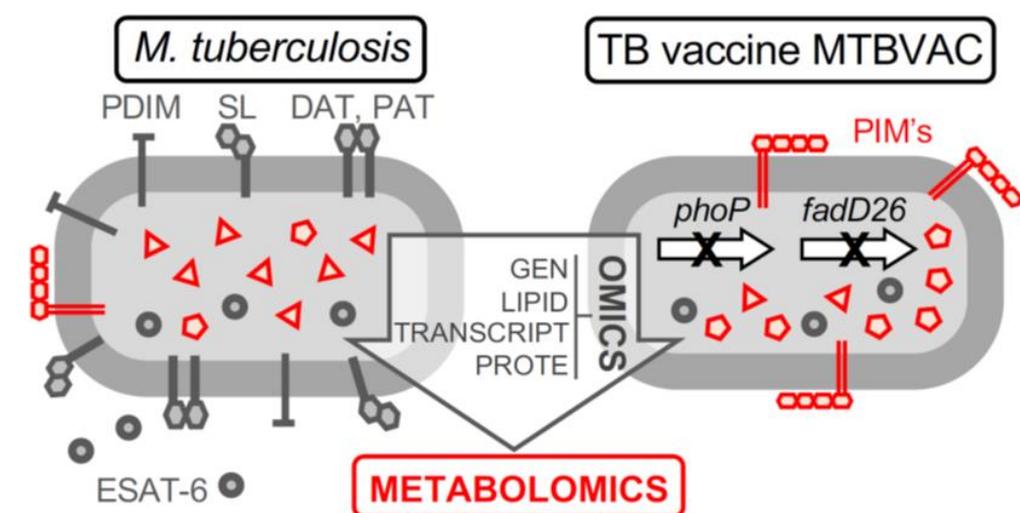


Análisis metabólico diferencial de cepa salvaje MT103 y modificada genéticamente MTBVAC para su uso como vacuna en la tuberculosis



Memoria que presenta Da. Caridad Díaz Navarro
para aspirar al grado de Doctor en el programa de Farmacia

Universidad de Granada

2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Caridad Díaz Navarro

ISBN: 978-84-1306-717-9

URI: <http://hdl.handle.net/10481/65366>

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

RESUMEN

La tuberculosis en el siglo XXI sigue ocasionando un número muy importante de muertes en todo el mundo. La tuberculosis constituye un problema principalmente en niños que viven en países subdesarrollados y en pacientes inmunodeprimidos y, además, presenta resistencias a una gran cantidad de antibióticos en uso. Por todo, existe una necesidad urgente de vacunas para disminuir el número de casos, así como los síntomas ocasionados.

Hasta el momento la prevención por el uso de la vacuna de *Mycobacterium bovis* de Calmete-Guerin ha resultado ser muy beneficiosa en algunos casos, pero sigue presentando ciertas limitaciones en situaciones de tuberculosis pulmonar. Esto ha llevado a requerir una vacuna nueva que garantice una protección total frente a este patógeno. Son muchas las estrategias seguidas por los investigadores con tal propósito, y en este caso concreto la vacuna MTBVAC (*Mycobacterium tuberculosis* vacuna) estaría clasificada dentro de las vacunas atenuadas. Para conseguir la atenuación de la cepa, se ha llevado a cabo la delección de dos genes virulentos *phoP* y *fad2D6* a partir de una cepa de *M. tuberculosis* conocida como MT103 y perteneciente al linaje 4 (Euroamericano). En el momento de elaboración de este manuscrito la vacuna se encuentra en fase clínica II y está siendo probada en niños y adultos en Sudáfrica.

En el presente estudio se abre un nuevo camino para explorar los cambios fenotípicos producidos a partir de cambios genómicos y se obtiene una herramienta para la caracterización metabólica y el análisis de las principales rutas bioquímicas de *M. tuberculosis*, pudiendo ayudar a descubrir nuevas moléculas que sirvan como biomarcadores de diagnóstico, indicando la existencia de la enfermedad o, incluso, moléculas que puedan indicarnos sobre la inmunidad de la vacuna en los pacientes en que ha sido administrada. Para ello se ha llevado a cabo un análisis metabolómico dirigido y no dirigido entre MT103 y MTBVAC utilizando la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. Además, durante el estudio se han utilizado mutantes del gen *phoP* para poder relacionar directamente algunos de los cambios encontrados a la regulación llevada a cabo por este gen. Por último, se ha realizado un análisis metabolómico extracelular entre las cepas H37Rv, MT103, MTBVAC, H37Rv *phoPR* mutante y H37Rv *phoPR* mutante con un plásmido pWM222, que contiene múltiples copias del gen *phoP*.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

Los resultados obtenidos muestran diferencias en la expresión de alrededor de 106 metabolitos intracelulares, muchos de ellos relacionados con la virulencia y la respuesta inmune, como los fosfatidilinositol manósidos, o de las moléculas que contienen trehalosa, respaldando de este modo la eficacia y seguridad del candidato a vacuna MTBVAC. Del mismo modo en el análisis de metabolitos extracelulares, se encontró una expresión diferencial de los mismos entre las distintas cepas, asociado claramente a la presencia o ausencia del gen *phoP*.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

ABREVIATURAS	8
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 La necesidad de nuevas vacunas	12
1.2 La producción de nuevas vacunas.....	13
1.3 Necesidad de una nueva vacuna contra la tuberculosis.....	13
1.4 Nuevas vacunas contra la tuberculosis.....	14
1.5 La vacuna MTBVAC	16
1.6 Aspectos clínicos de la vacuna MTBVAC.....	17
1.7 Aspectos morfológicos de la vacuna MTBVAC.....	18
1.8 Sensibilidad a antibióticos de la vacuna MTBVAC.....	19
1.9 Aspectos moleculares de la vacuna MTBVAC.....	19
1.10 Caracterización metabolómica de la vacuna MTBVAC	22
2. OBJETIVO.....	25
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
3.1 Extracción de metabolitos intracelulares	26
3.2 Extracción de metabolitos extracelulares.....	27
3.3 Metabolómica no dirigida	27
<input type="checkbox"/> Cromatografía en fase reversa y modo de ionización electroespray negativo.	30
<input type="checkbox"/> Cromatografía en modo HILIC y modo de ionización electroespray positivo	31
<input type="checkbox"/> Cromatografía en modo HILIC y modo de ionización electroespray negativo	32
<input type="checkbox"/> Creación de set de datos y validación analítica.....	33
<input type="checkbox"/> Análisis de las señales m/z con cromatografía reversa y modo de ionización negativo .	36
<input type="checkbox"/> Análisis de las señales m/z con cromatografía HILIC y modo de ionización positivo...	37
<input type="checkbox"/> Análisis de las señales m/z con cromatografía HILIC y modo de ionización negativo.	39
<input type="checkbox"/> Análisis de las señales m/z con cromatografía reversa y modo de ionización negativo (exometaboloma).....	40
<input type="checkbox"/> Análisis estadístico.....	42
<input type="checkbox"/> Identificación de metabolitos	42
3.4 Metabolómica dirigida.....	45
<input type="checkbox"/> FIMs	45
<input type="checkbox"/> di-AMP cíclico (c-di-AMP)	46
4. RESULTADOS.....	58
4.1 Cromatografía en fase reversa y modo de ionización electroespray positivo.....	58
4.2 Cromatografía en fase reversa y modo de ionización electroespray negativo	68
4.3. Cromatografía en modo HILIC y modo de ionización electroespray positivo	77

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

4.4.	Cromatografía HILIC y modo de ionización electroespray negativo	83
4.5.	Identificación de metabolitos en metabolómica no dirigida (Endometaboloma).....	111
4.6.	Metabolómica dirigida a FIMs.....	118
4.7.	Metabolómica dirigida a di-AMP cíclico.....	122
4.8.	Análisis de los sobrenadantes por cromatografía reversa y modo de ionización negativo	127
5.	DISCUSIÓN	138
5.1	Estrategia analítica	138
5.2.	Metabólica de MTBVAC y su relación con otras cepas	141
5.3	Metabolitos extracelulares	157
6.	CONCLUSIONES	160
7.	DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	161
8.	AGRADECIMIENTOS	162
9.	BIBLIOGRAFÍA CITADA	164

ABREVIATURAS

- ACP: Análisis de componentes principales
- Ac1PIM: Fosfatidil mio-inositol manósido triacilado
- Ac2 PIM: Fosfatidil mio-inositol manósido tetracilado
- ADC: Albúmina, Dextrosa y Catalasa
- ADI: Adquisición dependiente de información
- ANOVA: Análisis de la varianza.
- BCG: *Micobacterium bovis* bacilo de Calmette-Guérin
- BPCR: Biomedical Primate Research Centre
- CAD: Gas de colisión.
- CapA: Manosiltransferasa
- c-di-AMP: Di-adenosin monofosfato cíclico
- c-di-GMP: Di-guanosin monofosfato cíclico
- CE: Energía de colisión
- Cl: Cardiolipina
- CL: Cromatografía líquida
- CTI: Corriente total de iones
- CXP: Potencial de energía a la salida de la celda de colisión
- DAT: Diaciltrehalosas
- DGPF: Dioleiol glicerol pirofosfato
- DIM: Dimicocerosatos
- DP: Potencial de focalización
- EM: Espectrometría de masas
- EP: Potencial de entrada

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

ESI: Electrospray

FDR: *False discovery rate*

FE: Fosfatidiletanolamina

FG: Fosfatidilglicerol

FGF: Fosfatidilglicerol fosfato

FI: Fosfatidilinositol

FIF: Fosfoinositol fosfato

FIM: Fosfatidilinositol manósido

FM: Fase móvil/solventes

GDH: Glutamato deshidrogenasa

GDP-Man: guanosin difosfato-manosa

HILIC: Cromatografía líquida de interacción hidrofílica

IFN: Interferón

ISV: Ion spray voltaje

LA: Lipomanan

LAM: Lipoarabinomanano

Lipid DB: Base de datos de lípidos

LOSs: Lipooligosacáridos

ManLAM: Lipoarabinomanano cubierto de manosa

Mbt: Micobactina

McA: Micotiol amidasa

MMC: Mediador de masas CEU

MRM: Monitorización de reacción múltiple

MscR: Nitrosotiol reductasa,

MSH: Micotiol

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

MSH S-transferasa: Micotiol-S-transferasa

MSSM: Disulfuro de Micotiol

MS(NHOH): Micotiol sulfinamida

MSNO: Nitrosomicotiol

MT103: Cepa M. tuberculosis 103 no modificada

Mtb: Mycobacterium tuberculosis

MTBVAC: Cepa M. tuberculosis modificada genéticamente para su uso como vacuna

Mtr: Micotiol disulfuro reductasa

m/z: Masa/carga

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAT: Poliaciltrehalosas

PC: Componentes principales

PILAM: Lipoarabinomanan cubierto de fosfatidil-mio-inositol.

PimA: Fosfatidil-mio-inositol alfa-manosiltransferasa

PimB': Fosfatidil-mio-inositol dimanosido sintasa

PimC: Alfa-1,6-manosil transferasa

PimE: Alfa-1,2-manosil transferasa,

ppm: Partes por millón

PPM: Beta-D-manosilfosfodecaprenol

QC: Controles de calidad

QTOF-MS: Quadrupole Time of Flight mass spectrometry

RD1: Región diferencial-1

RMN: Resonancia magnética nuclear

SATVI: Centro de Investigación en Vacunas de Sudáfrica

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

SL: Sulfolípidos

TAT: Triaciltrehalosas

1-TbAd: 1-tuberculosiniladenosina

TBS: ácido tuberculoesteárico

TDIM: Dimicocerosatos de tiocerosol

TDM: Trehalosa dimicolato

TGC: Triglicéridos

TMM: Trehalosa monomicolato

V: Voltios

XDR: Ampliamente resistente a drogas

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La necesidad de nuevas vacunas

Las vacunas son uno de los mecanismos de defensa adquiridos más importantes en la lucha contra las enfermedades infecciosas, y, de hecho, han permitido erradicar patologías como la viruela, una enfermedad que solo en el siglo XX ocasionó la pérdida de 375 millones de vidas.

La inmunización frente a la viruela se utilizó por primera vez en 1796, siendo la primera vacuna producida. Edward Jenner empleó las pústulas de enfermos, inoculó el virus atenuado en otras personas y obtuvo protección. De este modo, consiguió los primeros pasos en la protección inmune frente a las enfermedades infecciosas. Y, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta el momento la viruela es la única enfermedad infecciosa oficialmente declarada como erradicada en todo el planeta gracias a la vacunación masiva.

