

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
RECIENTO UNIVERSITARIO “RUBÉN DARÍO”
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
QUÍMICA-FARMACÉUTICA.**



**TÍTULO: ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL GENOMA DEL
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. UNAN-MANAGUA 2008-2009.**

Autoras:

Bra. Samantha Alexandra Miranda Calero.

Bra. Elia María Cerda Cruz.

Tutor:

Msc. Luís Iván Marín Arguello.

Asesora Metodológica:

Msc. María Natalia Gutiérrez.

Managua, Diciembre del 2010.

DEDICATORIA

A mi madre, la mujer más completa que conozco; mi modelo de superación, ética, bondad, sabiduría y determinación, y sobre todo, el motor de mi vida.

A mis abuelos, los pilares fundamentales en mi formación y crecimiento personal, que son fuentes de apoyo y motivación en todo momento.

A mi esposo, por su inmensa solidaridad, optimismo y estímulo para emprender y culminar esta etapa de mi vida, y sin cuyo apoyo esto no sería posible.

Samantha A. Miranda Calero.

DEDICATORIA

A mis padres, ejemplo de lucha y perseverancia, los seres que más amo y a los cuales les estaré eternamente agradecida por la entrega de su vida y dedicación.

Elia María Cerda Cruz.

AGRADECIMIENTO

Al profesor Iván Marín Arguello, nuestro tutor, por su orientación a lo largo de la realización de esta monografía.

De manera especial a la Licenciada Elvis Jiménez, Máster Rosa González Tapia y a los profesores de Departamento de Química y Farmacia de la UNAN-Managua que han contribuido a mi formación profesional, en particular a la Máster María Natalia Gutiérrez y al Licenciado Ramón Cáceres por su participación en la corrección de este documento.

Al Máster Frank Medrano Mayorga, por su continua e imparable enseñanza, tanto a nivel profesional como personal, por ser una fuente de aliento, motivación y apoyo durante toda esta etapa, así como también por su sincera amistad.

De igual manera a las personas que laboran en el MINSA, que contribuyeron al desarrollo del presente estudio, en especial al Licenciado Albin Blanco.

A mi compañera de tesis, Elia María, por su incomparable determinación y optimismo frente a todos los obstáculos que se nos presentaron.

Así mismo, a mis amigas Brenda González, Darling Avilés y Sofía Castillo por permanecer siempre a mi lado, apoyándome y alentándome.

Samantha A. Miranda Calero.

AGRADECIMIENTO

A Dios...

Al profesor Iván Marín Arguello, tutor del trabajo monográfico, por las enseñanzas transmitidas, paciencia y colaboración durante este período.

A la Licenciada Elvis María Jiménez y a la Máster Rosa María González, por su apoyo y colaboración durante la realización del trabajo así como en la culminación del mismo.

De igual manera a los docentes de la UNAN-Managua del Departamento de Química y Farmacia, de manera especial a la Msc. María Natalia Gutiérrez, Msc. Frank Medrano y el Msc. Ramón Cáseres, por sus correcciones e indicaciones durante este trabajo, así como la enseñanza y experiencia a lo largo de la carrera.

Al personal del MINSA central, por la colaboración otorgada mediante la proporción de documentos, información e indicaciones, en especial al Licenciado Albin Blanco.

De manera especial a Samantha Miranda, mi amiga y compañera de tesis, por su comprensión, paciencia, confianza y aliento durante todos estos años de estudios, sobre todo durante este período.

A mis amigos: Sergio Flores, Segundo Medrano, Sofía Castillo y Brenda González, su presencia y apoyo incondicional no permitió que desanimara en ningún momento, su alegría fue el mayor empuje para este culmen.

Así mismo a mis familiares, por sus afectos y oraciones que han estado siempre presentes en mi vida.

Elia María Cerda Cruz.

OPINIÓN DEL TUTOR

Master

Rosa María González

Directora del Departamento de Química y Farmacia

UNAN-Managua

Estimada Msc. Rosa María González:

Tengo a bien dirigirme a usted para hacer de su fino conocimiento que la monografía titulada “Análisis bioinformático del genoma del *Mycobacterium tuberculosis*. UNAN-Managua, 2008-2009”, desarrollada por las bachilleras Samantha Alexandra Miranda Calero, carnet 04-62641-8 y Elia María Cerda Cruz, carnet 04-62629-4, para optar al título de Licenciatura en Química Farmacéutica en esta universidad, ha sido concluida y revisada conforme a los procedimientos metodológicos de investigación y lo establecido en el Reglamento del Régimen Académico Estudiantil cumpliendo satisfactoriamente con los requisitos.

Saludos cordiales,

Msc. Luis Iván Marín Arguello

Tutor

RESUMEN

La bioinformática es la aplicación de tecnología computacional a la gestión y análisis de información biológica, principalmente a nivel molecular. Esto representa un gran potencial para el conocimiento de patologías como la tuberculosis (TB) cuya patogenia es compleja y aún no está totalmente dilucidada, además se encuentra en aumento por la incidencia e incremento de múltiples factores de riesgo, su tratamiento y métodos de diagnóstico se enfrentan a inconvenientes como el desarrollo de cepas multi y extremadamente resistentes y el desarrollo de tuberculosis inespecíficas y/o cuyo agente etiológico no es el *Mycobacterium tuberculosis*.

En este estudio se realizó un análisis bioinformático de los genomas de las cinco cepas secuenciadas en su totalidad y disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI), a fin de determinar las familias de proteínas, proteínas virulentas y los procesos específicos que éstas regulan en la patogenia, obteniendo como resultado la identificación de regiones con alto potencial para el desarrollo de drogas antituberculosas como también posibles métodos de diagnóstico.

Para dicha selección se tomaron en cuenta parámetros como la especificidad de las proteínas, identidad de la secuencia entre las cepas analizadas, conocimiento de sus dominios, localización al ser expresadas y secreción, entre otros. Producto de lo anterior determinamos que la familia PE es una región ideal para el desarrollo de vacunas, las proteínas Mpt53, Cfp7, proteína de resistencia a antibióticos, y en menor grado la proteína BLAC y la proteína similar a la betalactamasa, son objetivos viables para el desarrollo de drogas antituberculosas.

Como potenciales métodos de diagnóstico se identificaron a las familias PPE y PE_PGRS, la proteína Mpt63, Esat 6, Cfp7 y Cfp2. Por otro lado se estableció que la presencia de la pirazinamidasas/nicotinamidasas pncA en los genomas, no es la única responsable de la resistencia a la pirazinamida. La cepa con mayor resistencia a antibióticos es la KZN1435 y la cepa H37Rv es la más completa en cuanto a las proteínas virulentas que codifica. Así mismo se determinó que el segmento IS6110 y las transposasas son los únicos elementos transponibles presente en todas las cepas.

TABLA DE CONTENIDO

APARTADO I: ASPECTOS GENERALES

1.1)	Introducción	1
1.2)	Objetivos	3
1.3)	Justificación	4
1.4)	Antecedentes	5

APARTADO II: MARCO TEÓRICO

2.1)	Caracterización del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
2.2)	Fisiopatología de la Tuberculosis (TB).	9
2.3)	Métodos de diagnóstico de la Tuberculosis.	12
2.4)	Epidemiología de la Tuberculosis.	12
2.5)	Agentes quimioterápicos en uso.	14
2.6)	Bioinformática.	14
2.7)	Genómica.	18
2.8)	Genómica del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
2.9)	Análisis bioinformático genómico del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
2.10)	Proteómica del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
2.11)	Organización de las proteínas dentro del genoma.	23

APARTADO III: HIPÓTESIS

3.1)	Hipótesis.	30
------	-----------------	----

APARTADO IV: DISEÑO METODOLÓGICO

4.1)	Descripción de las etapas del estudio.	31
4.2)	Tipo de estudio.	31
4.3)	Universo y Muestra.	31
4.4)	Variables.	32
4.5)	Materiales y métodos:	35

APARTADO V: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1)	Familias de Proteínas del <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	44
5.2)	Proteínas Virulentas del <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	84

5.3) Elementos Genéticos Transponibles.....	131
---	-----

APARTADO VI: CONCLUSIONES

6.1) Conclusiones	135
-------------------------	-----

APARTADO VII: RECOMENDACIONES

7.1) Recomendaciones.....	136
---------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía.....	137
-------------------	-----

ANEXOS

Anexo: Glosario de Abreviatura

Anexo: Glosario



Apartado I: Aspectos Generales

1.1) INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa cuyo agente etiológico usual es el *Mycobacterium tuberculosis* también conocido como bacilo de Koch, el cual pertenece al *Complejo Mycobacterium tuberculosis* (CMT), junto con el *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), y el *Mycobacterium microti*.

Los agentes constituyentes de esta agrupación poseen gran homogeneidad, tanto en algunas de sus propiedades taxonómicas como en su secuencia de nucleótidos, pero por otro lado, presentan múltiples divergencias con respecto a su virulencia, distribución geográfica, epidemiología, hospedador preferente y sus características fisiológicas, tales como morfología colonial, patrones de resistencia y susceptibilidad a inhibidores¹.

En la actualidad, la tuberculosis aún constituye un serio problema de salud pública a nivel mundial, sin embargo su erradicación ha sido imposible debido a la presencia de factores que inciden en su incremento y diseminación como: carencia de servicios básicos, hacinamiento y el VIH/SIDA, siendo este último el principal factor desencadenante en países desarrollados además de una fuente de TB atípica, difícil de diagnosticar y resistente a quimioterapéuticos de primera y segunda línea.

No obstante, gracias a diversas investigaciones y el progresivo conocimiento sobre el genoma y su potencial a fin de contribuir al avance de múltiples disciplinas y así mejorar la calidad de vida del ser humano, surge la bioinformática como una ciencia multidisciplinaria que ha modificado la forma de estudio de los microorganismos, ya que proporciona información específica que puede ser utilizada para su eliminación, como es el caso de las divergencias genéticas entre las cepas *mycobacterianas*.

Esta información sobre los genomas y proteomas de los organismos se encuentra agrupada y sintetizada en bases de datos bioinformáticas, proporcionando múltiples herramientas que facilitan su análisis, tal es el caso de Basic Local Alignment Search Tool, BLAST, que ha automatizado el alineamiento o comparación de genomas completos o regiones específicas

¹ Palomino C; Cardoso Leão S. y Ritacco V. (2007). Tuberculosis. From basic science to patient care. Primera Edición.

como proteínas o elementos transponibles del genoma, siendo estos últimos esenciales para estudios filogenéticos.

La importancia del análisis bioinformático genómico de las cepas secuenciadas del bacilo de Koch radica en sus grandes beneficios como la caracterización del proteoma de las cepas secuenciadas para el entendimiento de las divergencias entre ellas, la identificación de regiones con potencial para el diagnóstico y el desarrollo de nuevos tratamientos y/o vacunas y la determinación del rol de los genes específicos en la virulencia de las cepas *mycobacterianas*.

Actualmente, se encuentran secuenciadas y disponibles en el National Center of Biotechnology Information (NCBI) cinco cepas del *Mycobacterium tuberculosis*: CDC1551, F11, H37Ra, H37Rv y KZN1435; todas poseen características celulares similares, sin embargo difieren en su ubicación geográfica, virulencia y patrones de resistencia a antibióticos, esta información está codificada dentro del genoma y se expresa en forma de proteínas, cuya función depende de sus dominios específicos.

En este estudio se realizó el análisis de estas cepas para identificar los objetivos terapéuticos y de diagnóstico viables, tomando como parámetros para seleccionar a las proteínas y familias de proteínas potenciales, la presencia de éstas en todas las cepas, la identidad entre ellas, la especificidad de estos elementos para el CMT, su localización al ser expresadas, la etapa del proceso morbo en la que se activan y los factores que inducen su activación.

Este análisis implicó el alineamiento de los genomas completos para identificar su porcentaje de compatibilidad y la localización de sus divergencias y así crear su árbol filogenético; así mismo se seleccionaron dentro de sus genomas a las proteínas y familias de proteínas que intervienen en la virulencia y procesos metabólicos vitales para la sobrevivencia de bacilo en el macrófago y para la resistencia a antibióticos y metales pesados, a su vez éstas también fueron alineadas.

Finalmente, este estudio permitió definir un esquema de las proteínas y familias de proteínas que intervienen en los distintos estadios de la patogenia de la TB. Se caracterizó y cuantificó también a los elementos transponibles del genoma debido a su papel evolutivo al ser responsable de la adquisición de resistencias a antibióticos y/o metales pesados.

1.2) OBJETIVOS

1.2.1) OBJETIVO GENERAL

Analizar el genoma y proteoma de las cepas secuenciadas del *Mycobacterium tuberculosis* implementando herramientas bioinformáticas en la UNAN-Managua del 2008 al 2009.

1.2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el proteoma de las cepas secuenciadas del *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Identificar las regiones de los genomas con potencial para el diagnóstico y el desarrollo de nuevos quimioterápicos y/o vacunas.
3. Determinar la implicancia de los genes específicos en la virulencia y reactividad de las cepas de los *Mycobacterium tuberculosis*.

1.3) JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que la tuberculosis (TB) es la responsable de aproximadamente 1.7 millones de muertes por año a nivel global², mientras tanto en el contexto Nacional, según el Ministerio de Salud (MINSA), en el 2008 las defunciones a causa de esta patología mostraron una tendencia decreciente (-16.77% con respecto al año anterior), sin embargo aún permanece como una de las enfermedades infecciosas con mayor carga de morbimortalidad³.

Las causas por la que la TB aún no ha sido erradicada son: la resistencia que el *M. tuberculosis* ha adquirido a antibióticos de primera y segunda línea, la carencia de un diagnóstico adecuado y finalmente el poco conocimiento de su compleja patogenia. Todo lo mencionado anteriormente hace conveniente la realización de un análisis bioinformático genómico que proporcione un mayor entendimiento de la patogenia de la TB estudiando los genes específicos que definen este proceso morboso.

Mediante este análisis se identifican regiones específicas del genoma con gran potencial para el desarrollo de drogas antituberculosas eficaces, éstas son seleccionadas por encontrarse presente en todas las cepas, inhibir una función vital en la virulencia o procesos biológicos fundamentales del bacilo y por su localización al expresarse. Basándose en estos parámetros se definen también las secuencias con potencial para el diagnóstico, siendo fundamental identificar el momento en el que se expresan.

Estas determinaciones permitirán el desarrollo de fármacos y métodos de diagnóstico específicos que contribuirán a la rehabilitación de los pacientes con TB multirresistente, al diagnóstico de los pacientes con coinfección TB/VIH/SIDA, pacientes sintomáticos respiratorios y etapas latentes de TB. Así mismo el análisis bioinformático genómico del *M. tuberculosis* proporciona información vital sobre la patogenia del bacilo, siendo útil para futuras investigaciones que tengan como objetivo la erradicación de esta amenaza global.

² Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. World Health Organization. Disponible: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/index.html. Consultado: Mayo 2008.

³ División de Sistemas de Información del MINSA. 2009.

1.4) ANTECEDENTES

En 1998 los estudios genéticos del *Mycobacterium tuberculosis*, dieron como resultado la secuenciación y publicación del genoma de la cepa H37Rv, la cual fue la primera cepa secuenciada⁴. Sin embargo, la comprensión de la virulencia y patogénesis del *M. tuberculosis*, aún es un tema pendiente.

En la actualidad existen múltiples artículos sobre la tuberculosis y su impacto en la salud pública mundial, no obstante los estudios disponibles con hallazgos consistentes para el desarrollo de conclusiones sobre la patología de la TB son pocos; entre estos hallazgos se encuentran:

1. La coinfección SIDA-Tuberculosis es un aspecto que ha desencadenado múltiples variaciones en la poco conocida virulencia y patogénesis del bacilos tuberculoso, postulado en el artículo: Nuevo reto médico: la coinfección SIDA-Tuberculosis, por A. F. Liranza y E. V. Pacheco y publicado en 1998.
2. La caracterización de la cepa H37Rv, en la que se presentaba una perspectiva de la biología y crecimiento lento de la patogenicidad para ayudar a la concepción de profilácticos nuevos y las intervenciones terapéuticas, publicado en el mismo año y titulado: Descifrando la biología del *Mycobacterium tuberculosis* partiendo de la secuenciación completa del genoma, realizado por S. T. Cole, R. Brosch, *et al*.
3. Los polimorfismos entre las cepas de *M. tuberculosis* son mayores de lo anticipado y que la variación genética puede tener un papel muy importante en la patogénesis e inmunidad de la enfermedad, fundamentado en el artículo: Comparación de todo el genoma de cepas clínicas y de laboratorio de *Mycobacterium tuberculosis*, elaborado por R. D. Fleischmann, D. Alland, J. A. Eisen, *et al* y publicado en Octubre del 2002.

⁴ National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>. Consultado: Septiembre, 2009.

4. Verificación de la anotación original del genoma del *M. tuberculosis*, incluyendo a 82 nuevos polipéptidos, 22 de las cuales poseen funciones previstas, lo que produjo un cambio en la clasificación funcional de las proteínas; expuesto en el estudio: Re-anotación de la secuencia del genoma del *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, por J. Camus, M. Pryor, C. Médigue y S. Cole, publicado en el año 2002.

5. Parte importante de la virulencia del *M. tuberculosis* se encuentra codificada en la región RD1, establecido en el artículo: Virulencia *mycobacterial* y secreción especializada: misma historia, diferente final, realizado por M. A. Behr y D. R. Sherman y publicado en Marzo del 2007.

6. Desarrollo de cepas de TB hipervirulentas con nuevos genes que les confieren resistencias, su susceptibilidad terapéutica y distribución geográfica de estas cepas extremadamente resistentes (XDR), publicado en el estudio titulado: De las balas mágicas de nuevo a la montaña mágica: el aumento de tuberculosis extensivamente resistente a fármacos, por S. E. Dorman y R. E. Chaisson en marzo del 2007.

7. Los ensayos de PCR son una técnica eficaz, precisa y sensible de diferenciación, postulado en el artículo titulado: Evaluación de un ensayo de PCR múltiple para diferenciar *mycobacterias* del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en un laboratorio de referencia, cuyos autores fueron: N. Arráiz y Z. Romay y publicado en Chile en el 2007.



Apartado II: Marco Teórico

II) MARCO TEÓRICO

2.1) Caracterización del *Mycobacterium tuberculosis*.

2.1.1) Taxonomía del *Mycobacterium tuberculosis*.

El *Mycobacterium tuberculosis* es un organismo procariota perteneciente al reino de las bacterias, filo Actinobacteria, clase Actinobacteria, subclase Actinobacteridae, del orden Actinomycetales, suborden Corinebacterineae, de la familia Mycobacteriaceae, del género *Mycobacterium* y del grupo de especie del *Complejo Mycobacterium tuberculosis* (CMT)⁵.

2.1.2) Estructura del *Mycobacterium tuberculosis*.

Son microorganismos intracelulares facultativos que prefieren los tejidos con alta presión de oxígeno, son rectos o ligeramente curvos, con dimensiones de 0.2-0.6 micras de ancho por 1,0-10 micras de largo (Anexo 1). No contienen endosporas o cápsulas, carecen de fimbrias y generalmente se consideran Gram-positivas, aunque las *Mycobacterias* no parecen encajar en esta categoría desde una perspectiva empírica, debido a que no retienen el colorante cristal violeta.

De manera general, todas las especies de *Mycobacterium* comparten una pared celular característica, más gruesa que en las bacterias Gram negativas y que constituye una verdadera coraza lipídica difícilmente penetrable, hidrofóbica, cerosa y rica en ácidos micólicos y micolatos. Cabe mencionar que la pared celular hace una contribución sustancial a la resistencia de este género y las vías de biosíntesis de sus componentes son dianas potenciales para el tratamiento de la tuberculosis⁶.

Partiendo del interior hacia el exterior, presenta una membrana citoplásmica cubierta por una capa extensa de peptidoglicanos unidos a polisacáridos, los cuales se encuentran esterificados con los ácidos micólicos, que corresponden al 60% del peso de la pared celular, formados por lípidos libres, glucolípidos y peptidoglucolípidos; tal estructura, que

⁵ National Center for Biotechnology Information. (NCBI). Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1773&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Consultada: Agosto, 2009.

⁶ Bhamidi S. (2009). *Mycobacterial Cell Wall Arabinogalactan Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. Editorial Caister Academic. ISBN 978-1-904455-45-5.

le brinda una apariencia cerosa, es la responsable de conferirle una alta hidrofobicidad, resistencia a detergentes, a un buen número de antibióticos, a las tinciones habituales y le da afinidad por la tinción ácido alcohol resistente de Ziehl Neelsen y Kinyoun (Anexo 2).

Las cadenas de péptidos son los antígenos responsables de la estimulación de la respuesta inmune celular del hospedero, y de hecho éstas son utilizadas para preparar derivados protéicos purificados. Es importante mencionar, que la envoltura celular también incluye adhesinas y no contiene toxinas conocidas. Las características celulares de las diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis* se encuentran resumidas en Anexo 3.

2.1.3) Variación entre las cepas o biodiversidad.

En el pasado se sugería que el *Mycobacterium tuberculosis* presentaba muy poca diversidad en su secuencia genómica⁷. Se consideraba que la mayoría de la variabilidad genética detectada, estaba relacionada con elementos de transposición y fenotipos de resistencia a los medicamentos⁸. Sin embargo en la actualidad, la evidencia y el análisis de los aislados clínicos demuestran que las cepas de este agente patógeno presentan una estructura poblacional biogeográfica.

Estos diferentes linajes de cepas, asociados a diferentes regiones geográficas, varían no sólo en su virulencia y factores inmunológicos, sino en su capacidad para adaptarse a un medio específico. Esta variedad significativa en las cepas podría ser la base para la comprensión de la patogénesis, los mecanismos inmunes y la evolución de bacterias.

⁷ Musser J. M., Amin A. y Ramaswamy S. (2000). Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. Revista Genetics. Volumen 155 Página 7-16.

⁸ Sreevatsanm S., PanX., Stockbauer K., Connell N., Kreiswirth B., Whittam T. y Musser J. M. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionary recent global dissemination. Revista Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Volumen 94. Página 9869-9874.

2.1.4) Cepas hipervirulentas.

Las epidemias de TB a menudo son causadas por cepas hipervirulentas de *M. tuberculosis*. En experimentos de laboratorio, estos aislados clínicos provocan una inmunopatología inusual y pueden ser hiperinflamatorias como hipoinflamatorias. Los estudios han demostrado que la mayoría de estos mutantes tienen deleciones en la pared celular, modificando enzimas o reguladores que responden al estímulo ambiental.

Así mismo, los análisis de estas cepas han indicado los mecanismos que permiten al *M. tuberculosis* ocultar su potencial patógeno completo, induciendo un granuloma que ofrece un nicho de protección y que permite a los bacilos sostener a largo plazo la infección persistente⁹ así como también permanecer en estado latente hasta que el sistema inmunológico del huésped disminuya su capacidad.

2.2) Fisiopatología de la Tuberculosis (TB).

2.2.1) Etiología.

Es una infección contagiosa potencialmente mortal, causada generalmente por el *M. tuberculosis*. El prefijo latino "myco" se refiere a la cera de la que está compuesta la pared celular¹⁰. Las *Mycobacterias* son aerobias estrictas y no móviles, con excepción de la especie *M. marinum*, que ha demostrado ser móvil dentro de los macrófagos; éstos además se caracterizan por ser ácido-alcohol resistentes¹¹, sensibles a la luz ultravioleta y solar, además de formadores de granulomas en tejidos infectados (Anexo 4).

Cabe mencionar que la TB puede desarrollarse debido a la acción de otros agentes etiológicos pertenecientes al *Complejo de Mycobacterium Tuberculosis* (CMT), entre ellos encontramos al *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), que se transfiere al ser humano por transmisión zoonótica por el consumo de leche no pasteurizada y otros productos de animales infectados y cuya secuencia genómica tiene más de un 99.95% de coincidencia

⁹ Casali N. (2009). Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis. *Mycobacterium: Genomics and Molecular Biology*. Editorial Caister Academic. ISBN 978-1-904455-40-0.

¹⁰ Ryan K. J., Ray C.G. (2004). *Sherris Medical Microbiology*. Cuarta Edición. McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.

¹¹ 9/IDEM.Página 9.

con la del *M. tuberculosis*¹². Es necesario aclarar que aunque cualquier miembro del CMT es patogénica para el hombre, existen diferencias básicas en los genomas de cada uno de ellos que producen que las infecciones por estos agentes no sean igual de contagiosas y patogénicas.

2.2.2) Mecanismo de transmisión.

La infección se transmite inhalando aire contaminado con *M. tuberculosis* en ambientes cerrados. Para que el aire se contamine, una persona con TB activa debe expulsar las bacterias con la tos y éstas deben permanecer en el aire durante varias horas. Sin embargo, ésta puede ser transferida al feto antes o durante el nacimiento, al respirar o tragar líquido amniótico infectado, y al respirar aire que contenga microgotas infectadas¹³.

2.2.3) Patogenia.

El desarrollo de TB depende de la respuesta inmunológica del huésped y de las reacciones granulomatosas del mismo¹⁴, sin embargo la patogenia del bacilo tuberculoso no se encuentra totalmente dilucidado aún. Se conoce que con la entrada de éste a los pulmones o a otro sitio anatómico del huésped susceptible, se inicia una reacción inflamatoria aguda, inespecífica y silenciosa, que suele acompañarse de pocos o ningún síntoma.

A continuación los bacilos son fagocitados por macrófagos y transportados a los ganglios linfáticos regionales donde alcanzan el torrente sanguíneo y se diseminan por todo el organismo, la mayor parte de las lesiones tuberculosas diseminadas se curan, lo mismo que las lesiones pulmonares primarias, aunque siguen siendo focos latentes de reactivación. Entre dos u ocho semanas después de la primera infección, cuando los bacilos continúan

¹² Aymerich C. P., Domínguez Benítez J. y Ruíz V. A. (2006). *Mycobacterium bovis*. Hospital Universitario Germans Trias Pujol, Badalona. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona.

¹³ Zeledón Victor. (2006). Evaluación de la prueba del Glutaraldehído en la detección de casos de tuberculosis pulmonar en pacientes ingresados en Hospital Rosario Lacayo y Centros Asistenciales de la ciudad de León en el período Enero 2004 – Enero 2005. Página 12.

¹⁴ Robbins. (1990). Patología estructural y funcional. Cuarta Edición. Editorial Interamericana McGraw -Hill. Volumen 1. Página 394-400.

multiplicándose en el medio intracelular, se desarrolla la hipersensibilidad en el huésped infectado.

Los linfocitos penetran en la zona de infección y elaboran factores quimiotácticos como interleucinas y linfoquinas; en respuesta llegan a la zona monocitos que se transforman en macrófagos y luego en histiocitos especializados. El bacilo puede permanecer dentro de los macrófagos por años a pesar de la producción de las lisozimas, sin embargo se detiene su multiplicación, produciéndose la curación y calcificación tardía de los granulomas resultando en residuos visibles en una radiografía de tórax (Anexos 5 y 6).

2.2.4) Factores de riesgo para la adquisición de Tuberculosis.

Existen factores que tienden a predisponer al paciente a una infección por el agente tuberculoso, algunos con mayor influencia que otros, como es el caso del VIH/SIDA, que es la principal razón por la que no se han alcanzado las metas de control de la TB en zonas donde la infección por VIH/SIDA es frecuente, causando una infección bacilífera y contagiosa, aumentando los casos de TB en personas no infectadas por el VIH.

Otros factores de trascendencia son: la evolución del agente etiológico produciendo *Mycobacterias* resistentes a drogas; la edad avanzada, debido a que se reduce la efectividad del sistema inmunológico permitiendo que las bacterias inactivas resulten reactivadas; y finalmente, el origen étnico, ya que las etnias negras tienen mayor incidencia debido a que contaron con mucho menos tiempo para desarrollar genes resistentes y transmitirlos a su descendencia.

2.2.5) Tipos de tuberculosis.

Se distinguen dos tipos clínicamente diferentes: TB pulmonar y extra pulmonar; ambas difieren tanto en frecuencia como en su diagnóstico y el tratamiento para su erradicación. Así mismo se ha determinado un tipo inusual transmitida zoonóticamente, es decir de los animales al ser humano, ésta no se puede distinguir clínicamente de las ocasionadas por el

M. tuberculosis (Anexo 7). Se estima que en Latinoamérica cada año ocurren 7000 nuevos casos de TB humana por *M. bovis*¹⁵.

2.3) Métodos de diagnóstico de la Tuberculosis.

El diagnóstico de la TB yace en tres pilares de diferente importancia clínica: la bacteriología, radiología y reacción de tuberculina o Derivado Proteico Purificado (PPD) (Anexo 8), sin embargo ninguno es un método rápido y eficaz. Un procedimiento accesorio para el diagnóstico de las formas extrapulmonares, toma especial relieve en casos especiales de localización pulmonar; este procedimiento es el examen histológico mediante la biopsia transbronquial o por toracotomía.

2.4) Epidemiología de la Tuberculosis.

La TB nunca ha llegado a ser erradicada en los países pobres, y está en aumento en muchos países industrializados. Actualmente es uno de los principales problemas de salud pública, ya que se estima que más de 2/3 partes de la población mundial está infectada por el *M. tuberculosis*. En el mundo, 8.4 millones de personas desarrollan la enfermedad cada año, y entre 2 a 3 millones de personas, mueren en ese período¹⁶.

En el contexto nacional, según la División de Sistemas de Información del MINSA, esta patología presentó un comportamiento descendente del año 2005 al 2006¹⁷. Sin embargo, en el año 2007 surgió un aumento inesperado del 12.94% con respecto al año anterior, lo que representó 137 nuevos casos en el país¹⁸. Este comportamiento ascendente también se ve reflejado en el año 2008 con un incremento de 6.10% que corresponden a 73 nuevos pacientes diagnosticados¹⁹ (Anexo 9).

¹⁵ Ritacco V. y Kantor I. N. (1992). Zoonotic tuberculosis in Latin America. Revista Clinical Microbiology. Volumen 30. Páginas 3299- 3300.

¹⁶Estabilización de la epidemia mundial de tuberculosis. Comunicado de Prensa de la OMS. Marzo 24 del 2007. Ginebra/ Nueva York/París.

¹⁷ Informe de Admisión y Egresos de país por SILAIS. Reporte Anual 2005 y 2006.

¹⁸ Informe de Admisión y Egresos de país por SILAIS. Reporte Anual 2007.

¹⁹ Informe de Admisión y Egresos de país por SILAIS. Reporte Anual 2008.

En el año 2008, los departamentos que registraron un mayor número de pacientes diagnosticados fueron: León, Managua, RAAN y Matagalpa²⁰ (Anexos 10-14), y en términos de edad, el grupo que registró los mayores índices fue el comprendido entre 15 y 34 años, con un total de 488²¹. Cabe mencionar que el comportamiento de las defunciones en el período 2005-2008 fue decreciente (Anexo 15).

Otro factor de gran trascendencia es la coinfección del VIH/SIDA/TB. Del 2005 al 2008, las defunciones a causa del SIDA fueron similares a las presentadas por la TB en ese mismo período²² (Anexos 16 y 17). Actualmente, la División de Sistemas de Información del MINSA no cuenta con estadísticas que reflejen la relación entre estas patologías, sin embargo según el Perfil de la Tuberculosis en el país, publicado por la OMS, 100 de cada 2700 personas diagnosticadas con TB, presentan VIH/SIDA²³.

La pobreza es otra de las causas por la que la TB ha reaparecido como uno de los principales problemas de salud pública. Los cinco indicadores mediante los que se determina la categoría de pobreza correspondiente a cada departamento, son: hacinamiento, vivienda inadecuada, servicios insuficientes, baja educación y dependencia económica. En base a estos indicadores los departamentos del país se clasifican en cuatro categorías de pobreza: severa, alta, media y baja.

En el Mapa de pobreza del país (Anexo 18) se puede apreciar que los departamentos de León y Managua que presentan mayor número de diagnósticos de infecciones tuberculosas, no se encuentran sumergidos en la pobreza extrema, en cambio viven en pobreza baja. Matagalpa y RAAN presentan también elevados números de diagnósticos, sin embargo éstos sí se ubican en pobreza alta y pobreza severa respectivamente.

Es importante mencionar que la tasa de curación con el esquema de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES, DOTS por sus siglas en inglés), es del 75%. No obstante, la meta es llegar a una tasa de curación del 85%. Uno de los retos para alcanzar

²⁰19/IDEM. Página 12.

²¹ Informe de Admisión y Egresos de país por SILAIS. Reporte Anual 2005-2008.

²² Informe de Admisión y Egresos de país por SILAIS. Reporte Anual 2005-2008.

²³ Global Tuberculosis Control: Epidemiology, Strategy, Financing: WHO Report 2009.

esta meta, es la disminución de la tasa de abandono del tratamiento por parte de los pacientes (16%).

2.5) Agentes quimioterápicos en uso.

Los fármacos utilizados para el tratamiento de la TB incluyen agentes de amplio y de reducido espectro, así como combinaciones de varios fármacos como es el caso del tratamiento acortado estrictamente supervisado, TAES, o DOTS por sus siglas en inglés. De manera general los fármacos se clasifican como agentes de primera elección, agrupando a la Isoniazida (INH o H), Rifampicina (RMP o R), Pirazinamida (PZA o Z), Etambutol (EMB o E) y Estreptomina (STM o S).

Los agentes de segunda elección y complementarios son: Etionamida (ETH), Ácido p-aminosalicílico (PAS), Cicloserina, Capreomicina, Kanamicina, Clofazimina, Ofloxacino, Rifabutina. El DOTS o TAES es la estrategia recomendada internacionalmente por la OMS para asegurar la curación de la tuberculosis e incluye a los fármacos de primera línea administrados en dos etapas y abreviadas en:

2HREZ/4HR3

Esto significa dos meses de isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida administrados diariamente, seguido de cuatro meses de isoniazida y rifampicina administrados tres veces a la semana. Cabe mencionar que no todos los mecanismos de acción de estos fármacos se encuentran dilucidados (Anexo 19).

2.6) Bioinformática.

La definición de bioinformática no está universalmente establecida. De manera general, se define como la creación y desarrollo de tecnologías de información y computación para problemas en biología, más comúnmente en biología molecular, pero incrementando en otras áreas de la biología. También se trata de métodos de almacenamiento, recopilación y análisis de datos biológicos como secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, estructuras, funciones, vías e interacciones genéticas.

Esta nueva disciplina es el resultado de las cantidades masivas de información que generan otras ciencias como la genómica, proteómica, metabolómica, transcriptómica, entre otras; y

tiene como objetivo final descubrir la riqueza de la información biológica escondida en la masa de datos y obtener una visión más clara de la biología fundamental de los organismos, lo que tiene un profundo impacto en campos tan variados como la agricultura, el medio ambiente y en este caso, la salud humana.

Los principales esfuerzos de investigación en estos campos incluyen el alineamiento de secuencias, la predicción de genes, montaje del genoma, alineamiento estructural de proteínas, predicción de estructura de proteínas y la expresión génica, interacciones proteína-proteína y modelo de la evolución²⁴, todo esto con ayuda de herramientas específicas que facilitan su interpretación.

Las bases de datos que agrupan la información genética disponible pertenecen a diferentes instituciones y procedencias, entre ellas encontramos al DNA Data Bank of Japan (DDBJ), European Bioinformatics Institute (EBI) y National Center for Biotechnology Information (NCBI), siendo ésta última parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos de Norteamérica.

NCBI almacena y constantemente actualiza la información referente a secuencias genómicas en GeneBank; proporciona un índice de más de 20 millones de artículos científicos referentes a biomedicina, biotecnología, bioquímica, genética y genómica en PubMed; facilita una recopilación de enfermedades genéticas humanas en OMIM. También contiene a PubChem que incluye información sobre sustancias, estructuras compuestas y bioactividad de moléculas pequeñas.

Estas y otras bases de datos del NCBI están disponibles en línea de manera gratuita y son accesibles utilizando el buscador Entrez. NCBI proporciona además múltiples herramientas que facilitan el análisis de secuencias de ADN, ARN y proteínas, siendo una de las más utilizadas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que permite el alineamiento y comparación de regiones específicas y/o genomas completos publicados en las bases de datos, fundamentales para el análisis genómico de uno o varios organismo.

²⁴Kanehisa M., Bork P. (2003). Bioinformatics in the post-sequence era. Revista Nature Genetics. Volumen 33.

Para el alineamiento de secuencias pequeñas y para la identificación de las mismas. COBALT es una herramienta de alineación similar a BLAST y FASTA con la particularidad de que realiza alineamientos únicamente para proteínas.

Otras de las herramientas que simplifican el análisis bioinformático genómico son: MapView, valiosa para la identificación y localización de los genes y otras características biológicas al proporcionar vistas integradas de los mapas de cromosomas de muchos organismos; 3D Joining Neighbor, un método de agrupación usado para la construcción de árboles filogenéticos creados a base de datos de ADN o secuencias de proteínas.

Para el análisis bioinformático proteómico NCBI proporciona herramientas como Conserved Domain que se refiere a las funciones y unidad estructurales de una proteína que conservados durante la evolución, ya que durante ésta se produjeron cambios en posiciones específicas de las secuencias de aminoácidos de un modo que se conservan las propiedades físico-químicas de los residuos originales y por lo tanto la estructura y/o propiedades funcionales de esa región de la proteína.

Cluster (CLS) agrupa a las proteínas facilitando la comprensión de su relación y clasificándolos de acuerdo a criterios de homología o similitud de un conjunto de genes cuyos perfiles de expresión son parecidos. La base de datos Entrez Clusters, es una colección de referencia de secuencias de proteínas (RefSeq) de los genomas completos de procariotas, plásmidos, virus y genomas completos e incompletos de protozoos y plantas, anotados y agrupados por la similaridad de la secuencia y la función cada proteína²⁵.

En ésta las proteínas se asocian automáticamente en grupos basándose en las mejores puntuaciones de reciprocidad en BLAST. La base de datos de grupos de proteínas o clusters se actualiza a intervalos trimestrales después de lo cual la validación y procesos de evaluación de la calidad se producen. Por lo tanto, hay un retraso de 3 meses para la incorporación de proteínas de los genomas de nuevo en grupos de proteínas por el tiempo de procesamiento necesario²⁶.

²⁵ National Center for Biotechnology Information. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=helpcluster&part=helpcluster#helpcluster.Introduction>. Consultado: Octubre, 2009.

²⁶ 25/IDEM. Página 16.

Otra herramienta asociativa es COG (Cluster Orthologous Groups), que agrupa a las proteínas de acuerdo a sus funciones, encontrando en un mismo COG a proteínas individuales o grupos parólogos de al menos tres linajes que corresponden a un antiguo dominio conservado. La base de datos de las proteínas agrupadas por grupos ortólogos (COG) es un intento de clasificar filogenéticamente a las proteínas codificadas en el genoma completo.

La versión actual de la base de datos COG consta de 4.873 grupos, que incluyen 136.711 proteínas (aproximadamente el 71% de todas las proteínas codificadas) a partir de 50 genomas de bacterias, 13 genomas de arqueas y 3 de genomas de organismos eucariotas unicelulares. La base de datos COG se actualiza periódicamente a medida que se disponga de nuevos genomas.

Cn3D es otra herramienta de NCBI que permite apreciar las estructuras tridimensionales de las proteínas. Este software se ejecuta en Windows, Macintosh y Unix. Por otro lado Structure proporciona información acerca de las estructuras tridimensionales de las proteínas en lo que respecta a la función biológica, los mecanismos vinculados a la función, la historia evolutiva y las relaciones entre las macromoléculas.

Para el análisis bioinformático proteómico se requiere también de herramientas paralelas además de las anteriores como Pfam, que es una base de datos que alberga una gran colección de familias de proteínas (aproximadamente 11,912 familias de proteínas), cada una representada por múltiples alineamientos de secuencias y modelos ocultos de Markov (HMM)²⁷. Además, Pfam agrupa a las familias relacionadas conocidas como clanes o superfamilias.

PIR (Recursos de Información de Proteínas), fue establecida por la Fundación Nacional de Investigación Biomédica (NBRF) con el fin de dar apoyo a la investigación en proteómica, genómica, los sistemas biológicos y los estudios científicos. Una de las unidades que posee PIR es UNIPRO (Recurso Universal de las Proteínas), que es un recurso para almacenar las secuencias y funciones de las proteínas consolidando la información contenida en las bases

²⁷ Pfam. Disponible: <http://pfam.janelia.org/>. Consultado: Septiembre, 2009.

de datos Swiss-Prot, TrEMBL y PIR, dando lugar a uno de los catálogos de proteínas más completos del mundo.

InterPro es otra base de datos que se utiliza para la clasificación y anotación automática de las proteínas y genomas, lo que permite clasificar las secuencias en superfamilia, familia y los niveles de subfamilia, así como la predicción de la aparición de repeticiones de dominios funcionales²⁸. GO (Gene Ontology) es una iniciativa de la bioinformática importante por unificar la representación de los genes y productos génicos en todas las especies con el fin de difundir y permitir el acceso a toda esta información.

Las bases de datos específicas que proporcionan informes esquematizados, actualizados y asociados a recursos bioinformáticos genómicos y proteómicos del bacilo tuberculoso son Tuberculist y Tuberculosis Data Base, este último pone a disposición las herramientas y recursos disponibles en los centros de información de Stanford Microarray y el Instituto Broad.

Tuberculist, por su parte recopila diversos aspectos de la información genómica del *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *Canetti M.*, *M. microti*, y sobre todo del *M. tuberculosis*. Los datos contenidos en esta fuente se originaron principalmente de la cepa H37Rv, luego de su secuenciación y el cual se ha venido completando con los datos y observaciones hechas por investigadores de la Unité de Génétique Moléculaire Bactérienne²⁹.

2.7) Genómica.

El Ácido Desoxirribonucleico (ADN), es la molécula que contiene la información genética. Está formado por la unión de 4 diferentes nucleótidos: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C), constituidos por una base nitrogenada, una pentosa (azúcar) y un grupo fosfato, a través de este último se realizan las uniones entre nucleótidos. La unión del grupo fosfato tiene lugar en las posiciones 5' o 3' de la pentosa, produciendo cadena con esta orientación.

²⁸ InterPro. Disponible: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>. Consultado: Septiembre, 2009.

²⁹ TubercuList. Disponible: <http://tuberculist.epfl.ch/>. Consultado: Septiembre, 2009.

En el ADN de una célula se encuentran condensado todo el genoma de un organismo, el estudio de los genomas se denomina genómica e incluye como objetivos catalogar todos los genes que tiene un organismo, estudiar la organización y estructura de cada uno de ellos, pero también descubrir la función, los mecanismos implicados en la regulación de la expresión y el modo en que unos genes interactúan con otros.

Existen muchas áreas relacionadas con la genómica que se han ido desarrollando a lo largo de los años, algunas de las más importantes por su potencial tanto económico como social y ambiental son la genómica agropecuaria, la genómica forense, la genómica ambiental, la genómica industrial, la medicina genómica, etc. que con el paso de los años y el desarrollo de nuevas tecnologías se han expandido.

El primer reporte genómico de interés en la bacteriología médica fue la secuenciación completa del genoma del *Haemophilus influenzae* en 1995. En la actualidad se han completado la secuenciación de 87 genomas de bacterias y otros 200 genomas microbianos se encuentran en proceso. En el caso del *Mycobacterium tuberculosis*, se encuentran secuenciados los genomas de cinco cepas de este microorganismo (Anexo 20).

Los cromosomas de las cepas del bacilo tuberculoso presentan una topología circular con una longitud promedio de 4.4 Mpb, están compuesto de ADN repetitivo que codifica para proteínas que llevan a cabo los procesos celulares, metabolismo de lípidos, fundamental para su supervivencia, virulencia y para permanecer en estado latente. Además, el ADN de este microorganismo es rico en elementos de inserción y presenta pseudogenes, aunque no en grandes cantidades, pero importantes por su valor evolutivo.

Un pseudogén es una secuencia nucleotídica similar a un gen normal pero que no da como resultado un producto funcional, es decir, que no se expresa. Se han propuesto varios escenarios para explicar el origen de un pseudogén, desde la retrotransposición o transcripción inversa de manera espontánea de fragmentos de la transposición en ARN mensajero, hasta las mutaciones que desactivan una de las copias de un mismo gen cuando sólo se necesita una.

2.8) Genómica del *Mycobacterium tuberculosis*.

2.8.1) *Mycobacterium Tuberculosis* CDC1551.

A esta cepa se le denomina también como la “Cepa Oshkosh”, fue un reciente aislado clínico obtenido de un trabajador de fábrica de ropa de Tennessee, Kentucky, EE.UU. Es altamente contagiosa, infectando a cerca del 80% de los contactos sociales con paciente infectados, a pesar de esto no ha causado epidemias en el hombre y es sensible a una amplia gama de medicamentos.

Esta cepa resulta ser muy virulenta en ratones, produciendo más bacterias que la cepa H37Rv cuando se inocula. El genoma del *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 fue secuenciado por el Instituto de Investigación Genómica (TIGR, por sus siglas en inglés)

2.8.2) *Mycobacterium Tuberculosis* F11.

