y GyrB (10). A su vez cada subunidad está constituida por dominios; GyrA, está formada por el dominio de reunión del N-terminal (BRD) y el dominio Carboxilo-terminal (CTD). La subunidad GyrB está conformada por un dominio ATPasa seguida del dominio TOPRIM, el cual es un dominio altamente conservado con funciones catalíticas (Figura 1) (9,10). La función de la enzima implica la formación de un complejo entre los dos dominios que la componen, GyrA- GyrB, y el ADN, haciendo que la proteína esté abierta o cerrada. Al inicio del proceso, se genera una interacción entre el segmento del ADN con el dominio GyrA en el extremo N y

con el dominio TOPRIM del dominio GyrB. Con la hidrólisis del ATP se logra el cierre del dominio N-terminal de GyrB (N-gate) para continuar con la ruptura de la doble cadena del ADN (11) Figura 2.



Figura 1. Organización de los dominios conservados de las subunidades de ADN girasa.

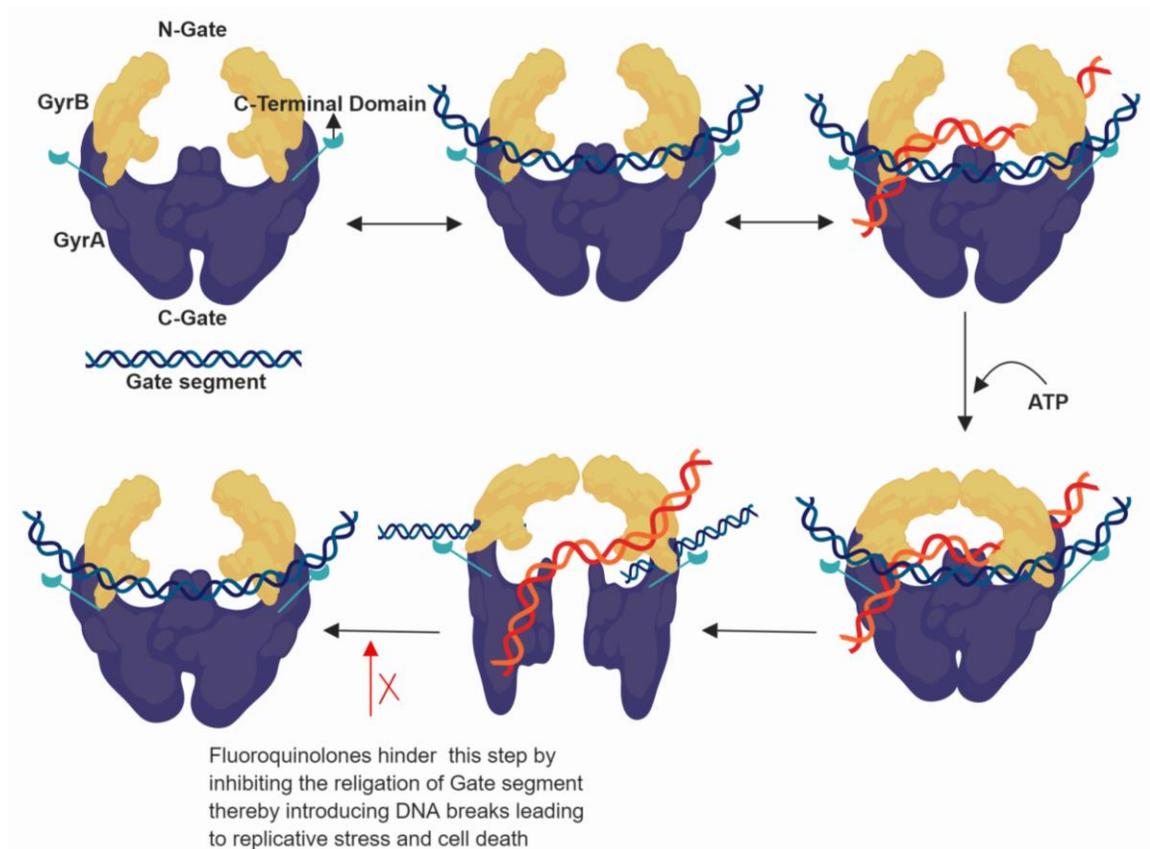


Figura 2. Mecanismo de acción de ADN girasa. El dominio N-terminal de GyrB, forma la puerta N, lugar de entrada del ADN. Formación del complejo GyrA – GyrB – ADN; Salida del ADN por el dominio C-terminal de GyrA. Imagen adaptada de

Kashyap et al. 2018 (11).

La inhibición de ésta enzima se puede realizar por medio de una Fluoroquinolona (FQ), la cual es un compuesto sintético que tiene en su estructura un anillo 4-oxo-1,4- dihidroquinolona más una molécula de Fluorina en la posición 6 (12). Esta inhibición se da por la formación de un complejo entre ADN, enzima y FQ en el sitio catalítico (dominio Toprim y BRD) dando como resultado la incapacidad de la bacteria para realizar replicación y transcripción (10,12) Figura 2.

Cuando se presenta resistencia a FQ, se ha reportado que el principal mecanismo molecular que explica este fenómeno es la presencia de mutaciones en los genes que codifican para la ADN girasa, *gyrA* y *gyrB* (9,10,13). Estas mutaciones están presentes en la Región determinada de resistencia a quinolonas de *gyrA* o *gyrB* (QRDR), en el cual las principales sustituciones son: en gen *gyrA* A90V, D94N/Y; y para el gen *gyrB* N538D y E540V (10).

- ✓ Kanamicina, Amikacina y Capreomicina (Aminoglicósidos): Son fármacos de segunda línea en el que Kanamicina y Amikacina son Aminoglicósidos y Capreomicina es un péptido cíclico. Estos fármacos inhiben la síntesis de proteínas. Amikacina y Kanamicina inhiben la síntesis de proteínas al alterar la subunidad 16S ribosomal, y el mecanismo de resistencia está dado por mutaciones en la posición 1400 y 1401 del gen *rrs*. Capreomicina se une en la interfaz de la subunidad pequeña y grande. Se conoce que hay una resistencia cruzada de Capreomicina y viomicina (antibiótico de la familia tuberactinomicina) (14), en donde se cree que mutaciones en el gen *tlyA* son las responsables. Las cepas que presentan resistencia a INH, RIF, a alguna FQ y a un medicamento inyectable, es catalogada con

resistencia extendida (XDR) (6,7).

1.2 Otros mecanismos de resistencia en MTB

1.2.1 Bombas de expulsión tipo ABC

Las bombas de expulsión son proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana citoplasmática de las células en general, y actúan como transportadores activos (requieren una fuente de energía para funcionamiento) para la eliminación de compuestos tóxicos incluyendo antibióticos de importancia clínica (15). Este sistema de expulsión, ayudan a que las concentraciones de antibióticos intracelular no sean altas, ayudando posiblemente a la resistencia antimicrobiana.

Se conocen varios estudios en los que los sistemas de expulsión pueden estar involucrados en la resistencia antimicrobiana en bacterias, pues se evidenció que las bombas de expulsión constituyen el 6-18% de los transportadores presentes en la membrana citoplasmática (16).

Tal como se mencionó anteriormente, un posible mecanismo de resistencia para las FQs es la presencia de los sistemas de expulsión; la primera evidencia indirecta de este mecanismo en micobacterias, surgió con los primeros reportes de aislamientos de MTB resistentes a FQs (17).

Estas proteínas pueden contribuir al desarrollo de fenotipos resistentes por dos mecanismos posibles: (i) Aumento de la expresión de genes que codifican las bombas de expulsión, por exposición a medicamentos y/o mutaciones en el promotor. La exposición a medicamentos se ha documentado como una posible causa del aumento de la expresión de estos genes, ya que se ha realizado ensayos en que se cultiva un aislamiento clínico MTB-MDR en presencia de concentraciones sub-inhedorias de RIF y OFX, y se observa un

aumento en la transcripción del gen *Rv1258c*, el cual codifica la bomba de expulsión Tap, que interviene en la resistencia a medicamentos anti-TB independientemente de la presencia de mutaciones en los genes blanco de FQs (18).

El otro mecanismo hace referencia a los (ii) polimorfismos en genes que codifican bombas de expulsión, y ha reportado que estas mutaciones pueden aumentar la expresión de éstos genes (19). Las bombas de expulsión tipo ABC están constituidas por dos transmembrane domains hidrofóbicos (TMDs) embebidos en la bicapa de la membrana, que corresponden al sitio de unión y la vía de translocación del sustrato, y dos nucleotide-binding domains (NBDs) hidrofílicos citoplasmáticos, los cuales son los motores de los transportadores ABC dado por la unión de ATP, lo cual genera la translocación del sustrato (20). Diferentes reportes indican que si las mutaciones ocurren en el dominio TMDs se observa una pérdida de la afinidad de la bomba de expulsión por el antibiótico, lo contrario a si se presenta cambios de aminoácidos en el dominio NBDs en el cual, se ha visto que se genera un daño en la función de la ATPasa (21).

Es por esto por lo que un aumento en la actividad de las bombas de expulsión y/o polimorfismos en genes que codifican bombas de expulsión que alteren el mecanismo de transporte de los medicamentos, pueden llevar a la disminución de la concentración intracelular del fármaco, para así generar una disminución en su actividad.

Desde la década de 1990, la incidencia de aislamientos de MTB resistentes a FQs ha ido aumentando poco a poco, primero con ciprofloxacina y OFX y actualmente con MFX y LVX (22). En un estudio realizado en la ciudad de Medellín (Colombia), encontraron que de 104 aislamientos MTB-MDR evaluados, 10 presentaron resistencia a FQs, indicando una tasa de resistencia

del 9.6%, 6 (5.8%) fueron XDR (13).

1.2.2 Estructura de las bombas de expulsión tipo ABC

Los transportadores tipo ABC, consisten en dos dominios hidrofóbicos alojados en la membrana celular (TMDs), que permiten la translocación del sustrato asociados (secuencias variables) con dos nucleotide-binding domains (NBDs), el cual es altamente conservado (23).

- La función del dominio NBD, es unir el ATP y realizar el proceso de hidrólisis para permitir el transporte de gran variedad de sustratos. Este dominio se divide a su vez en dos dominios constitutivos: un dominio catalítico (ATPasas) y un dominio estructural llamado α -helicoidal. El dominio catalítico a su vez contiene los motivos Walker A (P-loop), Walker B, los cuales forman el sitio de unión de nucleótidos; un Q-loop y un motivo H (20) que son secuencias altamente conservadas que cumplen una función en el ciclo catalítico de unión e hidrólisis de ATP. El dominio estructural α -hélice, está conformado por tres o cuatro hélices y por el motivo de la firma ABC, el cual es la marca de la familia de proteínas transportadoras ABC (ISGGQ) (24). Los dos dominios (dominio catalítico y α -helicoidal) están unidos por el Q-loop, y cambian su conformación al unirse dos moléculas de ATP, contribuyendo a la formación del sitio catalítico (20). (Figura 3).

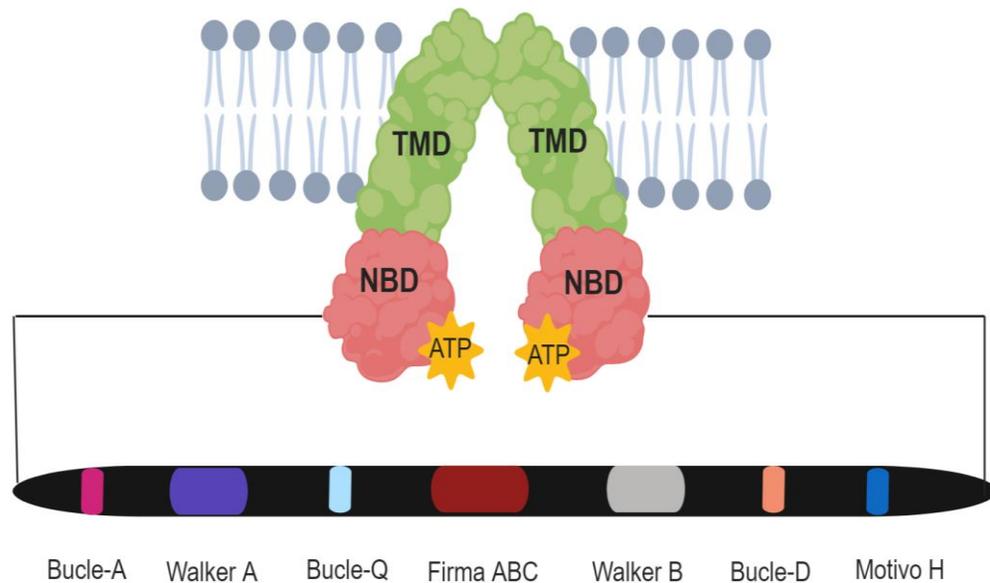


Figura 3. Estructura de las bombas de expulsión tipo ABC. Adaptado de *Rees et al. 2009* (20)

- El dominio TMD contiene un total de 12 hélices (6 por dominio) que forman un canal, y su secuencia es variable, lo cual le confiere la capacidad de afinidad a varios sustratos y así realizar la translocación de ellos (20,23). Por la forma de organización de las hélices, se dice que están ordenadas de forma de alas, creando un canal por el cual posiblemente se encuentra el sitio de unión al sustrato.

El mecanismo de acción de estas bombas de expulsión es dependiente de ATP, que, al unirse a los NBDs, generan un cambio conformacional en las hélices TM permitiendo que el sitio de unión tenga un aumento en su afinidad por el sustrato. En detalle, cuando los NBDs no está unido a dos moléculas de ATP (conformación abierta), los TMDs tienen una afinidad alta por el sustrato, ya que se encuentran abiertos en la cara interna de la célula y es allí cuando el sustrato se une y genera un cambio conformacional del gran dominio NBDs aumentando así la afinidad por

el ATP. Al unirse las dos moléculas de ATP, los dominios quedan enfrentados y asociados de forma cerrada. Esta conformación cerrada genera que los dominios TMDs cambien a un estado abierto hacia la cara extracelular de la membrana, generando que el sitio de unión al sustrato pierda afinidad y sea liberado en el espacio extracelular. Para restaurar el transportador a su condición inicial, se requiere la hidrólisis del ATP, ayudado por la repulsión electrostática causada por la presencia del ADP, lo cual es dirigido por el motivo Walker A de un NBD y el Pi coordinado por el motivo ABC del otro NBD. Como resultado, finalmente se genera una rotación de los subdominios de cada uno de los NBD, liberando así el ADP y Pi (20,23–25) Figura 4.

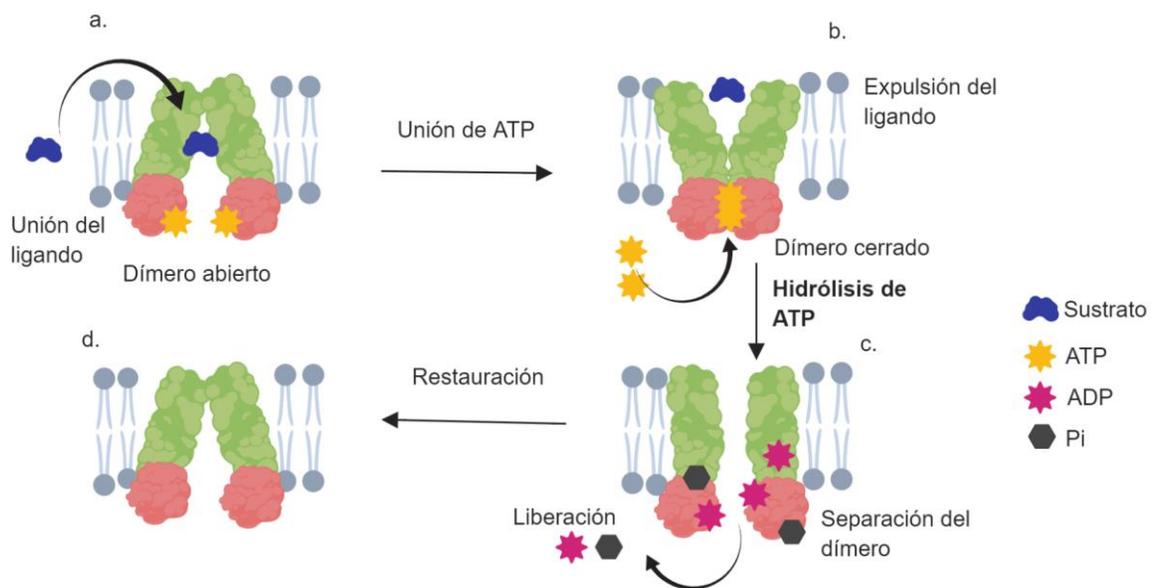


Figura 4. Mecanismo de acción de los transportadores Tipo ABC.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Las especies más frecuentes que infectan a los humanos son MTB y *M. bovis* (26). La presentación clínica más común es la forma pulmonar, pero puede afectar otros órganos, generando tuberculosis extrapulmonar (5).

El tratamiento de TB en Colombia causada por aislamientos fármaco-susceptibles, se basa en un régimen introducido por la OMS en el año 1994, el cual consiste en un tratamiento acortado supervisado (DOTS/TAES). Este esquema incluye dos fases: Una fase inicial de dos meses con los medicamentos de primera línea INH, RIF, PZA y EMB, seguida de una fase de tratamiento continuo de cuatro meses con INH y RIF (5,27–29).

Se reporta que este esquema de tratamiento tiene una tasa de curación superior al 90% (30), pero debido a su complejidad, los pacientes pueden tener una adherencia baja al tratamiento, lo cual trae consecuencias como la supresión parcial del crecimiento bacteriano, favoreciendo la aparición de aislamientos resistentes a múltiples antibióticos (30,31).

Es por esto y otros factores que en los años 90 se observó la aparición de aislamientos de TB-MDR (31). Estos medicamentos son catalogados como fármacos de primera línea y los más importantes del esquema de tratamiento (5). En el 2017, a nivel mundial se reportaron 457.560 nuevos casos de TB-MDR, de los cuales se presentaron 250.000 muertes (5).

El tratamiento para los pacientes con aislamientos TB-MDR, requieren el uso

prolongado de medicamentos de segunda línea. La falta de disponibilidad de los fármacos anti-TB y la falta de adherencia de los pacientes al tratamiento ha favorecido la aparición de aislamientos MTB-XDR (5,32).

Según la OMS 117 países han reportado al menos un caso de TB-XDR. Se estima que en el año 2017 aproximadamente el 8.5% de los casos de TB-MDR desarrollaron TB-XDR y para este mismo año, el 18% de los pacientes con TB-MDR presentaron resistencia a por lo menos una FQ (5).

La incidencia de tuberculosis para Colombia, según la OMS en el año 2017, estaba en 33 casos por cada 100.000 habitantes (5). Para este mismo año, esta entidad reportó una incidencia estimada de 475.600 casos nuevos de TB-MDR a nivel global de los cuales aproximadamente el 8.5% de los casos son TB-XDR. Para Colombia se informó una incidencia de 1.2 casos por 100.000 habitantes de TB-MDR en casos nuevos y de 6-11 en casos previamente tratados (5).

En el informe “Dos años de seguimiento al control de la TB-MDR a fármacos proyecto piloto comité luz verde Antioquia”, durante el periodo comprendido entre el año 2003 a 2012 se confirmaron 278 casos como TB-MDR por el Laboratorio Departamental de Salud Pública (LDSP). En el año 2009, el LDSP confirmaba un promedio de 20 casos de TB-MDR, pero por la búsqueda activa a partir del año 2010 se están confirmando 40 casos nuevos por año(33).

La resistencia a medicamentos en *M. tuberculosis* puede ser clasificada como resistencia adquirida, cuando mutantes resistentes del bacilo son seleccionados como resultado de un tratamiento inefectivo, o como resistencia primaria, cuando un individuo es infectado con un aislamiento de MTB fármaco-resistente (34). La selección de mutantes resistentes se ha asociado con el tiempo prolongado de exposición a medicamentos, su baja actividad

metabólica y capacidad de latencia (35). MTB presenta una resistencia natural o intrínseca a varios antibacterianos, debido a las características de la pared, lo cual sugiere, que la resistencia en MTB, es un proceso multifactorial, en el cual están involucrados diferentes mecanismos, tales como la acumulación de mutaciones en los genes blanco (36), la pared celular altamente impermeable (37), enzimas modificadoras de degradación y la amplia gama de bombas de expulsión mediado por transportadores (36). Es importante resaltar que se ha reportado en diferentes estudios que la permeabilidad, las mutaciones y los varios sistemas de expulsión presente en MTB, representan los principales mecanismos de resistencia a fármacos (38).

Las FQs presentan características benéficas para ser utilizadas como parte del tratamiento para TB, ya que tiene buena distribución tisular y celular y escasos efectos adversos, es por esto, que se ha aumentado la tendencia a su utilización empírica en comunidades con una alta tasa de TB-MDR. Recientemente se están planteando estudios para incluir las FQ en el esquema de tratamiento de primera línea y disminuir la duración de éste (39,40). El uso inapropiado de antibióticos en el tratamiento de TB y el uso de FQ para el tratamiento de otras infecciones respiratorias, ha sido uno de los factores que han favorecido la aparición de aislamientos de MTB resistentes a este grupo de fármacos y es por esta razón que es importante conocer otros mecanismos implicados en la resistencia a FQs que puedan estar actuando sinérgicamente junto con las mutaciones cromosomales para generar un fenotipo resistente (15).

Las FQs tienen como blanco las topoisomerasas bacterianas II y IV (41). MTB carece de topoisomerasa IV y posee solo la topoisomerasa II o ADN girasa. Esta topoisomerasa es un tetrámero conformado por dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente. La función es catalizar la relajación y el super enrollamiento del ADN al momento

de la replicación (10). Se reporta que la resistencia a FQs en MTB se debe principalmente a mutaciones cromosomales en estos dos genes, sin embargo, se reporta que entre un 15- 58% de los aislamientos de MTB resistentes a FQs no se puede explicar por este mecanismo, sugiriendo que la resistencia a FQs en este microorganismo puede ser mediado por otros mecanismos como cambios en la permeabilidad de la membrana, la inactivación y sistemas de bombas de expulsión (10). Esta situación, lleva a la necesidad de obtener una visión más profunda sobre mecanismos de resistencia, diferente a las de mutaciones clásicas en genes blanco, relacionados con fármaco-resistencia.

Las bombas de expulsión, son consideradas como uno de los principales mecanismos de fármaco-resistencia de bajo nivel en una amplia variedad de bacterias, y se ha demostrado que juegan un papel muy importante en la resistencia de MTB a varios medicamentos (42). Esto se debe, a que dichos transportadores de membrana expulsan el antibiótico hacia el ambiente externo de la célula, previniendo el acceso a su blanco de acción y disminuyendo la concentración intracelular del antibiótico (36). Adicionalmente, se ha demostrado que su actividad mejora la tolerancia de las bacterias a los medicamentos, de tal manera, que bacterias que contienen mutaciones en otros genes como los que codifican proteínas blanco, se acumulan brindando altos niveles de fármaco-resistencia (7).

Se conoce que las micobacterias, incluyendo MTB tienen cuatro familias de bombas de expulsión (37,43,44) dentro de las cuales, la superfamilia ATP-binding cassette (ABC), juega un papel crítico en el reconocimiento y transporte de diferentes fármacos anti-TB (20,45,46). Aunque se sabe que las bombas de expulsión son proteínas de membrana fundamentales e involucradas en la defensa de la bacteria contra compuestos tóxicos, como antimicrobianos, han sido poco estudiadas (37).

Es importante mencionar que, hasta la fecha, no se han reportado estudios que

describan la relación entre las bombas de expulsión tipo ABC y la resistencia a medicamentos anti-TB (específicamente a las FQs) presentes en los aislamientos clínicos de pacientes con TB-MDR/XDR en Colombia, ni a nivel mundial. Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo “Identificar polimorfismos en los genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC y su nivel de expresión en 10 aislamientos clínicos de MTB-MDR y MTB-XDR, caracterizados para susceptibilidad genotípica y fenotípica a fluoroquinolonas, expuestos a LVX. Medellín – Colombia 2017-2018.”

1.4 JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por Micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* dentro del cual se encuentran diversas especies, pero las que afectan principalmente a los humanos son *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* (26).

Según el reporte de la OMS para el año 2017, un tercio de la población mundial está infectada con MTB y aproximadamente el 10% de esta población desarrollará la enfermedad en algún momento de su vida (5,26,29). En el año 2017 se reportaron 10.0 millones de casos nuevos de TB a nivel mundial y 1.3 millones de muertes en pacientes VIH negativos (5).

La incidencia de tuberculosis para Colombia, según la OMS en el año 2017, estaba en 33 casos por cada 100.000 habitantes (5). Para este mismo año, esta entidad reportó una incidencia estimada de 475.600 casos nuevos de TB-MDR a nivel global de los cuales aproximadamente el 8.5% de los casos son TB-XDR. Para Colombia se informó una incidencia de 1.2 casos por 100.000 habitantes de TB-MDR en casos nuevos y de 6-11 en casos previamente tratados (5).

Según un estudio realizado por el Instituto Nacional de Salud (INS), la prevalencia de TB-MDR para Colombia en el año 2005 fue de 2.38% para casos nuevos y de 31.44% para casos previamente tratados (47). Estos datos son los que se referencian en el informe de la OMS lo cual nos muestra que es necesario actualizar las cifras de resistencia en Colombia y vigilar que el porcentaje de TB-MDR no sobrepase el 3% en casos nuevos ya que este es considerado el umbral para determinar si un país tiene graves problemas de resistencia en el control de la TB (5,47).

Se ha descrito que el porcentaje de éxito en el tratamiento de la TB-MDR y TB-XDR es inferior al del tratamiento de TB susceptible. Menos del 30% de los casos de TB resistente reciben el esquema de tratamiento adecuado a nivel mundial y frecuentemente representan fracasos terapéuticos y aumento en los efectos adversos (5).

Las fluoroquinolonas son uno de los principales antibióticos en el esquema de tratamiento de la TB-MDR ya que su blanco de acción es la única topoisomerasa descrita para *Mycobacterium tuberculosis* (ADN girasa). La levofloxacin es una fluoroquinolona recomendada por la OMS para el tratamiento de TB-MDR y sobre la cual se vienen adelantando estudios para diseñar otros esquemas de tratamiento en donde al utilizar este antibiótico se pueda reducir el tiempo de terapia y mejorar la adherencia del paciente (5).

El principal mecanismo que utiliza la micobacteria para generar resistencia antibiótica son las mutaciones cromosomales. Estas mutaciones aparecen de forma espontánea alterando la secuencia de ADN de los genes que codifican para blancos terapéuticos o para enzimas activadoras de antibióticos. Las pruebas moleculares utilizadas para el diagnóstico de resistencia genotípica buscan las principales mutaciones reportadas en genes que codifican para proteínas blancos. Sin embargo, se ha descrito la aparición de aislamientos de MTB que son fenotípicamente resistentes a algunos antibióticos, pero no poseen mutaciones cromosomales que expliquen esta resistencia. En estos casos se sospecha de otros mecanismos que pueden estar actuando de manera sinérgica o individual en la generación del fenotipo resistente (19,48,49).

Las bombas de expulsión son proteínas que se encuentran situadas en la membrana celular de la micobacteria y su función es expulsar del citoplasma componentes tóxicos. Estos componentes pueden ser productos del metabolismo

celular como radicales libres, metales pesados y antibióticos. En *Mycobacterium tuberculosis* se han descrito 5 familias de bombas de expulsión siendo el tipo ABC importantes en cuando a la disminución intracelular de diferentes antibióticos debido a la diversidad de sustratos que pueden expulsar. Estas bombas de expulsión pueden trabajar de manera sinérgica junto con las mutaciones cromosomales en la generación de resistencia ya que se ha observado que pueden participar en el aumento de la CIM (48–50).

Se han realizado estudios en donde se ha evaluado la especificidad de sustrato de diferentes bombas de expulsión para mejorar la comprensión de su mecanismo de acción y su participación en la resistencia antibiótica. También se ha estudiado la inhibición de las bombas de expulsión como una alternativa para mejorar la efectividad de los medicamentos antituberculosos (51,52).

Incrementar el conocimiento actual con respecto a las bases genéticas de las bombas de expulsión, aportará a largo plazo, herramientas para el diseño racional de compuestos que puedan inhibir estas bombas y puedan ser administrados como adyuvantes en el tratamiento antituberculoso, mejorando su efectividad y acortando el tiempo de tratamiento.

El estudio de polimorfismos en los genes codificantes para bombas de expulsión en aislamientos clínicos resistentes y el análisis de sus niveles de expresión nos permite hacer una aproximación inicial a nivel genómico para plantear bases moleculares sobre la resistencia mediada por este mecanismo.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los polimorfismos y el perfil de expresión de los genes que codifican para bombas de expulsión tipo ABC en aislamientos clínicos de MTB- MDR y MTB-XDR, caracterizados para susceptibilidad genotípica y fenotípica a FQs, expuestos a LVX?

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar polimorfismos en los genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC y su nivel de expresión en 10 aislamientos clínicos de MTB-MDR y MTB-XDR, caracterizados para susceptibilidad genotípica y fenotípica a fluoroquinolonas, expuestos a LVX. Medellín – Colombia 2017-2018.

3.2 Objetivos específicos

Identificar los polimorfismos en genes que codifican bombas de expulsión tipo ABC en 10 aislamientos clínicos MTB-MDR y MTB-XDR.

Identificar la presencia de las mutaciones en los genes *gyrA-gyrB* en 10 aislamientos clínicos MTB-MDR y MTB-XDR.

Determinar la asociación entre polimorfismos en los genes que codifican bombas de expulsión tipo ABC con la Concentración Inhibitoria Mínima de 10 aislamientos clínicos MTB-MDR y MTB-XDR.

Evaluar la expresión de genes que codifican para bombas de expulsión tipo ABC en 10 aislamientos clínicos MTB-MDR y MTB-XDR expuestos a diferentes concentraciones de LVX.

4. METODOLOGÍA

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos, se llevó a cabo un estudio descriptivo y se desarrolló la siguiente metodología (Figura 5):

4.1 Selección de la muestra

Se seleccionaron 10 aislamientos clínicos de MTB por conveniencia, cinco aislamientos clínicos de MTB-MDR y cinco de MTB-XDR (Tabla 1) con resistencia a FQs (OFX, MXF y/o LVX). Estos aislamientos se encuentran almacenados a -70°C en el cepario de la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), los cuales fueron obtenidos a partir de las actividades diagnósticas del laboratorio de Micobacterias de la CIB entre los años 2004 – 2010, Medellín Colombia.

Tabla 1. Aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* seleccionados a conveniencia del cepario de la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la CIB.