Hoy en día, más de 70 vacunas han sido autorizadas para su uso contra unos 30 microorganismos, salvando innumerables vidas. Enfermedades como la poliomielitis, el sarampión, las paperas o parotiditis, la rubéola y otras más, causaron unos 39 millones de infecciones en el siglo XX tan sólo en los Estados Unidos.

El uso de las vacunas ha sido un factor de enorme trascendencia en la protección y la mejora de la salud pública, a nivel mundial, y, la necesidad de nuevas vacunas es imperiosa¹. Existen enfermedades como la tuberculosis, el sida y la malaria, por poner un ejemplo, para las que aún no existen vacunas eficaces². Otras nuevas enfermedades emergentes producidas por diferentes formas de coronavirus a día de hoy necesitan urgentemente el desarrollo de vacunas. Este último año, la pandemia ocasionada por un nuevo virus SARS-Covid-19 ha ocasionado cientos de miles de muertes y millones de contagios en todo el mundo. La alarma global es enorme y la necesidad de una vacuna, hoy más que nunca, se convierte en la mejor arma para luchar contra esta pandemia por las grandes pérdidas, principalmente de vidas humanas y, secundariamente, por el grave desastre económico como consecuencias derivadas de la grave pandemia. Surge de este modo la enorme necesidad de satisfacer la demanda de nuevas vacunas y, por lo tanto, la implementación de novedosas tecnologías para conseguirlas con éxito.

1.2 La producción de nuevas vacunas

Las nuevas tecnologías, además de proporcionar mejoras en la respuesta inmunológica, son de gran importancia por su contribución a la sociedad, al aportar un ahorro de costes de atención sanitaria, que se extiende a la esperanza de vida y a la mejora de la calidad de vida³.

Para lograr el éxito en salud pública no solo es necesario la identificación de vacunas efectivas, también es necesario una infraestructura robusta para su fabricación, una supervisión regulatoria y de seguridad y una organización para su buena distribución. Este método de prevención representa la forma menos costosa y más fácil de proteger contra las grandes epidemias. La sociedad obtiene beneficios económicos al prevenir la hospitalización evitar la discapacidad a largo plazo y reducir las ausencias o bajas de trabajo. Esta sobradamente demostrado que las vacunas proporcionan los medios más rentables para salvar vidas, preservar la buena salud y obtener una alta calidad de vida⁴.

1.3 Necesidad de una nueva vacuna contra la tuberculosis

La infección por *M. tuberculosis* sigue siendo una causa de mortalidad y morbilidad en todo el mundo, causando 1.5 millones de muertes en 2018, según el informe presentado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ese año⁵. En Europa, a pesar de las caídas espectaculares en la prevalencia global de la tuberculosis en los últimos 100 años, la tuberculosis sigue existiendo y aumentando, con un incremento medio anual del 2,7% entre los años 2004 y 2008⁶. Además es preocupante que de esos casos, un 3,6% fueron resistentes a múltiples fármacos, mundialmente⁷.

La vacuna *BCG* (*Mycobacterium bovis* bacilo de Calmette-Guérin), es actualmente el principal mecanismo de defensa utilizado contra la tuberculosis. Es un componente importante de muchos programas nacionales de vacunación. Alrededor de 90 millones de dosis son suministrados por la OMS cada año⁸. Se trata de una vacuna del tipo atenuado obtenida de una cepa de *M. bovis* aislada de una vaca infectada. Calmette y Guérin necesitaron 30 años y más de 200 subcultivos para obtener la versión atenuada de la cepa virulenta original.

Esta vacuna está en uso desde 1921 y protege contra las formas más graves de la enfermedad, sin embargo, presenta una eficacia muy variable frente las expresiones de la tuberculosis pulmonar.

La vacuna BCG otorga un grado muy variable de protección que puede ir desde 0 a aproximadamente el 80%^{9, 10}. Aunque suele aportar una buena protección frente a las formas infantiles graves de tuberculosis, como en el caso de meningitis tuberculosa, presenta una pobre protección frente a las formas de infección en adultos¹¹. Debido a las diferencias encontradas en cuanto a la protección que confiere, es necesario una vacuna que pueda proporcionar mejores resultados, esto es, una óptima protección contra la enfermedad, tanto en niños como en adultos.

Por otra parte, la vacunación debe impedir el establecimiento del estado latente de la infección persistente que puede seguir con una infección primaria y ocasionar el inicio de la enfermedad en los adultos y aparecer muchos años después, por lo que la investigación y el desarrollo de nuevas vacunas eficaces contra las formas respiratorias de la enfermedad, que son las responsables de la transmisión de la tuberculosis es un reto trascendental para la investigación clínica¹². La mayoría de las personas infectadas con *M. tuberculosis* tienen infección asintomática, denominada infección latente por tuberculosis¹³. El diagnóstico se establece por la evidencia de una respuesta inmune celular a los antígenos derivados de *M. tuberculosis*, la conocida prueba cutánea de la tuberculina.

El riesgo en estos casos a una evolución a la enfermedad activa y sintomática es solo de un 10%. Sin embargo, los defectos en la inmunidad celular de determinados individuos pueden aumentar este riesgo significativamente ocasionando la aparición de esta grave enfermedad en un porcentaje mucho mayor.

1.4 Nuevas vacunas contra la tuberculosis

La variabilidad en la inmunidad para la vacuna BCG, hace que sean necesarias nuevas estrategias en la búsqueda de mejores vacunas profilácticas, dirigidas a prevenir la enfermedad y mejorar la inmunidad. Las estrategias que se siguen actualmente son dos: vacunas producidas a partir de subunidades y vacunas producidas a partir de cepas no virulentas.

Las vacunas a partir de subunidades se basan en el uso de proteínas antigénicas de los bacilos de tuberculosis para mejorar la inmunogenicidad de la vacuna BCG. Estos antígenos de *M. tuberculosis* normalmente se generan a partir de proteínas seleccionadas por su capacidad para ser reconocidas por el sistema inmune después de la infección en humanos y se pueden administrar directamente mediante potentes adyuvantes o pueden ser insertados sus genes codificantes en diferentes virus modificados genéticamente como virus no replicables.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

Las vacunas a partir de organismos vivos consisten principalmente en cepas de micobacterias no virulentas, tal como *Mycobacterium vaccae*. También el uso muy prometedor de recombinantes de BCG, incluyendo genes desde un microorganismo diferente. Además dentro de este grupo se incluirían las vacunas construidas racionalmente a partir de cepas atenuadas de *M. tuberculosis*, que se basan en la pérdida de genes de virulencia y lípidos inmunomoduladores que aportan seguridad y más eficacias a las vacunas de tuberculosis¹⁴.

Los candidatos a vacuna tienen que imitar la infección natural de un modo lo más parecido posible sin llegar a causar la enfermedad. En la figura 1 pueden verse las vacunas que se encuentran actualmente en ensayos clínicos¹⁵.

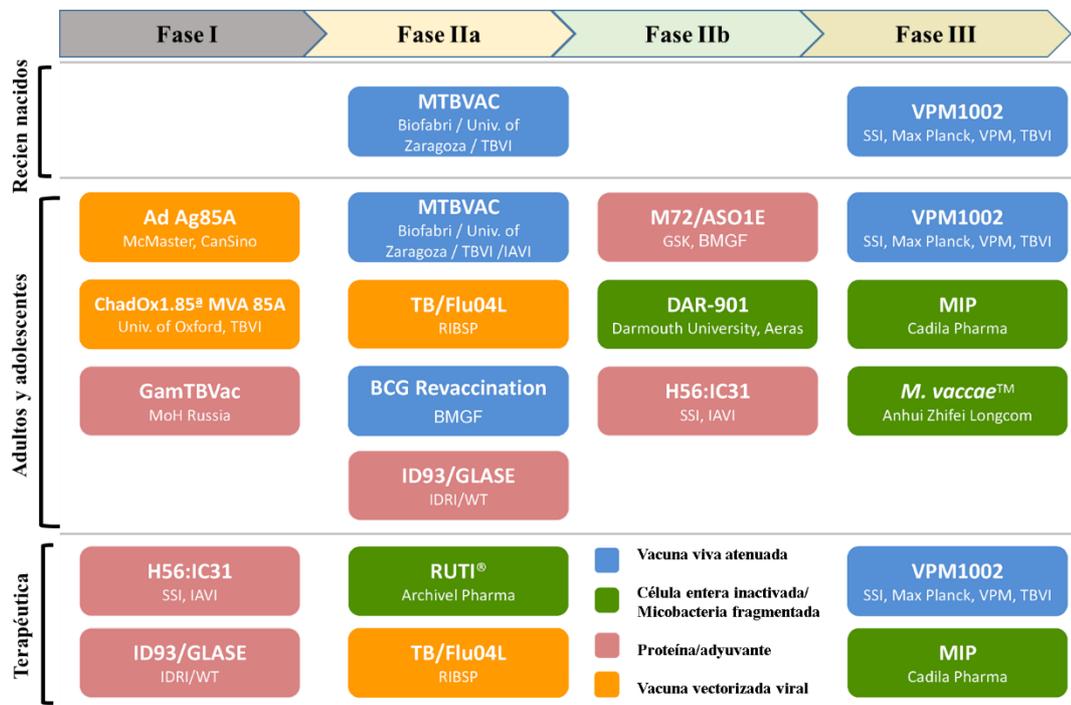


Figura 1. Candidatos a la vacuna contra la tuberculosis en proceso de ensayos clínicos. Se muestra el avance en los ensayos clínicos para las 14 candidatas a vacunas, coloreadas según cada estrategia de vacuna. Martín y col. Applied sciences, 2020.

Hasta ahora, los candidatos a vacunas evaluados para conocer su seguridad y eficacia como grado de protección frente a la enfermedad no han superado en eficacia a la BCG. Los estudios han sido conducidos en varios modelos animales, normalmente utilizando ratones y en menor número en cobayas. En los últimos años, como pruebas finales antes de entrar en la fase clínica, se están utilizando modelos en primates.

Por otra parte, la mejora de las vacunas atenuadas ha estado retrasada por la falta de herramientas eficaces para la manipulación genética de micobacterias, un aspecto que ha mejorado gracias a los trabajos llevados a cabo por el grupo de la Dra. Brigitte Gicquel en Europa y por el Dr. William Jacobs en Estados Unidos. Aun así, esta estrategia resulta muy laboriosa, ya que se debe demostrar la inmunidad frente a la tuberculosis y antes de todo esto hay que lograr la atenuación completa del microorganismo.

1.5 La vacuna MTBVAC

La vacuna MTBVAC frente a la tuberculosis ha sido construida gracias a la participación de científicos de la Universidad de Zaragoza (España) en colaboración con investigadores del Instituto Pasteur de París (Francia) y su desarrollo clínico e industrial corre a cargo de la biofarmaceutica española Biofabri. A finales de los años noventa este grupo focalizó sus estudios sobre las cepas que causaban brotes de tuberculosis resistentes a drogas en Europa y, más tarde estas cepas fueron descritas como *M. bovis* ampliamente resistente a drogas (XDR), responsables a su vez de grandes epidemias de tuberculosis y portadores de la inserción IS6110 en la región del promotor del gen *phoP*, lo que causaba una fuerte regulación de la expresión de este gen. Estudios posteriores apuntaban a que dicho gen podía ser un posible regulador de genes de virulencia en el genoma de *M. tuberculosis*, preferentemente expresado en este tipo de cepas, por lo que se infirió la hipótesis de que su inactivación podría reducir su virulencia¹⁶. El desarrollo de herramientas y reactivos biológicos que facilitaban la manipulación de bacterias, en combinación con la completa secuencia del genoma de *M. tuberculosis*, permitió el estudio de la contribución individual de genes a la virulencia de *M. tuberculosis*. Estos hechos han precedido a que el conocimiento de estas interacciones de genes y funciones proteicas proveerá un marco de trabajo para el desarrollo racional de vacunas frente a la tuberculosis.

La vacuna ha sido creada a partir de la cepa MT103, perteneciente al Linaje cuatro (Euroamericano), uno de los linajes más extendidos de *M. tuberculosis*¹⁷ y que fue obtenido a partir de un paciente infectado de *M. tuberculosis* y atenuada para su uso. En su construcción se utilizaron técnicas de ingeniería genética para poder introducir dos mutaciones independientes: la delección de los genes de la virulencia *phoP* y *fadD26*, obteniendo así una bacteria viva, incapaz de causar la enfermedad, pero con capacidad de estimular el sistema inmunológico, de forma similar a como lo hace la bacteria virulenta. El proceso se llevó a cabo

de acuerdo al documento establecido en el segundo consenso de Ginebra (Suiza) para el progreso de nuevas vacunas frente a micobacterias con el propósito de su desarrollo en estudios clínicos¹⁸.

