

Trabajo Fin de Grado

Estudio de la implicación de los genes de síntesis de la pared celular en el mecanismo de acción de las avermectinas frente a micobacterias

/

Study of the role of cell wall biosynthesis genes in the mechanism of action of avermectins in mycobacteria

Autor

Marcos Manero Carranza

Directores

Santiago Ramón García

Ainhoa Lucía Quintana

Ponente

José Antonio Aínsa Claver

*Departamento de Microbiología, Medicina preventiva y Salud pública,
Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza*

Grado en Biotecnología - Curso 2019/2020

Lista de Abreviaturas

CDS: Región codificante del gen

CIM: Concentración mínima inhibitoria

CMB: Concentración mínima bactericida

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidad óptica

dsDNA: DNA de hebra doble

EMB: Etambutol

FIC: Concentración inhibitoria fraccionaria

FICI: Índice FIC

MDR-TB: Tuberculosis multi resistente a fármacos

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

REG: Secuencias reguladoras del gen (promotor y terminador)

RNA: Ácido ribonucleico

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

SEL: Selamectina

ssDNA: DNA de hebra sencilla

TB: Tuberculosis

TFG: Trabajo fin de grado

Ufc: Unidades formadoras de colonias

XDR-TB: Tuberculosis extensivamente resistente a fármacos

ÍNDICE

1. Resumen / Abstract (1)

2. Introducción (2)

2.1. Tuberculosis y tratamiento de la enfermedad (2)

2.2. Desarrollo y reposicionamiento de antimicrobianos en la actualidad (2)

2.2.1. Descubrimiento de antimicrobianos (2)

2.2.2. Reposicionamiento farmacológico (3)

2.3. Avermectinas (4)

2.3.1. Introducción (4)

2.3.2. Mecanismo de acción de las avermectinas y potencial antimicrobiano (4)

2.4. Síntesis de la pared celular y mecanismo de acción de la selamectina (4)

2.4.1. Síntesis de la pared celular en bacterias del género *Mycobacterium* (4)

2.4.2. Inhibidores de la síntesis de la pared celular y selamectina (5)

3. Objetivos (6)

4. Materiales y métodos (7)

4.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo (7)

4.2. Antibióticos empleados (7)

4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana por microdilución (8)

4.4. Cinética de muerte de *M. smegmatis* (8)

4.5. Ensayos de sinergia por tablero de ajedrez (*checkerboard*) (9)

4.6. Construcción de mutantes del operón *emb* (9)

4.6.1. Mutantes de sobreexpresión del activador transcripcional *embR* (9)

4.6.1.1. Extracción de DNA cromosómico (9)

4.6.1.2. Extracción de DNA plasmídico (10)

4.6.1.3. Construcción de plásmidos (10)

4.6.1.3.1. *pSUM36* y regulador *embR* (*CDS* y *Regulador propios*) (10)

4.6.1.3.2. *pMV261* y regulador *embR* (11)

4.6.1.4. Transformación bacteriana en *M. smegmatis* mc²155 (12)

4.6.2. Mutantes *knock-out* (12)

4.6.2.1. Amplificación del cassette de kanamicina (12)

4.6.2.2. Generación de electrocompetentes *M. smegmatis* pJV53H (13)

ÍNDICE

5. Resultados (14)

5.1. Caracterización de la actividad antimicrobiana de selamectina y etambutol (14)

5.1.1. Interacción entre selamectina, etambutol y PBTZ-169 (14)

5.1.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de selamectina y etambutol (14)

5.2. Condiciones óptimas para la extracción de RNA (17)

5.3. Rol de los genes del operón *embCAB* en la resistencia a selamectina (18)

5.3.1. Mutantes de sobreexpresión de *embR* (18)

5.3.2. Mutantes *knock-out* del operón *embCAB* y *embR* (20)

6. Discusión (21)

7. Conclusiones / Conclusions (22)

8. Bibliografía (23)

9. S. Material Suplementario

S1. Oligonucleótidos empleados

S2. Señal de MTT proporcionada por los distintos inóculos bacterianos

S3. Ensayo de determinación de la expresión génica por RT-qPCR

S4. Cinética de muerte con inóculo de 10^7 ufc/ml

S5. Comprobación primers de amplificación del cassette de kanamicina

S6. Construcción de mutantes *knock-out* por recombineering y Gibson Assembly

1. Resumen

La aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes al tratamiento convencional de primera línea genera la necesidad de desarrollar nuevos antimicrobianos para combatir la enfermedad. Una estrategia, para reducir tiempos y costes, puede provenir del reposicionamiento farmacológico como en el caso de la selamectina. Para ello, se debe determinar su mecanismo de acción empleando un microorganismo modelo como *Mycobacterium smegmatis*. En un estudio previo del Grupo de Investigación, se identificó por ensayo en tablero de ajedrez (*checkerboard*) la existencia de interacción sinérgica entre selamectina y etambutol.

En este trabajo se ha observado la ausencia de interacción con otros inhibidores de la síntesis de la pared celular como PBTZ-169, lo que parece indicar que existe una relación entre las dianas del etambutol y el modo de acción de la selamectina, que se ha estudiado en mayor profundidad. Se han construido mutantes de sobreexpresión en plásmido y *knock-out* por *recombineering* de estas dianas y se han iniciado los pasos para realizar un análisis de la respuesta transcripcional de algunos genes de síntesis de la pared celular ante el tratamiento con ambos fármacos.

También se ha caracterizado la actividad del compuesto frente a un inóculo mayor que el estandarizado por ensayos de determinación de las concentraciones mínimas inhibitoria y bactericida y cinética de muerte, llegando a establecer el perfil de acción de los compuestos y la dependencia del inóculo y las condiciones óptimas de la extracción de RNA.

Sin embargo, la pandemia de la COVID-19 no ha permitido finalizar estas dos líneas, que requieren estudios futuros de susceptibilidad a los antibióticos en los mutantes construidos y caracterizar la respuesta transcripcional al tratamiento con selamectina y etambutol en las condiciones óptimas establecidas.

1. Abstract

The emergence of *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to the first line conventional treatment generates the necessity to develop new antimicrobial compounds for the disease treatment. A strategy to reduce cost and time can come from drug repurposing as in the case of selamectin. However, its mechanism of action must be first elucidated using *Mycobacterium smegmatis* as model organism. In a previous study from the laboratory, it was identified the synergic combination between selamectin and ethambutol by checkerboard.

In this project, it has been observed the absence of interaction with other cell wall synthesis inhibitors as PBTZ-169, what suggests that there is a relationship between the targets of ethambutol and the mechanism of action of selamectin, which has been studied in depth. Overexpression in plasmid and knock out by recombineering mutants of these targets have been built and the first steps to conduct an analysis of transcriptional response of some cell wall biosynthesis genes after treatment with both drugs have been performed.

Compound activity against a greater inoculum than the standardized has also been characterised by minimum inhibitory and bactericidal concentration and time kill assays, establishing the compound action profile, inoculum dependence and optimal conditions for RNA extraction.

However, the COVID-19's pandemic has not allowed us to finish these lines of action which require further susceptibility studies to the built mutants and the characterization of the transcriptional response to selamectin and ethambutol's treatment in the optimal established conditions.

2. Introducción

2.1. Tuberculosis y tratamiento de la enfermedad

La tuberculosis (TB) es la enfermedad infecciosa con mayor mortalidad en el mundo. Causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, ha sido considerada una emergencia pública global durante los últimos 25 años. La tasa de infección anual se estimó en 2018 en 10 millones de personas, aunque los casos a nivel nacional pueden variar entre 50 y más de 5.000 por millón de personas y año. Esto se debe, en parte, a la distribución desigual de la enfermedad y su relación con el índice de desarrollo del país. Además, se estima que en la actualidad 1.700 millones de personas están infectados de forma latente con el bacilo y podrían desarrollar la enfermedad en un futuro. Tanto la incidencia como la mortalidad de la TB están asociados, entre otros factores, a los índices de pobreza o co-morbilidad con VIH y, aunque la incidencia ha disminuido un 1,6% anual desde el año 2000, se espera un incremento en la misma como consecuencia del impacto de la COVID-19 (1,2).

Aunque la enfermedad ha sido conocida a lo largo de la historia, alcanzando la proporción de pandemia durante los siglos XVIII y XIX (3), el agente infeccioso que la causaba no fue conocido hasta su aislamiento por Robert Koch en 1882. Desde ese momento, comenzaron las acciones para reducir la mortalidad de la TB con el Movimiento Sanatorio (4). Con la aparición de los primeros quimioterápicos y antibióticos, se desarrolló el primer tratamiento farmacológico para la enfermedad en 1944 empleando estreptomycin. Aunque se observó una mejoría respecto al tratamiento anterior, rápidamente aparecieron **cepas resistentes**, haciendo necesario el uso combinado con ácido paraaminosalicílico (5) o el empleo de rifampicina para reducir el período de tratamiento y las cepas resistentes. En 1990 se introdujo el tratamiento actual, un **régimen intensivo de 2 meses llamado RHZE** con rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z) y etambutol (E) seguidos de 4 meses de isoniazida y rifampicina. El empleo combinado de estos fármacos busca reducir los efectos adversos y mejora la adherencia del paciente al tratamiento, tratando además de reducir la aparición de cepas resistentes (6), aunque estas han continuado emergiendo (7).

Para facilitar su estudio y tratamiento, las cepas resistentes se han clasificado como MDR-TB y XDR-TB. La **tuberculosis multi resistente a fármacos (MDR-TB)** posee **resistencia a rifampicina e isoniazida**. Aunque hay múltiples tratamientos en estudio para estas cepas (8), poseen baja tasa de éxito y altos efectos adversos por el empleo prolongado de múltiples fármacos (9). La **tuberculosis extensivamente resistente a fármacos (XDR-TB)** constituye el 9,6% de los casos MDR-TB. Estas cepas poseen, además, **resistencia a inyectables y fluoroquinolonas** y deben ser tratadas con más de 6 fármacos en la fase intensiva y 4 en la fase de continuación (10). Recientemente se ha introducido la bedaquilina (B), aprobada en 2012, que junto a pretomanid (Pa) y linezolid (L) forman parte del nuevo régimen (BPaL) ensayado para pacientes XDR-TB (11).

2.2. Desarrollo y reposicionamiento de antimicrobianos en la actualidad

2.2.1. Descubrimiento de antimicrobianos

El desarrollo de un nuevo antimicrobiano es un proceso largo y costoso que puede abarcar más de quince años (12) y alcanzar 2.870 millones de dólares (13). Los antimicrobianos son, normalmente, moléculas pequeñas que derivan de un metabolito producido por un microorganismo cuya diana es una enzima que participa en un proceso esencial para otro microorganismo, como la síntesis de la pared celular (beta-lactámicos).

En la primera época del descubrimiento, se identificaron compuestos químicos producidos por microbios presentes en el suelo con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos vecinos, conduciendo al descubrimiento de las principales familias de antibióticos aunque sin conocer su mecanismo de acción. Estos **test fenotípicos de célula completa** consisten en enfrentar al microorganismo productor, aislado del suelo, a una serie de microorganismos indicadores para observar la inhibición del crecimiento sobre estos (12).

Cuando los antibióticos descubiertos por este método dejaron de efectivos en el tratamiento de las enfermedades, los avances en biología estructural e ingeniería genética permitieron el desarrollo de una aproximación basada en el **diseño racional de fármacos**. Esta estrategia empleaba técnicas de cribado de alto rendimiento para identificar fármacos capaces de inhibir selectivamente proteínas esenciales, logrando conocer simultáneamente la actividad inhibitoria y el mecanismo de acción. Sin embargo, aunque los compuestos tenían capacidad para inhibir la diana estudiada *in vitro*, en muchas ocasiones la molécula no era capaz de atravesar la pared celular, resultando en la pérdida de actividad del compuesto *in vivo*.

A pesar de ello, esta aproximación no soluciona el problema de la **aparición de resistencias a antibióticos**. Para minimizarlo, los nuevos antibióticos son empleados puntualmente como último recurso frente a infecciones multirresistentes. Esto, junto al gran coste necesario para su desarrollo y la diseminación de resistencias que acortan su vida útil, redujo la investigación en el desarrollo de nuevos antimicrobianos generando un “agujero de innovación” en el que no se descubrieron nuevas familias entre 1960 y 2000 (12).