Aislamientos clínicos MTB-MDR	Aislamientos clínicos MTB-XDR
MDR-140	TBR-103
MDR-5051	TBGL-28
TBGL-129	TBGL-49
TBGL-81	TBR-152
TBR-101	TBR-102

MTB-MDR: aislamientos clínicos con multirresistencia.

MTB-XDR: aislamientos clínicos con resistencia extendida.

4.2 Pruebas de susceptibilidad

A los diez aislamientos clínicos MTB-MDR y MTB-XDR se les realizó, ente los años 2004 y 2010, pruebas de susceptibilidad a medicamentos de primera y segunda línea por el Método de las Proporciones Múltiples en Agar (53,54). Dos asadas del aislamiento se inocularon en el medio líquido Middlebrook 7H9 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) y se incubó hasta obtener un patrón MacFarland de 1.0. Luego se realizaron diluciones seriadas de 10^{-2} y 10^{-3} para la inoculación en medio Middlebrook 7H11 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) con las diferentes concentraciones críticas de los antibióticos a estudiar (54), los cuales fueron preparados según instrucciones del fabricante. La tabla 2, muestra las concentraciones utilizadas para cada antibiótico.

Tabla 2. Concentraciones críticas de los medicamentos antituberculosos de primera y segunda línea en el Método de las proporciones Múltiples.

Medicamentos anti-TB	Concentraciones críticas de los antibióticos (µg/mL)							
	0.2	0.5	1.0	2.0	7.5	8.0	10	30
Isoniacida	X		X					
Rifampicina			X					
Estreptomina				X				
Etambutol					X			
Amikacina			X					
Capreomicina							X	
Ofloxacina				X				
Levofloxacina				X				

Moxifloxacina	X
Ácido Para-Amino Salicílico	X
Etionamida	X
Cicloserina	X

4.3 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se determinó la CIM a LVX (Sigma-Aldrich, CO, St. Louis, MO, EE. UU.) para los aislamientos clínicos MTB-MDR y MTB-XDR. Para esto se utilizó el sistema BACTEC MGIT ® 960 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EE. UU.) y el software EpiCenter (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EE. UU.), las concentraciones probadas fueron 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0, 8,0 y 16,0 mg/L. El inóculo inicial se preparó a una escala 0.5 de MacFarland.

Los tubos MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tubes) se suplementaron con 800µL de OADC (ácido oleico, dextrosa, albúmina, catalasa y estearato de polioxietileno; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EE. UU.) y se inocularon con 500µL de una dilución 1/5 de la suspensión del aislamiento a evaluar y 100µL de la dilución del antibiótico deseado (este volumen fue calculado con respecto al volumen final del tubo MGIT 8.4mL). Para la preparación del tubo control de crecimiento, se realizó una suspensión del aislamiento a evaluar en una dilución 1/100. Por último, los tubos MGIT inoculados, son llevados al sistema automatizado, y se incuban entre 15-17 días a 37°C. El resultado se interpretó de la siguiente manera: Cuando el tubo MGIT control alcanzó las 400 o más unidades de crecimiento (GU), se procedió a realizar la lectura de los otros tubos que contenían las diferentes concentraciones de LVX a estudiar. La concentración

crítica para definir la susceptibilidad o resistencia es de 1.5 mg/L. La concentración inhibitoria mínima se definió como la concentración más baja del antibiótico en la cual no se observó crecimiento (55). Valores de las GU menores de 100, se interpretaron como “sensible”, mientras que los superiores a 100 GU se interpretaron como “resistente”.

4.4 Identificación de bombas de expulsión tipo ABC relacionadas con la resistencia a medicamentos anti-TB y sus genes reguladores

Se realizó una revisión bibliográfica para la identificación de genes que codifican para proteínas transportadoras tipo ABC y sus genes reguladores asociadas con resistencia a medicamentos, para esto se utilizó la cepa de referencia MTB H37Rv. Ésta búsqueda se realizó en bases de datos como PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) del NCBI y ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>) de ScienceDirect, utilizando palabras claves y términos MeSH como: Tuberculosis, Multidrug-resistant, *Mycobacterium tuberculosis*, ATP binding cassette transporter 1, Membrane transport proteins, ABC efflux pumps, Resistance mechanisms. Se tuvo en cuenta también las bases de datos de GenBank NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, Tuberculist: <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/> y TransportDB database: <http://membranetransport.org>.

Aunque inicialmente no se tenía planteado para este trabajo, se realizó la búsqueda de genes que posiblemente tenían funciones reguladoras para los genes codificantes de bombas de expulsión tipo ABC. Para esta búsqueda se utilizó la base de datos TBDatabase (http://genome.tdb.org/tbdb_sysbio/MultiHome.html).

4.5 Extracción de ADN genómico de aislamientos clínicos de MTB-MDR y MTB-XDR

La extracción se realizó por el método CTAB/NaCl (56,57), para el cual se transfirió al menos dos asadas de la micobacteria crecida en medio Middlebrook 7H11 a un eppendorf con 400 μ L de TE 1X pH 8.0. Se inactivó a 80°C durante 45 minutos y se le adicionaron 50 μ L de Lisozima 10mg/mL, para después homogenizar e incubar 15 minutos a 37°C. Posteriormente se adicionaron 75 μ L de una solución SDS 10%/ proteinasa K 10mg/mL previamente preparado, se mezcló en vórtex e incubó durante 10 minutos a 65°C.

Se adicionaron 100 μ L de NaCl 5M y 100 μ L de CTAB/NaCl precalentado y se mezcló en vórtex hasta observar un precipitado lechoso. Se incubó 10 minutos a 65°C, para luego adicionar 750 μ L de cloroformo/isoamilo alcohol (24:1). Se mezcló y se centrifugó por 8 minutos a 12.000 r.p.m. y posteriormente se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga. El ADN se precipitó mediante la adición de 450 μ L de isopropanol absoluto, se dejó reposar a -20°C por lo menos 30 minutos, para después centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 30 minutos. Se descartó la mayoría del sobrenadante y se adicionó 1 mL de Etanol al 70% frío y se mezcló por inversión. Se procede a centrifugar por 5 minutos a 12.000 r.p.m. para después descartar nuevamente el sobrenadante y centrifugar 1 minuto a 12.000 r.p.m. Por último, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por 15 minutos y se resuspende el botón en 30 μ L de agua grado molecular. La calidad del ADN total se midió utilizando Nanodrop 2000, Espectrometría (Thermo Scientific™) y Qubit® 2.0, Fluorometría (Thermo Scientific™). Se tuvo en cuenta una relación A 260/A280 >1.8 y una cantidad mínima de ADN \geq 1.5 μ g/ μ L.

4.6 Secuenciación y análisis de secuencias

Para la secuenciación se utilizó la tecnología de Illumina Hi-seq. Las librerías genómicas fueron construidas en el laboratorio de Genewiz (South Plainfield, NJ) donde también se secuenciaron los genomas.

Para el análisis de calidad de las lecturas se utilizó el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Para el ensamblaje de Novo y anotación de los genomas se utilizaron los softwares BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) y Prokka (<https://github.com/tseemann/prokka>) respectivamente.

Para buscar las variantes en los genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC y sus genes reguladores, se realizó un Blastn en el NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) y posteriormente se realizó un alineamiento múltiple con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

4.7 Diseño de cebadores para la cuantificación de los niveles de expresión de genes que codifican bombas de expulsión tipo ABC

A partir de la búsqueda previa de los genes que codifican para bombas de expulsión, se diseñaron cebadores específicos para cada uno de los genes a evaluar, sobre la secuencia de la cepa de referencia MTB H37Rv, utilizando el programa OligoAnalyzer 3.1, disponible para uso en línea: <http://www.idtdnacom/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

Se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones para su diseño: temperatura de anillaje entre 60-64°C, porcentaje de G+C máximo de 61%, longitud entre 18-25bp, cebadores finalizando en G o C en ambos extremos 5' y 3', se controló las formaciones de horquillas para evitar auto complementariedad.

4.8 Exposición de aislamientos clínicos de MTB- MDR y MTB-XDR a LVX

Para este procedimiento, se tomaron los aislamientos clínicos previamente cultivados en tubos MGIT, los cuales fueron incubados en el sistema cerrado BACTEC MGIT 320 (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EE. UU.) por 17 días a 37°C y se extendió la incubación durante 20 días más para obtener un crecimiento adecuado para la extracción de ARN.

4.9 Extracción de ARN de aislamientos clínicos de MTB-MDR y MTB-XDR

Para este procedimiento se utilizó el kit FastRNA® Pro-Blue Kit (MP Biomedicals). Para preparar la suspensión de micobacterias, se tomaron los tubos MGIT previamente expuestos a LVX (Control de crecimiento, concentración 0.5 mg/L para MTB-MDR y 1 mg/L y a 2 mg/L para MTB-XDR) y se centrifugó a 12.000 r.p.m por 15 minutos a 4°C, para después descartar el sobrenadante. Se removió el sedimento y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5mL, se centrifugo de nuevo y se descartó el sobrenadante. A continuación, se agregó un mL de la solución RNApro™ y se homogenizó mediante vórtex. La suspensión se transfirió a la matriz B de Lisis completando un mL. La muestra se lisó con Super FastPrep®-1 (MP Biomedicals) durante 30 segundos. El tubo se centrifugó 5 minutos a 12.000 x g y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo para incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 600 µL de etanol al 70% para homogenizar el lisado. Posteriormente, se transfirieron 700 µL a una columna RNeasy spin (RNeasy® Mini Kit Qiagen) y se centrifugó por 15 segundos a 10.000

r.p.m a temperatura ambiente. Se descartó el contenido del tubo colector y se adicionaron 700 µL del Buffer RW1 y se centrifugó durante 15 segundos a 10.000 r.p.m a temperatura ambiente. Luego se agregó 500 µL de buffer RPE y se centrifugó por 15 segundos a 10.000 r.p.m a temperatura ambiente para lavar la membrana de la columna. Se reemplazó el tubo colector de la columna por uno nuevo y se centrifugó por 1 minuto a la máxima velocidad a temperatura ambiente. Por último, se cambió de nuevo el tubo colector y se adicionaron 30 µL de agua libre de RNasas y se centrifugó por 1 minuto a 10.000 r.p.m a temperatura ambiente para eluir el ARN.

4.10 Cuantificación de los niveles de expresión de genes que codifican bombas de expulsión tipo ABC usando PCR en Tiempo Real

Para cuantificar el nivel de expresión de genes que codifican bombas de expulsión tipo ABC, se utilizó una técnica de PCR en tiempo real, utilizando los cebadores previamente diseñados (Anexo 1). Se utilizó el kit Máxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) y se utilizó el termociclador CFX96 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Como Housekeeping, se utilizaron los genes *rrs* y *sigA*. Para cuantificar los niveles de expresión basales, se tuvo en cuenta la expresión relativa, el cual da como resultado cuantas veces se expresa el gen a estudiar, con respecto a su control (Housekeeping). De igual forma se midieron los niveles de expresión de los genes de estudio de los aislamientos clínicos que fueron sometidos bajo condiciones de estrés a LVX. Los cambios en la expresión de los genes se reportaron de igual forma en términos de expresión relativa. A partir de la exposición de los aislamientos clínicos a concentraciones 0.5 mg/L para MTB-MDR, 1.0 mg/L y 2.0 mg/L de LVX para aislamientos clínicos MTB-XDR; se realizó la extracción del RNA y la síntesis de cDNA, manteniendo la concentración de RNA a 500ng; se continua la preparación de la mix para la PCR

y se desnaturaliza a 94°C por 5 minutos, se realizan 35 ciclos a 94°C por 30s, 62°C a 40s y 72°C por 40s, seguido por una extensión a 70°C por 5s.

ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS EN GENES QUE CODIFICAN BOMBAS DE EXPULSIÓN TIPO ABC Y SU NIVEL DE EXPRESIÓN CON LA RESISTENCIA A LEVOFLOXACINA EN AISLAMIENOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* MDR Y XDR

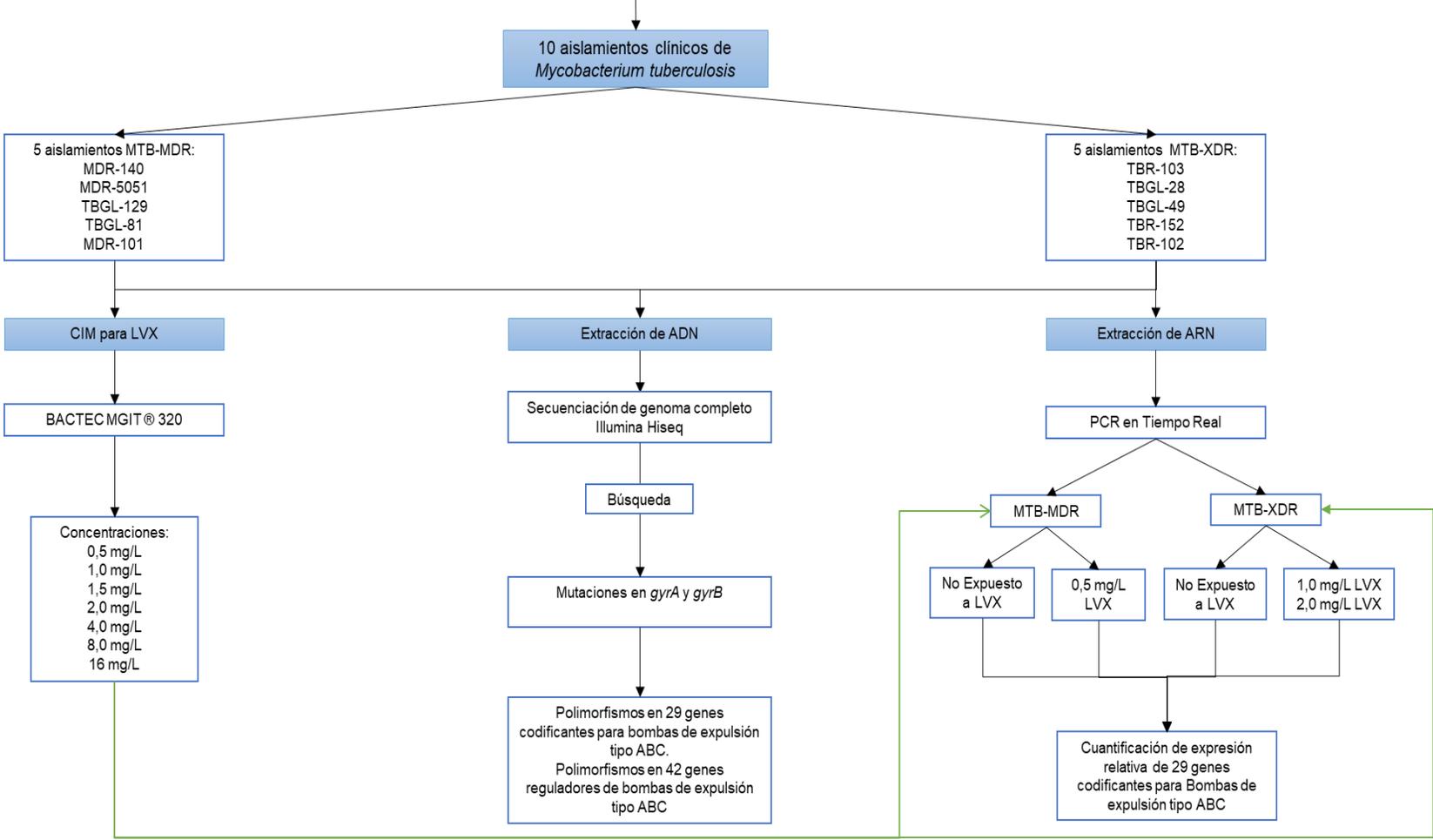


Figura 5. Metodología utilizada para la resolución de los objetivos planteados.

5. RESULTADOS

5.1 Cuantificación de la Concentración Inhibitoria Mínima por el sistema BACTEC MGIT® 320:

Para determinar la CIM de los aislamientos clínicos a LVX, se realizó el análisis de las gráficas arrojadas por el sistema BACTEC MGIT 320 y el software EpiCenter TB eXIST explicado previamente. El punto de corte para establecer sensibilidad o resistencia, establecido por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en el manual de procedimiento para *Mycobacterium tuberculosis* fue de 1.5 mg/L. En la figura 6 se pueden observar los perfiles de susceptibilidad de los 10 aislamientos clínicos de MTB para LVX.

En el caso de todos los aislamientos clínicos de MTB-MDR, se observa una curva correspondiente al control de crecimiento, indicando una CIM <0,5 mg/L, lo cual corresponde a un aislamiento sensible a LVX (Figura 6 y Anexo 2-4). En cuanto a los aislamientos clínicos con resistencia a LVX (MTB-XDR), se obtuvo una gráfica con curvas representadas en diferentes colores, correspondientes a las concentraciones de LVX en el que se obtuvo crecimiento (Anexo 2-4).

Dos aislamientos MTB-XDR (TBR-103 y TBR-152) tienen una CIM de 4 mg/L, dos aislamientos (TBGL-49 y TBR-102) con una CIM de 8 mg/L y un aislamiento (TBGL-28) con 16 mg/L (Figura 6).

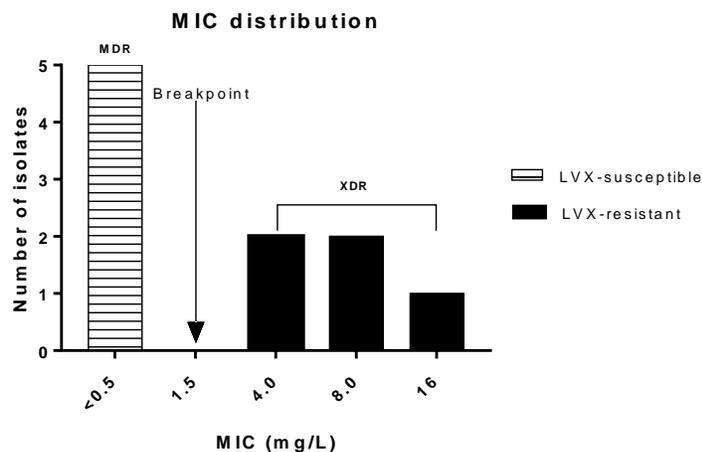


Figura 6. Distribución de la CIM de 10 aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

5.2 Identificación de genes que codifican para bombas de expulsión tipo ABC y sus genes reguladores.

En la búsqueda de los genes que codifican para bombas de expulsión, se identificaron 29 genes relacionados con transportadores tipo ABC (Anexo 8), y su posible función y asociación con resistencia a los diferentes medicamentos de primera y segunda línea. Estos 29 genes codifican para 15 proteínas completas transportadoras tipo ABC: Rv0194, Rv1218c-1217c, Rv2936-Rv2937-Rv2938 (drrA-drrB-drrC), Rv1273-Rv1272, Rv2688c-Rv2687c-Rv2686c, Rv1348-Rv1349, Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c, Rv1473, Rv1667c-Rv1668c, Rv1686c-Rv1687c, Rv1819c (bacA), Rv2477, Rv1747, Rv3781 (rfbE), Rv1463. Los genes restantes codifican posiblemente proteínas transmembranales tipo ABC. De igual forma se identificaron 42 genes involucrados en la regulación de las bombas de expulsión ya mencionadas (Anexo 9).

5.3 Secuenciación y análisis de polimorfismos en genes blanco *gyrA-gyrB*, genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC y sus genes reguladores presentes en los aislamientos clínicos MTB-MDR y MTB-XDR

Se realizó el ensamblaje *de Novo* y anotación de los 10 genomas, obteniendo un porcentaje de GC de 65% para cada aislamiento, un promedio de CDS de 4188 y una profundidad de secuenciación mayor a 300X para cada uno de los genes analizados.

Al realizar la búsqueda de variantes en los genes codificantes de la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) se encontraron SNPs asociados y no asociados con resistencia a fluoroquinolonas, los cuales se muestran en el anexo 10. Los aislamientos clínicos de MTB-XDR, TBGL-49, TBR-152 y TBR-102, presentan mutaciones asociadas con resistencia a fluoroquinolonas en el gen *gyrA* (Asp94Ala y Ser91Pro); el aislamiento TBGL-28 tiene mutaciones tanto en el gen *gyrA* como en el gen *gyrB* asociadas con resistencia (Glu50Asp).

De los 29 genes codificantes para bombas de expulsión, 21 no presentaron ningún tipo de mutación. En los 8 genes se encontraron principalmente SNPs e indels (inserciones y deleciones), Anexo 11. De los 42 genes reguladores identificados, en 12 genes se encontraron principalmente SNPs e indels (Anexo 12).

Los genes *Rv1217c* y *Rv1458c*, presentaron polimorfismos (SNPs) en un aislamiento clínico de MTB-XDR (TBR-103), el cual genero el cambio Ala173Thr y Thr133Ala respectivamente, pero estas mutaciones no se observaron en los aislamientos clínicos de MTB-MDR. En los aislamientos clínicos de MTB-XDR el gen *Rv2687c* no presentó SNP, pero si en dos aislamientos clínicos de MTB-MDR (MDR-5051 y TBGL-29) en que se observa el cambio Arg219Trp. El aislamiento TBR-103 presenta una mutación en el gen *Rv1463*, Glu198Gly, la cual no se

observa en los cuatro aislamientos de MTB-XDR restantes ni en los demás aislamientos de MTB-MDR.

En el gen *Rv1667c* se observa una inserción de diez bases nitrogenadas en la posición 1042 (1042_1052insCGCGGCAAGA) en cuatro aislamientos MTB-XDR (TBR-103, TBGL-28, TBGL-49 y TBR-102) y en tres aislamientos MTB-MDR (MDR-5051, TBGL-129 y TBGL-81). Dos de éstos (MDR-5051 y TBGL-129) presentan el cambio Asp56Asn.

Los genes *Rv2688c* y *Rv0194* tienen las mutaciones Pro156Thr y Met74Thr respectivamente, las cuales están presentes en todos los aislamientos MTB-XDR y en cuatro aislamientos MTB-MDR (MDR-5051, TBGL-129, TBGL-81 y MDR-101). El gen *Rv1218c* presentó el cambio Gln243Arg en cuatro aislamientos MTB-XDR (TBR-103, TBGL-49, TBGL-28 y TBR-102) y en dos aislamientos MTB-MDR (TBGL-81 y MDR-101). El aislamiento MTB-MDR TBGL-140 tiene una inserción en la posición 318 de tres bases nitrogenadas (318_321insGGC) y un SNP en la posición 23 (Val8Ala).

En cuanto a los genes reguladores, se identificaron 42 genes que regulan a los 29 genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC. En estos genes se identificaron SNPs e indels en 12 genes (12/42) (Anexo 12). Se observó que en los aislamientos clínicos MTB-MDR, *Rv0273c*, presentó la mutación Cys167Tyr, la cual no está presente en los aislamientos MTB-XDR. En el aislamiento MTB-XDR TBR-103 se observaron el mayor número de cambios en genes reguladores de los cuales sólo la mutación Thr168Ala estuvo presente en otros aislamientos. Las demás mutaciones identificadas en este aislamiento fueron cambios únicos.

5.4 Análisis de la expresión de 29 genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC en *Mycobacterium tuberculosis* en condiciones basales y post - tratamiento con LVX.

Se analizó la expresión de 29 genes codificantes para bombas de expulsión en 5 aislamientos clínicos de MTB-MDR y 5 aislamientos MTB-XDR. Se calculó la expresión relativa para estos genes en todos los aislamientos en condiciones basales (sin tratamiento a LVX), y para la medición en condiciones de exposición a LVX se tuvo en cuenta la clasificación del aislamiento de acuerdo con su susceptibilidad de la siguiente manera: Los aislamientos MTB-MDR fueron expuestos a 0.5 mg/L de LVX y los aislamientos MTB-XDR a 1 mg/L y 2 mg/L de LVX.

Cada aislamiento tuvo como control a sí mismo sin ser expuesto al antibiótico (control no expuesto). Se tomó un valor 1 para la expresión relativa de los aislamientos controles. Valores >1 indican una expresión aumentada y valores <1 indican una expresión disminuida. A continuación, se muestran los resultados de expresión relativa de los 29 genes tanto para los aislamientos MTB-MDR como MTB-XDR (Anexo 10-11). En las gráficas se muestran los datos de los genes que hacen parte de un mismo operón.

Se puede observar que para los genes *Rv1217c* y *Rv1218c* hay un comportamiento similar entre los aislamientos de MTB expuestos y no expuestos a LVX. Los aislamientos MTB-XDR TBR-152 y MTB-MDR TBR-140 mostraron una expresión 2 veces aumentada con respecto a los no expuestos. El aislamiento TBR-103 mostró también aumento en la expresión de ambos genes (1.15 y 1.32 respectivamente) (Figura 7).

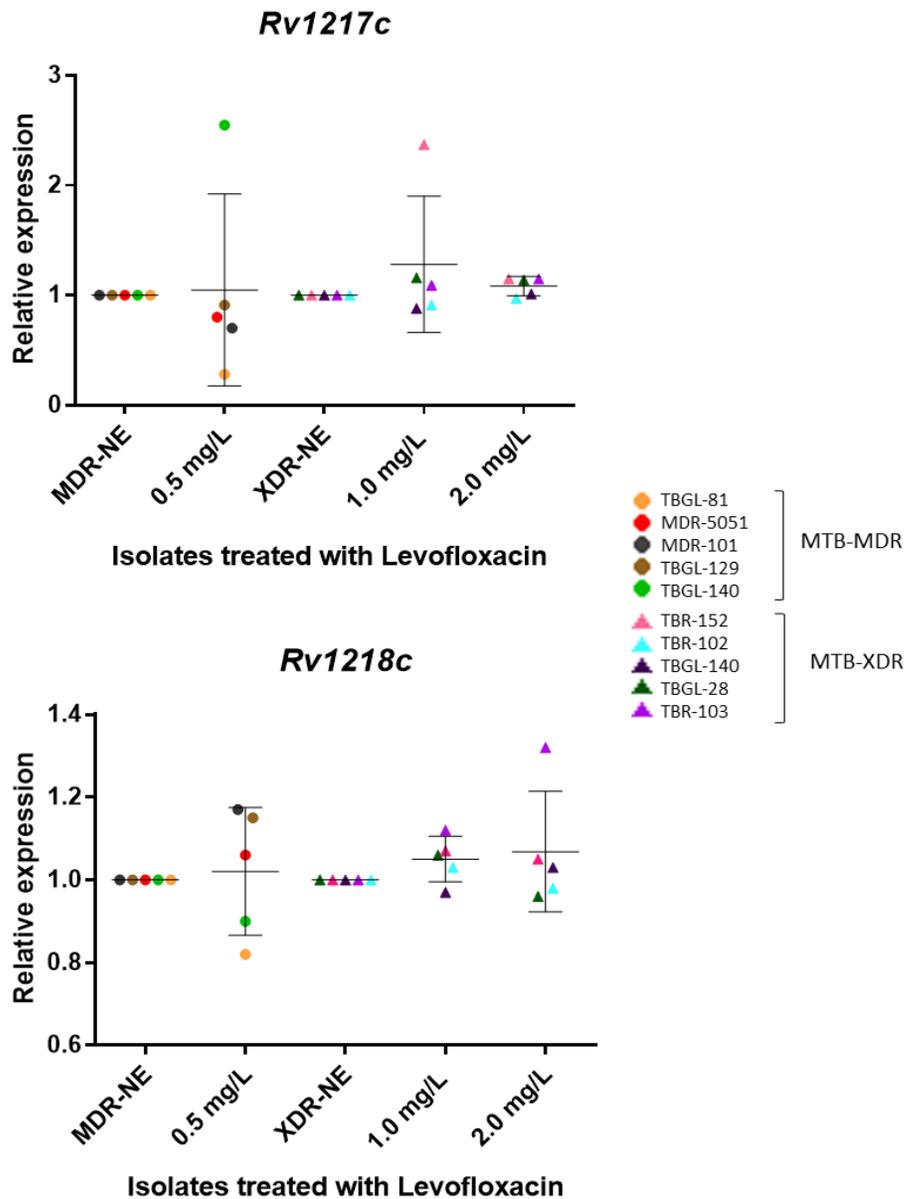


Figura 7. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1217c* y *Rv1218c* de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

- MTB-MDR
- ▲ MTB-XDR

Los genes *Rv2936-drrA*, *Rv2937-drrB* y *Rv2938-drrC* muestran una expresión relativa muy similar al control en los aislamientos MTB-MDR. En los aislamientos MTB-XDR se observa que el aislamiento TBR-103 muestra un leve aumento en la expresión de estos genes (1.15, 1.19 y 1.11 respectivamente) en la concentración 1 mg/L y aumenta un poco más (1.52, 1.44 y 1.20 respectivamente) en la concentración de 2 mg/L (Figura 8).