MTBVAC es segura en todos los estudios preclínicos que se han realizado y, proporciona una protección superior en ratones comparada a la cepa de referencia BCG Danish 1331, usada en la clínica. Se han realizado pruebas de protección frente a la infección, conducidas en colaboración con equipos nacionales e internacionales de España, Reino Unido, Francia y México y todas han mostrado resultados prometedores en el modelo de ratón e incluso una protección superior y una mayor inmunidad que la BCG en modelos de conejillo de indias.

Estudios sucesivos han confirmado la atenuación de la bacteria en el modelo de ratón con el sistema inmune reducido gracias a la inactivación del gen *phoP* y una mayor atenuación que BCG^{19,20,18}.

Tras los excelentes resultados se planteó la hipótesis de que MTBVAC es una vacuna más efectiva que la BCG, ya que esta se asemeja más al patógeno humano y tiene un repertorio mucho más amplio de antígenos de la tuberculosis. MTBVAC hasta el momento se ha probado en adultos en Suiza y en bebés recién nacidos en Sudáfrica.

El objetivo final es desarrollar MTBVAC como una vacuna preventiva contra la tuberculosis para bebés recién nacidos y como vacuna de refuerzo en adolescentes y adultos previamente vacunados con BCG al nacimiento. MTBVAC es la primera vacuna atenuada de *M. tuberculosis* aprobada para la realización de pruebas clínicas, sin embargo todavía la inmunidad conferida por el mutante *phoP* continúa en estudio^{21,22}.

1.6 Aspectos clínicos de la vacuna MTBVAC

En 2013 se inician los primeros ensayos clínicos en humanos para la Fase IA de MTBVAC con 36 voluntarios adultos sanos entre 18 y 45 años en el Complejo Hospitalario de la Universidad de Vaudois en Lausana, Suiza con número de registro NCT02013245).

En septiembre de 2015 continúan nuevos ensayos clínicos sobre 36 recién nacidos y 18 adultos en Sudáfrica (número de registro NCT02729571), país endémico, para conocer su seguridad y capacidad inmunogénica. En noviembre de 2015 se obtienen los resultados de los primeros ensayos en humanos, demostrando una fuerte memoria inmunológica después de 210 días de la vacunación. La vacuna candidata contra la tuberculosis, MTBVAC, muestra una seguridad excelente y una prometedora respuesta inmunitaria.

En enero de 2018 son dos los nuevos ensayos clínicos en 99 recién nacidos y 120 adultos (con el número de registro NCT02933281 y NCT03536117), respectivamente, en Sudáfrica. Estos dos ensayos clínicos de la fase 2A de seguridad e inmunogenicidad buscan determinar la dosis óptima a utilizar, es decir, que proteja pero sin ocasionar efectos secundarios.

Ambos trabajos se realizarán durante dos años y medio en el Centro de Investigación en Vacunas de Sudáfrica (SATVI), en Worcester, un pequeño núcleo con alta incidencia de tuberculosis. Los resultados de los ensayos clínicos en 36 bebés de Sudáfrica se publican en la revista *The Lancet Respiratory Medicine*, el 13 de agosto de 2019. MTBVAC es capaz de producir respuestas inmunes robustas y duraderas, demostrando resultados esperanzadores para el control de la tuberculosis²³.

Durante estos últimos meses, se está llevando a cabo un estudio para comprobar la eficacia de MTBVAC frente al coronavirus. De hecho, hay observaciones que desde los años 30 asociaban a la vacuna BCG con la reducción del 40% de las hospitalizaciones por enfermedades respiratorias²⁴. La relación tan clara entre BCG y MTBVAC hace que ambas se propongan como una alternativa para estimular la inmunidad frente a la covid-19.

1.7 Aspectos morfológicos de la vacuna MTBVAC

Los efectos de la mutación *phoP* en relación a relación de crecimiento y virulencia de las cepas *in vitro* e *in vivo* son de interés. Durante la fase exponencial en medio líquido se hallaron diferencias en el tamaño de los bacilos entre la cepa salvaje y la cepa mutante, esta última presentaba un tamaño menor. Sin embargo, no se establecieron diferencias durante la fase estacionaria. En medio sólido Lowestein-Jensen, aparecieron grandes cambios en el mutante por las propiedades aportadas por el gen *phoP*, presentando el bacilo entre sus largos ejes formaciones paralelas. También se vieron cambios morfológicos en las diversas colonias cuando las cepas fueron crecidas en medio Middlebrook 7H10 con agar, el mutante presentaba colonias más pequeñas. Al comparar la relación de crecimiento del mutante y la cepa salvaje midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm en medio líquido Middlebrook 7H9 con los componentes de enriquecimiento, albúmina bovina, dextrosa y catalasa (ADC), no se detectaron diferencias significativas entre las dos cepas, ni en la fase exponencial, ni en la estacionaria durante la curva de crecimiento. Otro cambio hallado fue la reactividad del mutante al colorante rojo neutro básico²⁵. Además, el mutante mostraba una deficiencia en su crecimiento a la formación de cuerdas en forma de serpiente, característica común en la cepa salvaje. Esta

reactividad e imposibilidad en la formación de serpentinas parecía debido a la alteración de la composición de la envuelta celular²⁶.

1.8 Sensibilidad a antibióticos de la vacuna MTBVAC

Otras preguntas que surgieron es si después de la atenuación de MT103 el perfil a drogas antituberculosas podría cambiar. Se demostró que el mutante *phoP* es altamente sensible a etambutol, isoniazida, rifampicina y estreptomina, además presentaron más sensibilidad a isoniazida que la cepa salvaje MTB y esto podría ser debido a cambios en la pared celular del mutante *phoP*. Todos estos resultados indican que *M. tuberculosis* mutante *phoP* es sensible a las principales drogas antituberculosas y en caso de infección hipotética con la cepa vacuna, sería posible ser tratada.²⁷

1.9 Aspectos moleculares de la vacuna MTBVAC

La delección del gen *phoP*, un factor de transcripción que controla el 2% del genoma de *Mtb* afecta a diferentes rutas biosintéticas, así como en funciones claves para la supervivencia intracelular y, la virulencia y la inmunomodulación²⁸.

Se ha demostrado la regulación en seis redes transcripcionales, que incluirían las respuestas hipóxicas tempranas y persistentes mediante la conexión con el regulón *DosR*, parte de este, es regulado negativamente en los mutantes *phoP* y es inducido en respuesta a la infección de macrófagos^{29,30}. Se sabe que algunos genes del regulón *DosR* intervienen en la expresión de importantes antígenos de células T y también se demostró que la vacuna BCG atenuada es defectuosa para la inducción de dos genes de latencia, *narK2* y *narX*³¹. Por el contrario en la cepa de Beijing asociada con la propagación epidémica y una mayor virulencia³², el regulón *DosR* es expresado constitutivamente, lo que sugiere su posible papel en la virulencia, y en consecuencia la regulación negativa de este en el mutante *phoP* podría contribuir a la atenuación de la cepa MTBVAC.

Otro punto de regulación sería la respiración aeróbica y anaeróbica, a partir de algunos componentes del complejo NADH deshidrogenasa, el principal receptor de electrones de la cadena respiratoria aeróbica. La disminución de la regulación de los genes *nuo* ha sido descrita en respuesta a la infección por macrófagos, lo que indica el cambio en el estado respiratorio de aeróbico a microaeróbico o anaerobio. PhoP controla la expresión del gen *Ald*, que parece estar

involucrado en la regeneración de NADH en ambientes limitantes de oxígeno, y, por lo tanto parece inducirse en *M. tuberculosis* durante la infección de macrófagos y células dendríticas.²⁸

Está involucrado en la virulencia a través de la zona conocida como *región diferencial-1* (RD1), implicada por la confirmación en distintos estudios, de la virulencia de este patógeno, la complementación de BCG con RD1 aumenta la virulencia en ratones³³ y, por el contrario, la eliminación de RD1 en *M. tuberculosis* produce la atenuación de este patógeno.

Se ha encontrado implicación de *phoP* en relación a la respuesta al estrés en *M. tuberculosis*, ya que el regulón *phoP* incluye genes que participan en esta función.²⁸ Una función más para este gen sería en el metabolismo de los lípidos, debido a que algunos genes del regulón *phoP* requeridos para la síntesis de lípidos, y basados en aciltrehalosas, son regulados en respuesta a la infección por macrófagos, sugiriendo que podrían desempeñar un papel en los procesos de virulencia o inmunomoduladores.^{29,30} Por último parece que *phoP* influye en la capacidad de persistencia de *M. tuberculosis* durante un largo periodo en el huésped infectado, probablemente como resultado de una serie de adaptaciones metabólicas²⁸. Los estudios llevados a cabo por la pérdida de los dos componentes *phoP-phoR* demostraron que la capacidad de *M. tuberculosis* para replicarse en células y modelos animales estaba afectada enormemente³⁴.

A modo de resumen, en la figura 2 pueden verse recogidas las principales rutas transcripcionales y genes relacionados con *phoP*.

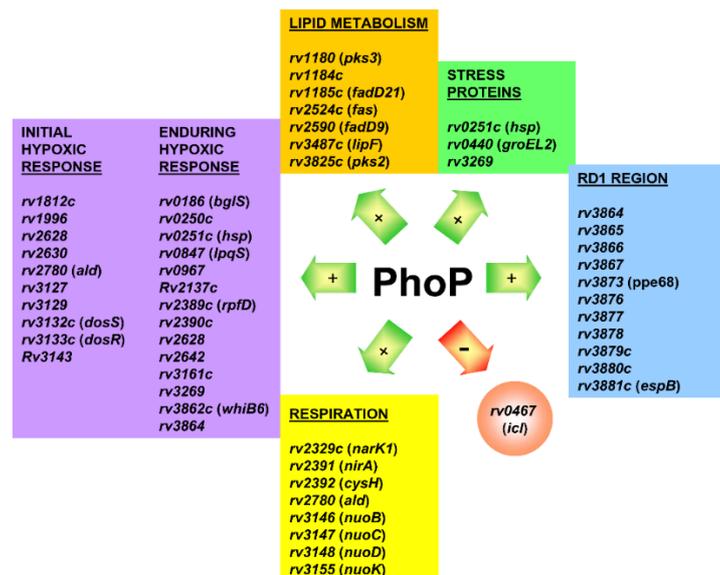


Figura 2. El regulón PhoP de *M. tuberculosis*. El regulón se identificó comparando los perfiles transcripcionales de la cepa *M. tuberculosis* tipo salvaje y el mutante *phoP* usando microarrays de ADN. Algunos de los genes más relevantes para la supervivencia para la supervivencia se enumeran y agrupan por función.

Las flechas verdes y rojas indican genes cuya expresión está regulada positiva o negativamente por *phoP* respectivamente. Gonzalo-Asensio y col., Plos one, 2008.

Además de la actuación de *phoP* en los distintos procesos descritos anteriormente, se encarga de la regulación de algunos genes en la región ESX-1, involucrada en la secreción de los principales antígenos y el factor de virulencia ESAT-6.³⁵ Por consiguiente, aunque el mutante *phoP* produce ESAT-6, no son capaces de exportar este factor de virulencia. ESAT-6 ha sido descrito por inhibir la autofagia³⁶ y además está implicado en la propagación de célula a célula al promover la apoptosis de las células infectadas³⁷. En la figura 3 puede verse el mecanismo desencadenado por la presencia o ausencia de *phoP* en distintas cepas de *M. tuberculosis* y en la cepa atenuada.