Representó la mayor parte de los aislamientos de pacientes con tuberculosis durante una epidemia en el Cabo Occidental de Sudáfrica, cabe mencionar que esta cepa se ha encontrado en otras partes del mundo³⁰. El genoma del *Mycobacterium Tuberculosis* F11, fue secuenciado por el Instituto Broad.

2.8.3) *Mycobacterium Tuberculosis* H37Ra.

Esta cepa es derivada de la cepa virulenta H37, aislada en 1905 por Edward R. Baldwin, a partir de un paciente de 19 años con tuberculosis pulmonar crónica. El *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra fue secuenciado por el Centro Nacional del Genoma Humano de China en Shanghai (Chinese National Human Genome Center).

La cepa H37Ra tiene características diferentes en comparación con la cepa hermana virulenta H37Rv, incluyendo, morfología en las colonias, la pérdida de la formación de la médula, la pérdida de colorante rojo neutro vinculante, disminución de la capacidad de sobrevivir en condiciones anaeróbicas, disminución de la capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos, y la pérdida de virulencia en los conejillos de indias, ratones y conejos.

³⁰ National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponible: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=15642. Consultada: Septiembre, 2009.

2.8.4) *Mycobacterium Tuberculosis* H37Rv.

La cepa H37Rv se ha derivado de la cepa H37, originaria del pulmón humano aislado en 1934, y ha sido ampliamente utilizado a nivel mundial en la investigación biomédica profiláctica. A diferencia de algunos aislados clínicos, ésta cepa conserva plena virulencia en modelos animales, es susceptible a las drogas y receptivo a la manipulación genética. El genoma del *Mycobacterium Tuberculosis* H37Rv fue secuenciado en 1998 por el Instituto TIGR.

2.8.5) *Mycobacterium tuberculosis* KZN1435.

La cepa de *M. tuberculosis* KZN1435 fue aislada de un paciente en KwaZulu-Natal, Sudáfrica. Esta cepa es multirresistente (resistente a isoniazida y rifampicina)³¹. El genoma fue secuenciado por El Instituto Broad.

2.9) Análisis bioinformático genómico del *Mycobacterium tuberculosis*.

El análisis genómico aplicado al estudio de bacterias infecciosa como el bacilo de Koch necesita de instrumentos bioinformáticos que analicen la interacción total de los genes, como el metabolismo que explica la fisiología básica de la bacteria y los genes de virulencia que causan la infección al humano. Por otro lado la información derivada de la secuenciación de genoma puede ser aplicada al desarrollo de nuevos medicamentos para combatir enfermedades infecciosas resistentes a los tratamientos vigentes.

Para la realización del análisis bioinformático genómico de un organismo se explora desde las relaciones entre los genes como la presencia de genes ortólogos y parólogos mediante CLS y COG, hasta el producto final de su expresión. La importancia de la ortología o parología entre genes es que así se determinan la razón de las similitudes de dos proteínas de diferentes organismos para poder definir su antepasado común, esto en el caso de los genes ortólogos.

³¹ National Center of Biotechnology Information (NCBI). Disponible: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=21055. Consultada: Septiembre , 2009

Por otro lado los genes parólogos son aquellos que se encuentran en el mismo organismo, y cuya semejanza revela que uno procede de la duplicación del otro. La duplicación génica es un fenómeno evolutivo importante, ya que una vez ocurrida, los genes repetidos evolucionan separadamente, pudiendo dar lugar a productos distintos y abriendo campo a nuevas adaptaciones. Son parólogos, por ejemplo los genes que determinan las distintas clases de hemoglobinas que se producen durante fetal y adulta.

La hemoglobina consiste en un grupo heme y cuatro globinas, en los vertebrados primitivos estas cuatro cadenas globinas eran del mismo tipo y se producían a partir de un mismo gen, sin embargo en los vertebrados superiores la hemoglobina consiste en dos cadenas de globina α y β , debido a la ocurrencia de una duplicación genética que condujo a dos copias del gen de globina original que divergieron a lo largo de la evolución, dando lugar a dos genes de globina especializados distintos.

Para la mayor comprensión y el análisis del genoma, la genómica ha dado lugar a la genómica comparativa y evolutiva, genómica computacional, farmacogenómica, toxigenómica y genómica funcional, ésta última subdividida de acuerdo a las funciones que realizan los genes a nivel de proteínas, metabolismo, transcripción, etc., originando diversas ciencias tales como: la proteómica, metabolómica, transcriptómica, glucómica, entre otros.

2.10) Proteómica del *Mycobacterium tuberculosis*.

La proteómica puede definirse como la genómica funcional a nivel de proteínas. El concepto más ampliamente distribuido es el que concibe a la proteómica como la ciencia que correlaciona las proteínas con sus genes, estudia el conjunto completo de proteínas que se pueden obtener de un genoma. Conocer el proteoma de un organismo es tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas por ese organismo, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente.

Las células expresan varios miles de proteínas diferentes que pueden experimentar numerosas modificaciones en respuesta a microambientes diversos. El análisis de los secretos fisiológicos de los microorganismos empezó más de una década atrás con la

lectura del primer genoma completo de la bacteria, *Haemophilus influenzae*³². El conocimiento del proteoma bacteriano permite evaluar proteínas como potenciales antígenos específicos en la respuesta inmune para la fabricación de vacunas.

2.11) Organización de las proteínas dentro del genoma.

Dentro del genoma del *Mycobacterium tuberculosis*, encontramos proteínas con diferentes funciones y características, que le proporcionan notables propiedades a este agente patógeno. Muchas de estas proteínas pueden ser agrupadas de acuerdo a la evolución o similitud en las secuencias de aminoácidos y otras por sus actividades o procesos semejantes que realizan.

2.11.1) Familia de proteína.

Una familia de proteínas es un grupo de proteínas relacionadas evolutivamente, es decir homólogas, con función bioquímica y estructuras tridimensionales similar. El término familia de proteínas indica grandes grupos de proteínas con el menor nivel posible de similitud de secuencias detectables, o bien, grupos pequeños de proteínas con secuencia, función, y estructura tridimensional idéntica. Una familia de proteínas consta de secuencias ortólogas, lo que indica proteínas con la misma función en diferentes organismos, y secuencias parólogas, que son proteínas en el mismo organismo pero con funciones diferentes.

Cuando se presenta una completa similitud de secuencia de longitud con la arquitectura de dominio común, es decir, el mismo número, orden, y los tipos de dominios, PIR se refiere a la familia como una familia de homeomorfa. Las regiones alineadas se conocen como un dominio homeomorfa, y esta región puede comprender varios dominios homólogos pequeños que se comparten con la familia³³.

³² Palomino C., Leão S. y Ritacco V. (2007) Tuberculosis. From basic science to patient care. Edición 2007.

³³ 30/IDEM. Página 22.

2.11.1.1) Superfamilia de proteínas.

Las superfamilias de proteínas están constituidas por un conjunto de proteínas, cuyos miembros poseen similitud en sus secuencias, las cuales pueden ser de longitudes iguales o diferentes. Las superfamilias presentan origen evolutivo y estructura tridimensional común, sin embargo pueden tener diferencias en el número y disposición de estructuras secundarias.

El Recurso de Información de Proteína (Protein Information Resource, PIR) utiliza el término "Superfamilias homeomorfa", para referirse a superfamilias constituidas de secuencias que se pueden alinear de extremo a extremo, lo que representa una semejanza en la secuencia homóloga de un dominio, una región que se extiende de igual modo en toda la alineación.

Este dominio puede incluir también pequeños dominios homólogos que se comparten con familias de proteínas y otras superfamilias³⁴. Cabe mencionar que la alineación de la superfamilia también puede incluir regiones que no se alinean, ya sea dentro o en los extremos de la alineación³⁵.

2.11.1.2) Subfamilia de proteína.

Subfamilia de proteínas es un nivel de clasificación de proteínas, el cual se da cuando los miembros de la familia comparten la misma interacción y las interfaces de interacción de los compañeros. Por lo que, los miembros de la subfamilia tienen que compartir funciones similares.

2.11.2) Proteínas virulentas.

2.11.2.1) Factores de virulencia.

Son proteínas u otras moléculas sintetizadas por enzimas y codificadas por genes en el ADN cromosómico, del bacteriófago o de plásmidos, y se refiere a la habilidad de una bacteria de causar enfermedad y es descrita en términos del número de bacteria infectante,

³⁴Mount D. W. (2004). Bioinformatics Sequence and Genome Analysis. Segunda Edición.

³⁵Barker et al. 1995, 1996. Disponible: <http://www.nbrf.georgetown.edu/>. Consultado: Agosto, 2009.

la ruta de entrada al cuerpo, los efectos de los mecanismos de defensa del huésped y las características intrínsecas de la bacteria. Entre los factores que influyen en el proceso patogénico del *M. tuberculosis*, encontramos:

2.11.2.2) Adhesinas³⁶:

Componentes de la superficie celular bacteriana que facilitan su adhesión a otras células o superficies inanimadas (Anexo 21). El bacilo tuberculoso utiliza adhesinas fimbriales o con pili, que se constituyen básicamente por una secuencia ordenada de subunidades proteicas de pilina que forman unas estructuras cilíndricas, largas, flexibles y que le permiten interactuar con la célula hospedadora³⁷ (Anexos 22 y 23).

2.11.2.3) Factores para invasividad:

El *M. tuberculosis* ingresa a la célula huésped mediante un mecanismo denominado “trigger o disparador” que ocurre cuando entra en contacto con la célula, liberando factores de virulencia directamente dentro del citoplasma del hospedero; éstos factores desencadenan cambios morfológicos en la célula huésped que forma una membrana rugosa que internaliza la bacteria en un tipo de endocitosis mediada por receptores.

2.11.2.4) Toxinas:

Las toxinas son proteínas que causan daños concretos al huésped³⁸ y son determinantes de la virulencia responsable de patogenicidad microbiana y/o evasión de la respuesta inmune del hospedador. En el genoma del *M. tuberculosis* se codifican una gran variedad de toxinas que poseen diferentes mecanismos para afectar al hospedero, sin embargo se encuentran en cantidades divergentes de una cepa a otra.

³⁶United State Department of Agriculture (USDA) and Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture (IICA). Disponible: <http://agclass.nal.usda.gov/mtwdk.exe?k=glossary&l=91&w=95&n=1&s=5&t>. Consultado: Agosto, 2009.

³⁷Dalton H. M. y March P. E. (1998) Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. Revista Current Opinion Biotechnology. Volumen 9. Páginas 252-255.

³⁸Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: http://es.wikipedia.org/wiki/Toxinas_microbianas. Consultado Julio, 2009.

2.11.2.5) Resistencia a antibióticos:

El principal problema para la erradicación de la TB, es la capacidad del *M. tuberculosis* para desarrollar resistencia a diversos antibióticos. La gravedad de esto no sólo radica en la utilización de tratamientos prolongados y fármacos más agresivos para el organismo humano, sino también en el tangible desarrollo de cepas *mycobacterianas* resistentes a todo tratamiento establecido.

En la actualidad se han reportado desde cepas denominadas multiresistentes por ser inmunes a la rifampicina e isoniazida, hasta las extensamente resistentes que además de poseer resistencia a los antibióticos antes mencionados, son inmunes a una droga de segunda línea. La rifampicina posee un rol particularmente importante en el régimen de primera línea: es altamente potente y esterilizante, erradicando *mycobacterias* intracelulares y semilantes que pueden causar recurrencias³⁹.

Se debe mencionar que una vez que se genera la información genética de la resistencia, las bacterias pueden transmitir los nuevos genes a través de transferencia horizontal, es decir, entre individuos, por intercambio de plásmidos, así como también por transferencia vertical; algunos ejemplos de los mecanismos de resistencia a antibióticos utilizados por el bacilo tuberculoso son:

Produciendo β -lactamasa: Resultando en la inmunidad a los fármacos que tenga anillos β -lactámicos, como las penicilina y cefalosporinas. Esta enzima, es decir la β -lactamasa, pueden ser codificadas por gen del cromosoma bacteriano o por plásmidos.

Modificando el sitio de unión de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs): Esto se da por diferencias estructurales de estas proteínas, como mayor peso molecular y/o menor afinidad al antimicrobiano.

Sistemas de excreción: El fármaco ingresa por un sitio de unión pero existen sistemas de bombeo que lo expulsan por otro lado, produciendo el egreso del fármaco a través de la membrana externa.

³⁹Dorman S. y Chaisson R. (2007). From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. Revista Nature Medicine. Volumen 13. Number 3.

2.11.2.6) Factores accesorios:

Plásmidos: Son moléculas de ADN extra cromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Su papel fundamental es la transferencia de información genética entre las bacterias en general.

Bacteriófagos o fagos: Otro método de intercambio de información genética es la transducción o transferencia de material genético de una bacteria a otra a través de virus bacterianos o bacteriófagos⁴⁰.

Sistema Restricción-Modificación: Compuesto por endonucleasas o enzimas de restricción que se encargan de cortar el ADN y por metilasas que realizan la metilación del mismo. La metilación en las dos hebras del ADN evita que la enzima de restricción pueda cortar la molécula de ADN. Este mecanismo es empleado por las *mycobacterias* para proteger a su propio ADN genómico y plasmídico del ataque de sus propias enzimas. El *M. tuberculosis* también posee proteínas encargadas de corregir su ADN dañado, entre estas encontramos a las mutasas.

Cambiar su mosaico antigénico: Para evitar ser fagocitados, e incluso para ser resistentes a determinados fármacos, el *M. tuberculosis* ha desarrollado la capacidad de cambiar la composición de su estructura; así encontramos por ejemplo que las *mycobacterias* producen betalactamasas para inhibir la acción de las penicilinas. Estas modificaciones pueden ser transferidas tanto de manera vertical, como de manera horizontal⁴¹.

Islas de patogenicidad: Existen genes de virulencia que se encuentran agrupados en un locus dentro de alguno de los cromosomas del patógeno. La utilidad de estas islas de patogenicidad para las *mycobacterias*, es que estas agrupaciones son transmitidas de bacteria a bacteria o de fagos a bacterias.

⁴⁰ Enciclopedia Encarta. Disponible: http://mx.encarta.msn.com/encyclopedia_761574409_3/Bacteria.html. Consultado: Febrero, 2009.

⁴¹ Pumarola A. (1987) Microbiología y parasitología médica: Masson-Salvat medicina. Segunda Edición. Editorial ElSevier, España. ISBN: 8445800604, 9788445800607.

2.11.3) Alteraciones en el ADN.

El ADN es una macromolécula bicatenaria que está constituida por dos cadenas polinucleotídicas unidas entre sí en toda su longitud. Esta doble cadena puede disponerse en forma lineal, como es el caso del ADN del núcleo de las células eucarióticas, o en forma circular, a modo del ADN de las células procarióticas, así como de las mitocondrias y cloroplastos eucarióticos.

Cabe mencionar que esta molécula no es estática, sino en cambio, es objeto de alteraciones o mutaciones, ya sean inducidas o espontáneas. Las mutaciones inducidas son el resultado de mutágenos químicos o biológicos. Por otro lado, las mutaciones espontáneas se producen de forma natural en las poblaciones bacterianas, esto puede ocurrir por errores en la replicación (Anexo 24), lesiones o daños fortuitos en el ADN y por elementos genéticos transponibles.

Los elementos genéticos transponibles son secuencias de ADN que tienen la propiedad de cambiar de posición dentro del genoma, por tal causa también reciben el nombre de elementos genéticos móviles. En las *mycobacterias* existen transposones simples o elementos de inserción (IS) y transposones compuestos (Tn), que varían entre sí en su tamaño y en su estructura.

Los IS son elementos pequeños, del orden de 1000 pb., o menos, dotadas en sus extremos de terminales inversamente repetidos (IR), de unos 15 a 25 pb. Normalmente sólo poseen un gen, que codifica la transposasa. Por lo tanto, a diferencia de los transposones, no confieren fenotipo seleccionable. En los genomas de muchas bacterias existen varias copias de IS, sin embargo los plásmidos suelen ser más ricos en IS.

Por otro lado los Tn contienen un elemento de inserción (IS) en cada extremo en orden directo o inverso y una región central que además suele contener información de otro tipo, como factores de transferencia de resistencia a antibióticos tales como el cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina, etc⁴². Poseen un mayor tamaño que los IS, desde casi 3.000 pb hasta más de 20.000 pb (Anexos 25 y 26).

⁴² Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Mutaci%C3%B3n>. Consultada: Septiembre, 2009.

Un nuevo tipo de elementos transponibles dotados de terminales inversamente repetidas, y a menudo con genes de resistencia a antibióticos o a metales pesados, son las Integrasas (In), que se transponen como un IS o un Tn, pero además están capacitados evolutivamente para realizar una recombinación específica de sitio por la que han incorporado a su estructura algún gen procedente de otro elemento genético.

Apartado III: Hipótesis

3.1) HIPÓTESIS.

El análisis y caracterización bioinformática del genoma y proteoma de las cepas secuenciadas del *Mycobacterium tuberculosis* permite identificar regiones potenciales específicas para el desarrollo de quimioterapéuticos, vacunas y diagnósticos eficaces.



Apartado IV: Diseño Metodológico

IV) DISEÑO METODOLÓGICO.

4.1) Descripción de las etapas del estudio.

La realización de esta investigación se llevó a cabo en 3 etapas:

Etapa 1: Planteamiento del tema y problema de estudio. Así mismo, se realizó la recopilación bibliográfica, en la cual se estableció la bibliografía básica del estudio y las cepas a analizarse. En esta etapa se establecieron las herramientas bioinformáticas para el análisis correspondiente.

Etapa 2: Selección y caracterización del proteoma y de regiones dentro del genoma implicadas en la virulencia y resistencia del *M. tuberculosis*.

Etapa 3: Análisis de dichas regiones y determinación de las dianas con potencial terapéutico y de diagnóstico.

Cabe mencionar que las cepas estudiadas se encuentran publicadas por el Centro Nacional para Información Biotecnológica o National Center for Biotechnology Information, NCBI; y disponibles al entrar a las siguientes secciones:

Genomes → Genome Project → Prokariotic Genomes → Complete Mycrobial Genome

4.2) Tipo de estudio.

La investigación realizada posee un enfoque cualicuantitativo debido a que se basa en datos cualitativos como lo son las funciones y características de las cepas y proteínas analizadas, así como también datos cuantitativos como la cantidad de proteína entre las cepas, los porcentajes de identidad entre ellas, etc. Es un estudio no experimental y explicativo de corte transversal, ya que se llevó a cabo en un período determinado de tiempo.

4.3) Universo y Muestra.

4.3.1) Universo:

En esta investigación el universo está constituido por los genomas de todas las cepas del *Mycobacterium tuberculosis*.

4.3.2) Muestra:

Los genomas de las cinco cepas del bacilo *Mycobacterium tuberculosis* secuenciadas y publicadas por el Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), es decir las cepas CDC1551, F11, H37Rv, H37Ra y KZN1435.

4.3.3) Criterios de inclusión:

- a) Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* completamente secuenciadas y publicadas por NCBI. Se incluyen también las cepas reanotadas y correspondientemente publicadas por el mismo centro.
- b) Proteínas y familias de proteínas relacionadas con la virulencia, resistencia y reactividad del *M. tuberculosis*.
- c) Familias de proteínas reguladoras de procesos celulares y moleculares del *M. tuberculosis*.
- d) Elementos genéticos transponibles dentro de los genomas de las cinco cepas estudiadas.

4.3.4) Criterios de exclusión:

- a) Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* cuyos genomas se encuentran en proceso de secuenciación.
- b) Proteínas que regulan procesos metabólicos en el *M. tuberculosis*.

4.4) Variables.

4.4.1) Enumeración:

4.4.1.1) Variable independiente:

- a) Genomas de las cinco cepas del *M. tuberculosis*.

4.4.1.2) Variables dependientes:

- a) Proteoma codificado en el genoma de las cinco cepas del *M. tuberculosis*.
- b) Elementos genéticos transponibles.

c) Regiones para el desarrollo de nuevos diagnósticos, quimioterapéuticos y vacunas.

4.4.2) Operacionalización:

Variable	Definición	Indicadores	Escala	Unidad de medida
Genomas de las cinco cepas.	Material genético contenido en las cinco cepas del <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Cepa CDC1551, F11, H37Rv, H37Ra y KZN1435.	4.398.250 nt - 4.424.435 nt	Nucleótidos (nt).
Proteoma codificado en el genoma de las cinco cepas <i>mycobacterianas</i> .	Es la totalidad de proteínas codificadas en el genoma del <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y que son expresadas en un momento en particular bajo condiciones de medio ambiente y/o etapas de desarrollo específicas.	Similitud en funciones y estructuras tridimensionales.	Longitud.	Pares de bases (pb).
Elementos genéticos transponibles.	Secuencias genéticas móviles capaces de insertarse a lo largo del genoma <i>mycobacteriano</i> .	Estructura.	Longitud	Pares de bases (pb).
Regiones para el desarrollo de nuevos diagnósticos, quimioterápicos y vacunas.	Grupo de proteínas relacionadas evolutivamente con función bioquímica y estructura tridimensional similar codificadas en el genoma del <i>M. tuberculosis</i> .	Análisis de sus dominios, presencia en todas las cepas, constituyentes de la pared celular, especificidad.	Adecuado. Inadecuado.	% de identidad.

4.5) Materiales y métodos:

La información analizada en el presente estudio fue obtenida tanto de fuentes primarias que van desde libros de microbiología hasta libros de bioinformática, así como revistas, artículos y monografías. De igual manera se utilizaron la información derivada de las fuentes secundarias como los análisis de ciertos artículo científicos para evaluar la veracidad aplicable de las conclusiones obtenidos en los mismos.

Las principales bases datos de la que obtuvimos la información requerida para el análisis son:

NCBI: Principal base de datos que almacena y ofrece múltiples herramientas bioinformática y la fuente principal de información del presente estudio

Entrez: Sistema de búsqueda que facilita acceder a la base de datos de NCBI.

PubMed: Facilitó literatura biomédica de MEDLINE, revistas y los libros en línea referente a temas afines.

PubChem: Brindó datos sobre las estructuras y bioactividad de las moléculas que interactúan con las proteínas y sus dominios.

Pfam: Base de datos que proporcionó información de las familias de proteínas, sus dominios y estructuras.

InterPro: Base de datos que clasificó a las proteínas en superfamilia, familias o subfamilias de proteínas, así como su función y presencia en las diferentes cepas.

UNIPRO: Catálogo de las proteínas que ofreció datos de los procesos biológicos, función molecular, localización de los polipéptidos al ser expresadas, entre otros.

TUBERCULOSIS DATA BASE y TUBERCULIST: Información genética específica y de primera mano del *Mycobacterium tuberculosis*, aunque en el caso de TUBERCULIST se encuentra enfocada a la cepa H37Rv.

GENE ONTOLOGY y AmiGO: Agrupa la información de las proteínas tuberculosas en función de sus homologías.

4.5.1) Materiales para recolectar la información:

Para la recolección de información proveniente de las diferentes fuentes bibliográficas se utilizaron fichas bibliográficas, fichas de citas textuales y fichas de resumen.

4.5.2) Materiales para procesar la información:

Para la obtención y procesamiento de la información se utilizaron múltiples herramientas, y las clasificamos según su origen:

Structure: Suministró una visión clara de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas, así como una breve información acerca de sus mecanismos y funciones. Esta herramienta depende de Cn3D.

Cn3D: Software bioinformático vital para la utilización de Structure permitiendo la visualización de las estructuras de las proteínas en 3D contribuyendo a la identificación de analogías entre ellas, lo que representa funciones similares, además detectó los puntos de interacción de una proteína y sus ligandos.

Conserved Domains: Contribuyó con la determinación de los dominios conservados dentro de las cepas del *Mycobacterium tuberculosis*.

Related Domains: Proporcionó la relación de los dominios presentes en el género *mycobacteriano* con otros para determinar su conservación durante la evolución.

Related Structure: Relacionó las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas codificadas en los genomas de las cepas analizadas.

BLAST: Herramienta con la que se alineó y comparó a las familias de proteínas y proteínas virulentas de los bacilos tuberculosos.

FASTA: Realización de alineaciones de pequeñas regiones de los genomas blancos.

COBALT: Comparación de proteínas.

Protein Cluster y COGs: Proporcionan información sobre las funciones de las proteínas *mycobacterianas* basándose en los grupos en los que ubican.

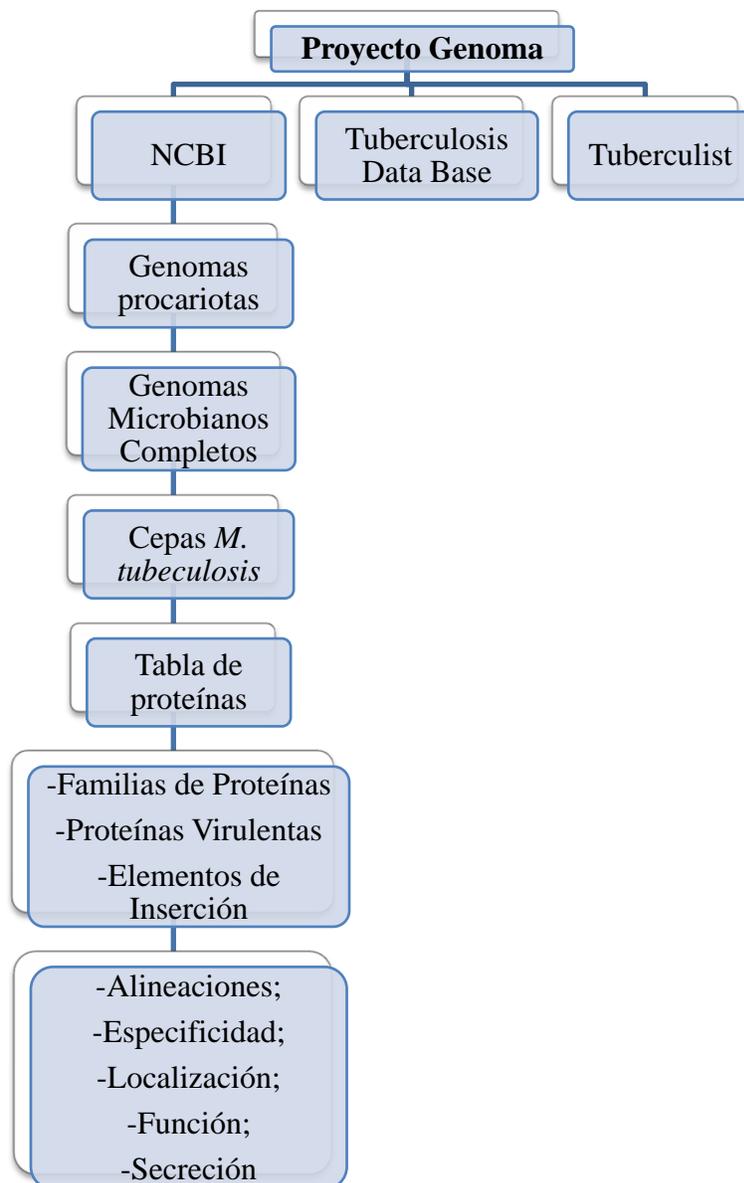
MapView: Permitió localizar dentro del cromosoma circular del *M. tuberculosis* un gen específico y posteriormente obtener su secuencia.

3D Joining Neighbor: Herramienta que permitió la construcción del árbol filogenético del *M.tuberculosis* a partir de sus cinco cepas.

4.5.3) Métodos:

En la ejecución de esta investigación se realizó un análisis cuali y cuantitativo de los datos obtenidos, así como también la síntesis de los elementos esenciales examinados y las revisiones bibliográficas correspondientes.

4.5.4) Algoritmo de búsqueda:



El análisis bioinformático del genoma y proteoma de las cepas del *M. tuberculosis* se fundamenta en la información obtenida en las bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI), y de manera complementaria en las bases de datos específicas para el bacilo tuberculoso: TUBERCULIST y TUBERCULOSIS DATA BASE.

NCBI presenta en la sección Proyecto Genoma, los genomas de diversos organismos, incluidos los procariontes que están recopilados en la unidad genomas procariontes, que engloba los genomas microbianos completamente secuenciados, aquí se incluyen las cinco cepas analizadas y sus tablas de proteínas, que contienen la lista de las proteínas codificadas en el genoma de cada cepa del *M. tuberculosis*, de ésta se seleccionaron las familias de proteínas, proteínas virulentas y elementos de inserción.

En esta misma ubicación se pueden encontrar las diferentes herramientas disponibles para el análisis bioinformático, entre ellos: BLAST y COBALT, mediante el cual se realizaron alineaciones para determinar su identidad; Cluster y COG facilitaron la identificación de la especificidad de las proteínas; Pfam, InterPro, UNIPRO y Conserved Domains brindaron información de las funciones moleculares, así como la localización y momento de secreción.



Apartado V: Análisis y Discusión de **Resultados**

V) ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Para el análisis bioinformático genómico de las cepas *mycobacterianas* secuenciadas y disponibles CDC1551, F11, H37Ra, H37Rv y KZN1435 se identificaron, caracterizaron y cuantificaron a las familias de proteínas, las proteínas determinantes de la virulencia de cada cepa y finalmente, los elementos genéticos transponibles, con el fin de identificar posibles regiones de diagnósticos y objetivos quimioterapéuticos.

Las cinco cepas del *Mycobacterium tuberculosis* poseen un cromosoma circular con longitud muy similar, donde el 90% del genoma codifica para proteínas, lo que establece una relación 1:1 entre el número de genes y las proteínas expresadas. Esta alta capacidad codificante es un aspecto característico de los organismos procariotas que los diferencia de otras especies donde sólo una pequeña fracción del genoma codifica proteínas, como el caso del genoma humano, en donde sólo alrededor del 1.5% consiste en exones.

Así mismo encontramos que los genomas *mycobacterinas* son muy semejantes en el número de genes codificantes para ARNs aunque difiere notoriamente en su porcentaje codificante para pseudogenes, que son genes sin ninguna función aparente, sin embargo se mantienen a lo largo de la evolución. Todo esto se encuentra ilustrado en la tabla 5.1 de las características generales de los genomas actualmente disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Tabla 5.1: Características de los genomas de las cepas *mycobacterianas* secuenciadas y publicadas.

Organismo	Longitud (nt)	Topología	% Codificante	N° de genes	Codificantes para proteínas	Codificantes para ARNs estructurales	Codificantes para Pseudogenes	Otros
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	4.403.837	Circular	90	4.293	4.189	48	56	2
<i>M. tuberculosis</i> F11	4.424.435	Circular	90	3.998	3.941	48	9	9
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	4.419.977	Circular	90	4.084	4.034	50	Ninguno	Ninguno
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	4.411.532	Circular	90	4.048	3.989	50	8	1.467
<i>M. tuberculosis</i> KZN1435	4.398.250	Circular	91	4.107	4.059	48	Ninguno	7

Fuente: Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI). Elaborado por: Equipo de investigadoras.

Para la selección de las proteínas con potencial para el desarrollo de métodos de diagnósticos y/o tratamientos se tomaron en cuenta parámetros como la especificidad de la secuencia, es decir la presencia de estas regiones en todas las cepas analizadas, en el Complejo del *Mycobacterium Tuberculosis* (CMT) y o en otras especies, donde la mejor opción serán aquellas presentes en todas las cepas *mycobacterianas* y exclusivas para el CMT.

Otro factor es el porcentaje de identidad, de importancia fundamental ya que para el desarrollo de terapéutico o diagnósticos, la secuencia blanco debe ser igual en todas las cepas que pretendan ser inhibidas y/o determinadas; cabe mencionar que este factor es establecido mediante las alineaciones realizadas en BLAST y/o COBALT.

Un factor determinante de la viabilidad de una proteína es su localización al ser expresada, ya que resulta un blanco más apropiado una secuencia que se encuentra en la pared celular que una que se localiza en el núcleo. Igual de importante es el momento de expresión, ya que una proteína tempranamente expresada tiene mayor potencial como un posible diagnóstico que otra que lo haga en estadio finales de la TB.

Otros parámetros son el conocimiento de sus dominios, lo cual determina el proceso virulento que median, o la etapa del proceso patológico en la que una proteína específica interviene; y la capacidad de la proteína de ser aislada directamente de un cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* es decir si esta es secretada a su medio de cultivo.

Para la determinación de las proteínas con mayor potencial le adjudicamos categoría a cada uno de estos parámetros, lo cual se encuentra claramente determinado en la tabla 5.2 de parámetros de selección de las secuencias con mayor potencial para el desarrollo de diagnóstico y/o métodos de diagnóstico para la tuberculosis según el análisis bioinformático de las cinco cepas secuenciadas.

Tabla 5.2: Parámetros de selección de las familias de proteínas con mayor potencial para el desarrollo de drogas y/o métodos de diagnóstico para la tuberculosis (TB).

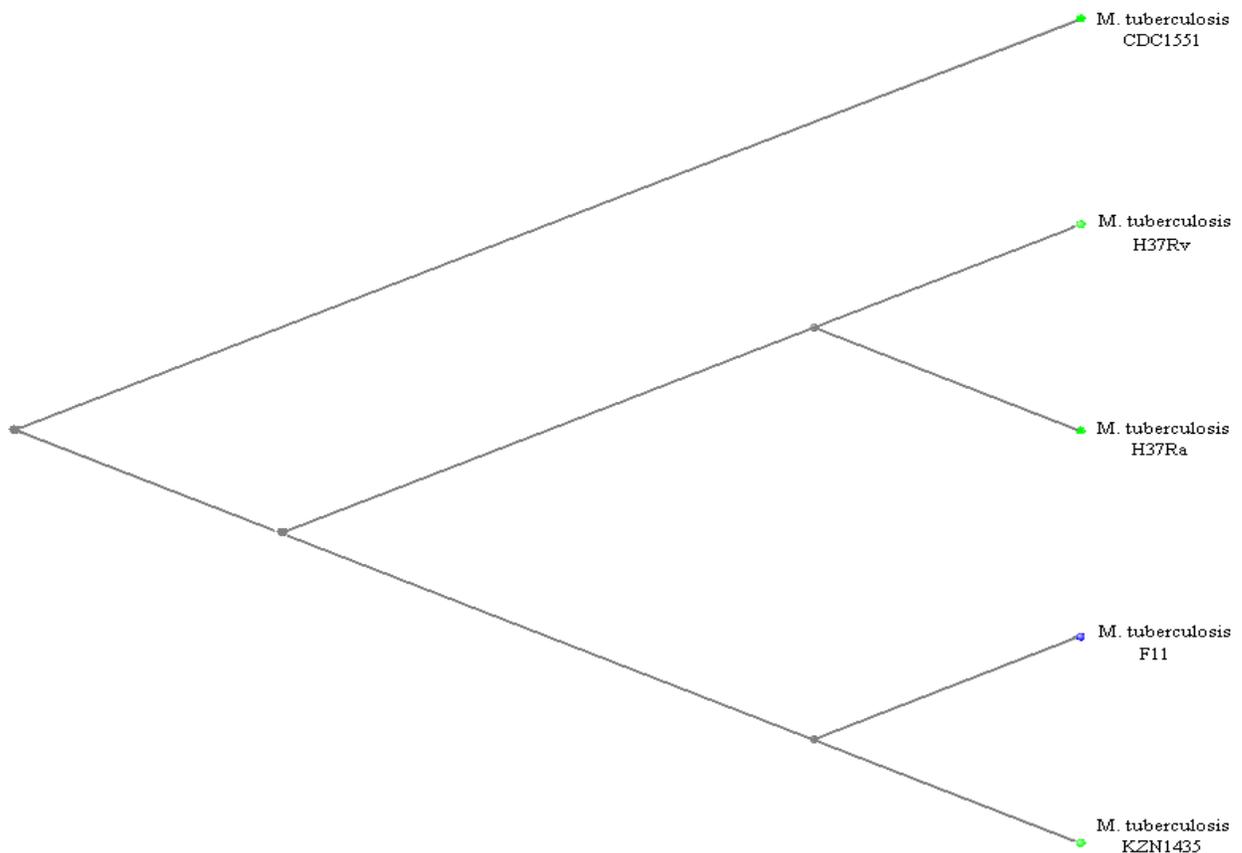
Parámetro	Muy bueno (+++)	Bueno (++)	Deficiente (-)
Especificidad	Presente en todas las cepas del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Presente en el Complejo del <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> (CMT) y/o otras especies	Ausente en una cepa <i>mycobacteriana</i> y/o en varias especies
Porcentaje de identidad	100%	>90%	<90%
Localización	Pared y/o membrana celular	Citoplasma	Otros
Momento	Durante la infección y/o protección	-	Durante los procesos celulares
Conocimiento de dominios	Función y estructura	Función o estructura	Ninguno
Secreción	Secretada y/o puede ser aislada de cultivo	-	No es secretada

Fuente: National Center for Biotechnology Information. Elaborado por: Equipo de investigadoras.

Igualmente peculiar y asociada a la capacidad codificante de las cepas *mycobacterianas* encontramos a su %GC, que en todas es mayor al 60% ya que las regiones codificantes poseen un alto contenido de Guanina-Citosina, caracterizadas por contar con un enlace más fuerte y resistente a la temperatura que las regiones con alto contenido Adenina-Timina. Estas cepas poseen además una gran similitud en la longitud de sus genomas, de aproximadamente 4.4 Mpb.

Un aspecto de gran relevancia evolutiva es la presencia de pseudogenes y otros ADN no codificantes, que proceden de la duplicación de pequeñas regiones del ADN, ya que el rastreo de estas secuencias repetitivas permite estudios sobre el linaje del bacilo tuberculoso (Gráfico 5.1). Cabe mencionar que no todas las cepas contienen estos elementos genéticos, y los que las presentan poseen cantidades diferentes, esto da una idea de la divergencia genética de las cepas y sus cambios evolutivos.

Gráfico 5.1: Árbol filogenético de las cepas *mycobacterianas* analizadas elaborado mediante BLAST basándose en sus divergencias genéticas.



Fuente: National Center for Biotechnology Information. Elaborado por: Equipo de investigadoras.

5.1) FAMILIAS DE PROTEÍNAS DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Es de nuestro conocimiento que el genoma del *Mycobacterium tuberculosis* posee un alto contenido de genes que codifican para proteínas (mayor del 90%), gran parte de éstas se encuentran agrupadas en familias de proteínas, jugando un papel significativo en el metabolismo celular, así como en la adaptación y sobrevivencia de la bacteria en el huésped. Las familias de proteínas poseen diferentes funciones y tamaños, en este estudio las clasificamos según la arquitectura de dominio común que posee cada una.

De esta manera, encontramos que todas las cepas secuenciadas del bacilo contienen diferentes familias de proteínas en distintas cantidades, variando por tanto en el total de miembros de familias en cada una, como se muestra en la tabla 5.3, en la que se logra apreciar las familias de proteínas que tienen en común las cinco cepas del *Mycobacterium tuberculosis*, siendo este aspecto de suma importancia para el estudio de la evolución y caracterización del *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabla 5.3: Distribución y total de las familias de proteínas en las cepas analizadas del *Mycobacterium tuberculosis*.

Familia de proteína	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Familia AAA ATPasa	2		1		
Familia AsnC reguladora transcripcional nadR					1
Familia ATPasa transportadores de cationes E1-E2.	11				
Familia de proteína NadC/P/Pho87	2				
Familia de proteína UDP-glucuronosil y UDP-glucosiltransferasa	1		2		
Familia de proteínas 2-hidroxiácido dehidrogenasa	1				
Familia de proteína 13E12				4	6
Familia de proteína 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenase			1		
Familia de proteína 5 unión a soluto	1				
Familia de proteína aciltransferasa	6				
Familia de proteína AhpC/TSA	1		1		
Familia de proteína aldehído dehidrogenasa	2				

Familia de proteína	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Familia de proteína alfa-amilasa	3				
Familia de proteína amidasa	1				
Familia de proteína carboxilesterasa	3				
Familia de proteína cbxX/cfqX			1		1
Familia de proteína chalcone/estilbeno sintasa	3				
Familia de proteína citidina y deoxicitidilata deaminasa	1		1		
Familia de proteína citocromo c	1		1		
Familia de proteína citocromo c assembly	1				
Familia de proteína CRISP asociada a rampa csm3					1
Familia de proteína CRISP asociada a rampa csm4					1
Familia de proteína CRISP asociada a rampa csm5					1
Familia de proteína de anclaje a la superficie de la pared celular,					1
Familia de proteína DedA	1		1		
Familia de proteína enoil-CoA hidratasa/isomerasa	1		1		
Familia de proteína factor elongación fijadora-GTP	1		1		
Familia de proteína fago integrasa	1		1		
Familia de proteína ferritina	1		1		
Familia de proteína fosfoglicerato mutasa	2				
Familia de proteína fosfoglucomutasa/fosfomanomutasa	1				
Familia de proteína FtsK/SpoIIIE	5		1		1
Familia de proteína GAF	2				
Familia de proteína glicogén fosforilasa	1		1		
Familia de proteína GTP1/obg, proteína obg fijadora GTP					1
Familia de proteína HesA/MoeB/ThiF	1				
Familia de proteína hexapéptido transferasa	1		1		
Familia de proteína HIT	2	1	1		

Familia de proteína	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Familia de proteína inositol monofosfatasa	4				
Familia de proteína ligasa mur	1				
Familia de proteína MaoC	2				
Familia de proteína MCE-mce1A		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce1B		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce1C		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce1D		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce1E					1
Familia de proteína MCE-mce1F		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce2A		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce2B		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce2C		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce2D		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce2E					1
Familia de proteína MCE-mce2F		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce3A		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce3B		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce3C		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce3D		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce3E					1
Familia de proteína MCE-mce3F		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce4A		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce4B		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce4C		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce4D		1	1	1	1
Familia de proteína MCE-mce4E					1
Familia de proteína MCE-mce4F		1	1	1	1
Familia de proteína MmpL membrana	12	1			
Familia de proteína MmpS membrana	1				
Familia de proteína moaA/nifB/pqqE	2				
Familia de proteína MoaC	1				
Familia de proteína monooxigenasa vinculante a flavina	6				
Familia de proteína MttB	1				
familia de proteína MutT/Nudix	5		1		
Familia de proteína nitroreductasa	1				
Familia de proteína NLP/P60	4		1		

Familia de proteína	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Familia de proteína OPT	1				
Familia de proteína ParB	1				
Familia de proteína PE	38	32	33	35	34
Familia de proteína PE-PGRS	49	68	63	61	56
Familia de proteína phthalate permeasa	1		1		
Familia de proteína PPE	61	68	72	69	66
Familia de proteína prolina dehidrogenasa	1		1		
Familia de proteína Rieske 2Fe-2S	1		1		
Familia de proteína romboidal	2		1		
Familia de proteína S30AE	1		1		
Familia de proteína ScpA/B					1
Familia de proteína Soj	3				
Familia de proteína SpoIIAA	1				
Familia de proteína spoU rRNA metilasa	4				
Familia de proteína Sua5/YciO/YrdC/YwIC					1
Familia de proteína sulfatasa	3				
Familia de proteína supuesta MCE		1	1	1	1
Familia de proteína transglutaminasa	1		1		
Familia de proteína transportador de azúcar	7				
Familia de proteína transportadora CorA	1		1		
Familia de proteína vinculante de AMP	2				
Familia de proteínas 3-beta hidroxisteroide dehidrogenasa/isomerasa	1		1		
Familia de proteínas 3-hidroxiisobutirato dehidrogenasa	1				
Familia de proteínas cisteína sintasa/cistationina beta-sintasa	2		2		
Familia de proteínas del factor de virulencia MCE	21				
Familia de proteínas epimerasa/dehidratasa dependiente NAD	3		3		

Familia de Proteína	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Familia de proteínas FMN-dependiente alfa-hidroxiácido dehidrogenasa	1		1		
Familia de proteínas glicosidasa	1				
Familia de proteínas hidrolasa carbón-nitrógeno	1		1		
Familia de proteínas Hly-III	1				
Familia de proteínas HSP20	1				
Familia de proteínas MmgE/PrpD	1		1		
Familia de proteínas NifR3/SMM1	1		1		
Familia de proteínas OmpA	1				
Familia de proteínas prolil oligopeptidasa	1		1		
Familia de proteínas que contienen dominio SPFH / Banda 7.	1				
Familia de proteínas SerB	1				
Familia de proteínas subtilasa	2				
Familia DeaD/DeaH, ARN delicada dependiente de ATP			1		
Familia decarboxilasa Orn/Lys/Arg	1		1		
Familia dehidrogenasa/reductasa de cadena corta óxido-reductasa	13				
Familia disulfido-nucleótido piridina, oxidoreductase	1				
Familia GMC óxido-reductasa	3				
Familia Ham1					1
Familia helicasa Snf2/Rad54	1				
Familia helicasa UvrD/Rep	2		2		
Familia hidrolasa alfa/beta pliegue	14		1		
Familia hidrolasa Ama/HipO/HyuC	2				
Familia lipoproteína MCE-LprK		1	1	1	
Familia lipoproteína MCE-LprL		1	1	1	
Familia lipoproteína MCE-LprM		1	1	1	
Familia lipoproteína MCE-LprN		1	1	1	
Familia LuxR regulador de dos componentes de la transcripción		1			1
Familia LuxR respuesta regulador fijador de AND	2				

Familia de proteína	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Familia metiltransferasa UbiE/COQ5	1				
Familia MRP proteína vinculante ATP				1	
Familia óxido-reductasa aldo/keto reductasa.	1				
Familia peptidasa M24/M37	1				
Familia peptidasa M13 endopeptidasa	1				
Familia peptidasa M16	1				
Familia PhzF, biosíntesis de proteína fenazina	1				
Familia reguladora transcripcional ArsR	10	6		6	6
Familia reguladora transcripcional Ada	1				
Familia reguladora transcripcional AsnC	2	4		3	3
Familia reguladora transcripcional CopG	1				
Familia reguladora transcripcional CopG vinculante a AND	11				
Familia reguladora transcripcional Cpr/FNR					
Familia reguladora transcripcional Crp	1		2		
Familia reguladora transcripcional GntR	5	6	6	6	6
Familia reguladora transcripcional IclR	2		2		
Familia reguladora transcripcional LacI	1	1		1	1
Familia reguladora transcripcional LuxR	6	5	6	3	3
Familia reguladora transcripcional LuxR/UHPA				1	1
Familia reguladora transcripcional LysR	6	2	2	2	
Familia reguladora transcripcional MarR	6	3	6	2	2
Familia reguladora transcripcional MerR	1	1	1	1	1
Familia reguladora transcripcional PbsX	1		1		

Familia de proteína	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Familia reguladora transcripcional TetR	39	22	20	21	21
Familia reguladora transcripcional TetR/AcrR	1	4	6	4	4
Familia reguladora transcripcional AraC	5	2	3	1	1
Familia reguladora transcripcional AraC/XylS				1	2
Familia reguladora transcripcional AraC/XylS regulación de virulencia virS					1
Familia reguladora transcripcional Crp/FNR	2	1	2	1	1
Familia reguladora transcripcional DeoR		1	1	1	
Familia reguladora transcripcional Lrp/Asn		1			
Familia reguladora transcripcional LRP/AsnC				1	1
Familia tetR represor transcripcional mce3R					1
Familia transcripcional AfsR/DnrI/RedD	3				
Familia transportadora BccT	1				
Familia transportadora de níquel HoxN/HupN/NixA.	1		1		
Familia-tetR represor transcripcional ethR					1
Subfamilia ECF factor sigma ARN polimerasa	1				
Superfamilia de proteína PAP2	2				
Superfamilia de proteína HAD	4		2		1
Superfamilia de proteína metalo-beta-lactamasa	5				
Superfamilia de proteínas fumarilacetoacetato hidrolasa familia/metallo-beta-lactamasa	1		1		
Total	483	255	297	250	256

Fuente: National Center for Biotechnology Information (NCBI). Elaborado por: Equipo de Investigadoras.