2.2.2. Reposicionamiento farmacológico

El reposicionamiento farmacológico permite acortar los períodos desde el descubrimiento de una actividad determinada en una molécula hasta su uso en la clínica. Esta estrategia se basa en la búsqueda de **nuevos usos para fármacos ya aprobados para uso clínico**, o en procesos finales de estarlo. De esta manera, se reducen los tiempos y costes asociados al desarrollo del fármaco, que únicamente requiere la realización de ensayos preclínicos de eficacia y fases clínicas tardías.

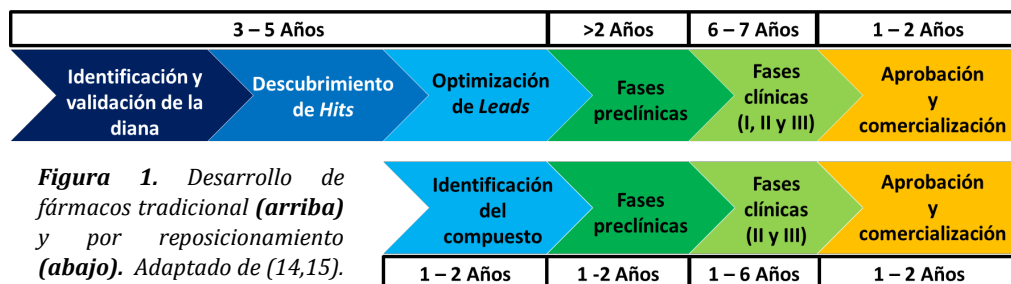


Figura 1. Desarrollo de fármacos tradicional (*arriba*) y por reposicionamiento (*abajo*). Adaptado de (14,15).

Aunque que las características farmacocinéticas, farmacodinámicas y toxicológicas serían conocidas acortando las fases iniciales (15), deben realizarse las fases preclínicas de comprobación de la eficacia y clínicas tardías, donde se establece la seguridad y eficacia de la molécula para la nueva indicación (**Figura 1**). Sin embargo, para el caso de antimicrobianos se suele observar esta actividad a mayores concentraciones que los niveles normales de exposición farmacológica, lo que puede suponer un incremento en la toxicidad y reacciones adversas. No obstante, aunque puede ser necesario definir nuevos perfiles de farmacocinética y farmacodinámica, suponen un punto de partida más fiable que el desarrollo *de novo* de un antibiótico.

2.3. Avermectinas

2.3.1. Introducción

Las avermectinas son una familia de compuestos, producidos por *Streptomyces avermitilis*, con acción antiparasítica (16). Sobre ellos, se realizaron diversas modificaciones en su estructura para dar lugar a derivados como la selamectina (SEL) (**Figura 2**) o la ivermectina, el producto de salud animal más vendido del mundo (17) y un importante fármaco antiparasítico en humanos (18).

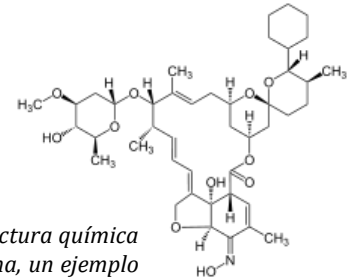


Figura 2. Estructura química de la selamectina, un ejemplo de avermectina.

2.3.2. Mecanismo de acción de las avermectinas y potencial antimicrobiano

Las avermectinas interfieren con los canales de cloro dependientes de glutamato, localizados en células nerviosas y musculares de los parásitos (19); al unirse a ellos producen su apertura y la consecuente entrada de cloro en la célula. Esto, produce la hiperpolarización de la membrana, lo que impide la transmisión del impulso nervioso y produce la muerte del parásito por parálisis (17). La molécula posee gran especificidad por estos canales a concentraciones nanomolares. Sin embargo, a concentraciones micromolares posee cierta inespecificidad por canales dependientes de ligando en vertebrados como pueden ser los receptores de GABA o los receptores de acetil colina (20) lo que puede causar toxicidad. Además, mutaciones en la proteína ABCB1 (Glicoproteína P) pueden causar neurotoxicidad, al ser la principal proteína encargada de evitar su paso por la barrera hematoencefálica (21).

Desde hace más de 40 años se han encontrado nuevos usos para los compuestos derivados de la familia, con efectos diversos que varían desde actividad anti viral, contra HIV o dengue (22); a antitumoral, frente a ciertos tipos de leucemia (23). Incluso se ha observado su capacidad para inhibir la replicación del SARS-CoV2 (24). Aunque inicialmente no se observó efecto antimicrobiano contra diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas, recientemente se ha observado su **actividad *in vitro* frente a *M. tuberculosis***, tanto con cepas de laboratorio como MDR-TB y XDR-TB clínicas (25).

Al comparar la capacidad de la ivermectina y sus derivados para inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* se observó que la **selamectina producía mayor inhibición** que el resto de compuestos (26), por lo que fue introducido en sucesivos estudios para la identificación del modo de acción frente a este microorganismo en los cuales se observó una **interacción sinérgica entre selamectina y etambutol** (27).

2.4. Síntesis de la pared celular y mecanismo de acción de la selamectina

2.4.1. Síntesis de la pared celular en bacterias del género *Mycobacterium*

La pared celular bacteriana es una estructura compuesta principalmente por peptidoglicano, un polímero de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. La pared de las bacterias del género *Mycobacterium* contiene, además, un polímero de arabinogalactano unido al peptidoglicano y largas cadenas de ácidos micólicos, con relevancia para su homeostasis, patogenicidad y supervivencia (28). El estudio de la síntesis de esta pared ha permitido comprender las rutas metabólicas implicadas en este proceso y entender el funcionamiento de fármacos para el tratamiento de la TB como el etambutol o el PBTZ-169.

El etambutol (EMB) es un fármaco de primera línea empleado contra la TB que interfiere con la correcta síntesis de la pared celular al inhibir selectivamente las enzimas **EmbA, EmbB y EmbC** (29,30), codificadas en el operón *embCAB* presente en bacterias del género *Mycobacterium*. Su expresión está controlada por el activador transcripcional EmbR y codifica para tres arabinosil-transferasas que incorporan residuos de arabinosa sobre lipomanano (EmbC) o galactano (EmbA y EmbB) permitiendo la posterior inserción de los ácidos micólicos en la pared celular (31).

El PBTZ-169 es un potencial fármaco en desarrollo contra la TB, que actualmente se encuentra en fases clínicas. Interfiere con la síntesis de la pared celular inhibiendo de forma selectiva la proteína **DprE1** (32). Esta enzima y DprE2 catalizan de forma sucesiva el paso de decaprenil-fosforibosa a decaprenil-fosfo-arabinofuranosa, sustrato de EmbA, EmbB y EmbC (31).

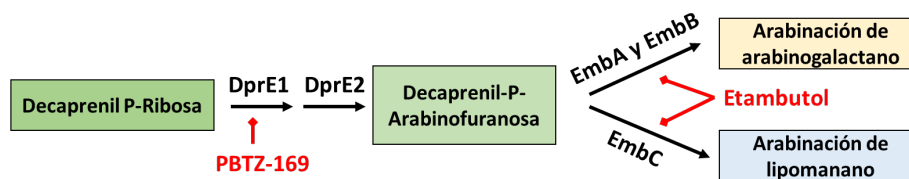


Figura 3. Esquema de la inhibición ejercida por etambutol y PBTZ-169 en el proceso de síntesis de la pared celular.

2.4.2. Inhibidores de la síntesis de la pared celular y selamectina

Identificar el modo de acción de un compuesto antimicrobiano permite conocer la diana y ruta metabólica vital afectada. Esto, puede suponer una base sobre la cual realizar modificaciones sobre el compuesto para aumentar su afinidad por la diana o capacidad inhibitoria (optimización) pero además permite una mejor comprensión de la biología de la bacteria y sus rutas, lo que facilita el descubrimiento de potenciales nuevos fármacos contra antiguas o nuevas dianas.

Alguna de las estrategias recientes para el descubrimiento del modo de acción de los antimicrobianos hace uso de las tecnologías ómicas como la transcriptómica (33). Por ejemplo, el estudio de la respuesta transcripcional en presencia y ausencia de un antimicrobiano permite definir un perfil de expresión con relación al tratamiento para identificar potenciales dianas del fármaco en estudio. Este proceso se puede realizar por medio de un estudio del transcriptoma completo del microorganismo, que supone un gran coste de tiempo y recursos; o estudiando un número reducido de genes y proteínas con posible implicación en el mecanismo de acción del compuesto.

La identificación de la interacción sinérgica entre selamectina y etambutol ha permitido identificar un posible mecanismo de acción relacionado. El conocimiento del modo de acción del etambutol permite centrar la búsqueda de **respuesta transcripcional** en un número reducido de genes, acortando el tiempo necesario para realizar el estudio. Además, restringir el número de genes que podrían ser relevantes en el modo de acción del compuesto permite su **estudio individualizado**. Así, se pueden realizar **mutantes de sobreexpresión y knock-out** de los genes implicados para observar un posible cambio en la respuesta al compuesto. Además, el estudio de la interacción entre selamectina y etambutol con PBTZ-169 puede servir para observar la relevancia de DprE1 en el mecanismo de acción de ambos compuestos.

Estos experimentos requieren etapas de cultivo bacteriano, que en el caso de *M. tuberculosis* pueden extenderse durante años debido al largo tiempo de duplicación del organismo. Por ello, los ensayos se realizan en *Mycobacterium smegmatis mc²155*, un microorganismo modelo de micobacterias no patógeno y con rápido crecimiento que facilita la realización de los ensayos.

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado (TFG) es contribuir a la determinación del rol que toman los genes de síntesis de la pared celular en la susceptibilidad de *M. smegmatis* a selamectina. Para ello, se siguen dos líneas de trabajo. La primera consiste en la **evaluación de la respuesta transcripcional** de *M. smegmatis* frente a selamectina y etambutol. Paralelamente, se busca observar la **implicación de los genes del operón *embCAB*** en la susceptibilidad del microorganismo, que se comprobará mediante la construcción de mutantes de sobreexpresión y *knock-out* de estos genes para determinar cambios en la respuesta a estos fármacos.

En base a esto, se proponen los siguientes objetivos parciales:

1. Determinar la interacción existente entre selamectina – PBTZ-169 y etambutol – PBTZ-169 contra *M. smegmatis*.
2. Establecer las condiciones óptimas de extracción de RNA en un cultivo de *M. smegmatis* tratado con selamectina, etambutol y con la combinación de ambos fármacos.
3. Construir mutantes de sobreexpresión del operón *embCAB* por sobreexpresión del regulador EmbR y construir mutantes *knock-out* simples y múltiples de los genes del operón *embCAB* por *recombineering*.