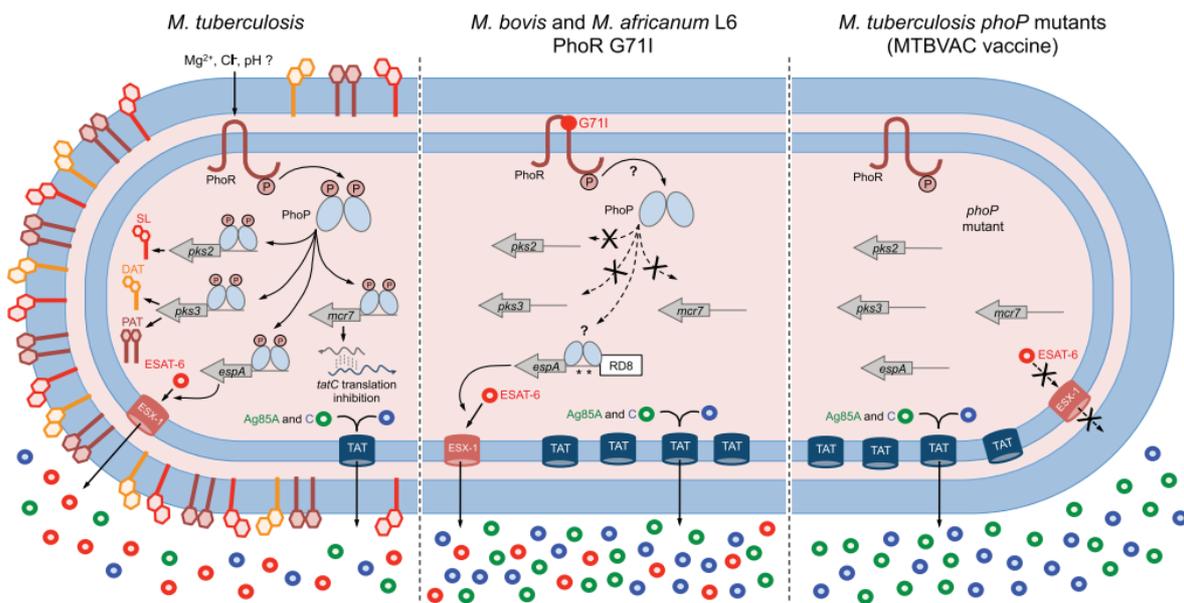


Figura 3. Figura. Ilustración comparativa de fenotipos regulados por PhoPR en *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* L6 y un mutante *phoP* de *M. tuberculosis*, portadora de un PhoR funcional, es capaz de detectar su estímulo afín y posteriormente fosforilar PhoP. PhoP fosforilada regula 3 fenotipos bien conocidos, incluida la síntesis de sulfolípidos, DAT/PAT (a través de la regulación de Pks2 y Pks3), la secreción de ESAT-6 (a través de la regulación de *espA*) y la regulación postranscripcional de *tatC*. Se espera que *M. bovis*, *M. africanum* L6 que llevan un alelo PhoRG71I defectuoso, tengan defectos en la fosforilación de PhoP y como consecuencia estas cepas carecen de SL, DAT y PAL. Sin embargo la secreción de ESAT-6 en estas cepas se restaura mediante mutaciones compensatorias en la región promotora de *espACD* que incluyen la delección de RD8 y polimorfismos específicos de especie. Estos mutantes también tienen un sistema TAT desregulado y, en consecuencia, secretan cantidades mayores de sustratos

TAT, incluídos los antígenos Ag85A y Ag85C. En consecuencia se espera que las cepas de vacunas basadas en *phoP* de *M.tuberculosis* adecuadamente atenuadas como MTBVAC, induzcan una inmunogenicidad mejorada y más duradera en comparación con los de BCG en ensayos clínicos. SL: sulfolípidos, DAT: diaciltrehalosas, PAT: poliaciltrehalosas. Broset y col. mBio, 2015..

La delección de *fadD26* dirige la completa síntesis de los lípidos de superficie del tipo tiocerol dimicocerosatos (TDIM), una familia de lípidos de superficie involucrados en la virulencia de *M. tuberculosis*¹⁸. Los TDIM son esenciales para la supervivencia de *M. tuberculosis* en el huésped, y en consecuencia, mutantes deficientes en TDIM están severamente atenuados. La falta de TDIM hace que *M. tuberculosis* sea más susceptible al ataque de la respuesta inmune innata temprana³⁸ y menos eficaz en detener la maduración fagosómica, lo que lleva a la acumulación en los fagosomas acidificados y la consecuente muerte bacteriana³⁹. En estudios más recientes se ha demostrado el papel de TDIM y ESAT-6 en promover la apoptosis celular y la ruptura del fagosoma⁴⁰.

1.10 Caracterización metabolómica de la vacuna MTBVAC

La metabolómica cada vez está ganando cada vez más popularidad en microbiología como herramienta que puede contribuir a comprender las características biológicas y de virulencia de los patógenos. Los metabolitos representan el producto integrado del genoma, transcriptoma, proteoma, y el medio ambiente de una célula, y son los informadores más directos del estado metabólico de una célula⁴¹. La metabolómica complementa las técnicas -ómicas, de tal modo que permite la investigación de propiedades que no pueden ser directamente evaluadas a través de la transcriptómica, la proteómica y la genómica. El uso de datos de un nivel -ómico para predecir la función en otro nivel no siempre están claros, de ahí que la integración de la metabolómica en el resto de ciencias -ómicas puede ayudar a aclarar la relación entre los niveles de información generados en cada técnica⁴². La información obtenida de esta caracterización metabólica ayudará a comprender muchos aspectos de la función celular y, por tanto puede ser usada para establecer el fenotipo de una célula en respuesta a cambios genéticos o ambientales⁴³. Es por ello que está teniendo un gran desarrollo en la evaluación a las respuestas producidas por estrés, la comparación de mutantes, el descubrimiento de fármacos, la toxicología, la nutrición, las investigaciones de los efectos globales de la manipulación genética, el cáncer, la comparación de diferentes estadios de crecimiento, la diabetes, el descubrimiento de nuevos productos

naturales, identificación y clasificación de microorganismos, etc⁴⁴. Si se compara con plantas y animales, la principal desventaja de la metabolómica en microorganismos es que los metabolitos de microorganismos son generalmente difíciles de identificar. Además los metabolitos extracelulares e intracelulares pueden ser difíciles de separar⁴⁵. Gracias a la metabolómica y su integración con la transcriptómica en *M. tuberculosis* recientemente se ha podido dibujar la red metabólica de este patógeno durante la infección^{46,47}

El metabolismo de *M. tuberculosis* es sorprendente. Se ha descubierto la capacidad de *M. tuberculosis* para catabolizar diferentes fuentes de carbono simultáneamente: cataboliza cada fuente de carbono a través de la ruta glucolítica, las pentosas fosfato y/o ácidos carboxílicos para distintos destinos metabólicos. Se trata de un metabolismo compartimentado en una célula que carece de orgánulos, excepcional en bacterias. La capacidad de catabolizar simultáneamente carbohidratos y ácidos grasos a destinos metabólicos distintos representa una topología de red metabólica no descrita en bacterias y nos aporta una visión nueva de la capacidad de *M. tuberculosis* para adaptarse al hospedador. Esta organización del metabolismo bacteriano intermediario no ha sido previamente observada y puede ayudar en el conocimiento de su patogenicidad.

Muchas de las investigaciones han ido dirigidas a la caracterización de la composición lipídica (lipidómica), debido a su alto contenido (suponen más del 60% del peso seco celular) y variabilidad, así como por sus importantes propiedades biológicas relacionadas con la virulencia y la patogenicidad. Si nos referimos al relevante estudio de Sartain BCG⁴⁸ que creó una base de datos (*Mtb* lipid DB) que contiene 2.512 entidades lipídicas a partir de la cepa de *Mtb* H37Rv, utilizando para ello la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, con el uso de dos espectrómetros, uno de tiempo de vuelo y otro tiempo de vuelo con cuadrupolo, junto con la identificación de iones automatizados a través de la determinación precisa de la masa y la información recogida extensivamente de la literatura a partir de lípidos purificados de *Mtb* H37Rv y *M. bovis*.

En la última década hay muchos estudios dirigidos a la búsqueda de biomarcadores que nos aporten información sobre la presencia de la infección y el estado de la enfermedad. Los estudios se han hecho directamente en cultivos de *M. tuberculosis*; en modelos animales, con individuos infectados e individuos sanos y el estudio de tejidos, en fluidos de pacientes infectados por tuberculosis e individuos sanos tal como sangre, orina y esputos para la búsqueda de biomarcadores para diagnóstico y para la caracterización de la enfermedad^{49,50,51}. Se han llevado a cabo estudios para investigar el mecanismo de acción y metabolismo de un determinado

fármaco frente a tuberculosis^{52,53} para elucidar el mecanismo de resistencia a una droga^{54,55} e incluso monitorizar la eficacia de un tratamiento^{56,57}. En la mayoría de estos análisis, utilizando la espectrometría de masas en combinación con cromatografía de gases y/o cromatografía líquida, en un número menor de ellos se ha utilizado como técnica analítica la resonancia magnética nuclear (RMN)⁴⁶. En relación a los biomarcadores identificados en cultivos de *M. tuberculosis* están: el ácido 9-hexadenoico, el ácido tubérculo-esteárico, el ácido heptadenoico, el ácido 11-eicosenoico, el ácido 13-docosenoico, el ácido 15-tetracosenoico, el ácido eicosanoico y cadaverina. Estos compuestos están asociados con la estructura única de pared celular de dichos organismos, la cual se caracteriza por la variación entre especies de *M. tuberculosis*. Algunas de estas moléculas, junto con D-glucopiranosido y D-glucosamina, fueron detectadas en cultivos y después se confirmó su presencia en esputos de enfermos. Se han hallado muchas moléculas endógenas aumentadas o disminuidas con alto potencial estadístico en cohortes de pacientes sanos e infectados con el bacilo de Koch, pero supone realmente un esfuerzo poder establecer un diagnóstico con este tipo de moléculas, por la dificultad para poder diferenciar la alteración de estos metabolitos por presencia de enfermedad o debida a otros tipos de trastornos. Existen otra clase de moléculas, como el ácido quinolínico (un derivado del triptófano), precursor del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido, para el que cada vez existen más evidencias de sus mayores requerimientos en distintos tipos de células durante procesos inflamatorios, lesión e infección, siendo esto fundamental para la respuesta adecuada de las células inmunitarias⁵⁸, participando en la inducción por varias citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas involucradas en distintas enfermedades, por lo que probablemente no sea lo suficientemente específico de tuberculosis. Por ejemplo, el ácido docosanoico, es uno de los ácidos grasos mayoritarios en *M. tuberculosis*, pero su capacidad de diagnóstico utilizando muestras de pacientes de tuberculosis, es realmente pobre. En cambio, el uso de este en combinación con otros 3 compuestos, lisofosfatidilcolina (18:0), treoninil- γ -glutamato y presqualeno difosfato, podría diferenciar pacientes con tuberculosis de controles sanos y de otros pacientes con enfermedades pulmonares con un área bajo la curva de 0.991⁵⁹. Aunque hasta la fecha no se están utilizando estos biomarcadores para un diagnóstico temprano, es evidente que están aportando una enorme información en la caracterización de las distintas cepas de *M. tuberculosis* en el proceso de la infección.

El estudio metabolómico de mutantes es más reciente y hasta el momento sólo se ha estudiado la lipidómica con relación a las implicaciones de las mutaciones *phoP* y *fadD26* en la cepa,^{60,27,28,35,26,61,62}

2. OBJETIVO

- Caracterizar la metabolómica de las cepas salvaje MT103 y mutada MTBVAC y para ello, desarrollar la metodología analítica necesaria.

La estrategia de estudio consistió en un análisis general centrado en la búsqueda de los metabolitos intracelulares y extracelulares diferenciales entre las cepas MT103 y MTBVAC (metabolómica no dirigida) y un análisis de metabolómica dirigida centrado en las diferencias en la expresión de FIMs. En este caso, además de la cepa salvaje y la cepa mutada, se estudiaron otras cepas. Asimismo, se desarrolló y validó un nuevo método para la determinación de di-AMP cíclico. Finalmente, se estudió la cepa H37Rv, tanto con delección en *PhoP* como amplificada en *PhoP*, para conocer el impacto de la delección del gen.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

En la figura 4 se muestra un esquema general del análisis metabolómico no dirigido.

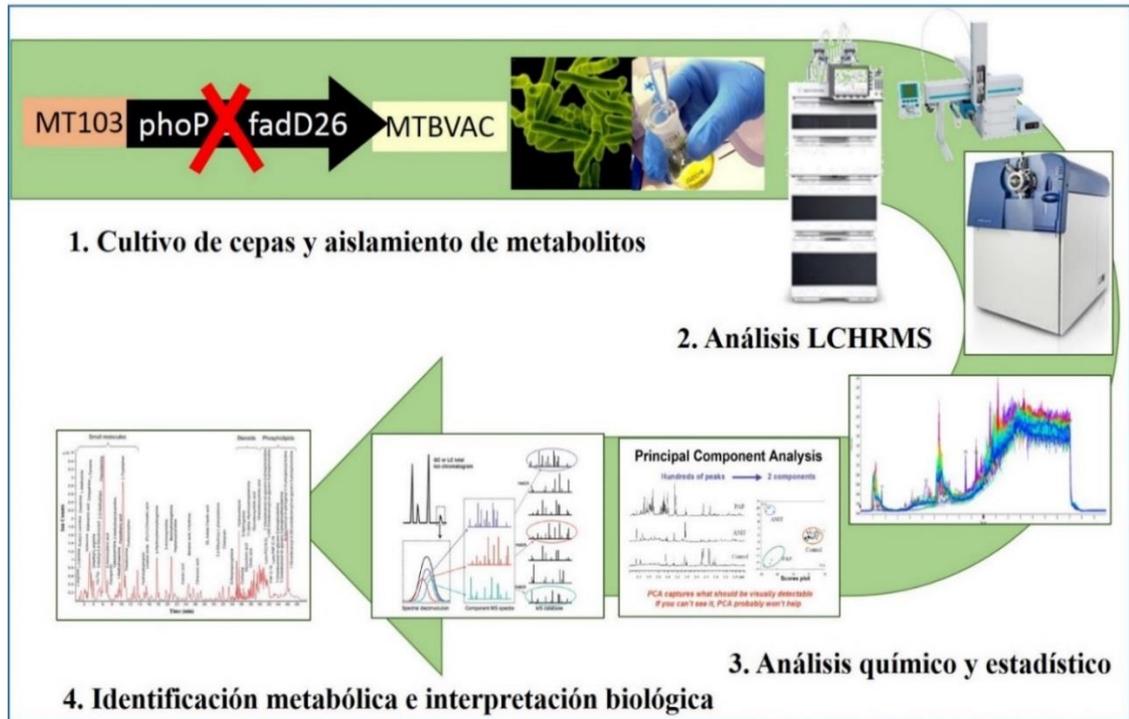


Figura 4. Esquema del análisis metabolómico no dirigido.