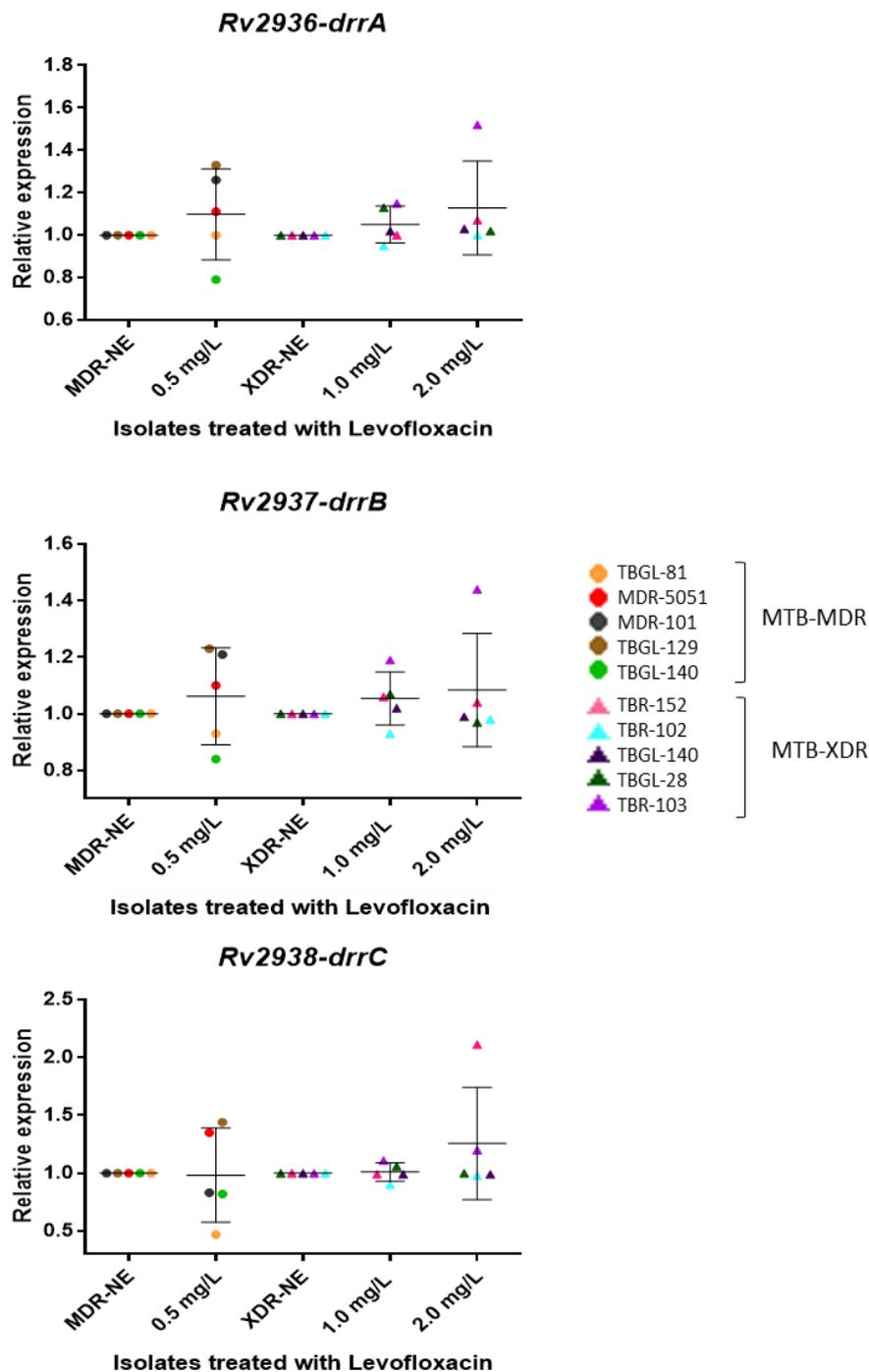


Figura 8. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv2936-drrA*, *Rv2937-drrB* y *Rv2938-drrC* de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

- MTB-MDR

- ▲ MTB-XDR

Se observó que los aislamientos MTB-XDR no tuvieron una expresión diferencial para los genes *Rv1272c* y *RV1273c* con respecto al control (XDR-NE) en ninguna de las dos concentraciones de LVX utilizadas, excepto el aislamiento TBR-103, el cual mostró un aumento en su expresión para ambos genes de 1.14 y 1.16 respectivamente. En el grupo de los aislamientos MTB-MDR, TBR-140 mostró una expresión aumentada de 2.8 veces con respecto al control para el gen *Rv1272c* (Figura 9).

Con respecto a la expresión de los genes *Rv2686c*, *Rv2687c* y *Rv2688c* se observa que en el grupo de los aislamientos MTB-MDR, el aislamiento TBR-140 muestra una expresión de 2.66 veces con respecto al control no expuesto a LVX para el gen *Rv2687c* y en el grupo de los aislamientos MTB-XDR se observa que el aislamiento TBR-152 muestra un aumento en la expresión de más 10 veces para el mismo gen (*Rv2687c*) comparado con su respectivo control. Se observó que el aislamiento TBR-103 presentó un aumento en la expresión de los tres genes de 1.31, 1.66 y 1.31 respectivamente (Figura 10).

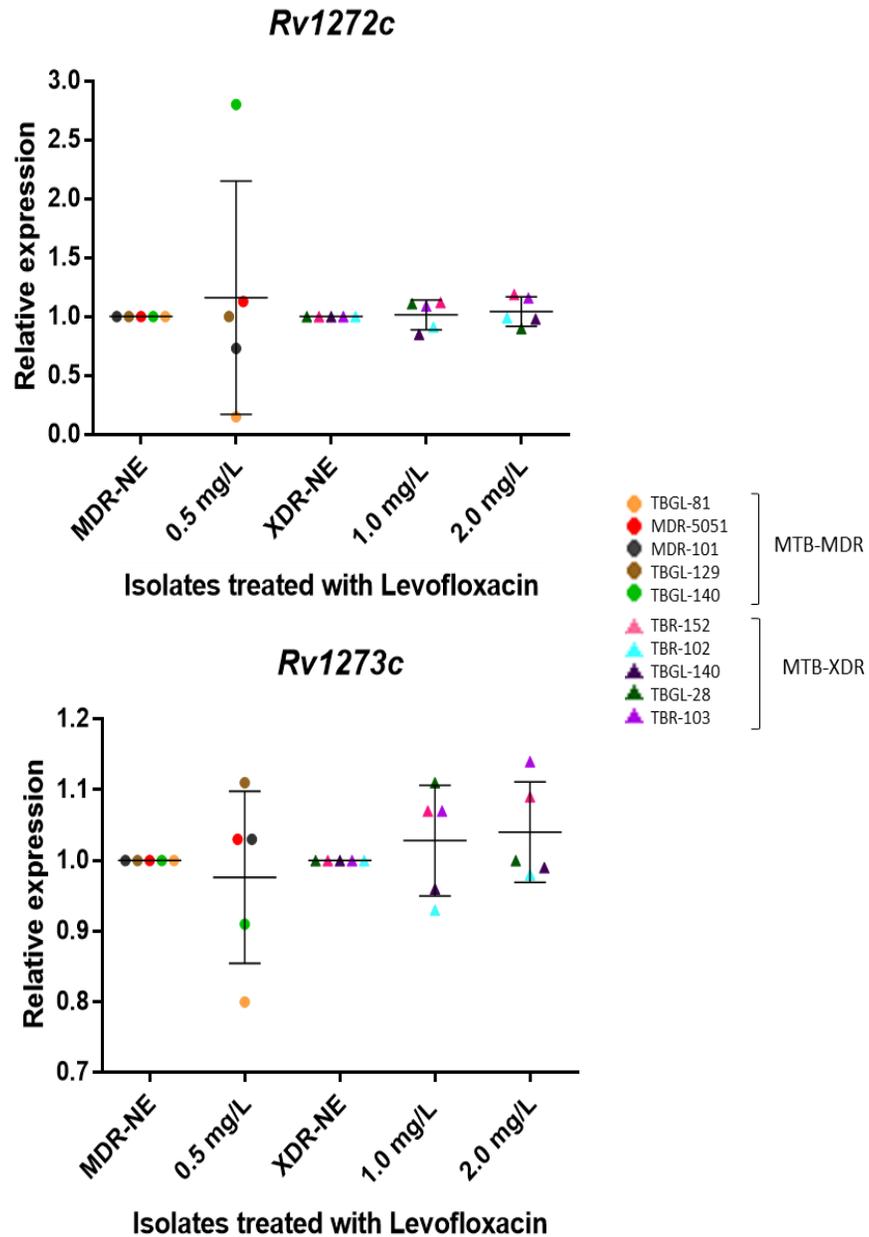


Figura 9. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1272c* y *Rv1273c* de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

- MTB-MDR
- ▲ MTB-XDR

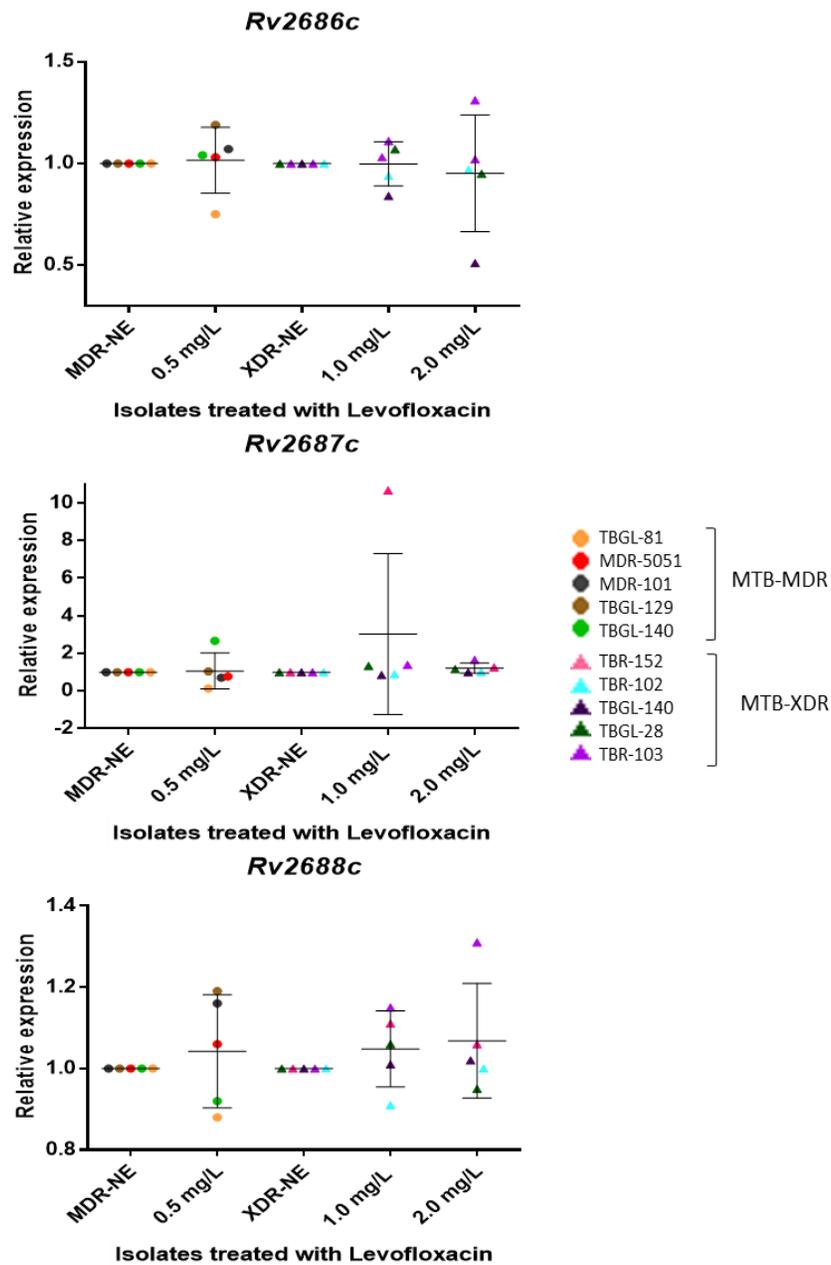


Figura 10. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv2686c*, *Rv2687c* y *Rv2688c* de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

- MTB-MDR
- ▲ MTB-XDR

El aislamiento TBR-140 mostró una expresión aumentada para los genes *Rv1348* y *Rv1349* (2.63 y 2.31 veces respectivamente). Se observó que el aislamiento MTB-XDR TBR-152 presentó un aumento de 3 veces en su expresión para el gen *Rv1349* tanto en la concentración de 1 mg/L como en la de 2 mg/L. El aislamiento MTB-XDR TBR-103 mostró una expresión aumentada en ambos genes de 3.77 y 1.16 respectivamente (Figura 11).

Al evaluar la expresión de los genes *Rv1456c*, *Rv1457c* y *Rv1458c* se observó que el aislamiento MTB-MDR TBR-140 muestra una expresión aumentada en los tres genes de 2.72, 2.91 y 2.53 respectivamente. El aislamiento MTB-XDR TBR-152 también mostró una expresión aumentada para los tres genes (4.49, 6.75 y 10.67 respectivamente) al igual que el aislamiento TBR-103 (1.18, 1.14 y 1.20 respectivamente) (Figura 12).

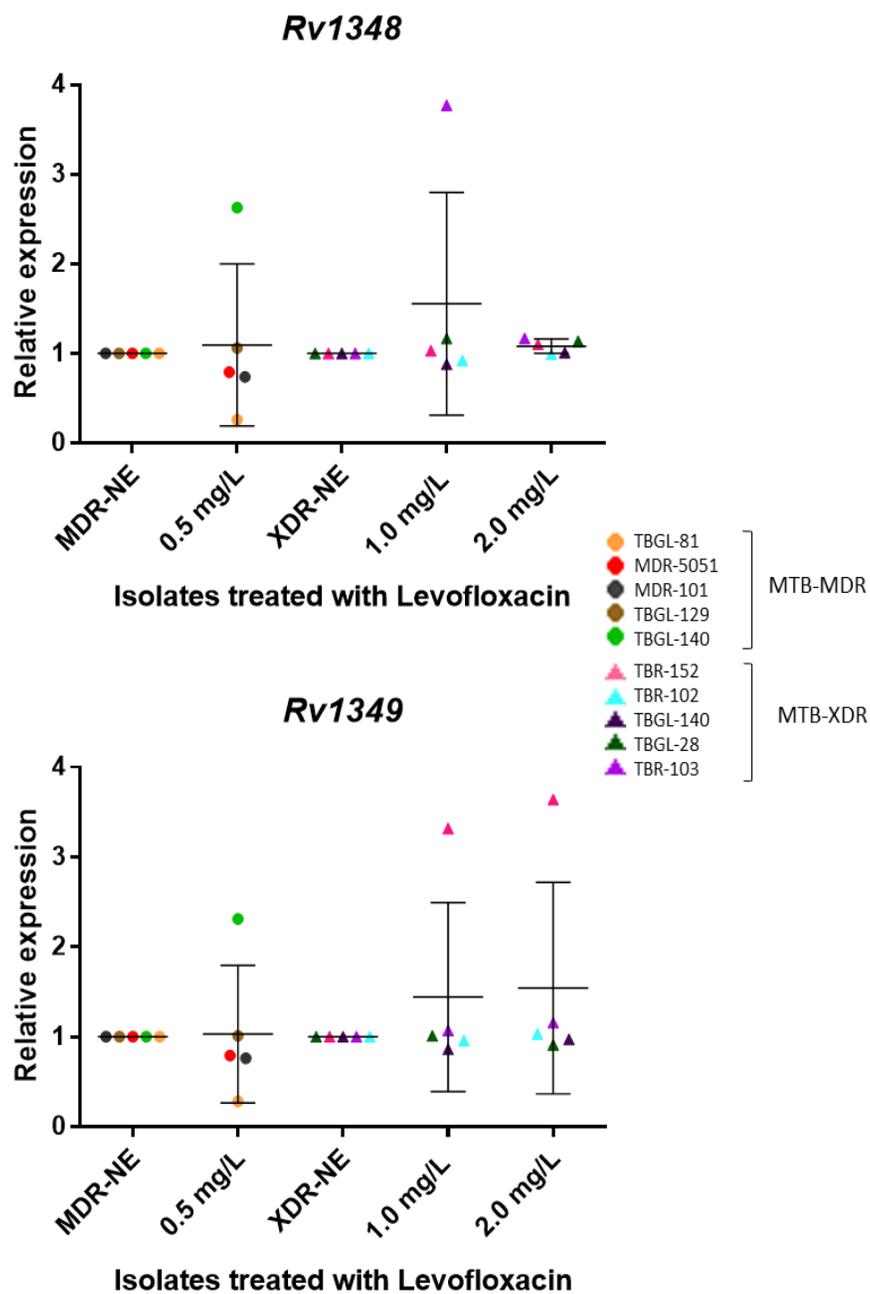


Figura 11. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1348* y *Rv1349* de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

- MTB-MDR
- ▲ MTB-XDR

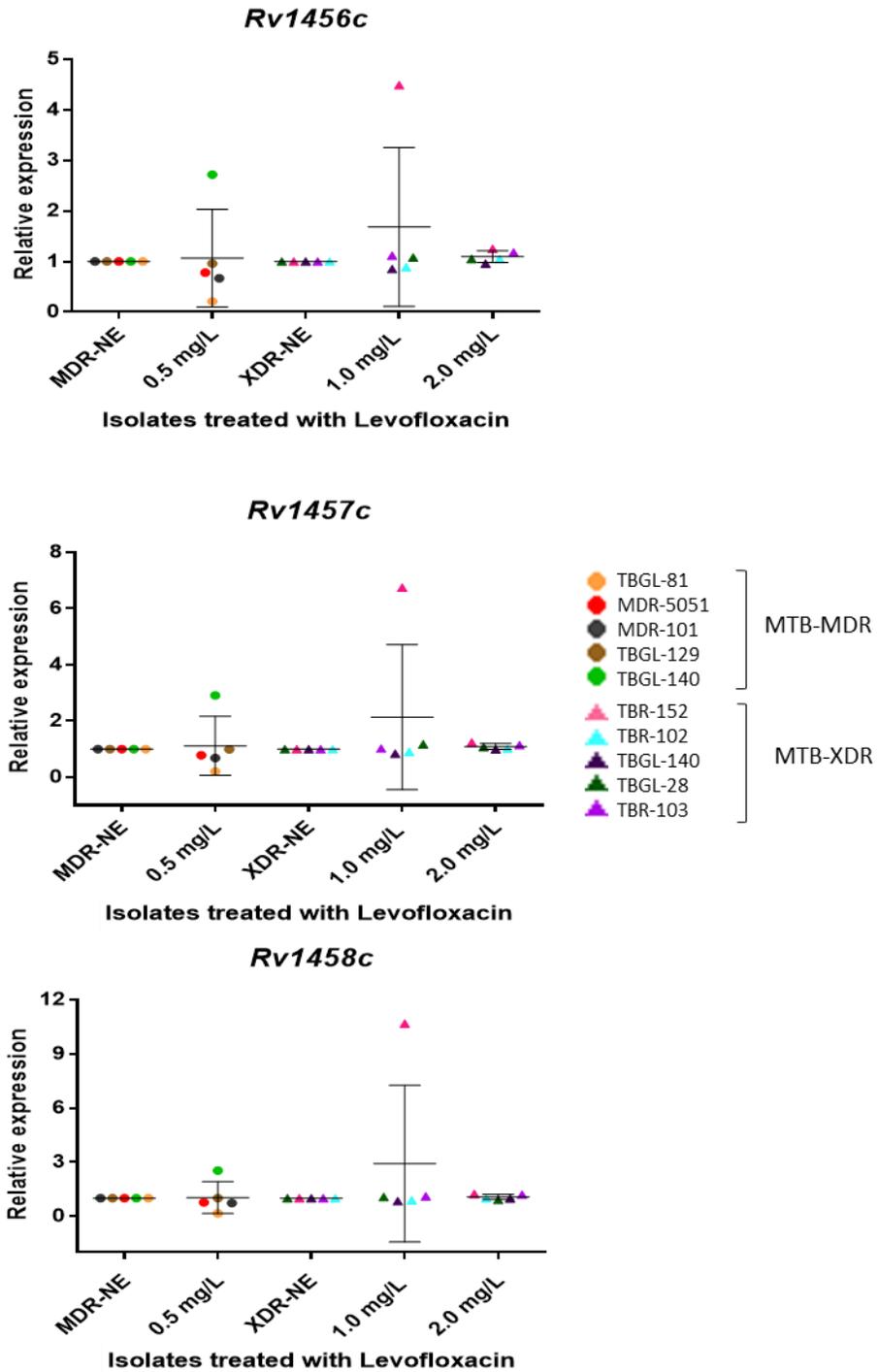


Figura 12. Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1456c*, *Rv1457c* y *Rv1458c* de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

● MTB-MDR

▲ MTB-XDR

La expresión relativa del aislamiento TBR-152 se encontró aumentada 2.87 veces para el gen *Rv1668c* con respecto a su control no expuesto a LVX. El aislamiento TBR-103 presentó un aumento en la expresión de los genes *Rv1667c* y *Rv1668c* (1.11 y 1.23 respectivamente) (Figura 13).

El gen *Rv1819c-bacA* mostró una expresión aumentada en los aislamientos MTB-MDR, MDR-101 (1.70) y TBGL-129 (1.12). Se observa que para los aislamientos MTB-XDR, este gen presentó una expresión aumentada en 3 aislamientos en las dos concentraciones utilizadas de LVX. Para la concentración de 1 mg/L los aislamientos TBR-103, TBR-152 y TBR-102 tuvieron una expresión de 1.14, 1.38 y 1.13 respectivamente y para la concentración de 2 mg/L estos mismos aislamientos mostraron una expresión relativa de 1.24, 1.21 y 1.18 respectivamente (Figura 14).

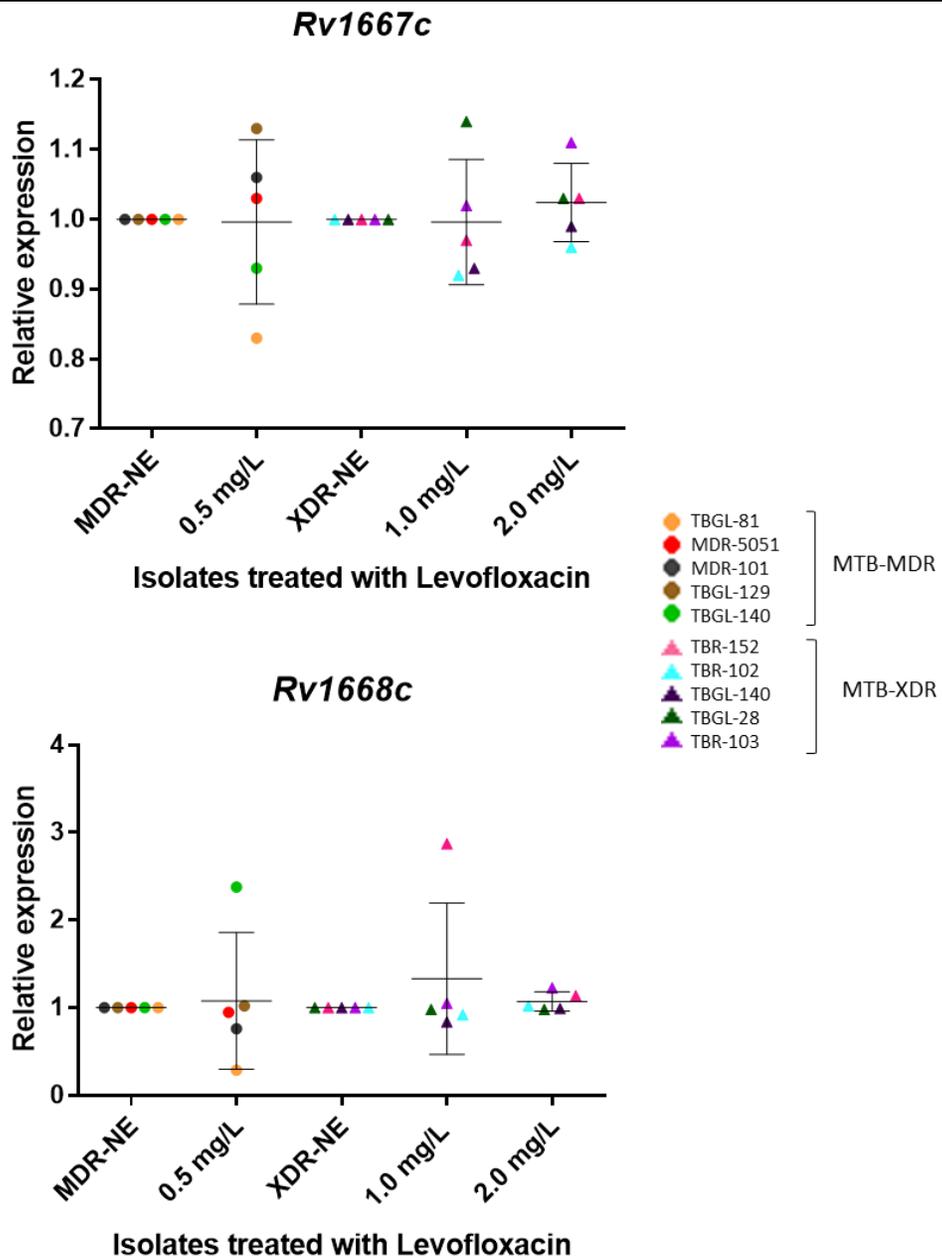


Figura 13: Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1667c* y *Rv1668c* de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

- MTB-MDR
- ▲ MTB-XDR

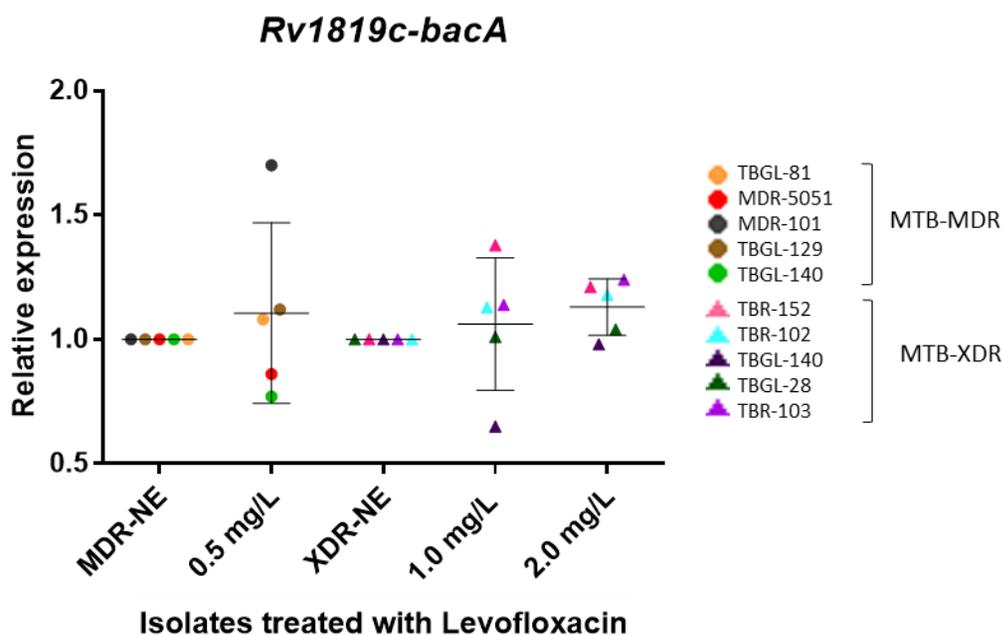


Figura 14: Análisis de la expresión relativa del gen *Rv1819c-bacA* de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

- MTB-MDR
- ▲ MTB-XDR

En los aislamientos MTB-MDR, se observó que el gen *Rv0194* tiene una expresión aumentada más de 2 veces en los aislamientos TBGL-140 (3.04) y TBGL-129 (2.94), el aislamiento TBGL-81 presentó una disminución en su expresión (0.16). Para los aislamientos MTB-XDR, el gen *Rv0194* tuvo un aumento en la expresión mayor a 2 veces (2.27) en la concentración de 2 mg/L para el aislamiento TBR-152. El aislamiento TBR-103 mostró un aumento en la expresión (1.34) al ser tratado con LVX de 2 mg/L (Figura 15a). Con respecto al gen *Rv2477*, se observó que éste, tuvo un aumento en la expresión al ser expuesto a las dos concentraciones (1 mg/l y 2 mg/L) de LVX en el aislamiento TBR-103, con una expresión relativa de 1.21 y 1.33 respectivamente (Figura 15b).

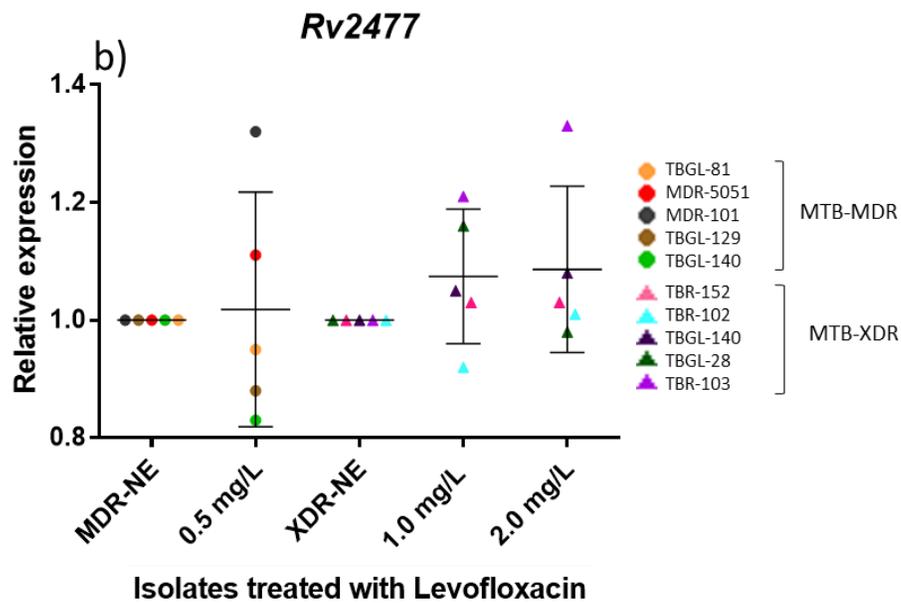
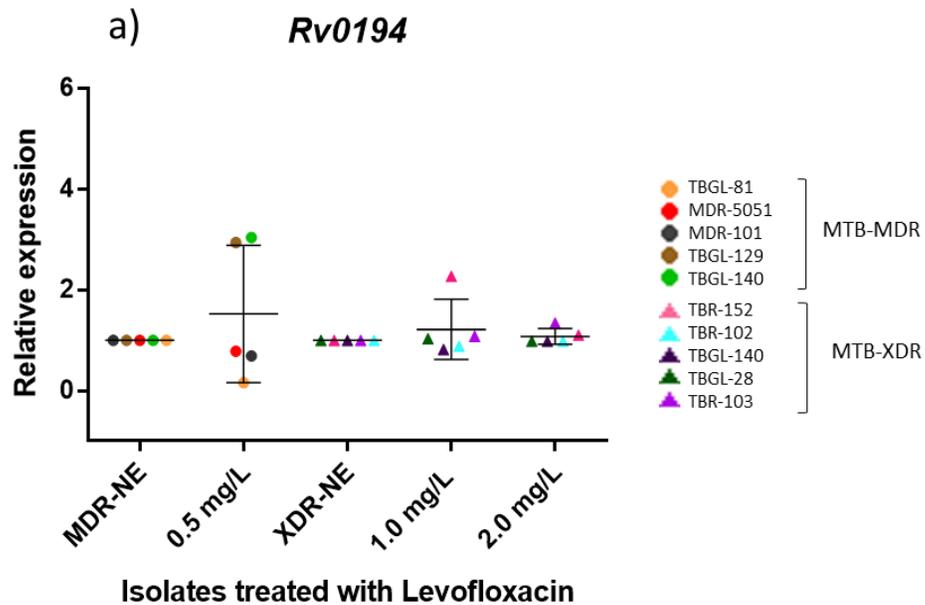


Figura 15: Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv0194* (a) y *Rv2477* (b) de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

- MTB-MDR
- ▲ MTB-XDR

El gen *Rv1747* se encontró con expresión aumentada en el aislamiento MTB-MDR, TBGL-140 (1.26). En los aislamientos MTB-XDR también se registró un aumento en la expresión del gen *Rv1747* en ambas concentraciones de LVX utilizadas (1 mg/L y 2 mg/L) para el aislamiento TBGL-28. El aislamiento TBR-103 mostró también un aumento en la expresión de este gen cuando la cepa fue expuesta a las dos concentraciones de LVX (Figura 16a). Con respecto al gen *Rv3781-rfbE* se observó un aumento en la expresión en el aislamiento MTB-XDR TBR-103 en las dos concentraciones de LVX utilizadas (1 mg/L y 2 mg/L). Las expresiones relativas obtenidas fueron 1.19 y 1.43 respectivamente (Figura 16b).