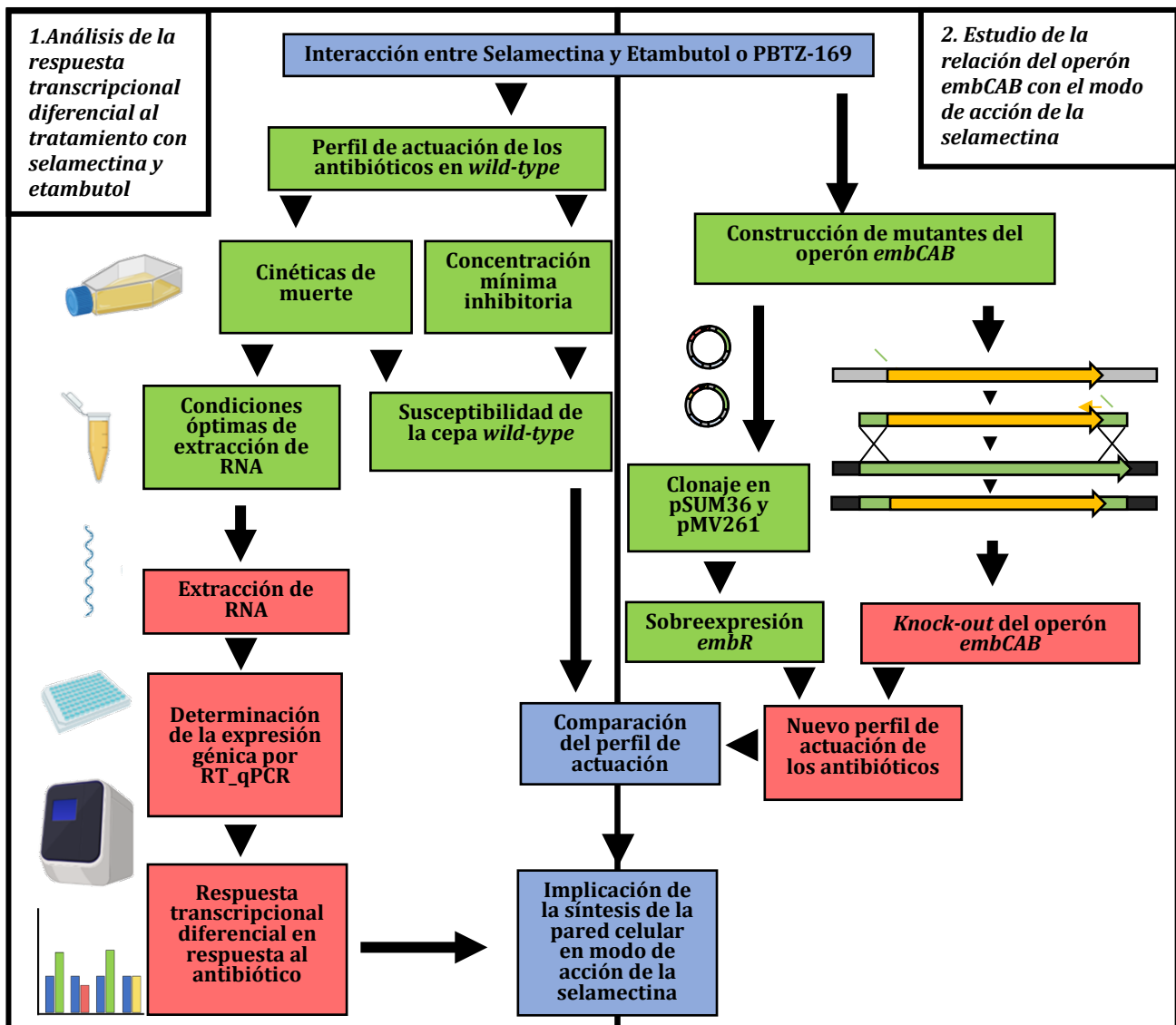


Figura 4. Esquema de trabajo seguido en este TFG. En verde, experimentos realizados. En rojo, experimentos no realizados a causa del cierre del laboratorio por la COVID-19.

4. Materiales y métodos

4.1. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *M. smegmatis* fueron cultivadas a 37 °C en medio líquido Middlebrook 7H9 (BD Difco) + 0,2% glicerol (v/v) (Sigma) + 10% ADC (v/v) (concentraciones finales 0,5% Albúmina sérica bovina – 0,2% Dextrosa – 0,0003% Catalasa – 0,085% NaCl) (BD Difco) + 0,05% tyloxapol (v/v) (Sigma) o 0,2 % glicerol (Sigma); medio líquido LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl); agar Middlebrook 7H10 (BD Difco) y agar LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl, 17 g/l agar bacteriológico). Las cepas de *Escherichia coli* fueron cultivadas a 37 °C en agar y medio líquido LB. Las cepas bacterianas que contenían plásmidos fueron cultivadas en los medios anteriores con un suplemento de antibiótico a las concentraciones correspondientes según la resistencia portada: kanamicina 20 µg/ml, higromicina B 20 µg/ml. Para conservar cepas a largo plazo se almacenaron alícuotas de los cultivos -80 °C con un 15% de glicerol (v/v).

Tabla 1. Cepas empleadas en el estudio y sus características más relevantes.

Cepas	Características más relevantes
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	Cepa modelo de micobacterias con crecimiento rápido y no patogénica.
<i>Mycobacterium smegmatis</i> pJV53H	Porta el plásmido pJV53H, empleado en <i>M. smegmatis</i> para la realización de mutantes <i>knock-out</i> por <i>recombineering</i> . Posee las proteínas Che9c gp60 y gp61 responsables del proceso de recombinación bajo un promotor inducible por acetamida así como resistencia a higromicina (34).
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Cepa modelo de <i>E. coli</i> ampliamente empleada en laboratorio. Empleada para la propagación de plásmidos y pasos intermedios de biología molecular.
<i>Escherichia coli</i> pSUM36	Empleada para la propagación del plásmido pSUM36. Este es empleado para la sobreexpresión génica por multicopia bajo control del promotor y terminador propios del gen. Porta resistencia a kanamicina (35).
<i>Escherichia coli</i> pMV261	Empleada para la propagación del plásmido pMV261. Este es empleado para la sobreexpresión génica bajo el control del promotor de Hsp60 fuerte y constitutivo y un terminador plasmídico. Porta resistencia a kanamicina (36).
<i>Mycobacterium smegmatis</i> pSUM36 + <i>embR</i>	Cepa de sobreexpresión del regulador EmbR que contiene el plásmido pSUM36 con el marco abierto de lectura y secuencias reguladoras de <i>embR</i> (<i>MSMEG_1963</i>) clonado en el sitio <i>PstI</i> del sitio de clonaje múltiple.

4.2. Antibióticos empleados

Los antibióticos fueron pesados y disueltos en el disolvente correspondiente a concentraciones de 10 mg/ml salvo PBTZ-169 que fue disuelto a 7 µg/ml. Todos los antibióticos fueron almacenados a -20°C.

Tabla 2. Antibióticos empleados en el estudio.

Antibiótico	Referencia	Disolvente
Selamectina	Y0000814 (European Pharmacopoeia)	Etanol
Etambutol	E-4630 (Sigma)	H ₂ O
PBTZ-169	Dr Vadim Makarov (*)	Dimetilsulfóxido (DMSO)

(*) Vadim Makarov. (Department of Stresses of Microorganisms, A. N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Leninsky Prospekt 33-2, Moscow, 119071, Russian Federation.)

4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana por microdilución

Los experimentos de determinación de CIM por microdilución determinan la concentración mínima de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano en un 90% respecto a un cultivo sin antibiótico.

Los ensayos fueron llevados a cabo en placas de titulación de 96 pocillos de fondo plano con volumen final de 150 µl incluyendo, por cuadruplicado, blancos y controles de crecimiento. Los compuestos fueron probados en réplica doble mediante diluciones seriadas (1:2) con concentraciones máximas iniciales de 128 µg/ml para selamectina, 64 µg/ml para etambutol y 40 ng/ml para PBTZ-169. Para todos los compuestos, el experimento fue realizado en dos condiciones diferentes, inoculando inicialmente 10⁵ o 10⁷ unidades formadoras de colonias (ufc)/ml, estimadas por mediciones de densidad óptica (DO) a 600 nm (una DO₆₀₀ de 0,125 corresponde a 10⁷ ufc/ml). Tras 3 días de incubación a 37 °C, se añadieron 30 µl de bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (5 mg/ml) + 20% Tween 80 (v/v).

Las bacterias en crecimiento poseen metabolismo activo y pueden reducir el compuesto MTT de coloración amarilla a una sal de formazán de coloración violeta, que es disuelta por acción del detergente Tween 80. Tras tres horas de incubación, se realizó la medición de DO_{580nm} en un lector de placas de 96 pocillos. Con la lectura, se realiza una relación entre la densidad óptica y la concentración de bacterias vivas. Posteriormente, mediante la **Ecuación 1**, se puede obtener la viabilidad bacteriana a una concentración conocida de antibiótico, lo que permite establecer la concentración mínima para inhibir al menos el 90% del crecimiento bacteriano (CIM).

$$Viabilidad (i) (\%) = \frac{Valor (i) - Media de pocillos blanco}{Media de pocillos control positivo} * 100 \quad (Ecuación 1)$$

Se realizó además, un experimento de determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) tomando 20 µl de cultivo bacteriano antes de añadir el MTT, que fueron añadidos sobre 180 µl de PBS + tyloxapol 0,1% (v/v) para realizar diluciones seriadas 1:10 de la misma hasta 10⁻⁸. Finalmente, se sembraron 5 µl en placas de agar LB y se observó el crecimiento 72 horas después.

4.4. Cinética de muerte de *M. smegmatis*

El experimento de cinética de muerte determina el tipo de actividad ejercida por las sustancias probadas contra *M. smegmatis* (bactericida o bacteriostático) y su perfil temporal. Se crecieron cultivos bacterianos en medio líquido 7H9 + 0,2% glicerol + ADC 10% en presencia de antibióticos a distinta concentración: selamectina 4, 8, 16, 20, 80 y 200 µg/ml y etambutol 2, 4, 8, 20, 40 y 100 µg/ml que corresponden a 1, 2, 4, 10, 20 y 50 veces la CIM en cada caso, incluyendo un cultivo en ausencia de ellos a modo de control. El experimento fue realizado por duplicado con dos inóculos bacterianos diferentes (10⁵ ufc/ml y 10⁷ ufc/ml).

A diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 6, 24, y 48 horas) se tomaron alícuotas de 50 µl que fueron diluidas en relación 1:10 en 450 µl de PBS + tyloxapol 0,1% (v/v) desde 10⁻¹ a 10⁻⁶. Se plaquearon 100 µl de cada dilución en placas de agar LB y se incubaron a 37 °C durante 72 horas, tras las cuales se determinaron las ufc/ml del cultivo original por conteo de las colonias crecidas en las placas con relación a la dilución plaqueada. Por último, se construyeron las curvas de cinética de muerte (log₁₀ ufc/ml – tiempo).

4.5. Ensayos de sinergia por tablero de ajedrez (*checkerboard*)

El ensayo de sinergia por *checkerboard* permite observar si dos compuestos (A y B) interaccionan de forma sinérgica, antagónica o no interaccionan. Se inoculan $2 \cdot 10^5$ ufc/ml de *M. smegmatis* en cada pocillo de una placa de 96 pocillos que contiene una matriz bidimensional de diluciones seriadas 1:2 de dos compuestos diferentes, comenzando en una concentración de 2x CIM (**Figura 5**). Tras una incubación de 24 o 72 horas a 37 °C, se determina el crecimiento por medio de MTT, como en el experimento de determinación de concentración mínima inhibitoria.

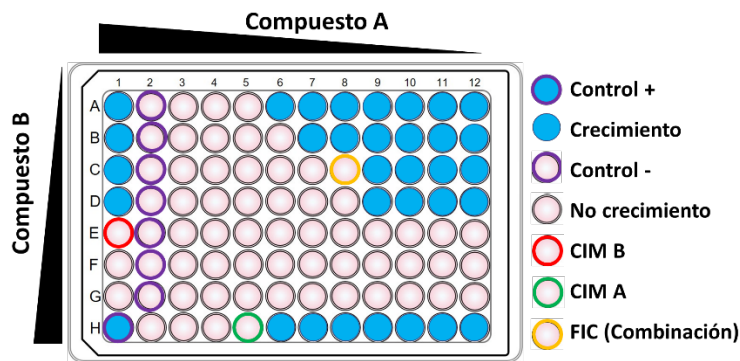


Figura 5. Ejemplo de ensayo de sinergia por tablero de ajedrez checkerboard. La columna 1 proporciona la CIM de B al carecer de compuesto A. La fila H proporciona la CIM de A al carecer de compuesto B.

Posteriormente, se realiza una estandarización del crecimiento bacteriano por pocillo empleando la **Ecuación 1**. La interacción se determina por medio del índice FIC (FICI) como la suma de FIC(A) y FIC(B) o concentración inhibitoria fraccionaria de A y B. Observando la CIM de los compuestos A y B en presencia del otro se puede establecer su FIC (**Ecuación 2**) y el FICI global que permite conocer la interacción (**Ecuación 3**). Dos antibióticos poseen interacción sinérgica si su FICI es menor de 0,5, no poseen interacción si su FICI se encuentra entre 0,5 y 4 y poseen interacción antagónica cuando su FICI es superior a 4 (37). Este ensayo se realizó de forma cruzada y por duplicado entre selamectina, etambutol y PBTZ-169.

$$FIC(A) = \frac{CIM\ A\ en\ presencia\ de\ B}{CIM\ A} \quad (\text{Ecuación 2}) \quad FICI = FIC(A) + FIC(B) \quad (\text{Ecuación 3})$$

4.6. Construcción de mutantes del operón *emb*

4.6.1. Mutantes de sobreexpresión del activador transcripcional *embR*

Empleando los plásmidos pSUM36 y pMV261, se realiza el clonaje del regulador del operón *embCAB*, *embR* (*MSMEG_1963*), identificado por BLAST de *Rv1267c* (Gen *embR* en *M. tuberculosis* H37Rv) frente al genoma de *M. smegmatis*.