Para una mayor comprensión y estudios, las proteínas presentes en cada cepa del bacilo tuberculoso las hemos agrupado de acuerdo a las funciones principales que realizan, como la virulencia del bacilo al huésped, la regulación de la transcripción del ADN y otros procesos metabólicos de gran importancia, tal como lo indica la tabla 5.4, donde el mayor número de las familias de proteínas llevan a cabo principalmente los procesos virulentos de las cepas F11, H37Ra, H37Rv y KZN1435.

Tabla 5.4: Agrupación de familias de proteínas según se actividad metabólica.

Actividad metabólica.	Número de Familias de Proteínas en las cepas del <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .				
	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Familias de proteínas virulentas	169	193	193	190	181
Familias reguladoras de transcripción	93	60	57	55	58
Familias reguladoras de otras funciones	221	2	47	5	17
TOTAL	483	255	297	250	256

Fuente: Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI). Elaborado por: Equipo de investigadoras.

Las funciones que realizan las familias de proteínas esta dada por los dominios conservados en su estructura, son estos los que permiten agrupar a las proteínas en superfamilias, familias o subfamilias de proteínas. Las herramientas como PFAM, INTERPRO, UNIPRO, nos proporcionan información acerca de los procesos biológicos y función molecular de todas las familias de proteínas del *M. tuberculosis*, así como la localización de estos polipéptidos al ser expresados. Estos resultados se reflejan en la siguiente matriz de síntesis (Tabla 5.5).

Tabla 5.5: Actividad metabólica de las familias de proteínas del *Mycobacterium tuberculosis*.

Familia de proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia de proteína 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa	Proceso metabólico de ácido graso. Oxidación–reducción.	Unión a coenzima. Actividad dehidrogenasa de 3-hidroxiacil-CoA.
Familia de proteína aciltransferasa	Procesos metabólicos como la biosíntesis de fosfolípidos.	Actividad aciltransferasa.
Familia de proteína AhpC/TSA	Homeostasis celular redox. Oxidación-reducción.	Actividad peroxiredoxin.
Familia de proteína aldehído dehidrogenasa	Oxidación-reducción.	Actividad óxido-reductasa.
Familia de proteína alfa-amilasa	Proceso metabólico de carbohidrato.	Unión a catión. Actividad isomerasa.
Familia de proteína amidasa	–	Actividad amidasa. Actividad carbono-ligasa de nitrógeno, con glutamina como amido-N-donante.
Familia de proteína vinculante de AMP	Procesos metabólicos.	Actividad ligasa.
Familia reguladora transcripcional ArsR	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	Actividad de factor de transcripción.
Familia de proteína carboxilesterasa	Procesos metabólicos.	Actividad hidrolasa.

Familia de Proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia de proteína de anclaje a la superficie de la pared celular	No definido.	No definido.
Familia de proteína sintasa chalcona/estilbeno	Procesos biosintéticos.	Actividad acetiltransferasa. Actividad sintasa naringenina-chalcona.
Familia de proteína citocromo c ensamblaje	Complejo Respiratorio de la cadena de montaje IV.	–
Familia de proteína citocromo c	Cadena transportadora de electrón.	Unión heme. Actividad transportadora de electrones.
Familia de proteína DedA	Captación de selenita.	–
Familia de proteína enoil-CoA hidratasa/isomerasa	Procesos metabólicos.	Actividad isomerasa.
Familia de proteínas 2-hidroxiácido dehidrogenasa	Oxidación-reducción.	Vinculante a NAD o NADH. Actividad fosfoglicerato dehidrogenasa.
Familia de proteína cbxX/cfqX	–	Unión a ATP. Actividad nucleótido trifosfatasa.
Familia de proteína FtsK/SpoIIIE	División celular. Segregación de cromosoma.	Unión a ATP. Unión a ADN. Actividad nucleósido trifosfato.
Familia de proteína HIT		Actividad catalítica.
Familia de proteína MCE	Invasión y supervivencia del bacilo al huésped.	–

Familia de proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia de proteína PE	Invasión al macrófago.	–
Familia de proteína PE-PGRS	Invasión al macrófago.	–
Familia de proteína PPE	Invasión al macrófago.	–
Familia de proteína ScpA/B	Segregación del cromosoma.	–
Familia de proteínas 3-beta hidroxisteroide dehidrogenas/isomerasa	Oxidación-reducción. Proceso de biosíntesis de esteroides.	Actividad 3-beta-hidroxi-delta5 deshidrogenasa de esteroides. Actividad isomerasa.
Familia de proteínas 3-hidroxiisobutirato dehidrogenasa	Oxidación-reducción. Derivación pentosa fosfato (oxidación de glucosa). Proceso metabólico de la valina.	Actividad 3-deshidrogenasa hidroxiisobutirato. Unión a coenzima. Actividad fosfogluconato deshidrogenasa (descarboxilante).
Familia de proteínas hidrolasa carbón-nitrógeno	Proceso metabólico de compuestos nitrogenados.	Actividad hidrolasa, que actúa en los enlaces carbono-nitrógeno (pero no péptido).
Familia de proteínas cisteina sintasa/cistationina beta-sintasa	Procesos metabólicos.	Actividad catalítica. Unión a fosfato piridoxal.
Familia de proteínas FMN-dependiente alfa-hidroxiácido dehidrogenasa	Proceso metabólicos.	Vinculante a FMN. Actividad óxido-reductasa.
Familia de proteínas Hly-III	Citólisis.	–
Familia de proteínas HSP20	Respuesta al estrés.	–

Familia de proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia de proteínas epimerasa/dehidratasa dependiente NAD	Proceso metabólico celular.	Actividad catalítica. Unión a coenzima.
Familia de proteínas NifR3/SMM1	Oxidación-reducción. Procesamiento de ARNt.	Vinculante a FAD. Actividad ARNt sintasa dihidouridina.
Familia de proteínas OmpA	–	Actividad fosfolipídica.
Familia de proteínas prolil oligopeptidasa	Proteólisis.	Actividad serina-endopeptidasa.
Familia de proteínas SerB	Procesos metabólicos.	Actividad fosfatasa.
Familia de proteínas subtilasa	Proteólisis.	Actividad serina tipo endopeptidasa.
Familia Ham1	–	Actividad hidrolasa.
Familia reguladora transcripcional AsnC	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	Actividad de factor de transcripción. Secuencia específica de unión de ADN.
Familia reguladora transcripcional GntR	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	Actividad de factor de transcripción.

Familia de proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia reguladora transcripcional LuxR/UHPA	<p>Regulación de la transcripción dependiente de ADN.</p> <p>Sistema de dos componentes de transducción de señal (fosforilación).</p> <p>Señalización de cascada intracelular.</p> <p>Respuesta de defensa. Proceso de biosíntesis de los nucleótidos cíclicos.</p>	-
Familia reguladora transcripcional MarR	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	Actividad de factor de transcripción.
Familia reguladora transcripcional MerR	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	<p>Unión a un nucleótido.</p> <p>Actividad factor de transcripción.</p>
Familia reguladora transcripcional TetR	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	Actividad de factor de transcripción.
Familia reguladora transcripcional AraC	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	<p>Actividad de factor de transcripción.</p> <p>Secuencia específica de unión de ADN.</p>
Familia reguladora transcripcional AraC/XylS	Regulación de transcripción dependiente de ADN.	<p>Actividad de factor de transcripción.</p> <p>Secuencia específica de unión de ADN.</p>
Familia reguladora transcripcional Crp/FNR	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	Actividad de factor de transcripción.
Familia reguladora transcripcional DeoR	Regulador de la transcripción.	Actividad de factor de transcripción.
Familia reguladora transcripcional LRP/AsnC	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	<p>Actividad de factor de transcripción.</p> <p>Secuencia específica de unión de ADN.</p>
Familia de proteína ferritina	<p>Homeostasis celular de iones hierro.</p> <p>Transporte de iones hierro.</p>	<p>Unión a iones hierro.</p> <p>Actividad óxido-reductasa.</p>

Familia de Proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia de proteína GAF	Sistema de dos componentes de transducción de señal (fosforilación).	Unión a ATP. Actividad dimerización de proteína. Actividad sensor de dos componentes.
Familia de proteína factor elongación vinculante-GTP	–	Unión GTP. Actividad GTPasa. Actividad factor translación elongación.
Familia de proteína HesA/MoeB/ThiF	Proceso metabólico.	Actividad catalítica.
Familia de proteína hexapeptido transferasa	–	Actividad transferasa.
Familia de proteína inositol monofosfatasa	Proceso metabólico de carbohidratos.	Actividad fosfatasa inositol o fosfatidilinositol.
Familia reguladora transcripcional LacI	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	Actividad de factor de transcripción.
Familia reguladora transcripcional LuxR	Regulación de la transcripción dependiente de ADN. Sistema de dos componentes de transducción de señal (Fosforilación).	Actividad de factor de transcripción. Respuesta de dos componentes regulador de la actividad. Unión al ADN.
Familia LuxR regulador de dos componentes de la transcripción	Regulación de la transcripción dependiente de ADN. Sistema de dos componentes de transducción de señal (Fosforilación).	Actividad de factor de transcripción. Respuesta de dos componentes regulador de la actividad. Secuencia específica de unión de ADN.

Familia de proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia reguladora transcripcional LysR	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	Actividad de factor de transcripción.
Familia de proteína MoaC	Procesos metabólicos.	Actividad óxido-reductasa.
Superfamilia de proteína metalo-beta-lactamasa	–	Actividad hidrolasa hidroxiacilglutaciona.
Familia de proteína MmpL membrana	Transporte y secreción de lípidos.	Actividad de transporte de diversos cationes y aniones.
Familia de proteína MmpS membrana	Transporte de lípidos.	–
Familia de proteína moaA/nifB/pqqE	–	Actividad catalítica. Cluster de unión de hierro-sulfuro.
Familia de proteína monooxigenasa vinculante a flavina	Actividad monooxigenasa. Actividad de transporte de electrones.	Proceso de biosíntesis de tiamina.
Familia MRP proteína vinculante ATP	–	Unión a ATP.
Familia de proteína MttB.	Transporte de proteína. Transporte transmembrana.	–
Familia de proteína ligasa mur	Proceso biosintético.	Unión a ATP. Actividad ligasa.
Familia de proteína MutT/Nudix	–	Actividad hidrolasa.
Familia de proteína NadC/P/Pho87	Transporte de citrato.	Actividad transporte transmembrana de citrato y arsenito.
Familia de proteína nitroreductasa	Oxidación-reducción.	Actividad óxido-reductasa.
Familia de proteína NLP/P60	–	Función desconocida.

Familia de proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia de proteína OPT	–	Transporte de oligopéptidos.
Superfamilia de proteína PAP2	–	Actividad Catalítica en la desfosforilación de fosfatidato.
Familia de proteína ParB	Segregación del cromosoma.	Unión a ADN.
Familia de proteína fago integrasa	Integración de ADN. Recombinación de ADN	Unión a ADN.
Familia de proteína fosfoglucomutasa/fosfomanomutasa	Proceso metabólico de carbohidrato.	Unión de ión magnesio. Actividad mutasa fosfoglucosamina.
Familia de proteína fosfoglicerato mutasa	Procesos metabólicos.	Actividad fosfoglicerato mutasa. Isomerasa.
Familia de proteína phthalate permeasa	–	Actividad transporte de moléculas.
Familia de proteína prolina dehidrogenasa	Proceso biosintético glutamato. Oxidación reducción. Proceso catabólico de prolina.	Actividad dehidrogenasa de prolina.
Familia de proteína romboidal	–	Actividad catalítica.
Familia de proteína Rieske 2Fe-2S	Proceso celular metabólico de compuestos aromáticos. Oxidación-reducción.	Vinculación de 2Fe-2S. Actividad transporte de electrones. Unión a iones hierro. Actividad óxido-reductasa.
Familia de proteína S30AE	Proceso metabólico primario.	Vinculación.

Familia de proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia de proteína Soj	Proceso biosintético de la cobalamina.	Actividad sintasa ácido cobirínicoa, diamida.
Familia de proteínas 7 banda/contenedora de dominio SPFH	No definido.	No definido.
Familia de proteína SpoIIAA	Regulación de la transcripción de ADN.	Unión a factor antisigma.
Familia de proteína spoU ARNr metilasa	Procesamiento de ARN.	Unión a ARN. Actividad metiltransferasa ARN
Familia de proteína transportador de azúcar	Transporte de carbohidratos.	Función molecular de azúcar.
Familia de proteína sulfatasa	Proceso metabólico.	Actividad hidrolasa éster sulfúrico.
Superfamilia de proteínas fumarilacetoacetato hidrolasafamilia metalo beta lactamasa	Proceso metabólico.	Actividad hidrolasa. Actividad isomerasa
Familia reguladora transcripcional TetR/AcrR	Regulación negativa de transcripción. Regulación de transcripción dependiente de ADN.	Actividad factor de transcripción. Actividad represora transcripcional específica.
Familia de proteína transglutaminasa	Procesos metabólicos.	–
Familia de proteína UDP-glucoronosil y UDP-glucosiltransferasa	Procesos metabólicos de carbohidratos. Glicolisación de lípidos.	Unión a carbohidrato. Actividad transferasa de grupos de la transferencia de hexosil.
Superfamilia de proteína HAD	Procesos metabólicos.	Actividad hidrolasa.
Familia de proteína CRISP asociada a rampa csm3	Procesos metabólicos.	Actividad hidrolasa.

Familia de proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia de proteína CRISP asociada a rampa csm4	Procesos metabólicos.	Actividad hidrolasa.
Familia de proteína CRISP asociada a rampa csm5	Procesos metabólicos.	Actividad hidrolasa.
Familia GTP1/obg de unión al GTP obg	–	Unión a GTP.
Familia tetR represor transcripcional mce3R	Regulación de la transcripción del operón mce3.	–
Familia de proteína Sua5/YciO/YrdC/YwIC	No definido.	No definido.
Familia reguladora transcripcional PbsX	Regulación de la transcripción.	Secuencia específica de unión de ADN.
Familia transcripcional AfsR/DnrI/RedD	Regulación de la transcripción dependiente de ADN. Sistema de dos componentes de transducción de señal (fosforilación).	Vinculación de ADN. Actividad reguladora de la respuesta de dos componentes.
Familia reguladora transcripcional Ada	Regulación de la transcripción dependiente de ADN. Reparación escisión de base.	Actividad metiltransferasa. Unión a secuencia específica de ADN. Actividad de factor de transcripción. Unión a ión zinc
Familia reguladora transcripcional CopG	Regulación de la transcripción.	Vinculación de ADN.
Familia peptidasa M16	Proteólisis.	Actividad metaloendopeptidasa. Unión a iones zinc.
Familia helicasa UvrD/Rep	Reparación de ADN.	Unión a ATP. Unión a ADN.

Familia de proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia ATPasa transportadores de cationes E1-E2.	Proceso de biosíntesis de ATP. Transporte de iones metales.	Unión a ATP. Unión de iones de magnesio. Exportadores de cobre-ATPasa.
Familia hidrolasa Ama/HipO/HyuC	Proteólisis.	Actividad metalopeptidasa. Actividad dimerización de proteína.
Familia de proteína dehidrogenasa de cadena corta óxido-reductasa	Procesos metabólicos.	Actividad óxido-reductasa. Vinculación.
Familia reductasa aldo/keto	Oxidación-reducción.	Actividad óxido-reductasa.
Familia de proteína PhzF, biosíntesis de proteína fenazina	Proceso biosintético.	Actividad catalítica.
Familia decarboxilasa Orn/Lys/Arg	Actividad liasa.	Unión a piroxidol fosfata.
Familia helicasa Snf2/Rad54	–	Unión a ADN. Unión a ATP. Actividad helicasa
Subfamilia ECF factor sigma ARN polimerasa	Regulación de la transcripción dependiente de ADN. Iniciación de la transcripción.	Actividad factor sigma. Actividad factor de transcripción.
Familia GMC óxido-reductasa	Oxidación-reducción.	Unión FAD. Actividad de transporte de electrones. Actividad óxido-reductasa actuando como donantes de CH-OH.

Familia de Proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia de proteína transportadora CorA	Transporte del ión cobalto. Transporte del ión magnesio.	Actividad transportadora transmembrana del ión cobalto. Actividad transportadora transmembrana del ión magnesio.
Familia metiltransferasa UbiE/COQ5	Procesos metabólicos.	Actividad metiltransferasa.
Familia peptidasa M13 endopeptidasa	Proteólisis.	Actividad metaloendopeptidasa.
Familia de proteínas glicosa hidrolasa	Proceso metabólico manosa.	Actividad alfa-manosidasa. Unión a carbohidrato. Unión a iones zinc. Hidrolasa
Familia de proteínas MmgE/PrpD	Proceso catabólico propionato.	Actividad deshidratasa 2-metilcitrato.
Familia de proteína glicogén fosforilasa	Proceso metabólico glicogén.	Actividad fosforilasa. Vinculación piroxidol fosfata.
Familia reguladora transcripcional Crp	Regulación de la transcripción dependiente de ADN.	Actividad factor de transcripción.
Familia reguladora transcripcional IclR	Regulación de la transcripción.	Unión a ADN.
Familia AAA ATPasa	—	Unión a ATP. Actividad nucleótido trifosfatasa.

Familia de proteína	Procesos Biológicos	Función Molecular
Familia de proteína citidina y deoxicitidilato deaminasa	–	Actividad hidrolasa. Unión a iones zinc.
Familia transportador de níquel HoxN/HupN/NixA	Transporte de ión níquel.	Unión a ión metal. Actividad transportadora transmembrana de iones níquel.
Familia caja DeaD/DeaH dependiente de ATP ARN helicasa	–	Unión a ATP. Vinculante a ácido nucleico. Actividad helicasa dependiente a ATP.
Familia de proteína 13E12	–	Actividad endonucleasa. Unión a ácido nucleico.
Familia hidrolasa alfa/beta pliegue	–	Actividad hidrolasa.
Familia transportadora BccT	Transporte.	Actividad transportadora.
Familia Peptidasa M24/M37	Proteólisis.	Actividad metaloendopeptidasa.
Familia disulfido nucleótido piridina óxido-reductasa.	–	Actividad óxido-reductasa. Unión a FAD.
Familia de unión a soluto proteína 5	Transporte.	Actividad transportadora.

Fuente: Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI). Elaborado por: Equipo de investigadoras.

Familias de proteínas virulentas: Constituida por proteínas que se caracterizan principalmente por participar en la invasión, y sobrevivencia del bacilo tuberculoso en el huésped. Es importante mencionar que las familias de proteínas relacionadas con esta función están presentes en las cinco cepas secuenciadas del *Mycobacterium tuberculosis*, variando en cantidad y localización dentro de su genoma.

La familia de proteína PE como la PPE y sus respectivas subfamilias se caracterizan por influir en la virulencia del *Mycobacterium tuberculosis*, siendo consideradas como una fuente de variabilidad antigénica, debido a que se localizan en la superficie celular al ser secretadas, por lo que interaccionan con los macrófagos evadiendo la respuesta inmune. A pesar de lo anterior se conoce muy poco respecto a la expresión o las funciones de los genes.

A la familia PE se le concede ese nombre por el dominio amino terminal rico en Prolina (P) y Ácido glutámico (E). Estas proteínas actúan como reguladoras de crecimiento siendo ricas en glicina. Cabe señalar que la familia PE a la vez se divide en dos subfamilias, PE y PE_PGRS, según su homología y presencia de dominios característicos en la región carboxilo terminal de sus secuencias, lo que marca mayormente la variación entre ellas además del peso molecular.

La familia PE está presente en las cinco cepas del bacilo de Koch, los miembros de esta familia están distribuidos en diferentes Clusters (razón por la cual varían en su longitud), sin embargo se concentran mayores miembros en el CLS1094524 presentando una similitud del 100% según el alineamiento que ejecutamos en BLAST y que se puede apreciar en la alineación 5.1 en la copia digital.

En lo que se refiere a la estructura, los miembros de estas proteínas poseen un dominio amino terminal PE, altamente conservado entre sus miembros, este dominio constituido alrededor de 110 amino ácido, contiene dos hélices α antiparalelas entre sí, unidas por un lazo loop (Ver estructura 5.1 en la copia digital). También posee un dominio PE-PPE localizado en la región carboxilo terminal, que puede o no encontrar entre sus miembros, se sugiere que su estructura secundaria es una mezcla de alfas hélices y láminas beta.

Por otro lado la subfamilia PE_PGRS, también la localizamos en todas las cepas del bacilo tuberculoso, siendo exclusivas de estos miembros. En su estructura encontramos dominios

con múltiples repeticiones de Glicina-Glicina-Alanina o Glicina-Glicina-Asparagina en el extremo carboxilo, por lo que es rica en su contenido de glicina (hasta 50%), proporcionando la variabilidad antigénica. El dominio amino terminal de esta subfamilia no es alterado.

La subfamilia PE_PGRS se agrupa en una variedad de Clusters, sin embargo no han sido agrupadas en ningún COG. En la alineación 5.2 que realizamos en BLAST, observamos que la familia de proteínas PE_PGRS en la cepa F11 poseen una identidad de 99% con respecto a la CDC1551, y altamente idénticas con la H37Rv, sin embargo la H37Ra tiene solamente un 93% de identidad con la proteína PE_PGRS de la cepa CDC1551.

La familia de proteína PPE con dominio amino terminal rica en Prolina-Prolina-Ácido Glutámico (PPE), su estructura esta relacionada con el dominio PE. Esta familia de proteína se divide en tres subfamilia la más relevante esta constituida por la clase MPTR, caracterizada por la presencia de múltiples copias en tándem con los motivos Asn-X-Gly-X-Gly-Asn_X-Gly (X representa cualquier aminoácido).

Al igual que la familia PE, esta familia se encuentra en todas las cepas, así mismo están dispersas en diversos Cluster, sin embargo todas se albergan en el COG5651N, cuya función es la secreción y motilidad celular. Con respecto a la identidad de las proteínas PPE en todas las cepas, según el alineamiento realizado en BLAST es del 100%, que se puede apreciar en la copia digita, alineación 5.3.

Considerando las características anteriores sobre toda la localización de estas familias de proteínas, así como su temprana expresión, resulta de suma importancia la utilización de éstas como tratamiento y métodos de diagnóstico de la tuberculosis, tomando en cuenta que representa una fuente de variación antigénica desde el punto de vista de evadir la respuesta inmune del huésped y como antígeno de superficie celular que interacciona con las moléculas de los macrófagos.

Además la familia de proteína PE ha demostrado ser potente antígenos de linfocitos B y T, éste último responsable de controlar la TB mediante la producción de citosinas y la lisis de la células infectadas, es por esto que la proteína PE puede ser una clave en el desarrollo de vacunas, así como marcadores inmunológicos de infección. Por otro lado las proteínas PE_PGRS por ser exclusivas del *M. tuberculosis*, son candidatos para determinados

antigénicos, siendo útiles como marcadores en estudios filogenéticos, que podría ser medida a través de análisis inmunológicos.

La familia Mce (Mammalian cell entry), fue localizado en el genoma del *Mycobacterium tuberculosis* y en otras especies de *mycobacterias* patógenas, actuando como factor de colonización al ayudar a la internalización del bacilo a los macrófagos, así mismo le confiere propiedades para permanecer en el estado de latencia⁴³. Esta familia de proteína se encuentra codificada en cuatro operones, mce1, mce2, mce3 y mce4, cada operón se encuentra en una isla de patogenicidad comprendiendo 6 genes nombrados de la A a la F.

Estos operones reprimen genes diferentes, por ende cada uno de ellos se expresa de diversas maneras y distintos momentos. El operón mce1, implicado en el estado de la bacteria, provocando cambio entre las infecciones de tuberculosis aguda y persistente. En cambio los operones mce2 y mce3, están involucrados en la entrada del bacilo al macrófago, así como la supervivencia de la bacteria luego de la invasión. Por otro lado el operón mce4 es expresado durante la fase de latencia, para la supervivencia del *Mycobacterium* en la célula huésped.

Las cepas F11, H37Ra y H37Rv, comprende la familia de proteína Mce con sus respectivos operones, sin embargo estos no poseen el gen E (mce1E, mce2E, mce3E y mce4E), en cambio contienen familia de lipoproteína (MCE- LprK, MCE- LprL, MCE- LprM y MCE- LprN). De igual manera la cepa KZN1435 también posee esta familia de proteína con los operones y cada operón con los 6 genes respectivos, por lo que no posee lipoproteína MCE.

Por otro lado la cepa CDC1551 contiene familia de proteínas virulentas mce distribuidas igualmente en isla de patogenicidad, con la diferencia que en esta cepa no se encuentran los operones antes mencionados.

Todos los miembros de la familia de proteínas Mce se agrupa en el COG1463Q, su función es la biosíntesis de metabolitos secundarios, el transporte y el catabolismo. Sin embargo, los genes que comprende cada operón se ubican en diferentes cluster, así mismo, varios operones comparten clusters, lo que implica alguna similitud existente entre ellos.

⁴³ Arruda, S., Bomfim, G., *et al.*(1993). Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Revista Science*. Volumen 261. Página: 1454.

De esta manera encontramos que la *mce1A* presentes en la cepa F11, H37Ra, H37Rv y KZN1435, se ubican en el Clusters CLS1094050, muestran una identidad del 100% (Ver alineación 5.4. Copia digital), este cluster es compartido con la entrada *mce2A*, pero no poseen una identidad similar, como es el caso de la *mce1A* del H37Rv con respecto a la *mce2A*, teniendo una igualdad del 48%, tal como se aprecia en la alineación 5.5 de la copia digital.

De igual manera, analizamos los miembros de los operones *mce1* (C-F) y *mce2* (C-F), y éstos comparten los mismos cluster, pero varían en cuanto a la longitud de su secuencia, disposición de aminoácido. Un ejemplo claro de ello, son las proteínas *mce1C* y las *mce2C*, se clasifican en el CLS1081188. La *mce1C* presentes en las cinco cepas poseen una alta identidad del 99% como se distingue en la alineación 5.6 en la copia digital, del mismo modo que la *mce2C* es similar en su alineación en todas las cepas (Ver alineación 5.7. Copia digital).

Sin embargo, la alineación 5.8 que realizamos en BLAST, nos muestra que la *mce1C* con respecto a la *mce2C*, presente una similitud del 68% (Ver copia digital), determinando que estas proteínas varían en su secuencia de aminoácidos, tanto por espacios en blancos o gap, cambios en la disposición de los aminoácidos y también por la diferencia de longitudes.

Cabe señalar que las familias de proteínas *mce* conservan en su estructura dos dominios que la caracterizan, basándonos en el análisis que realizamos en Conserved Domains, el Dominio Mtu_fam_mce (Ver estructura 5.2), son transportadores de membrana, se relacionan con cambios en la metilación y la conformación de la membrana al cambiar la posición de un dominio remoto que interactúa con la CheA quinasa. El dominio de mayor relevancia por ser altamente conservado entre sus miembros es el dominio Mce, sin embargo actualmente no se dispone de ninguna propuesta de estructura que nos permita realizar un mayor análisis.

Por todo lo anterior consideramos de relevancia la evaluación de estas proteínas, para la realización de un futuro diagnóstico específico sobre todo en el estado de latencia de la tuberculosis, considerando que los genes del *mce* presentes en el *M. tuberculosis* son secretados o expuestos en la superficie celular, por lo que han demostrado su papel significativo en la invasión y supervivencia del bacilo en los macrófagos del huésped.

Familia de proteína de función reguladora: En el genoma del *Mycobacterium tuberculosis* encontramos que diversas familias de proteínas están implicadas directamente en la regulación de variadas funciones, la cual se realiza principalmente a nivel de la transcripción, en donde se da interacciones entre el ambiente químico de la célula y proteínas reguladoras, codificadas por genes reguladores.

Dichas proteínas regulan la transcripción fundamentalmente mediante interacciones proteínas-ADN, por esta razón las familias de proteínas reguladoras poseen dominio Helix-Turn-Helix (HTH), motivo de unión de ADN, localizado generalmente en los extremos amino terminal, pero a la vez poseen otros dominios de uniones a ADN como wHTH (winged Helix Turn Helix), vinculante a efector, entre otros. De acuerdo a estos dominios las proteínas se pueden clasificar en dos:

Reguladores positivos: Son proteínas que activan o aumentan la frecuencia, velocidad y magnitud de la transcripción, por lo que realizarán la transcripción solo en presencia de éstos polipéptidos. Uno de estos reguladores son las proteínas MerR, se han localizado en muchas especies bacterianas incluyendo el *Mycobacterium tuberculosis*, estas proteínas son metaloreguladoras que controlan la resistencia al mercurio, la inducción del mercurio está en dependencia del operón *merr*.

En presencia de mercurio, éste actúa como un potente activador transcripcional de los genes *merr*. La presencia de estas proteínas resulta de importancia en el bacilo, debido que cuando la bacteria se ve amenazada por diferentes estímulos ambientales, tales como el estrés oxidativo, metales pesados, compuestos citotóxicos o antibióticos, entonces la proteína MerR son expresadas, éstas a la vez activan el factor sigma 70, que son factor de iniciación de la transcripción que permite la unión específica del ARN polimerasa a los promotores de genes.

La familia MerR presente en las cinco cepas con tan solo un integrante, se ubican en el CLS1083767 con una descripción multidominio, este cluster es conservado en el *Corynebacterineae*, en 2 géneros y en 10 organismos, la familia de proteínas MerR poseen

una identidad del 100% dentro de cada cepa del *M. tuberculosis* de acuerdo a la alineación 5.9 que llevamos a cabo en BLAST.

Basado en el análisis en Conserved Domains, esta familia de proteínas posee cuatro dominios funcionales, uno de ellos es el HTH localizados en el extremo amino terminal, este dominio es el que activa el transporte multiresistente, posee la característica de contener residuos (generalmente metales pesados) vinculantes a ADN, según la estructura 5.3 en la copia digital. El otro dominio característico es Sox, actúa como un sensor de estrés oxidativo aumentando la cantidad de proteínas antioxidantes. Este dominio es vinculante a un efector que puede ser un metal (Ver estructura 5.4, en la copia digital).

Desde nuestra perspectiva ésta proteína no puede ser utilizada como método de diagnóstico debido a que no se encuentra en la membrana, ni tampoco es secretada, además se encuentra en múltiples organismos, sin embargo la inhibición de esta proteína permitiría causar toxicidad en la célula, reduciendo de esta manera su capacidad de supervivencia.

La familia de proteína LuxR, es otra proteína que regula de forma activa la transcripción. La mayor actividad asignada a ésta familia, es la señalización del quórum que le permite a la bacteria alcanzar un nivel de población lo suficientemente elevado como para que, llegado el momento de producir los factores de virulencia tras alcanzar el quórum, pueda contrarrestar las defensas del huésped e invadir otras regiones de ese organismo con mayor probabilidad.

Localizamos esta familia en las cinco cepas de *Mycobacterium*, pero no en gran número. Por otro lado la familia LuxR se agrupa en el COG3903R, el cual es multifuncional, sin embargo se distribuyen en variados cluster, siendo CLS1081368 el que más abarca éstas proteínas, compartido con 12 organismos del *Mycobacterium*. Realizamos la alineación a través de BLAST con las proteínas LuxR de la cepa CDC1551 la cual presenta esta proteínas con diferentes longitudes (Ver alineación 5.10. Copia digital).

La familia LuxR de longitud 1113 aa con respecto a las de longitud de 882 aa, posee una identidad del 55%, en cambio la de longitud 1159 aa. conserva una identidad del 65%. Los porcentajes adquiridos anteriormente se deben a la variación de las longitudes que presentan dichas proteínas, el cual esta dado por la presencia de gaps o espacios en blancos, así como la disposición de los aminoácidos

El análisis de éstos polipéptidos con respecto a la estructura, nos indica que esta puede variar en cuanto al número de dominios. El dominio conservado en esta familia es el denominado LuxR_C, que contiene cadenas alfa, causa de unión al ADN, que participa en la regulación de la expresión génica tales como la detección del quórum, éste dominio esta rodeado por glicerol y ácido sulfúrico, este dominio se puede apreciar en la copia digital, estructura 5.5. El dominio CitB, también es un motivo de unión de ADN, es responsable de la transducción de señales y regulador de la transcripción. No se encuentra disponible su estructura en la herramienta Conserved Domains.

Algunos miembros de esta familia poseen también el dominio Guanylate_cyc (Ver estructura 5.6 en la copia digital), que contiene cadenas alfa y hojas beta, su función es llevar a cabo la actividad catalítica de la Adenilato y guanilato ciclasa, éste cataliza la conversión de ATP a 3' 5'-AMP cíclico (AMPC) y pirofosfato. El último dominio P-loop NTPase, también es conservado por algunos miembros, se caracteriza por la unión de un nucleósido fosfato. La estructura de este dominio esta rodeada por iones magnesio. Esto se puede apreciar en la estructura 5.7 en la copia digital.

Reguladores negativos: Son aquellos que detienen o impiden la transcripción de un promotor polimerasa II del ARN. La familia de proteína TetR pertenece a los reguladores negativos y se le asigna este nombre debido a que son represores de la tetraciclina. Estas proteínas están implicadas en procesos bacterianos, como la reacción catabólica, respuesta a la tensión osmótica y químicos tóxicos, al mismo tiempo juega un papel importante en la patogenicidad y en la transcripción de resistencia multidroga.

En este último caso es el gen *tetA* el cual confiere la resistencia a tetraciclina, expulsando de la célula bacteriana el antibiótico a través de una bomba eflujo, antes de que éste inhiba el alargamiento del polipéptido.

Estas proteínas se localizan en diversas especies, así como en todas las cepas analizadas del bacilo tuberculoso, están agrupadas en el COG1309K, que se caracteriza por la función de reguladores de transcripción. Sin embargo, estas proteínas están asignadas en diferentes clusters, sugerimos que la familia de proteína ubicada en cada clusters son altamente similares, uno de ellos es el CLS1081169, en donde las proteínas TetR, posee una similitud

del 100% en todas las cepas del *Mycobacterium* como se distingue en la alineación 5.11 en la copia digital.

Por otro lado los reguladores de la familia TetR se caracterizan por poseer dos dominios, según el análisis realizado en Conserved Domain, uno de ellos es el dominio TetR_N, ubicado en la amino terminal, el cual está constituido por helices alfa (HTH) motivo de unión de ADN de acuerdo a la estructura 5.8 en la copia digital, este dominio es altamente conservado entre sus miembros.

El otro dominio ubicado en el extremo carboxilo terminal, no es conservado por todos los miembros de esta familia, éste dominio participa en la oligomerización y en la unión a inductores (que pueden ser drogas). El reconocimiento de una molécula inductora provoca un cambio conformacional en el dominio de unión de ADN que conlleva a la disociación del complejo ADN represor permitiendo la transcripción del gen que codifica el transporte de droga y la consecuente aparición de resistencia a una serie de compuestos tóxicos.

Es trascendente mencionar que las subfamilias de la familia TetR también han sido de importancia para este análisis, como es el caso de la subfamilia TetR/AcrR localizado en toda las cepas del bacilo, a pesar de esto, no pertenecen a ningún COG, pero si se agrupan en el CLS1082158 presentando una identidad del 100%, basada en la comparación en BLAST (Ver alineación 5.12. Copia digital), este cluster tiene 19 miembros dos de los cuales son parólogos.

Este polipéptido al ser miembro de la Familia TetR, conserva los dos dominios de esta familia, pero además contienen un dominio denominada TetR_C (Ver estructura 5.9 en la copia digital), compuesto por hélice alfa (HTH), contienen dos ligandos uno de ellos es un ión sulfuro y el otro es el 7-Clorotetraciclina, el cual se une a un ión Mg^{2+} , responsable de la pérdida de capacidad de unión de ADN, lo que conlleva a la liberación de ADN y la expresión de los genes responsables de la resistencia a antibiótico y la tolerancia a compuestos químicos, regulado por la bomba eflujo.

Otro regulador negativo y miembro de la familia TetR es la subfamilia de proteína EthR, de suma importancia debido a que las drogas Tiocarbamida que contienen a fármacos tal como la etionamida (fármaco antituberculoso de primera línea) que son activadores de la monooxigenasa *Etha*, este gen es regulado por esta familia de proteína. Por consiguiente la

ethionamida tiene la capacidad de inhibir la unión de la EthR con el ADN. Evitando así la resistencia.

De aquí radica la importancia de esta familia de proteína, que desde nuestro punto de vista, la inhibición de la proteína TetR, permitiría la acción de antibióticos, como es el caso de la tetraciclina, a pesar de esto la familia de proteína TetR presenta la desventaja de no ser secretada a la membrana celular, lo que dificulta su obtención. Mientras tanto la inhibición de EthR mejora el índice terapéutico de los derivados tiocarbamida, que debe llevar a la reconsideración de su uso como fármacos de primera línea.

Familia de proteínas ArsR, represora de la resistencia Arsenical, posee características semejantes a todos los reguladores, esta familia de proteína se une a ADN a través de un motivo HTH, además contienen un wHTH⁴⁴. La familia ArsR es un metaloregulador (que contiene proteínas que parecen disociarse del ADN en presencia de iones metálicos), un ejemplo de esto es la regulación de la metalotioneína, una proteína necesaria para la resistencia al cadmio.

Esta proteína se localiza en múltiples organismos, incluyendo las cepas del *Mycobacterium tuberculosis*, pero ausente en la cepa H37Ra. ArsR presentes en las cepas CDC1551, F11, H37Rv y KZN1435 no se encuentran en grandes cantidades y la mayoría de éstas se ubican en diferentes Clusters, siendo el CLS1185663 donde se agrupan muchas de ellas. Basándonos en la alineación que realizamos a través de BLAST, las familias ArsR perteneciente al Clusters antes mencionado poseen una identidad del 100%, tal y como se distingue en la alineación 5.13 (Copia digital). Analizamos su estructura a través de Conserved Domains, donde obtuvimos que el principal dominio es Lrp, al que se le acredita la regulación de la transcripción.

Aunque la función primordial de esta familia es la resistencia a arsénico, estimamos que esta actividad no es de suma importancia para objetivos terapéuticos, debida a que participan en la defensa de vida intracelular. Por otro lado la ausencia de esta familia de proteína en una de las cepas del bacilo tubérculo y la ubicación de ésta en la célula, es un

⁴⁴ Pfam. Disponible: <http://pfam.sanger.ac.uk/family?acc=PF01022>. Consultado: Septiembre, 2009.

inconveniente para que pueda ser utilizada como diagnóstico, agregando a esto la presencia de la familia en más de 30 miembros ajenos a las cepas del *M. tuberculosis*.

Familias de proteínas reguladoras de otras funciones: Las proteínas forman parte estructural de las células y la mayoría de éstas catalizan prácticamente todas las reacciones que se llevan a cabo a nivel celular. Son varias las funciones que requiere el microorganismo para controlar las condiciones físico-químicas dentro de la célula, realizando funciones vitales básicas como la ingestión de nutrientes, eliminación de tóxico (metales o drogas), entre otras.

Las familias de proteínas cuya función principal radica en la expulsión de tóxicos, transporte de iones, biosíntesis de micro y macromoléculas, almacenamiento de moléculas, entre otras actividades metabólicas, se localizan dentro del genoma del *Mycobacterium tuberculosis* en menor cantidad con respecto a las familias de proteínas tal como lo refleja la tabla 5.6.

Tabla 5.6: Porcentaje de las familias de proteínas presentes en las cepas analizadas según su actividad metabólica.

Actividad metabólica	Número de Familias de Proteínas				
	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN
Familias de proteínas virulentas	35%	76%	65%	76%	71%
Familias reguladoras de transcripción	19%	23%	19%	22%	23%
Familias reguladoras de otras funciones	46%	1%	16%	2%	6%
TOTAL	100%	100%	100%	100%	100%

Fuente: Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI). Elaborado por: Equipo de investigadoras.

MmpL (*Mycobacterial membrane protein Large*), son supuestas proteínas integrales de membrana de las bacterias. Esta familia de proteína es miembro de la superfamilia RND (Resistance, Nodulation, and Cell Division Proteins), la cual actúa como bombas de resistencia a múltiples fármacos y regulador de transporte de una gran diversidad de

compuestos catiónicos o aniónicos, incluyendo varias drogas, metales pesados, solventes alifáticos y aromáticos, sales biliares, ácidos grasos, detergentes y colorantes.⁴⁵

Familia de proteína MmpL, la localizamos únicamente en la cepa CDC1551 con 12 miembros, sin embargo estas proteínas están ubicadas en diversos cluster. Efectuamos el alineamiento con la herramienta BLAST y se encuentran reflejados en la alineación 5.14, la alineación se realizó entre los diferentes miembros ubicados en los cluster, la alineación se realizó con respecto al CLS1082009, presentando poca identidad, así, el CLS1084141 con identidad del 58%, sin embargo la familia de proteína MmpL ubicada en el CLS1081221 contiene una identidad del 21%.

Determinamos que estas diferencias son causas de la longitud, presencias de huecos o gaps, así como la disposición de aminoácido. Por otro lado el análisis que ejecutamos en la herramienta Pfam y Conserved Domains encontramos que esta familia generalmente posee dos dominios; el dominio MmpL, conservado entre sus miembros, aunque se desconoce la función, se sugiere que esta involucrada en la secreción y transporte de lípidos, lo que contribuye a la capacidad propia de los patógenos para sobrevivir dentro de la célula.

El dominio RND que poseen algunos miembros de esta familia, el cual lleva a cabo la resistencia de antibióticos a través de una bomba eflujo o bomba al exterior. Por otro lado, las proteínas MmpL ubicadas en el Cluster CLS1081383, CLS1082290 Y CLS1094609, poseen el dominio actII, que también es responsable de resistencia a medicamentos y la catálisis de lipólisis.

Lo descrito anteriormente, nos permite sugerir que de acuerdo a los mecanismos comunes de su función sería pertinente el desarrollo de inhibidores para esta proteína que pueden ser útiles para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades infecciosas, tal como la tuberculosis. A pesar de esto, la familia de proteínas MmpL, presentan la desventaja de localizarse cerca del núcleo y de estar ausente como familia de proteínas en las cuatro cepas restantes (F11, H37Ra, H37Rv y KZN1435).

⁴⁵ Domenech P., Reed M. y Barry C. (Junio, 2005). Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL Protein Family to Virulence and Drug Resistance. Revista Infect Immun. Volumen 73. Número 6. Página 3492.