3.1 Extracción de metabolitos intracelulares

Se llevó a cabo en cinco réplicas biológicas con medio de cultivo 7H9-ADC, en las cepas incluidas en el estudio, MTBVAC y MT103. Los cultivos debían alcanzar un crecimiento de al menos 3×10^7 unidades formadoras de colonias antes de proceder a la extracción de los metabolitos. La densidad óptica de los cultivos para MT103 estuvo en torno a 1,24 y para MTBVAC a 1,14 después de una incubación de 10-14 días en tubos flasks a 37 °C. Posteriormente, se procedió a la extracción de metabolitos, siguiendo el procedimiento detallado a continuación.

Las muestras fueron centrifugadas a 4.000 xg durante 10 minutos a 4 °C con el fin de sedimentar las bacterias. Se descartó el sobrenadante, y el *pellet* fue resuspendido en 10 ml de Tris-HCl en hielo frío a pH 7,4. Además se centrifugó como en el paso anterior. Se descartó el sobrenadante y se repitió dos veces más este paso para quitar el máximo de impurezas. Se

añadieron finalmente diez ml de metanol a -80 °C al *pellet* de cada muestra y se agitaron vigorosamente durante 30 segundos. Las muestras se mantuvieron en hielo seco durante 30 minutos, y después se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio en hielo seco. Para la extracción del sedimento, se añadieron tres ml de metanol/agua al 50% a -20 °C al sedimento y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C, y se añadió el sobrenadante al tubo que contiene la primera extracción.

Una vez finalizado el procedimiento se preparó la muestra que iba a utilizarse como control de calidad a partir de una alícuota de 1,5 ml de cada una de las réplicas biológicas de ambas cepas. Las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta su análisis.

3.2 Extracción de metabolitos extracelulares

Se llevó a cabo por triplicado para cada cepa incluida en el estudio, que serían las que se detallan a continuación, MT103, MTBVAC, H37Rv, H37Rv Δ phoP y H37Rv Δ phoPpW222. Los cultivos se hicieron crecer en medio 7H9 con Tween 80 al 0.05% y suplementado con Dextrosa/NaCl. El análisis en este caso se realizó con las cepas en crecimiento exponencial, para lo que se dejaron en cultivo hasta alcanzar una densidad óptica para todas las cepas de aproximadamente 0,6, durante un tiempo de siete días. Una vez alcanzado el crecimiento deseado, todos los cultivos fueron centrifugados a 4000 g durante 10 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación los sobrenadantes fueron recogidos y filtrados con un tamaño de partícula de 0,22 μ m con el fin de realizar el análisis metabolómico.

3.3 Metabolómica no dirigida

Cromatografía: En el análisis de metabolómica no dirigida se utilizaron 2 tipos diferentes de cromatografía: la de fase reversa y la de interacción hidrofílica. La cromatografía en fase reversa es ampliamente usada, debido a su reproducibilidad y predecibles tiempos de retención, útil para varias clases de metabolitos apolares y de polaridad intermedia. Su principal desventaja es la pobre recuperación de compuestos hidrofílicos. Este problema puede resolverse por el uso de cromatografía de interacción hidrofílica, la cual presenta otro tipo de inconvenientes, por un lado, requiere mayores tiempos de equilibrado y puede mostrar saltos en los tiempos de

retención. La combinación de ambas nos proporciona un método óptimo para retener compuestos extremadamente polares y lipofílicos.⁶³

Espectrometría: Se usó espectrometría de masas de alta resolución QTOF-MS (*Quadrupole Time of Flight mass spectrometry*). Se utilizó un equipo de alta resolución, que combina el tiempo de vuelo de las diferentes moléculas con un triple cuadrupolo, donde se fragmentan las moléculas, pudiendo de este modo, aportar una mayor información de estas y ayudándonos de a su identificación. El equipo de espectrometría de masas triple cuadrupolo consiste en tres cuadrupolos conectados en serie (figura 5). El cuadrupolo 1 (Q1) y el cuadrupolo 3 (Q3) funcionan como dos analizadores con una configuración en cuadrupolo conectados en serie. El cuadrupolo 2 (Q2), conocido también como celda de colisión, se sitúa entre los dos cuadrupolos, el Q1 y Q3. Es un cuadrupolo especial en el que se aplica una energía, llamada energía de colisión, que permite fragmentar los iones obtenidos en la fuente de ionización. Esta energía puede tomar diferentes valores, lo que permite obtener espectros de masas en los que aparecen diferentes fragmentos y/o diferentes relaciones de intensidad entre ellos, dependiendo del valor de energía que se esté aplicando.

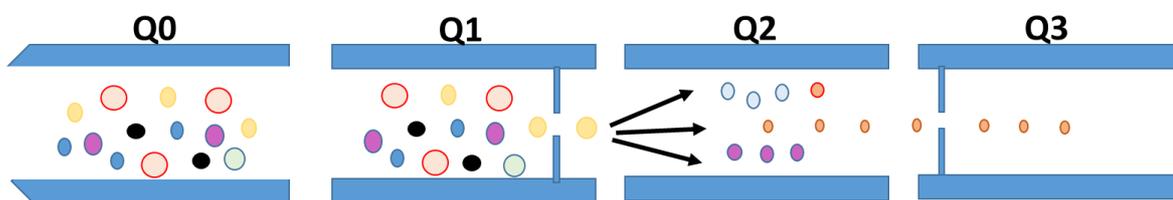


Figura 5. Representación de los diferentes cuadrupolos en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo. Q0: cuadrupolo 0, Q1: cuadrupolo 1, Q2: cuadrupolo 2 o celda de colisión y Q3: cuadrupolo 3.

Cuando se trabaja en espectrometría de masas y sobre todo, con análisis de cuantificación absoluta, es necesario optimizar una serie de parámetros característicos del equipo, para intentar conseguir la máxima señal de las moléculas de interés y los límites de detección más bajos. A continuación, se pasan a definir brevemente:

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

- DP: Potencial de focalización. Consiste en la diferencia de potencial aplicada a la entrada del orificio para evitar que los iones formen *clusters*.
- EP: Potencial de entrada. Se encarga de guiar y focalizar la entrada de iones a la región de alta presión Q0.
- CE: Energía de colisión, cantidad de energía que reciben los precursores de iones para entrar en la celda de colisión.
- CAD: Gas que se aplica para producir los iones por colisión.
- CXP: Potencial de energía que se aplica a la salida de la celda de colisión.
- Gas 1: Ayuda a generar pequeñas gotas con el flujo y la muestra para su posterior volatilización.
- Gas 2: Gas que favorece la evaporación del solvente formado con las gotas de la muestra y facilita el proceso de ionización.
- Temperatura: Temperatura que debe tener el Gas 2 para promover la evaporación.
- Gas cortina: Gas que se aplica para evitar que las gotas de solvente contaminen la óptica iónica.
- ISV: *Ion spray voltage*, se conoce como el potencial de voltaje necesario para que las muestras puedan obtener una carga en la fuente de ionización.

En los análisis desarrollados se ha utilizado la metodología ADI (adquisición dependiente de información). Se conoce como un modo de escaneo iónico de fragmentos a partir de una molécula parental basado en inteligencia artificial, que proporciona conmutación automática “sobre la marcha” de datos de masas y de datos de masas/masas. Al realizar una exploración dependiente de la información a dos energías de fragmentación diferentes, se generan dos espectros de iones de producto de disociación inducidos por colisión para cada uno de los compuestos detectados. Como tal, los espectros de MS/MS ricos en información se obtienen a partir de iones precursores no conocidos de antemano.

Se llevaron a cabo cuatro tipos de análisis utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución, cromatografía en fase reversa con ionización ESI positivo, cromatografía reversa e ionización en ESI negativo, cromatografía HILIC con ionización ESI positiva y, por último, cromatografía HILIC y ESI negativo. Todas las muestras del estudio fueron inyectadas por triplicado en cada uno de los análisis junto con los controles de calidad y las muestras con solventes. A continuación, se detallan cada uno de los análisis

realizados para el estudio de los metabolitos intracelulares de la cepa salvaje y de la cepa atenuada.

- **Cromatografía en fase reversa y modo de ionización electrospray negativo.**

Los análisis se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo líquido modelo 1290 (Agilent) y un espectrómetro de masas tiempo de vuelo triple cuadrupolo modelo QTOF5600 (SCIEX). La columna y precolumna utilizada para la separación fue la misma que en el apartado anterior. La carrera cromatográfica fue de 20 minutos. Se utilizó una fase móvil A, que contenía el 90% de agua desionizada, un 10% de acetonitrilo y con un 0,1% de ácido fórmico y una fase móvil B, preparada con un 90% de acetonitrilo, un 10% de agua desionizada y un 0.1% de ácido fórmico.

El gradiente y el porcentaje de las fases móviles utilizado durante el gradiente en el análisis de cada muestra pueden verse en la tabla 2.

Tabla 2. Flujo y gradiente cromatográfico utilizado durante el análisis con cromatografía reversa y modo de ionización negativo.

Tiempo (minutos)	Flujo (µl/min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0.0	300	99	1
0.5	300	99	1
11.0	300	1	99
15.5	300	1	99
15.6	300	99	1
20.0	300	99	1

El flujo fue de 300 µl/min durante la carrera cromatográfica. El horno conteniendo la columna se mantuvo a una temperatura de 45 °C. El volumen de inyección fue de cinco µl.

Las condiciones utilizadas para el espectrómetro de masas fueron las siguientes, el valor de DP fue -100 eV, la energía de colisión usada -10 eV, los gases para la evaporación GS1, con un valor de 50 psi y GS2, con un valor también de 50 psi, la energía de ionización, fue de -4500 eV, la temperatura de la fuente 500 °C y el valor del gas cortina fue de 45 psi. La calibración del equipo durante la secuencia de análisis se realizó cada cinco inyecciones.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

Las condiciones cromatográficas y los parámetros en relación al espectrómetro de masas descritas en este apartado, fueron las utilizadas durante el análisis metabolómico del exometaboloma.

- **Cromatografía en modo HILIC y modo de ionización electrospray positivo**

Los análisis se desarrollaron utilizando un cromatógrafo líquido modelo 1290 (Agilent) y un espectrómetro de masas tiempo de vuelo triple cuadrupolo modelo QTOF5600 (SCIEX). La columna empleada para la separación fue una columna XBridge BEH Amide con las dimensiones 2,1 mm x 150 mm y un tamaño de partícula de 2,5 µm. Además, se utilizó un guarda columnas XBridge BEH con dimensiones de 2,1 mm x 5 mm, y un tamaño de partícula de 2,5µm, obtenidas ambas, de Waters. La carrera cromatográfica fue de 10 minutos. Se utilizó una fase móvil A: que consistía en el 90% de agua desionizada, un 10% de acetonitrilo, conteniendo un 0,1% de ácido fórmico y una fase móvil B, que incluía el 90% de acetonitrilo y un 10% de agua desionizada, con un 0,1% de ácido fórmico. El flujo y gradiente empleado durante el análisis cromatográfico de cada muestra puede observarse en la tabla 3.

Tabla 3. Flujo y gradiente cromatográfico utilizado durante el análisis con cromatografía HILIC y modo de ionización positivo.

Tiempo (minutos)	Flujo (µl/min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0.0	400	1	99
0.1	400	1	99
7.0	400	70	30
7.1	400	1	99
10.0	400	1	99

El flujo fue de 400 µl/min durante la carrera cromatográfica. El horno que contenía la columna se mantuvo a una temperatura de 25 °C durante el análisis. El volumen de inyección fue de tres µl.