4.6.1.1. Extracción de DNA cromosómico

Para la amplificación del gen, se realiza la extracción y purificación de DNA cromosómico de *M. smegmatis* mc²155. Partiendo de un cultivo estacionario, se centrifugan 5 ml a 4000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se resuspenden en 400 µl de solución TE (100 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8) y las bacterias son inactivadas a 85 °C durante 15 minutos. A continuación, se enfrían ligeramente las muestras, se añaden 50 µl de lisozima 10 mg/ml y se incuban a 37 °C durante una hora. Seguidamente, se añaden 72,5 µl de SDS 10% (v/v) y 2,5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incuban 10 minutos a 65 °C. Tras la incubación, se añaden 100 µl de una disolución de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio)/NaCl (10% CTAB (v/v), 0,7 M NaCl) precalentada a 65 °C y 100 µl de NaCl 5 M y se incuban a 65 °C durante 10 minutos.

La extracción de DNA se realiza añadiendo 750 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Posteriormente, las muestras son centrifugadas durante 5 minutos a 12000 rpm y se recoge la fase acuosa. Este paso de extracción de DNA se lleva a cabo dos veces. Tras realizar la extracción de la fase acuosa por segunda vez, los ácidos nucleicos se precipitan añadiendo 420 μ l de isopropanol, se introducen en un congelador a -20 °C durante al menos 30 minutos y se recogen por centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos, desechando el isopropanol (sobrenadante).

A continuación, el precipitado de ácidos nucleicos es lavado con etanol 70% (v/v) y centrifugado de nuevo 5 minutos a 12000 rpm. Finalmente, los ácidos nucleicos se resuspenden en 50 μ l de agua libre de nucleasas (Qiagen). Tras esto, se determina la concentración del DNA y su pureza empleando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) y es almacenado a -20°C.

4.6.1.2. Extracción de DNA plasmídico

Las células recogidas por centrifugación de 1,5 ml de cultivo estacionario, se resuspenden en 100 μ l de Solución 1 preenfriada en hielo (50 mM glucosa, 10 mM EDTA y 25 mM Tris pH 8). Tras esto, se adicionan 200 μ l de Solución 2 (0,2 M NaOH, 1% v/v SDS) y el contenido del tubo es mezclado con suavidad hasta que adquiere un tono transparente e incubado 5 minutos en hielo. A continuación, se añaden 150 μ l de Solución 3 fría (5 M acetato potásico, 11,5% v/v ácido acético glacial), se mezcla con suavidad y se incuban 5 minutos en hielo produciendo la aparición de un precipitado blanco. El tubo es centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos y se toma el sobrenadante, que es transferido a un tubo nuevo.

La extracción de DNA plasmídico se realiza mediante la metodología descrita anteriormente, resuspendiendo el precipitado final en 30 μ l de agua libre de nucleasas. Finalmente se añade 1 μ l de RNasa 1 mg/ml y se incuba 10 minutos a 37 °C. Tras esto, se determina la concentración del DNA y su pureza siendo almacenado a -20 °C. Este protocolo se empleó para la purificación de las construcciones finales de los plásmidos pSUM36 y pMV261 con sus respectivos insertos. Para el resto de las purificaciones se empleó el kit de extracción High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) a partir de cultivos estacionarios de *E. coli* empleados para propagar los plásmidos.

4.6.1.3. Construcción de plásmidos

4.6.1.3.1. pSUM36 y regulador *embR* (CDS y Regulador propios)

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó el marco de lectura abierto del gen *MSMEG_1963* junto a 500 pares de bases aguas arriba (*upstream*) del inicio de traducción y aguas abajo (*downstream*) del codón de terminación, regiones que se asume que contendrán el promotor y terminador del gen. Se realizó un clonaje no direccional empleando el sitio de restricción *Pst*I (único en pSUM36) y sitios de restricción compatibles *Nsi*I en los extremos 5' de los primers (no corta en el interior del gen *embR*).

El diseño de los primers se realizó mediante el programa Benchling (38) a partir de la secuencia génica obtenida en la base de datos Mycobrowser (39) añadiendo el sitio de restricción en 5' y 5 bases extra *upstream* para permitir el corte efectivo (40).

Las secuencias de todos los primers empleados se encuentran en las **Tablas S1.1 a S1.4 de material suplementario**.

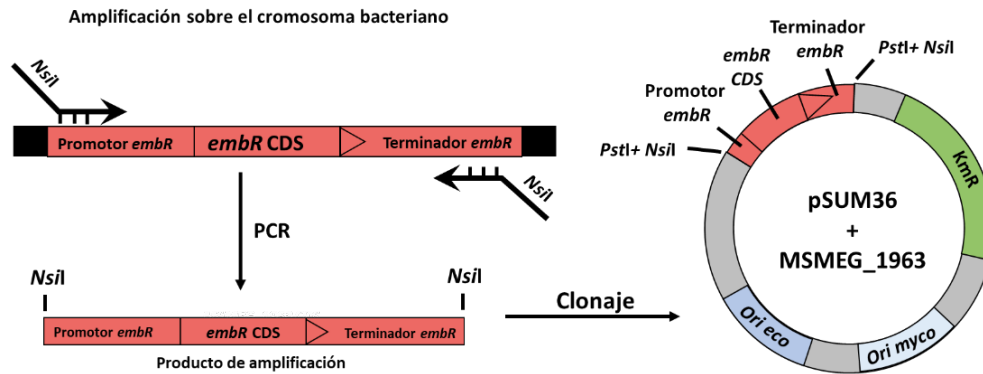


Figura 6: Clonaje del marco de lectura abierto de MSMEG_1963 junto a su promotor y terminador en pSUM36.

Sobre el genoma de *M. smegmatis* mc²155 se llevó a cabo una PCR de alta fidelidad empleando los primers pSUM36_F y pSUM36_R y la polimerasa PrimeStar GXL (Takara) que se purificó con el kit High Pure PCR product isolation (Roche). Posteriormente, el plásmido y el producto de PCR fueron digeridos respectivamente con las enzimas *Pst*I y *Nsi*I (Fermentas), que fueron inactivadas a continuación. El plásmido fue desfosforilado con fosfatasa alcalina rAPid Alkaline Phosphatase (Roche) y se realizó la ligación inserto:vector con ratios molares de 3:1 y 5:1 en presencia de T4DNA ligasa (Invitrogen) durante 24 horas, que posteriormente fue inactivada por calor.

El producto de ligación fue transformado mediante choque térmico sobre alícuotas de *E. coli* DH5 α termocompetentes. Las alícuotas guardadas a -80 °C fueron descongeladas en hielo. Sobre ellas se añadieron 5 μ l de la mezcla de ligación y fueron incubadas en hielo durante 10 minutos. A continuación, fueron colocadas en un baño a 42 °C durante 50 segundos y resuspendidas en 1 ml de medio LB líquido. Finalmente, se incubaron durante 1 hora a 37 °C para permitir la expresión del gen de resistencia a kanamicina y plaqueadas en agar LB con kanamicina 20 μ g/ml.

Al día siguiente, sobre las colonias crecidas en la placa, se realizó una PCR *on colony* para comprobar que poseían el plásmido con el inserto correcto empleando el primer *forward* (pMV_F) y un primer *check* (pMV_Check-R) interno del gen, que proporcionan un producto de PCR de 1,2 kb (**Figura 13**). Dado que el gen clonado posee su promotor y regulador propios no es necesario estudiar la direccionalidad del clonaje. Las colonias positivas fueron propagadas en medio LB líquido con kanamicina y el plásmido fue extraído mediante el protocolo de aislamiento de plásmidos recogido en el apartado 4.6.1.2. y conservado a -20 °C en agua libre de nucleasas.

4.6.1.3.2 pMV261 y regulador *embR*

Se clonó la región codificante (CDS) del gen *MSMEG_1963* de forma no direccional empleando el sitio de restricción único *Eco*RI, localizado en el sitio de clonaje múltiple del plásmido pMV261. Para ello se amplifica la CDS mediante una PCR de gran fidelidad, empleando dos primers con sitios *Eco*RI en sendos extremos 5' (primers pMV_F y pMV_R) sobre el DNA genómico de *M. smegmatis* mc²155.

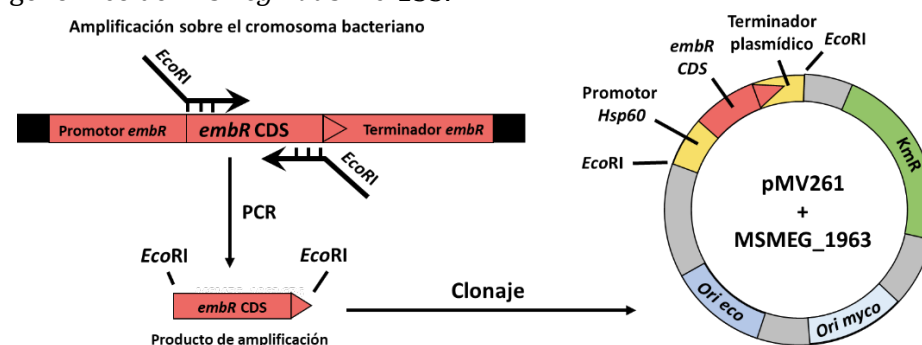


Figura 7: Clonaje del marco de lectura abierto de MSMEG_1963 en pMV261 quedando bajo control del promotor Hsp60 y terminador plasmídico.

Para ello, el plásmido pMV261 y el producto de PCR fueron digeridos con la enzima *EcoRI* (Fermentas). A continuación, se inactivó la enzima de restricción, se desfosforiló el vector y se realizó la reacción de ligación en las mismas condiciones que la construcción anterior. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH5 α termocompetentes. Tras el crecimiento de las colonias, la correcta direccionalidad se comprobó mediante PCR *on colony*, empleando el primer *check* interno del gen (pMV_Check_R) y un primer *forward* (pMV_Check_F) que hibrida en el interior del plásmido, resultando en un producto de amplificación de 1,3 kb (**Figura 14**). Así, se comprueba la direccionalidad del inserto en el vector, que en este caso si es relevante dado que el gen empleará el promotor Hsp60 del vector para su expresión.

4.6.1.4. Transformación bacteriana en *M. smegmatis* mc²155

2 ng de los plásmidos con el inserto dializados en agua libre de nucleasas fueron transformados por electroporación sobre alícuotas de *M. smegmatis* electrocompetentes en cubetas de 2 mm de paso enfriadas en hielo a 2,5 kV, 25 μ F y 1000 Ω . Posteriormente, fueron incubadas durante 3 horas en medio 7H9 + Tween 80 para permitir la expresión del cassette de resistencia al antibiótico y sembradas en placas de 7H10 con kanamicina 20 μ g/ml a 37 °C.

4.6.2. Mutantes *knock-out*

Empleando el sistema de *recombineering* (34) se realizan mutantes *knock-out* de los genes del operón *embCAB* (MSMEG_6387-9) identificado por BLAST de los genes de *M. tuberculosis* H37Rv frente al genoma de *M. smegmatis*. Los mutantes a realizar serán: mutante triple $\Delta embCAB$, mutante doble $\Delta embAB$ y los mutantes sencillos $\Delta embA$, $\Delta embB$, $\Delta embC$, $\Delta embR$.

4.6.2.1. Amplificación del cassette de kanamicina

La estrategia empleada para la delección de los genes se basa en el empleo de primers específicos que amplificarán un cassette de resistencia a kanamicina. Estos poseen una cola de 50 nucleótidos en el extremo 5' que no hibridará en el vector, sino que será idéntica a un fragmento del gen que se desea eliminar (**Figura 8**). Por ello, se realizan 6 PCR de amplificación del cassette de resistencia a kanamicina con las parejas de primers correspondientes (**Tabla 3**) empleando la polimerasa MyTaq DNA Polymerase (Bioline). Los productos de PCR fueron purificados antes de su empleo posterior por medio del Kit indicado anteriormente en el punto 4.6.1.2.