El aislamiento TBR-103 mostró una expresión relativa aumentada en las dos concentraciones de LVX utilizadas (1 mg/L y 2 mg/L) de 1.16 y 1.40 respectivamente para el gen *Rv1463*. El mismo comportamiento se observó para el aislamiento TBR-103 con respecto a la expresión del gen *Rv1473*, en el cual se obtuvieron expresiones relativas de 1.16 y 1.15 para 1 mg/L y 2 mg/L respectivamente. El aislamiento TBR-152 presentó un aumento de 3 veces en la concentración de 1 mg/L de LVX (Figura 17).

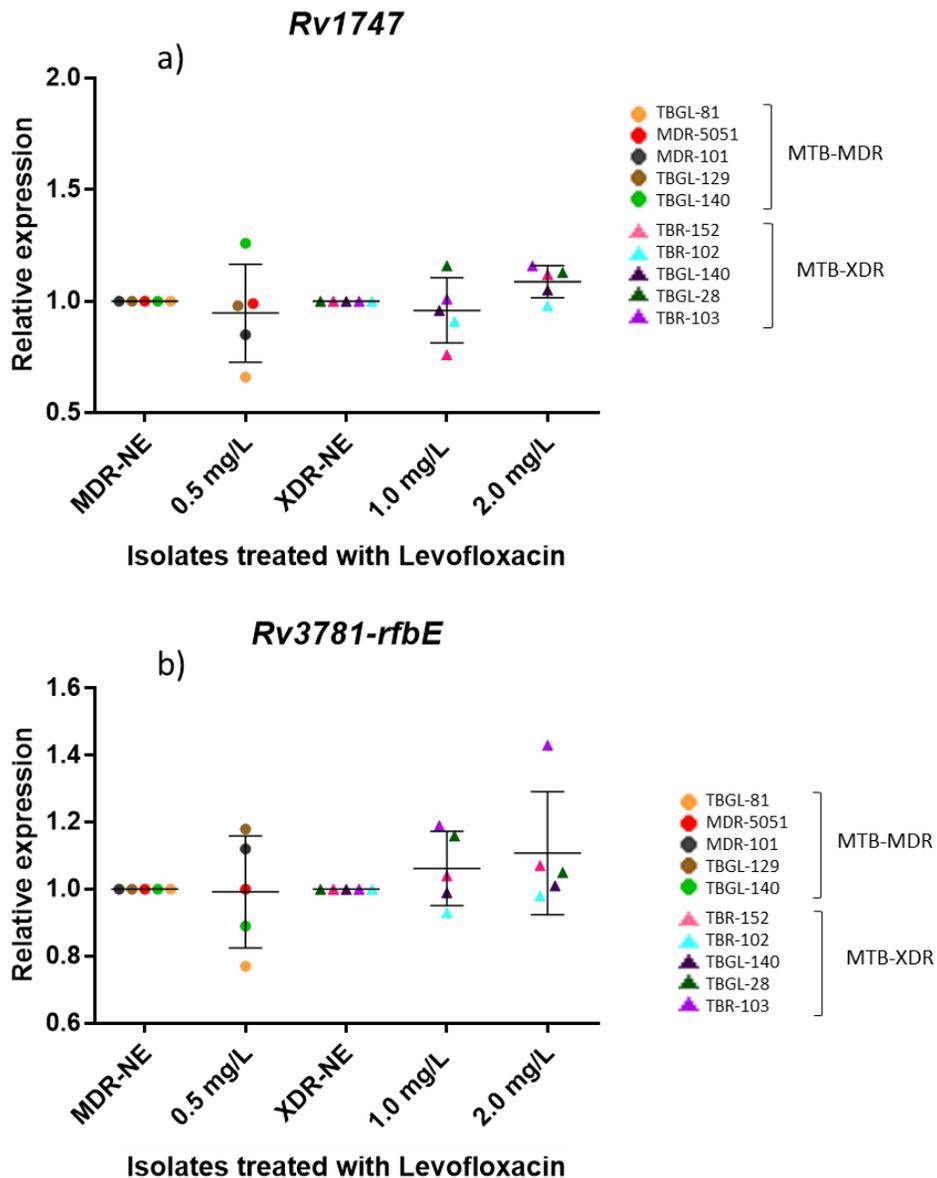


Figura 16: Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1747* (a) y *Rv3781* (b) de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

- MTB-MDR
- ▲ MTB-XDR

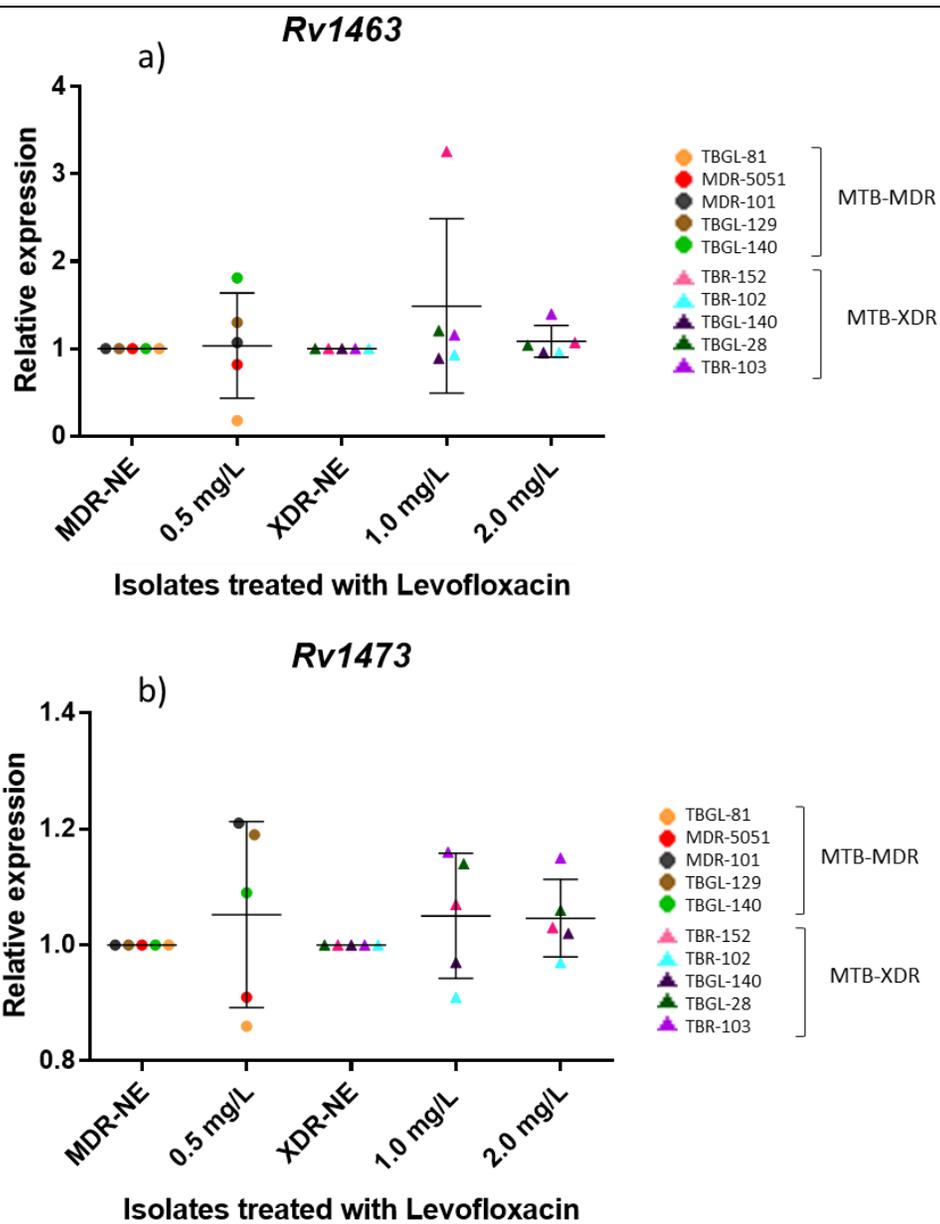


Figura 17: Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1463* (a) y *Rv1473* (b) de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

- MTB-MDR
- ▲ MTB-XDR

Al analizar la expresión relativa de los genes *Rv1686c* y *Rv1687c* se observó que los aislamientos MTB-MDR MDR-101 y TBGL-129 tenían un aumento en la expresión de ambos genes. Con respecto a los aislamientos MTB-XDR, el aislamiento TBR-103 presentó una expresión aumentada en ambos genes bajo las dos concentraciones de LVX utilizadas (Figura 18).

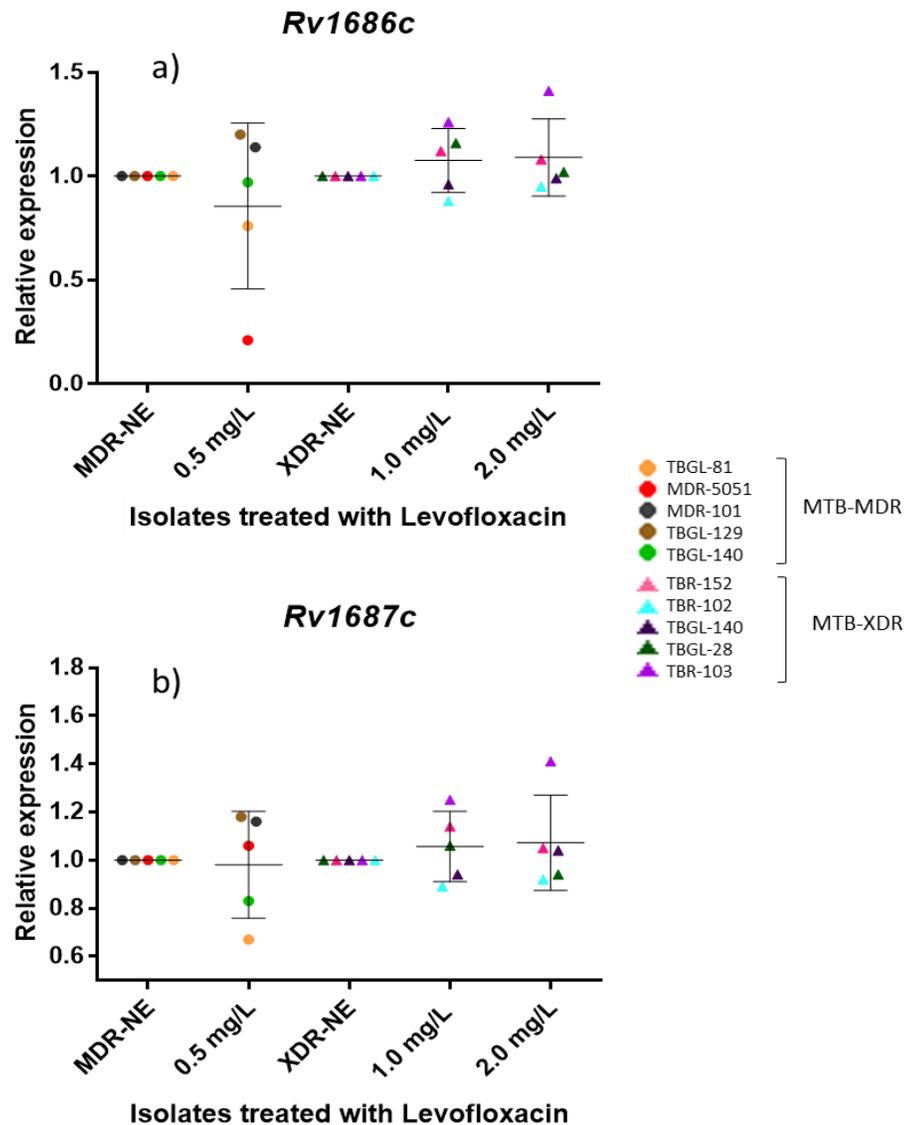


Figura 18: Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv1686c* (a) y *Rv1687c* (b) de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

● MTB-MDR

▲ MTB-XDR

A continuación, se muestran los datos de expresión relativa para genes que codifican para dominios u otras regiones de bombas de expulsión tipo ABC.

Para el gen *Rv3000* se observa un aumento en la expresión en el aislamiento TBR-152 mayor a 6 veces para la concentración de 1 mg/L de LVX y de 1.24 para la concentración de 2 mg/L. El aislamiento TBR-103 también presenta un aumento en la expresión de este gen al ser expuesto a 2 mg/L de LVX. El aislamiento MTB-MDR TBGL-140 mostró una expresión aumentada en este gen, mientras que el aislamiento TBGL-81 disminuyó su expresión (Figura 19a). El gen *Rv2136c* mostró una expresión aumentada en el aislamiento MTB-XDR TBR-103 en las dos concentraciones de LVX (Figura 19b).

El aislamiento TBR-152 presentó una expresión aumentada en 11 veces con respecto a su control al ser expuesto a una concentración de 1 mg/L en el gen *Rv2209*. El aislamiento TBR-103 también mostró un aumento en la expresión de este gen al ser expuesto a las dos concentraciones de LVX (1 mg/L 2 mg/L). El aislamiento MTB-MDR TBGL-140 duplicó su expresión de este gen al ser expuesto a LVX (0.5 mg/L), Figura 19c.

En la tabla 3 se resumen los principales hallazgos del estudio, como lo observado en el aislamiento MTB-MDR TBGL-140, que presentó un aumento en la expresión relativa de varios genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC, al ser expuesto a LVX. De igual forma, el aislamiento MTB-MDR TBR-103, quien no presenta mutación en genes blanco, tuvo un aumento en todos los 29 genes codificantes para bombas al ser expuesto a las dos concentraciones de LVX. Por

último, el aislamiento MTB-MDR TBR-152, al ser expuesto a LVX presenta aumento en la expresión relativa superiores a 2, alcanzando los valores más altos.

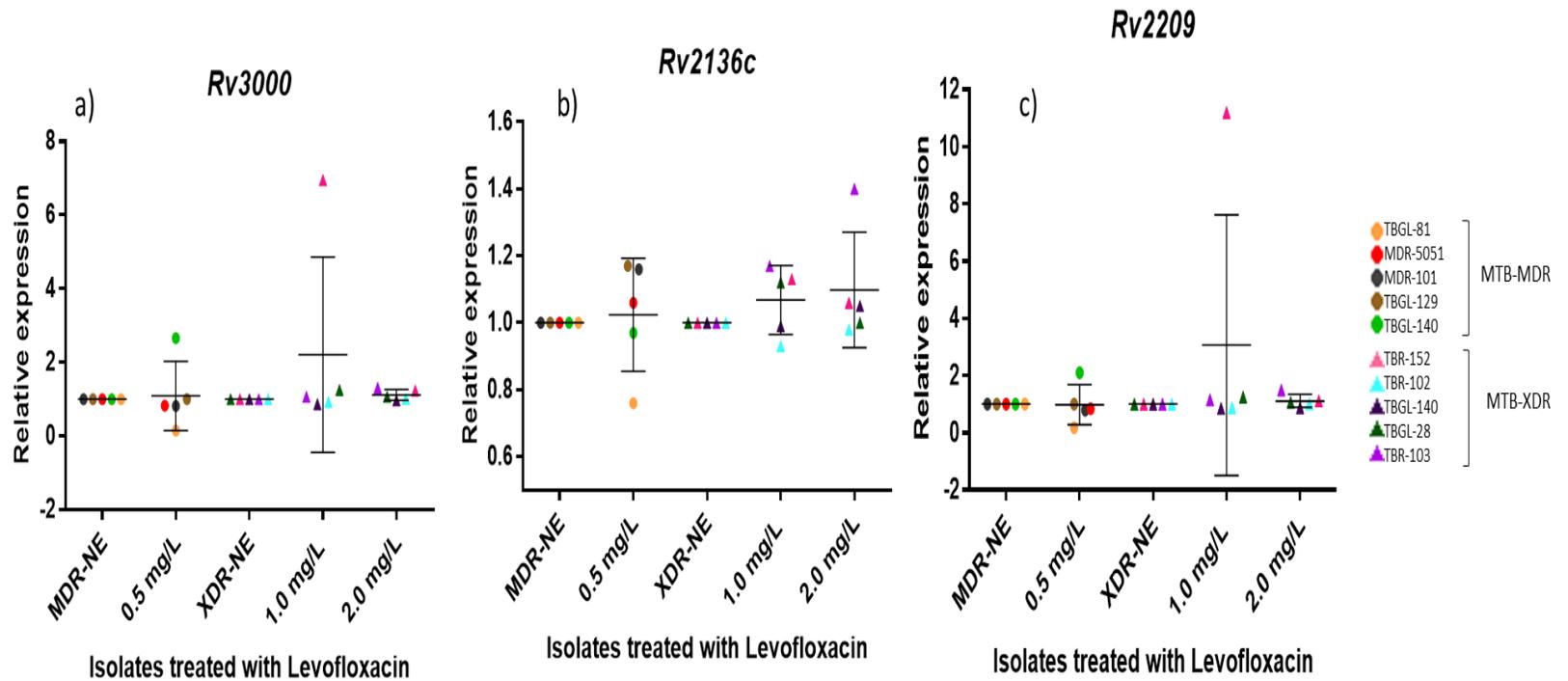


Figura 19: Análisis de la expresión relativa de los genes *Rv3000* (a), *Rv2136c* (b) y *Rv2209* (c) de *Mycobacterium tuberculosis*. MDR-NE: aislamientos MTB-MDR no expuestos a LVX. XDR-NE: aislamientos MTB-XDR no expuestos a LVX.

- MTB-MDR
- ▲ MTB-XDR

Tabla 3. Mutaciones y expresión relativa de los principales genes codificantes en bombas de expulsión en los aislamientos TBGL-140, TBR-152 y TBR-103.

Aislamiento	CIM (mg/L)	Mutación en <i>gyrA</i>	Genes codificantes para bombas de expulsión	Mutación	Expresión relativa*	
M T B - M D R	TBGL-140	<0,5	NM	<i>Rv1217c</i>	-	2,55
				<i>Rv1218c</i>	T23C/Val8Ala	0,90
				<i>Rv0194</i>	-	3,04
				<i>Rv1272c</i>	-	2,80
				<i>Rv1348</i>	-	2,63
				<i>Rv1349</i>	-	2,31
				<i>Rv1456c</i>	-	2,72
				<i>Rv1457c</i>	-	2,91
				<i>Rv1458c</i>	-	2,53
				<i>Rv1667c</i>	G169A/Asp56Asn	0,93
				<i>Rv1668c</i>	-	2,38
				<i>Rv1463</i>	-	1,81
				<i>Rv2687c</i>	-	2,66
				<i>Rv3000</i>	-	2,66
				<i>Rv1747</i>	-	1,26
<i>Rv2209</i>	-	2,10				
M T B - X D R	TBR-152	4	Ser91Pro	<i>Rv1217c</i>		2,37
				<i>Rv1819c-bacA</i>		1,38
				<i>Rv0194</i>	T221C/Met74Thr	2,27
				<i>Rv1272c</i>		1,12
				<i>Rv1349</i>		3,32
				<i>Rv1456c</i>		4,49
				<i>Rv1457c</i>		6,75
				<i>Rv1458c</i>		10,67
				<i>Rv1667c</i>	1043_1053insGCGGCAAGAC	0,97
				<i>Rv1668c</i>		2,87
				<i>Rv1463</i>		3,26
				<i>Rv1686c</i>		1,12
				<i>Rv1687c</i>		1,14
				<i>Rv2688c</i>	C466A/Pro156Thr	1,11
				<i>Rv2687c</i>		10,67
<i>Rv3000</i>		6,95				
<i>Rv2136c</i>		1,13				
<i>Rv2209</i>		11,20				
<i>Rv2938-drrC</i>		2,11**				

Aislamiento	CIM (mg/L)	Mutación en <i>gyrA</i>	Genes codificantes para bombas de expulsión*	Mutación	Expresión relativa	
M T B - X D R	TBR-103	4	NM	<i>Rv1217c</i>	G517A /Ala173Thr	1,15
				<i>Rv1218c</i>	A728G/Gln243Arg	1,32
				<i>Rv2936-drrA</i>		1,52
				<i>Rv2937-drrB</i>		1,44
				<i>Rv2938-drrC</i>		1,20
				<i>Rv1819c-bacA</i>		1,24
				<i>Rv0194</i>	T221C/Met74Thr	1,34
				<i>Rv1273c</i>		1,14
				<i>Rv1272c</i>		1,16
				<i>Rv2477</i>		1,33
				<i>Rv1348</i>		3,77*
				<i>Rv1349</i>		1,16
				<i>Rv1456c</i>		1,18
				<i>Rv1457c</i>		1,14
				<i>Rv1458c</i>	A397G / Thr133Ala	1,20
				<i>Rv1473</i>		1,15
				<i>Rv1667c</i>	1042_1052insCGCGGCAAGA	1,11
				<i>Rv1668c</i>		1,23
				<i>Rv1463</i>	A593G/Glu198Gly	1,40
				<i>Rv1686c</i>		1,41
				<i>Rv1687c</i>		1,41
				<i>Rv2688c</i>	C466A/Pro156Thr	1,31
				<i>Rv2687c</i>		1,66
				<i>Rv2686c</i>		1,31
				<i>Rv3000</i>		1,31
				<i>Rv1747</i>		1,16
<i>Rv3781-rfbE</i>		1,43				
<i>Rv2136c</i>		1,40				
<i>Rv2209</i>		1,49				

NM: No mutada

* Expresión relativa obtenida al exponer el aislamiento a 1 mg/L de LVX

** Expresión relativa obtenida al exponer el aislamiento a 2 mg/L de LVX

6. DISCUSIÓN

6.1 Análisis de CIM y presencia de mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* y en genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC

La resistencia a FQs en MTB se ha explicado principalmente por las mutaciones cromosomales en los genes *gyrA* y *gyrB*, donde las mutaciones principalmente asociadas a la resistencia a LVX ocurren en la región QRDR tales como Ala90Val, Asp94 (Ala, Gly, His, Asn, Tyr), Ser91Pro del gen *gyrA*. En *gyrB* se puede observar mutaciones que ocurren con menos frecuencia como Glu503Asp, Asp500 (Ala, His, Asn), Gly509Ala y Glu540 (Val, Asp) (10,58).

En el presente estudio se evaluó la resistencia a FQ, específicamente a LVX, la cual es la FQ recomendada por la OMS para el tratamiento de la TB-MDR (5). Al analizar los mecanismos genéticos de resistencia a FQ, se observó que la mutación más frecuente en los aislamientos de este estudio ocurrió en el gen *gyrA* en la posición 94. Según estudios previos ésta es la mutación más reportada a nivel global como causante de resistencia a FQ (59). Un aislamiento presentó SNP en la posición 91 (Ser91Pro) la cual también se ha asociado con resistencia a FQs (60).

Un pequeño porcentaje de la resistencia a FQ se le atribuye a la presencia de mutaciones en el gen *gyrB* (61). Se ha descrito que éste gen también tiene identificada una región QRDR entre los codones 461-499 (58). Mutaciones en esta región también se han descrito como posibles responsables de resistencia a FQs (58,61). En el presente estudio se encontró un aislamiento (TBGL-28) con mutaciones tanto en el gen *gyrA* (Asp94Ala) como en *gyrB* (Glu501Asp). Esta mutación encontrada en *gyrB* fue reportada por *Maruri et al.* 2012, en aislamientos

con resistencia a OFX y MOX (62); la CIM para este aislamiento fue 16 mg/L, siendo la CIM más alta encontrada en los aislamientos clínicos analizados en este estudio, esto puede estar relacionado con la presencia de mutaciones simultáneas en los dos genes blanco. Algunos estudios han reportado que la acumulación de mutaciones en estos dos genes están asociados con altos niveles de resistencia a FQs (59,63), a diferencia del estudio realizado por *cui et al. 2011* en el que se refiere que no hay diferencia significativa entre el nivel de CIM y la presencia de mutaciones en *gyrA* o *gyrA-gyrB* (64). Cuatro aislamientos MTB-MDR (MDR-5051, TBGL-129, TBGL-81 y TBR101) presentaron el cambio Ser95Thr, el cual se ha catalogado como un SNP que no confiere resistencia, debido a que aparece en aislamientos clínicos pan-susceptibles, MTB-MDR y MTB-XDR y por lo tanto se ha asociado con cambios evolutivos de la micobacteria sin asociación con resistencia (59–61). Un aislamiento MTB-XDR (TBR-103) no presentó mutaciones asociadas con resistencia a FQ, pero tiene resistencia fenotípica a LVX con una CIM de 4 mg/L. Se ha reportado que el 15-18% de aislamientos con resistencia fenotípica a FQs no presenta mutaciones en genes blanco, lo cual puede indicar la presencia de otros mecanismos de resistencia como las bombas de expulsión tipo ABC que pueden estar actuando de manera individual o sinérgica para el desarrollo de resistencia fenotípica (65).

Estudios han demostrado que las bombas expulsión, en este caso las tipo ABC, tienen un papel importante en el mecanismo de fármaco-resistencia, ya que expulsan el antibiótico hacia el exterior de la célula, disminuyendo así la posibilidad de que el antibiótico entre en contacto con su blanco de acción (36). En MTB estas proteínas están codificadas por el 2.5% del genoma y se ha reportado que su papel en la resistencia a fármacos anti-TB es debida al incremento en la expresión de los genes que las codifican cuando se somete el aislamiento a condiciones de estrés, tales como concentraciones sub-inhedoras (49,66). El estudio de las bombas de expulsión ha cobrado importancia debido al problema

creciente de la resistencia a antibióticos (49), sin embargo todavía falta un gran campo por explorar, ya que hay genes codificantes para estos tipos de proteínas que aún no han sido bien caracterizados. Estudios previos han reportado cambios de expresión en los genes *Rv0194*, *Rv1217*, *Rv1218*, *drxA*, *drxB*, *Rv2688*, *Rv1273*, *Rv1819*, *Rv1458* y su posible efecto en la CIM (48,67).

En el presente estudio se evaluaron 29 genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC, de los cuales sólo nueve presentaron SNPs o indels. El gen *Rv1217c* se encontró un SNP en la posición 173, el cual se presentó en el aislamiento MTB-XDR TBR-103, este aislamiento no posee mutaciones asociadas con resistencia a FQs en los genes blanco. El SNP encontrado genera el cambio Ala173Thr, una mutación previamente reportada aunque con un cambio de aminoácidos diferente (68). Estudios realizados en MTB han reportado mutaciones en el gen *Rv1218c*, (Ile603Val, Gln243Arg y Leu151Arg) que pueden estar presentes en aislamientos MTB-MDR y MTB-XDR (48,67,69). En todos los aislamientos MTB-XDR analizados en este estudio (5/5) y en cuatro aislamientos MTB-MDR (4/5), se encontró el polimorfismo Gln243Arg, pero no se observaron los cambios Ile603Val y Leu151Arg. La presencia de la mutación Gln243Arg en los aislamientos clínicos MTB-MDR y MTB-XDR analizados puede estar relacionado con la resistencia a INH y RIF, ya que esta bomba codificada por los genes *Rv1217c-Rv1218c* está descrita como una proteína que aumenta la CIM de estos fármacos(46). El aislamiento TBGL-140 mostró una mutación no reportada, Val8Ala y de igual forma presenta una inserción de tres bases nucleótidas 318_321insGGC no reportada; esta inserción genera la adición de un aminoácido (glicina) a la proteína en la posición 105, no obstante, en un estudio previo realizado la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la Corporación para Investigaciones Biológicas, se observó que esta inserción no afecta motivos ni dominios de la proteína (70).

El aislamiento TBR-103 tiene una mutación en el gen *Rv1458c* en la posición 133 (Thr133Ala) el cual es reportado por *Kuan et al. 2015* y *Koster et al. 2018* en aislamientos MTB-XDR (68,69). Este aislamiento (TBR-103) como ya se ha mencionado, no tiene mutaciones asociadas con resistencia a LVX en genes blanco, y la presencia de esta mutación (Thr133Ala) en la proteína *Rv1458c*, podría indicar que el gen que la codifica, que hace parte de la bomba *Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c* cuya estructura es similar a otra proteína transportadora que ha sido asociada con resistencia a FQs, puede estar contribuyendo al fenotipo resistente, ya que en estudios previos se ha asociado la presencia de mutaciones en genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC, con el aumento de la expresión de los mismos (23,69,71).

Se han reportado otras mutaciones como Ser333Ala y Ala4Gly en la proteína *Rv1458c* (48,67), las cuales no se presentaron en ninguno de los aislamiento evaluados en el presente trabajo. Todos los aislamientos MTB-XDR (5/5) y tres MTB-MDR (3/5) tienen un cambio en el gen *Rv2688c* en la posición 156 (Pro156Thr). Éste cambio fue reportado por *Kanji et al. 2017* y *Kuan et al. 2015*, sólo en aislamientos MTB-XDR, pero no se han realizado estudios que permitan determinar el efecto que puede tener esta mutación en la proteína y su asociación con resistencia a FQs (48,69). El gen *Rv2687c* tiene un cambio en la posición 220 (Arg219Trp) en dos aislamientos MTB-MDR (MDR-5051 y TBGL-129), el cual no se encuentra reportado, es por esto que se requiere de más estudios que permitan esclarecer el efecto de este polimorfismo en la proteína. Este cambio se encuentra en la región X de la proteína.

Todos los aislamientos MTB-XDR (5/5) y cuatro MTB-MDR, presentaron un SNP en el gen *Rv0194* el cual genera un cambio en la proteína en la posición 74 (Met74Thr), el cual ha sido reportado en varios estudios en aislamientos MTB-MDR y MTB-XDR, como marcador evolutivo (48,67,69), lo cual nos indica que esta

mutación posiblemente no contribuye a fenotipos resistentes. El gen *Rv1463* presentó un polimorfismo en un solo aislamiento, MTB-XDR (TBR-103), que no tiene mutaciones asociadas con resistencia a LVX en genes blanco. Este SNP genera un cambio de un Ácido glutámico por glicina (Glu198Gly) en la posición 98 de la secuencia proteica que no está reportada en estudios previos, es por esto que se podría plantear la hipótesis, que esta mutación en este gen podría estar involucrados en procesos de resistencia a LVX.