Transporte transmembrana, realizada por diversas proteínas, una de ellas es la familia de proteínas MttB, consiste en la presencia de diversas trimetilamina metiltransferasa (MttB). Este polipéptido está codificado en la cepa CDC1551 con un único miembro, clasificado en el CLS1082764, conteniendo 24 miembros distribuidos en la *corynebacteria* y se consideran parólogos. Esta proteína es agrupada en el COG0805U, responsables de transporte y secreción.

Basándonos en la herramienta de Conserved Domains, la familia de proteína MttB, presenta un dominio denominado Sec-independent protein translocase protein (TatC), actualmente la estructura de este dominio no se encuentra disponible, sin embargo, se le acredita la capacidad de transporte de complejos de proteínas e incluso de enzimas a través de la membrana citoplasmática. Además están involucradas en la translocación de proteínas y protones.

Consideramos que esta familia de proteínas, por estar ausente en las otras cepas, no proporciona en nuestro estudio ningún interés para ser usado como método de diagnóstico, sin embargo la función de esta proteína es vital para la sobrevivencia de la misma.

En lo que respecta a la resistencia de los antibióticos, en este caso particular a las Betalactamasa, se encuentran las superfamilias de proteínas Metalo-Beta-Lactamasa (MBL), que requieren de un cofactor de metales, generalmente Zn^{2+} , para llevar a cabo su actividad, como es el resistir a los antibióticos betalactamasa, incluyendo los carbapenémicos, lo que complica el tratamiento clínico de la enfermedad.

La superfamilia MBL presentes únicamente con cinco miembros en la cepa del bacilo CDC1551, cada miembro se encuentra en diferentes clusters. Ejecutamos la alineación de estos cinco miembros con el fin de conocer la identidad entre ellos, en base a la alineación 5.15 en la copia digital, la superfamilia ubicada en el CLS1185386 comparte una identidad del 33% con respecto al CLS1081387, los CLS1185702 y CLS1084097 con una similitud de 32% y por última la familia que pertenece al CLS1084029 con identidad del 26%.

Esta familia, de igual forma no son agrupadas en el mismo COG, la superfamilia de proteína ubicada en el CLS1084097 se grupa en el COG2015Q, cuya función radica en el metabolismo secundario de lípidos, así como el transporte y catabolismo, los cuatro miembros restante se agrupan en el GOG0491R. Justificamos esta razón, debido a que la

proteína ubicada en el COG2015Q, conserva dos dominios, por lo contrario el otro COG, posee únicamente un dominio.

Uno de los dominios es el denominado Alquil sulfatasa, éste dominio es altamente conservado en todos sus miembros es el del dominio Beta-Lactamasa, el cual posee una estructura con un pliegue alfa-beta-alfa-beta donde se une dos moléculas de zinc que rompen el enlace amida del anillo betalactámico, la metalo-beta-lactamasas incluye superfamilia de enzimas que hidrolizan tiol-éster, fosfodiéster y enlaces éster sulfúrico⁴⁶ (Ver estructura 5.10 en la copia digital).

Desde nuestra perspectiva esta superfamilia de proteína a pesar de que se encuentran en la membrana celular, no son de importancia terapéutica, ni de diagnóstico, sobre todo por la ausencia de ésta en la mayoría de las cepas, pero presentes en diversos organismos, además que poseen una similitud menor del 50%. Por otro lado la función de esta proteína al inhibir los fármacos betalactámicos dificulta el tratamiento contra la tuberculosis.

Las proteínas Asociadas a la Resistencia de Múltiples fármacos (MRP, Multidrug Resistance Associated), pertenecientes a la superfamilia de proteínas ABC (ATP Binding Casatte). Se encuentra en diversas bacterias como proteínas que atraviesan la membrana, transportando iones orgánicos⁴⁷. Estas actúan como bomba eflujo o de expulsión, disminuyendo de esta manera la acumulación intracelular de varias sustancias incluyendo los fármacos.

La proteína MRP se encuentra con un solo miembro como familia de proteína en la cepa H37Rv, ubicadas en CLS1185489, dicho cluster contiene 57 miembros, de los cuales 28 son supuestos parólogos, a éste clusters se le asigna como supuesta unión a ATP. Por otro lado este polipéptido es agrupado en el COG0489D, cuya función es el control del ciclo celular, en la mitosis y la meiosis.

⁴⁶Pérez-Llarena F., Bou G. (2009). Beta-Lactamase Inhibitors: The Story so Far. Revista Curr Med Chem. Volumen 16. Número 28. Página 3740.

⁴⁷ National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=73300>. Consultado: Septiembre, 2009

De la misma manera utilizando Conserved Domains identificamos 3 dominios. El Mrp, la función de este dominio radica en la vinculación de un ATPasa, el cual participa en la división celular y partición de cromosoma. El MRP_supesta, motivo de unión de ATP localizado en la región amino terminal y actúa como antiportadores de Na^+ / H^+ . La vinculación a ATP, permite transportar una amplia variedad de sustratos a través de la membrana celular. Por último el dominio DUF59; con funciones desconocidas. La estructura de estos dominios no se encuentra disponible en Conserved Domains.

Se hace pertinente la propuesta de esta proteína como blanco de tratamiento en diversas patologías, al igual que en el *Mycobacterium*, considerando que la inhibición de ésta es vital de acuerdo a la importante actividad que realiza, así como por su presencia en la membrana celular, sin embargo, estas proteínas es falta en las cepas CDC1551, F11, H37Ra y KZN1435, y presente en varios organismos.

La familia de proteína Citocromo C (cytC) localizados en la membrana de la bacteria, se pueden definir como la transferencia de electrones de proteínas que tienen uno o varios grupos heme C unido a la proteína por bonos tioéter. Esto se lleva a cabo en la oxidación respiratoria del complejo enzimático, durante esta actividad la proteína acepta y libera electrones que transitan a otro citocromo, realizando así la transferencia de éstos, lo que lleva a la liberación de energía, almacenada en forma de ATP.

Las cepas CDC1551 y la H37Ra son las únicas que codifican para estas proteínas, ambas se agrupan en el COG2010C y se le acredita a éste la producción y conservación de energía. De igual manera las proteínas se localizan en el CLS118583 y según la alineación que realizamos en BLAST éstas son similares en un 100% (Ver alineación 5.16). En base al análisis en Conserved Domains, esta familia es constituida por un dominio denominado citocromo C, el cual esta unido a un grupo heme C, es decir, una protoporfirina IX con un ion de hierro coordinado (Ver estructura 5.11).

Esta familia de proteína no presenta ninguna relevancia desde el punto de vista terapéutico, debido a que no juega ningún papel fundamental con respecto a la virulencia o sobrevivencia del bacilo del Koch, además que dicha familia no pueden considerar como un método de diagnóstico a causa de la ausencia de la familia citocromo c en la cepa F11,

H37Rv y KZN1435. Tampoco es factible como blanco de tratamiento, debido a que estas proteínas también se encuentran en el humano.

La familia de proteína HoxN/HupN/NixA, son transportadoras de níquel de alta afinidad, pero también se han asignado como transportadora de cobalto. Se encuentran únicamente en la cepa CDC1551, ubicadas en el CLS1185748 y en el COG3376P, su función es el transporte y metabolismo de iones inorgánicos.

Según Conserved Domains, esta proteína contiene un único dominio denominada NicO (actualmente la estructura de este dominio no se encuentra disponible), realiza función de actividad catalítica hidrolasa, catalizando la oxidación del hidrógeno molecular. La absorción de iones depende de la fuerza motriz de protones. Los electrones procedentes de la oxidación del hidrógeno se transportan por la cadena respiratoria hasta el oxígeno, que actúa como aceptor final, lográndose obtener energía por fosforilación oxidativa.

Al igual que las proteínas que causan resistencia a otros metales, esta familia de proteína no aporta de ningún interés como método de diagnóstico para el tratamiento del *Mycobacterium*. Además que la proteína HoxN/HupN/NixA no es secretada a la membrana celular y por otro lado estos polipéptidos están ausentes en las cepas F11, H37Ra, H37Rv y KZN1435.

Familia de proteína enoil-CoA hidratasa/isomerasa, miembro de la superfamilia de proteína Crotonase/Enoil-coenzima A (CoA) hidratasa, que realizan funciones importantes como el metabolismo de ácido graso y la estabilización de un anión enolato intermedio derivado de un sustrato acil-CoA. Esta familia de proteínas son localizadas en la cepa CDC1551 y en la cepa H37Ra únicamente, en cada cepa existe solamente una familia agrupadas en el CLS1081975 con longitud de 113aa.

Este Cluster alberga 7 organismos todos miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Se agrupan en el COG1024I, su función es el metabolismo y transporte de lípidos. Basado en el alineamiento 5.17 que ejecutamos en BLAST la familia de proteínas de cada cepa posee una identidad del 100%.

El único dominio que posee, basándonos en Conserved Domains es Crotonase/like, en su estructura conservan un núcleo estructural y la formación de trímeros (o dímeros de trímeros) cada trímero contiene tres sitios de unión de sustrato, estos estabilizan el anión

enolato intermedio derivado de un sustrato acil-CoA. Esto se logra por dos grupos de columna vertebral conserva NH en los sitios activos que un agujero de forma oxianión (Ver copia digital. Estructura 5.12).

Esta familia contiene un conjunto diverso de enzimas incluidas enoil-CoA hidratasa, sintasa naphthoata, metil-CoA descarboxilasa, 3-hidroxibutiril deshidratasa CoA, y dienoil-CoA isomerasa, involucradas en el metabolismo de la oxidación de los ácidos grasos, éste es un mecanismo clave para la obtención de energía metabólica (ATP). Cabe señalar que la oxidación de los ácidos grasos da como resultado la Acetil-CoA, un intermediario clave en el metabolismo de lípidos y glúcidos.

Esto señala la importancia de la familia de proteína en la actividad celular, la inhibición de esta proteína sería esencial para disminuir la capacidad del metabolismo de los lípidos, necesario para la virulencia del *M. tuberculosis*, sin embargo la ausencia de estas proteínas en tres cepas del bacilo tuberculoso disminuye el interés en esta enzima.

En lo que respecta al metabolismo de los carbohidratos, la familia alfa-amilasa es una de las responsables de esta actividad, se encuentra en diversos organismos, en la cepa CDC1551 del bacilo de Koch, con tres miembros ubicados en CLS1185303, CLS1179034 y CLS1183060. La alineación 5.18 que realizamos con los cluster que se puede notar en la copia digital, determinamos que el CLS1179034 tienen una similitud de apenas el 62% con respecto al CLS1185303 y el CLS1083066 una identidad de 33%.

La familia de proteína amilasa se halla constituida por diversos dominios el más conservado entre los tres es el Dominio alfa-amilasa (Estructura 5.13), tienen una estructura de 8 cadena alfa/beta barril, que contiene el sitio activo. El dominio treS_termin; trehalose synthase, realizan uno de los tres mecanismos para la biosíntesis de la trehalosa al convertir la maltosa en trehalosa, el cual es esencial para el crecimiento de las *mycobacterias*. Este dominio es ubicado en la región amino terminal de la proteína.

El dominio trehalose_treC es un disacárido de glucosa, que se expresa para la protección contra el estrés hiperosmótico y térmico. Esta familia describe a la trehalosa-6-fosfato hidrolasa, producto de la TreC (o TreA) de genes, que se encuentra a menudo junto con un transportador de captación de la trehalosa y un represor operón trehalosa. A pesar de lo anterior hemos analizado que esta familia de proteína no tiene gran relevancia en lo que

respecta a objetivo terapéutico y/o diagnóstico, debido a su poca distribución en las cepas del bacilo.

Todas las familias de proteínas juegan un papel vital en el genoma del bacilo de Koch, sin embargo no todas son viables para el desarrollo de terapia y métodos de diagnóstico. A través de la comparación de las familias de proteína basada en los criterios de especificidad, localización, secreción y el momento de expresión de las proteínas, se determinan proteínas potenciales, esto se puede apreciar en la tabla 5.7

La familia de proteína PE es altamente factible para el desarrollo de vacunas, determinado principalmente por la función que realizan sus dominios, como por el momento de secreción y su aislamiento. Por otro lado, la familia de proteína PPE es viable como método de diagnóstico, así como la familia PE_PGRS que podrían ser utilizados como marcadores inmunológicos, esta última familia es específica del *Mycobacterium tuberculosis* lo que la hace útil para los estudios filogenéticos.

Tabla 5.7: Selección de las familias de proteínas con mayor potencial para el desarrollo de drogas y/o métodos de diagnóstico para la tuberculosis (TB).

Proteína	Especificidad	Porcentaje de identidad	Localización	Momento	Conocimiento de dominios	Secreción
Familia de proteína PE	++	+++	+++	+++	+++	+++
Familia de proteína PE_PGRS	+++	++	+++	+++	+++	+++
Familia de proteína PPE	++	+++	+++	+++	++	+++
Familia de proteína MCE	++	++	+++	+++	++	+++
Familia de proteína MerR	-	+++	++	-	+++	+++
Familia de proteína LuxR	-	-	++	-	++	-
Familia de proteína TetR	-	+++	++	+++	+++	-
Familia de proteína TetR/AcrR	-	+++	++	-	+++	-
Familia de proteína EthR	-	++	++	+++	+++	+++
Familia de proteína ArsR	-	+++	++	-	++	-
Familia de proteína MmpL	-	-	-	-	++	-
Familia de proteína MtbB	-	++	++	-	++	-
Superfamilia de proteína Metallo-Beta-Lactamasa	-	-	++	-	++	-
Familia de proteína MRP	-	++	+++	-	++	+++
Familia de proteína Citocromo C	-	+++	+++	-	+++	+++

Proteína	Especificidad	Porcentaje de identidad	Localización	Momento	Conocimiento de dominios	Secreción
Familia de proteína HoxN/HupN/NixA	-	+++	++	-	++	+++
Familia de proteína enoil-CoA hidratasa/isomerasa	++	+++	++	-	+++	-
Familia de proteína amilasa	-	-	++	-	+++	-

Fuente: National Center for Biotechnology Information. Elaborado por: Equipo de investigadoras.

5.2) PROTEÍNAS VIRULENTAS DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

Muchas de las proteínas codificadas en el genoma del bacilo tuberculoso son determinantes de su patogenicidad y virulencia, sin embargo no todas actúan con un mismo mecanismo y momento, ya que como ha sido mencionado uno de los aspectos más peculiares de este genoma es su capacidad para “encender y apagar” la expresión de ciertos genes en las diferentes etapas de su desarrollo.

La importancia de esta propiedad *mycobacteriana* tiene gran trascendencia desde el punto de vista de este estudio debido a que para poder identificar objetivos potenciales para el diagnóstico y desarrollo de drogas antituberculosas, se debe conocer las proteínas que intervienen en su patogenicidad, desde las etapas tempranas como la adhesión, hasta los períodos de latencia y reactivación, fundamentales para la diseminación de la TB, sobre todo en coexistencia con factores de riesgo como la vejez o el VIH/SIDA.

La cantidad de cada proteína virulenta es variable de una cepa a otra como puede ser visualizado en la tabla 5.8 en donde se encuentran la cantidad de proteínas virulentas presentes en cada una de las cepas analizadas, en ellas podemos determinar que la cepa con mayor número de proteína virulentas es la H37Rv, seguida muy de cerca por la KZN1435, siendo estas dos las cepas más agresivas dentro de este grupo.

Esta variabilidad explica la divergencia en la virulencia de estas cepas *mycobacterianas*; sin embargo la función de estos polipéptidos es la misma en todas ellas. Con el fin de analizar el rol de las proteínas virulentas las hemos agrupado de acuerdo a la etapa y la función que realizan durante el desarrollo de esta patología.

Tabla 5.8: Cantidad de proteínas virulentas presentes en las cepas *mycobacterianas* analizadas.

Cepa de <i>M. tuberculosis</i>	Cantidad de proteínas virulentas
CDC1551	63
F11	75
H37Ra	88
H37Rv	208
KZN1435	206

Fuente: National Center for Biotechnology Information (NCBI). Elaborado por: Equipo de Investigadoras.

5.2.1) Proteínas que intervienen en la colonización: El *M. tuberculosis* es una bacteria intracelular que requiere de la respuesta inmunológica del huésped para ingresar al macrófago e iniciar el proceso morbosos. En los procesos de ataque y adhesión al huésped encontramos que intervienen antígenos de función específica conocida y otros que se relacionan con este fin por sus dominios o por pertenecer a una familia específica.

Resulta importante mencionar que la gran mayoría de estas proteínas invasivas se encuentran presentes en todas las cepas *mycobacterianas* analizadas aunque en diversas cantidades y localizaciones. Uno de estos polipéptidos es la proteína antigénica de bajo peso molecular CFP 2, que pertenece a la familia MTB12 y es uno de los componentes principales y tempranamente secretados que desempeña un papel esencial para las respuestas proinflamatorias durante las primeras etapas de la TB humana.

La CFP 2 pertenece a un grupo de proteínas de la que obtiene su nombre y que son filtradas de los cultivos (Cultive Filtered Protein), es decir se encuentran en el medio de cultivo de crecimiento del *M. tuberculosis*, aunque su mecanismo de secreción aún no está bien definido. Forma parte de la pared celular e interviene en los procesos celulares *mycobacterianos* aunque no cuentan con un dominio determinado, por lo cual sus funciones aún no se encuentran bien dilucidadas.

Esta proteína se encuentra presente en el genoma de las cepas H37Ra, H37Rv, F11; KZN1435 y de manera hipotética en la cepa CDC1551, es decir de ésta última no se conoce información específica excepto su secuencia de aminoácidos. Sin embargo todas ellas comparten una identidad del 100%, a excepción de la proteína de la cepa CDC1551 que posee una identidad del 99% con las otras proteínas, según el alineamiento que realizamos en Cobalt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>).

Por ser un antígeno precozmente secretado inductor de la respuesta inmune del huésped y ser parte de la familia de antígenos que pueden ser filtrados de los cultivos, constituye una nueva posibilidad de diagnóstico *in vivo* como método alternativo para la prueba de tuberculina, sobre todo para pacientes inmunodeprimidos, en donde la PPD posee como principal inconveniente el desencadenamiento de una infección tuberculosa primaria.

El antígeno estimulante de células T del huésped de bajo peso molecular TB8.4 es una proteína integral de membrana secretada que carece de dominio conocido pero que es vinculado a procesos celulares. Esta proteína se encuentra en todas las cepas con una identidad del 100%, aunque es encontrada con nombres sinónimos; cabe mencionar que esta proteína pertenece a un grupo conservado en el género *Mycobacterium* con un total de 11 miembros.

La relevancia de esta proteína desde el punto de vista terapéutico no pudo ser determinada por la carencia de un dominio y función específica, sin embargo por ser un estimulante de las células T, podría ser utilizado como diagnóstico aunque tiene inconvenientes como la baja especificidad por encontrarse en 6 miembros ajenos a las cepas de *M. tuberculosis*, así como por no ser un producto que pueda ser purificado de un cultivo madre.

El antígeno secretado CFP7 pertenece a la familia ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target 6KD) del *M. tuberculosis*, que son componentes minoritarios de filtrados purificados de cultivos (CFP) y caracterizados por inducir una respuesta inmunológica del tipo TH1. Los antígenos ESAT-6 son secretados durante la fase inicial de crecimiento siendo fuertemente reconocido por animales y humanos infectados por el bacilo patógeno⁴⁸.

Los miembros de esta familia son pequeñas o cortas proteínas bacterianas de funciones y mecanismos de acción aún no totalmente dilucidados y de vital importancia para la virulencia del *Mycobacterium tuberculosis*, ya que se ha determinado que de la presencia o ausencia de este tipo de factores de virulencia, dependerá la capacidad del bacilo para infectar a la célula hospedera, además de desarrollar una respuesta inmune específica.

Los ESAT-6 se vinculan también con la protección de la bacteria y con la agresividad de la misma frente a la célula huésped, sin embargo su función específica es aún una incógnita debido a que dentro de las proteínas Esat-6 se encuentran algunos dominios con funciones desconocidas como el DUF 1066 y el WXG100, aunque cabe aclarar que no en todos los Esta-6 se encuentran ambos.

⁴⁸Calderón, M., Parra-López C., et al. (2006) *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen immunogenicity in Owl Monkeys. Publicaciones NOVA. Volumen 4.Número 5. Páginas 14-26.

Cabe mencionar que al analizar el genoma de las cepas tuberculosas se determinó que las Esat-6 se encuentran tanto en forma aislada como en forma de islas de patogenicidad, además de presentarse en grandes cantidades en la mayoría de estas cepas; lo que nos reafirma nuevamente que las pequeñas divergencias entre los genomas representan grandes cambios en la virulencia *mycobacteriana*.

Debido a todas las características antes mencionadas, es natural asumir que la Esat-6 puede ser utilizada como un método de diagnóstico de la TB, tanto *in vivo*, la cual podría ser medida a través de análisis inmunológicos como la técnica ELISA debido a que se desarrolla una respuesta inmune específica, es decir un anticuerpo específico, así como mediante técnicas biotecnológicas como el PCR.

Otro factor que induce a proponer a proteínas como un método de diagnóstico, es que las Esat-6 pueden ser purificadas desde un cultivo madre, además que son antígenos tempranamente secretados durante la infección tuberculosa. Por otro lado, al conocer que sin la expresión de esta exotoxina la virulencia del bacilo patógeno es reducida e incluso atenuada, resulta pertinente indagar la manera de inhibirla.

La proteína CFP 7 se encuentra dentro del grupo CLS1081286, el cual está constituido por 33 miembros conservados en el género *Mycobacterium*, de los cuales 21 se consideran parólogos. Es importante destacar que las proteínas CFP 7, sin importar el sinónimo con el que sean nombrados en las distintas cepas tuberculosas, poseen una identidad del 100% según la alineación que realizamos en Cobalt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>).

Al realizar el análisis de esta proteína utilizando Cn3D se logró determinar que comparte la estructura proteica con su familia, como es apreciable en la estructura 5.14 que resulta pertinente mencionar, es altamente característica por contar con cuatro cadenas pertenecientes al dominio WXG, que aunque carece de función específica determinada, posee un notorio ligando glicerol, conocido por ser constituyente de las membranas celulares lo que lo relaciona con la capacidad de adhesión de las células huésped.

Dentro de las proteínas que juegan un rol importante para la internalización del bacilo tuberculoso a la célula diana encontramos al complejo de antígeno esterasa 85 y sus formas

85A, 85B y 85C, que son fundamentales para la supervivencia del *Mycobacterium tuberculosis* dentro de su entorno de acogida y principales componentes de su pared celular.

Este péptido es secretado a la región exterior de la célula y pertenece a la familia antigénica A85 *mycobacterial*, que ayuda a mantener la integridad de la pared celular catalizando la transferencia de los ácidos micólicos y arabinogalactan a la pared celular y a través de la síntesis de dimicolato trehalosa (factor de la médula o cable), necesaria para la prevalencia efectiva de dicha pared celular, por ello el complejo de antígenos 85 se considera un aciltransferasa en donde todos sus miembros comparten el mismo sustrato.

Además estas proteínas secretadas permiten la rápida invasión de los macrófagos alveolares a través de la interacción directa entre el sistema inmune del huésped y el bacilo invasor⁴⁹. Otro aspecto de fundamental importancia del complejo de proteínas antígenas 85 es su gran afinidad a la fibronectina y su capacidad para unirse a ésta, la cual es un constituyente de las membranas celulares.

Esta unión entre el antígeno 85 y la fibronectina es la principal mediadora de la adherencia microbiana a la célula hospedadora. De aquí que por cada forma alternativa que exista de fibronectina (fbpA, fbpB, fbpC) existe una modificación del antígeno 85 (Ag85A, Ag85B, Ag85C) siendo todas ellas homólogas y compartiendo una identidad del 68-79% entre sus secuencias.

Mediante la alineación realizada de las proteínas antígenas esterasa 85 realizada en Cobalt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>), se determinó que estas proteínas varían en su secuencia de aminoácidos, tanto por espacios en blancos o gap, cambios en la disposición de los aminoácidos como por divergencias en las longitudes, sin embargo Conserved Domains establece que todos comparten dominios esterasa y estereasa_lipasa característicos.

Por todas estas propiedades estos péptidos poseen un alto potencial como dianas para nuevos tratamientos antituberculosos por su gran afinidad a la fibronectina celular humana,

⁴⁹Ronning DR, Vissa V, Besra GS, Belisle JT, Sacchettini JC. (2004) Mycobacterium tuberculosis antigen 85A and 85C structures confirm binding orientation and conserved substrate specificity. Revista de Química Biológica. Volumen 279. Páginas 36771-7.

sin la cual la adhesión *mycobacteriana* no se llevaría a cabo, por participar en el desarrollo de la respuesta inmune del huésped, por ser un antígeno secretado y encontrarse distribuido en todas las cepas.

También puede ser utilizada como un método de diagnóstico de la infección tuberculosa, aunque no es específica del *Mycobacterium tuberculosis*, ya que la esterasa 85 pertenece al grupo CLS1082585 con 77 miembros conservados en 20 miembros del género *Mycobacterium*, siendo todos miembros parólogos.

A través de Cn3D se aprecia que la estructura del Ag85 contiene un bolsillo hidrofóbico y un túnel que se extiende hacia el centro de la proteína que indica la ubicación del probable sitio de unión a la monomicolata trehalosa, además de una larga región de residuos conservados en la superficie entre los Ag85 A, B y C, representando un sitio probable para la interacción de estas proteínas con la fibronectina humanos (Ver estructura 5.15 en la copia digital).

Se debe mencionar que en todos los genomas de las cepas tuberculosas el orden de aparición de los antígenos 85 es: Ag 85C, Ag 85B y Ag 85A; excepto en la cepa H37Ra, en donde el Ag 85C no existe, lo que podría explicar la virulencia atenuada de esta cepa en relación con los demás. Otra proteína de unión a la fibronectina es FbpA, poseedora de un solo dominio esterasa_lipasa, que le confiere su gran afinidad y que interviene en la adhesión de la bacteria a la superficie celular blanco.

Los factores de virulencia mammalian cell entry: mce1, mce2, mce3 y mce4 pertenecen a la familia de proteínas de factores de virulencia Mce y desde el punto de vista de esta investigación son proteínas de gran importancia debido a que son fundamentales en la invasión a la célula hospedera, ya que además de ofrecer protección al bacilo intervienen en múltiples aspectos de la invasión: al ser secretadas estimulan la respuesta inmune del huésped promoviendo la internalización en los macrófagos, por lo que a menudo se conocen como factores de internalización.

Además regulan el crecimiento *mycobacteriano*, permitiéndole pasar de un estado de crecimiento estacionario a uno activo y viceversa, necesario para la reactivación o infección tuberculosa primaria; también participan en el cambio del estado latente al activo, por lo tanto facilitan la adaptación del microorganismo al medio interno y hostil del huésped. Esto

último es utilizado por el *Mycobacterium* como un sistema de protección para evitar su fagocitosis al permanecer en un estado de latencia temporal.

Se determinó que estos factores de virulencia se encuentran presentes en todas las cepas de *M. tuberculosis*, ya sea en forma de islas de patogenicidad como en forma individual; cabe mencionar que no en todas las cepas se encuentran como proteínas Mce sino en cambio se encuentran a manera de familias de proteínas Mce, se identificó también que la única cepa que contiene genes que codifican para Mce individuales es la CDC1551, en donde se presentan tres tipos de factores de virulencia: Mce1, Mce2 y Mce3.

El Mce1 y Mce2 pertenecen al grupo de proteínas CLS1094050 y el Mce3 pertenece al CLS1094628. El grupo CLS1094050 está categorizado como multifuncional, dentro de éste existen 47 miembros, 39 de los cuales son supuestos parólogos, conservados en el género *Mycobacterium*. En este mismo grupo se encuentran 8 proteínas de las cepas analizadas.

Mediante el alineamiento en BLAST se determinó que: las familias de proteínas mce 1A de las cepas F11, H37Ra y H37Rv poseen una identidad del 100%; las familias de proteínas mce 2A del F11 y KZN1435, y los factores de virulencia del CDC1551 poseen una identidad del 62% y las familias de proteínas mce 2A del H37Ra y del H37Rv poseen una identidad del 62% (Ver alineamientos 5.19, 5.20 y 5.21 en la versión digital).

Por otro lado encontramos que el grupo CLS1094628, también es un grupo multifuncional, sin embargo es un grupo más reducido con sólo 26 miembros conservados en el género *Mycobacterium*, de los cuales 19 son supuestos parólogos. De estos 26 miembros, 4 pertenecen a las cepas CDC1551, F11, H37Ra y H37Rv denotándose como factor de virulencia en la CDC1551 y en el resto como familia de factores de virulencia mce 3A.

Mediante el análisis en BLAST en el alineamiento 5.22 de la copia digital se logró identificar que todos estos polipéptidos poseen una identidad del 100%. De la misma manera utilizando Conserved Domains se identificaron los tres dominios constituyentes de estos Mce, ya que al conocerlos se logra entender la razón de las funciones estos factores de virulencia.

El dominio Mtu_fam_mce constituye una familia con miembros parólogos que se encuentran como seis proteínas homólogas repetitivas en la misma orientación por casete, distribuidas en 4 cintas o casetes independientes en el *Mycobacterium tuberculosis*. El

dominio Mce es necesario para la colonización y la supervivencia dentro del macrófago. Esta familia contiene proteínas de función desconocida de otras bacterias⁵⁰.

Y por último el dominio Ttg2C es un sistema de transporte de tipo ABC involucrado en la resistencia a disolventes orgánicos. Es un componente periplásmico que participa en la biosíntesis de metabolitos secundarios, el transporte, y el catabolismo⁵¹. Es importante señalar, que es este último dominio el que diferencia a los factores de virulencia mce con las familias de virulencias mce, ya que en éstas últimas este dominio no existe.

A pesar de la trascendencia de estos motivos, actualmente el único con estructura disponible en Structure, es el dominio Mtu_fam_mce, poseedor de dos cadenas relacionadas con cambios en la metilación y la conformación de la membrana al cambiar la posición al interactuar con la CheA quinasa (Ver en copia digital la estructura 5.16).

Un aspecto que debe ser mencionado, es que los factores de virulencia mce dentro del genoma de las *mycobacterias*, aparecen en el orden mce1, mce2 y mce3. Así mismo se debe valorar el papel de estas proteínas como un método de diagnóstico específico para personas de riesgos, como PVVS o personas drogo dependientes, ya que al identificar este tipo de proteína dentro del genoma del paciente se logrará determinar una tuberculosis latente en el mismo.

Otra proteína inmunogénica que interviene en la colonización tuberculosa es la proteína secretada Mpt70 o Mpb70, la cual pertenece al grupo CLS1083392, conservado en el *Complejo Mycobacterium tuberculosis* y poseedor de 7 miembros. Según el múltiple alineamiento de las secuencias del CLS1083392 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/prkview.cgi?result=align&cluster=CLS1083392>), son idénticas en los 193 aminoácidos que las componen.

La estructura del Mtp70, establecida en la copia digital como la estructura 5.17, tiene una clara homología estructural al dominio FAS1 (Según estructura 5.18 disponible en la

⁵⁰ National Center for Biotechnology Information. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdsrv.cgi?uid=111376>. Consultado: Agosto, 2009.

⁵¹ National Center for Biotechnology Information. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdsrv.cgi?uid=31652> Consultado: Agosto, 2009.

versión digital) de la proteína de adhesión celular fasciclin I, cuya estructura se determinó recientemente y está formada por una sola cadena compleja con inicio y final notorio. La inhibición del sitio de unión de esta proteína lograría disminuir la capacidad del *M. tuberculosis* para fijarse a la célula diana y lograr colonizarla.

Por otro lado, el hecho de que sea una de las principales proteínas inmunogénicas secretadas la hace un objetivo atractivo para el diagnóstico *in vivo* de la TB, sin embargo tiene como desventajas que no se encuentra presente en todas las cepas *Mycobacterianas* y su clara homología con FAS1, presente en plantas, bacterias y en animales, lo hace inespecífico.

La citotoxina/hemolisina TlyA y la hemolisina (proteína parecida a la hemolisina) son exotoxinas que atacan las membranas de las células de la sangre, a menudo por la formación de un poro en la membrana, con la consecuente pérdida del citoplasma y liberación de la hemoglobina intracelular en el organismo huésped, a esto se le conoce como actividad citolítica-hemolítica.

No pertenecen a ningún grupo de proteínas o cluster, aunque sí se encuentran dentro de agrupaciones de grupos ortólogos, COG. La estructura de TlyA está codificada dentro del genoma de las cepas CDC1551, H37Rv, H37Ra y KZN1435, y está formado por sus tres dominios básicos: el S4/Hsp/ARNt, una ARNt sintetasa; el SAM, una metiltransferasa y el COG1189 que es una predecible ARNr metilosa.

La hemolisina con dominio Hemolysin III de estructura no definida, interviene en las vías metabólicas que regulan el metabolismo de lípidos y fosfatos. Estas proteínas son fundamentales en la virulencia del bacilo por el daño celular que ocasionan y la formación del granuloma que requiere el *M. tuberculosis* para sobrevivir, además en el caso específico de la hemolisina que por ser una proteína integral de la pared celular, constituye un blanco adecuado para el desarrollo de nuevos tratamientos.

La proteína Tig o factor trigger codifica el factor desencadenante de las modificaciones morfológicas que ocurren para la internalización del bacilo de Koch, se encuentra presente en todas las cepas *mycobacterianas* con un identidad del 100% según el alineamiento 5.23 mediante BLAST y a través de Structure, Pfam y Conserved Domains se determinaron sus cuatro dominios y sus funciones.

El primer dominio encontrado fue el Trigger_N, que confiere al péptido las actividades de acompañante ATP independiente y de peptidil-prolil cis-trans isomerasa -(PPIase) *in vitro*. A continuación el dominio Trigger_C presenta el C-terminal de la proteína; este dominio es altamente similar al anterior, es decir, es independiente del ATP y muestra las mismas actividades *in vitro*, por todas estas semejanzas es natural que sus estructuras también lo sean, esto puede ser verificado en la estructura 5.19 de la copia digital.

El tercer motivo, el dominio TIG es el encargado de proporcionar las características de factor desencadenante trigger y actualmente se encuentra en estado provisional, por lo cual su estructura es aún indefinida. Por último encontramos al dominio de una sola cadena FKBP_C del tipo FKBP, peptidil-prolil cis-trans isomerasa. Este dominio actúa como un potenciador de la virulencia hacia el macrófago. Su estructura se encuentra disponible en la versión digital en la estructura 5.20.

Por encontrarse en todas las cepas bacterianas y las funciones de sus múltiples dominios, esta proteína es indispensable para la endocitosis de la bacteria por la célula blanco, sin embargo la inhibición de esta proteína resultaría compleja por poseer múltiples dominios que poseen diversas funciones y estructuras. Cabe mencionar que todos los factores trigger pertenecen al PRK01490 conservados en las bacterias con 645 miembros distribuidos en 645 organismos, es decir no es específica del CMT.

Otra proteína que es secretada durante el proceso de infección del huésped es la proteína antigénica integral de la membrana TBFG_13343, la cual tiene como función el ensamblaje del pili, una estructura delgada y flexible, mediando la adhesión a la matriz extracelular facilitando la interacción directa con el epitelio del huésped durante la infección en los pulmones u otros tejidos.

Este péptido tiene una fuerte afinidad para laminina, pero carece de afinidad significativa para la fibronectina y el colágeno tipo IV. Se encuentra presente en las cepas F11, H37Ra, H37Rv y a manera de proteína hipotética en la CDC1551; a pesar de ello todas se encuentran dentro del grupo CLS1094761 conservado en 10 miembros pertenecientes al género *Mycobacterium*, 3 de los cuales son parólogos y a través Cobalt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>) se estableció que estas proteínas poseen una identidad del 100%.

La proteína TCFG_13343 no contiene ningún dominio específico, más sin embargo pertenece a la familia Mycobacterial pili. Desde el punto de vista diagnóstico posee un gran valor debido a que solamente es secretada durante la infección tuberculosa, sin embargo a diferencia de las Esat-6, no desencadena un tipo de anticuerpo específico para ella. Por otro lado, tampoco es una proteína que pueda ser purificada desde un cultivo, lo que desestima su potencial como método de diagnóstico.

La proteína de invasión Rip es relacionada con los procesos virulentos del *Mycobacterium tuberculosis*. Utilizando Structure, Conserved Domains y Entrez Gene se determinó que esta proteína está constituida por dos dominios: el Spr y el COG3883. El primero actúa como una hidrolasa asociada a la pared celular, razón por la cual este dominio es conocido como una peptidoglucano hidrolasa, sin embargo su función específica no se encuentra definida.

El segundo motivo no se encuentra caracterizado por lo que es difícil dilucidar en que momento del proceso de invasión interviene este motivo, pero un aspecto relevante es que se encuentra conservado en las bacterias. A pesar del poco conocimiento de los motivos de esta proteína de virulencia, podemos suponer una relación entre la función peptidoglucano hidrolasa del Spr y el hecho que esta proteína esté vinculada con los factores promotores de la resucitación E y B.

Al conocer ambos aspectos se establece que la energía producto de la hidrólisis del peptidoglucano puede ser utilizada por los FprE y FprB como fuente de energía para iniciar el cambio del estado latente bacteriano al estado activo. Sin embargo esta proteína no representa una buena diana para tratamientos debido a que es bidominal, encontrando a uno poco definido disminuyendo su potencial terapéutico.

Por otro lado, debido a que no se encuentra presente en todas las cepas *mycobacterianas* tampoco puede ser utilizada para diferenciar de manera precisa la TB. Merece ser mencionado que las proteínas invasivas Rip dentro del genoma de las cepas analizadas, se encuentran en pares o tripletes, y además, todas pertenecen al CLS1082253 conservado en las *Mycobacterias* constituido por 23 miembros, 13 de los cuales son parólogos.

La proteína inmunogénica secretada Mpt63/Mpb63 forma parte del grupo de proteínas CLS1082618 conservadas en las *Mycobacterias* con 8 miembros, 4 de los cuales

pertenecen a las cepas F11, H37Ra, H37Rv y CDC1551, aunque en este último se encuentra como una proteína hipotética, sin embargo según el alineamiento 5.24 realizado en BLAST se establece que todas poseen una identidad del 100%, es decir son homólogas.

Mediante la búsqueda en Conserved Domains y Related Structure determinamos que el dominio de esta proteína inmunológica es el DUF1942, cuya función exacta es desconocida aunque un papel putativo o supuesto, incluye la participación en las interacciones huésped-bacteria que participan en la endocitosis o fagocitosis, posiblemente durante la internalización de las bacterias⁵² (Ver estructura 5.21 en copia digital).

Esta proteína podría constituir un blanco atractivo para el tratamiento y diagnóstico de la TB por encontrarse en tan sólo 8 miembros homólogos *mycobacterianos*, es decir es muy específica para estas bacterias, por poseer un sólo dominio y por ser secretada, sin embargo posee como inconvenientes el poco conocimiento que se tiene sobre su dominio básico DUF1942 y su ausencia en la cepa KZN1435, la cual es multirresistente.

También intervienen en la colonización del huésped las toxinas *mycobacterianas* que se encargan de atacar a la célula blanco causando daños en ella y pertenecientes a la superfamilia PIN, poseedoras de un dominio homónimo muy compactado a como puede apreciarse en la estructura 5.22 en la versión digital. Se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo del genoma de la cepa KZN1435, sin embargo según la denominación oficial de NCBI, solamente esta cepa contiene toxinas.

No obstante, mediante la búsqueda realizada en los dominios de las proteínas relacionadas con la virulencia en el medio bioinformático paralelo a NCBI, Tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/index.html>), identificamos 62 toxinas codificadas dentro del genoma del *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Cabe señalar que dentro de ambos genomas las toxinas se encuentran generalmente junto a una antitoxina o seguidas de otra toxina.

Se establece entonces, que desde la perspectiva de identificar potenciales objetivos terapéuticos y de diagnóstico, las toxinas no tienen gran relevancia por el poco

⁵²National Center for Biotechnology Information Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5222632>.

Consultado: Septiembre, 2009

conocimiento de sus dominios. Otro factor que disminuye la viabilidad de las toxinas es la distribución en las cepas *mycobacterianas*, ya que están ausentes en más de la mitad de las cepas analizadas.

5.2.2) Reguladores del crecimiento *mycobacteriano* dentro del macrófago: Existen proteínas virulentas que controlan el crecimiento y la adaptación del bacilo tuberculoso al medio hostil del huésped, por lo que son indispensables para que la infección por el *Mycobacterium tuberculosis* pueda persistir y desarrollarse la TB activa en el hospedero. Se incluyen aquí a todas esas proteínas que intervienen en los períodos altamente complejos de latencia y reactivación bacteriana.

Es probable que la regulación de la síntesis de la pared celular y la división celular son una respuesta a las diversas condiciones del medio ambiente esenciales para la infección de un huésped, ya que al regular libremente su capacidad de replicación puede mantenerse latente dentro de los macrófagos sin ser eliminado por el sistema inmunológico, y así podrá reactivarse cuando éste se encuentre inmunodeprimido.

El antígeno 84 perteneciente al grupo de proteínas que controlan el ciclo de división bacteriana: CLS1082802; se encuentra ampliamente conservado en los actinomicetales y está compuesto por 25 miembros distribuidos en 4 géneros y 25 organismos distintos. Está presente en las cepas: CDC1551, F11 y de manera hipotética en la H37Ra y H37Rv, sin embargo mediante el alineamiento 5.25 en BLAST se identificó que estas proteínas comparten una identidad del 100%.

A través de Conserved Domains y Pfam se determinó que estos antígenos poseen cuatro dominios; dos relacionados con la iniciación de la división celular: el DivIVA, el que también influye en la división de los cromosomas, y el DivIIA. Actualmente las estructuras de ambas proteínas no se encuentran disponibles. También tiene un dominio FliH, que se encarga del ensamblaje flagelar por medio del cual se realizan exportaciones a través de la membrana.

Este motivo se encuentra relacionado con los transportadores ABC de unión al ATP. Finalmente cuenta con un dominio ATP_synt_B responsable del transporte de protones a través de la membrana citoplasmática del bacilo. Consecuente a una búsqueda de estos dos

últimos dominios se encontraron en Structure Summary, estructuras similares a estos motivos.

En ellas se determina que la estructura FliH está rodeada de varios ligandos como el catión cadmio, el anión cloro, moléculas como carbitol y el compuesto complejo CID5496738, cuyo agente quelante es el cobalto, todo esto puede ser apreciado en la estructura 5.23 en la versión digital. Por el contrario, el ATP_syn_B es simple con una corta cadena lineal (Ver estructura 5.24). Por encontrarse ampliamente distribuida en los actinomicetales y por su ausencia en algunas cepas analizadas, no representa un blanco viable para este estudio.

El antígeno Hsp20 interviene en el crecimiento bacteriano así como también en un aspecto que caracteriza al *M. tuberculosis* como lo es su capacidad de permanecer latente dentro de los macrófagos de huésped. Esta proteína se encuentra en las cinco cepas tuberculosas analizadas, sin embargo en la cepa KZN1435 difiere en la longitud y su ausencia dentro de grupos de proteínas.

En cambio las Hsp20 de las cepas restantes se ubican en el CLS1082708 conservado específicamente en el *Mycobacterium* y formado por 12 miembros, 2 de los cuales son parólogos. Según el alineamiento 5.26 estas proteínas disponible en la copia digital, poseen una identidad del 100% y a través de Conserved Domains se reconoció el dominio de este antígeno, el ACD_sHSPs-like, de tipo pequeño e inductor del estrés, su estructura (5.25) esta disponible en la versión digital.

El factor de integración al huésped Mihf, de función específica no definida, se encuentra presente en la cepa H37Ra, H37Rv, F11 y KZN1435, sin embargo la última no se encuentra ubicada en ningún grupo de proteínas mientras que las 3 cepas restantes se ubican en el grupo de proteínas CLS1082182 conservadas en el *Complejo Mycobacterium tuberculosis* con un total de 6 proteínas 100% idénticas según el alineamiento 5.27 realizado en BLAST y localizado en la versión digital.

Con respecto al dominio prevalente y coordinador de las funciones de este factor, actualmente no se encuentra definido, por lo cual tampoco se cuenta con una estructura probable para este péptido. Por participar en la acogida de la bacteria al ambiente del huésped y su especificidad es notorio el potencial de esta proteína como un método de

diferenciación del *M. tuberculosis*, sin embargo por la carencia de información pasa a un segundo plano en una lista donde sólo los mejores candidatos son viables.

La proteína inmunogénica secretada Mpt64 o Mpt64/Mpb64 se encuentra agrupada dentro del CLS1082667 conservado en el *Mycobacterium* constituido por 29 miembros, 22 de los cuales son parólogos. Este péptido está dentro del genoma de todas las cepas estudiadas y según el alineamiento 5.28 en BLAST disponible en la copia digital, las Mpt64 del CDC15511, F11, H37Ra, H37Rv y KZN1435 poseen una identidad del 99% y 48% con la Mpt64 precursora del CDC1551, aunque las Mpt64 de las cepas son 100% idénticas.