Tabla 3. Esquema de empleo de primers para la generación de mutantes *knock-out* de los distintos genes.

Nº	Mutante	Primer Forward	Primer Reverse
1	$\Delta embCAB$	Forward EmbC	Reverse EmbB
2	$\Delta embAB$	Forward EmbA	Reverse EmbB
3	$\Delta embA$	Forward EmbA	Reverse EmbA
4	$\Delta embB$	Forward EmbB	Reverse EmbB
5	$\Delta embC$	Forward EmbC	Reverse EmbC
6	$\Delta embR$	Forward EmbR	Reverse EmbR

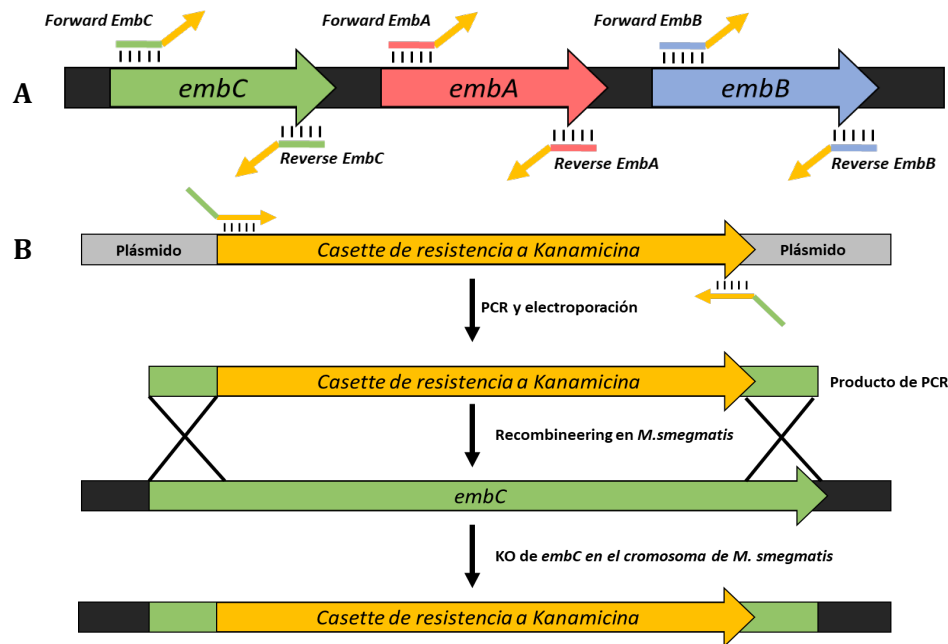


Figura 8. A. Esquema del operón *embCAB* y fundamento del diseño de los primers para *knock-out*.
B. Proceso de amplificación del cassette de kanamicina con los primers anteriores y generación de mutantes *knock-out* de *embC* sobre el genoma de *M. smegmatis* mediante el sistema de recombineering.

4.6.2.2. Generación de electrocompetentes *M. smegmatis* pJV53H

El funcionamiento del sistema de *recombineering* se basa en la expresión de gp60, una exonucleasa 5' -> 3' que genera ssDNA a partir del producto de PCR dsDNA; y gp61, que se une a los extremos de este ssDNA. Durante la replicación, este sustrato puede sufrir un proceso de recombinación en la hebra retardada favorecido por la interacción de gp61 con la maquinaria de replicación en los fragmentos de Okazaki. Gracias a su acción recombinasa, gp61 produce la sustitución del gen diana por el cassette de resistencia a kanamicina flanqueado por colas homólogas al gen diana, generando un mutante *knock-out*.

Se inició un cultivo de *M. smegmatis* pJV53H (porta gp60 y gp61) en 100 ml de 7H9 + 0,05% Tween 80 + 0,2% succinato (v/v) que mejorará la inducción del promotor inducible por acetamida. Tras un crecimiento *overnight*, se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm. Cuando esta alcanza la fase exponencial media (entre 0,5 y 1), se añade acetamida hasta una concentración final de 0,2% (v/v) que inducirá la expresión de las enzimas del sistema de *recombineering*. Posteriormente, las células son incubadas en hielo durante 1,5 horas y posteriormente centrifugadas a 3000 rpm y 4 °C durante 10 minutos para la formación de un pellet bacteriano.

A continuación, son lavadas tres veces con una disolución de 10% glicerol (v/v) enfriada previamente en hielo, comenzando con un lavado en 20 ml, posteriormente 10 ml y finalizando con 5 ml. Finalmente, las células son resuspendidas en 1 ml de glicerol 10% (v/v) y alicuotadas para su uso posterior. Estas células, ya electrocompetentes, son electroporadas en una cubeta fría de 2 mm de grosor en las condiciones anteriores indicadas con los productos de PCR dializados. Tras una recuperación de tres horas en medio LB líquido, son plaqueadas en medio 7H10 con kanamicina 20 µg/ml. Las células que crezcan previsiblemente habrán incorporado a su genoma el cassette de kanamicina. La eliminación del gen diana se comprueba por PCR, empleando dos primers *upstream* y *downstream* del gen sustituido para observar un cambio en el amplicón generado de entre 4 y 4,5 kb a 1,5 kb (tamaño del cassette de resistencia a kanamicina).

5. Resultados

5.1. Caracterización de la actividad antimicrobiana de selamectina y etambutol

5.1.1. Interacción entre selamectina, etambutol y PBTZ-169

La existencia de sinergia entre dos compuestos puede ser resultado de un mecanismo de acción relacionado al afectar a la misma ruta metabólica. El PBTZ-169 actúa inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana al inhibir a la proteína DprE1 (41), mientras que el etambutol actúa sobre las proteínas EmbA, EmbB y EmbC (28,30). En el ensayo de *checkerboard* (Tabla 4), se pudo confirmar la sinergia entre selamectina y etambutol en una de las dos placas reveladas a 24 horas y en las dos placas reveladas a 72 horas. La interacción sinérgica de estos compuestos es conocida (27), por lo que repitiendo el experimento se podría observar con mayor seguridad esta interacción. Además, se vio que no existe interacción entre selamectina y PBTZ-169 o etambutol y PBTZ-169 a 24 y 48 horas, lo que podría indicar que la selamectina ejerce su acción sobre las enzimas EmbA, EmbB o EmbC pero no de DprE1 como ocurre en el caso del etambutol.

Tabla 4. Resultados del experimento de sinergia por Checkerboard a 24 horas y 48 horas de crecimiento

Compuesto		24 horas de incubación				72 horas de incubación			
A	B	FIC A	FIC B	FICI	Interacción	FIC A	FIC B	FICI	Interacción
SEL	EMB	0,5	0,5	1	NO	0,031	0,5	0,531	Sinergia
		0,125	0,25	0,375	Sinergia	0,062	0,25	0,312	Sinergia
EMB	PBTZ-169	0,5	1	1,5	NO	1	1	2	NO
		1	0,5	1,5	NO	0,5	0,25	0,75	NO
SEL	PBTZ-169	1	1	2	NO	1	1	2	NO
		0,25	0,5	0,75	NO	1	1	2	NO

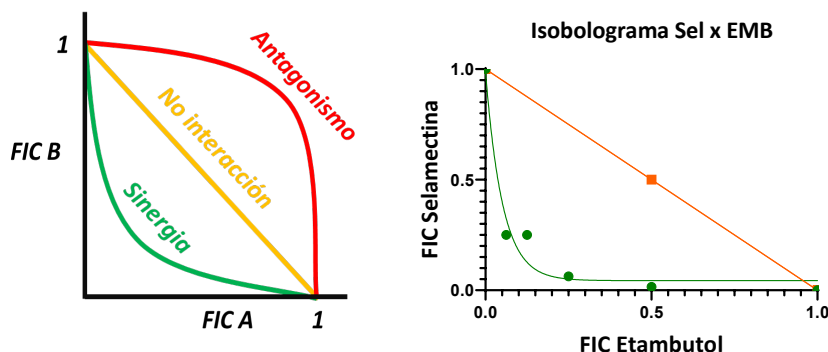


Figura 9.

Izquierda. Interpretación de sinergias en isoblograma.

Derecha. Perfil de interacción entre selamectina y etambutol a 72 horas (Verde) respecto a un perfil de no interacción (Naranja).

Como validación secundaria de la acción sinérgica entre los compuestos, es necesario realizar un experimento de cinética de muerte comparando su acción por separado y en combinación. Además, esto permitirá determinar si haber encontrado una placa con ausencia de interacción y otra con interacción sinérgica clara con 24 horas de crecimiento se debe a una verdadera acción sinérgica a ese tiempo de crecimiento o por el contrario se trata de una anomalía experimental.

5.1.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de selamectina y etambutol

Una posibilidad para analizar la relevancia de los genes de síntesis de la pared celular en el mecanismo de acción de la selamectina es analizar la respuesta transcripcional a selamectina y etambutol. Para ello, se debe realizar una extracción de RNA, que necesita un alto número de bacterias tratadas con el fármaco para ser eficiente.

Esto requiere comenzar el cultivo con un inóculo de 10^7 ufc/ml, cuya respuesta al antibiótico debe ser caracterizada y comparada respecto al inóculo estandarizado de 10^5 ufc/ml, puesto que puede haber variaciones en el perfil de muerte.

Tabla 5. Resultados de tres experimentos de concentración mínima inhibitoria con un inóculo inicial de 10^5 ufc/ml y 10^7 ufc/ml. Se asume que variaciones de una dilución en el caso de Selamectina y etambutol son debidos al error experimental. (*) Para el inóculo de 10^7 ufc/ml únicamente se realizaron 2 experimentos. (#) La variación en el valor de CIM de PBTZ-169 en el experimento 3 respecto a los experimentos 1 y 2 puede deberse a un cambio en el stock de antibiótico empleado.

Inóculo	Antibiótico	CIM experimento 1	CIM experimento 2	CIM experimento 3
10^5 ufc/ml	Selamectina	2 μ g/ml	2 μ g/ml	4 μ g/ml
	Etambutol	2 μ g/ml	4 μ g/ml	4 μ g/ml
	PBTZ-169	>20 ng/ml	25 ng/ml	0,976 ng/ml (#)
10^7 ufc/ml	Selamectina	32 μ g/ml	32 μ g/ml	(*)
	Etambutol	64 μ g/ml	>64 μ g/ml	(*)
	PBTZ-169	>20 ng/ml	500 ng/ml	(*)

A partir de los resultados de la **Tabla 5** se observa una aparente dependencia de inóculo en la CIM para los tres compuestos. Se planteó la posibilidad de que un inóculo elevado tuviera capacidad para proporcionar señal positiva en revelado con MTT, aunque el compuesto inhibiera el crecimiento bacteriano. Para comprobarlo, se realizaron diluciones seriadas de inóculo bacteriano observando que, efectivamente, un inóculo inicial de 10^7 ufc/ml era suficiente para proporcionar una señal positiva de crecimiento (**Ver Material Suplementario S2**).

Por ello, durante el segundo experimento de CIM para el inóculo de 10^7 ufc/ml se realizó de forma paralela un experimento de CMB. Se vio que el MTT es demasiado sensible para el inóculo de 10^7 ufc/ml puesto que este es capaz de proporcionar señal alta aunque el cultivo se encuentre en condiciones bacteriostáticas.

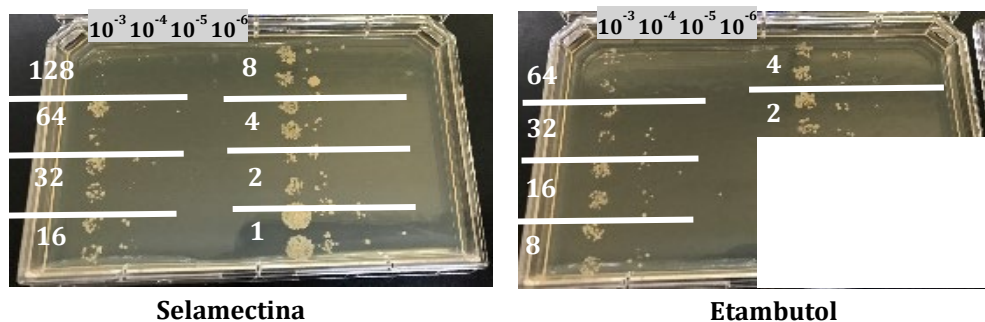


Figura 10. Experimento de concentración mínima bactericida. Se plaquearon por duplicado diluciones seriadas (entre 10^{-3} y 10^{-6}) de cada pocillo del experimento de CIM con microorganismo y antibiótico (concentraciones expresadas en μ g/ml). Las imágenes tomadas tras 3 días de incubación a 37 °C.