Es importante mencionar que el comportamiento de las CIM no tuvo una variación importante con respecto a la presencia de mutaciones en los genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC en los aislamientos estudiados. Sin embargo, es necesario resaltar el comportamiento de aislamientos particulares como el TBR-103, el cual reúne varias mutaciones únicas (ausentes en los otros aislamientos) en tres genes codificantes de bombas de expulsión *Rv1217c*, *Rv1458c* y *Rv1463* y no posee los mecanismos clásicos de resistencia a LVX como lo son mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*. Estas observaciones nos llevan a plantear que muy posiblemente las proteínas de expulsión en este aislamiento tengan un papel principal, en el desarrollo de resistencia fenotípica a FQ.

6.2 Análisis de expresión relativa de 29 genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC en aislamientos de MTB-MDR y MTB-XDR

La expresión de los genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC ha sido evaluada en varios estudios, en los cuales se ha propuesto que la actividad de estas bombas son afectadas por la exposición a concentraciones sub-inhedoras de los medicamentos antituberculosos y que su expresión es mayor en los aislamientos clínicos que en la cepa de referencia MTB H37Rv (49,67). Es por lo que, en nuestro estudio, se identificaron los posibles cambios en la expresión

relativa en los 10 aislamientos clínicos (MTB-MDR y MTB-XDR) expuestos a diferentes concentraciones sub-inhedorias de LVX; la no exposición a LVX se tomó como control.

Para la bomba de expulsión Rv1217c-1218c, se pudo observar disminución en la expresión del gen *Rv1217c* en la mayoría de los aislamientos clínicos MTB-MDR (4/5), sin embargo, en el aislamiento TBGL-140 se encuentra aumentada, sugiriendo que en este aislamiento esta bomba podría estar transcribiéndose más activamente en respuesta a la exposición a LVX (Anexo 13). Para los aislamientos clínicos MTB-XDR (concentración 2 mg/L de LVX) se observa que hay un aumento en la expresión en 3 de ellos (TBGL-28, TBR-103 y TBR-152), existiendo una variación en los valores de expresión, mostrando general una disminución de la expresión relativa con respecto a los valores observados en la concentración de 1 mg/L de LVX, a excepción del aislamiento TBR-103 que muestra un aumento en la expresión (1.15); es importante recordar que este aislamiento es el único que tiene una mutación en el gen *Rv1217c* (Ala173Thr), que podría estar ayudando a generar un aumento en la expresión de este gen (Anexo 13). En un estudio hecho por *Garima et al. 2015*, se evaluaron los diferentes perfiles de expresión relativa en los genes como *Rv0194*, *Rv1819c-bacA*, según la concentración sub-inhedoria de RIF, INH y EMB (1/2 CIM, 1/3 CIM y 1/4 CIM) reportando que estas concentraciones pueden afectar la forma de actuación de las bombas de expulsión tipo ABC (67), lo cual podemos observar en nuestro estudio, ya que la mayoría de aislamientos MTB-XDR, al ser expuestos a una concentración sub-inhedoria de 2 mg/L disminuyen su expresión relativa. Cabe destacar que el aislamiento MTB-XDR, TBR-152, presenta el valor de expresión relativa más alto en este grupo de aislamientos clínicos (2.37) en la exposición a 1 mg/L de LVX, indicando así, que, en este aislamiento, posiblemente, las bombas de expulsión estén actuando de forma elevada para contrarrestar las concentraciones de LVX a las que han sido expuestas.

El gen *Rv1218c* en la concentración de 2 mg/L de LVX (MTB-XDR) se muestra con una expresión aumentada en el aislamiento clínico TBR-103; este aislamiento presenta en los 29 genes de bombas de expulsión, una expresión aumentada leve, al ser expuesto a LVX, soportando la teoría que las bombas de expulsión juegan un gran papel importante en la resistencia a FQs. El aumento de expresión de estos genes (*Rv1217c-Rv1217c*) se ha visto asociada con el transporte de varios sustratos como novomicina y pirazoles, y con la resistencia a INH y RIF (49,72), pero como se observó en el presente estudio, también son afectadas por la exposición a LVX, lo cual crea la necesidad de realizar más estudios para conocer, si esta bomba puede tener una variabilidad en la afinidad de sustratos, permitiendo así el transporte de varios fármaco anti-TB.

La bomba de expulsión *Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c*, se ha asociado con la resistencia a FQs, al ver que el incremento en la expresión de sus genes genera el aumento de los valores de CIM en *M.smegmatis* (45,48). En los aislamientos clínicos MTB-XDR de este estudio, el gen *Rv2686c* tiene una expresión aumentada en TBR-103, la cual aumenta a medida que la concentración de LVX es mayor pasando de 1.11 veces a 1.31 veces, lo cual nos sugiere que al ser retado por una mayor concentración requiere de un trabajo mayor para poder disminuir la concentración intracelular del antibiótico y por lo tanto contribuir a la resistencia fenotípica. Varios estudios muestran que éste gen se encuentra con un aumento de expresión en aislamientos MTB-XDR a pesar de no ser expuesto a concentraciones sub-inhibitoria de FQs (48,73,74), lo cual es similar a los resultados obtenidos en este estudio.

Estos hallazgos son compatibles con los resultados de diferentes estudios en el que el aumento de expresión de este gen está presente sólo en MTB-XDR (48,73); también se observó que este gen tienen un cambio de Arg219Trp, presente sólo

en los aislamientos MDR-5051 y TBGL-129, lo cual nos sugiere que posiblemente esta mutación no está asociada con resistencia a LVX. En tres aislamientos clínicos MTB-XDR se observó que el gen *Rv2687c* tuvo un aumento en la expresión, particularmente en el aislamiento TBR-152, con un aumento de 10.67 veces, mostrando así que esta bomba posiblemente esté contribuyendo a la resistencia a LVX, actuando posiblemente de forma sinérgica con la mutación en el gen blanco (*gyrA*) (Anexo 13) (45,48,73). El gen *Rv2688c* de igual forma muestra un leve aumento de expresión, en los aislamientos MTB-XDR expuestos a 1 mg/L de LVX (TBR-103 y TBR-152) y se observó que la expresión relativa aumenta a medida que la concentración de LVX es mayor, mostrando que el aislamiento TBR-103, de nuevo mantiene los niveles de expresión altos como posible mecanismo de resistencia.

En un estudio realizado en el año 2017, se reporta que a pesar de que los niveles de expresión de la bomba *Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c* son significativamente más elevados en aislamientos clínicos que en la cepa de referencia MTB-H37Rv, permanecen disminuidos en los aislamientos clínicos pan-susceptibles y MTB-MDR (74), lo cual es evidenciado en nuestros resultados, a excepción del aislamiento clínico MTB-MDR TBGL-140 quien muestra una expresión relativa elevada en la gran mayoría de sus genes con valores de expresión relativa superiores a dos, por lo tanto se requieren más estudios en este aislamiento para poder conocer las razones de esto, pues a pesar de que su fenotipo es susceptible (CIM <0.5 mg/L), las bombas de expulsión se están comportando de forma diferente indicando una posible forma de adaptación a la exposición a LVX como un paso inicial al desarrollo de resistencia.

La bomba *Rv2936-drrA-Rv2937-drrB-Rv2938-drrC*, se ha visto asociada a la resistencia a FQs y etambutol, al estar aumentada la expresión de los genes que la codifican (48,49,73). En los aislamientos estudiados, se observó que estos

genes tuvieron una expresión aumentada en los aislamientos MTB-XDR; por otro lado los genes *Rv2936-drrA* y *drrB-Rv2938*, mostraron una expresión aumentada, en tres aislamientos clínicos MTB-MDR (MDR-101, MDR-5051 y TBGL-129) lo cual es coherente con los hallazgos de estudios previos, en donde se evidencia que su expresión es altamente afectada por concentraciones sub-inhibitoria de LVX (75) y que este sistema proteico posee la capacidad de transportar gran variedad de sustratos debido a que tiene residuos aromáticos en su sitio de unión (76). El aumento en la expresión de este sistema en aislamientos MTB-MDR se ha visto asociada a la resistencia a INH, en un estudio realizado por *Li et al 2015* (77), lo cual es coherente con los hallazgos encontrados en el presente estudio, mostrando así que la actividad de estas bombas posiblemente está asociada con resistencia a INH y también a FQs. En los aislamientos clínicos MTB-XDR del presente estudio, se observó que los genes *Rv2936-drrA-Rv2937-drrB* se encuentran con una expresión elevada principalmente en el aislamiento TBR-103, cuando es expuesto a una concentración de 1 mg/L, y esta expresión aumentó cuando la concentración de LVX fue incrementada a 2 mg/L.

El gen *Rv0194*, ha estado asociado con la resistencia a β -lactámicos en *M. smegmatis* y *M. bovis* pero no a medicamentos anti-TB de primera y segunda línea (48,49,78). En los aislamientos clínicos MTB-MDR del presente estudio, se observó un aumento en la expresión de este gen en dos aislamientos (TBGL-140 y TBGL-129) con una expresión relativa de 3.04 y 2.94 respectivamente, mostrando una actividad posiblemente mediada por la exposición a LVX. En los aislamientos clínicos MTB-XDR éste gen (*Rv0194*) se comportó de una forma similar a los MTB-MDR, bajo una concentración de LVX de 1.0 mg/L el aislamiento TBR-152 tiene una expresión relativa de 2.27 y al aumentar la concentración de LVX se observa que disminuye su expresión relativa a 1.10 veces, contrario a el comportamiento del aislamiento TBR-103, que aumenta su expresión relativa, mostrando una posible mayor actividad de la bomba facilitando una expulsión

mayor del medicamento, pues como ya se ha mencionado, este aislamiento no presenta un mecanismo de resistencia clásico (mutaciones en genes blanco), lo cual indica un mecanismo de resistencia alterno como las bombas de expulsión (Anexo 13) (67,78).

La bomba Rv1273c-Rv1272c hasta el momento, no tiene estudios que la asocien con el transporte de algún antibiótico en particular, pero se ha planteado la hipótesis de que permite en el transporte de ácidos grasos de cadena larga (79). En el grupo de los aislamientos MTB-MDR, TBR-140 mostró una expresión aumentada de 2.8 veces con respecto al control para el gen *Rv1272c*; en los aislamientos clínicos MTB-XDR no se observa una expresión diferencial para estos genes (*Rv1273c-Rv1272c*) excepto el aislamiento TBR-103, que aumentó su expresión relativa cuando se expuso a la concentración 2 mg/L de LVX. En un estudio realizado por *kanji et al 2017*, se reporta que este gen tiene aumentada su expresión en los aislamientos MTB-XDR pero no hay diferencia significativa cuando se compara con aislamientos MTB-MDR (48). Otros estudios reportan que esta bomba aumenta su expresión al ser expuesta a concentraciones sub-inhibitoria de diferentes medicamentos de primera línea y que de forma basal en aislamientos MTB-XDR está sobre expresada, ayudando así a la presencia de resistencia a medicamentos anti-TB (17,67,75).

Para la bomba Rv-1456c-Rv1457c-Rv1458c se ha reportado con un incremento en la expresión de sus genes en aislamientos MTB-XDR y MTB-MDR sin ser expuestos a medicamentos, pero no ha sido asociada con resistencia a ningún medicamento anti-TB (71). Sin embargo, en los aislamientos clínicos MTB-MDR de este estudio, se observa que los genes *Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c* presentan una elevación en su expresión en el aislamiento MTB-MDR, TBGL-140 con una expresión relativa de 2.72, 2.91 y 2.53 respectivamente, lo cual sugiere que esta bomba en este aislamiento posiblemente está siendo retada para así disminuir la

concentración intracelular de LVX. En los aislamientos clínicos MTB-XDR en la concentración de 1.0 mg/L de LVX, se observó que el aislamiento TBR-152 tuvo una expresión relativa de 4.49 (*Rv1456c*), 6.79 (*Rv1457c*) y 10.67 (*Rv1458c*) siendo los valores más altos encontrados en esta bomba, lo cual nos indica que esta bomba posiblemente esté más activa en este aislamiento contribuyendo a su fenotipo resistente. El aislamiento TBR-103 tiene una mutación única en el gen *Rv1458c*, (Thr133Ala), y la expresión relativa es de 1.20, mostrándose levemente aumentada. Se ha reportado que esta bomba tiene un comportamiento similar a *Rv2688c-Rv2667c-Rv2686c*, debido a que su conformación estructural es parecida, por lo tanto se espera que también su perfil de expresión se encuentre elevado ante la exposición a LXV, indicando que esta proteína podría estar contribuyendo al perfil de resistencia a LVX (17,23,48,67,71).

La bomba *Rv1348-Rv1349*, está implicada en el transporte de hierro en las micobacterias, no se han hecho reportes asociándola con resistencia a medicamento anti-TB (23,80). En este estudio se encontró esta bomba tiene una disminución en su expresión en los aislamientos MTB-MDR, que en su mayoría presentaron valores de expresión relativa inferiores a 1, pero cabe destacar que en el aislamiento TBGL-140, los genes *Rv1348-Rv1349*, estuvieron elevados, expresión relativa de 2.63 y 2.31 respectivamente, indicando una vez más que en este aislamiento, particularmente, muestra una expresión mayor en varios genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC (Anexo 13). Esta expresión elevada en este gen, también se pudo evidenciar en los aislamientos MTB-XDR cuando fueron expuestos a las dos concentraciones de LVX. El aislamiento TBR-103 en el gen *Rv1348* mostró una expresión relativa de 3.77 en la exposición a 1.0 mg/L de LVX, se puede plantear que en este aislamiento hay un aumento en la expresión de estos genes posiblemente como mecanismo de resistencia. El gen *Rv1349* presentó un aumento en la expresión, en la concentración de 1.0 mg/L de LVX en el aislamiento TBR-152 con una expresión relativa de 3.32 y no se

observaron mutaciones en este gen. Nuestros resultados indican que la expresión de esta bomba aumenta al exponer los aislamientos a LVX, sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios adicionales para verificar si su sobreexpresión está relacionada con la exposición a LVX.

El gen *Rv1473* se ha descrito como una bomba tipo ABC asociada a la expulsión de macrólidos en *M. smegmatis* y *M. avium*, ya que encuentra la expresión aumentada al ser expuesto a azitromicina (23,81,82). En el presente estudio se observó en los aislamientos clínicos MTB-XDR tuvieron un aumento en la expresión de este gen en el aislamiento TBR-103 con una expresión relativa de 1.14 y 1.16 en la exposición a LVX, indicándonos que en este aislamiento posiblemente el aumento de expresión de este gen contribuya a la resistencia fenotípica a LVX a pesar de ser descrita como un transportador de macrólidos, ya que como se ha estudiado en otras bombas de expulsión tipo ABC pueden presentar afinidad a varios sustratos (83).

La bomba de expulsión *Rv1667c-Rv1668c* es un transportador de macrólidos asociado recientemente por *Zhang et al 2017*, con resistencia a pirazinamida, al demostrar que la elevación en la expresión de sus genes generan un aumento en la CIM de este medicamento, pero no altera la CIM de otros medicamentos anti-TB (84). A pesar que *Zhang et al. 2017* reporta que esta bomba de expulsión no es afectada por la exposición a otros medicamentos anti-TB como las FQs, en nuestro estudio podemos observar que la expresión de estos genes aumenta en aislamientos MTB-XDR al ser expuestos a diferentes concentraciones de LVX, por ejemplo el aislamiento MTB-XDR TBR-152, quien muestra valores de expresión relativa para el gen *Rv1668c* de 2.87 en la concentración de 1.0 mg/L de LVX y 1.14 en la concentración de 2.0 mg/L. Un comportamiento similar se observa en el aislamiento TBR-103 que al ser expuesto a una concentración de 2.0 mg/L de LVX mostró una expresión relativa de 1.23. Estos resultados nos indican que ha pesar

de que ésta bomba ha sido asociada principalmente con el transporte de macrólidos, puede existir una variabilidad en la afinidad en el dominio TMD de la proteína, generando así el transporte de varios sustratos como la LVX.

El aumento en la expresión de la bomba de expulsión Rv1686c-Rv1687 no ha sido asociada como mecanismo de resistencia a medicamentos anti-TB, pero Betts *et al* 2003 reportó que estos genes son inducidos por Triclosan, el cual es un biocida presente en productos de limpieza (85); contrario a lo reportado por Gómez *et al* 2016, quien no encuentra asociación con la presencia de resistencia a Triclosan (86). En el presente estudio se observa que los genes *Rv1686c-Rv1687c* tienen un leve incremento en su expresión en los aislamientos (MDR-101 y TBGL-129) con una expresión relativa de 1.14-1.20; de igual forma se encuentran con una expresión aumentada en el aislamiento MTB-XDR TBR-103 expuestos a una concentración de 1 mg/L de LVX, cabe resaltar que al aumentar la concentración de LVX a 2.0mg la expresión relativa de igual manera aumenta. La sobreexpresión en los aislamientos MTB-MDR y MTB-XDR bajo condiciones de exposición a LVX, puede indicar que esta bomba puede contribuir a los perfiles de resistencia fenotípica a primera y segunda línea.

Se ha descrito que en el gen *Rv1819c-bacA* presenta aumento en su expresión cuando el aislamiento es expuesto a concentraciones sub-inhíbitora de antibióticos de primera línea, pero no se tienen datos del comportamiento de esta bomba ante fármacos de segunda línea (67). En un estudio realizado en el 2013 por Calgin *et al*, no se observó diferencia significativa entre la expresión relativa de este gen entre aislamientos MTB-MDR y pan-susceptibles, a pesar de que se observó levemente aumentado con respecto a la cepa de referencia MTB H37Rv (17). En el presente estudio se mostró que tres aislamientos expuestos a 1.0 mg/L de LVX (TBR-103, TBR-152 y TBR-102) y en la concentración de 2.0 mg/L se observa una disminución en la expresión relativa de los aislamientos TBR-152 y

TBR-103. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que esta bomba posiblemente no esté implicada en la resistencia a LVX. *Jiang et al 2008*, reporta expresión aumentada de éste gen, al exponer un aislamiento a INH (87).

El gen *Rv2477* ha sido estudiado como posible marcador de resistencia a amikacina, y se ha observado que al exponer los aislamientos a ofloxacina se genera un aumento en su expresión en aislamientos MTB-MDR (88,89). En los aislamientos clínicos MTB-XDR evaluados en el presente estudio se observó un aumento en la expresión en el aislamiento TBR-103, al ser expuesto a las dos concentraciones de LVX (1 mg/L y 2 mg/L). Los hallazgos obtenidos en este estudio nos muestran que esta bomba de expulsión no solo aumenta su expresión por la exposición a OFX, como lo reporta *Gupta et al 2010*. (89), sino que también es afectada por concentraciones sub-inhibitoria de LVX, contribuyendo así a la aparición de fenotipos resistentes.

La bomba de expulsión *Rv1747* no está totalmente descrita y no se tiene certeza sobre el tipo de molécula por la que tiene afinidad, sin embargo, se han planteado varias hipótesis acerca de su función, una de ellas es que esta bomba está involucrada en procesos de síntesis de la pared celular (90). En el presente estudio se observó un aislamiento clínico MTB-MDR con expresión elevada, TBGL-140, con una expresión relativa de 1.26 y en los aislamientos MTB-XDR expuestos a 2.0 mg/L de LVX se observa que dos aislamientos (TBGL-28 y TBR-103) presentaron una expresión levemente aumentada, con una expresión relativa entre 1.12-1.16. El aumento de expresión de este gen podría estar asociada con la posible función que reporta *Heinkel et al. 2018*, que implica el transporte de metabolitos involucrados en la síntesis y/o reparación de la pared celular (90). Se requieren mayores estudios para poder determinar su función en la resistencia a FQs.

La bomba de expulsión Rv3781-rfbE ha sido asociado con el transporte de polisacáridos al exterior de MTB, y se dice que posiblemente el sustrato es el lipoarabinomano, sin embargo no hay datos de la expresión relativa que pueda ser asociada con resistencia a medicamentos (91,92). En el presente estudio se encontró que para el gen *Rv3781-rfbE* la expresión está levemente elevada en el aislamiento MTB-XDR, TBR-103 con una expresión relativa de 1.16 y 1.19 respectivamente. Al aumentar la concentración de LVX, se observó que este aislamiento aumentó su expresión a 1.43.

El gen *Rv3000* codifica para un posible proteína transmembranal, *Calgin et al. 2013* estudia su perfil de expresión en aislamientos MTB-MDR y pan-susceptible, y se evidencia que su expresión en aislamientos MTB-MDR es más elevada que en la cepa de referencia MTB H37Rv (17). En el presente estudio se observa que en el aislamiento clínico MTB-MDR TBGL-140 tiene una expresión relativa 2.66 lo cual indica un aumento en su expresión y una posible actividad aumentada de esta bomba en respuesta a la exposición a 0.5 mg/L de LVX. Por otro lado, dos de los aislamientos clínicos MTB-XDR, presentaron aumento en la expresión relativa de 1.25 (TBGL-28) y 6.95 (TBR-152), sin embargo, estos resultados necesitan ser explorados para comprender el papel de esta bomba en la resistencia a FQ.

La proteína de expulsión Rv1463 se ha visto asociada a procesos adaptativos en condiciones de estrés por hipoxia (93), no se ha reportado estudios en los cuales, se evalúe su posible papel en la resistencia a medicamentos anti-TB. En el presente estudio se observó que el aislamiento MTB-XDR, TBGL-103 con una CIM de 4 mg/L, tiene una mutación única en este gen (Glu198Gly) y la expresión relativa en la exposición a 2 mg/L es de 1.40. El aislamiento MTB-XDR TBGL 152 mostró una expresión relativa de 3.26, el cual es el valor más alto observado en los aislamientos analizados. Debido a que esta proteína está asociada a procesos adaptativos a condiciones de estrés por hipoxia (93), se podría pensar, que

también se puede sobre expresar por estrés a la exposición a antibióticos anti-TB y contribuir con la resistencia.

El gen *Rv2209* ha sido relacionado con resistencia a OFX, ya que *Gupta et al. 2010* observó que al exponer un aislamiento MTB-MDR con resistencia a OFX, aumenta su expresión. En los aislamientos clínicos MTB-MDR del presente estudio, se encontró que el aislamiento TBGL-140 (MTB-MDR), tuvo una expresión relativa de 2.10, lo cual nos puede indicar que la LVX también puede ser un sustrato para esta bomba. En los aislamientos clínicos MTB-XDR, se observó una elevación en la expresión en dos aislamientos en la exposición a 1 mg/L, en especial el aislamiento TBR-152 que tuvo una expresión relativa de 11.20, demostrando una gran actividad en esta bomba de expulsión en este aislamiento, contribuyendo al fenotipo resistente (Anexo 13).

El gen *Rv2136c* se asocia con resistencia a RIF ya que en un estudio realizado por *Jiang et al. 2008*, se encuentra sobre expresado en aislamientos MTB-MDR expuestos y no expuestos a RIF (87). En el presente estudio, se observó que este gen se encuentra levemente aumentada la expresión en dos aislamientos clínicos MTB-MDR (MDR-101 y TBGL-129) con una expresión relativa 1.16 y 1.17 respectivamente, lo cual es coherente con el estudio realizado por *Jian et al. 2008*. En los aislamientos clínicos MTB-XDR del presente estudio, expuestos a LVX en las dos concentraciones, se evidenció expresión aumentada del aislamiento TBR-103. Estos hallazgos sugieren que esta bomba, posiblemente también sea inducida por FQs, al verse el aumento de expresión en los aislamientos MTB-MDR y MTB-XDR bajo condiciones de exposición a LVX, por lo tanto, podría estar involucrada en la resistencia a FQs.

6.3 Presencia de mutaciones en los 42 genes reguladores de genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC

Estudios previos han reportado que el gen regulador *Rv0324* parece estar asociado con la generación de tolerancia a bradiquinina, MXF y capreomicina en MTB. Ésta hipótesis surgió al observar que la expresión de éste gen aumentaba cuando el aislamiento era expuesto a estos fármacos (94). Hasta el momento, no hay estudios en este gen que evalúen la presencia de SNPs que puedan estar contribuyendo al aumento de expresión en los genes en los cuales cumple funciones de regulación (*Rv1819c-bacA*, *Rv3781-rfbE* y *Rv3000*) y su posible asociación con resistencia. En el presente estudio se observó que el gen *Rv0324* presentó una mutación en la posición 168, generando un cambio de una treonina por una alanina (Thr168Ala) en dos aislamientos MTB-MDR (TBGL-81 y MDR-101) y en cuatro aislamientos MTB-XDR (TBGL-28, TBGL-49, TBR-103 Y TBR-102). Al analizar los genes que son regulados por este gen (*Rv0324*) se pudo observar que en los aislamientos MTB-MDR (TBGL-81 y MDR-101) el gen codificante para bomba de expulsión tipo ABC, *Rv3000* no presenta aumento en la expresión relativa; el gen *Rv1819c-bacA* y *Rv3781-rfbE* tienen un aumento leve en su expresión relativa al exponer los aislamientos a LVX (expresión relativa 1.70 y 1.12) (Anexo 15). En los aislamientos MTB-XDR (TBGL-28, TBR-103 Y TBR-102) se observó que los genes codificantes *Rv1819c-bacA*, *Rv3781-rfbE* y *Rv3000* presentaron un aumento en la expresión relativa. Es importante mencionar que mutaciones en genes reguladores pueden incrementar la actividad de expulsión de las proteínas transportadoras y así contribuir a la resistencia fenotípica (95).

El gen *Rv0302* es un regulador transcripcional de la familia TetR, y se ha reportado que esta familia juega un papel importante en la regulación de diferentes genes asociados a resistencia a Etambutol (EMB) (96), pero no se han realizado estudios que evidencien los posibles SNPs presentes en éste gen, ni perfiles de

expresión que estén asociados con resistencia a FQs. En el presente estudio se observó que sólo el aislamiento MTB-XDR, TBR-103, presenta el cambio His84Asp. Este gen regulador (*Rv0302*) tiene función sobre los genes codificantes *Rv1217c-Rv1218c*, *Rv2936-drrA-Rv2937-drrB-Rv2938-drrC* y *Rv3781-rfbE*, quienes en el aislamiento TBR-103 presentan un aumento en la expresión relativa (1.10-1.52).

El gen regulador *Rv0273c* es un activador transcripcional de la familia TetR, el cual actúa como represor y regulador negativo de la expresión de *inhA*, se ha reportado que concentraciones sub-inhedoras de EMB puede aumentar la susceptibilidad de los aislamientos de MTB a INH (97). No se ha reportado mutaciones asociadas al aumento de expresión de este gen que contribuyan a fenotipos resistentes a medicamentos anti-TB. En el presente estudio se identificó una mutación en el gen *Rv0273c* (Cys167Tyr) en dos aislamientos MTB-MDR (TBGL-129 y MDR-5051). Este gen regulador actúa sobre los genes codificantes *Rv1348*, *Rv3936-drraA*, *Rv2937-drrB* y *Rv2936-drrC*, quienes, en los dos aislamientos ya mencionados, presentan un aumento en la expresión relativa de los genes *Rv3936-drraA*, *Rv2937-drrB* y *Rv2936-drrC* con valores entre 1.10 y 1.44 al ser expuestos a las dos concentraciones de LVX (1 mg/L y 2 mg/L respectivamente) (Anexo 15).

El gen *Rv0678* codifica para un represor de bombas de expulsión de la super familia de resistencia- nodulación-división (RND), mutaciones en éste gen causa un aumento significativo en la expresión de las bombas de expulsión MmpS5-MmpL5, asociando este proceso con resistencia a clofazimina y badaquilina en aislamientos MTB-MDR expuestos a estos fármacos (98,99). En el presente estudio, se observó que el aislamiento MTB-MDR TBGL-129, presenta un cambio en la posición 112 (Glu112Lys) el cual no está reportado. Los genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC, *Rv2937-drrB*, *Rv2938-drrC* y *Rv3781-rfbE*,

los cuales también son regulados por *Rv0678*, se encuentran con un leve aumento de la expresión relativa al ser expuestos a 0.5 mg/L de LVX con valores entre 1.10-1.35. Estos hallazgos nos muestran que posiblemente ésta mutación afecte la expresión de los genes sobre los cuales ejerce función reguladora, aumentando su expresión relativa, lo cual fue contrario a lo observado por *Villellas et al. 2017*, ya que no observa aumento en la expresión de aislamientos expuestos a concentraciones sub-inhedoras de OFX, LVX y MOX (98).

El gen *Rv2488c* es un gen regulador transcripcional de la familia LuxR, *Schürch et al. 2011* reporta una mutación en la posición 265 generando un cambio de treonina a isoleucina (Thr265Ile), el cual, es un cambio presente en aislamientos clínicos MTB pertenecientes al linaje Beijing y su posible efecto en esta proteína es la disminución de la hidrofobicidad del núcleo proteico (100). No se han realizado estudios que asocien esta mutación con resistencia a medicamentos anti-TB ni el efecto que pueda generar. En el presente estudio el aislamiento MTB-XDR TBR-103, el cual pertenece al linaje Beijing, tiene la mutación reportada previamente por *Schürch et al. 2011*, Thr265Ile en el gen *Rv2488c*. Los genes codificantes para bombas de expulsión, *Rv1217c-Rv1218c*, sobre los cuales ejerce función reguladora el gen *Rv2488*, su expresión relativa se encuentra levemente aumentada (1.10-1.32) al ser expuestos a las dos concentraciones de LVX (1 mg/L y 2 mg/L respectivamente) Anexo 15.

El gen *Rv3862c* es una proteína reguladora perteneciente a la familia WhiB, y se caracteriza por ser un sistema sensor de redox en MTB (101). *Rodríguez-Castillo et al. 2017* reporta que este gen presenta una mutación que genera un cambio en la proteína en la posición 53 (Cys53Arg) en un aislamiento MTB-MDR, la cual genera una alteración en la proteína (102). El hallazgo de *Rodríguez-Castillo et al. 2017* es contrario a los resultados en el presente estudio, en donde se observó que la mutación Cys53Arg, está presente en un aislamiento MTB-XDR (TBR-103).

El gen *Rv3781-rfbE*, codificante para bombas de expulsión, es regulado por *Rv3862c*, cual presenta una expresión relativa aumentada al ser expuesto a las dos concentraciones de LXV (1.19-1.43 respectivamente).