La estructura y el dominio de esta proteína no se encuentran disponibles pero se conoce que se expresa únicamente cuando las células *mycobacterianas* se están dividiendo activamente. En virtud de este perfil de expresión particular, la MPT64 se encuentra actualmente en fase III de ensayos clínicos para evaluar su potencial para sustituir a la tuberculina o derivado proteico purificado, como el método de elección de para el diagnóstico de la infección de tuberculosis activa.

Lo interesante de la elección de esta proteína, es que aunque se encuentra conservada en el *Mycobacterium*, existen proteínas que son más específicas para el CMT, pero sin embargo no han sido desarrolladas como métodos de diagnóstico. Esto refleja la preferencia a una proteína que se encuentra presente en todas las cepas *mycobacterianas* sobrepuesta a una proteína que sea específica al complejo *mycobacteriano*.

La proteína secretada integral de membrana y de supervivencia intracelular Eis está presente en la cepa KZN1435, aunque también se encuentra de manera hipotética en la F11, CDC1551 y H37Rv. Cabe mencionar que esta proteína no se encuentra ubicada dentro de ningún grupo de proteínas. Según Conserved Domains contiene dos dominios básicos: el denominado Eis y el GNAT, ambos proporcionan la característica acetiltransferasa implicada en la supervivencia intracelular.

La importancia práctica de este péptido es que al actuar como una acetiltransferasa de la acetil-coenzima A, la convierte en acetoacetil-coenzima A, que es un importante intermediario metabólico en la oxidación de ácidos grasos, que por ser moléculas muy reducidas liberan mucha energía y que constituye un mecanismo clave para la obtención de

energía metabólica (ATP) por parte de los organismos aeróbicos. Cabe mencionar que la acetilación producida por esta proteína posee un sustrato desconocido.

La estructura del dominio Eis no ha sido determinada, sin embargo la del dominio GNAT se está disponible en Structure y se visualiza en la estructura 5.26 en la versión digital, ahí se diferencia una cadena compleja con sustrato desconocido a su lado. La Eis le confiere la herramienta necesaria para que genere energía para sus procesos vitales y de virulencia, permitiéndole sobrevivir al medio hostil del huésped y crear un ambiente en el que pueda desarrollarse, este medio se denomina granuloma.

La inhibición de este tipo de proteínas constituye una gran pérdida de la capacidad de adaptación al huésped para las *mycobacterias*, por lo cual podrían ser fagocitadas adecuadamente por el sistema inmunológico del huésped. De aquí radica su importancia como un posible objetivo quimioterapéutico para el control de la TB, sin embargo una gran desventaja es que no se encuentra presente en todas las cepas *mycobacterianas*.

Durante el proceso de latencia-reactivación intervienen las proteínas de unión o vinculantes a las penicilinas, ubicadas en la cara externa de la membrana citoplasmática y encargadas de catalizar la síntesis de la pared celular de peptidoglucano. Las que mejor se conocen y han sido descritas son 6 tipos: PBP1, PBP2, PBP3, PBP4, PBP5 y PBP6, cada una con diferentes funciones.

La PBP1 (PBP1a y PBP1b), PBP2 y PBP6 poseen actividad transpeptidasa, mientras que las PBP3, PBP4 y PBP5 se comportan como carboxipeptidasas. Las tres más importantes son la PBP1, PBP2 y PBP3 (PBP esenciales), siendo responsables respectivamente, de la elongación celular, mantenimiento de la forma bacteriana y tabicación o división celular⁵³, respectivamente.

Es importante señalar que la PBP5 posee baja afinidad natural a β -lactámicos, produciendo microorganismos con baja susceptibilidad a los mismos; también puede realizar la mayoría de las funciones de las PBP, así cuando un microorganismo presenta en su proteoma PBP3 y PBP5 y se inhibe la PBP3, el PBP5 produce que las células sigan creciendo.

⁵³ Goffin C.y Ghuysen J. (1998) Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. Revista de Biología Molecular. Volumen 62. Páginas 1079-1093.

Las proteínas de unión a las penicilinas están presentes en diversas cantidades en todas las cepas analizadas, aproximadamente de 3 a 5 proteínas por cepas, y se encuentran ubicadas dentro del CLS1185561 conservado en el CMT con un total de 7 miembros y en un COG categorizado como multifuncional. Según el alineamiento 5.29 en BLAST se determinó que la identidad de estas proteínas es del 99%, cuya variación se debe al tamaño de las mismas, que van de 517 a 539 aa.

Según Conserved Domains esta proteína consta de dos dominios básicos: el AmpC y Betalactamasa; ambos dominios actúan como mecanismo de defensa. El primero, el dominio AmpC, es una betalactamasa clase C, es decir una cefalosporinasa así como también tiene función de unión a la penicilina; por otro lado, el dominio betalactamasa está lejanamente relacionado con la D-alanina D-alanina carboxipeptidasa y pertenece a la superfamilia betalactamasa.

Mediante Structure se identificó la estructura del dominio betalactamasa, sin embargo la del dominio AmpC aún no se encuentra disponible. En la estructura 5.27 disponible en la versión digital, del motivo betalactamasa encontramos que está compuesto por una hélice alfa y una hoja beta, muy enlazadas entre sí. Como es de imaginarse estas proteínas constituyen un buen objetivo para el diagnóstico de la TB por encontrarse presente en todas las cepas *mycobacterianas* y por ser específica para el CMT.

Desde el punto de vista terapéutico también poseen potencial por ser constituyentes de membrana, contribuir a mantener la forma de la bacteria, formar parte en la tabicación y participar en otros procesos celulares; sin embargo, debido a que en muchos casos los bacilos tuberculosos poseen más de un subtipo de PBP, los cuales pueden variar en su función principal al actuar como carboxipeptidasas o como transpeptidasas, es difícil concebir la inhibición de todas ellas.

Los factores promotores de la resucitación Rpf (A, B, C, D y E) son los principales responsables del complejo proceso de reactivación del bacilo tuberculoso, sin embargo en la cepa CDC1551 se encuentran presente de manera hipotética, y en la cepa H37Ra, solamente se encuentra el factor de resucitación C, lo que resulta particularmente interesante al conocer que estas dos cepas son las menos virulentas según datos epidemiológicos.

Cabe aclarar que no todas las *mycobacterias* secretan estos Rpf al mismo tiempo, sino en cambio estos factores se activan en cadena, es decir en una infección latente existen *mycobacterias* que se encuentran en total estado latente y otros que se encuentran a un nivel mínimo de replicación; cuando por la acción de factores externos el huésped reduce su capacidad inmunológica, los bacilos que no están totalmente latentes inician la secreción de Rpf.

Esto estimula a las *mycobacterias* totalmente latentes e inician la secreción de más de estos factores, seguido de su replicación. El dominio predominante de los Rpf es el dominio transglicolasa, que la asemeja a un resto de oligosacárido con un sitio activo glutamato, importante para la reactivación. También presenta un claro bolsillo de fijación para una molécula de gran tamaño.

Sin embargo algunas Rpf, como la A y la B poseen dominios adicionales como el DUF348, de función desconocida y el G5, proveniente de la familia homónima vinculada a la función de adhesión. Las únicas Rfp que se sitúan en un grupo de proteínas son las proteínas rpfA, ubicadas en el CLS1081759 conservado en el *Mycobacterium* con 8 miembros integrantes en 8 organismos diferentes.

El porcentaje de identidad entre estas proteínas es del 100% (Ver alineación 5.30 en la versión digital) y según Conserved Domains todas ellas comparten el dominio transglicolasa, el cual participa en la síntesis del peptidoglucano para la elongación de la pared celular que es fundamental en la protección bacteriana, ya que es el responsable de la gran resistencia a las defensas del huésped y a los cambios en las presiones osmóticas de los diferentes compartimentos del mismo.

Por todos los aspectos analizados anteriormente se establece que esta proteína constituye un difícil objetivo para el desarrollo de drogas antituberculosas y para el diagnóstico, porque aunque es característica del género *Mycobacterium* y es componente de la membrana celular, no se encuentra en todas las cepas, varía en sus dominios y muchas de sus funciones son desconocidas. No se debe olvidar que su función transglicolasa lo capacita para desarrollar resistencia a muchos fármacos.

La proteína de estrés universal USP es una pequeña proteína bacteriana citoplasmática cuya expresión es mayor cuando la célula está expuesta a agentes de estrés y es la responsable de

la activación del *Mycobacterium*, incluyendo aspectos como el movimiento, la secreción, la producción de enzimas, la expresión génica, etc., como consecuencia de una alteración en la homeostasis celular, lo cual puede ocurrir por factores externos o internos⁵⁴.

Estas proteínas son las desencadenantes de las respuestas S.O.S. que se encargan de proteger a la bacteria de la acción de antibióticos y sistema inmunológico del huésped. Este péptido se encuentra ubicado en el grupo CLS1082385 integrado por 12 miembros distribuidos en 12 organismos y en un COG cuya clasificación funcional es intervenir como señal para los mecanismos de transducción.

La USP se encuentra en todas las cepas *mycobacterianas*, sin embargo en la F11, H37Rv, H37Ra y KZN1435 se presenta como proteína hipotética; cabe señalar que la identidad entre éstas es del 100% según el alineamiento 5.31 en la copia digital. Según Conserved Domains, la USP está compuesta por un dominio homónimo, compuesto por una cadena alfa y una beta, con ligandos como el ADP o adenosin difosfato y el etileglicol de acuerdo con la estructura 5.28 localizada en la versión digital.

Otra proteína que regula el crecimiento bacteriano es la proteína inhibidora de tabicación o de división celular, que es integral de membrana y participa en la inhibición de la formación del anillo Z que se produce cuando los microorganismos inician su reproducción y una señal procedente de una fuente desconocida hace entrar en escena una estructura poco dilucidada que aprieta como una liga la sección media de la bacteria.

La supresión de este proceso es utilizado por las *mycobacterias* cuando deben permanecer en estado de latencia temporal dentro de los macrófagos. La proteína inhibidora de la tabicación se encuentra presente en las todas las cepas estudiadas, sin embargo en la KZN1435 se encuentra como proteína hipotética, sin embargo todas pertenecen al PRK00159, grupo conservado en los actinomicetales y constituido por 35 miembros, 2 de los cuales son parólogos, distribuidos en 34 organismos diferentes.

Según la alineación 5.32 en BLAST se definió que poseen una identidad del 100% y mediante Conserved Domains se determinó que posee un dominio único UPF0233 no

⁵⁴ Gene Ontology. AmiGO. Disponible: <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0006950>.

Consultada: Octubre, 2009.

caracterizado. Aunque estas proteínas regulan un aspecto básico de la división celular, el poco conocimiento le resta potencial como una posible vía de diagnóstico y/o quimioprolifático.

El regulador de la persistencia *mycobacterial* *mprA* es una proteína de función específica desconocida pero vinculada a la regulación de los genes responsable del estrés ambiental, un aspecto importante a mencionar es que esta proteína forma parte del complejo o sistema MPRAB, el cual también contiene otro miembro, el *mprB*; los dos componentes se encargan de la regulación transcripcional.

Estas proteínas tiene la capacidad de detectar los cambios en el ambiente para controlar la velocidad y la cantidad de crecimiento celular, por lo que se cree que intervienen en procesos como latencia y reactivación *mycobacteriana*. La *mprA* es una proteína exclusiva para la cepa KZN1435 y no se encuentra ubicada dentro de ningún grupo de proteínas.

Posee tres dominios básicos: REC o dominio receptor de señales que posee un sitio de unión al ADN, el Trans_Reg_C que activa la fosforilación y posee un sitio de unión al ADN polimerasa y el Ompr de unión al ADN que se encarga del mecanismo de señalización para la transducción y transcripción. Esta proteína no es importante desde la perspectiva de nuestro análisis debido a que no se encuentra distribuida en todas las cepas estudiadas.

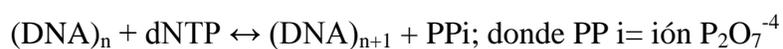
Sin embargo, resulta interesante este tipo de proteínas particulares y específicas con funciones altamente protectoras y reguladoras que se encuentran únicamente en cepas concretas, sobre todo si estas cepas son caracterizadas por ser multirresistentes y altamente virulentas como es el caso de la KZN1435.

5.2.3) Proteínas inducidas y correctivas del ADN bacteriano dañado: Dentro del genoma de las cepas del *M. tuberculosis* encontramos genes que se expresan en proteínas que se activan al detectar daños dentro del ADN bacteriano. Estas proteínas realizan correcciones y en algunos casos, realizan otras funciones adicionales. Entre estas encontramos a la proteína F inductora de daños al ADN *dinF* que está presente en todas las cepas analizadas y se ubica dentro del CLS1185745.

Este grupo se conserva en los actinomicetales y está integrado por 32 proteínas, además está dispuesta dentro de un COG caracterizado como mecanismo de defensa. Todas las *dinF* de las cepas *mycobacterianas* poseen una identidad del 100% según el alineamiento 5.33 en BLAST y sus funciones de anticargador y de transporte de drogas se deben a sus dos dominios básicos MatE para proteínas de eflujo o flujo hacia el exterior.

Actualmente estos dominios no se encuentran totalmente caracterizados y tampoco se cuenta con su estructura básica, sin embargo se vinculan con la capacidad de las bacterias para resistir a la acción de ciertos fármacos, cabe mencionar que carece de potencial trascendental para nuevos antituberculosos o diagnóstico debido a que no es una proteína específica del CMT y por no ser integral de la pared celular.

Dentro de esta clasificación encontramos también a la proteína P inductora de daños al ADN *dinP* o ADN polimerasa IV, que participan en el metabolismo y la mutagénesis del ADN, catalizando la reacción:



Se ubica dentro del PRK03352 conservado en actinomicetales y constituido por 25 proteínas, siendo 2 par3logas. Este grupo de proteínas PRK03352 se localiza en un COG cuyas funciones incluyen la replicaci3n, recombinaci3n y reparaci3n del ADN. Cabe mencionar que mediante la alineaci3n en BLAST de todas las proteínas *dinP*, se establece que tienen una identidad del 100% entre ellas (Ver alineamiento 5.34 en la copia digital).

Mediante Conserved Domains determinamos que los dominios que establecen sus funciones b3sicas son: el dominio Pol_IV-Kappa y el dominio IMS. El Pol_IV_Kappa es miembro de la familia Pol IV de ADN polimerasas y puede realizar el bloqueo de transcripci3n transversal para evitar lesiones al ADN, como en el caso del d3mero ciclobutano pirimidina resultado del da3o por rayos UV, la cual represente una elevada tasa de error.

A trav3s de Structure se determin3 que la estructura de este dominio es similar a una mano derecha con su palma, dedo pulgar y me3ique, lo que es com3n en otros tipos de familias de ADN polimerasas. Se identifican tambi3n claramente hojas y h3lices beta y alfa respectivamente, con ligandos como calcio y un 2',3'-Dideoxiadenosin-5'-difosfato, esto puede ser determinado en la estructura 5.29 de la versi3n digital.

El dominio IMS (Estructura 5.30 en copia digital) de la familia ImpB / MucB / Samb está implicado en la protección UV. Su estructura está dada por hélices alfa y hojas beta y las características de unión y reparación del ADN dañado y la actividad ADN polimerasa dependen de este dominio. Debido a que no es una proteína que pueda ser purificada de un cultivo o que participe directamente en la virulencia de la cepa posee un bajo potencial para los objetivos del estudio.

La proteína mutator mutT3, también conocida como 7,8-dihidro-8-oxoguanina -trifosfatasa, pertenece a la familia Nudix hidrolasa, de quien posee su dominio característico, por lo que es de esperarse que posea una función molecular de actividad hidrolasa. Es el responsable del sistema de extracción de una forma de guanina dañada por oxidación (7,8-dihidro-8-oxoguanina), que se lleva a cabo directamente desde el ADN y la piscina de nucleótidos.

Se encuentra presente en todas las cepas *mycobacterianas* y se ubica dentro del grupo CLS1081394 conservado en el *Mycobacterium* y constituido por 11 proteínas en 11 organismos diferentes. A su vez, este grupo de proteínas está comprendido dentro de un COG categorizado como multifuncional. Al igual que la anterior y por razones similares, esta proteína no representa un objetivo de diagnóstico y/o tratamiento.

5.2.4) Resistencia a antibióticos y metales pesados: Las *mycobacterias* son una clase de microorganismos que sobreviven en el organismo huésped de múltiples maneras: se han adaptado la vida dentro de un macrófago, por lo que dependen de la respuesta inmune del hospedero; codifican toxinas que producen daños dentro del mismo para crear un medio óptimo de desarrollo.

Han desarrollado un complejo mecanismo para permanecer en latencia hasta esperar que el sistema inmunológico se encuentre deprimido, para poder reactivarse y producir una infección secundaria que, en la mayoría de los casos, es más agresiva y atípica que la primoinfección, como en el caso de las PVVS. Y añadiéndose a todo lo anterior, encontramos como un factor agravante a la capacidad de los bacilos tuberculosos para desarrollar resistencia a fármacos e incluso a metales pesados.

El hecho más desventajoso de esto, es que son los mismos antibióticos los que provocan que el sistema *mycobacteriano* desarrolle una respuesta S.O.S, que la prepare para

eliminarlos y sobrevivir de manera eficiente. Como es de imaginarse, esto constituye un gran problema terapéutico, sobre todo en los tiempos actuales donde la coinfección VIH/SIDA/TB constituye una fuente de TB altamente virulenta, atípica y multirresistente.

5.2.4.1) Resistencia a AB: Las proteínas fijadoras o de unión a la penicilina además de intervenir en la latencia y reactivación de las *mycobacterias*, también codifican resistencia natural a fármacos betalactámicos como las penicilinas y cefalosporinas. En el pasado, estas proteínas de la membrana bacteriana se unían a la penicilina mediante enlaces covalentes.

Sin embargo debido al uso inadecuado de estos fármacos, el *Mycobacterium* logró modificar estos sitios de unión a las penicilinas y a otros betalactámicos, para poder evitar la inhibición de su pared celular y por ende, su destrucción. Esta propiedad se transfirió al inicio mediante plásmidos pero con el pasar del tiempo las bacterias la transferían de manera vertical, por lo que ahora se considera como un tipo de resistencia natural.

La betalactamasa, también conocida como betalactamasa clase A BLAC, son proteínas fijadoras de betalactámicos con actividad preferente sobre la penicilina. Estas enzimas catalizan la hidrólisis irreversible del enlace amida del núcleo betalactámico de estos antibióticos, transformándolos en compuestos inactivos incapaces de ejercer su acción. Se encuentra en todas las cepas *mycobacterianas* y se ubican dentro del CLS1082741.

Este grupo es conservado en los actinomicetales y formado por 10 proteínas distribuidas en 10 organismos diferentes. Este grupo a su vez, se encuentran dentro de un COG caracterizado como mecanismo de defensa. A pesar de que son denominadas con nombres sinónimos, estas proteínas poseen una identidad del 100%, establecido en el alineamiento 5.35. Su función penicilinasasa se debe a un dominio homónimo cuya estructura está formada por hélices alfa y hojas betas muy compactadas (Estructura 5.31 en la copia digital).

Dentro de las betalactamasas se encuentran también a las denominadas proteínas parecidas a las mismas, de función desconocida y con un dominio de la superfamilia metalo betalactamasa, las cuales se localizan en el grupo CLS1081387 conservado en el *Mycobacterium* e integrado por 20 miembros en 20 organismos diferentes.

Además forma parte de un COG caracterizado por funciones predecibles de hidrolasas. En las cepas analizadas, estas proteínas se encuentran en la F11, H37Ra, H37Rv y KZN1435; en la cepa CDC1551 se encuentra en forma de familia metalo betalactamasa. Todas estas proteínas poseen un porcentaje de identidad del 100% (Ver alineamiento 5.36 en la copia digital) y en la estructura 5.32 se determina que esta formada por una cadena alfa y una beta con ligandos como el ión zinc, glicerol y el compuesto C6L.

Debido a que estas proteínas son secretadas extracelularmente por la bacteria, son ampliamente conocidas tanto por su secuencia y estructura como por su mecanismo de acción y por encontrarse presente en todas las cepas *mycobacterianas* analizadas, podría constituir un método de diagnóstico; sin embargo según nuestro análisis presenta la desventaja de encontrarse en otras bacterias.

Por otro lado, la inhibición de esta proteína contribuiría a disminuir parcialmente la resistencia de estas bacterias a betalactámicos, porque hay que recordar que aunque las betalactamasas intervienen en la resistencia, también existen otras proteínas vinculadas a ésta. Por todo lo anterior se determinó que estas proteínas no representa un punto clave para la quimioprofilaxis o para el diagnóstico de la TB.

La proteína constituyente de la pared celular bifuncional de unión a la penicilina 1A/1B ponA1, insensible a la penicilina, es considerada como bifuncional por actuar como carboxipeptidasa y transpeptidasa participando en la formación de las cadenas de peptidoglucano de la pared celular y realiza su función de resistencia a la penicilina al alterar el sitio de unión a la penicilina.

Se encuentra en todas las cepas tuberculosas analizadas, sin embargo en la CDC1551 se encuentra a manera de una proteína de unión a la penicilina. Integran el CLS1094055 conservado en las corinobacterias con 37 proteínas integrantes, 8 de las cuales son parálogas distribuidas en 33 organismos y a su vez este grupo se ubica en un COG caracterizado funcionalmente como participante en la biogénesis de la membrana y pared celular.

La identidad de estas proteínas entre sí es de un 99% debido a diferencias en sus longitudes y a espacios en blanco o gaps, sin embargo todas poseen la doble funcionalidad característica según el alineamiento 5.37 realizado. Mediante Conserved Domains y

Structure Related determinamos sus dominios específicos: el dominio MrcB que es una carboxipeptidasa de membrana de unión a la penicilina que participa en la biogénesis de la envoltura celular, es decir la membrana externa.

El dominio transpeptidasa característico de la superfamilia de proteínas transpeptidasa de unión a las penicilinas, posee una estructura formada por cadenas alfa y beta muy entrelazada entre sí y rodeado del ligando ácido sulfúrico como puede ser visualizado en la estructura 5.33; y finalmente el dominio Transgly, propio de la superfamilia transgly o transglicosilasa, en cuya estructura (5.34) se diferencian claramente las cadenas alfa y beta no muy entrelazadas y la presencia de un ligando etanodiano (C₂O₂).

Una proteína que se relaciona con la proteína ponA1, es la proteína bifuncional de unión a penicilina asociada a la membrana 1A/1B ponA2, la cual comparte funciones con la ponA1 por lo que asumimos, y se verificó en Conserved Domains, también comparten los tres dominios anteriores. Sin embargo, esta proteína posee la peculiaridad de regular la forma bacteriana.

Mediante el análisis con la herramienta antes mencionada, se determinó que esta función adyacente se debe a la presencia de un dominio PASTA_pknB, cuyo nombre se deriva de PBP y las cadenas del dominio asociado de serina/quinasa treonina (en inglés, PBP and Serine/Threonine kinase Associated domain chains). El PknB es un miembro de un grupo de relacionadas quinasas sensores transmembrana, reguladores de la forma celular y cuya estructura disponible en la versión digital en la estructura 5.35.

La proteína que se encarga parcialmente de evitar la acción de la pirazinamida, y por ende de crear *Mycobacterias* resistentes a ella, es la pirazinamidasa/nicotinamidasa pncA, que convierte la droga antituberculosa pirazinamida (PZA) en su forma activa, el ácido pirazinoico (POA). Esta proteína se encuentra integrando el grupo o cluster de proteínas CLS1082720, conservado en nueve proteínas de nueve organismos distintos dentro del *Mycobacterium*.

A su vez, este dominio está organizado dentro del COG categorizado funcionalmente por participar en la biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo. En las cepas analizadas, esta proteína se encontró dentro del genoma de cada una de ellas, sin embargo lo interesante de esto es que no todas las cepas son resistentes, o al menos no

existen datos que señalen su resistencia hasta el momento a la pirazinamida. La única cepa que presenta resistencia a fármacos es la cepa KZN1435.

Cabe mencionar que la identidad de estas proteínas entre sí es alta, sin embargo es variante. Para las cepas F11, H37Ra y H37Rv con respecto a la CDC1551 es de 100% y para la KZN1435 es del 99%, esta última varía por un espacio en blanco o gap según el alineamiento 5.38 en la copia digital. Por la gran similitud entre estos péptidos se determinó que la divergencia entre éstas no es el factor determinante por la cual esta enzima produce resistencia en unas cepas y en otras no.

Por lo tanto, cabe la posibilidad de un mecanismo sinérgico que contribuya con las *pncA* para lograr la resistencia total a la pirazinamida, una droga antituberculosa de primera línea. En la estructura 5.36 se puede apreciar que la *pncA* está constituida por hélices alfa, hojas beta y un ligando de ión zinc. Después de todo lo antes mencionado determinamos que esta proteína no posee valor desde el punto de vista de este estudio.

Las proteínas inductoras de resistencia a la isoniazida *iniA*, *iniB* e *iniC* se encuentran distribuidas en las cepas *mycobacterianas*, presentándose en el orden *iniB*, *iniA* e *iniC* y aunque su función concreta es desconocida, se sabe que además de producir resistencia a la isoniazida también lo hacen para el etambutol. Las proteínas *iniB* se localizan en todas las cepas analizadas, sin embargo en la CDC1551 son hipotéticas.

Estos péptidos se ubican dentro del CLS1081330 conservado en el CMT integrado por 7 proteínas miembros y distribuidas en 7 diferentes organismos. La identidad entre las *iniB* de las cepas F11, H37Ra, H37Rv y KZN1435 es de 100%, y la proteína de la cepa CDC1551 posee un 99% de identidad con las otras *iniB* (Alineamientos 5.39 en la versión digital). Las *iniA* integran el CLS1185335 conservado en los actinomicetales con 29 proteínas miembros, 6 de las cuales son parólogos; todas éstas se distribuyen en 26 organismos diferentes.

A su vez este grupo se ubica dentro de un COG caracterizado por ser multifuncional. La identidad de estas proteínas es del 100%, incluso para la *iniA* hipotética de la CDC1551 (Alineamiento 5.40 en la copia digital). Su estructura está dada por sus dos dominios básicos determinados mediante Conserved Domains: el COG0699 que le proporciona a la proteína actividad GTPasa, es decir catálisis de la hidrólisis de la molécula guanosín

trifosfato y el dominio Era_like que le confiere a la iniA un lazo (loop) de unión al fosfato (Estructura 5.37).

Por último la proteína iniC pertenece al CLS1185336 conservado en 26 organismos de los actinomicetales e integrado por 27 proteínas, siendo 2 parólogas. Se encuentra presente dentro del genoma de todas las cepas tuberculosas, aunque en la cepa CDC1551 se encuentra de manera hipotética. Todas las iniC poseen una identidad del 100% como se visualiza en el alineamiento 5.41 en la versión digital. La estructura de estas proteínas, al igual que sus funciones, es definida por sus dominios.

La diferencia entre las funciones de estas proteínas se debe a la divergencia en su secuencia, la iniB posee un 27% de identidad con respecto a la iniA. En la alineación 5.42 la iniB e iniC comparten un 27% de similitud y la iniA posee un 34% de identidad con la iniC (Alineación 5.43). Cabe mencionar que estas proteínas de resistencia no constituyen un objetivo viable en esta investigación por la gran divergencia entre ellas.

La proteína de resistencia a antibióticos se encuentra presente en todas las cepas *mycobacterianas*, aunque en la cepa CDC1551 se halla de forma hipotética, a pesar de ello la identidad de estas proteínas en dichas cepas es del 100% (Ver alineación 5.44 en la copia digital). Esta proteína se ubica en el CLS1082937 conservadas en el CMT con 7 proteínas miembros distribuidas en 7 diferentes organismos. Mediante Conserved Domains y Structure se determinó que el dominio regulador es metallo_dependent_hydrolases.

Este dominio es la razón por la cual esta proteína es ubicada dentro de la familia de hidrolasas dependientes de metales, también llamada superfamilia amidohidrolasa y le proporciona a la proteína la capacidad de hidrolizar enlaces de grupos aminos, principalmente los correspondientes a antibióticos. En la estructura 5.38 de la copia digital se diferencian hojas beta rodeadas de hélices alfa y en el centro el ión metálico conservado asemejándose a un barril.

Esta estructura es conservada en la gran mayoría de los miembros de esta familia, principalmente el sitio de unión al metal conservado, agregándose en ocasiones cuatro histidinas y un residuo de ácido aspártico. Luego de conocer el sitio de unión de esta proteína, determinamos que el mecanismo de acción de esta proteína se basa en que el ión o

iones metálico extraigan un protón una molécula de agua para un ataque nucleofílico de sobre el sustrato.

5.2.4.2) Resistencia a metales pesados: A pesar que las bacterias requieren como nutrientes algunos metales como el cobre, zinc, cobalto y otros como nutrientes, las necesitan en cantidades muy pequeñas debido a que en altas concentraciones intracelulares, estos metales son tóxicos. Para evitar esta toxicidad las *mycobacterias* han desarrollado mecanismos de defensas que expulsan a estos metales.

Dentro del genoma de las cepas analizadas encontramos las siguientes proteínas, cabe mencionar que algunas de ellas se encuentran únicamente como proteínas integrales de membrana: proteína de resistencia al telurio *terC*, proteína de resistencia al arsénico/arsenato reductasa *arsC*, proteína transportadora para resistencia al mercurio supuesta y el antígeno soluble secretado MPT53 precursor, el cual proporciona un mecanismo de resistencia al cobre.

Sin embargo desde el punto de vista de nuestro estudio, las primeras tres proteínas no representan un objetivo idóneo, porque a pesar que se encuentran en todas las cepas y en algunos casos son integrales de membrana, estos mecanismos de defensa se activan para la vida extracelular del *Mycobacterium tuberculosis*, debido a que es un microorganismo intracelular facultativo.

Por otro lado el antígeno soluble secretado MPT53 constituye un objetivo viable debido a que este promueve la resistencia al cobre, metal que sí se encuentra en cantidades considerables dentro del organismo humano por ser un nutriente esencial y por no ser tóxico en bajas concentraciones (120 a 150 mg / persona); más sin embargo es un elemento tóxico para los microorganismos por poseer propiedades bactericidas.

Este péptido es un componente celular antigénico secretado proveniente de la familia similar a *TlpA*, presente en las cepas estudiadas y pertenece al CLS1083394 formado por 13 proteínas distribuidas en 13 organismos diferentes del género *Mycobacterium*; a su vez, este cluster o grupo se encuentra ubicado dentro de un COG categorizado por ser multifuncional.

Estas proteínas varían un poco en sus secuencias y mediante el alineamiento 5.45 en BLAST, se determinó que poseen una identidad del 100% entre ellas. A través de Structure y Conserved Domains se estableció que las funciones de estas proteínas están dadas por su dominio TlpA_like_ScsD_MtbDsbE, motivo por el cual este péptido se ubica dentro de la familia TlpA y es responsable de las propiedades supresoras de la sensibilidad D al cobre (ScsD).

En la estructura 5.39 se pueden apreciar que esta proteína está constituida por hojas beta y hélices alfa no compactadas entre sí, además de su sitio de vinculación con la histidina. Por todo lo anterior, hemos establecido que esta proteína es un blanco ideal para el desarrollo de un tratamiento, ya que al inhibirla las concentraciones sanguíneas de cobre, que son de 1 a 3 mg/litro, podrían encargarse de dañar e incluso eliminar a la *mycobacteria* ya que concentraciones tan pequeñas como 0.99 a 0.5 mg/litro son tóxicas para las bacterias.

5.2.4.3) Transportadores: El transporte de membrana es el conjunto de mecanismos que regulan el paso de solutos, como iones y pequeñas moléculas, a través de membranas plasmáticas. Dicha propiedad se debe a la selectividad de membrana, una característica que las faculta como agentes de separación específica de sustancias de distinta índole química.

Este mecanismo es utilizado por las *mycobacterias* para transportar antibióticos y otros compuestos, y así asegurar su subsistencia en el ambiente del huésped. Existen muchos tipos de transporte a través de membrana, algunos dependen de factores como el gradiente de concentración, tamaño, carga neta de la molécula a ser transportada y requerimientos de energía o ATP.

Dentro del genoma del bacilo tuberculoso encontramos a transportadores que pueden movilizar diversos iones y moléculas según la direccionalidad; así encontramos a los simcargadores, unicargadores y anticargadores. También existen bombas que son proteínas que hidrolizan ATP para transportar a través de una membrana un determinado soluto a fin de generar un gradiente electroquímico.

Las bombas más utilizadas por el *mycobacterium* son las efflux o de flujo hacia el exterior que constituyen el mecanismo de resistencia más común y es responsable del transporte de compuestos tóxicos como las drogas, toxinas y los detergentes. Los diversos estudios

realizados a estas bombas de flujo hacia el exterior sugieren que éstas tienen un papel fisiológico al conferir resistencia a las sustancias naturales producidas por el huésped incluyendo hormonas, bilis y las moléculas de defensa del anfitrión.

Estos sistemas de transporte pueden compartir dominios con las familias: MFS (Superfamilia de los principales facilitadores), SMR (Superfamilia de resistencia a múltiples drogas pequeñas), MATE (Familia de extrusión a compuestos tóxicos y multidrogas), ABC (Superfamilia de cintas fijadoras al ATP) y RND (Familia de resistencia a la división celular por nodulación).

En el genoma de las cepas *mycobacterianas* se encuentran codificadas 16 proteínas encargadas de transporte por unión al ATP o por bomba de eflujo o flujo hacia el exterior, así encontramos:

- Antígeno rico en prolin pra.
- Proteína de flujo hacia afuera para multirresistencia a drogas integral de membrana EmrB.
- Transportador ABC de membrana permeable para transporte de antibióticos.
- Proteína integral de membrana para el transporte de múltiples drogas Mmr.
- Proteínas transportadoras ABC de unión al ATP transmembrana para transporte de drogas.
- Proteína de flujo hacia el exterior, transportadora ABC para resistencia a antibióticos.
- Proteína de unión al ATP transportadora ABC para macrólidos.
- Proteína de unión al ATP transportadora ABC para resistencia a múltiples drogas.
- Proteína de unión al ATP transportadora ABC de antibióticos.
- Proteína fijadora del ATP, con flujo hacia el exterior, transportadora ABC para resistencia a antibióticos.
- Proteínas de unión al ATP transportadoras ABC para drogas.
- Proteínas transportadoras ABC de unión al ATP para transportar antibióticos.

- Proteínas transportadoras ABC de unión al ATP transportadoras de antígenos-O/lipopolisacáridos rfbE.
- Proteínas transportadoras ABC integrales de membranas transportadoras de antígenos-O/lipopolisacáridos rfbD.
- Tap Proteína de flujo hacia el exterior para multirresistencia a drogas.
- Transportador de drogas.

Estos mecanismos son utilizados para producir resistencia a antibióticos. En el caso de las bombas de eflujo son producto de una mutación de la bacteria tornándose capaz de eliminar el antibiótico por los canales que se utilizaba para los desechos. Mediante este sistema el *M. tuberculosis* muestra resistencia a los macrólidos, tetraciclina, rifampicina, etambutol, etionamida, cloranfenicol, quinolonas y betalactámicos, entre otros.

Desde la perspectiva de nuestro análisis, estas proteínas no son un objetivo factible debido a que estas proteínas no son constituyentes de membrana, a excepción de las permeables para antibióticos y/o las proteínas transmembrana o integrales de membrana; además ninguna se encuentra presente en todas las cepas, no son secretadas y no son específicas para el CMT o la especie *Mycobacterium* y sobre todo por la complejidad de inhibir la formación del poro de eliminación.

Sin embargo mencionaremos algunos de los dominios presentes en estas proteínas, y que cabe mencionar, se encuentran compartidos por éstas. Así, mediante la búsqueda en Structure, Related Structure, Conserved Domains y Related Domains encontramos que estos transportadores se ubican dentro de grupos considerados multifuncionales tales como: CLS1185414, CLS1082063, CLS1082576, CLS1185664, CLS1083690, CLS1185495, CLS1082432, CLS1082235 y CLS1185558.

De igual manera determinamos que conservan dominios como: MdlB del sistema de transporte de múltiples drogas del tipo ABC, dominio de la superfamilia de transportadores transmembrana ABC que representa una unidad de seis hélices transmembrana, el dominio de la superfamilia nucleótido trifosfatasa (NTP-asa) P-loop (bucle o lazo), caracterizados por conservar un motivo de unión a un fosfato de nucleótidos también conocido como el motivo Walker.

El dominio P-loop, bucle o lazo que participan en diversas funciones celulares, el dominio ATPasa (TagH) característico del sistema de transporte del fosfato poliol, que es un tipo de ABC para polisacáridos, el Uup característicos de los componentes de la ATPasa de los transportadores ABC con dominios ATPasa duplicado, el ABCF_EF-3 o factor de elongación 3 (EF-3).

La localización y distribución de todas las proteínas virulentas expuestas anteriormente se encuentran sintetizadas en la tabla 5.9 en donde se ubican las cantidades totales de cada una de las cinco cepas analizadas; incluimos en esta lista las 62 antitoxinas y las 62 toxinas determinadas en tuberculist, una herramienta bioinformática alternativa y paralela de NCBI encargada del estudio específico del genoma general del *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabla 5.9: Distribución y total de proteínas virulentas en las cepas analizadas del *Mycobacterium tuberculosis*.

Proteína virulenta	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Antígeno MPT70	1		1	1	1
Antígeno supuesto		1			
Antígeno 84	1				
Antígeno células T (Antígeno supuesto)	1	1	1		
Antígeno Cfp10A			1	1	1
Antígeno Cfp2			1	1	1
Antígeno Cfp6		1	1	1	1
Antígeno de bajo peso molecular 7 ESXH (10 kDa antígeno) (CFP-7) (proteína TB10.4)				1	1
Antígeno de bajo peso molecular cfp2		1			
Antígeno de bajo peso molecular para células T TB8.4				1	1
Antígeno EsxB			1		
Antígeno Esxh			1		
Antígeno filtrado de cultivo de 10kDa EsxB		1		1	1
Antígeno Hsp20	1	1	1	1	1
Antígeno rico en prolina de 28kDa	1	1	1	1	
Antígeno rico en prolina pra	1	1	1	1	
Antígeno secretado, supuesto	4			1	

Proteína virulenta	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Antígeno soluble secretado MPT53 precursor	1	1	1	1	1
Antígeno, esterasa 85-A, supuesto	1	1	1	1	1
Antígeno, esterasa 85-B, supuesto	1	1	2	1	1
Antígeno, esterasa 85-C, supuesto	1	1		2	1
Antitoxina				62 (Tuberculist)	59
arsC proteína de resistencia al arsénico/arsenato reductasa	1	1	1	1	1
Bacteriocina CFP29	1	1	1	1	1
Betalactamasa	1		1		
Betalactamasa clase A BLAC		1		1	1
Citotoxina / Hemolisina TlyA	1		1	1	1
Esat-6	1	18	19	17	21
Factor de integración al huésped MihF		1	1	1	1
Factor de virulencia	3				
Factor promotor de resucitación rpfA		1		2	1
Factor promotor de resucitación rpfB		1		2	1
Factor promotor de resucitación rpfC		1	1	2	1
Factor promotor de resucitación rpfD		1	1	1	1
Factor promotor de resucitación rpfE		1		1	1
Factor trigger	1	1	1	1	1
Hemolisina					2
Hidroxilaminobenzeno mutasa hab					1
Lipoproteína antigénica de 19 kDa, precursora		1		1	1
Lipoproteína antigénica, 22 kDa	1				
MRA_1465 Transportadores ABC permeables para antibióticos			4		
Péptido parecido a la tuberculina		1	1	1	1
Pirazinamidasas / nicotinamidasas	1	1	1	1	1
Precursor de cutinasa Cfp21		1	1	1	1
Proteína inmunogénica Mpt64	2	1	1	1	1
Proteína antigénica de bajo peso molecular 6 cfp6		1			

Proteína virulenta	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Proteína antigénica mpt51/mpb51 secretada FbpD		1	1	1	1
Proteína antigénica secretada		1	1	1	
Proteína bifuncional de unión a la penicilina 1A/1B ponA1: Insensible a la penicilina		1		1	1
Proteína bifuncional de unión a la penicilina asociada a membrana 1A/1B ponA2			1	1	1
Proteína de estrés universal	8				
Proteína de flujo hacia afuera para multirresistencia a drogas integral de membrana EmrB		1		1	1
Proteína de flujo hacia el exterior, transportadora ABC para resistencia a antibióticos	3				
Proteína de invasión		3	2	3	
Proteína de resistencia a antibióticos		1	1	1	1
Proteína de resistencia al alcanfor CrcB	2				
Proteína de resistencia al alcanfor CrcB1			1		
Proteína de resistencia al alcanfor CrcB2			1		
Proteína de supervivencia intracelular aumentada eis					1
Proteína de unión a la penicilina 1	1				
Proteína de unión a la penicilina 4	2		1		
Proteína de unión a la penicilina DacB1		1	1	1	1
Proteína de unión al ATP transportadora ABC para macrólidos			3		1
Proteína de unión al ATP transportadora ABC para resistencia a múltiples drogas			1		
Proteína de unión al ATP transportadora ABC de antibióticos			2		
Proteína F inducible por daños al ADN dinF	1	1	1	1	1

Proteína virulenta	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Proteína inductora de resistencia a la isoniazida iniA		1	1	1	1
Proteína inductora de resistencia a la isoniazida iniB		1	1	1	1
Proteína inductora de resistencia a la isoniazida iniC		1	1	1	1
Proteína inhibidora de tabicación	1	1	1	1	
Proteína inmunogénica Mpt63		1	1	1	
Proteína integral de membrana para el transporte de múltiples drogas Mmr			2	1	
Proteína mutator mutT3		1	1	1	1
Proteína P inducible por daños al ADN dinP	1	1	1	1	1
Proteína parecida a la betalactamasa		1	1	1	1
Proteína similar a la hemolisina		1	1	1	
Proteína transportadora para resistencia al mercurio, supuesta	1	1	1	1	1
Proteína utilizadora de mycobactina viuB					1
Proteína fijadora de penicilinas	5	4	3	4	3
Proteína fijadora del ATP, con flujo hacia el exterior, transportadora ABC para resistencia a antibióticos	2				
Proteínas de unión al ATP transportadoras ABC para drogas			3		
Proteínas transportadoras ABC de unión al ATP para transportar antibióticos					2
Proteínas transportadoras ABC de unión al ATP transmembrana para transporte de drogas				1	6
Proteínas transportadoras ABC de unión al ATP transportadoras de antígenos-O/lipopolisacáridos rfbE		1	1	1	1
Proteínas transportadoras ABC integrales de membrana transportadoras de antígenos-O/lipopolisacáridos rfbD		1	1	1	

Proteína virulenta	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Regulador de la persistencia mycobacterial mprA					1
Regulador transcripcional reguladora de virulencia VirS		1		1	1
Tap Proteína de flujo hacia el exterior para multirresistencia a drogas	1				
TBFG antígeno secretado L-alanina dihidrogenasa ALD (antígeno de 40 kDa)		1		1	
terC proteína de resistencia al telurio (terC)	1	1	1	1	1
Toxina				62 (Tuberculist)	61
Transportador ABC de membrana para transporte de antibióticos					2
Transportador de drogas	7		1		
Total	63	75	88	84	206

Fuente: National Center for Biotechnology Information (NCBI). Elaborado por: Equipo de Investigadoras.

A través de la comparación de todas las proteínas virulentas reflejada en la tabla 5.10 basándose en los parámetros o criterios ya establecidos en la tabla 5.2, es decir en la especificidad, porcentaje de identidad, localización, momento, conocimiento de dominios y secreción, se determinó que las Esat 6 tienen un alto potencial para el desarrollo de métodos de diagnóstico para la TB, ya que aunque posee la desventaja del poco conocimiento de sus dominios, puede ser aislada de cultivo y está codificada en todas las cepas analizadas.

Tabla 5.10: Selección de las proteínas virulentas con mayor potencial para el desarrollo de drogas y/o métodos de diagnóstico para la tuberculosis (TB).