Las condiciones utilizadas en el espectrómetro de masas fueron las siguientes, el valor del DP, 100 eV, la energía de colisión, 30 eV, los gases para la evaporación GS1, con un valor de

50 psi y GS2 con un valor también de 50 psi, la energía de ionización, 5000 eV y la temperatura de la fuente, 500 °C y el valor del gas cortina, 45 psi. La calibración del equipo durante la secuencia de análisis se realizó cada 10 inyecciones.

- **Cromatografía en modo HILIC y modo de ionización electroespray negativo**

Los análisis se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo líquido modelo 1290 (Agilent) y un espectrómetro de masas tiempo de vuelo triple cuadrupolo modelo QTOF5600 (SCIEX). La columna y guarda columna utilizadas para la separación fueron las mismas que en el apartado anterior. La carrera cromatográfica tuvo una duración de 10 minutos. Se empleó una fase móvil A, que consistía en el 90% de agua desionizada, un 10% de acetonitrilo y con un 0,1% de ácido fórmico y una fase móvil B, que consistía en el 90% de acetonitrilo, un 10% de agua desionizada y un 0,1% de ácido fórmico. Las condiciones cromatográficas durante el análisis pueden verse en la tabla 4.

Tabla 4. Flujo y gradiente cromatográfico utilizado durante el análisis con cromatografía HILIC y modo de ionización negativo.

Tiempo (minutos)	Flujo (µl/min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0.0	400	1	99
0.1	400	1	99
7.0	400	70	30
7.1	400	1	99
10.0	400	1	99

El flujo del análisis fue de 400 µl/min durante la carrera cromatográfica. El horno que contenía la columna se mantuvo a una temperatura de 45° C. El volumen de inyección fue de tres µl.

Las condiciones utilizadas en el espectrómetro de masas se resumen en las siguientes, el valor del DP, -100 eV, la energía de colisión usada, de -30 eV, los gases para la evaporación GS1, con un valor de 50 psi y GS2, con un valor también de 50 psi, la energía de ionización, -4500 eV, la temperatura de la fuente, 500 °C y el valor del gas cortina, 45 psi. La calibración durante la secuencia de análisis se realizó cada 10 inyecciones.

- **Creación de set de datos y validación analítica**

Para la creación de las matrices de trabajo, el primer paso fue la evaluación de los tiempos de retención y del valor del error masa/carga (m/z) en tres picos aleatorios a lo largo de cada uno de los análisis desarrollados. Además, se utilizaron diversos estándares analíticos, roxitromicina y leucina marcada con ^{13}C , con el objetivo de poder evaluar la intensidad, el tiempo de retención y el error m/z a lo largo de los distintos análisis realizados durante los estudios de metabolómica no dirigida. Se utilizó, para esto, el *software Peak view* versión 1.1.2 (Sciex). Con la información que se obtuvo relacionada con el tiempo de retención de los m/z seleccionados pudimos corregir en los casos que fuera necesario el mal alineamiento de los iones. Esto quiere decir que en los casos donde el tiempo de retención de los iones se hubiera movido algunos segundos, podrían producirse errores en la selección de las señales, es decir que un mismo ion haya sido identificado dos veces de manera incorrecta en muestras distintas, por haberle sido asignado un tiempo de retención distinto. A fin de evitar y corregir estos posibles errores se debe comprobar la deriva analítica en todas las muestras. Los datos de espectros de masas fueron procesados todos usando el *software Marker view*, versión 1.2.1. de Sciex. Se realizó la detección de los picos, se llevó a cabo el alineamiento de los picos y el filtrado de datos. Solamente fueron considerados para el análisis las masas/carga obtenidas que presentaban un perfil monoisotópico para reducir la redundancia y mejorar la selección de características moleculares verdaderas.

Durante todo el análisis se utilizaron controles de calidad para comprobar la precisión y exactitud. La precisión se evaluó usando inyecciones aleatorias de los controles de calidad. Además, estas muestras se utilizaron para evaluar la calidad de los análisis realizados, evaluando las fluctuaciones en la medida de las señales de todas las variables detectadas, utilizando el *software Marker view*.

Todos los procesos fueron evaluados mediante el método multivariable de análisis de componentes principales (ACP). Para validar nuestros análisis instrumentales utilizamos esta prueba, verificando que los controles de calidad inyectados aleatoriamente durante todo el proceso de análisis presentaban una disposición agrupada. Este es el método estadístico no supervisado más común empleado en metabolómica, y un primer paso frecuente en el análisis de datos, utilizado cuando se está trabajando con una matriz de datos que presenta un elevado número de variables. Con el uso de esta técnica se realiza una combinación lineal de las variables originales que serán independientes entre sí, y representadas en distintos componentes principales o factores.

El ACP se suele dividir en diferentes etapas. Por un lado, tenemos el análisis de la matriz para ver las posibles correlaciones entre las variables, siempre y cuando se puedan presentar altas correlaciones entre estas, apareciendo información redundante, y manifestando en realidad que son pocas las variables responsables de la gran variabilidad total. Por otro lado, nos hallamos con la selección del número de componentes principales, en tanto que la elección de los factores, se realiza de modo que el primero englobe el mayor porcentaje posible de la variabilidad original. El segundo componente principal debe presentar el porcentaje máximo posible de variabilidad no recogida en el primero, y así, sucesivamente. Del total de componentes principales se escogerá, en cada caso, el porcentaje de variabilidad que se considere apropiado para el objeto de estudio. Finalmente, se realiza un análisis de la matriz factorial, una vez seleccionado el número de componentes principales, y se representan en forma de matriz, las correlaciones entre las variables y los componentes. Las puntuaciones que tienen los componentes principales para cada caso, nos permitirán su representación gráfica. Tras aplicar el ACP a cada uno de los análisis, se evaluó la agrupación de los controles de calidad y de los distintos tipos de muestra.

Durante los análisis se inyectaron muestras con solventes utilizados en la preparación de las muestras para identificar impurezas y con el fin de comprobar la posible contaminación por arrastre de señales de una muestra a otra. Todas las señales que no aparecían con una intensidad tres veces mayor en las muestras de estudio que en las provenientes del solvente inyectadas fueron excluidas del análisis.

Posteriormente, se hizo el cálculo del coeficiente de variación de todas las intensidades obtenidas de los picos en las muestras inyectadas como controles de calidad después de la creación del set de datos. Las masas/carga con una variabilidad mayor del 30%, fueron eliminadas de la matriz de datos.

- **Análisis de las señales m/z con cromatografía reversa y modo de ionización positivo**

Para el análisis con cromatografía reversa y modo de ionización positivo se realizó una búsqueda con el objetivo de localizar las variables detectadas por el espectrómetro de masas desde el minuto 1.00 hasta el minuto 18.00. El número de variables que se obtuvieron en la primera selección fueron 1.781 señales m/z. El nivel de ruido que consideramos para filtrar las señales m/z durante el análisis fue de 300 cuentas por segundo, la tolerancia entre las masas de 20 ppm y la deriva en el tiempo de retención que consideramos en las señales entre las muestras fue de 0.10 minutos. Solo se considerarán las señales que estén presentes en al menos 12 de las

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

muestras analizadas. Después de éste primer filtrado se redujeron las variables seleccionadas a 421 m/z, al elegir solo las que presentaban espectros monoisotópicos, a fin de que resultara más fácil poder asignar una identificación fiable. Después de esa reducción y de quitar los elementos que no se encontraban tres veces por encima de la señal obtenida en los solventes, la matriz se redujo a 218 variables, y posteriormente se eliminaron aquellas que presentaban un 30% de variabilidad entre los controles de calidad adquiridos durante todo el análisis. Finalmente, la matriz tras el filtrado contenía 214 señales m/z.

La representación mostró una buena agrupación, utilizando APC en todos los casos. Las muestras correspondientes a los controles de calidad se encontraron agrupadas con una ligera deriva, lo que daba validez a los resultados obtenidos durante el análisis metabolómico. Igualmente, las muestras para MTBVAC y MT103 aparecen agrupadas, en este caso, las réplicas biológicas presentan cierta variabilidad respecto a los casos anteriores. Las réplicas analíticas aparecen prácticamente solapadas. Por último, las muestras que contenían los solventes se presentan agrupadas en la parte izquierda de la figura 6.

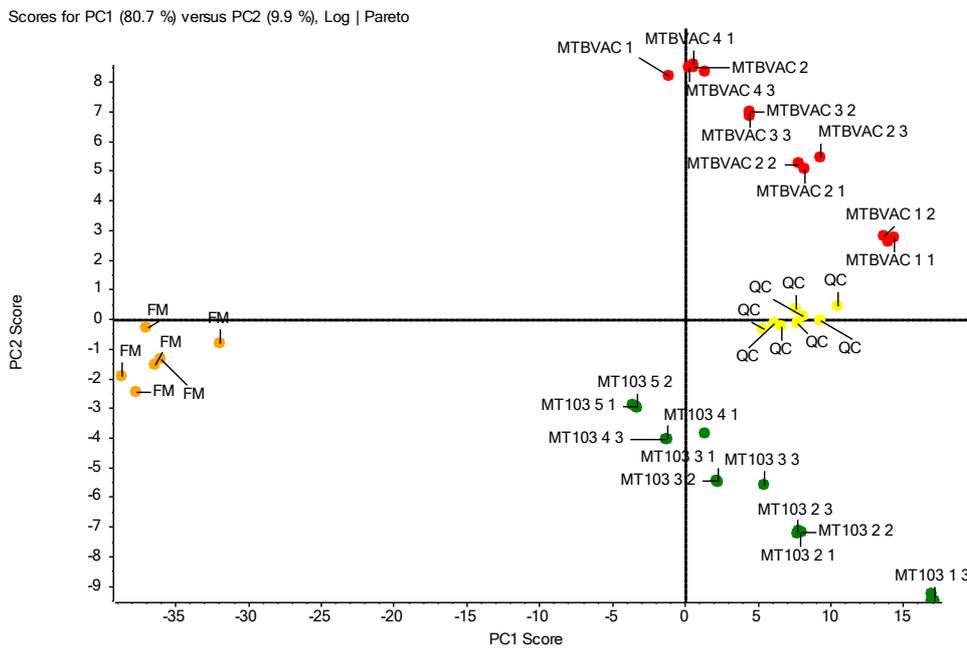


Figura 6. Representación de la agrupación de la cepa en análisis de componentes *Mycobacterium* (MT103, círculos verdes), MTBVAC (círculos rojos), los controles de calidad (QC, círculos amarillos) y los solventes (FM, círculos naranja) dos componentes que explican el 91.6% de la variabilidad (PC1 con el 80.7% y PC2 con el 9.9%) en el análisis para reversa negativo. PC: Componentes principales.

El ACP confirma que nuestro experimento presenta una buena reproducibilidad, viendo la clara distribución de las réplicas analíticas y los controles de calidad, además de que la representación con 2 componentes del modelo, explica el 91.6% de la variabilidad entre las cepas MT103 y MTBVAC.

- **Análisis de las señales m/z con cromatografía reversa y modo de ionización negativo**

Al proceder al análisis por cromatografía reversa y modo de ionización negativo se hizo una búsqueda para las variables teniendo en cuenta todas las señales que aparecían desde el minuto 1.00 hasta el minuto 17.00. El número de variables detectada que se obtuvo para este rango de tiempo fue de 1.523 m/z. El nivel de ruido que se escogió como umbral fue de 100 cuentas por segundo, la tolerancia entre las masas, de 15 ppm, el tiempo de retención para considerar entre las señales y las diferentes muestras fue de 0.12 minutos. Solo se considerarán las señales que estén presentes en al menos 12 de las muestras analizadas. Después de éste primer filtrado se redujeron las variables escogidas a 384. Al seleccionar solo las que seguían una relación monoisotópica y era posible asignar una identificación fiable, después de esa reducción y de quitar los elementos que no se encontraban tres veces por encima de la señal obtenida en los solventes se redujo la matriz a 268 m/z. Tras evaluar la relación de señales obtenidas en los controles de calidad, aquellas que se encontraban por debajo del 30% fueron eliminadas de la matriz. Finalmente, la matriz disminuyó a 267 señales.

El ACP, mostró una agrupación perfecta en todos los casos y se observa que las muestras para los controles de calidad, aparecen en el centro, dando validez a los resultados obtenidos. Igualmente, las muestras para MTBVAC y MT103 aparecen totalmente agrupadas, como cabe esperar al tratarse de réplicas analíticas y biológicas. Por último, las muestras que contenían los solventes están totalmente solapadas. El ACP confirma que nuestro experimento presenta una muy buena reproducibilidad, además la representación con dos componentes del modelo explica el 98,0% del modelo (figura 5).