Para el caso de selamectina, hay crecimiento bacteriano hasta en la dilución 10^{-6} con 1 μ g/ml de compuesto, que decrece en una dilución al aumentar la concentración a 2 μ g/ml. Mediante el conteo de colonias en la placa se determinó una concentración de $3,8 \times 10^6$ ufc/ml a 2 μ g/ml, indicando que el compuesto posee acción bacteriostática a esa dosis. La verdadera acción bactericida se puede observar a concentraciones superiores a 32 μ g/ml, donde disminuye notablemente el número de colonias crecidas aunque se observan anomalías entre diluciones. Para el caso del etambutol se pudo observar el mismo efecto, alcanzándose la concentración bacteriostática a 2 μ g/ml y acción bactericida en concentraciones superiores a 32 μ g/ml

Este experimento, aunque solo se realizó una vez, confirmó que la señal de inhibición observada por MTT con un inóculo de 10^7 ufc/ml correspondía a acción bactericida, mientras que la acción bacteriostática se encontraba a menores concentraciones, cercanas a las obtenidas para la CIM del inóculo de 10^5 ufc/ml. Sin embargo, para validar estos resultados de CIM y CMB, el experimento debería ser repetido con réplicas.

Tabla 6. Resultados del experimento de concentración mínima inhibitoria con un inóculo inicial de 10^7 ufc/ml con CIM y CMB corregidas al inocular en agar LB.

Antibiótico	CIM	CMB
Selamectina	4 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$
Etambutol	2 $\mu\text{g/ml}$	64 $\mu\text{g/ml}$

Para caracterizar esta dependencia de inóculo en el perfil de actuación de los compuestos, se realizó un experimento de cinética de muerte. Con el fin de facilitar el procedimiento experimental, este se realizó con inóculos de 10^5 ufc/ml y 10^7 ufc/ml frente a las mismas concentraciones de antibiótico (1x, 2x, 4x y 10x CIM para 10^5 ufc/ml) obteniéndose como resultado la **Figura 11**, siendo 4 $\mu\text{g/ml}$ la CIM para selamectina y 2 $\mu\text{g/ml}$ la CIM para etambutol.

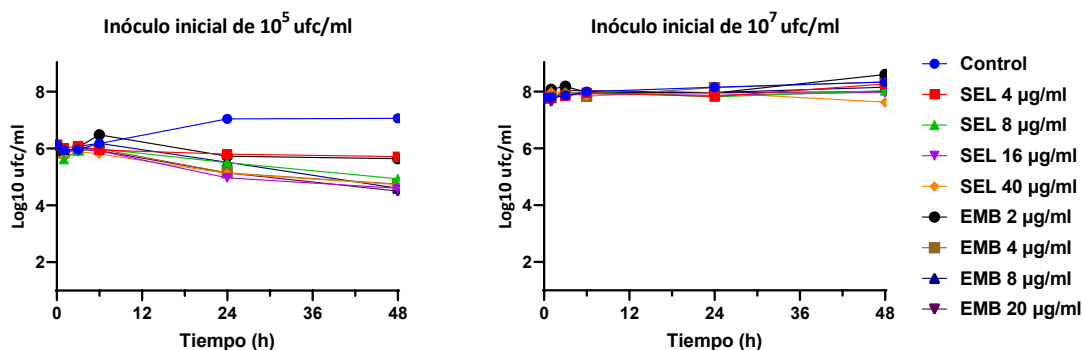


Figura 11. Resultados del experimento de cinética de muerte para inóculos de 10^5 ufc/ml y 10^7 ufc/ml. El límite de detección se encuentra en 10^2 ufc/ml.

Se pudo observar que, en los primeros tiempos (entre 0 y 6 horas), existe una gran fluctuación de hasta media unidad de logaritmo en la concentración de los cultivos, momentos donde no se aprecia una fuerte actividad bactericida y por lo tanto las concentraciones deberían permanecer estables. Esto se debe a un error experimental del propio procedimiento puesto que únicamente se cuentan colonias en 100 μl de cultivo diluido (una muestra poco representativa del mismo); y a la ausencia de detergente en el medio de cultivo, lo que dificulta la homogenización de los cultivos antes del sembrado. La decisión de no añadir detergente se debe a que éste inhibe el comportamiento antimicrobiano de la selamectina (27).

Además, se confirmó la dependencia de inóculo para la actividad de selamectina y etambutol, que poseen similitud en su modo de acción a tiempos de 24 y 48 horas. Para un inóculo de 10^5 ufc/ml, concentraciones respectivas de 2 $\mu\text{g/ml}$ de etambutol y 4 $\mu\text{g/ml}$ de selamectina (1x CIM) tienen capacidad bacteriostática a 24 y 48 horas, pero al incrementar la concentración a 2x CIM se observa acción bactericida, que produce una reducción de la concentración bacteriana de dos unidades de logaritmo. Sin embargo, para un inóculo de 10^7 ufc/ml no se llegó a ver esta acción bactericida a las concentraciones y tiempos ensayados, con la excepción de un ligero descenso de concentración en el cultivo de selamectina 40 $\mu\text{g/ml}$.

5.2. Condiciones óptimas para la extracción de RNA

El ensayo de cinética de muerte permite determinar las condiciones óptimas de extracción de RNA para analizar la respuesta transcripcional de los genes involucrados en la síntesis de la pared celular en respuesta al tratamiento farmacológico. El análisis de la expresión de estos genes en condiciones basales y frente a condiciones inhibitorias de selamectina y etambutol, permite observar diferencias y similitudes en el patrón de expresión génica que contribuye a determinar el mecanismo de acción de la selamectina. Además, este análisis ante un tratamiento combinado con selamectina y etambutol puede permitir comprender como funciona la sinergia.

Tabla 7. Selección de genes para el estudio de la expresión génica ante un tratamiento con selamectina y etambutol.

Gen	Función
Operón <i>embCAB</i>	Codifica para tres arabinosil transferasas sobre galactano y lipomanano que son inhibidas por etambutol, uno de los principales fármacos en el tratamiento de tuberculosis (29,30).
<i>embr</i>	Codifica para un factor de transcripción que produce la sobreexpresión de los genes del operón <i>embCAB</i> (42).
<i>MSMEG_6382</i> (Ortólogo de <i>dprE1</i>)	Codifica para una epimerasa que transforma decaprenil-fosforibosa en decaprenilfosforilarabinosa, sustrato de las enzimas codificadas por el operón <i>embCAB</i> (28).
Operón <i>iniBAC</i>	Codifica genes inducidos en situaciones de daño sobre la pared celular. Su sobreexpresión aumenta en presencia de fármacos que dañan la pared celular (43).
<i>mysA</i> y <i>rrsA</i>	Genes <i>housekeeping</i> para el experimento de RT-qPCR que codifican para la subunidad sigma A de la RNA polimerasa y para el 16S rRNA respectivamente.

En las condiciones idóneas de extracción, se mantiene una alta concentración bacteriana que expresa mecanismos de adaptación al estrés generado por los antimicrobianos antes del descenso de la viabilidad del cultivo a causa de la acción del fármaco. Como estas condiciones óptimas no se pudieron determinar en el primer experimento de cinética de muerte, se decidió repetir el ensayo elevando la concentración de antibiótico a valores de 20x y 50x CIM manteniendo el valor de 4x CIM para poder comparar los resultados con el primer experimento, obteniéndose como resultado la **Figuras 12, S4.1 y S4.2 (Material Suplementario)**.

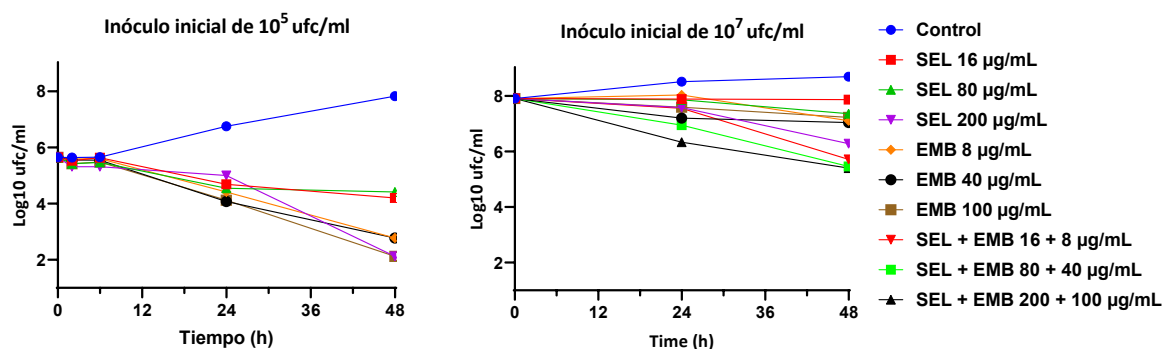


Figura 12. Resultados del experimento de cinética de muerte. **Izquierda** experimento con antibióticos por separado realizado antes del confinamiento con inóculo de 10⁵ ufc/ml y límite de detección en 10² ufc/ml. Como estos antibióticos ejercen su acción a tiempos largos, se sustituyeron las mediciones a 1 y 3 horas por una a 2 horas, donde no es esperable que se produzca gran variación en la concentración del cultivo.

Derecha experimento con antibióticos por separado y combinados realizado por un miembro del laboratorio tras el confinamiento por la COVID-19 con inóculo de 10⁷ ufc/ml y límite de detección en 10⁴ ufc/ml realizando la medición a 24 y 48 horas.

Nota COVID-19: A causa del cierre del laboratorio por la pandemia, no se pudo realizar el experimento de cinética de muerte combinando selamectina y etambutol para determinar las condiciones óptimas de extracción. Sin embargo, tras el confinamiento, el investigador predoctoral José Manuel Ezquerra Aznárez realizó el experimento (**Figura 12 derecha**), permitiendo establecer las condiciones óptimas para la extracción al obtenerse un perfil de acción idéntico al representado en la **Figura S4.1** en las 48 horas iniciales. En este experimento se realizó una extensión de las mediciones hasta 96 horas (**Figura S4.2**).

Al repetir el experimento queda de manifiesto, de nuevo, la dependencia del inóculo con la acción de ambos antimicrobianos. En los cultivos inoculados con 10^5 ufc/ml se observa acción bactericida para todas las concentraciones ensayadas a tiempos de 48 horas, con mayor actividad de la selamectina que, a concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$, logra un descenso de la concentración hasta 10^2 ufc/ml. Sin embargo, para el inóculo de 10^7 ufc/ml, los dos antimicrobianos tienen efecto bacteriostático a los tiempos ensayados, salvo selamectina 200 $\mu\text{g/ml}$ que produce un descenso en caso dos unidades de logaritmo a 48 horas.

En este segundo ensayo si se pudieron determinar las condiciones óptimas para la extracción. Para el tratamiento con **selamectina**, esto ocurre a **24 horas con 200 $\mu\text{g/ml}$** , donde el antimicrobiano ejerce todavía acción bacteriostática y la concentración celular del cultivo se mantiene elevada, pero se espera una expresión génica diferencial en respuesta al antibiótico antes de que comience la muerte celular. Para el etambutol la muerte se produce a tiempos más elevados porque a tiempos cortos posee acción bacteriostática (25,44), por lo que se mediría la respuesta a **24 horas** en el cultivo de **100 $\mu\text{g/ml}$ de etambutol**. Además, en estas condiciones, la combinación de antibióticos a 24h potencia notablemente la actividad bactericida, por lo que la expresión génica del tratamiento combinado puede ser diferente a la de los compuestos por separado y su estudio puede ayudar a identificar el mecanismo de acción de la combinación sinérgica. Sin embargo, para observarla, es preferible usar combinaciones que por separado no poseen acción bactericida pero en conjunto incrementen en gran medida este efecto como en el caso de **selamectina 16 $\mu\text{g/ml}$ con etambutol 8 $\mu\text{g/ml}$ a 24 horas**.