Proteína	Especificidad	Porcentaje de identidad	Localización	Momento	Conocimiento de dominios	Secreción
CFP 2	+++	++	+++	+++	-	+++
TB 8.4	++	+++	+++	-	-	-
CFP 7	+++	+++	+++	-	++	+++
ESAT 6	+++	++	+++	+++	++	+++
Antígeno 85 A, B Y C	++	-	+++	+++	+++	+++
Mce	++	++	-	+++	+++	+++
Mpt 70	++	-	+++	-	+++	-
Citoxina / Hemolisina TlyA (Hemolisina)	-	-	+++	-	++	+++
Tigger	-	+++	-	-	+++	-
TBFG_13343	++	+++	-	+++	-	+++
Rip	+++	-	-	-	++	-
Mpt 63	++	+++	+++	+++	++	+++
Toxinas	++	-	-	-	+++	+++
Antígeno 84	-	+++	-	-	+++	+++
Hsp 20	++	+++	-	-	+++	-
Mihf	++	+++	-	-	-	-
Mpt 64	+++	++	+++	+++	++	+++
Eis	++	-	+++	-	++	-

Proteína	Especificidad	Porcentaje de identidad	Localización	Momento	Conocimiento de dominios	Secreción
PBP	++	++	+++	+++	++	-
Rpf	++	+++	-	-	+++	+++
USP	++	+++	++	+++	+++	-
Inhibidora de la tabicación	-	+++	+++	-	-	-
MprA	-	-	-	+++	-	-
DinF	++	+++	-	-	++	-
DinP	++	+++	-	-	+++	-
MutT3	+++	-	-	-	+++	-
BLAC	++	+++	+++	++	+++	+++
Proteína parecida a la Betalactamasa	++	+++	+++	+++	+++	+++
Proteína de unión a la penicilina 1A/1B ponA1	++	++	+++	-	+++	-
Proteína de unión a la penicilina ponA2	++	++	+++	-	+++	-
Pirazinamidasas / Nicotamidasas	+++	++	-	+++	-	+++
Ini A, B y C	+++	+	-	+++	++	-
Proteína de resistencia a antibióticos	+++	+++	+++	+++	+++	-
Mpt 53	+++	+++	+++	+++	+++	-

Fuente: National Center for Biotechnology Information. Elaborada por: Equipo de investigadoras.

La proteína Cfp7 es altamente viable por razones similares, además es un posible objetivo de inhibición porque se localiza en la pared celular al ser expresada. La Cfp2 constituye una nueva posibilidad para el diagnóstico *in vivo* alternativo a la PPD por ser un antígeno precozmente secretado y filtrado de cultivo; además de evitar el principal inconveniente de la tradicional PPD: el desarrollo de tuberculosis primaria en pacientes inmunocomprometidos.

Otra proteína factible como diagnóstico es la Mpt63 que a pesar de su ausencia en la KZN1435 es altamente específica por encontrarse en tan sólo 8 miembros *mycobacterianos* y en forma homóloga; además se identificaron como altamente viables para el desarrollo de terapéuticos a las proteínas de resistencia a antibióticos y la Mpt53 tanto por su localización como por su especificidad e identidad, aunque no son secretadas.

Así mismo identificamos a la BLAC y a la proteína parecida a la betalactamasa a pesar de poseer una especificidad buena por no ser exclusivas para el CMT. Los antígenos 85 A, B y C que a pesar de poseer muy buenas puntuaciones en parámetros reflejados en la tabla 5.10, presenta el inconveniente del poco porcentaje de identidad. También se pueden apreciar muchas otras proteínas con buenos puntajes en ciertos parámetros pero una mala especificidad, uno de los parámetros de mayor trascendencia.

Cabe señalar que la proteína Mpt64 presenta muy buena puntuación en los parámetros que establecimos, sobre todo en la especificidad y que durante la realización de esta investigación encontramos que actualmente se encuentra en estudios para su utilización como métodos de diagnóstico alternativo a la tuberculina, razón que reafirma la utilidad del análisis bioinformático del genoma del *M. tuberculosis* para determinar los mejores métodos de diagnóstico y dianas de drogas para el tratamiento de la TB.

5.2.5) Patogenicidad del *Mycobacterium tuberculosis* a nivel proteico.

Como es conocido, muchos aspectos de la infección tuberculosa a nivel celular y molecular permanecen desconocidos y uno de nuestros objetivos es colaborar con el conocimiento de ello, por lo que a través del análisis bioinformático genómico del *M. tuberculosis* se determinó la implicancia de las proteínas en la virulencia y reactividad de las cepas,

agrupándolo en la tabla 5.12. La esquematización de estas proteínas contribuirá a la comprensión de la patogenia del bacilo tuberculoso.

Por razones de espacio se utilizarán las leyendas establecidas en la tabla 5.11 para cada proceso virulento en el que intervienen estas proteínas. Dentro de estos procesos encontramos que la invasión se encuentra dividida en tres etapas diferentes: la adherencia a la célula hospedera, el ataque a la misma y el crecimiento bacteriano. Cabe mencionar que las proteínas generalmente realizan más de uno de estos procesos virulentos.

Tabla 5.11: Leyendas de los procesos virulentos en los que intervienen las proteínas virulentas codificadas en el genoma de las cepas *mycobacterianas* analizadas.

Proceso virulento	Leyenda
Protección	P
Preparación para la invasión	PI
Invasión_Adherencia	I_A
Invasión_Ataque a la célula huésped	I_ACH
Invasión_Crecimiento bacteriano	I_CB
Síntesis de proteínas	SP
Adaptación	A
Latencia	L
Reactivación	R
Unión y corrección de ADN dañado	UCAD
Resistencia a antibióticos	RAB
Formación del pili	FP
Resistencia a metales pesados	RMB
Transporte a través de membrana	TAM
Metabolismo	M
Procesos celulares	PC

Tabla 5.12: Procesos virulentos en los que intervienen las proteínas virulentas codificadas en el genoma de las cepas *mycobacterianas* analizadas, divididos según los diversos estadios de la enfermedad.

Proteína	P	PI	Invasión			SP	A	L	R	UCAD	RAB	FP	RMP	TAM	M	PC
			I_A	I_ACH	I_CB											
Antígeno MPT70			√													
Antígeno 84					√											
Antígeno Cfp10A															√	
Antígeno Cfp2		√														
Antígeno Cfp6															√	
Antígeno de bajo peso molecular para células T TB8.4		√														√
Antígeno Hsp20					√			√	√							
Antígeno rico en prolina de 28kDa																√
Antígeno rico en prolina pra														√		
Antígeno secretado, supuesto	√	√		√												
Antígeno soluble secretado MPT53 precursor	√												√ (Cobre)		√	√ (Homeostasis)
Antígeno, esterasa 85, supuesto	√	√	√													
Antitoxina	√															
arsC proteína de resistencia al arsénico/arsenato reductasa													√ (Arsénico)	√ (Sodio y Arsénico)	√	
Bacteriocina CFP29	√															

Proteína	P	PI	Invasión			SP	A	L	R	UCAD	RAB	FP	RMP	TAM	M	PC
			I_A	I_ACH	I_CB											
Betalactamasa											√					
Betalactamasa clase A BLAC											√					
Citotoxina / Hemolisina TlyA				√												
Esat-6	√	√		√												
Factor de integración al huésped MihF							√									
Factor de virulencia	√	√			√		√	√	√							
Factor promotor de la resucitación rpf									√							√
Factor trigger			√	√												
Hemolisina				√												
Hidroxilaminobenzeno mutasa hab															√	
Lipoproteína antigénica de 19 kDa, precursora						√										√
Lipoproteína antigénica, 22 kDa						√										√
MRA_1465 Transportadores ABC permeables para antibióticos						√										
Péptido parecido a la tuberculina																√
Pirazinamidasas/Nicotinamidasas											√				√	

Proteína	P	PI	Invasión			SP	A	L	R	UCAD	RAB	FP	RMP	TAM	M	PC
			I_A	I_ACH	I_CB											
Precursor de cutinasa Cfp21															√	
Proteína inmunogénica Mpt64					√											
Proteína antigénica de unión a la fibronectina secretada fbpA	√		√													
Proteína antigénica secretada			√								√					√
Proteína bifuncional de unión a la penicilina 1A/1B ponA1: Insensible a la penicilina	√									√						
Proteína de estrés universal							√	√								
Proteína de flujo hacia afuera para multirresistencia a drogas integral de membrana EmrB										√			√			
Proteína de flujo hacia el exterior, transportadora ABC para resistencia a antibióticos													√			
Proteína de invasión	√			√												
Proteína de resistencia a antibióticos													√	√		
Proteína de resistencia al alcanfor CrcB	√															√
Proteína de supervivencia intracelular aumentada eis							√								√	

Proteína	P	PI	Invasión			SP	A	L	R	UCAD	RAB	FP	RMP	TAM	M	PC
			I_A	I_ACH	I_CB											
Proteína de unión a la penicilina	√				√			√	√		√					
Proteína de unión a la penicilina DacB1	√										√					√
Proteína de unión al ATP transportadora ABC para macrólidos											√			√		
Proteína de unión al ATP transportadora ABC para resistencia a múltiples drogas											√			√		
Proteína de unión al ATP transportadora ABC de antibióticos											√			√		
Proteína F inducible por daños al ADN dinF										√	√			√		
Proteína inductora de resistencia a la isoniazida iniA											√					
Proteína inductora de resistencia a la isoniazida iniB											√					
Proteína inductora de resistencia a la isoniazida iniC											√					

Proteína	P	PI	Invasión			SP	A	L	R	UCAD	RAB	FP	RMP	TAM	M	PC
			I_A	I_ACH	I_CB											
Proteína inhibidora de tabicación							√									
Proteína inmunogénica Mpt63				√												√
Proteína integral de membrana para el transporte de múltiples drogas Mmr										√			√			
Proteína mutator mutT3									√							
Proteína P inducible por daños al ADN dinP									√							
Proteína parecida a la betalactamasa										√						
Proteína transportadora para resistencia al mercurio, supuesta						√						√ (Mercurio)				
Proteína utilizadora de mycobactina viuB															√	
Proteína fijadora del ATP, con flujo hacia el exterior, transportadora ABC para resistencia a antibióticos										√			√			

Proteína	P	PI	Invasión			SP	A	L	R	UCAD	RAB	FP	RMP	TAM	M	PC
			I_A	I_ACH	I_CB											
Proteínas de unión al ATP transportadoras ABC para drogas										√				√		
Proteínas transportadoras ABC de unión al ATP para transportar antibióticos										√				√		
Proteínas transportadoras ABC de unión al ATP transmembrana para transporte de drogas										√				√		
Proteínas transportadoras ABC de unión al ATP transportadoras de antígenos-O/lipopolisacáridos rfbE										√				√		
Proteínas transportadoras ABC integrales de membrana transportadoras de antígenos-O/lipopolisacáridos rfbD										√				√		
Regulador de la persistencia mycobacterial mprA								√	√							

Proteína	P	PI	Invasión			SP	A	L	R	UCAD	RAB	FP	RMP	TAM	M	PC
			I_A	I_ACH	I_CB											
Regulador transcripcional reguladora de virulencia VirS																√
Tap Proteína de flujo hacia el exterior para multirresistencia a drogas										√			√			
TBFG antígeno secretado L-alanina dihidrogenasa ALD (antígeno de 40 kDa)	√														√	√
terC proteína de resistencia al telurio (terC)												√ (Telurio)				
Toxina				√												
Transportador ABC de membrana para transporte de antibióticos										√			√			
Transportador de drogas										√			√			

Fuente: National Center for Biotechnology Information. Elaborado por: Equipo de investigadoras.

5.3) ELEMENTOS GENÉTICOS TRANSPONIBLES.

El análisis bioinformático genómico de las cepas *mycobacterianas* determinó que sus genomas codifican abundantes elementos genéticos transponibles, sin embargo las cantidades presentes son variables, lo que puede apreciarse en tabla 5.13, así encontramos que la cepa con menor número es la CDC1551 con 55 elementos de inserción, seguida por la cepa H37Ra con 85, la cepa H37Rv con 88 segmentos transponibles, la F11 con 95 y por último, la KZN1435 que cuenta con 98 segmentos de inserción.

Tabla 5.13: Cantidades totales y distribución de los elementos genéticos transponibles presentes en el genoma de las cepas *mycobacterianas* analizadas.

Producto	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
Dañada IS1560 transposasa			1	1	
Dañado IS 1555 transposasa	1				
Dañado IS1081 transposasa	1		1	1	
Dañado IS1536 transposasa	1		1		
Dañado IS1605 transposasa	1				
Dañado IS6110 transposasa			1		
Integrasa		3		3	6
Integrasa XerC					1
IS como 2 transposasa				2	
IS1081, transposasa	5		5	1	
IS1141- como transposasa			1		
IS1245- como transposasa			1		
IS1533, proteína transposasa A	1				
IS1533, proteína transposasa B	1				
IS1533, transposasa				2	
IS1535, resolvasa	1		2		
IS1535, transposasa	2		2		
IS1536, resolvasa	1		1		
IS1537, resolvasa	1				
IS1537, transposasa	1				
IS1538, resolvasa	1		1		
IS1538, transposasa	1		1		
IS1539, resolvasa	1		1		
IS1539, transposasa	1		1		
IS1540, transposasa	1				
IS1547, transposasa	2	1	2	1	

Producto	CDC1551	F11	H37Ra	H37Rv	KZN1435
IS1553, transposasa	1				
IS1554, transposasa	1				
IS1556, transposasa	1				
IS1557, transposasa	3				
IS1558, transposasa	2				
IS1560, transposasa	3				
IS1561, transposasa	1				
IS1602, resolvasa	1		1		
IS1602, transposasa	1		1		
IS1603, transposasa	1				
IS1604, transposasa	1				
IS1606, transposasa	1				
IS1607, transposasa	2				
IS1608, transposasa	2				
IS2606, como transposasa			1		
IS6110, proteína hipotética	4		17		
IS6110, transposasa	4	17	17	23	14
ISMav2- como transposasa			1		
ISMt1, transposasa A			2		
ISMt1, transposasa B			2		
ISMt2 transposasa A			1		
ISMt2 transposasa B			1		
ISMt3- como transposasa A1			1		
ISMt3- como transposasa A2			1		
ISMt3 transposasa A			1		
ISMt3 transposasa B1			1		
ISMt3 transposasa B2			1		
phi Rv1 integrasa				1	
phi Rv2 integrasa fago					1
phi Rv2 integrasa profago				1	
Resolvasa		6		6	6
Resto de una transposasa A				1	
Restos de una transposasa(supuesta)			3		
Transposasa	1	68	1	45	70
Transposasa degenerada	1				
Transposasa putativo			10		
Total	55	95	85	88	98

Fuente: National Center of Biotechnology Information. Elaborada por: Equipo de investigadoras.

Entre estas secuencias de ADN repetitivo encontramos segmentos de inserción (Is), transposones (Tn), integrasas y resolvasas. De manera general se definió que los genomas poseen diversos tipos y cantidades de segmentos transponibles. La cepa CDC1551 posee 36 tipos diferentes, la F11 contiene 5 tipos diferentes, la H37Ra tiene 33, la H37Rv posee 13 y por último, la KZN1435 posee apenas 6 tipos diferentes.

Es importante mencionar que la mayoría de todos estos elementos pertenecen a la familia IS3 y la familia IS256, los restantes pertenecen a nuevos grupos aún no definidos. Un segmento de inserción ampliamente distribuido es el IS6110, del cual se encuentran 8 en la CDC1551, 17 en la F11, 34 en la H37Ra, 23 en la H37Rv y 14 en la KZN1435.

En el pasado el IS6110 era utilizado como una región de diferenciación para el bacilo tuberculoso, sin embargo ahora se conoce que este segmento de inserción no es específico para éste, ya que se encuentra presente en otros miembros del CMT, por lo que puede ser utilizado para diferenciar a las infecciones causadas por los miembros de este complejo. Dentro del genoma *mycobacteriano* también se encuentra un segmento de inserción más estable: el IS1081, aunque no está presente en todas las cepas.

Cabe mencionar que las cantidades en las que se encuentra este segmento de inserción son mínimas, en comparación con las cantidades del IS6110. Otro elemento significativamente relevante son los transposones, los cuales son los responsables de transmitir las resistencias de una bacteria a otra. Los tipos de transposasas dentro del genoma de las cepas analizadas se encuentran en cantidades muy divergentes, así encontramos 27 tipos en la CDC1551, presentándose 4 tipos dañados y 1 degenerado.

En la F11 existen 86 tipos; 27 tipos en la H37Ra, siendo 4 tipos dañados, 1 tipo resto de transposones y 6 tipos parecidos a transposones; 9 tipos en la H37Rv, apareciendo 2 tipos dañados, 1 tipo resto de transposasas y 1 tipo resto de transposasa; y por último encontramos 2 tipos de transposasa en la KZN1435. En relación a las cantidades, la cepa con mayor número de transposasas es la KZN1435, por lo que no es sorprendente que esta sea la cepa multirresistente a fármacos.

Dentro de todos los genomas *mycobacterianos* analizados encontramos elementos en diversas cantidades y localizaciones, sin embargo los únicos elementos móviles que están codificados en todas las cepas son el IS6110 y las transposasas lo que les atribuye una alto

potencial para la diferenciación de las cepas *mycobacterianas* así como para los estudios filogenéticos.

Apartado VI: Conclusiones

6.1) CONCLUSIONES

Mediante el análisis bioinformático del genoma de las cepas secuenciadas del *Mycobacterium tuberculosis*, se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1) La región con mayor potencial para el desarrollo de vacunas; es la familia PE por su valor antigénico al estimular a los linfocitos B y T.
- 2) Se identificó como objetivos viables para la elaboración de drogas antituberculosas a la proteína Cfp7, la proteína de resistencia a antibióticos, la Mpt53, así como en menor grado la BLAC y la proteína similar a la betalactamasa.
- 3) Las familias de proteína PPE y PE_PGRS tienen un elevado valor para el desarrollo de métodos de diagnóstico de la TB como marcadores inmunológicos. De igual manera la proteína Mpt63, Esat 6 y Cfp7; estas últimas pueden ser aisladas directamente de cultivos y la Cfp2 como alternativa a la PPD.
- 4) La diferencia en la resistencia a la pirazinamida de ciertas cepas *mycobacterianas* no está determinada por la divergencia entre las proteínas responsables de la misma, es decir la pirazinamidasa/nicotinamidasa *pncA*, por lo que es posible la existencia de un mecanismo sinérgico que contribuya a la actividad de esta proteína en el proteoma *mycobacteriano* para que dicha resistencia se exprese.
- 5) Se determinó que la cepa con mayor resistencia a antibióticos es la KZN1435 en cuyo genoma contiene proteínas exclusivas como la *mprA* y la familia MPR; también es la que más elementos genéticos transponibles presenta.
- 6) La cepa H37Rv es la más completa en cuanto a las proteínas virulentas que codifica, aunque también se estableció que la virulencia de las cepas *mycobacterianas* no depende de la cantidad de proteínas o familias de las mismas que expresa, sino con la función y proceso molecular que realiza cada una.
- 7) IS6110 y las transposasas son los únicos elementos genéticos transponibles presentes en todas las cepas analizadas.

La identificación de estas regiones mediante las herramientas bioinformáticas permitió la confirmación de la hipótesis planteada.

Apartado VII: Recomendaciones

7.1) RECOMENDACIONES

- 1) Promover investigaciones basadas en la bioinformática por su gran potencial para el desarrollo de alternativas a fin de mejorar la calidad de vida humana, especialmente en el área de salud donde aún existen vacíos de información como es el caso de la tuberculosis.
- 2) Realizar estudios sobre la patogenia del *Mycobacterium tuberculosis*, a fin de generar información que contribuya a la comprensión y erradicación de esta compleja patología.
- 3) Ejecutar la fase experimental de las regiones determinadas durante este análisis sobre todo la familia de proteína PE como una alternativa para el desarrollo de vacunas y del péptido Esat 6 como método de diagnóstico por ser una proteína directamente aislada de cultivo.
- 4) Al MINSA, profundizar en el estudio de las resistencias del *M. tuberculosis* a las diversas drogas vigentes, la comparación y caracterización de los diferentes miembros del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), especialmente el *M. bovis*, principal responsable de la tuberculosis por transmisión zoonótica.
- 5) Implementar la creación de laboratorios virtuales a lo interno de la institución que permitan la capacitación y el acceso a esta disciplina y sus herramientas, para su aplicación en las diversas áreas de la educación, debido a que permite obtener los posibles resultados y luego llevarlos a la práctica, disminuyendo los errores durante el proceso.



Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA.

Libros:

1. Bhamidi S. (2009). Mycobacterial Cell Wall Arabinogalactan Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Editorial Caister Academic. ISBN 978-1-904455-45-5.
2. Casali N. (2009). Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium: Genomics and Molecular Biology*. Editorial Caister Academic. ISBN 978-1-904455-40-0.
3. Esko J. D., Doering T. L. y. Raetz C. R. (2008). In *Essentials of Glycobiology*. Segunda Edición. Editorial Cold Spring Harbor.
4. K. Ryan, C. Ray. (2004). *Sherris Medical Microbiology*. Cuarta Edición. Editorial McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
5. Klein D., Prescott, Lansing M. y Harley J. (1999). *Microbiology*. Segunda Edición. Editorial McGraw-Hill.
6. Malcolm Campbell A. y Heyer Laurie. (2007). *Discovering Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. Segunda Edición. Editorial Pearson Education, Inc. ISBN 0-8053-8219-4.
7. Messerschmidt A, Huber R, Wieghardt K, Poulos T. (2001). *Handbook of Metalloproteins*. Wiley. ISBN 0-471-62743-7
8. Mount D. W. (2004). *Bioinformatics Sequence and Genome Analysis*. Segunda Edición. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-712-1
9. Palomino C; Cardoso Leão S. y Ritacco V. (2007). *Tuberculosis. From basic science to patient care*. Primera Edición.
10. Piura López J. (2006). *Metodología de la Investigación Científica. Un enfoque integrador*. Primera Edición. Editorial PAVSA. Managua.
11. Pumarola A. (1987) *Microbiología y parasitología médica: Masson-Salvat medicina*. Segunda Edición. Editorial Elsevier, España. ISBN: 8445800604, 9788445800607.
12. Robbins (1990). *Patología estructural y funcional*. Cuarta Edición. Editorial Interamericana Mc Graw – Hill.
13. Sampieri R., Collado C. y Lucio P. (2007). *Metodología de la Investigación*. Cuarta Edición. Editorial McGraw-Hill.

14. Shriver D. F., Atkins P. W. (1999). Inorganic chemistry. Tercera Edición. Editorial Oxford University.

Revistas:

15. Araujo Z., Acosta M., Escobar H., *et al.* (2008). Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. Revisión. Revista Investigación clínica. Volumen 49. Pág. 411-441.
16. Arráiz N., Romay Z. y Faría N. (2007). Evaluación de un ensayo de PCR múltiple para diferenciar micobacterias del *Complejo Mycobacterium tuberculosis* en un laboratorio de referencia. Revista Chilena de Infectología. Volumen 24. Número 2.
17. Arruda S., Bomfim G., *et al.* (1993). Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. Revista *Science*. Volumen 261. Página: 1454
18. Beck-Sague C., Dooley M., *et al.* (1992). Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. Factors in transmission to staff and HIV-infected patients. Revista JAMA 268:1280-1286.
19. Bhamidi S., Scherman M., *et al.* (2008). The identification and location of succinyl residues and the characterization of the interior arabinan region allow for a model of the complete primary structure of *Mycobacterium Tuberculosis* mycolyl arabinogalactan. Revista Química biológica. Volumen 283. Páginas 12992-13000.
20. Brandta A., Kidrona H., *et al.* (2003). Structural studies on metalloregulatory protein MerR. Revista Microbiol. Volumen 27. Número 43. Página 145.
21. Brinkman A., Ettema T., *et al.* (2003). The Lrp family of transcriptional regulators. Revista Molecular Microbiology. Volumen 48. Número 2. Página 287.
22. Brodin P., Rosenkrands I., Andersen P., Cole S. T y Brosch R. (2004). ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors. Revista Trends in Microbiology. Volumen 12. Número 11. Páginas 500-508.
23. Calderón, M. N., Parra-López C., Rosalba, *et al.* (2006). *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen immunogenicity in Owl Monkeys. Revista NOVA. Volumen 4. Número 5. Páginas 14-26.

24. Carpenter E., Hird W. (1986). Time series analysis of Micobacteriosis in California slaughter swine. Preventive Revista Veterinary Medicine. Volumen 3. Página 559.
25. Cole S., Brosch R., *et al.* (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Revista Nature. Volumen 393. Página 537.
26. Dalton H. M. y March P. E. (1998). Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. Revista Current Opinion Biotechnology. Volumen 9. Páginas 252-255.
27. Dany J. V., Beste M. E., Bhushan B., Andrzej M. K., Graham R. S., *et al.* (2009). The Genetic Requirements for Fast and Slow Growth in Mycobacteria. Revista PLoS ONE. Volumen 4. Número 4. Página 5349.
28. Domenech P., Reed M. y Barry C. (2005). Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL Protein Family to Virulence and Drug Resistance. Revista Infect Immun. Volumen 73. Número 6. Página 3492.
29. Dorman S. y Chaisson R. (2007). From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. Revista Nature Medicine. Volumen 13. Número 3.
30. Espinosa L., Galán J., Gutiérrez M., *et al.* (1998). Allele-Specific PCR Method Based on *pncA* and *oxyR* Sequences for Distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intraspecific *M. bovis pncA* Sequence Polymorphism. Revista Journal of Clinical Microbiology. Volumen 36. Número 1.
31. García J., Valdespino J., *et al.* Epidemiología del SIDA y la tuberculosis. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 1994; 116:546-65.
32. Goffin C. y Ghuyssen J. M. (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. Revista Biología Molecular. Volumen 62. Páginas 1079-1093.
33. Green J., Scott C., Guest R. (2001). Functional versatility in the CRP-FNR superfamily of transcription factors: FNR and FLP. Revista Advances in Microbial Physiology. Volumen 44. Número 1. Página 34.
34. Haft D. Selengut J. *et al.* (Noviembre, 2008). A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. Revista PLoS Computational Biology.

35. Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, *et al.* (1999). Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Revista Psiquiatrica genetic.* Volumen 56. Páginas 29 - 36.
36. Hett E., Chao M., Steyn A., Fortune S., Deng L., Rubin E. (2007). A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Molecular Microbiology.* Volumen 66. Número 3. Página 658-68.
37. Jacobs R., Sunakorn P., *et al.* (1992) Intensive short course chemotherapy for tuberculous meningitis. *Revista Pediatric Infected Disease J.* Volumen 11. Página 194.
38. Jereb J., Burwen S., *et al.* (1993). Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit: application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Revista J. Infect. Dis.* 168:1219-1224.
39. John T., Varalakshmi D., *et al.* (1997). Role of the Major Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in Cell Wall Biogenesis. Volumen 276. Número 5317. Páginas 1420 – 1422.
40. Kanehisa M., Bork P. (2003). Bioinformatics in the post-sequence era. *Revista Nature Genetics.* Volumen 33.
41. Kantor I. Ritacco V. (1999) Zoonotic tuberculosis in Latin America. *Revista Journal of Clinical Microbiology.* Volumen 3. Página 3299.
42. Kleeberg M. H. (1984). Human tuberculosis of bovine origin in relation to public health. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties.* *Revista AGRIS record.*
43. Kurabachew M., Enger O., *et al.* (2003). “A multiplex polymerase chain reaction assay for genus-, group- and species-specific detection of *mycobacteria*”. *Revista Diagnostic Microbiology and infectious disease.* Volumen 49. Página 99.
44. Lily K., Jayanthi U. y Madhavan H. (2004). “Application of polymerase reaction (nPCR) using MPB 64 gene primers to detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical specimens from extrapulmonary tuberculosis patients”. *Revista INDIAN J MED RES.* Volumen 122. Página 165.

45. Maddocks S. y Oyston P. (Diciembre, 2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Revista Microbiology*. Volumen 15. Número 12. Página 3609.
46. Makarova K., Grishin N., Koonin E. (2006). The HicAB cassette, a putative novel, RNA-targeting toxin-antitoxin system in archaea and bacteria. *Revista Bioinformatics*. Volumen 22. Número 21. Páginas 2581-4.
47. Marquis K., Burton B., *et al.* (2008). SpoIIIE strips proteins off the DNA during chromosome translocation. *Revista Genes & Dev*. Volumen 22. Número 22. Página 1786.
48. Mishra A., Singhal A., *et al.* (2005). "Direct Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine Samples by a Novel Nested PCR Assay: Correlation with Conventional Techniques". *Revista Journal of Clinical Microbiology*. Volumen 43. Página 5670.
49. Murray J., Felton C., Saray S. Pulmonary complication of AIDS report of a national heart lung and blood institute workshop. *Revista The New England Journal of Medicine*. 1984; 310:1682-8.
50. Musser J., Amin A. y Ramaswamy S. (2000). Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. *Revista Genetics*. Volumen 155 Página 7-16.
51. Pérez-Llarena F., Bou G. (2009). Beta-Lactamase Inhibitors: The Story so Far. *Revista Curr Med Chem*. Volumen 16. Número 28. Página 3740.
52. Polgár L. (Febrero, 2002). The prolyl oligopeptidase family. *Revista Cellular and Molecular Life Sciences*. Volumen 59, Number 2.
53. Ramaswamy S. y Musser J. (1998). Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Tuber. Lung Dis*. 79:3-29.
54. Robledo J. Mejía G. *et al.* (2006). "Evaluation of a rapid culture method for tuberculosis diagnosis: a Latin American multi-center study". *Revista The International Journal of Tuberculosis and lung disease*. Volumen 10. Página 613.
55. Ronning D., Vissa V., Besra G., Belisle J., Sacchettini J. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A and 85C structures confirm binding orientation and

- conserved substrate specificity. *Revista de Química Biológica*. Volumen 279. Páginas 36771-7.
56. Ruma Pahwa, Suresh Hedau, *et al.* (2005). Assessment of possible tuberculosis lymphadenopathy by PCR compared to non-molecular methods. *Revista Journal of Medical Microbiology*. Volumen 54. Página 873.
 57. Shah D., Verma R., *et al.* (2002). A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista FEMS microbiology letters*. Volumen 214. Página 39.
 58. Small P., Shater R., Hopewell P., *et al.* (1993). Exogenous infection with multidrug resistant mycobacterium tuberculosis in patient with advanced HIV infection. *Revista The New England Journal of Medicine*. 328:1137-44.
 59. Sonnenberg M. y Belisle J. (1997). Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Revista Infection and Immunity: American Society for Microbiology*. Volumen 65. Páginas 4515–4524.
 60. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K., Connell N., Kreiswirth B., Whittam T. y Musser J. M. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionary recent global dissemination. *Revista Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Volumen 94. Página 9869-9874.
 61. Stewart G., Wernisch L., *et al.* (2002). The Heat Shock Response of *Mycobacterium Tuberculosis*: Linking Gene Expression. *Revista: Immunology and Pathogenesis*. Volumen 3, Número 4. Página 348.
 62. Stroneburner R., Caroché E., *et al.* (1992), Survival in cohort of HIV infection tuberculosis patient in New York City. Implication for the expansion of AIDS case definition. *Revista Archives of Internal Medicine*. 152:2033-7.
 63. Tauro P., Kapoor K., (1986), *An Introduction to Microbiology*. *Revista The New Age*. ISBN 0852268785.
 64. Trinidad Gallegos M., Schleif R., *et al.* (1997). AraC/XylS Family of Transcriptional Regulators. *Revista: Microbiology and Molecular Biology*. Volumen 61, Número 4.

65. Valdés E; Ferrer A. y Ferrer N. (1999). La tuberculosis, otra vez un problema de salud. Revista Cubana de Medicina General Integral. La Habana. Volumen 15. Número 3.
66. van Embden J., Cave J., *et al.* (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. Revista Clinic. Microbiol. 31:406-409.
67. Waldron K., Robinson N. (2009). How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal. Revista Nature Microbiology. Volumen 7. Páginas 25–35.
68. Zacarías F., González R., Cuchi P., Yañes A., Peruga A., Marín R., *et al.* (1994). El SIDA y la tuberculosis en América Latina y el Caribe. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 116:250-62.

Página web:

69. Bactregulators. Disponible: <http://www.bactregulators.org>.
70. Enciclopedia Encarta. Disponible: http://mx.encarta.msn.com/encyclopedia_761574409_3/Bacteria.html.
71. Gene Ontology. AmiGO. Disponible: <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>
72. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. World Health Organization. Disponible: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/index.html.
73. InterPRO. Disponible: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>
74. Ministerio de Salud de Nicaragua. (MINSA): Disponible://www.minsa.gob.ni/
75. National Center of Biotechnology Information. (NCBI). Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
76. Nature International weekly journal of Science. Disponible: <http://www.nature.com/nature/journal/>
77. New York Online Access to Health. Disponible: <http://www.noahhealth.org/spanish/illness/TB/spTB.html>.
78. Nicaragua: TB Country Profile. Disponible://: www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/nic.pdf
79. Pfam. Disponible: <http://pfam.janelia.org/>
80. PIR. Disponible: <http://pir.georgetown.edu/>

81. PubChem. Disponible: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/help.html#PubChem>
82. PubMed. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
83. Scientific Facts on Drug resistant Tuberculosis. Disponible: <http://www.greenfacts.org/en/tuberculosis/1-2/1-mdr-tb-xdr.htm>. Retrieved 2009-03-26.
84. Structure. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>
85. TUBERCULIST. Disponible: <http://tuberculist.epfl.ch/quicksearch/>
86. TUBERCULOSIS DATA BASE. Disponible: <http://tuberculist.epfl.ch/>
87. UNIPROT. Disponible: <http://www.uniprot.org/uniprot/>
88. United State Department of Agriculture (USDA) and Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture (IICA). Disponible: <http://agclass.nal.usda.gov/mtwdk.exe?k=glossary&l=91&w=95&n=1&s=5&t>
89. Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://www.wikipedia.com>.
90. World Health Organization / Organización Mundial de la Salud. Disponible: <http://www.who.int/en/>

Informes y Tesis:

91. Aymerich C. P., Domínguez Benítez J. y Ruiz V. A. (2006). *Mycobacterium bovis*. Hospital Universitario Germans Trias Pujol, Badalona. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona.
92. División de Sistemas de Información del MINSA. 2009.
93. Estabilización de la epidemia mundial de tuberculosis. Comunicado de Prensa de la OMS. Marzo 24 del 2007. Ginebra/ Nueva York/París.
94. Garcia-Abreu A., Nobuer I. y Cowgill K. (2004) El VIH/SIDA en países de América Latina: Los retos futuros. Publicado por Panamerican Health Organization.
95. Global Tuberculosis Control: Epidemiology Strategy Financing: WHO. Report 2009. ISBN 978 92 4 156380 2.
96. Informe de Admisión y Egresos de país por SILAIS. Reporte Anual 2005.
97. Informe de Admisión y Egresos de país por SILAIS. Reporte Anual 2006.
98. Informe de Admisión y Egresos de país por SILAIS. Reporte Anual 2007.
99. Informe de Admisión y Egresos de país por SILAIS. Reporte Anual 2008.

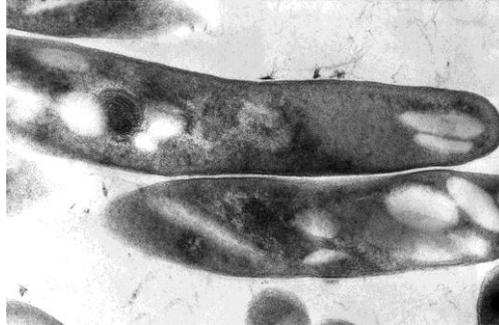
100. Kibugus D., Gathus S. A study of HIV infection is associated with tuberculosis as seen infection disease hospital (IDH) in Nairobi. VI International Conference of AIDS/ISTD World Congress. San Francisco, California (Abstract ThB 489, 1990).
101. Prat C., Aymerich J., *et al.* (2006). Mycobacterium bovis. Publicado por Control de Calidad SEIMC. 2004.
102. Rabinow P. (1996). Making PCR: A Story of Biotechnology. Chicago: University of Chicago.
103. Reporte de la OMS. (2006). Geneva. WHO Global Task Force outlines measures to combat XDR-TB worldwide.
104. Tardencilla A., López R., *et al.* (Julio, 2006). Informe Anual XV Edición 2005. Programa Nacional de Control de Tuberculosis.
105. Ulloa G., Pérez M., Jirón M., *et al.* (Mayo, 2005). Prevalencia de VIH en personas afectadas por Tuberculosis en siete SILAIS priorizados de Nicaragua 2005.
106. Yeso G., Gnaore G., Sassan M., Ackdh A., Sidibe K., Braun M., *et al.* (1990). Prospective study of a pulmonary tuberculosis in HIV-1 and HIV-2 infection. In VII International Conference of AIDS/II STD World Congress. Florence, Italy.
107. Zeledón V. (Febrero, 2006). Evaluación de la prueba del Glutaraldehido en la detección de casos de tuberculosis pulmonar en pacientes ingresados en Hospital Rosario Lacayo y centros asistenciales de la ciudad de León en el periodo Enero2004 – Enero 2005.



ANEXOS

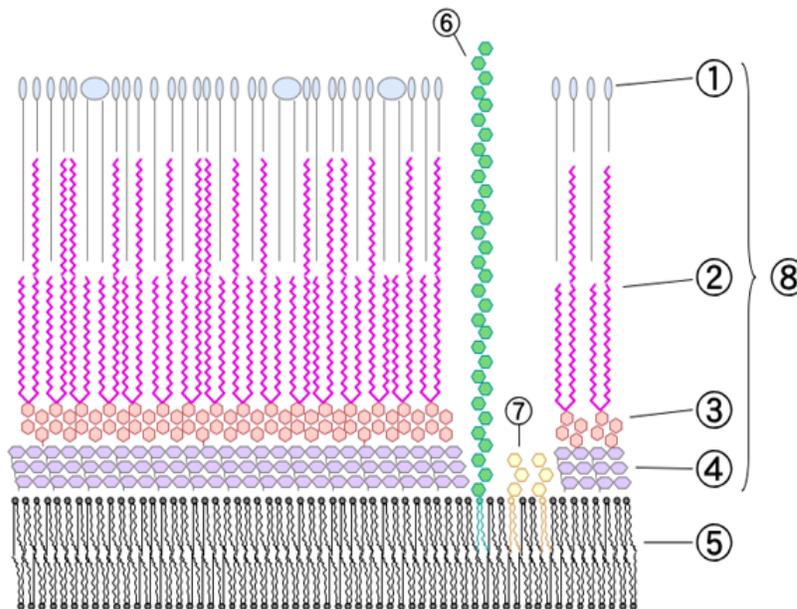
ANEXOS.

Anexo 1: Imagen del bacilo *Mycobacterium tuberculosis* mediante microscopía electrónica de transmisión.



Fuente: Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mycobacterium_tuberculosis_01.jpg. Consulta: Noviembre, 2008.

Anexo 2: Componentes de la pared *mycobacteriana*.



Fuente: Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium>. Consultada: Marzo, 2009.

Descripción:

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 1) Lípidos externos. | 5) Membrana plasmática. |
| 2) Ácidos Micólicos. | 6) Lipoarabinomanan. |
| 3) Polisacáridos (Arabinogalactan). | 7) Fosfatidilinosida. |
| 4) Peptidoglucano. | 8) Esqueleto de la pared celular. |

Anexo 3: Características celulares y de virulencia de las cepas *mycobacterianas*.

Organismo	Características celulares					Virulencia		
	Cepa Gram	Forma	Estructura	Endosporas	Motilidad	Salinidad	Requerimientos de Oxígeno	Hábitat
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	Positivo	Barra	Simple	No	No		Aeróbicos	Asociado a huésped
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	Positivo	Barra	Simple	No	No		Aeróbicos	Asociado a huésped
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	Positivo	Barra		No	No	No halofílica	Aeróbicos	Asociado a huésped
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Positivo	Barra	Simple	No	No		Aeróbicos	Asociado a huésped
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN 1435	Positivo	Barra		No	Sí		Aeróbicos	Asociado a huésped

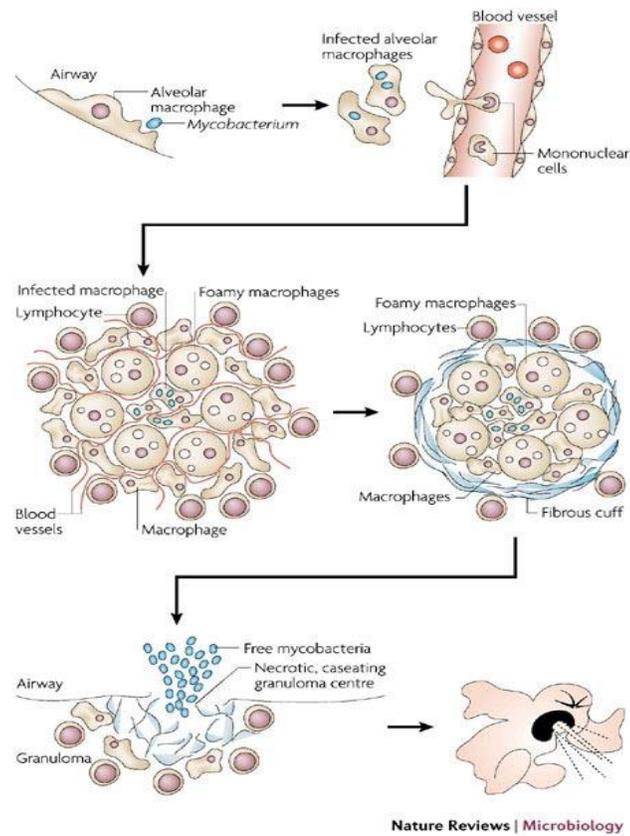
Fuente: National Center for Biotechnology Information. Realizada por: Equipo de trabajo.

Anexo 4: Sección de microscopía electrónica. Se observa un bacilo dentro de un macrófago rodeado por membrana celular.



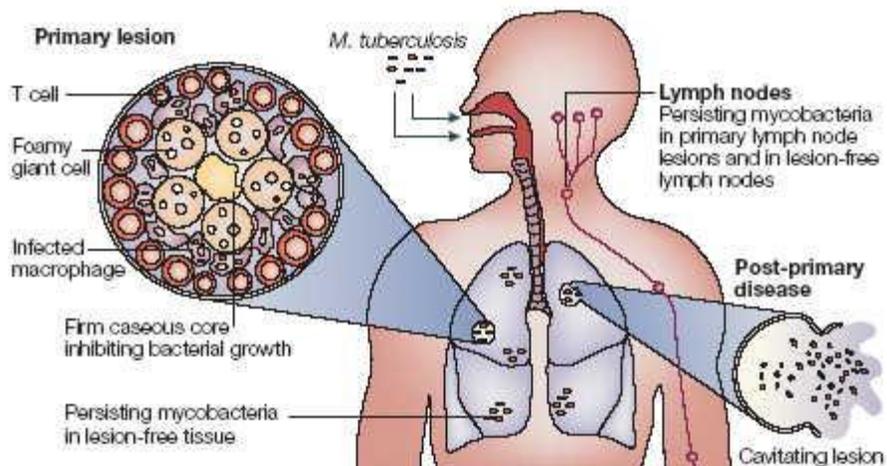
Fuente: Vásquez E., et al. (2003) Tomografía axial computarizada y resonancia magnética en el diagnóstico de la enfermedad whipple. Revista Chilena de Neuropsiquiatría. Volumen 41. Número 2. Página 6.

Anexo 5: Mecanismo de formación de una granuloma por el *M. tuberculosis*.



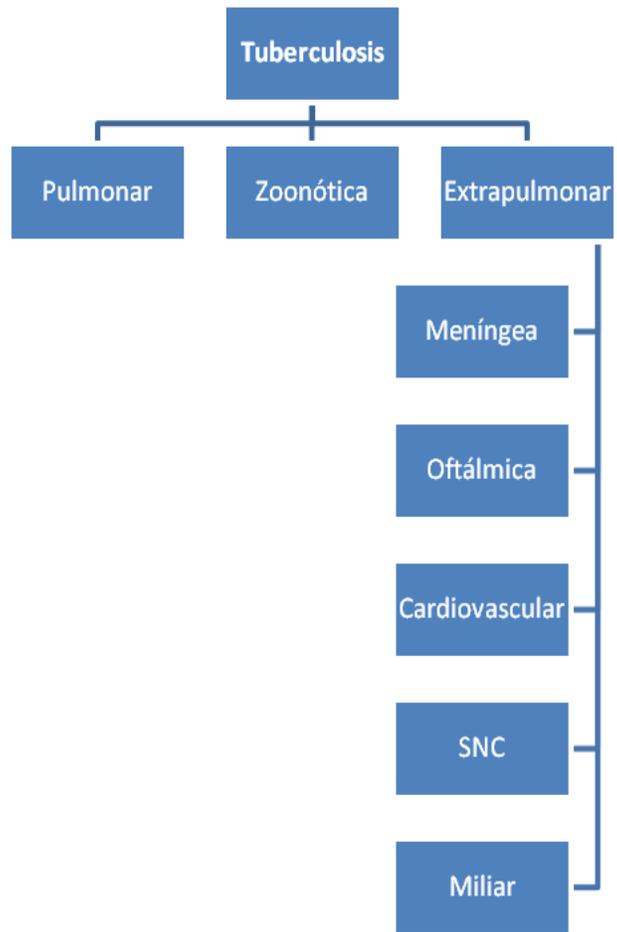
Fuente: Revista Nature Reviews Microbiology. Disponible: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n1/box/nrmicro1538_BX1.html. Consultada: Julio, 2009.

Anexo 6: Factores que intervienen en la formación de un granulomas por *M. tuberculosis* localizados en pulmones humanos.



Fuente: Mycobacterium tuberculosis. Disponible: <http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/Tuberculosis.html>. Consultada: Junio, 2009.

Anexo 7: Esquema sobre los tipos de tuberculosis.



Fuente: Wikipedia. La enciclopedia libre. Elaborado por: Equipo de investigación.

Anexo 8: Características de los métodos de diagnóstico de la tuberculosis.