En este estudio se analizaron los polimorfismos y perfiles de expresión presentes en 29 genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC y los polimorfismos presentes en 42 genes reguladores de bombas de expulsión. En este estudio encontramos datos coherentes con los descritos en la literatura con respecto a algunos polimorfismos, que se han asociado con el aumento en la actividad de bombas de expulsión tipo ABC en aislamientos MTB-MDR y MTB-XDR. Si bien el tamaño de la muestra fue pequeño para plantear asociaciones de estas mutaciones con resistencia a FQs, se obtuvieron datos bastante interesantes en donde el comportamiento de algunos aislamientos mostró una posible relación entre la resistencia fenotípica y la presencia de mutaciones en genes codificantes para bombas de expulsión. En el caso del aislamiento MTB-XDR TBR-103 se encontraron una serie de mutaciones únicas en estos genes con la particularidad de que este aislamiento expresa un fenotipo resistente a FQs en ausencia de mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*, las cuales se han descrito como el principal mecanismo de resistencia a FQ en MTB.

En este trabajo se analizaron genes, para la presencia de polimorfismos y perfiles de expresión, para los cuales hasta la fecha no hay ningún reporte que pueda definir su papel en la resistencia a medicamentos anti-TB y es por esta razón que es necesario profundizar en el mecanismo de acción y afinidad química de las bombas de expulsión en MTB para que, en un futuro, se facilite el diseño de nuevas moléculas que inhiban estas proteínas y actúen como adyuvantes en el tratamiento de la tuberculosis.

7. CONCLUSIONES

En este estudio se observó que un aislamiento presentó una CIM de 16 mg/L a LVX y tenía mutaciones en los dos genes blanco de LVX, *gyrA* y *gyrB*. Este hallazgo puede sugerir que la presencia de mutaciones en ambos genes favorece CIM elevadas a FQs en MTB.

En el presente estudio el comportamiento de las CIM no tuvo una variación importante con respecto a la presencia de mutaciones en los genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC en los aislamientos estudiados.

Se identificaron las mutaciones en proteínas de expulsión ABC (Ala173Thr, Thr133Ala y Glu198Gly) *Rv1217c*, *Rv1458c* y *Rv1463*, en un aislamiento MTB-XDR (TBR-103), el cual no posee mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*, las mutaciones observadas en estos genes no estaban presentes en aislamientos MTB-MDR, lo cual puede indicar que estas mutaciones posiblemente tienen un papel importante en la resistencia a LVX.

La identificación de mutaciones en genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC y sus genes reguladores son un paso inicial en el desarrollo de futuros estudios en los que se continúe explorando su participación en el desarrollo de resistencia fenotípica a LVX en aislamientos clínicos de MTB-XDR que no presentan mutaciones asociadas con resistencia en proteínas blanco de FQs.

La expresión aumentada de los genes que codifican para bombas de expulsión tipo ABC que están asociadas con resistencia de otros fármacos anti-tb, al ser expuestas a concentraciones sub-inhedoras de LVX en aislamientos MTB-MDR y MTB-XDR, nos permite sugerir que estas proteínas puedan poseer afinidad por varios tipos de antibióticos.

El aislamiento MTB-XDR TBR-103 (con ausencia de mutaciones en *gyrA* y *gyrB*) mostró un aumento en la expresión de los 29 genes codificantes para bombas de expulsión, lo cual nos permite concluir que, para este aislamiento, la expresión aumentada de bombas de expulsión es el principal mecanismo de resistencia a FQs.

Al analizar los polimorfismos presentes en los genes reguladores de bombas de expulsión en MTB, se encontraron mutaciones que no han sido reportadas, por lo tanto, se requieren más estudios que permitan aclarar el efecto de estas proteínas reguladoras en el desarrollo de resistencia a fármacos anti-TB.

8. PERSPECTIVAS

Es necesario continuar con el presente estudio para lograr un tamaño de muestra más significativo, que permita aclarar cuáles son las mutaciones, en proteínas de expulsión tipo ABC, que se asocian con resistencia a FQs.

Se requieren estudios *in silico* de modelamiento de las proteínas transportadoras tipo ABC, que permitan hacer predicciones funcionales sobre el efecto que generan las mutaciones encontradas en el desarrollo del fenotipo resistente a FQs.

Es importante continuar explorando el efecto de los genes reguladores en el perfil de expresión de las bombas de expulsión tipo ABC y su contribución al desarrollo de resistencia.

Limitaciones del estudio

El tamaño de muestra utilizado fue pequeño para lograr determinar una asociación entre las mutaciones en genes codificantes para bombas de expulsión tipo ABC y sus reguladores, con la CIM a LVX.

En los ensayos de expresión se utilizó a cada aislamiento de MTB no expuesto a LVX como control de sí mismo. Sin embargo, no se determinó el perfil de expresión en aislamientos pan-susceptibles para conocer las condiciones basales de expresión de los genes analizados.

9. REFERENCIAS

1. Vynnycky E, Fine PE. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiol Infect.* octubre de 1997;119(2):183-201.
2. Dheda K, Barry CE, Maartens G. Tuberculosis. *The Lancet.* marzo de 2016;387(10024):1211-26.
3. Lemos ACM, Matos ED. Multidrug-resistant tuberculosis. *Braz J Infect Dis.* marzo de 2013;17(2):239-46.
4. Lyon SM, Rossman MD. Pulmonary Tuberculosis. *Microbiol Spectr* [Internet]. 1 de febrero de 2017 [citado 7 de febrero de 2019];5(1). Disponible en: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0032-2016>
5. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. 2018.
6. Palomino J, Martin A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics.* 2 de julio de 2014;3(3):317-40.
7. Schmalstieg AM, Srivastava S, Belkaya S, Deshpande D, Meek C, Leff R, et al. The Antibiotic Resistance Arrow of Time: Efflux Pump Induction Is a General First Step in the Evolution of Mycobacterial Drug Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2012;56(9):4806-15.
8. Escribano I, Rodríguez JC, Llorca B, García-Pachon E, Ruiz M, Royo G. Importance of the Efflux Pump Systems in the Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Fluoroquinolones and Linezolid. *Chemotherapy.* 2007;53(6):397-401.

-
9. Maxwell A, Bush NG, Evans-Roberts K. DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus* [Internet]. 23 de octubre de 2015 [citado 7 de febrero de 2019];6(2). Disponible en: <http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.ES-P-0010-2014>
 10. Mayer C, Takiff H. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr* [Internet]. 22 de agosto de 2014 [citado 8 de abril de 2018];2(4). Disponible en: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.MGM2-0009-2013>
 11. Kashyap A, Singh PK, Silakari O. Chemical classes targeting energy supplying GyrB domain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. diciembre de 2018;113:43-54.
 12. Mustaev A, Malik M, Zhao X, Kurepina N, Luan G, Oppegard LM, et al. Fluoroquinolone-Gyrase-DNA Complexes: TWO MODES OF DRUG BINDING. *J Biol Chem*. 2 de mayo de 2014;289(18):12300-12.
 13. Alvarez N, Zapata E, Mejía GI, Realpe T, Araque P, Peláez C, et al. The Structural Modeling of the Interaction between Levofloxacin and the *Mycobacterium tuberculosis* Gyrase Catalytic Site Sheds Light on the Mechanisms of Fluoroquinolones Resistant Tuberculosis in Colombian Clinical Isolates. *BioMed Res Int*. 2014;2014:1-9.
 14. Holm M, Borg A, Ehrenberg M, Sanyal S. Molecular mechanism of viomycin inhibition of peptide elongation in bacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 26 de enero de 2016;113(4):978-83.

-
15. Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius NC, McEvoy CRE, Van Helden PD, Victor TC. A Balancing Act: Efflux/Influx in Mycobacterial Drug Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de agosto de 2009;53(8):3181-9.
 16. Paulsen IT, Sliwinski MK, Saier MH. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities 1 Edited by G. Von Heijne. *J Mol Biol.* abril de 1998;277(3):573-92.
 17. Calgin MK, Sahin F, Turegun B, Gerceker D, Atasever M, Koksall D, et al. Expression analysis of efflux pump genes among drug-susceptible and multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates and reference strains. *Diagn Microbiol Infect Dis.* julio de 2013;76(3):291-7.
 18. Siddiqi N, Pathak N, Banerjee S, Ahmed N, Katoch VM, Hasnain SE, et al. Mycobacterium tuberculosis Isolate with a Distinct Genomic Identity Overexpresses a Tap-Like Efflux Pump. *Infection.* 1 de abril de 2004;32(2):109-11.
 19. Rodrigues L, Machado D, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex. *Infect Genet Evol.* junio de 2012;12(4):695-700.
 20. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol.* marzo de 2009;10(3):218-27.
 21. ter Beek J, Guskov A, Slotboom DJ. Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol.* abril de 2014;143(4):419-35.
 22. Bhatti N, Chronos N, White JP, Larson E. A case of resistant tuberculosis. *Tubercle.* junio de 1990;71(2):141-3.

-
23. Braibant M. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev.* octubre de 2000;24(4):449-67.
 24. Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1 de junio de 2008;72(2):317-64.
 25. Licht A, Schneider E. ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Open Life Sci* [Internet]. 1 de enero de 2011 [citado 19 de febrero de 2019];6(5). Disponible en: <http://www.degruyter.com/view/j/biol.2011.6.issue-5/s11535-011-0054-4/s11535-011-0054-4.xml>
 26. Garza-Velasco R, Ávila-de Jesús J, Perea-Mejía LM. Tuberculosis pulmonar: la epidemia mundial continúa y la enseñanza de este tema resulta crucial y compleja. *Educ Quím.* enero de 2017;28(1):38-43.
 27. Kolumbien, editor. Guías de la promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública. T. 3: ... Bogotá: Ministerio de la Protección Social [u.a.]; 2007. 302 p. (Colección PARS).
 28. MINISTRO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. ACTUALIZACIÓN DE LOS LINEAMIENTOS PARA EL MANEJO PROGRAMÁTICO DE TUBERCULOSIS Y LEPROSIS EN COLOMBIA. 00007 feb 26, 2015 p. 27.
 29. Pandit A. Tuberculosis: A basic discourse. *Apollo Med.* junio de 2016;13(2):86-90.
 30. Dorman SE, Chaisson RE. From magic bullets back to the Magic Mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nat Med.* marzo de 2007;13(3):295-8.

-
31. Iseman MD. Evolution of drug-resistant tuberculosis: a tale of two species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 de marzo de 1994;91(7):2428-9.
 32. Malik S, Willby M, Sikes D, Tsodikov OV, Posey JE. New Insights into Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Functional Genetic Analysis of *gyrA* and *gyrB* Mutations. Via LE, editor. *PLoS ONE*. 28 de junio de 2012;7(6):e39754.
 33. Giraldo MR, Paniagua L. Dos años de seguimiento al control de la tuberculosis multidrogorresistente-TB-MDR a fármacos, Proyecto piloto comite luz verde Antioquia. :1-6.
 34. Johnson R, Streicher EM, Louw GE, Warren RM, van Helden PD, Victor TC. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Issues Mol Biol*. julio de 2006;8(2):97-111.
 35. Wayne LG. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. noviembre de 1994;13(11):908-14.
 36. Smith T, Wolff KA, Nguyen L. Molecular Biology of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. En: Pieters J, McKinney JD, editores. *Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis and its Interaction with the Host Organism [Internet]*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012 [citado 8 de abril de 2018]. p. 53-80. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/82_2012_279
 37. Rossi ED, Aínsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev*. enero de 2006;30(1):36-52.

-
38. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett.* 15 de octubre de 1994;123(1-2):11-8.
 39. Alvarez-Freites EJ, Carter JL, Cynamon MH. In vitro and in vivo activities of gatifloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* abril de 2002;46(4):1022-5.
 40. Lubasch A, Keller I, Borner K, Koeppe P, Lode H. Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin, and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* octubre de 2000;44(10):2600-3.
 41. da Cunha EFF, Barbosa EF, Oliveira AA, Ramalho TC. Molecular Modeling of *Mycobacterium Tuberculosis* DNA Gyrase and its Molecular Docking Study with Gatifloxacin Inhibitors. *J Biomol Struct Dyn.* abril de 2010;27(5):619-25.
 42. Piddock LJV. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 1 de abril de 2006;19(2):382-402.
 43. De Rossi E, Branzoni M, Cantoni R, Milano A, Riccardi G, Ciferri O. *mmr*, a *Mycobacterium tuberculosis* gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors. *J Bacteriol.* noviembre de 1998;180(22):6068-71.
 44. Pasca MR, Gugliera P, De Rossi E, Zara F, Riccardi G. *mmpL7* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Is Responsible for Isoniazid Efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de noviembre de 2005;49(11):4775-7.
 45. Pasca MR, Gugliera P, Arcesi F, Bellinzoni M, De Rossi E, Riccardi G. *Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c*, an ABC Fluoroquinolone Efflux Pump in

-
- Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de agosto de 2004;48(8):3175-8.
46. Wang K, Pei H, Huang B, Zhu X, Zhang J, Zhou B, et al. The Expression of ABC Efflux Pump, Rv1217c–Rv1218c, and Its Association with Multidrug Resistance of Mycobacterium tuberculosis in China. *Curr Microbiol.* marzo de 2013;66(3):222-6.
 47. Garzón MC, Angée DY, Llerena C, Orjuela DL, Victoria JE. Vigilancia de la resistencia del Mycobacterium tuberculosis a los fármacos antituberculosos, Colombia 2004-2005. *Biomédica.* 1 de septiembre de 2008;28(3):319.
 48. Kanji A, Hasan R, Ali A, Zaver A, Zhang Y, Imtiaz K, et al. Single nucleotide polymorphisms in efflux pumps genes in extensively drug resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Pakistan. *Tuberculosis.* diciembre de 2017;107:20-30.
 49. Rodrigues L, Parish T, Balganes M, Ainsa JA. Antituberculosis drugs: reducing efflux = increasing activity. *Drug Discov Today.* marzo de 2017;22(3):592-9.
 50. Machado D, Coelho TS, Perdigão J, Pereira C, Couto I, Portugal I, et al. Interplay between Mutations and Efflux in Drug Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Front Microbiol [Internet].* 27 de abril de 2017 [citado 19 de marzo de 2019];8. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00711/full>
 51. Singh M, Jadaun GPS, Ramdas null, Srivastava K, Chauhan V, Mishra R, et al. Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant Mycobacterium tuberculosis isolates. *Indian J Med Res.* mayo de 2011;133:535-40.

-
52. Pule CM, Sampson SL, Warren RM, Black PA, van Helden PD, Victor TC, et al. Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. *J Antimicrob Chemother.* enero de 2016;71(1):17-26.
 53. Alcaide F, Esteban J, González-Martin J, Palacios J-J. Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* octubre de 2017;35(8):529-35.
 54. Woods GL, Clinical and Laboratory Standards Institute (Wayne P. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes: approved standard. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
 55. Alvarez N. DNA METHYLATION AND ITS RELATIONSHIP WITH LEVOFLOXACIN RESISTANCE in *Mycobacterium tuberculosis*. [Medellin, Colombia]: UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA; 2017.
 56. Belisle JT, Sonnenberg MG. Isolation of Genomic DNA from *Mycobacteria*. En: *Mycobacteria Protocols* [Internet]. New Jersey: Humana Press; 1998 [citado 7 de febrero de 2019]. p. 31-44. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1385/0-89603-471-2:31>
 57. Parish T, Stoker NG, editores. *Mycobacterium tuberculosis protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2001. 403 p. (Methods in molecular medicine).
 58. Wang J-Y, Lee L-N, Lai H-C, Wang S-K, Jan I-S, Yu C-J, et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure. *J Antimicrob Chemother.* 1 de mayo de 2007;59(5):860-5.
 59. Nosova EY, Bukatina AA, Isaeva YD, Makarova MV, Galkina KY, Moroz AM. Analysis of mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes and their association with

-
- the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin. *J Med Microbiol.* 1 de enero de 2013;62(Pt_1):108-13.
60. Chawla K, Kumar A, Shenoy VP, Chakrabarty S, Satyamoorthy K. Genotypic detection of fluoroquinolone resistance in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* at a tertiary care centre in south Coastal Karnataka, India. *J Glob Antimicrob Resist.* junio de 2018;13:250-3.
 61. Chaoui I, Oudghiri A, El Mzibri M. Characterization of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Morocco. *J Glob Antimicrob Resist.* marzo de 2018;12:171-4.
 62. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother.* abril de 2012;67(4):819-31.
 63. Feuerriegel S, Cox HS, Zarkua N, Karimovich HA, Braker K, Rusch-Gerdes S, et al. Sequence Analyses of Just Four Genes To Detect Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients Undergoing Treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de agosto de 2009;53(8):3353-6.
 64. Cui Z, Wang J, Lu J, Huang X, Hu Z. Association of mutation patterns in *gyrA/B* genes and ofloxacin resistance levels in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East China in 2009. *BMC Infect Dis* [Internet]. diciembre de 2011 [citado 8 de febrero de 2019];11(1). Disponible en: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-11-78>
 65. Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A, Ganiats T, Brodine S, Alcaraz J, et al. Frequency and Geographic Distribution of *gyrA* and *gyrB* Mutations

-
- Associated with Fluoroquinolone Resistance in Clinical Mycobacterium Tuberculosis Isolates: A Systematic Review. Kranzer K, editor. PLOS ONE. 27 de marzo de 2015;10(3):e0120470.
66. Balganes M, Dinesh N, Sharma S, Kuruppath S, Nair AV, Sharma U. Efflux Pumps of Mycobacterium tuberculosis Play a Significant Role in Antituberculosis Activity of Potential Drug Candidates. Antimicrob Agents Chemother. mayo de 2012;56(5):2643-51.
67. Garima K, Pathak R, Tandon R, Rathor N, Sinha R, Bose M, et al. Differential expression of efflux pump genes of Mycobacterium tuberculosis in response to varied subinhibitory concentrations of antituberculosis agents. Tuberculosis. marzo de 2015;95(2):155-61.
68. Koster K, Largen A, Foster JT, Drees KP, Qian L, Desmond EP, et al. Whole genome SNP analysis suggests unique virulence factor differences of the Beijing and Manila families of Mycobacterium tuberculosis found in Hawaii. Cloeckert A, editor. PLOS ONE. 23 de julio de 2018;13(7):e0201146.
69. Kuan CS, Chan CL, Yew SM, Toh YF, Khoo J-S, Chong J, et al. Genome Analysis of the First Extensively Drug-Resistant (XDR) Mycobacterium tuberculosis in Malaysia Provides Insights into the Genetic Basis of Its Biology and Drug Resistance. Manganello R, editor. PLOS ONE. 25 de junio de 2015;10(6):e0131694.
70. Gomez V. CARACTERIZACIÓN DE POLIMORFISMOS EN PROTEÍNAS DE TRANSPORTE CASSETE DE UNIÓN A ATP Y SU ASOCIACIÓN CON LOS NIVELES DE RESISTENCIA A LEVOFLOXACINA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE Mycobacterium tuberculosis MULTIFÁRMACO-RESISTENTES Y CON RESISTENCIA

EXTENDIDA. [Medellin, Colombia]: UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA; 2014.

71. Hao P, Shi-Liang Z, Ju L, Ya-Xin D, Biao H, Xu W, et al. The role of ABC efflux pump, Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c, from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in China. *Folia Microbiol (Praha)*. noviembre de 2011;56(6):549-53.
72. Balganes M, Kuruppath S, Marcel N, Sharma S, Nair A, Sharma U. Rv1218c, an ABC Transporter of *Mycobacterium tuberculosis* with Implications in Drug Discovery. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 de diciembre de 2010;54(12):5167-72.
73. Kanji A, Hasan R, Zhang Y, Shi W, Imtiaz K, Iqbal K, et al. Increased expression of efflux pump genes in extensively drug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Mycobacteriology*. diciembre de 2016;5:S150.
74. Oh TS, Kim YJ, Kang HY, Kim C-K, Cho SY, Lee HJ. RNA expression analysis of efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Korea. *Infect Genet Evol*. abril de 2017;49:111-5.
75. Kardan-Yamchi J, Kazemian H, Haeili M, Harati AA, Amini S, Feizabadi MM. Expression analysis of 10 efflux pump genes in multi/extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates of clinical origin. *J Glob Antimicrob Resist [Internet]*. enero de 2019 [citado 10 de febrero de 2019]; Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716519300104>

-
76. Rahman SJ, Kaur P. Conformational changes in a multidrug resistance ABC transporter DrrAB: Fluorescence-based approaches to study substrate binding. *Arch Biochem Biophys.* noviembre de 2018;658:31-45.
 77. Li G, Zhang J, Guo Q, Jiang Y, Wei J, Zhao L, et al. Efflux Pump Gene Expression in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. Chatterji D, editor. *PLOS ONE.* 19 de febrero de 2015;10(2):e0119013.
 78. Danilchanka O, Mailaender C, Niederweis M. Identification of a Novel Multidrug Efflux Pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 de julio de 2008;52(7):2503-11.
 79. Martin A, Daniel J. The ABC transporter Rv1272c of *Mycobacterium tuberculosis* enhances the import of long-chain fatty acids in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* febrero de 2018;496(2):667-72.
 80. Farhana A, Kumar S, Rathore SS, Ghosh PC, Ehtesham NZ, Tyagi AK, et al. Mechanistic Insights into a Novel Exporter-Importer System of *Mycobacterium tuberculosis* Unravel Its Role in Trafficking of Iron. Davis D, editor. *PLoS ONE.* 7 de mayo de 2008;3(5):e2087.
 81. Eldholm V, Balloux F. Antimicrobial Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: The Odd One Out. *Trends Microbiol.* agosto de 2016;24(8):637-48.
 82. Busatto C, Vianna JS, da Silva LV, Ramis IB, da Silva PEA. *Mycobacterium avium*: an overview. *Tuberculosis.* enero de 2019;114:127-34.
 83. Duan W, Li X, Ge Y, Yu Z, Li P, Li J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1473 is a novel macrolides ABC Efflux Pump regulated by WhiB7. *Future Microbiol.* enero de 2019;14(1):47-59.

-
84. Zhang Y, Zhang J, Cui P, Zhang Y, Zhang W. Identification of Novel Efflux Proteins Rv0191, Rv3756c, Rv3008, and Rv1667c Involved in Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. agosto de 2017 [citado 10 de febrero de 2019];61(8). Disponible en: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00940-17>
 85. Betts JC, McLaren A, Lennon MG, Kelly FM, Lukey PT, Blakemore SJ, et al. Signature Gene Expression Profiles Discriminate between Isoniazid-, Thiolactomycin-, and Triclosan-Treated *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 de septiembre de 2003;47(9):2903-13.
 86. Gomez A, Andreu N, Ferrer-Navarro M, Yero D, Gibert I. Triclosan-induced genes Rv1686c-Rv1687c and Rv3161c are not involved in triclosan resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep* [Internet]. septiembre de 2016 [citado 13 de febrero de 2019];6(1). Disponible en: <http://www.nature.com/articles/srep26221>
 87. Jiang X, Zhang W, Zhang Y, Gao F, Lu C, Zhang X, et al. Assessment of Efflux Pump Gene Expression in a Clinical Isolate *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time Reverse Transcription PCR. *Microb Drug Resist*. marzo de 2008;14(1):7-11.
 88. Faksri K, Tan JH, Disratthakit A, Xia E, Prammananan T, Suriyaphol P, et al. Whole-Genome Sequencing Analysis of Serially Isolated Multi-Drug and Extensively Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Thai Patients. Sreevatsan S, editor. *PLOS ONE*. 12 de agosto de 2016;11(8):e0160992.
 89. Gupta AK, Katoch VM, Chauhan DS, Sharma R, Singh M, Venkatesan K, et al. Microarray Analysis of Efflux Pump Genes in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* During Stress Induced by Common Anti-Tuberculous Drugs. *Microb Drug Resist*. marzo de 2010;16(1):21-8.

-
90. Heinkel F, Shen L, Richard-Greenblatt M, Okon M, Bui JM, Gee CL, et al. Biophysical Characterization of the Tandem FHA Domain Regulatory Module from the Mycobacterium tuberculosis ABC Transporter Rv1747. *Structure*. julio de 2018;26(7):972-986.e6.
 91. Dianišková P, Korduláková J, Škovierová H, Kaur D, Jackson M, Brennan P, et al. Investigation of ABC transporter from mycobacterial arabinogalactan biosynthetic cluster. *Gen Physiol Biophys*. 2011;30(3):239-50.
 92. Pitarque S, Larrouy-Maumus G, Payré B, Jackson M, Puzo G, Nigou J. The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface. *Tuberculosis*. noviembre de 2008;88(6):560-5.
 93. Devasundaram S, Raja A. Variable transcriptional adaptation between the laboratory (H37Rv) and clinical strains (S7 and S10) of Mycobacterium tuberculosis under hypoxia. *Infect Genet Evol*. junio de 2016;40:21-8.
 94. Peterson EJR, Ma S, Sherman DR, Baliga NS. Network analysis identifies Rv0324 and Rv0880 as regulators of bedaquiline tolerance in Mycobacterium tuberculosis. *Nat Microbiol* [Internet]. agosto de 2016 [citado 17 de febrero de 2019];1(8). Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nmicrobiol201678>
 95. Baucheron S, Coste F, Canepa S, Maurel M-C, Giraud E, Culard F, et al. Binding of the RamR Repressor to Wild-Type and Mutated Promoters of the *ramA* Gene Involved in Efflux-Mediated Multidrug Resistance in Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*. febrero de 2012;56(2):942-8.
 96. Dover LG, Corsino PE, Daniels IR, Cocklin SL, Tatituri V, Besra GS, et al. Crystal Structure of the TetR/CamR Family Repressor Mycobacterium

-
- tuberculosis EthR Implicated in Ethionamide Resistance. *J Mol Biol.* julio de 2004;340(5):1095-105.
97. Zhu C, Liu Y, Hu L, Yang M, He Z-G. Molecular mechanism of the synergistic activity of ethambutol and isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 26 de octubre de 2018;293(43):16741-50.
98. Villellas C, Coeck N, Meehan CJ, Lounis N, de Jong B, Rigouts L, et al. Unexpected high prevalence of resistance-associated *Rv0678* variants in MDR-TB patients without documented prior use of clofazimine or bedaquiline. *J Antimicrob Chemother.* 28 de diciembre de 2016;dkw502.
99. Zhang S, Chen J, Cui P, Shi W, Zhang W, Zhang Y. Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Table 1. *J Antimicrob Chemother.* septiembre de 2015;70(9):2507-10.
100. Schürch AC, Kremer K, Warren RM, Hung NV, Zhao Y, Wan K, et al. Mutations in the regulatory network underlie the recent clonal expansion of a dominant subclone of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *Infect Genet Evol.* abril de 2011;11(3):587-97.
101. Alam MS, Garg SK, Agrawal P. Studies on structural and functional divergence among seven WhiB proteins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Molecular properties of *M. tuberculosis* WhiB proteins. *FEBS J.* enero de 2009;276(1):76-93.
102. Rodríguez-Castillo JG, Pino C, Niño LF, Rozo JC, Llerena-Polo C, Parra-López CA, et al. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing-like strains revealed specific genetic variations associated

with virulence and drug resistance. *Infect Genet Evol.* octubre de 2017;54:314-23.