Nota COVID-19: El experimento de determinación de la expresión por RT-qPCR no fue realizado debido a la clausura temporal del laboratorio por el SARS-Cov2, aunque los oligonucleótidos fueron diseñados y se comprobó su especificidad (**Ver material suplementario S3**). El resultado esperado del experimento de RT-qPCR es una expresión génica diferencial durante el tratamiento con selamectina o etambutol respecto al control no tratado. Además, si el mecanismo de acción de la selamectina está relacionado con el mecanismo de acción del etambutol a nivel de inhibición de la síntesis de la pared celular, se espera la **inducción del operón iniBAC** (43). Aunque se desconoce el efecto sobre la expresión de los genes del operón *embCAB* durante el tratamiento con etambutol, podría ocurrir una respuesta transcripcional similar entre selamectina y etambutol si ambos poseen un mecanismo de acción relacionado.

5.3. Rol de los genes del operón *embCAB* en la resistencia a selamectina

La existencia de interacción sinérgica entre etambutol y selamectina podría deberse a un mecanismo de acción relacionado que se ha tratado de comprobar mediante la manipulación de la expresión de los genes del operón *embCAB* y *embR*.

5.3.1. Mutantes de sobreexpresión de *embR*

Aumentar la expresión de la diana del fármaco es uno de los mecanismos evolutivos de los microorganismos para aumentar su resistencia a antibióticos, haciendo que este deba encontrarse a una mayor concentración para realizar la misma inhibición (45).

Las proteínas EmbA, EmbB y EmbC, principales dianas del etambutol, se sobreexpresan por acción del factor de transcripción EmbR. (42). Para estudiar la posible relación de estos genes con el mecanismo de acción de la selamectina, se realizaron mutantes de sobreexpresión del regulador EmbR que consecuentemente poseerán mayor concentración de estas dianas.

Se comprobó la correcta amplificación del gen *MSMEG_1963* sobre el genoma de *M. smegmatis* al correr el resultado de la PCR en un gel de agarosa al 1% junto al Marker 100bp plus (Generuler) (**Figura 13**). Se pueden observar los amplicones mayores de 3kb para la amplificación del CDS (3,4 kb) y para CDS y secuencias reguladoras (REG) (4,4kb) con el promotor y terminador propios del gen.

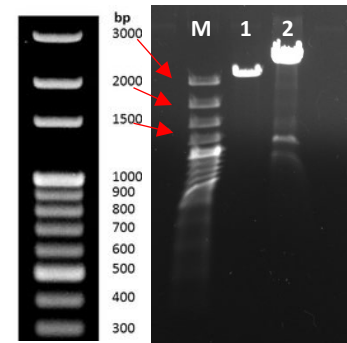


Figura 13. Resultado de PCR de amplificación sobre *EmbR*. **M** Marcador de peso molecular 100bp plus, **1** *embR* CDS, **2** *embR* CDS + REG.

Para la amplificación de *embR* CDS+REG se observó la presencia de bandas inespecíficas a tamaños inferiores al producto de amplificación por lo que se repitió la PCR por triplicado. Cuando se cargaron los nuevos productos de amplificación en el gel se seleccionaron como sustrato para pasos posteriores aquellos en los que únicamente se observara la banda correspondiente al gen amplificado que fueron purificados.

Tras realizar la ligación y transformación bacteriana en *E. coli*, se analizaron por PCR doce colonias positivas de cada cultivo para comprobar si la resistencia a kanamicina se debía a la presencia del vector e inserto deseado o por una mutación espontánea que les confería resistencia. También se comprobó la direccionalidad en el clonaje de *embR* CDS pMV261. El resultado de la PCR fue positivo para cinco colonias transformadas con el plásmido pSUM36+*embR* CDS+REG (1,2 kb) y nueve para el caso de pMV261+*embR* CDS (1,3kb).

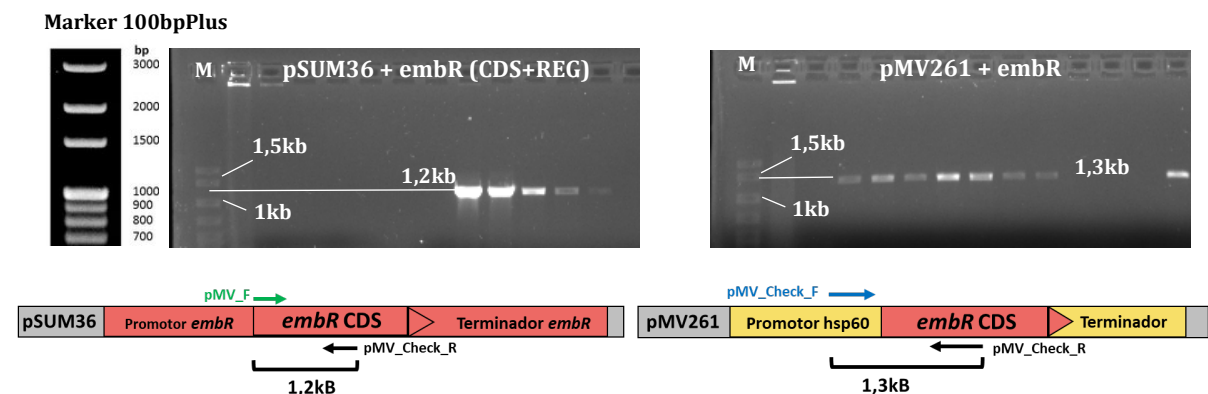


Figura 14. Arriba. Resultado de PCR on colony. **Izquierda.** resultado para pSUM36 + Inserto. **Derecha.** resultado para pMV261 + Inserto. El primer pocillo de cada fila corresponde al Marker 100bp plus (Izquierda).
Abajo. Esquema de PCR de comprobación de la presencia del inserto en pSUM36 y pMV261.

Tras la transformación bacteriana en *M. smegmatis*, únicamente se observó crecimiento de colonias en la transformación con pSUM36+*embR* CDS+REG y, aunque fueron repetidas 3 veces, no se llegó a observar crecimiento para el plásmido pMV261 que contenía EmbR bajo el control del promotor Hsp60. Cinco de estas colonias fueron aisladas y crecidas medio líquido 7H9 con kanamicina 20 µg/ml para su congelación en glicerol de modo que pudieran ser usadas en el laboratorio para experimentos posteriores.

Nota COVID-19: Aunque el paso posterior a la construcción de los mutantes era caracterizar su susceptibilidad a selamectina, etambutol y PBTZ-169; estos experimentos no pudieron llevarse a cabo debido al cierre del laboratorio por la COVID-19.

La caracterización de estos mutantes se haría empleando los mismos ensayos realizados con la cepa wild-type para observar un posible cambio en la actividad antimicrobiana. Se conoce que como consecuencia de la sobreexpresión de *EmbR* se produce una reducción de la susceptibilidad a etambutol al aumentar la expresión de *EmbA*, *EmbB* y *EmbC* (42). Un fenómeno parecido al exponer la bacteria a selamectina indicaría un mecanismo de acción similar o la existencia de dianas potenciales en el operón *embCAB*. Así mismo, se espera que la concentración mínima inhibitoria del PBTZ-169 no sufra cambios, puesto que posee una diana diferente (*DprE1*).

5.3.2. Mutantes *knock-out* del operón *embCAB* y *embR*

Para este estudio, se planteó la realización de diversos mutantes *knock-out* del operón *embCAB* mediante el uso de la técnica de *recombineering* (**Ver material suplementario S5**). Estos mutantes presumiblemente poseerían mayor sensibilidad a selamectina, puesto que la ausencia de estos genes produciría un perfil similar a la inhibición en un tratamiento con etambutol.

Tras la electroporación por duplicado de la cepa de *M. smegmatis* pJV53 no se observó crecimiento en ningún caso. Este hecho se esperaba para el caso de mutantes doble y triple ($\Delta embAB$ y $\Delta embCAB$), donde la ausencia completa de estos genes debería imposibilitar la viabilidad del microorganismo dado que se produciría la pérdida de una ruta esencial (46). Sin embargo, se conoce que los genes individualmente no son esenciales para el crecimiento del microorganismo (47). Una posible explicación para los resultados observados es que, durante la recombinación, se produjera un fallo y no se realizara la sustitución del gen por el cassette de kanamicina. Esto imposibilitaría el crecimiento de las bacterias en medio que contenía el antibiótico.

El experimento se realizó colocando colas de identidad de únicamente 50 nucleótidos durante el diseño de los primers, para permitir en un único paso de PCR amplificar el cassette de kanamicina y tener el producto final de *recombineering*. Estos, podrían no ser suficientes para realizar el experimento de manera eficiente dado que, para una recombinación eficiente, es recomendable emplear sustratos con al menos 500 nucleótidos de identidad (48). Otra posible razón para el fallo del experimento, consultada con miembros del laboratorio en base a su experiencia previa en estas técnicas, es que la eficacia del stock de células electrocompetentes del laboratorio era menor de lo esperado, por lo que se debería realizar un nuevo stock para aumentar el rendimiento de la técnica.

Por ello, se plantea realizar de nuevo el experimento ampliando las colas de identidad. Esto se puede realizar, por ejemplo, mediante tres PCR diseñando *primers* con extremos solapantes en 3' y 5' para la amplificación por separado de las colas y el cassette de resistencia a kanamicina que podría ser ensamblado por *Gibson Assembly* (49) para obtener el sustrato con el que transformar (**Ver material suplementario S6**).

Nota COVID-19: Aunque se esperaba repetir este experimento generando un nuevo stock de células electrocompetentes y ampliando los nucleótidos de identidad en el sustrato de recombinación, no se pudo llevar a cabo por la clausura del laboratorio debido a la COVID-19.

6. Discusión

La resistencia a los antibióticos es un problema global que amenaza los sistemas de salud de países avanzados y en vías de desarrollo. La aparición de cepas multi resistentes incrementa los costes de los tratamientos actuales y el riesgo de que infecciones fácilmente tratables en el pasado sean letales en un futuro (50). Una de las alternativas actuales para enfrentar este problema se encuentra en el reposicionamiento farmacológico, que trata de identificar nuevas aplicaciones terapéuticas en fármacos clínicamente aprobados para otras indicaciones. Siguiendo esta estrategia, se identificó la actividad antimicrobiana de la selamectina frente a micobacterias (25). A pesar de poseer uso veterinario extendido, la selamectina no ha sido autorizada para su uso en humanos (51) y no hay ensayos clínicos iniciados (52), por lo que para su aprobación como antimicrobiano deberá superar las fases de aprobación farmacológica en humanos. Aunque esto puede suponer una dificultad para el empleo de este fármaco en terapia, el descubrimiento de su mecanismo de acción para inhibir el crecimiento de bacterias del género *Mycobacterium* puede ser un punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos, así como para comprender mejor el funcionamiento fisiológico de la bacteria y sus rutas metabólicas.

Estudios previos muestran la potencial relación entre el modo de acción de la selamectina y etambutol implicando los procesos de síntesis de la pared celular (53). Por ello, a lo largo de este TFG se han seguido dos caminos para observar la relevancia de los genes de síntesis de la pared celular en el modo de acción de la selamectina como antimicrobiano frente a *M. smegmatis* (**Figura 3**).

Se ha buscado observar la **respuesta transcripcional diferencial** de genes relacionados con la síntesis de la pared celular y con el mecanismo de acción de etambutol y PBTZ-169 ante un tratamiento con selamectina o etambutol. La ausencia de interacción entre PBTZ-169 con selamectina o etambutol y la sinergia entre selamectina y etambutol identificadas en la **Tabla 4** podrían ser indicativa de que selamectina ejerce su acción interfiriendo con la función de EmbA EmbB o EmbC pero no de DprE1, principal diana del PBTZ-169. Para estudiar la respuesta, se debe obtener suficiente material genético de partida por lo que fue necesario caracterizar la acción de los antimicrobianos ante un inóculo de 10^7 ufc/ml. Se observó que existía una dependencia del inóculo con el modo de actuación de estos compuestos, resultando en un incremento en la CIM para 10^7 ufc/ml respecto al inóculo de 10^5 ufc/ml (**Tabla 5**) y cambio en el perfil de muerte (**Figuras 11 y 12**). Estos ensayos permitieron determinar las condiciones óptimas para la extracción de RNA sobre la cual analizar la expresión génica diferencia que tienen lugar a las 24 horas de tratar con selamectina (con 200 $\mu\text{g/ml}$), etambutol (con 100 $\mu\text{g/ml}$) o combinando ambos fármacos (con 16 $\mu\text{g/ml}$ de selamectina y 8 $\mu\text{g/ml}$ de etambutol).