Método de diagnóstico	Sensibilidad	Ventaja	Desventaja
Baciloscopía	No satisfactoria. Como regla deben existir entre 5 mil a 10 mil bacilos/ml de expectoración para que tengan un 50% de posibilidades de ser detectados al microscopio. Sólo cuando el número de bacilos alcanza a más de 100.000/ml de expectoración se espera que las baciloscopias sean consistentemente positivas.	Es posible examinar un número de campos 15 veces mayor que con la tinción de Ziehl-Neelsen. Procedimiento de elección para el diagnóstico enfermos sintomáticos.	El principal inconveniente es que estos microscopios son caros y sólo se justifican en grandes laboratorios, cuando deben procesarse más de 50 muestras diarias. Así mismo, ésta sólo utiliza 0,001 ml de la muestra, efectuando un extendido de unos 10.000 campos microscópicos, de los cuales en el mejor de los casos, sólo se leen 100 a 200 campos.
Cultivo	Mayor sensibilidad. Basta que exista más de 10 bacilos/ml, en muestras digeridas y concentradas, para que sea positivo.	Procesan 0,1 ml de expectoración. Es el método de elección para el diagnóstico de la tuberculosis en los países desarrollados y aumenta el rendimiento hasta en un 20% o más.	Pueden ser persistentemente negativos en alrededor del 10% de los casos de tuberculosis pulmonar y tiene el inconveniente de su mayor costo y de la demora habitual de entre 3 y 8 semanas en su informe. Así mismo presentan el inconveniente de una baja especificidad para identificar, de qué tipo de especie del CMT, proviene la infección.
Radiología	Es el método más sensible para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar.	Determina la existencia de daños pulmonares y su grado de desarrollo.	Es un método considerablemente más caro, menos accesible y mucho menos específico que la bacteriología. Así mismo, sólo se diagnostican casos de TB avanzados.

Método de diagnóstico	Sensibilidad	Ventaja	Desventaja
Prueba de tuberculina o PPD	Debido a la utilización de bajas concentraciones de PPD se ha desencadenado una pérdida de sensibilidad, hasta el punto que la prueba no es capaz de identificar a todos los individuos infectados de bacilo tuberculoso, e incluso, puede resultar en un falso negativa.	Mayor utilidad diagnóstica en los niños, especialmente en los no vacunados con BCG. Incluso en los vacunados, sobre todo si son contactos de un caso bacilífero, un PPD francamente positivo, digamos de 150 o más mm de induración, tiene mayores probabilidades de representar una infección reciente con el bacilo tuberculoso.	Por lo menos entre el 10 y 20% o más, de todas las formas de tuberculosis, en el momento del diagnóstico, pueden aparecer como anérgicas a la tuberculina. Son las formas llamadas no reactivas de la enfermedad, que algunos autores creen que serían de peor pronóstico.
Técnica de cultivo radiométrico o BATEC	-	Se trata de un método automatizado, de alta sensibilidad y especificidad, que en forma simple, permite hacer el diagnóstico de tuberculosis en menos de una semana en el 95% de los casos.	Es indudable que estas nuevas técnicas bacteriológicas han significado un avance en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas. Sin embargo, requieren de una inversión inicial en equipos que pocos centros pueden afrontar.
Técnicas químicas	-	Este instrumento es capaz de aumentar las señales un millón de veces, lo que permite la medición en pocas horas de pequeñísimas cantidades de ácidos micólicos específicos para diferentes especies <i>mycobacterianas</i> .	El costo es el principal inconveniente, así como la complejidad en la preparación de las muestras y la preparación de los recursos humanos. De igual manera, uno de los principales inconvenientes es la susceptibilidad del equipo, ya que éste es muy vulnerable.

Método de diagnóstico	Sensibilidad	Ventaja	Desventaja
Glutaraldehído	La prueba de Glutaraldehído tiene utilidad en el diagnóstico de tuberculosis por su buena sensibilidad (90%)	–	La especificidad de este método es muy baja (76%).
Técnicas biotecnológicas	Altamente sensible y específico.	Método de diagnóstico seguro y preciso. Se diagnostican a pacientes en los primeros estadios de la enfermedad.	–

Fuente: Zeledón Rodríguez V.M. (2006) Evaluación de la prueba del Glutaraldehído en la detección de casos de tuberculosis pulmonar en pacientes ingresados en Hospital Rosario Lacayo y centros asistenciales de la ciudad de León en el período Enero 2004 –Enero 2005. Elaborado por: Equipo de investigación.

Anexo 9: Reporte anual de diagnóstico de tuberculosis (TB) en Nicaragua del período 2005 - 2006.

Año	Diagnósticos de TB	Comportamiento Anual de Diagnósticos (N° pacientes)	Comportamiento Anual de Diagnósticos (%)
2005	1264	63	4.98%
2006	1058	-206	-16.29%
2007	1195	137	12.94%
2008	1268	73	6.10%

Fuente: Basado en datos proporcionados por la División de Sistemas de Información. Elaborado por: Equipo de investigación.

Anexo 10: Reporte anual de diagnóstico de tuberculosis (TB) por departamento del período 2005 - 2006.

Departamento	2005	2006	2007	2008
Boaco	36	10	18	20
Carazo	45	35	38	33
Chinandega	35	26	47	54
Chontales	70	43	49	62
Estelí	60	45	61	55
Granada	38	34	40	28

Departamento	2005	2006	2007	2008
Jinotega	63	63	56	51
León	268	220	171	269
Madrid	51	39	45	40
Masaya	33	24	28	23
Managua	177	177	238	211
Matagalpa	117	115	130	176
Nueva Segovia	45	32	37	26
RAAN	174	148	193	180
RAAS	35	28	29	23
Rivas	15	8	9	12
Río San Juan	2	11	6	5
Total	1264	1058	1195	1268

Fuente: Tabla 4 / IDEM.

Anexo 11: Reporte de diagnóstico de TB por departamentos en el 2005.

Departamento	2005	
	Diagnósticos	Porcentaje
Boaco	36	2.85%
Carazo	45	3.56%
Chinandega	35	2.77%
Chontales	70	5.54%
Estelí	60	4.75%
Granada	38	3.01%
Jinotega	63	4.98%
León	268	21.20%
Madrid	51	4.03%
Masaya	33	2.61%
Managua	177	14.00%
Matagalpa	117	9.26%
Nueva Segovia	45	3.56%
RAAN	174	13.77%
RAAS	35	2.77%
Rivas	15	1.19%
Río San Juan	2	0.16%
Total	1264	100.00%

Fuente: Tabla1 / IDEM.

Anexo 12: Reporte de diagnóstico de TB por departamentos en el 2006.

Departamento	2006	
	Diagnósticos	Porcentaje
Boaco	10	0.95%
Carazo	35	3.31%
Chinandega	26	2.46%
Chontales	43	4.06%
Estelí	45	4.25%
Granada	34	3.21%
Jinotega	63	5.95%
León	220	20.79%
Madrid	39	3.69%
Masaya	24	2.27%
Managua	177	16.73%
Matagalpa	115	10.87%
Nueva Segovia	32	3.02%
RAAN	148	13.99%
RAAS	28	2.65%
Rivas	8	0.76%
Río San Juan	11	1.04%
Total	1058	100.00%

Fuente: Tabla 1 / IDEM.

Anexo 13: Reporte de diagnóstico de TB por departamentos en el 2007.

Departamento	2007	
	Diagnósticos	Porcentaje
Boaco	18	1.51%
Carazo	38	3.18%
Chinandega	47	3.93%
Chontales	49	4.10%
Estelí	61	5.10%
Granada	40	3.35%
Jinotega	56	4.69%
León	171	14.31%
Madrid	45	3.77%
Masaya	28	2.34%
Managua	238	19.92%
Matagalpa	130	10.88%
Nueva Segovia	37	3.10%
RAAN	193	16.15%
RAAS	29	2.43%
Rivas	9	0.75%
Río San Juan	6	0.50%
Total	1195	100.00%

Fuente: Tabla 1 / IDEM.

Anexo 14: Reporte de diagnóstico de TB por departamentos en el 2008.

Departamento	2008	
	Diagnósticos	Porcentaje
Boaco	20	1.58%
Carazo	33	2.60%
Chinandega	54	4.26%
Chontales	62	4.89%
Estelí	55	4.34%
Granada	28	2.21%
Jinotega	51	4.02%
León	269	21.21%
Madrid	40	3.15%
Masaya	23	1.81%
Managua	211	16.64%
Matagalpa	176	13.88%
Nueva Segovia	26	2.05%
RAAN	180	14.20%
RAAS	23	1.81%
Rivas	12	0.95%
Río San Juan	5	0.39%
Total	1268	100.00%

Fuente: Tabla 1 / IDEM.

Anexo 15: Reporte anual de defunciones a causa de TB.

Año	Defunciones por TB	Comportamiento Anual de Defunciones (N° pacientes)	Comportamiento Anual de Defunciones (%)
2005	194	140	259.25%
2006	170	-24	-12.37%
2007	149	-21	-12.35%
2008	124	-25	-16.77%

Fuente: Tabla 1 / IDEM.

Anexo 16: Reporte anual de defunciones a causa del VIH / SIDA.

Año	Defunciones por VIH/SIDA	Comportamiento Anual de Defunciones (N° pacientes)	Comportamiento Anual de Defunciones (%)
2005	25	-335	-93.05%
2006	18	-7	-28.00%
2007	28	10	55.55%
2008	31	3	10.71%

Fuente: Tabla 1 / IDEM. UNAIDS y PAHO.

Anexo 17: Reporte anual de defunciones a causa de la TB.

Año	Defunciones por TB	Comportamiento Anual de Defunciones (N° pacientes)	Comportamiento Anual de Defunciones (%)
2005	194	140	259.25%
2006	170	-24	-12.37%
2007	149	-21	-12.35%
2008	124	-25	-16.77%

Fuente: Tabla 1 / IDEM. Informe Anual XV Edición 2005. Programa Nacional de Control de Tuberculosis.

Anexo 18: Mapa de pobreza extrema de Nicaragua.



Fuente: Nicaragua: TB Country Profile. Disponible://: www.who.int/GlobalAtlas/predefinedReports/TB/PDF_Files/nic.pdf

Anexo 19: Farmacología de las drogas de primera línea contra la TB.

Droga	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia	Reacciones adversas
Estreptomicina (STM o S)	Aún no se encuentra bien claro, sin embargo se sabe que se basa en la interferencia de la síntesis proteica bloqueando la traducción del ARNm tanto en su inicio como en la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica.	El mecanismo de resistencia bacteriano más frecuente es la expresión de enzimas modificantes de aminoglucósidos adquiridos vía plásmidos o transposones. Sin embargo, en las <i>mycobacterias</i> el mecanismo más conocido de resistencia a los aminoglucósidos es por alteración de la diana sobre la que actúan (16sRNA) como consecuencia de mutaciones cromosómicas.	Produce efectos tóxicos a nivel del sistema nervioso central y periférico, así como reacciones de hipersensibilidad. Su derivado dihidroestreptomicina es menos tóxico, pero provoca daños irreversibles a nivel auditivo.
Isoniazida (INH o H)	Es un profármaco que requiere su activación por parte de la enzima catalasa-peroxidasa <i>mycobacteriana</i> , katG, codificada por el gen katG27. Si la enzima catalasa-peroxidasa se encuentra intacta, el derivado activo de la INH actúa bloqueando la síntesis de los ácidos micólicos. Este fármaco presenta acción bacteriostática, incluso frente a bacilos resistentes, sin embargo la INH es activa, tan sólo, frente a los bacilos en replicación activa.	La resistencia de bajo nivel se produce por mutaciones en el gen inhA, responsable de la actividad reductasa de la proteína transportadora de ácidos grasos acilénolicos; sin embargo, esta mutación origina una sobreexpresión de la enzima que compensa la acción inhibidora del fármaco. Del 42-58% de las cepas INH resistentes presentan mutaciones en el gen katG.	Sus principales acciones tóxicas son la neuritis periférica y hepatitis medicamentosa. En altas dosis puede producir insomnio, e incluso convulsiones. Otros efectos colaterales son el rash, intolerancia gastrointestinal y alteraciones hemáticas son posibles, pero poco frecuentes.

Droga	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia	Reacciones adversas
Rifampicina (RMP o R)	<p>Presentan un resto naftoquinónico unido a un puente alifático grande, que les confiere la lipofilia necesaria para atravesar satisfactoriamente la pared celular de la <i>mycobacteria</i> y para unirse adecuadamente a la ARN polimerasa dependiente de ADN en la <i>mycobacteria</i>, y así inhibir la transcripción génica bacteriana. Además de este efecto bactericida sobre las células de <i>M. tuberculosis</i> metabólicamente activas, la RMP también posee una excelente acción esterilizante de las bacterias en estado de latencia.</p>	<p>Se adquiere resistencia a la RMP mediante mutaciones en una región bien definida de 81 pares de bases, es decir 27 codones, de la región central del gen que codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa (rpoB). Sin embargo, se han descrito 35 variantes alélicas distintas, con ligeras variaciones en su distribución geográfica.</p>	<p>En combinación con la INH aumenta la incidencia de efectos hepatotóxicos. Produce elevación de la bilirrubinemia e ictericia. Otras reacciones de origen inmunológico se manifiestan con fiebre, escalofríos, cefalea y alérgias generalizadas.</p>
Pirazinamida (PZA o Z)	<p>Mecanismo aún no bien dilucidado. Es activo incluso frente a TB latente y presenta un alto sinergismo con INH y RMP, logrando reducir las terapias a 6 meses. La actividad de la pirazinamida depende de la presencia de una amidasa bacteriana que la convierte en ácido pirazonoico (forma activa), que es altamente específico para el <i>M. tuberculosis</i>.</p>	<p>Las mutaciones en el gen <i>pncA</i> son las responsables de la síntesis de pirazinamidasa encargadas de inducir resistencia al fármaco. Se ha observado que entre el 72 y el 97% de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a PZA poseen mutaciones dispersas en el gen estructural (<i>pncA</i>) o en el promotor de la piracinamidasa. No obstante, existen cepas resistentes a la PZA, sin mutaciones en el gen <i>pncA</i>, en las que esta resistencia se debe a otros mecanismos relacionados con la permeabilidad o el eflujo.</p>	

Droga	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia	Reacciones adversas
Etambutol (EMB o E)	Es un amino alcohol sintético activo por vía oral. Su mecanismo de acción no está del todo claro, se ha postulado que interfiere el metabolismo de dimicolato de trehalosa, del micolato y de la biosíntesis de espermidina. Sin embargo, estudios recientes indican como primer sitio de acción es la biosíntesis de arabinogalactano (AG) y lipoarabinomanano (LAM), también se cree que actúa como antimetabolito en la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos.	El EMB inhibe de forma específica la biosíntesis de la pared <i>mycobacteriana</i> . Así que la resistencia al EMB se asocia con cambios en una región genómica definida, el operón embCAB, que codifica arabinosil transferasa (EmbC, EmbA y EmbB) en el <i>M. tuberculosis</i> relacionadas con la síntesis de componentes de la pared celular como el arabinogalactano y el lipoarabinomanano. Entre el 47 y el 69% de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> resistentes presentan mutaciones en la región EmbB. En las cepas que no presentan mutaciones en la región EmbB la resistencia suele ser menor.	

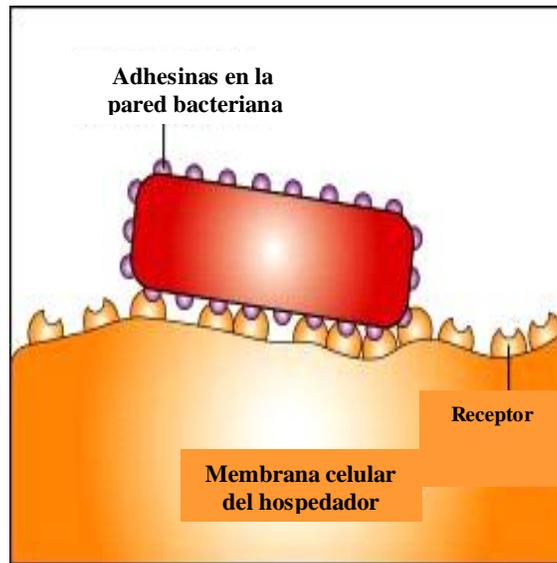
Fuente: Palomino C; Cardoso Leão S. y Ritacco V. (2007). Tuberculosis. From basic science to patient care. Primera Edición. Elaborado por: Equipo de investigadoras.

Anexo 20: Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* secuenciadas y publicadas.

Organismo	Tamaño (Mpb)	%GC	N° de cromosomas	Publicado	Modificado	Centro de investigación
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	4.4	65.6	1	09/10/2002	04/24/2009	TIRG
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	4.4	65.6	1	06/07/2007	05/01/2009	Broad Institute
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	4.4	65.6	1	05/31/2007	05/07/2009	Chinese National HGC, Shanghai
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	4.4	65.6	1	06/20/1998	04/24/2009	Welcome Trust Sanger Institute
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN 1435	4.4	65.4	1	10/30/2007	07/14/2009	Broad Institute

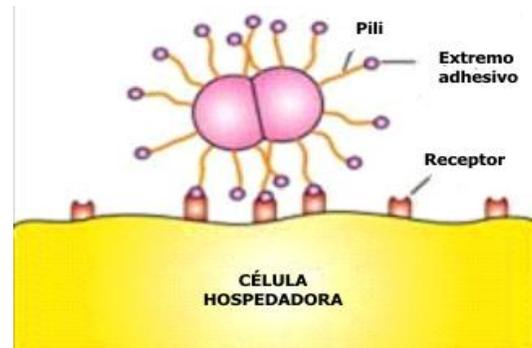
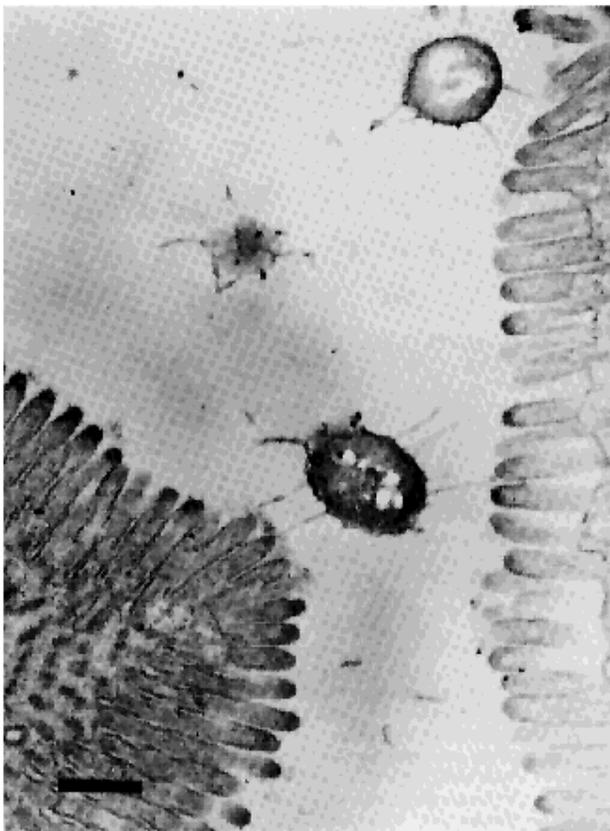
Fuente: Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI). Elaborado por: Equipo de investigadoras.

Anexo 21: Adhesina bacteriana uniéndose a célula.



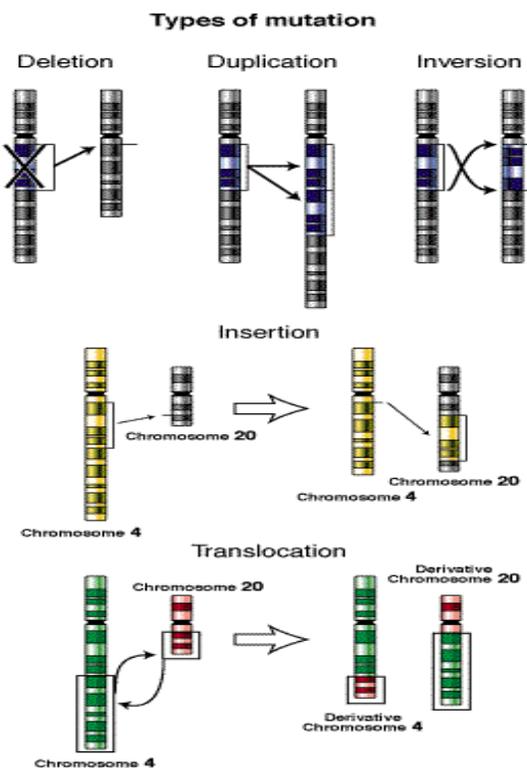
Fuente: DocStoc. Disponible: <http://www.docstoc.com/docs/529901/FACTORES-DE-VIRULENCIA>. Consultado: Agosto, 2009.

Anexos 22 y 23: Adhesinas fimbriales o pilis uniéndose a células blanco.



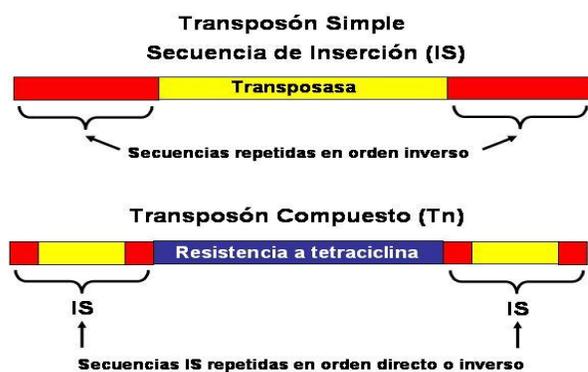
Fuente: Imagen 14 / IDEM.

Anexo 24: Deleciones y duplicaciones en regiones de un cromosoma.



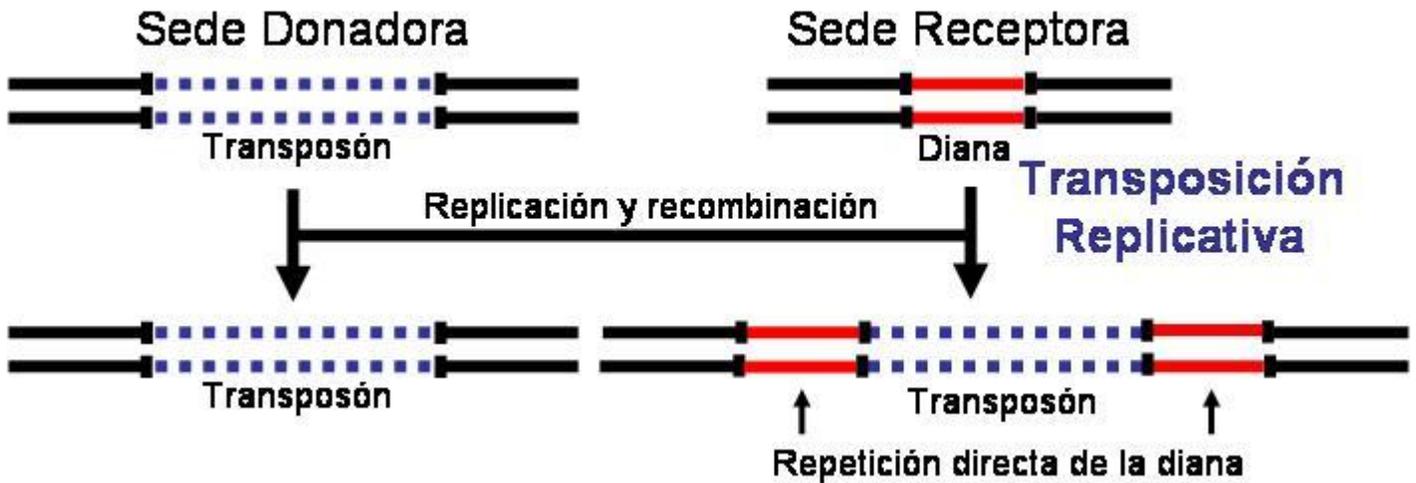
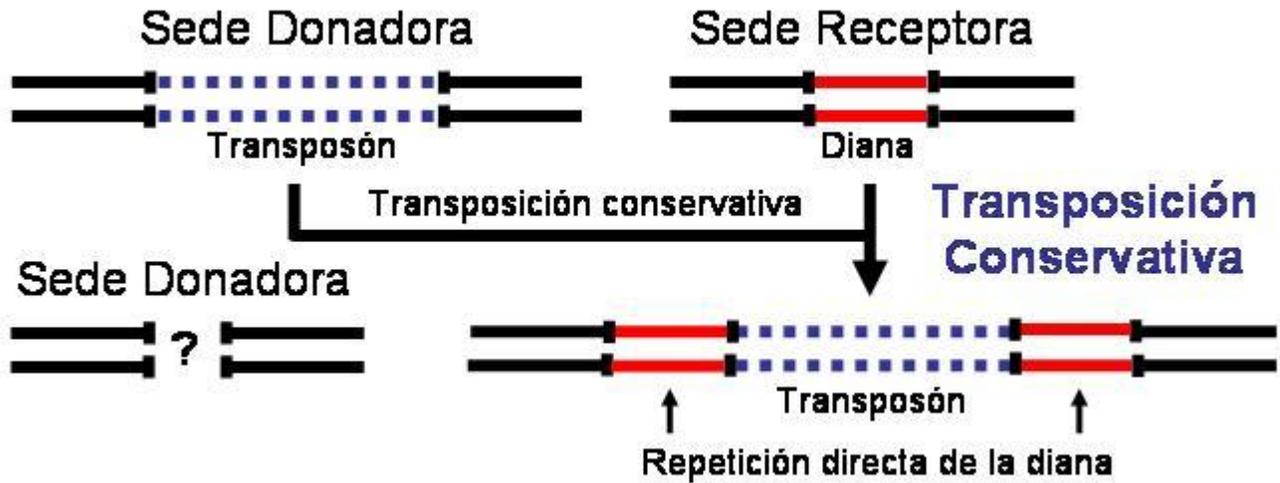
Fuente: Wikipedia. La enciclopedia libre. <http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Types-of-mutation.png>. Consultada: Agosto, 2009.

Anexo 25: Tipos de elementos genéticos transponibles.



Fuente: Imagen 21 / IDEM.

Anexo 26: Mecanismos de transposición.



Fuente: Imagen 21 / IDEM.

Anexo 27: Tabla de Amino ácidos.

Nombre	Abreviatura	Estructura lineal
Alanina	A	$\text{CH}_3\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Arginina	R	$\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{-NH}(\text{CH}_2)_3\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Asparagina	N	$\text{H}_2\text{N-CO-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Ácido aspártico	D	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Cisteina	C	$\text{HS-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Ácido Glutámico	E	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Glutamina	Q	$\text{H}_2\text{N-CO}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Glicina	G	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
Histidina	H	$\text{NH-CH}=\text{N-CH}=\text{C-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Isoleucina	I	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Leucina	L	$(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Lisina	K	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Metionina	M	$\text{CH}_3\text{-S}(\text{CH}_2)_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Fenilalanina	F	$\text{Ph-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Prolina	P	$\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{-CH-COOH}$
Serina	S	$\text{HO-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Treonina	T	$\text{CH}_3\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Triptofan	W	$\text{Ph-NH-CH}=\text{C-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Tirosina	Y	$\text{HO-Ph-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$
Valina	V	$(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}(\text{NH}_2)\text{-COO}$

Fuente: National Center for Biotechnology Information (NCBI). Elaborado por: Grupo de Investigadoras.

Anexo 28: Glosario de Abreviatura

A: Adenina.

Acs: Anticuerpos.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Ags: Antígenos.

AMPc: Adenosina Monofosfato cíclico.

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.

ARNs: Ácido Ribonucleico estructural.

ATP: Adenosín Trifosfato.

GTP: Guanín Trofosfato

BAAR: Bacilos Alcohol-Ácido Resistentes.

BACTEC: Técnicas de cultivo radiométricas.

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de búsqueda de Alineamiento Local).

C: Citosina.

CAM: Cloranfenicol Acetil Metil transferasa.

CDC: Control Diseases Center (Centro de Control de Enfermedades).

CLS: Cluster (Agrupación).

CMT: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

COBALT: Constraint-based Multiple Alignment Tool (Herramienta de Alineamiento Múltiple Basado en Concordancia).

COG: Clusters of Orthologous Groups (Agrupaciones de grupos ortólogos).

DOTS: Tratamiento de corta duración.

EMB o E: Etambutol.

ETH: Etionamida.

G: Guanina.

GC: Guanina + Citosina.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución).

Hsp: Heat shock protein (Proteína de shock térmico o calórico).

HTH: Helix Turn Helix (Hélice giro Hélice).

IN: Integrones.

INH o H: Isoniazida.

INTERPRO: Integrative Protein Signature Database (Base de datos de proteínas integradas).

IR: Terminales inversamente repetidos.

IS: Elementos de Inserción.

ITS: Infecciones de transmisión Sexual.

kDa: Kilo Dalton.

LPS: Liposacáridos.

MBL: Metallo Beta Lactamasa.

MINSA: Ministerio de Salud.

MpB: Miles pares de base.

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica).

Nt: Nucleótido.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORF: Open Reading Frame (Marcos de lectura abiertos).

PAS: Ácido p-aminosalicílico.

Pb: Pares de base.

PBPs: Proteínas de unión a penicilinas.

PCR: Polimeras Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

PIR: Protein Information Resource (Recurso de Información de Proteína).

PPD: Derivado Proteico Purificado ó reacción de tuberculina.

PVVS: Personas que Viven con VIH/SIDA.

PZA o Z: Pirazinamida.

RMP o R: Rifampicina.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismo de Nucleótido Simple)

STM o S: Estreptomicina.

T: Tiamina

TAES: Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado.

TB: Tuberculosis.

TIGR: The Institute for Genomic Research (Instituto de Investigación Genómica).

Tn: Transposón compuesto.

UNIPROT: Universal Protein Resource (Recurso de Proteína Universal).

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana.

wHTH: winding Helix Turn Helix (alado Hélice giro Hélice).

Anexo 29: Glosario

Ácido aspártico o su forma ionizada, el aspartato (Asp y D): Es uno de los veinte aminoácidos con los que las células forman las proteínas. En el ARN se encuentra codificado por los codones GAU o GAC. Presenta un grupo carboxilo (-COOH) en el extremo de la cadena lateral. A pH fisiológico, tiene una carga negativa (es ácido); pertenece al grupo de aminoácidos con cadenas laterales polares cargadas. No es un aminoácido esencial ya que puede ser sintetizado por el organismo humano⁵⁵.

Ácidos micólicos: Son ácidos grasos que se encuentran en las paredes celulares del taxón mycolata, un grupo de bacterias que incluye al *Mycobacterium tuberculosis*. Ellos constituyen el principal componente de la pared celular de las especies mycolata⁵⁶. La presencia de ácidos micólicos en la pared celular proporciona un claro rasgo morfológico general conocido como "cordones". Los ácidos micólicos se componen de una cadena corta de beta-hidroxi con un lado más largo de la cadena alfa alquilo. Cada molécula contiene entre 60 y 90 átomos de carbono. El número exacto de átomos de carbono varía según las especies y se puede utilizar como una ayuda de identificación.

La mayoría de los ácidos micólicos también contienen varios grupos funcionales. El *M. tuberculosis* produce tres tipos principales de ácidos micólicos: alfa, metoxi, y Keto. Los alfa-ácidos micólicos comprenden, al menos, el 70% de los ácidos micólicos presentes en el microorganismo y contiene varios anillos de ciclopropano.

Además, los ácidos micólicos permiten a la bacteria crecer rápidamente dentro de los macrófagos y ocultarse de manera efectiva del sistema inmune del huésped. La biosíntesis de micolatos es crucial para la supervivencia y la patogénesis de *Mycobacterium tuberculosis*.

⁵⁵Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_asp%C3%A1rtico
Consultado: Septiembre, 2009.

⁵⁶Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: http://en.wikipedia.org/wiki/Mycolic_acids. Consultado: Febrero, 2009.

Aciltransferasa: Es la enzima catalizadora de la transferencia de grupos acil (RCO-)⁵⁷. Es decir, la catálisis de la reacción generalizada: acil-transportador + reactivo = acil-reactivo + transportador.

Actividad 3-beta-hidroxi-delta5 deshidrogenasa de esteroides: La catálisis de la reacción: 3-beta-hidroxi-delta (5)-esteroide + NAD + = 3-oxo-delta (5)-esteroide + NADH + H +.

Actividad 3-deshidrogenasa hidroxiiisobutirato: Catálisis de la reacción: 3-hidroxi-2-metilpropanoato + NAD⁺ = 2-metil-3-oxopropanoato + NADH + H⁺.

Actividad ácido cobirínico A, C-sintasa diamida: Catálisis de la conversión del ácido cobirínico al ácido cobirínico A, C-diamida a través de la formación de un intermediario de ácido cobirínico C-monoamino.

Actividad aciltransferasa: Catálisis de la reacción generalizada: acil-carrier + reactivo = acil-reactivo + transportista.

Actividad amidasa N-acetilmuramoil-L-alanina: Es la catálisis de la hidrólisis de la relación entre residuos N-acetilmuramoil y residuos L-aminoácidos en determinados glucopéptidos de la pared celular bacteriana.

Actividad amidasa: Catálisis de la reacción: una amida de ácido monocarboxílico + H₂O = a monocarboxilata + NH₃.

Actividad ARNt sintasa dihidrouridina: Catálisis de la reacción: ARNt-uracilo + aceptor = ARNt-dihidrouridina + aceptor reducido.

⁵⁷ Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://www.uniprot.org/keywords/KW-0012>. Consultado: Junio, 2009.

Actividad carbono-ligasa de nitrógeno, con glutamina como amido-N-donante:

Catálisis de la transferencia del nitrógeno amida de la glutamina a una variedad de sustratos. GATas cataliza dos reacciones separadas en dos sitios activos, que se encuentran ya sea en una sola cadena polipeptídica o en diferentes subunidades. En la reacción de la glutaminasa, la glutamina se hidroliza a ácido glutámico y amoníaco, que se añade a un sustrato aceptor en la reacción de la sintetasa.

Actividad catalítica: Es la reacción bioquímica a temperaturas fisiológicas. En las reacciones catalizadas biológicamente, los reactivos se conocen como sustratos y los catalizadores son sustancias naturales macromoleculares conocidos como enzimas. Las enzimas tienen sitios de unión específicos para los sustratos y generalmente están compuestas en su totalidad o en gran parte por proteína, pero el ARN que tiene actividad catalítica (ribozimas) a menudo es también considerado como enzimático.

Actividad de dimerización de proteína: Es la formación de un dímero de proteínas, que consiste en una estructura de macromoléculas de dos subunidades idénticas asociadas no covalente o no idénticas.

Actividad de sensor de dos componentes: Catálisis de la fosforilación de un regulador de transcripción específicos en respuesta a la señal de una sustancia, en particular fuera de la célula.

Actividad de transferasa: Catálisis de la transferencia de un grupo, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo glicosil, grupo acilo, que contienen fósforo, o de otros grupos, de un compuesto (donante) a otro compuesto (receptor). Transferasa es el nombre sistemático para cualquier enzima de la clase 2 EC.

Actividad de transporte de electrones: Cualquier entidad molecular que sirve como un aceptor de electrones y de los donantes de electrones en un sistema de transporte de electrones.

Actividad dehidrogenasa de 3-hidroxiacetil-CoA: Es la realización de la catálisis de la reacción: (S)-3-hidroxiacetil-CoA + NADP + = 3-acetoacetil-CoA + NADPH + H⁺.

Actividad dimerización de proteína: La formación de un dímero de proteínas, una estructura de macromoléculas consiste de dos subunidades idénticas asociadas no covalente o no idénticas.

Actividad fosfatasa: Es la catálisis de la hidrólisis de monoésteres fosfórico, la liberación de fosfato inorgánico.

Actividad fosfatas inositol o fosfatidilinositol: Catálisis de la eliminación de un grupo fosfato de mio-inositol fosforilado (1, 2, 3, 5/4, 6-ciclohexanehexol) o de un fosfatidilinositol.

Actividad fosfogluconato deshidrogenasa (descarboxilante): Catálisis de la reacción: 6-fosfo-D-gluconato + NADP + = D-ribulosa 5-fosfato + CO₂ + NADPH + H⁺.

Actividad glucuronosiltransferasa: La catálisis de la reacción: UDP-glucuronato + receptor = UDP + receptor beta-D-glucuronoside.

Actividad helicasa: Es la catálisis de la reacción: NTP + H₂O = NDP + fosfato para impulsar la anulación de una hélice de ADN o ARN.

Actividad hidrolasa éster sulfúrico: Catálisis de la reacción: RSO-R' + H₂O = RSOOH + R'H. Esta reacción es la hidrólisis de un enlace éster sulfúrico, un éster formado por ácido sulfúrico, O=SO(OH)₂

Actividad hidrolasa hidroxiacilglutaciona: Lleva acabo la catálisis de la reacción: (S) - (2-hidroxiacil) glutación + H₂O = glutación + 2-hidroxil carboxilato.

Actividad hidrolasa, que actúa en los enlaces carbono-nitrógeno (pero no péptido):

Cataliza la hidrólisis de un enlace carbono-nitrógeno, con la excepción de los enlaces peptídicos.

Actividad hidrolasa: La catálisis de la hidrólisis de diversos enlaces, por ejemplo, C-O, C-N, C-C, bonos de anhídrido fosfórico, etc. Hidrolasa es el nombre sistemático para cualquier enzima de la clase EC 3.

Actividad liasa: Catálisis de la ruptura de C-C, C-O, C-N y otros enlaces por otros medios de hidrólisis o por oxidación, o por el contrario agregar un grupo a un doble enlace. Se diferencian de otras enzimas en dos sustratos que participan en una dirección de reacción, pero sólo una en la otra dirección. Al actuar sobre el sustrato único, una molécula es eliminada y esto genera un doble enlace o un nuevo anillo.

Actividad ligasa: Catálisis de la ligadura de dos sustancias que rompe concomitantemente un vínculo difosfato, por lo general en un nucleósido trifosfato.

Actividad metaloendopeptidasa: Catálisis de la hidrólisis de los enlaces alfa-péptido en una cadena polipeptídica por un mecanismo en el que el agua actúa como un nucleófilo, uno o dos iones metálicos tienen la molécula de agua y en las cadenas de aminoácidos son ligandos de los iones metálicos.

Actividad metiltransferasa Metilado-ADN-proteína -S-cisteína: Catálisis de la reacción: el ADN (que contiene 6-O-metilguanina) + (proteína)-L-cisteína = ADN (sin 6-O-metilguanina) + proteína S - metil-L-cisteína.

Actividad metiltransferasa: Catálisis de la transferencia de un grupo metilo a una molécula receptora.

Actividad mutasa fosfoglucoamina: Catálisis de la reacción: D-glucosamina-1-fosfato = D-glucosamina 6-fosfato.

Actividad nucleósidos trifosfatasa: La catálisis de la reacción: un nucleósido trifosfato + H_2O = nucleósido difosfato + fosfato.

Actividad oxidorreductasa: Es la catálisis de una reacción de oxidación-reducción (redox), una reacción química reversible en la que el estado de oxidación de un átomo o átomos de una molécula se altera. Uno actúa como un sustrato de hidrógeno o de un donante de electrones y se oxida, mientras que los otros átomos como el hidrógeno o aceptor de electrones y se reduce.

Actividad prolina dehidrogenasa: Catálisis de la reacción: L-prolina + receptor = (S)-1-pirrolina-5-carboxilato + aceptor reducido.

Actividad serina-endopeptidasa: Consiste en la catálisis de la hidrólisis de los enlaces alfa-péptido en una cadena de polipéptidos de un mecanismo catalítico, que involucra una tríada catalítica que consiste en un nucleófilo serina que es activado por un interruptor de protones de un residuo de ácidos (por ejemplo, aspartato o glutamato) y un residuo de base (por lo general histidina).

Actividad sintasa naringenina chalcona: Es la catálisis de la reacción: 3 malonil-CoA + 4-coumaroil-CoA = 4-CoA + chalcona naringenina + 3 CO_2 .

Actividad transmembrana de los iones de cobalto: Es la catálisis de la transferencia de los iones de cobalto de un lado a otro de la membrana.

Actividad transportista del ión magnesio: Consiste en la catálisis de la transferencia de iones de magnesio de un lado a otro de la membrana.

Actividad transferasa de grupos de la transferencia de hexosil: Catálisis de la transferencia de un grupo de hexosil de un compuesto (donante) a otro (receptor).

ADN vector: Es capaz de replicarse independientemente del ADN de la célula anfitriona en la cual crece. Dentro de este grupo de *vectores* están los plásmidos.

ADN vinculante: Cualquier función molecular por el cual un producto del gen interactúa de manera selectiva con el ADN.

Agente quelante: También denominado antagonista de metales pesados, es una sustancia que forma complejos con iones de metales pesados. A estos complejos se les conoce como quelatos, palabra que proviene de la palabra griega *chele* que significa garra.

Alineamiento de secuencias: Es el proceso de comparar dos o más secuencias con el fin de buscar una serie de caracteres individuales o patrones de caracteres que se encuentran en el mismo orden en las secuencias, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas consultados⁵⁸. Las secuencias alineadas se escriben con las letras (representando aminoácidos o nucleótidos) en filas de una matriz en las que, si es necesario, se insertan espacios para que las zonas con idéntica o similar estructura se alineen.

Las aproximaciones computacionales al alineamiento de secuencias se dividen en dos categorías:

- Alineamiento global: Alineamiento de secuencias completas.
- Alineamiento local: Alineamiento de subsecuencias.

Anotación: Es la localización de genes en un secuencia de genoma, incluyendo genes que codifican proteínas y genes que codifican ARN, proporcionando así la secuencia y localización de proteínas codificadas y moléculas de ARN⁵⁹.

Antígeno: Es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmune⁶⁰. La definición moderna abarca todas las sustancias que pueden ser

⁵⁸ Wikipedia La enciclopedia libre. Disponible: http://es.wikipedia.org/wiki/Alineamiento_de_secuencias. Consultado: Julio 10, 2009.

⁵⁹ David W. Mount. (2004). *Bioinformatics; Sequence and Genome Analysis*. Segunda Edición. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

reconocidas por el sistema inmune adaptativo, bien sean propias o ajenas. Los antígenos son usualmente proteínas o polisacáridos. Esto incluye partes de bacterias (cápsula, pared celular, flagelos, fimbrias, y toxinas), de virus y otros microorganismos. Los lípidos y ácidos nucleicos son antigénicos únicamente cuando se combinan con proteínas y polisacáridos.

Los antígenos no-microbianos exógenos (ajenos al individuo) pueden incluir polen, clara de huevo, y proteínas de tejidos y órganos transplantados o proteínas en la superficie de glóbulos rojos transfundidos.

Apoptosis: Es una forma de muerte celular, que está regulada genéticamente. La muerte celular programada es parte integral del desarrollo de los tejidos tanto de plantas como de animales pluricelulares. Cuando una célula muere por apoptosis, empaqueta su contenido citoplasmático, lo que evita que se produzca la respuesta inflamatoria característica de la muerte accidental o necrosis. En lugar de hincharse y reventar, derrama su contenido intracelular dañino enzimático, hacia el espacio intercelular, las células en proceso de apoptosis y sus núcleos se encogen, y con frecuencia se fragmentan conformando vesículas pequeñas que contienen el material citoplasmático. De esta manera, pueden ser eficientemente englobadas vía fagocitosis y, consecuentemente, sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente⁶¹.

Arabinogalactan: Es un biopolímero formado por monosacáridos arabinosa y galactosa. Dos clases de arabinogalactanes se encuentran en la naturaleza: arabinogalactan vegetal y arabinogalactan microbiana. La arabinogalactan microbiana es un componente estructural de la pared celular de micobacterias⁶². Tanto la arabinosa como la galactosa, son únicas en la configuración de furanosa. La porción galactano de la arabinogalactan microbiana es lineal, constituida de aproximadamente 30 unidades con una alternancia de enlaces

⁶⁰ Dictionary. Disponible: http://www.antígeno_Definición_dictionary.com. Consultado: Abril, 2008.

⁶¹ Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>. Consultado: Julio, 2009

⁶² Esko J. D., Doering T. L. y. Raetz C. R. (2008). In *Essentials of Glycobiology*. Editorial Cold Spring Harbor. II Edición. Capítulo 20.

glucosídicos β -(1-5) y β -(1-6). La cadena arabinan, que consta alrededor de 30 residuos⁶³, se unen a los tres puntos de ramificación en la cadena de galactano. La porción de arabinan del polímero es una estructura compleja ramificada, generalmente cubierta con ácidos micólicos. Los enlaces arabinan glucosídicos son α -(1-3), α -(1-5), y β -(1-2).

Arabinosa: Es una aldopentosa, es decir es un monosacárido con cinco átomos de carbono, que incluye un aldehído (CHO) como grupo funcional.

Arginina (R): Es uno de los 20 aminoácidos que se encuentran formando parte de las proteínas. La arginina es un aminoácido esencial, y puede estimular la función inmunológica al aumentar el número de leucocitos. La arginina está involucrada en la síntesis de creatina, poliaminas y en el ADN⁶⁴.