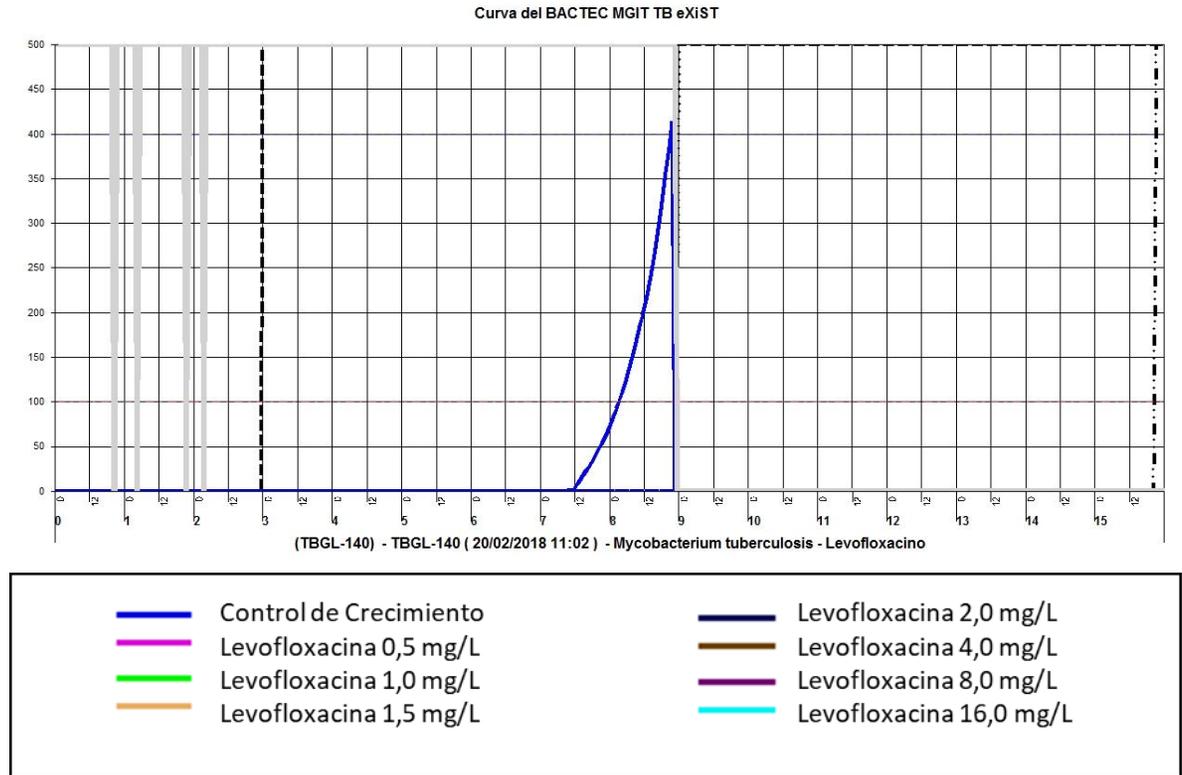
10. ANEXOS

Anexo 1. Primers utilizados para la amplificación por PCR en tiempo real de los 29 genes codificantes para bombas de expulsión de *Mycobacterium tuberculosis*

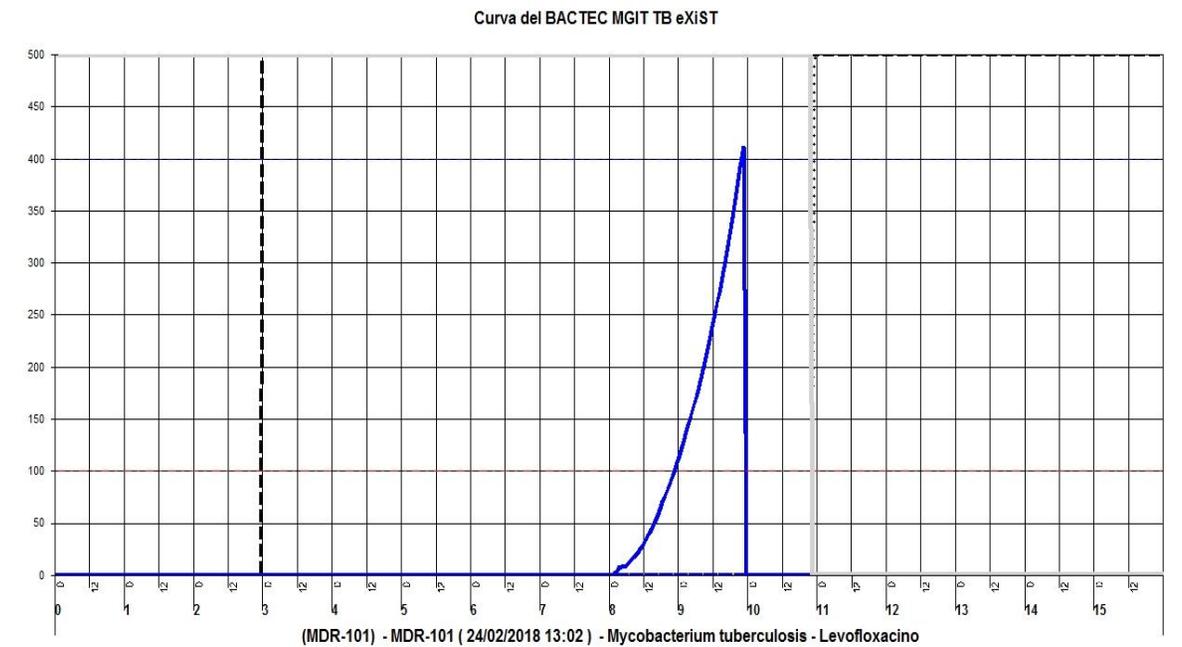
Gen	Nombre	Secuencia Primers
Rv1217c	Rv1217c-7F	5'- GCA CTG GAA CAG GCC TTC CTT G -3'
	Rv1217c-8R	5'- CAG CCA ATG GGT CCG GGA AAC -3'
Rv1273c	Rv1273c-6R	5'- GCG AAG TAG GAC AGG AAG GCG ATC -3'
	Rv1273c-7F	5'- CAT CAC CGA GGT GCT TTC CAC G -3'
Rv1272c	Rv1272c-5F	5'- GTC GAT TCT GAC CAT GGT GGC G -3'
	Rv1272c-6R	5'- GTG GCC GAA CGT CTT GAC TAC C -3'
Rv1348	Rv1348-9F	5'- GCA GAG AAG ATG AAC GGC GAA GC -3'
	Rv1348-10R	5'- GGA TCC ATT CGA TGC GTG GCT AC -3'
Rv1349	Rv1349-7F	5'- GTG CTT ACC GCA CCG GTC ATG -3'
	Rv1349-8R	5'- GAA CAC GAC ACT GCA GAC CGC -3'
Rv1456c	Rv1456c-5F	5'- GTC CAC GAA CTG GTG GTC AGC -3'
	Rv1456c-6R	5'- CGG CGA GTC GCA CCA GAA TC -3'
Rv1457c	Rv1457c-5F	5'- GAT CAT CGC GCT GGG TAC CG -3'
	Rv1457c-6R	5'- CTA GGA CGA CGA TCC CGA ACC AG -3'
Rv1458c	Rv1458c-5F	5'- GTG GGA GTT GAT CGA CGC GC -3'
	Rv1458c-6R	5'- CAT GTC GGT GGC TAG CAC GTC -3'
Rv1473	Rv1473-6R	5'- CCG TAT GCA AGC GCA GGA AGT C -3'
	Rv1473-7F	5'- GAC AAG GTG GCC CGG ATC AAG -3'
Rv1667c	Rv1667c-4R	5'- CGC GTA CTG CTG GTC AGT GAC -3'
	Rv1667c-5F	5'- GGC ATC GAC GAA TAC CTG CAG C -3'
Rv1668c	Rv1668c-5F	5'- GAA TGG GAC GTG ATC GCT CTC GAC -3'
	Rv1668c-6R	5'- CAG GTT CTG CCG CTT GGC TTC -3'
Rv1686c	Rv1686c-4R	5'- CGT GTC AAA GCC AAG GAA CCA GAA C -3'
	Rv1686c-5F	5'- GCA CCG AAT TTC AGG CCG TAC AG -3'
Rv1687c	Rv1687c-4R	5'- GTT GTA AAT GGT CGG GTC CTG AGG C -3'
	Rv1687c-5F	5'- GCG CGT CGA ATT ATG GGA TCG G -3'
Rv2688c	Rv2688c-4R	5'- GGC GAA GAA GCG CAG GTT CTC -3'
	Rv2688c-5F	5'- GTG AAC GCC CGC AAG ATC AAG G -3'
Rv2687c	Rv2687c-3F	5'- GAC TGA TTT GGC TGG CAG TGC TG -3'
	Rv2687c-4R	5'- GGT GGT AAC CAA GCC CGT GAA C -3'
Rv2686c	Rv2686c-4R	5'- GTT ACT CGC AGC GCC GTC ATC -3'
	Rv2686c-5F	5'- GTG ACC ACC ATC TAC GTC GTC G -3'

Gen	Nombre	Secuencia Primers
Rv2936- drrA	drrA-4R	5'- CCG CCT CTT TCC GGC ATG TAC -3'
	drrA-5F	5'- GCT ATT TGG GAT CTG GTG GCC AG -3'
Rv2937- drrB	drrB-4R	5'- CGA TTG ACG CCT AGC AGC GAA TC -3'
	drrB-5F	5'- CTG TCA TTC GCC GCT GAC CTG -3'
Rv2939- drrC	ddrC-4R	5'- CGC GTT TGC CAG GAT TCG AG -3'
	ddrC-5F	5'- GTG GTA TTG GGT TTC CGG TTT CGA C -3'
Rv1819 c-bacA	bacA-6R	5'- GAT GAA CGA GAT GAC CGT GGC C -3'
	bacA-7F	5'- CAG ACA ATT GTT CCG TTG CCG TGG -3'
Rv2477c	Rv2477c-6R	5'- CCA AGC CAA CTC CTC GGT CAA C -3'
	Rv2477c-7F	5'- GAA GAC CCG CAA GCT CGA CTT C -3'
Rv0194	RV0194-9F	GAT CAT GGA CGA CCC GAC CTC TG
	RV0194-10R	CTC CGC GAC AAC CAG GTC ATC
Rv1218c	Rv1218c-4R	5'- GCC GAA GCG CTC GAT CAG TTC -3'
	Rv1218c-5F	5'- GCT GCT CTT GGA TGA GCC GAG -3'
Rv3000	Rv3000-3F	5'- GCT CAC CGA TCT GGA TGT GCT C -3'
	Rv3000-4R	5'- GGC GAG CAG CAG GTA CAT CAC
Rv1463	Rv1463-3F	5'- CTG GCC ATG CAA TAT CCC GTC G -3'
	Rv1463-4R	5'- GGA TTC GGC GTA GCG GTT CAC -3'
Rv1747	Rv1747-7F	5'- GAT GGC GAC AAG ACA CTG CTG G -3'
	Rv1747-8R	5'- GTT CGA GGG CCA CAA CGT TCA C -3'
Rv3781- rfbE	rfbE-4R	5'- CGA TGC CCA GAT CGA AGA CCG -3'
	rfbE-5F	5'- GGC GAG TAC CTT TCG ATG CCG -3'
Rv2209	Rv2209-5F	5'- GCG CGC TAT CAC GAT CTG CTG -3'
	Rv2209-6R	5'- CGA ACC GAC GAC CAA TCC AAT GC -3'
Rv2136	Rv2136c-4R	5'- GTG CCG ATG ATG ACA TAC CAG CC -3'
	Rv2136c-5F	5'- GAC CAT CAG CGC TGG ACT GTT TC -3'

a)



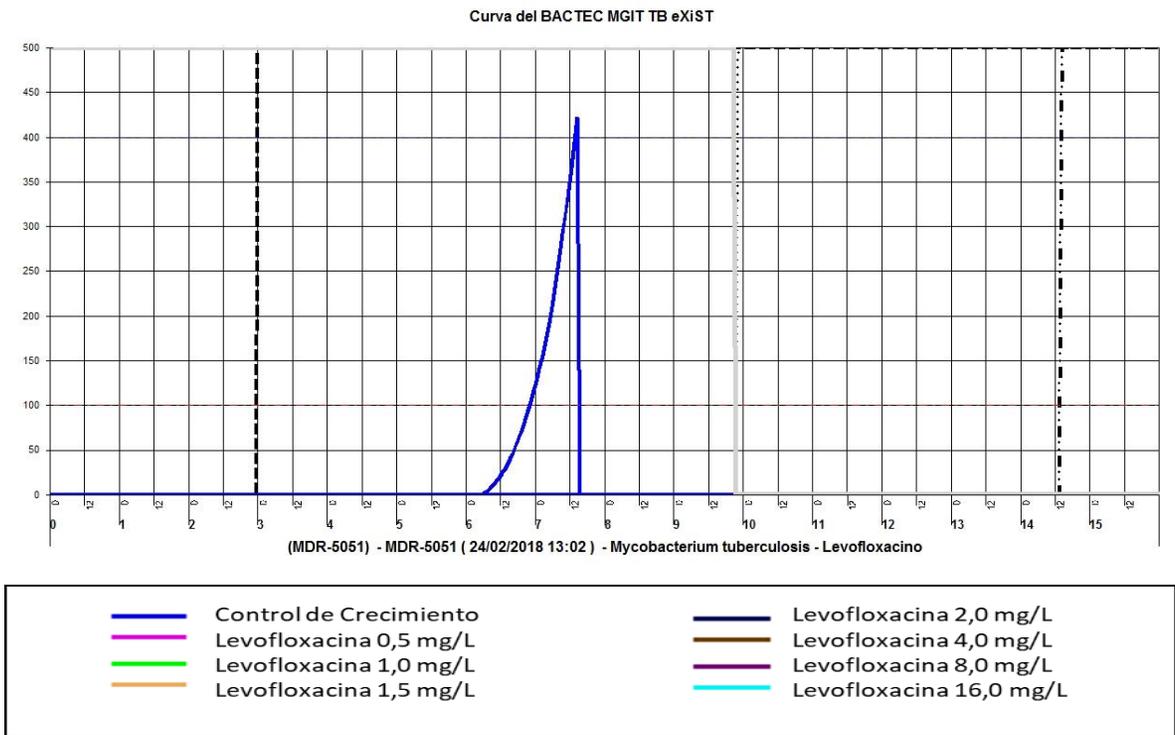
b)



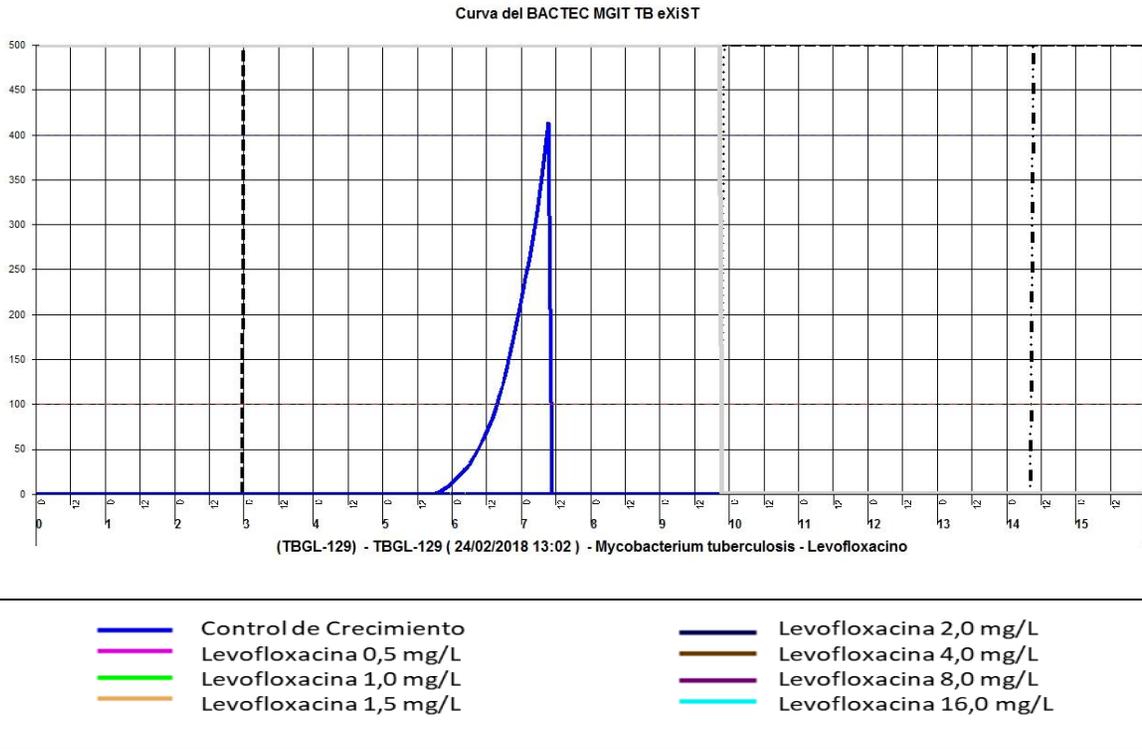


Anexo 2. Curva de CIM a LVX para los aislamientos clínicos MTB-MDR, TBGL-140 y MDR-101. a) Aislamiento TBGL-140. b) Aislamiento MDR-101. La CIM obtenida para los dos aislamientos fue <0.5 mg/L.

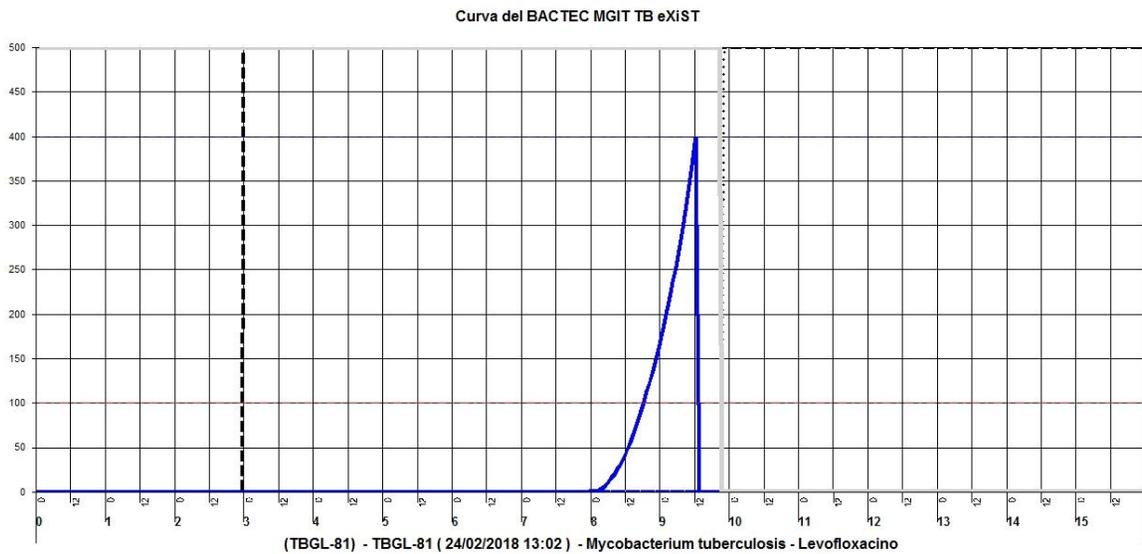
a)



b)



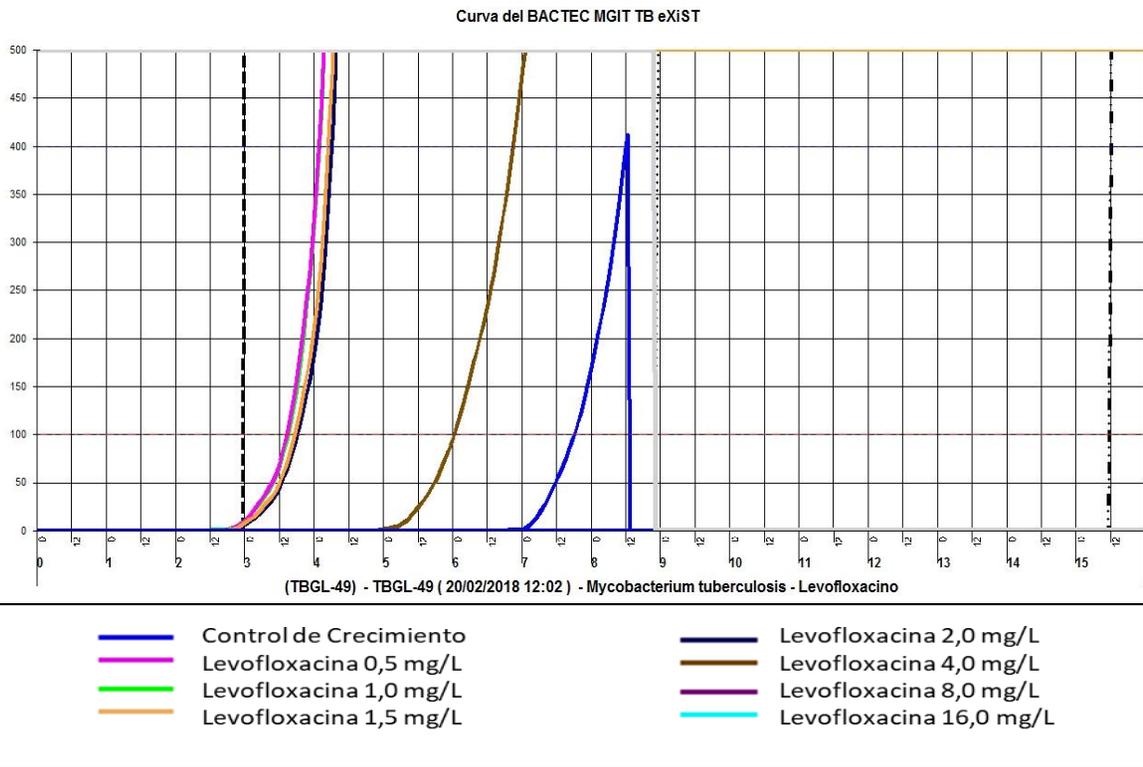
Anexo 3. Curva de CIM para los aislamientos clínicos MTB-MDR, a) MDR- 5051 y b) TBGL-129. CIM obtenida para los dos aislamientos: <0.5 mg/L.



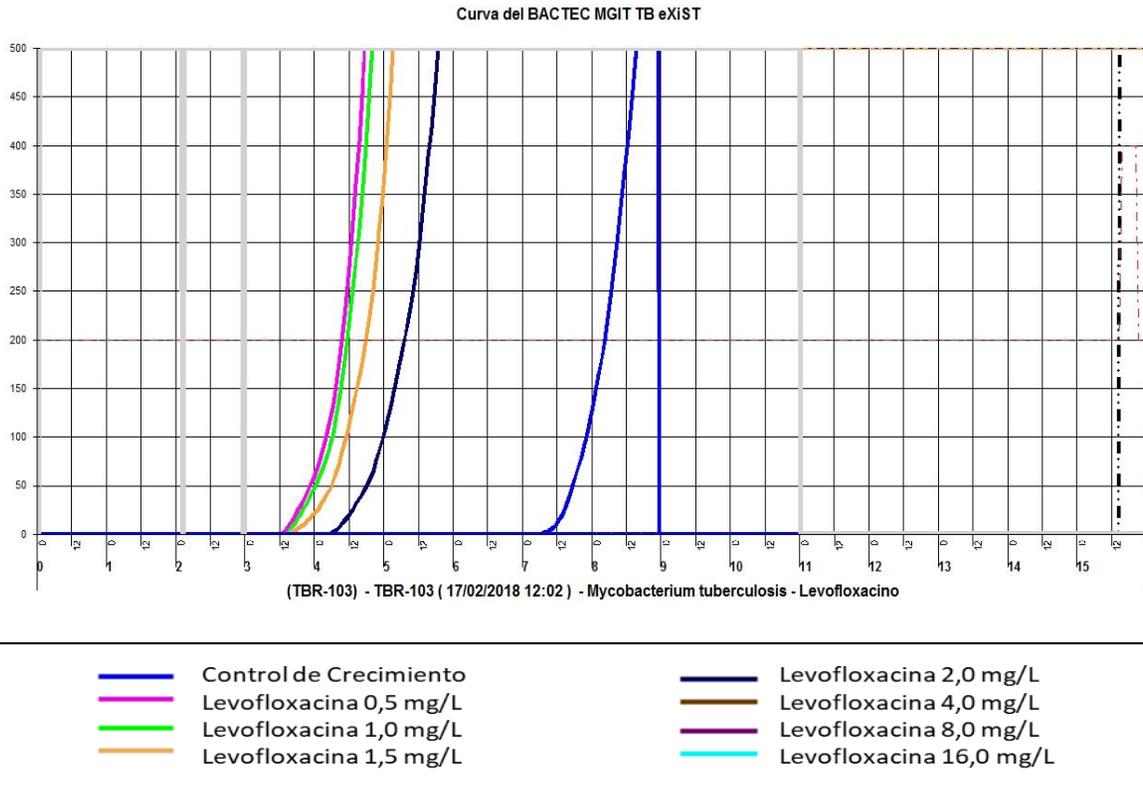


Anexo 4. Curva de CIM para el aislamiento clínico MTB-MDR, TBGL-81. CIM obtenida para el aislamiento es: <0.5 mg/L.

a)



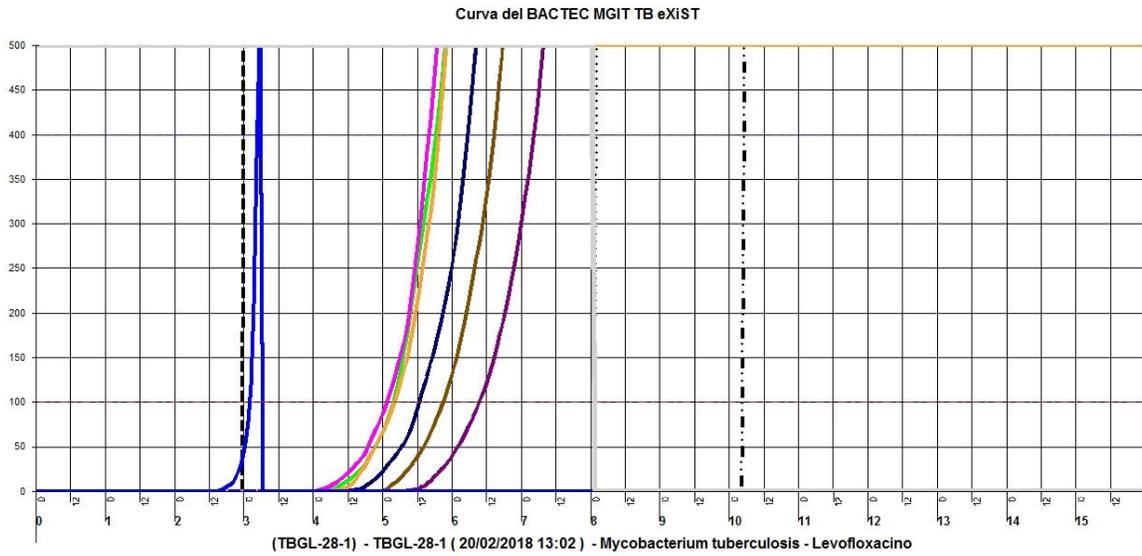
b)



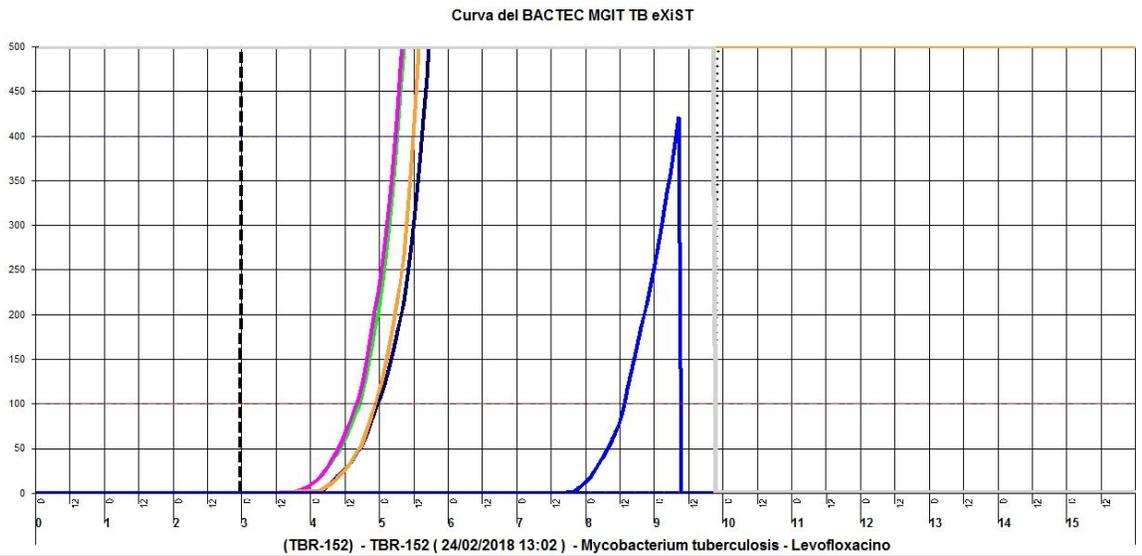
Anexo 5. Curva de CIM de aislamientos clínicos MTB-XDR TBGL-49 y TBR-103.

a) Aislamiento clínico TBGL-49 con un CIM de 8 mg/mL. b) Aislamiento clínico TBR-103 con un CIM de 4 mg/L. Concentración crítica 1.5 mg/L.

a)

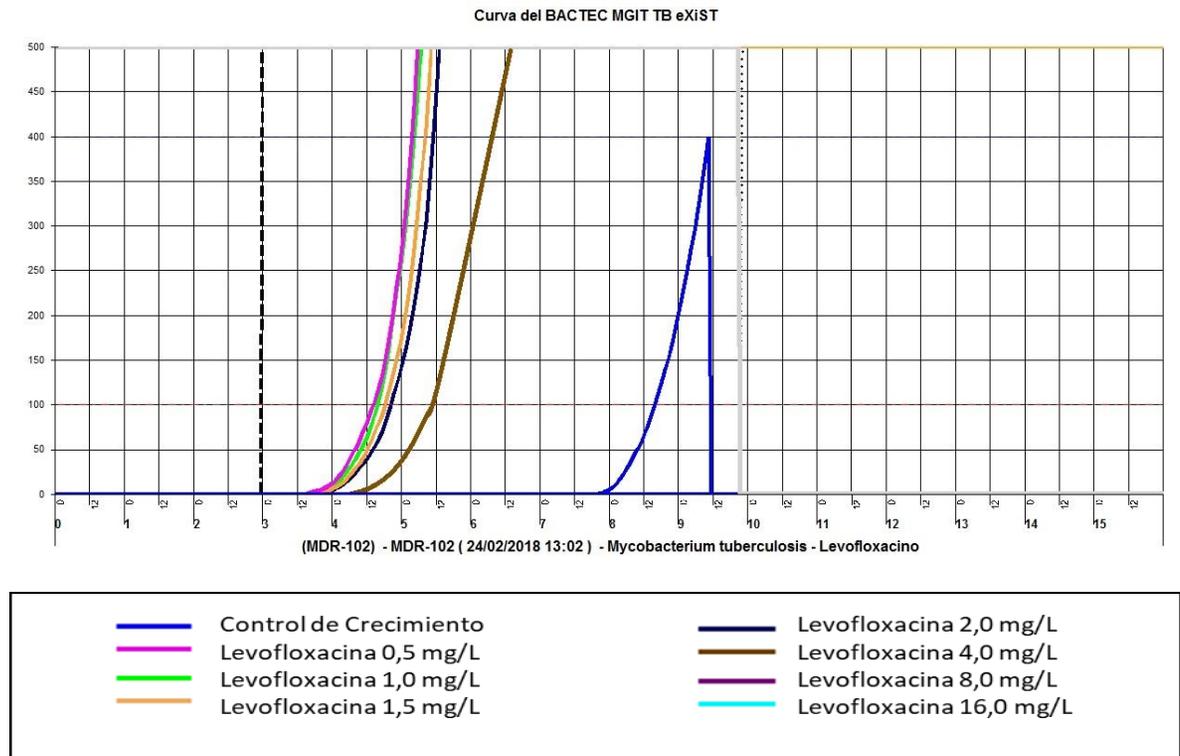


b)



Anexo 6. Curva de CIM de aislamientos clínicos MTB-XDR TBGL-28 y TBR-152.

a) Aislamiento clínico TBGL-28 con un CIM de 16 mg/mL. b) Aislamiento clínico TBR-152 con un CIM de 4 mg/L. Concentración crítica 1.5 mg/L.



Anexo 7. Curva de CIM del aislamiento clínico MTB-XDR, MDR-102 con una CIM de 8 mg/mL. Concentración crítica 1.5 mg/L.

Anexo 8. Genes que codifican para bombas de expulsión tipo ABC en *Mycobacterium tuberculosis*.