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

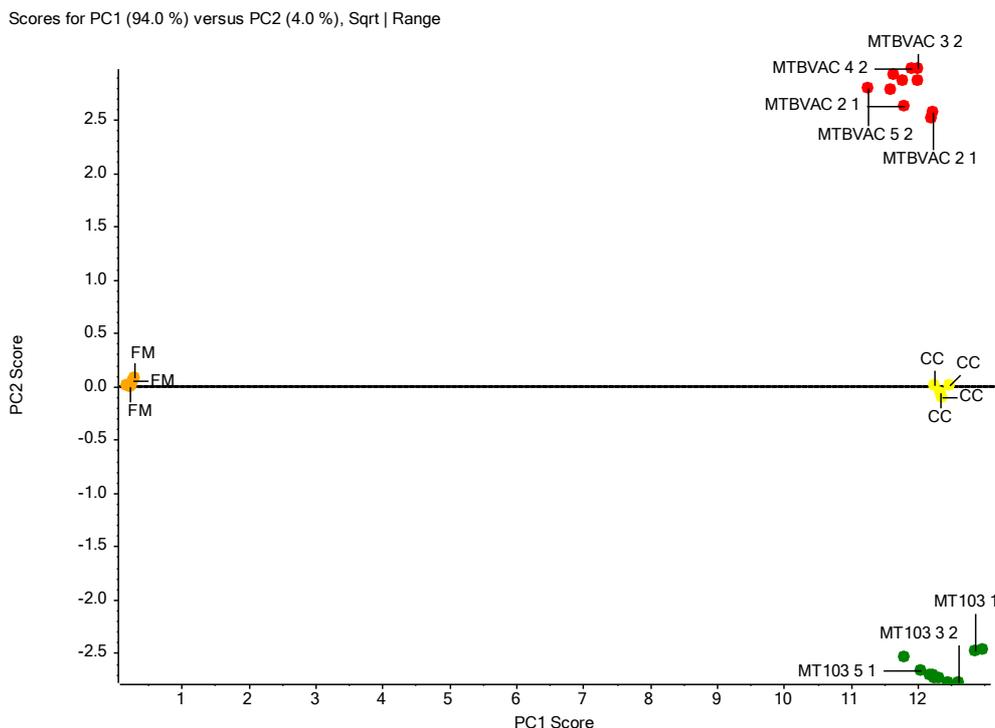


Figura 5. Representación de la agrupación de la cepa en análisis de componentes Mycobacterium (MT103, círculos verdes), MTBVAC (círculos rojos), los controles de calidad (QC, círculos amarillos) y los solventes (FM, círculos naranja) dos componentes que explican el 98.0% de la variabilidad (PC1 con el 94.0% y PC2 con el 4.0%) en el análisis para reversa negativo. PC: Componentes principales.

- **Análisis de las señales m/z con cromatografía HILIC y modo de ionización positivo**

En cuanto al análisis utilizando una cromatografía HILIC y modo de ionización positivo se obtuvo una matriz con 4.872 variables, que fueron detectadas usando espectrometría de masas y considerando todas las señales que aparecían desde 0.90 minutos hasta 9.00 minutos y que cumplían una serie de requisitos. El nivel de ruido en la extracción de los picos se estableció en 100 cuentas por segundo, la tolerancia entre las masas, de 20 ppm y la variabilidad en el tiempo de retención a considerar en las señales entre las muestras será de 0.10 minutos. Solo se considerarán las señales que estén presentes en al menos 12 de las muestras. Tras la reducción por la selección de las señales obtenidas en el análisis por presentar un perfil monoisotópico nos quedamos con 547 variables. Después de revisar las variables que estaban presentes en las fases móviles se redujo el número de variables a 276 m/z, además otras seis variables, fueron eliminadas por presentar un 30% de variabilidad en las intensidades entre los controles de calidad inyectados durante el análisis. Finalmente, se obtuvo una matriz formada con 271 m/z.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

La utilización de ACP, presentó una agrupación perfecta en todos los casos. Las muestras para los controles de calidad aparecen en el centro, dando validez de nuevo a los resultados. Igualmente, las muestras para MTBVAC y MT103 aparecen totalmente agrupadas.

Por último, las muestras que contenían los solventes están totalmente solapadas. El ACP confirma que nuestro experimento presenta muy buena reproducibilidad y, además la representación con dos componentes del modelo explica el 98,2% de la variabilidad (figura 6).

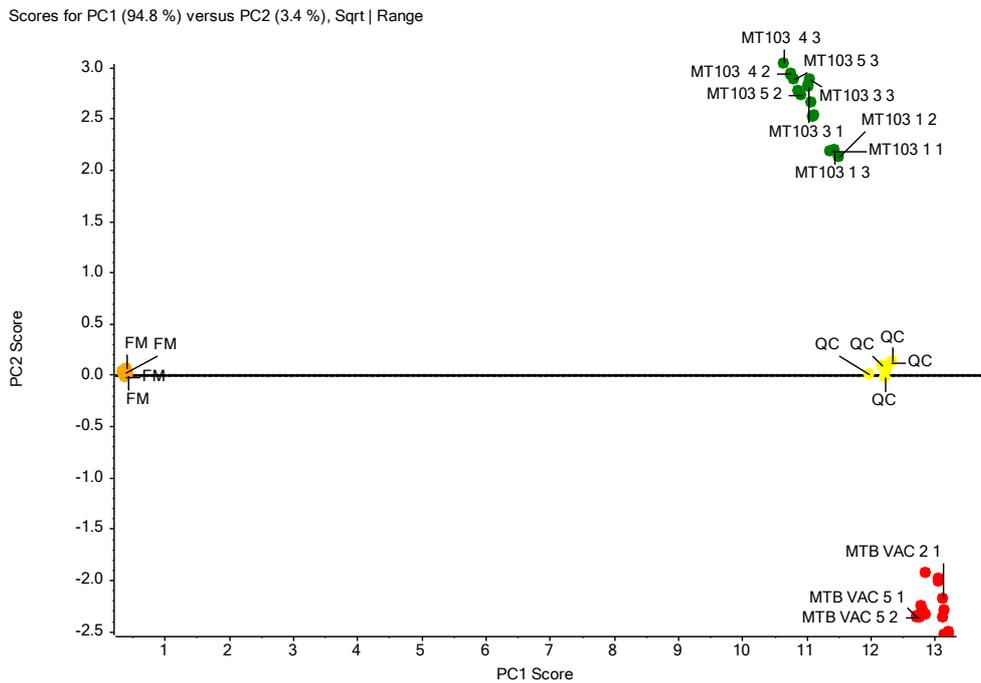


Figura 6. Representación de la agrupación de la cepa en análisis de componentes *Mycobacterium* (MT103, círculos verdes), MTBVAC (círculos rojos), los controles de calidad (QC, círculos amarillos) y los solventes (FM, círculos naranja) dos componentes que explican el 98.2% de la variabilidad (PC1 con el 94.8% y PC2 con el 3.4%) en el análisis para HILIC positivo. PCC: Componentes principales.

- **Análisis de las señales m/z con cromatografía HILIC y modo de ionización negativo**

Para el análisis con cromatografía HILIC y modo de ionización negativo se seleccionaron las variables teniendo presente todas las señales que aparecieran desde 1.20 minutos hasta 8.70 minutos. El número de variables que se obtuvo en el primer filtrado fue de 1.496 m/z. El nivel de ruido en los análisis para la selección de las variables se estableció en 100 cuentas por segundo, la tolerancia entre las masas, en 15 ppm y el cambio en el tiempo de retención para considerar, entre las señales entre las diferentes muestras del estudio, en 0.12 minutos. Solo se considerarán las señales que estén presentes en al menos 12 de las muestras analizadas. Después de éste primer filtrado se redujeron las variables elegidas a 327 al seleccionar solo las que seguían una relación monoisotópica y era posible asignarles una identificación. Posteriormente a esa reducción se eliminaron los elementos que no se encontraban tres veces por encima de la señal obtenida en los solventes, y se redujo la matriz a 141 variables. Se calculó el coeficiente de variación de todas las señales obtenidas en los controles de calidad inyectados durante el análisis, con el objeto de, eliminar aquellas que presentaban un coeficiente de variación superior al 30%. Tras aplicar este cálculo, no hubo ninguna variable que superó este umbral.

El ACP, presentaba una buena agrupación en todos los casos. Las muestras que se correspondían con los controles de calidad aparecen en el centro a una distancia adecuada, formando un clúster y, dando validez a los resultados obtenidos durante el proceso analítico. Igualmente, las muestras para MTBVAC y MT103 aparecen agrupadas, aunque hay una muestra biológica de MT103 un poco más alejada del resto. Sin embargo, las tres réplicas analíticas aparecen juntas, confirmando la reproducibilidad analítica. Finalmente, las muestras que contenían los solventes están totalmente solapadas. El ACP confirma que nuestro experimento presenta muy buena reproducibilidad y, además la representación con dos componentes del modelo explica el 99,2% de la variabilidad, ver figura 7.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

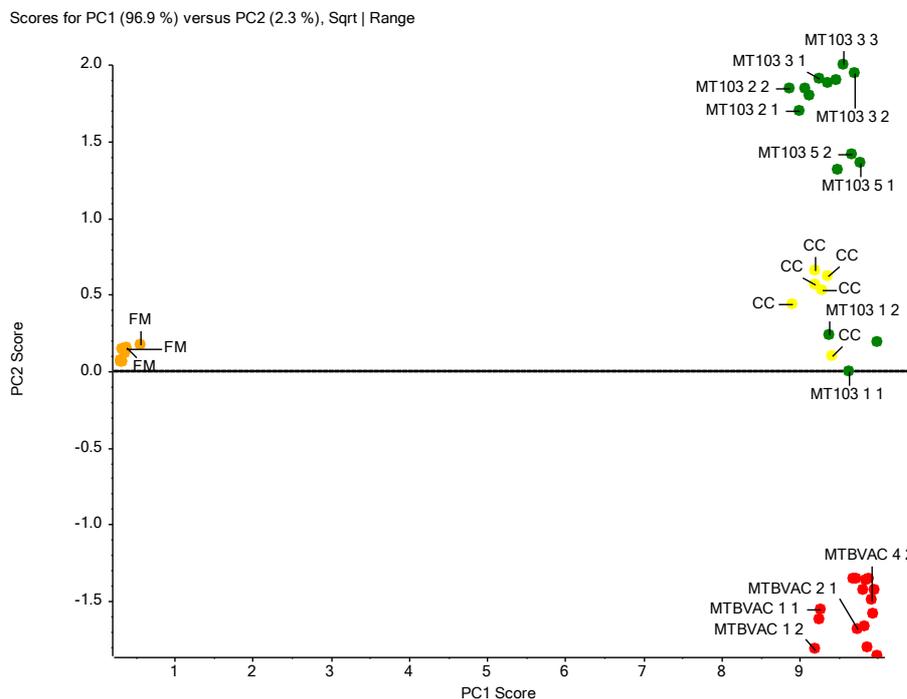


Figura 7. Representación de la agrupación de la cepa en análisis de componentes principales *Mycobacterium* (MT103, círculos verdes), (MTBVAC círculos rojos), los controles de calidad (QC, círculos amarillos) y los solventes (FM, círculos naranja) utilizando dos componentes que explican el 99.2 % de la variabilidad (PC1 con el 96.9% y PC2 con el 2.3%) en el análisis para HILIC negativo. PC: Componentes principales

- **Análisis de las señales m/z con cromatografía reversa y modo de ionización negativo (exometaboloma)**

El análisis por cromatografía reversa y modo de ionización negativo fue el escogido para el estudio del exometaboloma. Se seleccionaron los parámetros que incluyeran las señales que aparecieran desde el minuto 1.00 hasta el minuto 17.00. El nivel de ruido se evaluó en los cromatogramas obtenidos y tras esto, se escogió como nivel de ruido 100 cuentas por segundo.

El valor para la tolerancia de masas se estableció en 15 ppm y el tiempo de retención para considerar en el alineamiento entre muestras en 0.12 minutos. Solo se considerarán las señales que estén presentes en al menos seis de las muestras analizadas. Se obtuvieron 2.041 señales en la primera evaluación de la matriz de datos, para el período de tiempo escogido. Después de éste primer filtrado se redujeron las variables a 455, al seleccionar sólo las que seguían una relación monoisotópica. Posteriormente, tras revisar las señales que podían provenir de los solventes, se eliminaron de las muestras incluidas en el estudio, todas aquellas que no se encontraban tres veces por encima de la señal obtenida en los solventes, reduciendo de este modo la matriz a 403

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

m/z. Tras la evaluación de las señales obtenidas en los controles de calidad, todas aquellas que se encontraban por debajo del 30% fueron eliminadas de la matriz, reduciendo finalmente la matriz a 402 señales.