ARN vinculante: Interacción de forma selectiva y no covalente con una molécula de ARN o de una parte del mismo.

Arqueas (Archaea): Son microorganismos unicelulares. Al igual que las bacterias, las arqueas carecen de núcleo y son por tanto procariontes. Sin embargo, las diferencias a nivel molecular entre arqueas y bacterias son tan fundamentales que se las clasifica en grupos distintos. Actualmente se considera que las arqueas están filogenéticamente más próximas a los eucariontes que a las bacterias⁶⁵.

ATP vinculante: Proteína que se une 5'-trifosfato de adenosina (ATP), una adenosina ribonucleótido (a base de purina adenina ligada a la del azúcar D-ribofuranose) que lleva

63 Suresh Bhamidi, Michael S. Scherman, et al. (2008) The identification and location of succinyl residues and the characterization of the interior arabinan region allow for a model of the complete primary structure of *Mycobacterium Tuberculosis* mycolyl arabinogalactan. Revista de Química biológica. Volumen 283, Páginas 12992-13000.

64 Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Arginina>. Consultado: Septiembre, 2009.

65 Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Archaea>. Consultado: Julio, 2009.

tres grupos fosfato esterificados a la mitad del azúcar. Es la fuente de la célula de la energía y de fosfato.

ATP-dependientes de la actividad helicasa de ADN: Catálisis de la reacción: $ATP + H_2O = ADP + \text{fosfato}$, conduciendo la anulación de la hélice de ADN.

Bacteriófagos: Son virus que infectan exclusivamente a bacterias. Al igual que los virus que infectan células eucariotas, los fagos están constituidos por una cubierta proteica o cápside en cuyo interior está contenido su material genético, que puede ser ADN o ARN de simple o doble cadena, circular o lineal (en el 95% de los fagos conocidos es ADN de doble cadena), de 5.000 a 500.000 pares de bases. El tamaño de los fagos oscila entre 20 y 200 nm aproximadamente.

Carboxipeptidasa: Es una proteasa que hidroliza los enlaces peptídicos. Ésta en concreto es una exoproteasa, es decir, ataca a la proteína por un extremo, específicamente acomete al extremo carboxilo-terminal. Existen 2 tipos de carboxipeptidasas, que aunque catalizan la misma reacción, tienen especificidad distinta:

- Carboxipeptidasa A: Sólo rompe el enlace peptídico si el aminoácido carboxilo-terminal es hidrofóbico.
- Carboxipeptidasa B: Rompe el enlace si es básico.

Ciclofilinas (CYP): Son proteínas que se unen a la ciclosporina, un inmunosupresor que se utiliza generalmente para evitar el rechazo después de los trasplantes de órganos internos. Estas proteínas poseen actividad peptidil isomerasa prolil, que cataliza la isomerización de enlaces peptídicos desde el estado trans a la forma cis en los residuos de prolina, lo que facilita el plegamiento de proteínas y, por ello, la consecución de su estructura⁶⁶.

Citocromo c o cyt c: Es una proteína hemo pequeño que se encuentra estrechamente asociados con la membrana interna de la mitocondria. Pertenece a la familia de proteínas

⁶⁶ Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclophilin>. Consultado: Septiembre, 2009.

del citocromo c. El citocromo c es una proteína muy soluble, a diferencia de otros citocromos, con una solubilidad de aproximadamente 100 g/L y es un componente esencial de la cadena de transporte de electrones, en el que ejerce un electrón. Es capaz de sufrir oxidación y reducción, pero no se puede unir al oxígeno. Entre las funciones del citocromo c, encontramos que: Pueden catalizar varias reacciones tales como la oxidación y la hidroxilación aromática, y muestra la actividad de peroxidasa por la oxidación de donadores de electrones distintos;

También es un intermediario en la apoptosis. El citocromo c es liberado por la mitocondria en respuesta a estímulos pro-apoptóticos.

La elevación sostenida de los niveles de calcio precede a la liberación de cyt c de la mitocondria⁶⁷.

Citocromo: Son proteínas de color oscuro que desempeñan una función vital en el transporte de energía química en todas las células vivas. Las células animales obtienen la energía de los alimentos mediante un proceso llamado respiración aerobia; las plantas capturan la energía de la luz solar por medio de la fotosíntesis. Los citocromos intervienen en los dos procesos⁶⁸.

Citolisis: La ruptura de las membranas celulares y la pérdida de citoplasma.

Codón: Es una longitud de tres nucleótidos en el ADN que se traduce por la célula como una posición de aminoácidos en una proteína. De los 64 codones posibles, 61, se leen habitualmente como uno de los 20 aminoácidos, y los 3 restantes se leen como codones de parada que indica el final de la proteína. Los ARNm llevan la información para las secuencias de proteínas como una secuencia de codones.

Cointegrado: Es un intermediario formado durante la transposición replicativa.

⁶⁷Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: http://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_c. Consultado: Septiembre, 2009.

⁶⁸Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Citocromo>. Consultado: Septiembre, 2009.

Complejo Respiratorio de la cadena de montaje IV: La agregación, disposición y unión en común de un conjunto de componentes para formar la cadena respiratoria complejo IV (también conocido como citocromo c oxidasa), el miembro de la terminal de la cadena respiratoria de la mitocondria y algunas bacterias aerobias. Oxidasas citocromo c son múltiples enzimas que contienen la subunidad de 13 subunidades en la forma mitocondrial de mamíferos a 3-4 subunidades en las formas bacterianas.

Contenido de Guanina y Citosina: Es una característica del genoma de un organismo o de cualquier segmento de ADN o ARN, que representa la cantidad de pares Guanina (G)-Citosina (C), este contenido está expresado generalmente como porcentaje. Los pares GC en el ADN están conectados por tres enlaces de hidrógeno en vez de dos, como los pares Adenina (A) y Tiamina (T). Esto hace el enlace GC más fuerte y más resistente a la desnaturalización por efecto de la temperatura por lo que el contenido GC tiende así a ser mayor en los hipertermófilos.

Cutina: Es una macromolécula que constituye el componente principal de la cutícula vegetal que cubre todas las superficies aéreas de las plantas. Es un polímero formado por muchos ácidos grasos de cadena larga, que están unidos unos a otros por uniones éster, creando una red rígida tridimensional. El otro polímero cutícula importante, que es mucho más fácilmente conservado en el registro fósil, es subcutáneo. La cutina se compone de ácidos hidroxí omega y sus derivados que están vinculados entre sí a través de enlaces éster, formando un polímero de poliéster de tamaño indeterminado⁶⁹.

D-alanina-D-alanina carboxipeptidasa: Nombre alternativo para transpeptidasa, recibido por tener dos residuos de alanina en el carbono terminal⁷⁰.

⁶⁹Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://en.wikipedia.org/wiki/Cutin>. Consultado: Octubre, 2009.

⁷⁰Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Transpeptidasa>. Consultado: Junio, 2009.

Derivación pentosa-fosfato: El proceso por el que se oxida la glucosa, junto a la síntesis de NADPH. De glucosa 6-P se oxida con la formación de dióxido de carbono (CO₂), ribulosa 5-fosfato y la reducción de NADP; ribulosa 5-P entra entonces en una serie de reacciones de interconversión de fosfatos de azúcar. La vía pentosa fosfato es una fuente importante de equivalentes de reducción para las reacciones de la biosíntesis y también es importante para la conversión de hexosas para pentosas.

Droga: Es cualquier sustancia de origen natural o sintético, diferente de un nutriente, que, cuando se administra o se aplica a un organismo, afecta a la estructura o el funcionamiento del organismo, en particular, cualquiera de esas sustancias utilizadas en el diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedad⁷¹.

Endocitosis: Proceso celular por el que la célula introduce en su interior moléculas grandes o partículas, y lo hace englobándolas en una invaginación de la membrana citoplasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse e incorporarse al citoplasma⁷².

Endocitosis mediada por receptor: Es el mecanismo de incorporación de moléculas específicas reconocidas por un receptor de la membrana plasmática.

Endonucleasa: Es la capacidad de la fosfodiesterasa para adherirse a enlaces fosfodiéster internos, dentro de un sustrato de ADN o ARN.

Enzima de restricción (o endonucleasas de Restricción): Es una enzima que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción, o en un sitio no muy lejano a éste, dependiendo de la enzima. Los sitios de restricción cuentan entre 4 y 12 pares de bases, con las que son reconocidos. El mecanismo de corte de ADN se realiza a través del ruptura de 2 enlaces fosfodiéster en la doble hebra, lo que da lugar a dos

71 UniProt. Disponible: <http://www.uniprot.org/uniprot/A5WR89>. Consultado: Septiembre, 2009.

72 Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Endocitosis>. Consultado: Agosto, 2009.

extremos de ADN. Éstos pueden ser romos (cuando los enlaces rotos coinciden) o Cohesivos/escalonados. Estos últimos tienen tendencia a volver a unirse de modo espontáneo, ya que los extremos se pueden unir a otros extremos coincidentes que pueda haber en la cercanía (Apareamiento de Watson y Crick). Los fragmentos de ADN obtenidos de este modo pueden unirse por otras enzimas llamadas ligasas.

Enzimas: Sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sea termodinámicamente posible (si bien no pueden hacer que el proceso sea más termodinámicamente favorable). En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en diferentes moléculas (los productos). Casi todos los procesos en las células necesitan enzimas para que ocurran en tasas significativas. A las reacciones mediadas por enzimas se las denomina reacciones enzimáticas⁷³.

Esterasa: Enzima perteneciente a la familia de hidrolasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces ésteres.

Eucariota: Es un organismo compuesto por una o más células que tiene un núcleo reconocible en el examen microscópico. Esta clasificación incluye plantas y animales.

Exonucleasa: Enzima que degrada el ADN o ARN progresivamente por escisión de nucleótidos a partir de un extremo de la cadena.

Exportadores de cobre-ATPasa: Catálisis de la transferencia de un soluto o solutos de un lado de una membrana a la otra según la reacción: $ATP + H_2O + Cu^{2+} (en) = ADP + fosfato + Cu^{2+} (fuera)$.

⁷³Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Enzima>. Consultado: Mayo, 2009.

Factor de elongación: Proteína que se asocia con los ribosomas en función del ciclo durante la fase de elongación de la síntesis de proteínas, y cataliza la formación de la unión entre el acilo de entrada de residuos de aminoácidos y la cadena de péptidos.

Factores de virulencia: Son moléculas producidas por un patógeno, que influencia específicamente las funciones del hospedante, permitiendo al patógeno crecer. Los factores que se usan en los procesos vitales generales, como metabolismo o componentes celulares bacterianos, pueden ser vitales a la habilidad del patógeno a sobrevivir en el hospedante, pero no son considerados "factores de virulencia" desde que han perdido funciones específicas por influencia directamente del hospedante⁷⁴. Un factor o determinante de virulencia, es fácilmente identificable debido a que es el componente molecular del patógeno, que cuando es removido, disminuye la virulencia del patógeno.

FAD (Flavin Adenine Dinucleotide): Proteína implicada en la síntesis de flavina adenina dinucleótido o la proteína que contiene al menos un FAD como grupo prostético / cofactor (flavoproteína), tales como la oxidación de muchas enzimas de reducción. FAD es una molécula transportadora de electrones, que funciona como un receptor de hidrógeno. El término genérico "flavina" deriva de la palabra latina Flavio ("amarillo") por el color amarillo brillante que presentan en forma sólida y en soluciones acuosas neutras.

Fagocitosis: Es un tipo de endocitosis por el cual algunas células rodean con su membrana citoplasmática a una sustancia extracelular (un sólido) y la introducen al interior celular. Esto se produce gracias a la emisión de pseudópodos alrededor de la partícula o microorganismo hasta englobarla completamente y formar alrededor de él una vacuola, la cual fusionan posteriormente con lisosomas para degradar la sustancia fagocitada, la cual recibirá el nombre de fagosoma. Es el modo de nutrición, ingestión de materia del exterior (bacterias, otras células, materia inorgánica, etc), como es el caso de algunos organismos unicelulares. Es uno de los medios de transporte grueso que utilizan para su defensa algunas células de los organismos pluricelulares.

⁷⁴Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: http://es.wikipedia.org/wiki/Factor_de_virulencia. Consultado: Agosto, 2009.

En organismos multicelulares, este proceso lo llevan a cabo células especializadas, casi siempre con el fin de defender al conjunto del organismo frente a potenciales invasores perjudiciales. En muchos organismos superiores, la fagocitosis es tanto un medio de defensa ante microorganismos invasores como de eliminación (e incluso reciclaje) de tejidos muertos⁷⁵.

Fijador a GTP: Proteína que se une a un guanósina 5'-trifosfato (GTP), un guanósina ribonucleótido (a base de purina guanina relacionados con el azúcar D-ribofuranose) que lleva tres grupos fosfato esterificados a la mitad del azúcar.

Fijador a Nucleótido: Proteína que se une a un nucleótido, un éster de fosfato de un nucleósido que consiste en una base de purina o de pirimidina vinculados a la ribosa o desoxirribosa fosfatos.

Fijador de 2Fe-2S: Interacción de forma selectiva y no covalente con 2Fe-2S, este grupo está formado por dos átomos de hierro, con dos átomos de azufre inorgánico encuentra entre los hierros y actuando como puente ligando.

Fijador de coenzima: Interacción de forma selectiva y no covalente con una coenzima, cualquiera de los diferentes cofactores orgánicos no proteicos que se requieren, además de una enzima y un sustrato, para una reacción enzimática de proceder.

Fijador de factor anti-sigma: Interactuar de forma selectiva y no covalente con un factor de antisigma, un factor que inhibe la capacidad del factor sigma para funcionar como un iniciador de la transcripción.

Fijador piridoxal fosfato: Interacción de forma selectiva y no covalente con fosfato de piridoxal 5', 3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metil-4 carboxaldehído piridina-5' fosfato, la forma biológicamente activa de vitamina B6.

⁷⁵Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Fagocitosis>. Consultado: Agosto, 2009.

Fimbrina: Es una proteína de unión a actina que interviene en la formación de retículas de microfilamentos. Miembro de la familia con dominios CH (de homología a calponina, como son la actinina alfa o la distrofina), posee un elemento de 27 kDa de unión a actina que consiste en una duplicación en tandem con dos dominios CH. Es capaz de unir filamentos intermedios. Se encuentra presente en muchos tipos celulares, destacando los que poseen microvellosidades intestinales, estereocilios, filopodios de fibroblastos. Su secuencia de proteínas es muy semejante en humanos y levaduras, lo que da idea de su conservación en la filogenia; de hecho, las levaduras carentes de fimbrina son defectivas en morfogénesis y endocitosis. La fimbrina, debido a su implicación en la generación de microfilamentos, interviene en procesos complejos como la citocinesis en levaduras y la invasión por bacterias enteropatógenicas. Su papel como creador de retículas de actina deriva de su estructura proteica, estructura descrita por cristalografía en los organismos modelo *Arabidopsis thaliana* y *Schizosaccharomyces pombe*.

Flavoproteína: enzimas que contienen uno o más nucleótidos de flavina (FAD o FMN) como cofactores redox. Flavoproteínas están involucrados, por ejemplo, en la degradación oxidativa de piruvato, ácidos grasos y aminoácidos, y en el proceso de transporte de electrones.

Función molecular de azúcar: La actividad Simportador hidrógeno: Catálisis de la transferencia de un soluto o solutos de un lado de una membrana a la otra según la reacción: azúcar (a) + H + (salida) = azúcar (en) + H + (en)

Furanosa: Es un azúcar simple que contiene una de cinco miembros furanos basado en la estructura de anillo y es un sub-cetona terminal que le da poder reductor.

Galactano: Es un polímero de la galactosa. Se encuentra en la hemicelulosa y se puede convertir a la galactosa por hidrólisis. La solubilidad de la galactosa en el agua es 68,30 gramos por 100 gramos de agua a 20-25 °C. Glucosa y galactosa se producen por la hidrólisis de la lactosa por β -galactosidasa.

Galactosa (Gal): Es un tipo de azúcar que es menos dulce que la glucosa. Se considera un edulcorante nutritivo porque tiene la energía alimentaria. Su nombre proviene de la antigua palabra griega para la leche, γάλακτος (Galaktos).

Gen: Es la longitud de ADN que especifica una unidad de la función biológica, por lo general la secuencia de aminoácidos de una proteína. El ADN se copia en las moléculas de ARNm utilizando las reglas de vinculación como los utilizados para sintetizar nuevas cadenas de ADN.

Genes estructurales: Contienen información para traducir proteínas. Se trata de los genes cuya expresión está regulada. Dichos genes estructurales tienen la información necesaria para traducir 3 proteínas: Beta-galactosidasa, permeasa y la transacetilasa.

Genoma: Es todo el material genético contenido en las células de un organismo en particular.

Glicina (Gly, G): Es uno de los aminoácidos que forman las proteínas de los seres vivos. En el código genético está codificada como GGT, GGC, GGA o GGG. Es el aminoácido más pequeño y el único no quiral de los 20 aminoácidos presentes en la célula. Su fórmula química es $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ y su masa es 75,07. La glicina es un aminoácido no esencial. Otro nombre (antiguo) de la glicina es glicocola. La glicina actúa como neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central. Fue propuesta como neurotransmisor en 1965⁷⁶.

Glicosilación de lípidos: unión covalente de un residuo de glicosilo a una molécula de lípidos.

Granuloma en tejidos infectados: Los granulomas de la tuberculosis tienden a contener la necrosis (tubérculos calcificantes), pero no necrotizante granulomas que también pueden estar presentes. De células gigantes multinucleadas con núcleos dispuestos en forma de

⁷⁶ Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, et al. (1999) Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Archivo Psiquiatrico genético*. Volumen 56. Páginas 29 - 36.

herradura (células de Langhans gigantes) a menudo están presentes, pero no son específicas para la tuberculosis. El diagnóstico de la tuberculosis requiere la identificación del microorganismo causante de las tinciones especiales o los cultivos microbiológicos.

Grupo vinculante 2, hierro, 2, azufre: Interacción de manera selectiva y no covalente con un 2-hierro, 2-azufre (2Fe-2S); este grupo está formado por dos átomos de hierro, con dos átomos de azufre inorgánico, los átomos de hierros actúan como puente ligandos.

Heme o un grupo heme: Es un grupo prostético, o cofactor, que consiste en un átomo de hierro contenido en el centro de un gran anillo orgánico heterocíclico llamada porfirina. No todas las porfirinas contienen hierro, pero una fracción importante de las metaloproteínas que contienen porfirina tiene heme en su grupo prostético, estos son conocidos como hemoproteínas⁷⁷.

Heme: Proteína que contiene al menos un grupo hemo, un átomo de hierro coordinada a una protoporfirina IX. En la mioglobina y la hemoglobina, una de las posiciones de coordinación de hierro es ocupado por el oxígeno o de otros ligandos, como el monóxido de carbono. Hemo se encuentran también en los citocromos de la cadena de transporte electrónico en el que los electrones se unen, en la reducción de peróxidos (catalasas y peroxidases), y actúan como terminal de los componentes de los sistemas involucrados en multienzimático hidroxilación. El citocromo c es la proteína hemo único punto en común en la que el grupo hemo está unido covalentemente.

Hemolisinas: Es una proteína de bajo peso molecular que produce lisis de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas mediante la producción de poros en la membrana citoplasmática. Es un factor de virulencia del *Staphylococcus aureus*⁷⁸.

⁷⁷Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://en.wikipedia.org/wiki/Heme>. Consultado: Septiembre, 2009.

⁷⁸ Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Hemolisina> Consultado: Agosto, 2009.

Hidrolasa: Enzima que cataliza la reacción de hidrólisis, es decir, la adición de los iones hidrógeno e hidroxilo de agua a una molécula con la consiguiente división en dos o más moléculas más simples.

Hierro férrico vinculante: Interactuar de forma selectiva y no covalente con el hierro férrico, Fe (III).

Homeostasis celular de iones de hierro: Cualquier proceso que participan en el mantenimiento de un equilibrio interno de los iones de hierro en el nivel de una célula.

Homólogo: Describe los genes que han surgido de un gen ancestro común, como lo demuestran sus secuencias similares.

Inmunofilinas: Se refiere a un número de proteínas que sirven como receptores citosólicos de los principales fármacos inmunosupresores, ciclosporina A (CsA), FK506 y rapamicina. Unas clases conocidas de inmunofilinas son las ciclofilinas y las proteínas de enlace FK506, como la FKBP.

Integración de ADN: El proceso por el cual un segmento de ADN se incorpora a otro, generalmente más grande, como la molécula de ADN de un cromosoma.

Integrasa o Recombinasa: Es una enzima producida por un retrovirus como el VIH, que permite a su material genético ser integrado en el ADN de la célula infectada⁷⁹.

Invasividad: Propiedad que tienen los microorganismos de entrar en los tejidos del hospedero, sobrevivir a las defensas del mismo, multiplicarse y diseminarse. Pueden ser los gérmenes intra y/o extra celulares. Las superficies del cuerpo que son vulnerables para el ingreso de los microorganismos son la cavidad bucal, ocular y lesiones en la piel, así mismo el tracto respiratorio, gastrointestinal y el genitourinario.

79 Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://en.wikipedia.org/wiki/Integrase>. Consultada: Septiembre, 2009.

Ionóforo: Son pequeñas moléculas hidrofóbicas que se disuelven en la capa bilipídica y aumenta su permeabilidad a iones inorgánicos específicos. En otras palabras, son moléculas transportadoras de iones a favor de un gradiente de concentración.

Isla de patogenicidad: Es una fracción del DNA genómico de un microorganismo patógeno que le faculta como virulento. Suele estar contenido en plásmidos, y su origen es una transferencia horizontal de material genético. Suele albergar las secuencias codificantes de adhesinas, factores de evasión de las defensas del hospedador, toxinas, enzimas degradativas de componentes celulares, etc⁸⁰.

Kinasa: Enzima que cataliza la transferencia de fosfato (fosforilo o pirofosforil) por lo general de ATP para un segundo sustrato.

Lantibióticos: Son una clase de antibióticos peptídicos que contienen aminoácidos tioéter policíclicos, así como los aminoácidos dehidroalanina insaturados y ácido 2-aminoisobutírico. Los lantibióticos son producidos por un gran número de bacterias Gram positivas como *Streptococcus* y *Streptomyces* para atacar a las bacterias gram positivas de otros y, como tales, son considerados un miembro de las bacteriocinas⁸¹.

Ligasa: Enzima que cataliza la unión de dos moléculas, junto con la ruptura de un enlace pirofosfato del ATP o trifosfato similar. A veces los términos "sintasa", "sintetasa" o "carboxilasa" también se utilizan para esta clase de enzimas.

Macrófago: Célula fagocitaria del sistema retículo endotelial, que se encuentra presente en diferentes órganos. Los macrófagos procesan y presentan el antígeno al sistema inmune.

80 Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: http://es.wikipedia.org/wiki/Isla_de_patogenicidad
Consultado: Julio, 2009.

81 Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://en.wikipedia.org/wiki/Lantibiotics>. Consultado: Octubre, 2009.

Metaloenzima: Las metaloenzimas tienen una característica en común, que el ion metálico se une a la proteína con un sitio coordinación lábil. Como ocurre con todas las enzimas, la forma del sitio activo es crucial; el metal normalmente se encuentra en un bolsillo, cuya forma se adapta el sustrato. Los iones metálicos catalizan reacciones que son difíciles de lograr en la química orgánica⁸².

Metaloproteasa: Enzimas proteolíticas que utilizan un metal para su mecanismo catalítico. La mayoría de metaloproteasas son de zinc-dependientes, algunos de cobalto uso.

Metaloproteína: Es un término genérico para una proteína que contiene un ion metálico como cofactor⁸³. Las funciones de las metaloproteínas son muy variadas en las células, actuando como enzimas, proteínas de transporte y almacenamiento, y en la transducción de señales. De hecho, aproximadamente un cuarto a un tercio de todas las proteínas requieren metales para llevar a cabo sus funciones⁸⁴. El metal suele estar coordinado por átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre pertenecientes a los aminoácidos de la cadena polipeptídica y/o un ligando macrocíclico incorporado en la proteína.

La presencia de los iones metálicos en las metaloenzimas les permite llevar a cabo funciones tales como reacciones redox que no pueden ser fácilmente realizadas por el conjunto limitado de grupos funcionales que se encuentran en los aminoácidos⁸⁵.

Metilasa: Enzima encargada de catalizar la introducción de grupos metilos (-CH₃) en determinadas bases en una específica secuencia de ADN.

82Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Metaloprote%C3%ADna>. Consultado: Julio, 2009.

83Shriver D. F., Atkins P.W. (1999). Inorganic chemistry. Tercera Edición. Editorial Oxford University.

84 Waldron KJ, Robinson NJ (2009). How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? Revista Nature: Microbiología. Volumen 7. Páginas 25–35.

85 Messerschmidt A, Huber R, Wieghardt K, Poulos T. (2001). Handbook of Metalloproteins. Wiley. ISBN 0-471-62743-7

Microfilamentos: Son finas fibras de proteínas de 3 a 7 nm de diámetro. Están compuestos predominantemente de una proteína contráctil llamada actina. Los filamentos de actina o microfilamentos se sitúan en la periferia de la célula y se sintetiza desde puntos específicos de la membrana celular. Son los responsables de la forma y del desplazamiento celular. Están formados por proteínas globulares.

Monooxigenasa: Enzimas que reducen el oxígeno molecular mediante la incorporación de un átomo de oxígeno en el sustrato y el otro en el agua.

Mutación no-sinónimo: Cambio en uno de las tres posiciones en un codón para otro codón que especifica un diferente amino ácido.

Mutación sinónimo: Cambio en uno de las tres posiciones en un codón para otro codón que especifica el mismo amino ácido.

Mutación: En genética y biología, es una alteración o cambio en la información genética o genotipo de un ser vivo y que, por lo tanto, va a producir un cambio de características, que se presenta súbita y espontáneamente, y que se puede transmitir o heredar a la descendencia⁸⁶.

Mutagénesis: Es la producción de mutaciones sobre ADN, clonado o no. De realizarse in vitro, dicha alteración puede realizarse al azar (mutagénesis al azar), sobre cualquier secuencia, o bien de forma dirigida (mutagénesis dirigida) sobre una secuencia conocida y en la posición de interés. En el caso de realizarse in vivo, sobre organismos y no sobre ADN clonado por tanto, se realiza a gran escala y sin conocimiento de secuencia, empleando para ello sustancias denominadas mutágenos⁸⁷.

⁸⁶ Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Mutaci%C3%B3n>. Consultada: Septiembre, 2009.

⁸⁷ Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Mutag%C3%A9nesis>. Consultado: Marzo, 2009.

NAPD: Las enzimas que utilizan NADP (H) como aceptor de electrones o como cofactor. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, coenzima redox que participa en una variedad de reacciones enzimáticas en las que sirve como portador de electrones al ser alternativamente oxidada (NADP +) y reducida (NADPH). Analógica de NAD, pero NADPH se utiliza ampliamente en la biosíntesis, en lugar de las vías catabólicas, así como en la fotosíntesis.

Necrosis: (Del griego Νεκρός, significa muerte) Es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no se puede reparar o curar. Por ejemplo, el aporte insuficiente de sangre al tejido o isquemia, un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos, una infección, o el desarrollo de una enfermedad autoinmune o de otro tipo. Una vez que se ha producido y desarrollado, la necrosis es irreversible. Es una de las dos expresiones morfológicas reconocidas de muerte celular dentro de un tejido vivo⁸⁸.

Nivel de dominio de las proteínas: Se define como una unidad compacta, de características globulares, que suele comprender entre 30-150 aminoácidos y se considera que esta conformación está determinada por la secuencia de aminoácidos. Es una ordenación de fragmentos de estructura secundaria en una estructura terciaria y se estabiliza por enlaces de hidrógeno entre cadenas.

Nucleasa: Enzima que degrada los ácidos nucleicos en oligonucleótidos más corto o subunidades de un solo nucleótido por la hidrólisis de enlaces de fosfato de azúcar en la estructura de ácido nucleico.

Oligonucleótidos: Fragmentos cortos de polinucleótidos de 12 a 20 bases y de secuencia definida, que se utilizan como iniciadores o sondas, para amplificación enzimática, secuenciamiento, detección de mutaciones, etcétera.

⁸⁸ Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Necrosis>. Consultado: Julio, 2009.

Oxidoreductasa: Enzima que cataliza la oxidación de un compuesto con la reducción de otro.

Patogenicidad: Es la capacidad que tienen los microorganismos de producir enfermedad. Se usa para describir o comparar especies.

Peroxidasa: Enzima que cataliza la oxidación de un sustrato mediante la reducción de peróxido de agua. Estas enzimas se encuentran a menudo en los peroxisomas.

Pinocitosis: Es un proceso biológico que permite a determinadas células y organismos unicelulares obtener líquidos orgánicos del exterior para ingresar nutrientes o para otra función.

Plasmido: También llamados vectores, son moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. Su tamaño varía desde 1 a 250 kb. El número de plásmidos puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula⁸⁹.

Proceso metabólico celular de compuesto aromático: Son las reacciones químicas y las vías de participación de los compuestos aromáticos, cualquier compuesto orgánico que se caracteriza por uno o más anillos planos, cada uno de los cuales contiene dobles enlaces conjugados y electrones pi deslocalizados, que lleva a cabo por las células individuales.

Procariota: Organismo que no tiene núcleo en la célula, a menudo los microorganismo unicelulares.

Procesador de ARNt: Proteína implicada en el procesamiento de la transcripción del tRNA primaria para obtener un tRNA funcional. Transcripción de los resultados de tRNA

⁸⁹ Klein D. W., Prescott, Lansing M.; Harley J. (1999). Microbiology. Segunda Edición. Editorial McGraw-Hill.

genes en una molécula precursora de gran tamaño que incluso puede contener secuencias de varias moléculas de ARNt. Este transcrito primario es posteriormente procesada por la división y por la modificación de las bases adecuadas.

Procesamiento ARNt: El proceso por el cual un pre-molécula del tRNA se convierte en un ARNt maduro, listo para la adición de un grupo aminoacil.

Procesamiento del ARN: Cualquier proceso que participan en la conversión de uno o varios elementos transcripciones primaria de ARN en una o más parejas de moléculas de ARN.

Proceso catabólico de prolina: Reacciones químicas y las vías que resulta en la degradación de la prolina (pirrolidina-2-carboxílico), un derivado, cíclico, alfa-aminoácidos no esenciales se encuentran en enlace peptídico de las proteínas.

Proceso de biosíntesis de ATP: reacciones químicas y las vías que resulta en la formación de ATP, la adenosina 5'-trifosfato, una coenzima de importancia universal y regulador de la enzima.

Proceso de biosíntesis de cisteína a través de la cistationina: Son las reacciones químicas y las vías que resulta en la formación de la cisteína, a través de la cistationina intermedios.

Proceso de biosíntesis de cobalamina: Las reacciones químicas y las vías que resultan en la formación de vitamina B12 cianocobalamina (vitamina A), una vitamina soluble en agua se caracteriza por la posesión de un núcleo de corrina que contiene un átomo de cobalto.

Proceso de biosíntesis de esteroides: Las reacciones químicas y las vías que resulta en la formación de los esteroides, compuestos con un 1,2, núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, incluye la formación de novo y la interconversión de los esteroides por la modificación.

Proceso de biosíntesis de glutamato: Reacciones químicas y las vías que resulta en la formación de glutamato, el anión del ácido 2-aminopentanedioic.

Proceso de biosíntesis de los nucleótidos cíclicos: Las reacciones químicas y las rutas que resulta en la formación de una de nucleótidos cíclicos, un nucleótido en la que el grupo fosfato está en la vinculación diéster a dos posiciones sobre el residuo de azúcar.

Proceso de biosíntesis de tiamina: Las reacciones químicas y las vías que resulta en la formación de B1 tiamina (vitamina A), una vitamina soluble en agua presente en las verduras frescas y carnes, especialmente el hígado.

Procesos catabólicos de peptidoglucano: Las reacciones químicas y las vías que resulta en la degradación de peptidoglicanos, cualquiera de una clase de glicoconjugados en las paredes celulares de bacterias.

Procesos celulares: Cualquier proceso que se lleva a cabo a nivel celular, pero no necesariamente limitarse a una sola célula. Por ejemplo, la comunicación celular se produce entre más de una célula, pero se produce a nivel celular⁹⁰.

Proceso metabólico celular: Reacciones químicas y vías por las que las células individuales transformar las sustancias químicas.

Proceso metabólico de carbohidratos: reacciones químicas y las vías de participación de los hidratos de carbono, cualquiera de un grupo de compuestos orgánicos en función de la fórmula general $C_x(H_2O)_y$ y Incluye la formación de los derivados de los hidratos de carbono mediante la adición de un residuo de los hidratos de carbono a otra molécula.

Proceso metabólico de compuestos nitrogenados: Las reacciones químicas y las vías de participación de diferentes compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos, incluye la

90 Gene Ontology. AmiGO. Disponible: http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/termdetails.cgi?term=GO:0009987&session_id=9358amigo1256606980. Consultado: Agosto, 2009.

fijación de nitrógeno, la nitrificación, desnitrificación, de asimilación o la reducción de nitrato desasimilatoria y la interconversión de la materia orgánica y de nitrógeno de amonio.

Proceso metabólico de glucógeno: Las reacciones químicas y las vías de participación de glucógeno, un polidispersa, muy ramificado glucano integrado de las cadenas de D-glucosa en los residuos de alfa (1 -> 4) enlace glucosídico, unidas por los alfa (1 -> 6) enlaces glucosídicos.

Proceso metabólico manosa: Las reacciones químicas y las vías de participación de manosa, la Manno aldohexosa-hexosa, el C-2 epímero de la glucosa. La D-(+)-forma está ampliamente distribuido en Mananos y hemicelulosas y es de gran importancia en el núcleo de oligosacáridos N-oligosacáridos de las glucoproteínas.

Proceso metabólico valina: Las reacciones químicas y las vías de participación de la valina, 2-amino-3-ácido metilbutanoico.

Procesos metabólicos: Son todas las reacciones químicas y las vías, incluyendo el anabolismo y catabolismo, por el que los organismos vivos transforman las sustancias químicas. Los procesos metabólicos suelen transformar moléculas pequeñas; sin embargo incluyen también los procesos de macromoléculas tales como la reparación y la replicación del ADN, y la síntesis y la degradación de proteínas⁹¹.

Procesos metabólicos primarios: Son reacciones químicas y las vías de participación de los compuestos que se forman como parte de los procesos normales de anabólicos y catabólicos. Estos procesos tienen lugar en la mayoría, si no todas, las células del organismo.

Proteasa: Enzima que hidroliza los enlaces peptídicos.

⁹¹ Gene Ontology. AmiGO. Disponible: <http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/termdetails.cgi?term=GO:0008152>. Consultado: Agosto, 2009.

Proteína integral de membrana: Indica que la totalidad o parte de la secuencia del péptido se encaja en la membrana⁹².

Proteínas: Son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Las proteínas desempeñan un papel fundamental en los seres vivos y son las biomoléculas más versátiles y más diversas. Realizan una enorme cantidad de funciones diferentes.

Proteólisis: Reacciones químicas y las vías que resulta en la degradación de una proteína por la destrucción de la configuración natural, activo, con la hidrólisis de enlaces peptídicos.

Quinasa o cinasa: Llamada quinasa debido a que en inglés se escribe kinas. En bioquímica, es un tipo de enzima que transfiere grupos fosfatos desde el ATP a un sustrato específico o diana. El proceso se llama fosforilación. La diana puede activarse o inactivarse mediante la fosforilación. Todas las quinasas necesitan un ion metálico divalente como el Mg^{2+} o el Mn^{2+} para transferir el grupo fosfato⁹³.

Quorum: Este fenómeno es el responsable de que un conjunto de células independientes, bajo la generación de señales químicas autoinductoras, desarrolle comportamientos poblacionales coordinados, las señales extracelulares les proporciona información acerca de la densidad de células en el ambiente: cuanto mayor sea la población, mayor será la concentración de estas señales. Cuando se alcanza una concentración umbral, esto indica que la población ha llegado al quórum y se empiezan a expresar una serie de genes, provocando fenómenos de la multicelularidad, al igual que el patrón de la formación de colonias o la formación de cuerpos fructíferos.

⁹² Gene Ontology: AmiGO. Disponible: <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0016021>. Consultado : Agosto, 2009.

⁹³ Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Quinasa>. Consultado: Septiembre, 2009.

Recombinación de ADN: Cualquier proceso por el cual un nuevo genotipo está formado por una reagrupación de genes resultantes de combinaciones de genes diferentes de los que estaban presentes en los padres. En los eucariotas la recombinación genética puede ocurrir por surtido de cromosomas, la recombinación intracromosomal, o la recombinación intercromosómicos no recíprocas. Intracromosómica recombinación se produce por cruzar. En las bacterias que pueda producirse por la transformación genética, la conjugación, transducción, o F-producción.

Regulación de la transcripción dependiente de ADN: Cualquier proceso que modula la frecuencia, velocidad y magnitud de la transcripción de ADN-dependiente.

Reparación de la escisión de base: En la reparación de la escisión de base, una base alterada se retira por una enzima glicosilasa de ADN, seguida de una escisión del fosfato de azúcar resultante. El pequeño hueco a la izquierda en la hélice del ADN, es rellenado por la acción secuencial de la DNA polimerasa y ligasa de ADN.

Resolvasa: Es una enzima reguladora de la transposición.

Respuesta de defensa: reacciones, desencadenada en respuesta a la presencia de un cuerpo extraño o la aparición de una lesión, que se traducen en la restricción de los daños al organismo atacado o la prevención y recuperación de la infección causada por el ataque.

Secuencia específica de unión de ADN: Interactuar de forma selectiva y no covalente con el ADN de una composición de nucleótidos específicos, por ejemplo, GC-ADN ricos vinculante, o con un motivo de secuencia específica o tipo de ADN, por ejemplo promotor vinculante o ADN_r vinculante.

Señalización de *quorum*: Detección de quórum o autoinducción, es un mecanismo de control de expresiones genéticas dependiente de la densidad celular.

Serina (Ser o S): Es uno de los veinte aminoácidos naturales más comunes en la Tierra. La cadena lateral de la serina puede experimentar glucosilación⁹⁴.

Síntesis de la actividad ácido graso: Catálisis de la reacción: acetil-CoA + malonil n-CoA + NADPH + H + 2n = largo de ácidos grasos de cadena + n + 1 n-CoA + CO₂ + NADP + 2n.

Sistema de dos componentes de regulación: Proteína implicada en un sistema de responder a los cambios del medio ambiente se caracteriza generalmente por un sensor Kinasa de la membrana celular que fosforila sí mismo en respuesta a una señal y un regulador de respuesta a la cual se transfiere el grupo fosfato. El que responde es típicamente una proteína de unión al ADN que regula la transcripción. Varios de estos sistemas son muy complejos, con la participación de muchas proteínas en una cascada de señalización o de contribuir a las respuestas de varios de forma simultánea. Están involucrados en una variedad de procesos como quimiotaxis, osmorregulación, el transporte de magnesio, la tolerancia de pH, la esporulación, o la respuesta de las especies virulentas a los entornos de la célula huésped.

SNPs (Single nucleotide polymorphisms): Son variaciones de secuencia en una posición única de la base, que son comúnmente bastantes individuales de una misma especie.

Tautómeros: Se denominan así a dos isómeros que se diferencian sólo en la posición de un grupo funcional. Entre las dos formas existe un equilibrio químico. En un equilibrio tautomérico hay migración de un grupo o átomo.

Toxigenicidad: Capacidad que tienen algunos microorganismos de producir sustancias tóxicas o químicas que dañan los tejidos del huésped. Estos pueden ser Exotoxinas y Endotoxinas.

⁹⁴Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Serina>. Consultado: Septiembre, 2009.

Toxinas: Son proteínas o lipopolisacáridos que causan daños concretos a un huésped.

Transferencia de genes horizontal (TGH): También conocida como transferencia de genes lateral (TGL), es un proceso en el que un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente. La transferencia de genes horizontal es común entre las bacterias, incluso entre aquellas que son distantes. Este proceso se considera como una causa importante en la resistencia a fármacos. Cuando una célula bacteriana consigue esta resistencia, puede transferir rápidamente estos genes a otras especies. Bacterias entéricas intercambian material genético a través del aparato digestivo en el que viven.

Transferencia vertical: Ocurre cuando un organismo recibe material genético de sus ancestros, por ejemplo de sus padres o de una especie de la que ha evolucionado.

Translocación: Proteína implicada en el transporte de proteínas a través de una membrana. Como un ejemplo de translocación en el núcleo se produce a través de los poros nucleares que permiten la rápida difusión de moléculas pequeñas. Las moléculas más grandes (9nm máximo) toman más tiempo. Translocación a la mitocondria o el cloroplasto se produce en los sitios de adherencia entre las membranas externas e internas y se rige por la hidrólisis del ATP, así como el gradiente electroquímico de la membrana interna.

Transmembrana: Proteínas con al menos un dominio de transmembrana, una membrana-que atraviesan hélice alfa o beta-hoja (en el caso de porinas) de dominio incrustado en una membrana.

Transpeptidasa: Es una enzima bacteriana cuya función es realizar enlaces cruzados en la formación de las cadenas que constituyen al peptidoglicano en la pared celular de muchas bacterias. La enzima transpeptidasa es una carboxipeptidasa de 406 aminoácidos fijada sobre la membrana plasmática y es necesaria para la formación de la pared celular bacteriana. Es el blanco de la inhibición por la acción de las penicilinas, por ello, se considera una proteína ligadora de penicilina. La unión penicilina-transpeptidasa es de naturaleza irreversible, produce un grupo acilo sobre la transpeptidasa y forma como

resultado un altamente estable intermediario *peniciloil*, el cual carece de función sobre la síntesis de peptidoglicano.

Transporte de citrato: El movimiento dirigido de citrato, 2-hidroxi-1,2,3-propanetricarboxilato, dentro, fuera, dentro o entre las células.

Transporte de iones de níquel: El movimiento dirigido de iones níquel, dentro o entre las células.

Transporte de iones hierro: El movimiento dirigido de los iones hierro (Fe) dentro, fuera o entre las células.

Transporte de iones metales: El movimiento dirigido de los iones metálicos, cualquier ion metálico con una carga eléctrica, dentro, fuera, dentro o entre las células.

Transposasa: Es una enzima que se une a los extremos de un transposón y cataliza el movimiento de los transposones a otra parte del genoma de un mecanismo de corte y pegue o un mecanismo de transposición replicativa⁹⁵.

Triptófano (Trp o W): Es un aminoácido esencial en la nutrición humana. Es uno de los 20 aminoácidos incluidos en el código genético (codón UGG). Se clasifica entre los aminoácidos apolares, también llamados hidrofóbicos. El triptófano es un aminoácido esencial con una función muy importante ya que ayuda a regular los niveles adecuados de Serotonina en el cerebro. La ansiedad, el insomnio y el estrés se benefician de un mejor equilibrio gracias al triptófano⁹⁶.

⁹⁵Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://en.wikipedia.org/wiki/Transposase>. Consultada: Septiembre, 2009.

⁹⁶Wikipedia. La enciclopedia libre. Disponible: <http://es.wikipedia.org/wiki/Tript%C3%B3fano>. Consultado: Agosto, 2009.

Tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB): Se define como la tuberculosis que ha desarrollado resistencia al menos a la isoniazida y rifampicina, así como a cualquier miembro de la familia de las quinolonas y al menos una de las drogas inyectables de segunda línea contra la tuberculosis: kanamicina, capreomicina, o amikacina⁹⁷.

Tuberculosis multi resistente (MRD-TB): Se define como la tuberculosis que es resistente al menos a isoniazida (INH) y rifampicina (RMP), las dos drogas más poderosas de primera línea contra la TB. Los aislados clínicos resistentes a cualquier otra combinación de fármacos antituberculosos, pero no a la INH y RMP, no son clasificados como MDR-TB⁹⁸.

Unión a coenzima: Interactuar de forma selectiva y no covalente con una coenzima, cualquiera de los diferentes cofactores orgánicos no proteicos que se requieren, además de una enzima y un sustrato, para una reacción enzimática de proceder.

Unión de hierro-sulfuro: Interacción de forma selectiva y no covalente con un sulfuro de hierro, una combinación de hierro y los átomos de azufre.

Unión de iones magnesio: Interactuar de forma selectiva y no covalente con magnesio (Mg) iones.

Unión de iones zinc: Interacción de forma selectiva y no covalente con los iones zinc.

Virulencia: Designa el carácter patogénico, nocivo y violento de un microorganismo, como una bacteria, hongo o virus, o en otras palabras, la capacidad de un microbio de causar enfermedad. Virulencia deriva del latín *virulentus* que significa «lleno de veneno».

97 Reporte de la OMS. Publicado 2006, Geneva. WHO Global Task Force outlines measures to combat XDR-TB worldwide.

98 Scientific Facts on Drug resistant Tuberculosis. GreenFacts Website. Disponible: <http://www.greenfacts.org/en/tuberculosis/1-2/1-mdr-tb-xdr.htm>. Retrieved 2009-03-26. Consultado: Diciembre, 2008.