GENE	GENE ID	GENE DESCRIPTION	
Rv1217c	888401	Tetronasin ABC transporter integral membrane protein	Pyrazolonas, pyrroles, pyridonas, Novobiocinas, INH, RIF
Rv1273c	887025	Drug ABC transporter ATP-binding protein	RIF, INH
Rv1272c	887021	Drug ABC transporter ATP-binding protein	ND
Rv1348	886853	Iron ABC transporter ATP-binding protein/permease IrtA	Regulador Hierro-INH
Rv1349	886834	Iron ABC transporter ATP-binding protein/permease IrtB	Regulador Hierro-INH
Rv1456c	886591	Antibiotic ABC transporter permease	RIF, INH, EMB, STR
Rv1457c	886587	Antibiotic ABC transporter permease	RIF, INH, EMB, STR
Rv1458c	886582	Antibiotic ABC transporter ATP-binding protein	RIF, INH, EMB, STR
Rv1473	886549	Macrolide ABC transporter ATP-binding protein	Macróldos
Rv1667c	885518	Pseudo [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv]	PZA
Rv1668c	885522	Probable second part of macrolide-transport atp-binding protein abc transporter	No determinado

Rv1686c	885672	ABC transporter permease	No determinado
Rv1687c	885678	ABC transporter ATP-binding protein	INH, RIF
Rv2688c	888463	Antibiotic ABC transporter ATP-binding protein	FQ, STR, RIF
Rv2687c	888446	Antibiotic ABC transporter permease	FQ
Rv2686c	888360	Antibiotic ABC transporter permease	FQ
Rv2936-drrA	888168	Daunorubicin ABC transporter ATP-binding protein DrrA	EMB, FQs, STR, INH, RIF
Rv2937-drrB	887968	Daunorubicin ABC transporter permease DrrB	EMB, FQs, STR, RIF, INH
Rv2938-drrC	888491	Daunorubicin ABC transporter permease DrrC	EMB, FQs, STR
Rv1819c-bacA	885539	Vitamin B12 transport ATP-binding protein BacA	INH, RIF
Rv2477c	887757	Macrolide ABC transporter ATP-binding protein	OFL
Rv0194	886790	Multidrug ABC transporter ATPase/permease	STR, Amplicilina, Cloramfenicol, Novobiocina
Rv1218c	888518	Tetronasin ABC transporter ATP-binding protein	Pyrazolonas, pyrroles, pyridonas, Novobiocinas, INH, RIF
Rv3000	887271	Transmembrane protein	Sin determinar
Rv1463	886571	ABC transporter ATP-binding protein	Sin determinar
Rv1747	885311	ABC transporter ATP-binding protein/permease	INH

<i>Rv3781- rfbe</i>	886113	O-antigen/lipopolysaccharide	ABC transporter	
		ATP-binding protein RfbE		
<i>Rv2209</i>	887230	Integral membrane protein		OFL
<i>Rv2136c</i>	887612	Undecaprenyl-diphosphatase		RIF, INH

Anexo 9. Genes reguladores para los 29 genes que codifican para bombas de expulsión tipo ABC en *Mycobacterium tuberculosis*

Gen regulador	Producto	Genes de Bombas de Expulsión regulados
Rv0047c	Conserved hypothetical protein	<i>Rv0194</i>
		<i>Rv2936</i>
		<i>Rv2937</i>
		<i>Rv2938</i>
		<i>Rv3781</i>
		<i>Rv2136c</i>
		<i>Rv1463</i>
Rv0767c	Conserved hypothetical protein	<i>Rv0194</i>
		<i>Rv1272c</i>
		<i>Rv2686c</i>
		<i>Rv2687c</i>
		<i>Rv2688c</i>
		<i>Rv2936</i>
		<i>Rv2937</i>
Rv1353c	Transcriptional Regulator	<i>Rv0194</i>
		<i>Rv1217c</i>
		<i>Rv1272c</i>
		<i>Rv1273c</i>
		<i>Rv1348</i>
		<i>Rv1349</i>
		<i>Rv2936</i>
		<i>Rv2937</i>
		<i>Rv2938</i>
		<i>Rv3000</i>
<i>Rv1463</i>		
Rv1719	Transcriptional Regulator	<i>Rv0194</i>
		<i>Rv2936</i>
		<i>Rv2937</i>
		<i>Rv2938</i>
Rv1776c	Transcriptional Regulator	<i>Rv0194</i>
		<i>Rv1272c</i>
		<i>Rv1686c</i>
		<i>Rv2686c</i>
		<i>Rv2687c</i>
		<i>Rv2688c</i>
		<i>Rv2936</i>
<i>Rv2937</i>		
Rv1816	Transcriptional Regulator	<i>Rv0194</i>
		<i>Rv1457c</i>
		<i>Rv1458c</i>
		<i>Rv2936</i>
		<i>Rv2937</i>
		<i>Rv2938</i>
		<i>Rv1819c</i>
<i>Rv1463</i>		
		<i>Rv2209</i>

Gen regulador	Producto	Genes de Bombas de Expulsión regulados
Rv0967	Conserved hypothetical protein	<i>Rv1273c</i>
		<i>Rv1348</i>
		<i>Rv1349</i>
		<i>Rv1456c</i>
		<i>Rv1457c</i>
		<i>Rv1473</i>
		<i>Rv1668c</i>
		<i>Rv2936</i>
		<i>Rv2937</i>
		<i>Rv2938</i>
		<i>Rv2477c</i>
		<i>Rv1463</i>
		<i>Rv1747</i>
		<i>Rv2209</i>
<i>Rv2136c</i>		
<i>Rv3781</i>		
Rv1423-whiA	Transcriptional Regulator	<i>Rv1273c</i>
		<i>Rv1456c</i>
		<i>Rv1457c</i>
		<i>Rv1747</i>
Rv0023	Transcriptional Regulator	<i>Rv1348</i>
		<i>Rv1456c</i>
		<i>Rv1457c</i>
		<i>Rv1667c</i>
		<i>Rv1668c</i>
		<i>Rv2686c</i>
		<i>Rv2936</i>
		<i>Rv2937</i>
		<i>Rv2938</i>
<i>Rv3781</i>		
Rv0273c	Transcriptional Regulator	<i>Rv1348</i>
		<i>Rv2936</i>
		<i>Rv2937</i>
		<i>Rv2938</i>
Rv3736	Transcriptional Regulator, araC/xylS-family	<i>Rv1348</i>
Rv3830c	Transcriptional Regulator, tetR-family	<i>Rv1348</i>
		<i>Rv1349</i>
Rv0691c	Transcriptional Regulator	<i>Rv1456c</i>
		<i>Rv3781</i>
Rv1846c	Transcriptional Regulator	<i>Rv1456c</i>

Gen regulador	Producto	Genes de Bombas de Expulsión regulados
Rv1990c	Transcriptional Regulator	Rv0194 Rv3781
Rv2011c	Conserved hypothetical protein	Rv0194 Rv1667c Rv2937 Rv2938 Rv2477c Rv1747 Rv3781
Rv2021c	Transcriptional Regulator	Rv0194 Rv2686c
Rv2034	arsR-Type Repressor Protein	Rv0194 Rv1348 Rv1349 Rv1457c Rv1458c Rv2936 Rv2937 Rv2938
Rv3597c- Isr2	Iron-Regulated Isr2 Protein Precursor	Rv0194 Rv1349 Rv2936 Rv2937 Rv2938 Rv1819c Rv1463 Rv2209 Rv2136c Rv3781
Rv0302	Transcriptional Regulator, tetR/acrR-family	Rv1217c Rv1218c Rv2936 Rv2937 Rv2938 Rv3781
Rv0880	Transcriptional Regulator, marR-family	Rv1217c
Rv1219c	Transcriptional Regulator	Rv1217c Rv1218c
Rv2488c	Transcriptional Regulator, luxR-family	Rv1217c Rv1218c
Rv3574	Transcriptional Regulator, tetR-family	Rv1217c Rv1218c Rv2938 Rv1819c

Gen regulador	Producto	Genes de Bombas de Expulsión regulados
Rv3849	Conserved hypothetical protein	<i>Rv1456c</i> <i>Rv1457c</i> <i>Rv3781</i>
Rv0757-phoP	Two Component System Transcriptional Regulator	<i>Rv1473</i> <i>Rv2936</i> <i>Rv2937</i> <i>Rv2938</i> <i>Rv3781</i>
Rv2324	Transcriptional Regulator, asnC-family	<i>Rv1473</i>
Rv3249c	Transcriptional Regulator, tetR-family	<i>Rv1473</i> <i>Rv2686c</i> <i>Rv2687c</i> <i>Rv2688c</i> <i>Rv2937</i> <i>Rv2938</i> <i>Rv1463</i> <i>Rv2477c</i>
Rv0081	Transcriptional Regulator	<i>Rv1686c</i> <i>Rv1687c</i> <i>Rv2938</i> <i>Rv1819c</i> <i>Rv2477c</i> <i>Rv1463</i> <i>Rv3781</i>
Rv1473A	Transcriptional Regulator	<i>Rv1686c</i> <i>Rv2936</i> <i>Rv2937</i> <i>Rv2938</i> <i>Rv2477c</i>
Rv2250c	Transcriptional Regulator	<i>Rv1686c</i> <i>Rv1687c</i> <i>Rv1463</i>
Rv0135c	Transcriptional Regulator	<i>Rv2936</i> <i>Rv2937</i> <i>Rv2938</i> <i>Rv2477c</i>
Rv1556	Regulatory Protein	<i>Rv2936</i> <i>Rv2937</i> <i>Rv2938</i>
Rv2887	Transcriptional Regulator	<i>Rv2936</i> <i>Rv2937</i> <i>Rv2938</i> <i>Rv2477c</i>

Gen regulador	Producto	Genes de Bombas de Expulsión regulados
Rv2989	Transcriptional Regulator	<i>Rv2936</i> <i>Rv2937</i> <i>Rv2938</i>
Rv3219-whib1	Transcriptional Regulator whib-like	<i>Rv2936</i> <i>Rv2937</i> <i>Rv2938</i>
Rv0678	Conserved hypothetical protein	<i>Rv2937</i> <i>Rv2938</i> <i>Rv3781</i>
Rv1994c	Transcriptional Regulator	<i>Rv2937</i> <i>Rv2938</i>
Rv3133c-devR	Two Component System Transcriptional Regulator	<i>Rv2937</i> <i>Rv2938</i> <i>Rv1819c</i> <i>Rv1463</i>
Rv0653c	Transcriptional Regulator, tetR-family	<i>Rv2938</i>
Rv0324	Transcriptional Regulator, arsR-family	<i>Rv1819c</i> <i>Rv3000</i> <i>Rv3781</i>
Rv3066	Transcriptional Regulator, deoR-family	<i>Rv2477c</i>
Rv1033c-trcR	Two Component System Transcriptional Regulator	<i>Rv1463</i>
Rv2621c	Transcriptional Regulator	<i>Rv1463</i>
Rv3416-whiB3	Transcriptional Regulator whib-like	<i>Rv2136c</i>
Rv1049	Transcriptional Repressor	<i>Rv3781</i>
Rv1956	Transcriptional Regulator	<i>Rv3781</i>
Rv3862c-whiB6	Transcriptional Regulator whib-like	<i>Rv3781</i>

Anexo 10. Mutaciones encontradas en los genes blanco para LVX en los 10 aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

		MTB-MDR				
GENES	MDR-140	MDR-5051	TBGL-129	TBGL-81	TBR-101	
gyrA	G61C/Asp20 Gln	G61C/Asp20 Gln	G61C/Asp20 Gln	G61C/Asp20 Gln	G61C/Asp20 Gln	
	T1373C/ Ile458 Thr	G284C/ Ser95 Thr G739A/Gly246 Ser	G284C/ Ser95 Thr G739A/Gly246 Ser	G284C/ Ser95 Thr G2003A/ Gly668 Gln	G284C/ Ser95 Thr G2003A/ Gly668 Gln	
gyrB	-	-	-	-	-	
		MTB-XDR				
GENES	TBR-103	TBGL-28	TBGL-49	TBR-152	TBR-102	
gyrA	Glu21 Gln Ser95 Thr	G61C/Asp20 Gln A281C/ Asp 94 Ala* G284C/ Ser95 Thr G2003A/ Gly668 Gln	G61C/Asp20 Gln A281C/ Asp 94 Ala* G284C/ Ser95 Thr G2003A/ Gly668 Gln	Ser91 Pro* Glu21 Gln Ser95 Thr	Asp94 Gly* Glu21 Gln Ser95 Thr	
	gyrB	-	A1503C/Glu501 Asp*	-	-	

* Mutaciones asociadas con resistencia a LVX en genes blanco *gyrA* y *gyrB*

Anexo 11. Genes codificantes para bombas de expulsión que presentaron mutaciones e inserciones en los aislamientos clínicos de MTB-MDR y MTB-XDR secuenciados.

Genes	MDR-140	MDR-5051	TBGL-129	TBGL-81	TBR-101
<i>Rv1217c</i>	-	-	-	-	-
<i>Rv1458c</i>	-	-	-	-	-
<i>Rv1667c</i>	G169A / Asp56Asn	G169A / Asp56Asn 1042_1052insCGCGGCAAGA	G169A / Asp56Asn 1042_1052insCGCGGCAAGA	1042_1052insCGCGGCAAGA	1043_1053insGCGGCAAGAC
<i>Rv2688c</i>	-	C466A / Pro156Thr	C466A / Pro156Thr	C466A / Pro156Thr	C466A / Pro156Thr
<i>Rv2687c</i>	-	C658T / Arg219Trp	C658T / Arg219Trp		
<i>Rv0194</i>	-	T221C / Met74Thr	T221C / Met74Thr	T221C / Met74Thr	T221C / Met74Thr
<i>Rv1218c</i>	T23C / Val8Ala 318_321insGGC	-	-	A728G / Gln243Arg	A728G / Gln243Arg
<i>Rv1463</i>	-	-	-	-	-

Genes	TBR-103	TBGL-28	TBGL-49	TBR-152	TBR-102
<i>Rv1217c</i>	G517A / Ala173Thr	-	-	-	-
<i>Rv1458c</i>	A397G / Thr133Ala	-	-	-	-
<i>Rv1667c</i>	1042_1052insCGCGGCAAGA	1042_1052insGCGGCAAGAC	1042_1052insGCGGCAAGAC	1043_1053insGCGGCAAGAC	1043_1053insGCGGCAAGAC
<i>Rv2688c</i>	C466A / Pro156Thr				
<i>Rv2687c</i>	-	-	-	-	-
<i>Rv0194</i>	T221C / Met74Thr				
<i>Rv1218c</i>	A728G / Gln243Arg	A728G / Gln243Arg	A728G / Gln243Arg		A728G / Gln243Arg
<i>Rv1463</i>	A593G / Glu198Gly	-	-	-	-

Anexo 12. Genes reguladores que presentaron mutaciones e inserciones en los aislamientos clínicos de MTB-MDR y MTB-XDR secuenciados.

	Genes	MDR-140	MDR-5051	TBGL-129	TBGL-81	TBR-101
MDR	<i>Rv1353c</i>	-	Gly46Arg	Gly46Arg	-	Gly46Arg
	<i>Rv0302</i>	-	-	-	-	-
	<i>Rv2488c</i>	-	-	-	-	-
	<i>Rv0273c</i>	-	Cys167Tyr	Cys167Tyr	-	-
	<i>Rv3830c</i>	-	-	-	-	-
	<i>Rv0691c</i>	-	-	-	-	-
	<i>Rv0678</i>	-	-	Thr68Ala Glu112Lys	-	-
	<i>Rv0324</i>	-	-	-	Thr168Ala	Thr168Ala
	<i>Rv2621c</i>	-	-	-	Ala190Asp	-
	<i>Rv3416</i>	-	-	-	Gln19Arg	-
	<i>Rv3862</i>	-	-	-	-	-
	<i>Rv1994c</i>	-	-	-	-	-
		Genes	TBR-103	TBGL-28	TBGL-49	TBR-152
XDR	<i>Rv1353c</i>	-	-	-	-	-
	<i>Rv0302</i>	His84Asp	-	-	-	-
	<i>Rv2488c</i>	Thr265Ile	-	-	-	-
	<i>Rv0273c</i>	-	-	-	-	-
	<i>Rv3830c</i>	622_623insT	-	-	-	-
	<i>Rv0691c</i>	Ala140Thr	-	-	-	-
	<i>Rv0678</i>	-	-	-	-	-
	<i>Rv0324</i>	Thr168Ala	Thr168Ala	Thr168Ala	-	Thr168Ala
	<i>Rv2621c</i>	Ala190Asp	-	-	-	-
	<i>Rv3416</i>	Gln19Arg	-	-	-	-
	<i>Rv3862</i>	Cys53Arg	-	-	-	Arg57Ser
	<i>Rv1994c</i>	-	-	Thr68Ala	-	-

Anexo 13. Expresión relativa para los aislamientos clínicos MTB-MDR expuesto a una concentración de 0.5 mg/L de LVX.

GENES	EXPRESIÓN RELATIVA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS MTB-MDR				
	0,5 mg/L†				
	MDR-101	MDR-5051	TBGL-140	TBGL-129	TBGL-81
<i>Rv1217c</i>	0,70♦	0,80♦	2,55*	0,91♦	0,28♦
<i>Rv1218c</i>	1,17*	1,06	0,90♦	1,15*	0,82♦
<i>Rv2936-drrA</i>	1,26*	1,11*	0,79♦	1,33*	1,00
<i>Rv2937-drrB</i>	1,21*	1,10*	0,84♦	1,23*	0,93♦
<i>Rv2938-drrC</i>	0,83♦	1,35*	0,82♦	1,44*	0,47♦
<i>Rv1819c-bacA</i>	1,70*	0,86♦	0,77♦	1,12*	1,08
<i>Rv0194</i>	0,69♦	0,78♦	3,04*	2,94*	0,16♦
<i>Rv1273c</i>	1,03	1,03	0,91♦	1,11*	0,80♦
<i>Rv1272c</i>	0,73♦	1,13*	2,80*	1,00	0,15♦
<i>Rv2477</i>	1,32*	1,11*	0,83♦	0,88♦	0,95♦
<i>Rv1348</i>	0,74♦	0,79♦	2,63*	1,06	0,26♦
<i>Rv1349</i>	0,76♦	0,79♦	2,31*	1,01	0,28♦
<i>Rv1456c</i>	0,67♦	0,78♦	2,72*	0,96♦	0,21♦
<i>Rv1457c</i>	0,68♦	0,78♦	2,91*	0,99	0,20♦
<i>Rv1458c</i>	0,74♦	0,77♦	2,53*	1,00	0,17♦
<i>Rv1473</i>	1,21*	0,91♦	1,09	1,19*	0,86♦
<i>Rv1667c</i>	1,06	1,03	0,93♦	1,13*	0,83♦
<i>Rv1668c</i>	0,76♦	0,95♦	2,38*	1,02	0,29♦
<i>Rv1463</i>	1,07	0,82♦	1,81*	1,30*	0,18♦
<i>Rv1686c</i>	1,14*	0,21♦	0,97♦	1,20*	0,76♦
<i>Rv1687c</i>	1,16*	1,06	0,83♦	1,18*	0,67♦
<i>Rv2688c</i>	1,16*	1,06	0,92♦	1,19*	0,88♦
<i>Rv2687c</i>	0,70♦	0,77♦	2,66*	1,04	0,13♦
<i>Rv2686c</i>	1,07	1,03	1,04	1,19*	0,75♦
<i>Rv3000</i>	0,82♦	0,83♦	2,66*	1,00	0,15♦
<i>Rv1747</i>	0,85♦	0,99	1,26*	0,98♦	0,66♦
<i>Rv3781-rfbE</i>	1,12*	1,00	0,89♦	1,18*	0,77♦
<i>Rv2136c</i>	1,16*	1,06	0,97♦	1,17*	0,76♦
<i>Rv2209</i>	0,79♦	0,84♦	2,10*	1,01	0,18♦

El gen *rrs* se utilizó como control endógeno de expresión.

† Aislamientos no expuestos a LVX (muestras control) se asumen un valor de expresión relativa de 1, después del proceso de normalización de datos con el control endógeno

* Expresión aumentada.

♦ Expresión disminuida.

Anexo 14. Expresión relativa para los aislamientos clínicos MTB-XDR expuesto a una concentración de 1 mg/L y 2 mg/L de LVX.

EXPRESIÓN RELATIVA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS MTB-XDR

GENES	1 µg/ml †					2 µg/ml †				
	TBGL- 28	TBGL- 49	TBR- 103	TBR- 152	TBR- 102	TBGL- 28	TBGL- 49	TBR- 103	TBR- 152	TBR- 102
<i>Rv1217c</i>	1,16*	0,88	1,09*	2,37*	0,91	1,14*	1,01	1,15*	1,15*	0,97
<i>Rv1218c</i>	1,06	0,97	1,12*	1,07	1,03	0,96	1,03	1,32*	1,05	0,98
<i>Rv2936- drrA</i>	1,13*	1,02	1,15*	1,00	0,95	1,02	1,03	1,52*	1,07	1,00
<i>Rv2937- drrB</i>	1,07	1,02	1,19*	1,06	0,93	0,97	0,99	1,44*	1,04	0,98
<i>Rv2938- drrC</i>	1,06	0,99	1,11*	0,99	0,90	1,00	0,99	1,20*	2,11*	0,98
<i>Rv1819c- bacA</i>	1,01	0,65	1,14*	1,38*	1,13*	1,04	0,98	1,24*	1,21*	1,18*
<i>Rv0194</i>	1,03	0,82	1,08	2,27*	0,88	0,98	0,98	1,34*	1,10*	0,98
<i>Rv1273c</i>	1,11*	0,96	1,07	1,07	0,93	1,00	0,99	1,14*	1,09	0,98
<i>Rv1272c</i>	1,11*	0,85	1,09	1,12*	0,91	0,90	0,98	1,16*	1,19*	0,99
<i>Rv2477</i>	1,16*	1,05	1,21*	1,03	0,92	0,98	1,08	1,33*	1,03	1,01
<i>Rv1348</i>	1,17*	0,88	3,77*	1,03	0,92	1,14*	1,01	1,17*	1,10*	0,99
<i>Rv1349</i>	1,01	0,86	1,07	3,32*	0,96	0,91	0,97	1,16*	3,64*	1,03
<i>Rv1456c</i>	1,08	0,85	1,12*	4,49*	0,89	1,05	0,96	1,18*	1,25*	1,05
<i>Rv1457c</i>	1,17*	0,84	1,02	6,75*	0,91	1,07	0,99	1,14*	1,24*	1,01
<i>Rv1458c</i>	1,07	0,84	1,11*	10,67*	0,89	0,91	0,99	1,20*	1,25*	1,01
<i>Rv1473</i>	1,14*	0,97	1,16*	1,07	0,91	1,06	1,02	1,15*	1,03	0,97
<i>Rv1667c</i>	1,14*	0,93	1,02	0,97	0,92	1,03	0,99	1,11*	1,03	0,96
<i>Rv1668c</i>	0,98	0,84	1,05	2,87*	0,92	0,98	0,99	1,23*	1,14*	1,02

Rv1463	1,21*	0,89	1,16*	3,26*	0,93	1,04	0,96	1,40*	1,07	0,96
Rv1686c	1,16*	0,96	1,26*	1,12*	0,88	1,02	0,99	1,41*	1,08	0,95
Rv1687c	1,06	0,94	1,25*	1,14*	0,89	0,94	1,04	1,41*	1,05	0,92
Rv2688c	1,06	1,01	1,15*	1,11*	0,91	0,95	1,02	1,31*	1,06	1,00
Rv2687c	1,33*	0,84	1,39*	10,67*	0,89	1,16*	0,99	1,66*	1,25*	1,01
Rv2686c	1,07	0,84	1,11*	1,03	0,94	0,95	0,51	1,31*	1,02	0,97
Rv3000	1,25*	0,87	1,07	6,95*	0,93	1,07	0,97	1,31*	1,24*	1,01
Rv1747	1,16*	0,96	1,01	0,76	0,91	1,13*	1,05	1,16*	1,12*	0,98
Rv3781- rfbE	1,16*	0,99	1,19*	1,04	0,93	1,05	1,01	1,43*	1,07	0,98
Rv2136c	1,12*	0,99	1,17*	1,13*	0,93	1,00	1,05	1,40*	1,06	0,98
Rv2209	1,25*	0,85	1,15*	11,20*	0,87	1,06	0,88	1,49*	1,12*	1,02

El gen *rrs* se utilizó como control endógeno de expresión.

† Aislamientos no expuestos a LVX (muestras control) se asumen un valor de expresión relativa de 1, después del proceso de normalización de datos con el control endógeno

* Expresión aumentada.

◆ Expresión disminuida.

Anexo 15. Mutaciones encontradas en genes reguladores y expresión relativa de los genes codificantes para bombas de expulsión en aislamientos MTB-XDR y MTB-MDR.

Aislamiento	Gen regulador	Mutación	Genes codificantes para bombas de expulsión	Mutaciones en proteínas de expulsión ABC	Expresión relativa
M T B - M D R	MDR-101	Rv1353c GGC/CGC Gly46Arg	Rv0194	Met74Thr	0,69
			Rv1217c	-	0,70
			Rv1272c	-	0,73
			Rv1273c	-	1,03
			Rv1348	-	0,74
			Rv1349	-	0,76
			Rv2936	-	1,26
			Rv2937	-	1,21
			Rv2938	-	0,83
			Rv3000	-	0,82
	Rv1463	-	1,07		
	Rv1747	-	0,85		
	MDR-5051	Rv0324 ACT/GCT Thr168Ala	Rv1819c	-	1,70
			Rv3000	-	0,82
			Rv3781	-	1,12
			Rv0194	Met74Thr	0,78
	MDR-5051	Rv1353c GGC/CGC Gly46Arg	Rv1217c	-	0,80
			Rv1272c	-	1,13
			Rv1273c	-	1,03
			Rv1348	-	0,79
Rv1349			-	0,79	
Rv2936			-	1,11	
Rv2937			-	1,10	
Rv2938			-	1,35	
Rv3000			-	0,83	
Rv1463			-	0,82	
Rv1747	-	0,99			
MDR-5051	Rv0273c TGC/TAC Cys167Tyr	Rv1348	-	0,79	
		Rv2936	-	1,11	
		Rv2937	-	1,10	
		Rv2938	-	1,35	

	Aislamiento	Gen regulador	Mutación	Genes codificantes para bombas de expulsión	Mutaciones en proteínas de expulsión ABC	Expresión relativa	
M T B - M D R	TBGL-129	<i>Rv1353c</i>	GGC/CGC Gly46Arg	<i>Rv0194</i>	Met74Thr	0,78	
				<i>Rv1217c</i>	-	0,80	
				<i>Rv1272c</i>	-	1,13	
				<i>Rv1273c</i>	-	1,03	
				<i>Rv1348</i>	-	0,79	
				<i>Rv1349</i>	-	0,79	
				<i>Rv2936</i>	-	1,11	
				<i>Rv2937</i>	-	1,10	
				<i>Rv2938</i>	-	1,35	
				<i>Rv3000</i>	-	0,83	
	TBGL-81	<i>Rv0273c</i>	TGC/TAC Cys167Tyr	<i>Rv1463</i>	-	0,82	
				<i>Rv1747</i>	-	0,99	
				<i>Rv1348</i>	-	1,06	
				<i>Rv2936</i>	-	1,33	
				<i>Rv2937</i>	-	1,23	
				<i>Rv2938</i>	-	1,44	
				<i>Rv2937</i>	-	1,10	
				<i>Rv2938</i>	-	1,35	
				<i>Rv3781</i>	-	1,18	
				<i>Rv1819c</i>	-	1,08	
TBGL-81	<i>Rv0324</i>	ACT/GCT Thr168Ala	<i>Rv3000</i>	-	0,15		
			<i>Rv3781</i>	-	0,77		
			<i>Rv2621c</i>	GCC/GAC Ala190Asp	<i>Rv1463</i>	-	0,18
			<i>Rv3416-whiB3</i>	CAA/CGA Gln19Arg	<i>Rv2136c</i>	-	0,76

Aislamiento	Gen regulador	Mutación	Genes codificantes para bombas de expulsión	Mutaciones en proteínas de expulsión ABC	Expresión relativa*	
M T B - X D R	Rv0324	ACT/GCT Thr168Ala	Rv1819c	-	1,14-1,24	
			Rv3000	-	1,07-1,31	
			Rv3781	-	1,19-1,43	
	Rv2488c	ACC/ATC Thr265Ile	Rv1217c	Ala173Thr	1,1-1,15	
			Rv1218c	Gln243Arg	1,12-1,32	
	Rv3830c	622_623insT	Rv1348	-	3,77-1,17	
			Rv1349	-	1,07-1,16	
	TBR-103	Rv0691c	GCC/ACC Ala140Thr	Rv1456c	-	1,12-1,18
				Rv3781	-	1,19-1,43
	Rv0302	ACT/GCT His84Asp	Rv1217c	Ala173Thr	1,1-1,15	
			Rv1218c	Gln243Arg	1,12-1,32	
			Rv2936	-	1,15-1,52	
			Rv2937	-	1,19-1,44	
			Rv2938	-	1,11-1,20	
			Rv3781	-	1,19-1,43	
Rv3781			-	1,19-1,43		
Rv3862c-whiB6	TGC/CGC Cys53Arg	Rv3781	-	1,19-1,43		
TBR-102	Rv0324	ACT/GCT Thr168Ala	Rv1819c	-	1,13-1,18	
			Rv3000	-	0,93-1,01	
			Rv3781	-	0,93-0,98	
Rv3862c-whiB6	CGC/AGC Arg57Ser	Rv3781	-	0,93-0,98		
TBGL-28	Rv0324	ACT/GCT Thr168Ala	Rv1819c	-	1,01-1,04	
			Rv3000	-	1,25-1,07	
			Rv3781	-	1,16-1,05	
TBGL-49	Rv0324	ACT/GCT Thr168Ala	Rv1819c	-	0,65-0,98	
			Rv3000	-	0,87-0,97	
			Rv3781	-	0,99-1,01	
	Rv1994c	ACC/GCC Thr68Ala	Rv2937	-	1,02-0,99	
		Rv2938	-	0,99-0,99		

PRESENTACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS

- XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología 2018:



- VI Simposio de Investigación Escuela de Ciencias de la Salud y Clínica Universitaria, UPB 2018
“Comparte tu conocimiento”



Acreditación Institucional de Alta Calidad • Sede Central - Medellín
Res. No. 02444 del 27 de febrero de 2017 - 8 años - Vigilancia Mineducación

La Escuela de Ciencias de la Salud y la Clínica Universitaria Bolivariana
Certifican que:

La investigación titulada:

“Asociación entre los niveles de expresión de genes que codifican bombas de expulsión tipo ABC con la resistencia a levofloxacin en aislamientos clínicos de Mycobacterium tuberculosis multirresistente (MDR) y con resistencia extendida (XDR)”

Autores: Jenny Santiago, Nataly Álvarez, Verónica Gómez, Jaime Robledo, Francois Rouzaud; fue presentada por la investigadora Jenny Santiago, en la categoría de ponencia oral, en el:

VI Simposio de Investigación Escuela de Ciencias de la Salud y Clínica Universitaria Bolivariana, UPB 2018
“Comparte tu conocimiento”

Intensidad 13 horas

Realizado en: Medellín, 6 y 7 de noviembre de 2018

CAMILO OSORIO BARKER
Decano
Escuela de Ciencias de la Salud

JUAN GUILLERMO BARRIENTOS GÓMEZ
Director Científico
Clínica Universitaria Bolivariana

ZULMA VANESSA RUEDA VALLEJO
Coordinadora de Investigación
Escuela de Ciencias de la Salud