Paralelamente, se ha tratado de determinar el **rol que toman las proteínas codificadas por el operón *embCAB* en el mecanismo de acción de la selamectina**. Se espera que el cambio de expresión en las dianas del etambutol produzca un cambio en la susceptibilidad a selamectina si este fármaco tiene como diana alguna de estas proteínas. Para ello, se construyeron mutantes de *M. smegmatis* con sobreexpresión del regulador *embR* y se realizaron todos los pasos para la construcción de mutantes *knock-out* aunque estos últimos no se llegaron a aislar. En futuros estudios se debe determinar la concentración mínima inhibitoria y los perfiles de muerte de estos mutantes ante selamectina y etambutol que confirmarían la posible relación entre el modo de acción de la selamectina y las proteínas codificadas por *embCAB*.

7. Conclusiones

1. La selamectina posee interacción sinérgica con etambutol pero no existe interacción entre selamectina y PBTZ-169 o etambutol y PBTZ-169, lo que podría estar relacionado con una relación en el mecanismo de actuación de selamectina y etambutol.
2. La determinación de la concentración mínima inhibitoria de un inóculo de 10^7 ufc/ml por MTT puede proporcionar falsos positivos si el compuesto probado tiene acción bacteriostática por lo que se debe comprobar mediante la siembra en agar.
3. La concentración mínima inhibitoria y el efecto bactericida o bacteriostático de selamectina y etambutol en un cultivo de *M. smegmatis* son dependientes del inóculo inicial.
4. Las condiciones óptimas para la extracción de RNA que permiten analizar la respuesta transcripcional diferencial ante un tratamiento con selamectina ocurren a 24 horas con un cultivo inoculado con 10^7 ufc/ml de *M. smegmatis* y 200 $\mu\text{g/ml}$ de selamectina, mientras que para el tratamiento con etambutol ocurren a 24 horas con 100 $\mu\text{g/ml}$.
5. Las condiciones óptimas para la extracción de RNA que permiten analizar la respuesta transcripcional diferencial ante un tratamiento combinado con selamectina y etambutol ocurren a 24 horas en un cultivo inoculado con 10^7 ufc/ml de *M. smegmatis* con 16 $\mu\text{g/ml}$ de selamectina y 8 $\mu\text{g/ml}$ de etambutol.

7. Conclusions

1. Selamectin has a synergic interaction with ethambutol but there is no interaction between selamectin and PBTZ-169 or ethambutol and PBTZ-169. This could indicate a relationship in the mechanism of action of selamectin and ethambutol.
2. Determination of minimum inhibitory concentration using MTT with an inoculum of 10^7 colony former units per millilitre (cfu/ml) can provide false positive results if the compound tested has bacteriostatic effect. For this reason, it must be checked in agar.
3. The minimum inhibitory concentration and the bacteriostatic or bactericide effect of selamectin and ethambutol against *M. smegmatis* depend of initial inoculum.
4. The optimal conditions for RNA extraction that allow the analysis of the transcriptional response of selamectin occur at 24 hours with a 10^7 cfu/ml inoculum of *M. smegmatis* and 200 $\mu\text{g/ml}$ of selamectin while for ethambutol occurs with 100 $\mu\text{g/ml}$ of ethambutol.
5. The optimal conditions for RNA extraction to analyse the transcriptional response after a combined treatment with selamectin and ethambutol occur at 24 hours in a culture inoculated with 10^7 cfu/ml of *M. smegmatis* and 16 $\mu\text{g/ml}$ of selamectina and 8 $\mu\text{g/ml}$ of ethambutol.

8. Bibliografía

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019 [Internet]. Geneva PP - Geneva: World Health Organization;
2. Stop TB Partnership. THE POTENTIAL IMPACT OF THE COVID-19 RESPONSE ON TUBERCULOSIS IN HIGH-BURDEN COUNTRIES : A MODELLING ANALYSIS. 2019;1-7.
3. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 2006;100(11):1862-70.
4. Bryder L. The Medical Research Council and treatments for tuberculosis before streptomycin. *J R Soc Med.* 2014;107(10):409-15.
5. Murray JF, Schraufnagel DE, Hopewell PC. Treatment of tuberculosis: A historical perspective. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(12):1749-59.
6. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):354-73.
7. World Health Organization. WHO | Drug-resistant TB: XDR-TB FAQ. WHO. 2018;
8. Nahid P, Mase SR, Migliori GB, Sotgiu G, Bothamley GH, Brozek JL, et al. Treatment of drug-resistant tuberculosis an official ATS/CDC/ERS/IDSA clinical practice guideline. Vol. 200, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2019. 93-142 p.
9. Cohn DL, Bustreo F, Raviglione MC. Drug-Resistant Tuberculosis: Review of the Worldwide Situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. *Clin Infect Dis.* 1997;24(Supplement_1):S121-30.
10. Falzon D, Gandhi N, Migliori GB, Sotgiu G, Cox HS, Holtz TH, et al. Resistance to fluoroquinolones and second-line injectable drugs: impact on multidrug-resistant TB outcomes. *Eur Respir J.* 2012/10/25. 2013 Jul;42(1):156-68.
11. Conradie F, Diacon AH, Ngubane N, Howell P, Everitt D, Crook AM, et al. Treatment of highly drug-resistant pulmonary tuberculosis. *N Engl J Med.* 2020 Mar 5;382(10):893-902.
12. Walsh CT, Wencewicz TA. Prospects for new antibiotics: A molecule-centered perspective. *J Antibiot (Tokyo).* 2014;67(1):7-22.
13. DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ.* 2016;47:20-33.
14. Matthews H, Hanison J, Nirmalan N. "Omics"-informed drug and biomarker discovery: Opportunities, challenges and future perspectives. *Proteomes.* 2016;4(3):1-12.
15. Farha MA, Brown ED. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nat Microbiol.* 2019;4(4):565-77.
16. Miller TW, Chalet L, Cole DJ, Cole LJ, Flor JE, Goegelman RT, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Isolation and chromatographic properties. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;15(3):368-71.
17. Omura S, Crump A. Ivermectin: Panacea for resource-poor communities? *Trends Parasitol.* 2014;30(9):445-55.
18. Campbell WC. History of Avermectin and Ivermectin, with Notes on the History of Other Macrocyclic Lactone Antiparasitic Agents [Internet]. Vol. 13, *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2012. p. 853-65.
19. Laing R, Gillan V, Devaney E. Ivermectin - Old Drug, New Tricks? *Trends Parasitol.* 2017;33(6):463-72.
20. Portillo V, Jagannathan S, Wolstenholme AJ. Distribution of glutamate-gated chloride channel subunits in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *J Comp Neurol.* 2003 Jul 21;462(2):213-22.

21. Erkens T, Daminet S, Rogiers C, Gommeren K, Lampo E, Vander Donckt D, et al. Presence of the ABCB1 (MDR1) deletion mutation causing ivermectin hypersensitivity in certain dog breeds in Belgium. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr.* 2009;78(4):256–60.
22. Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J.* 2012 May 1;443(3):851–6.
23. Sharmeen S, Skrtic M, Sukhai MA, Hurren R, Gronda M, Wang X, et al. The antiparasitic agent ivermectin induces chloride-dependent membrane hyperpolarization and cell death in leukemia cells. *Blood.* 2010 Nov 4;116(18):3593–603.
24. Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res.* 2020 Apr 3;178:104787.
25. Lim LE, Vilchèze C, Ng C, William R, Jr J, Ramón-garcía S, et al. Anthelmintic Avermectins Kill Mycobacterium tuberculosis, Including. 2013;
26. Scherr N, Pluschke G, Thompson CJ, Ramón-garcía S. Selamectin Is the Avermectin with the Best Potential for Buruli Ulcer Treatment. 2015;1–10.
27. Ezquerra M, Ramon S. Estudios iniciales de la caracterización del modo de acción molecular de las avermectinas como agentes anti-tuberculosos. 2018;
28. Abrahams KA, Besra GS. Mycobacterial cell wall biosynthesis : a multifaceted antibiotic target. 2019;(2018):116–33.
29. Takayama K, Kilburn JO. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in Mycobacterium smegmatis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(9):1493–9.
30. Goude R, Amin AG, Chatterjee D, Parish T. The Arabinosyltransferase EmbC Is Inhibited by Ethambutol in Mycobacterium tuberculosis; *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Oct 1;53(10):4138 LP – 4146.
31. Kolly GS, Boldrin F, Sala C, Dhar N, Hartkoorn RC, Ventura M, et al. Assessing the essentiality of the decaprenyl-phospho- D -arabinofuranose pathway in Mycobacterium tuberculosis using conditional mutants. 2014;92(March):194–211.
32. Foo CSY, Lechartier B, Kolly GS, Boy-Röttger S, Neres J, Rybniker J, et al. Characterization of DprE1-mediated benzothiazinone resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(11):6451–9.
33. Chernov VM, Chernova OA, Mouzykantov AA, Lopukhov LL, Aminov RI. Omics of antimicrobials and antimicrobial resistance. *Expert Opin Drug Discov.* 2019;14(5):455–68.
34. van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in Mycobacterium tuberculosis. *Nat Methods.* 2007;4(2):147–52.
35. Aínsa JA, Martín C, Cabeza M, De La Cruz F, Mendiola M V. Construction of a family of Mycobacterium/Escherichia coli shuttle vectors derived from pAL5000 and pACYC184: Their use for cloning an antibiotic-resistance gene from Mycobacterium fortuitum. *Gene.* 1996;176(1–2):23–6.
36. Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature.* 1991;351(6326):456–60.
37. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Jul 1;52(1):1.
38. Cloud-Based Informatics Platform for Life Sciences R&D | Benchling [Internet]. [cited 2020 Apr 18]. <https://www.benchling.com/>
39. Mycobrowser [Internet]. [cited 2020 Apr 28]. https://mycobrowser.epfl.ch/genes/MS_MEG_1963
40. Neb. Cleavage Close to the End of DNA Fragments (oligonucleotides) [Internet]. [cited 2020 Apr 28]. https://www.neb.com/~media/nebus/files/chart_image/cleavage_olignucleotides_old.pdf

41. Evans JC, Mizrahi V. ScienceDirect Priming the tuberculosis drug pipeline : new antimycobacterial targets and agents. *Curr Opin Microbiol.* 2018;45:39–46.
42. Alcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(10):2270–3.
43. Alland D, Steyn AJ, Weisbrod T, Aldrich K, Jacobs WR. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis iniBAC promoter, a promoter that responds to cell wall biosynthesis inhibition. *J Bacteriol.* 2000;182(7):1802–11.
44. de Steenwinkel JEM, de Knecht GJ, ten Kate MT, van Belkum A, Verbrugh HA, Kremer K, et al. Time–kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of Mycobacterium tuberculosis. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Oct 14;65(12):2582–9.
45. Munita JM, Arias CA, Unit AR, Santiago A De. HHS Public Access Mechanisms of Antibiotic Resistance. *HHS Public Access.* 2016;4(2):1–37.
46. Shi L, Zhou R, Liu Z, Lowary TL, Seeberger PH, Stocker BL, et al. Transfer of the first arabinofuranose residue to galactan is essential for Mycobacterium smegmatis viability. *J Bacteriol.* 2008;190(15):5248–55.
47. Escuyer VE, Lety MA, Torrelles JB, Khoo KH, Tang JB, Rithner CD, et al. The Role of the embA and embB Gene Products in the Biosynthesis of the Terminal Hexaarabinofuranosyl Motif of Mycobacterium smegmatis Arabinogalactan. *J Biol Chem.* 2001;276(52):48854–62.
48. van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. Recombineering mycobacteria and their phages. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Nov;6(11):851–7.
49. Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods.* 2009;6(5):343–5.
50. O'Neil J. Review on Antibiotic resistance. *Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations.* Heal Wealth Nations. 2014;(December):1–16.
51. Selamectin | C43H63NO11 - PubChem [Internet]. [cited 2020 Apr 14]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9578507#section=Drug-and-Medication-Information>
52. Search of: selamectin - List Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2020 Apr 14].
53. Ezquerra M, Ramon S, Lucía A. Mode of action elucidation studies of new antimicrobial compounds. 2019;