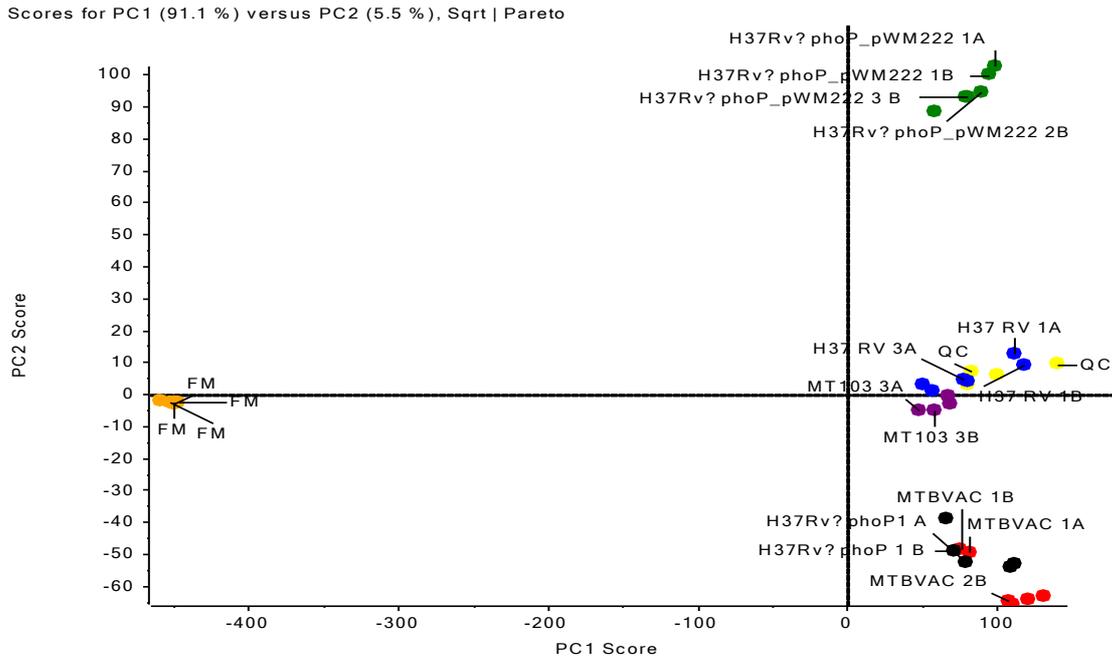


Figura 8. Representación de la agrupación de las cepas en análisis de componentes principales para *Mycobacterium tuberculosis* 103 (MT103, círculos verdes), *Mycobacterium tuberculosis* cepa vacuna (MTBVAC círculos rojos), la cepa H37Rv (círculos azules), el mutante H37RvΔphoP (círculos negros), el mutante H37RvΔphoPhhpWM222 (círculos verdes) los controles de calidad (QC, círculos amarillos) y los solventes (FM, círculos naranja) utilizando dos componentes que explican el 96.6 % de la variabilidad (PC1 con el 91.1% y PC2 con el 5.5%) en el análisis para reversa positivo.

En el ACP, se pudo ver la buena agrupación para las cepas del mismo tipo incluidas en el análisis. Las muestras correspondientes a los controles de calidad aparecen en el centro a una distancia adecuada, dando validez a los resultados obtenidos durante el proceso analítico por la proximidad y agrupación de los mismos. Igualmente, las cepas y sus réplicas analíticas aparecen todas agrupadas. Puede verse claramente que tanto MT103 junto con H37Rv se encuentran muy próximas por un lado y que MTBVAC junto con el mutante phoP de H37Rv igualmente se encuentran muy cerca en la gráfica. La cepa que presenta las múltiples copias del gen *phoP* aparece aislada del resto de cepas, pero situada más cerca de las cepas salvajes. Por último, las muestras que contenían los solventes se encuentran totalmente solapadas. El ACP confirma que

nuestro experimento presenta una muy buena reproducibilidad, además la representación con solo dos componentes explica el 99,2% de la variabilidad del modelo (Figura 8).

- **Análisis estadístico**

El análisis estadístico para las cuatro aproximaciones metabolómicas se realizó utilizando la herramienta *Metaboanalyst* versión 3.0. Se creó un archivo de Excel tipo csv que contenía el tipo de muestra, el grupo al que pertenece, las señales m/z y la intensidad para cada una de ellas.

Se hizo un test de normalidad con el fin de comprobar si los datos presentaban una distribución gaussiana. Tras confirmar que su distribución no era de este tipo, se procedió a normalizar los datos en cada uno de los análisis y posteriormente, usar un test paramétrico. Para este fin era necesario que las muestras presentasen una distribución normal. Las muestras fueron normalizadas usando la suma de las intensidades totales del cromatograma. Los datos además fueron transformados usando Pareto y escalados usando la función logarítmica.

Para el análisis univariable de los metabolitos en el sobrenadante de los cultivos utilizamos el test de *t-Student* con los dos grupos experimentales *M. tuberculosis* y MTBVAC. Además después se usó el factor de corrección de Benjamini Holchber con el objetivo de hacer comparaciones múltiples y, así, poder reducir la proporción de falsos positivos, catalogados como errores de tipo I⁶⁴. Para llevar esto a cabo el método asume a la hora de estimar el número de hipótesis nulas consideradas enormemente falsas que todas las hipótesis nulas con ciertas, y como consecuencia la estimación de FDR está inflada, siendo de este modo más conservadores. El análisis multivariable de ACP fue usado para detectar posibles *outliers*. Una vez realizados ambos test, el p-valor para seleccionar los metabolitos estadísticamente significativos fue menor de 0,05. Otros factores para tener en cuenta en la selección de los metabolitos, fueron las diferencias encontradas entre ellos de más de dos veces de cambio.

- **Identificación de metabolitos**

Se utilizó el *software PeakView* (versión 1.0 con el complemento *Formula Finder* versión 1.0, SCIEX, Concord, Ontario, Canadá) para determinar una fórmula molecular de acuerdo con la masa exacta y el patrón isotópico. La aproximación de la fórmula elemental se completó a partir de espectros de masas precisos, HRMS y MS/MS obteniendo fórmulas tentativas, que reflejan las diferencias entre los valores m/z calculados y medidos tanto para los iones originales

como para los fragmentos. A fin de determinar una identidad tentativa a las señales m/z obtenidas, se usaron distintas bases de datos, teniendo en cuenta un error máximo de cinco ppm. Además de la comparación de espectros de fragmentación, utilizando distintas bases de datos con información experimental y predictiva, y el uso de literatura científica, para apoyar en la identificación de los metabolitos diferenciales. En algunos de los casos en los que no se produjo la fragmentación, se llevaron a cabo análisis adicionales de MS/MS para tratar de poder asignar una identificación de la estructura de los metabolitos diferenciales. A continuación, se detallan algunas de las bases de datos consultadas, mediador de masas CEU (MMC) como herramienta de búsqueda que proporciona acceso directo con distintos repositorios públicos (KEGG, *Metlin*, *Human metabolome database*, *lipidmaps*). *Human metabolome database* es una base de datos que contiene información detallada sobre moléculas pequeñas que existen en el cuerpo humano. Presenta más de 114.177 entradas de metabolitos incluyendo solubles en agua y en lípidos. Proporciona información relacionada con datos químicos, clínicos y bioquímicos/biológicos moleculares. *Metlin* contiene información para más de 500.000 estándares con espectros de masas/masas a múltiples energías de colisión y con modos de ionización positivo y negativo. *Lipidmaps* es una base de datos que contiene información estructural y anotaciones de 43.659 lípidos biológicamente relevantes, lo que la convierte en la base de datos pública de lípidos más grande del mundo. Otra base de datos conocida como NIST 2012 de carácter privada también fue utilizada durante esta tarea, está dotada con espectros de masas y de fragmentación adquiridos con diferentes espectrómetros de masas y en condiciones diferentes. Además, se consultaron otras bases de datos que contenían información detallada de compuestos químicos como *PubChem* y *ChemSpider*. Relacionadas directamente con metabolitos de microorganismos se consultó la enciclopedia Metacyc de vías metabólicas, el metabolismo de *Escherichia coli* y la colección de bases de datos Biocyc. Se accedió a Mtb LipidDB con más de 2.512 entidades lipídicas pertenecientes a *M.tuberculosis*. También se utilizó la información de las condiciones experimentales, el comportamiento de ionización y/o el tiempo de retención en las diferentes condiciones cromatográficas para tratar de identificar el metabolito que correspondía con las señales m/z obtenidas durante los análisis.

Para asignar una identidad de los metabolitos diferenciales entre ambos grupos teniendo en cuenta las veces de cambio y el p valor con la corrección de Benjamin Holchberg se utilizarán distintos tipos de herramientas, además de un sistema de clasificación dependiendo del grado de fiabilidad en la identificación del metabolito. Con este objetivo, se ha empleado el sistema de identificación propuesto por Schymansky⁶⁵, que está dividido en cinco niveles que a su vez

cataloga en dos, dentro del nivel uno y dos donde se produce la identificación de estructura y del nivel tres al cinco que englobaría la clase de sustancia, fórmula o masa de interés. A continuación, se detalla en qué consistiría cada nivel:

- **Nivel 1.** Estructura confirmada: sería la situación perfecta y, se ha podido confirmar la estructura utilizando un estándar de referencia con masas, masas/masas y coincidencia del tiempo de retención.
- **Nivel 2.** Estructura probable: indica que ha sido posible proponer una estructura usando diferentes criterios. Para el nivel 2a implicaría la comparación con literatura o bases de datos de librerías, donde la coincidencia de estructura-espectro no es ambigua. Hay que tener especial cuidado cuando se necesitan comparar espectros registrados con diferentes parámetros de adquisición. Para el nivel 2b diagnóstico representa el caso en que ninguna otra estructura se ajusta a la información experimental, pero no hay disponible estándares o datos de literatura para la confirmación. La evidencia puede incluir fragmentos MS/MS de diagnóstico y/o comportamiento de ionización, así como información del compuesto parental y el contexto experimental.
- **Nivel 3.** Candidato tentativo: describe una zona gris donde existen evidencias para una posible estructura, pero ofrece información insuficiente para solo una estructura. Aunque hay muchos grados de gris posibles para muchas situaciones diferentes, si abordamos todos los intentos y propuestas, la estructura exacta permanece especulativa a nivel 3.
- **Nivel 4.** Fórmula molecular inequívoca: es posible cuando una fórmula puede ser asignada inequívocamente usando la información espectral (aducto, isotópica y/o información de fragmentos). Pero existen evidencias insuficientes para proponer posibles estructuras. Los espectros de fragmentación podrían no contener información suficiente, con la presencia de interferencias o ni siquiera disponer de estos espectros. Además, la fórmula proporciona cierta información y podría rastrearse en estudios posteriores.
- **Nivel 5.** Masa exacta: puede ser medida en una muestra y tener interés específico para la investigación, pero carece de información para asignar incluso una fórmula. Métodos dirigidos y de cribado permiten el rastreo de estas masas en otras investigaciones. Sin embargo, el nivel cinco indica qué información no inequívoca sobre la estructura o la fórmula existen. Incluso se pueden registrar los ms/ms de una masa de nivel cinco y guardarlos como un espectro desconocido en una base de datos.

A partir de esta clasificación y utilizando las diferentes herramientas para la identificación molecular se procedió al análisis de todas las señales de m/z seleccionadas a lo largo de los cuatro análisis. Todos presentaban una relación isotópica y una calidad espectral adecuada para poder asignar una identificación a nuestra lista de candidatos diferenciales. Los resultados obtenidos para la asignación estructural se muestran en apartados independientes en relación al tipo de cromatografía y modo de ionización realizados en cada análisis.

3.4 Metabolómica dirigida

- **FIMs**

Las cepas MT103, MTBVAC, H37Rv, H37Rv Δ phoP::hyg, GC1237 y GC1237 Δ phoP::hyg se cultivaron en medio 7H9-ADC y se obtuvieron los *pellets* siguiendo el protocolo anteriormente descrito para el análisis de endometaboloma. Una vez desarrollado el protocolo se llevaron a cabo sucesivas extracciones a temperatura ambiente utilizando cloroformo-metanol en proporción 1/2 y finalmente se usó cloroformo/metanol en proporción 2/1. Los extractos fueron combinados, en una solución con cloroformo/metanol/agua y en una proporción de 4/2/1 y evaporados bajo una atmósfera de N_2 a 40 °C. Tras la evaporación, los extractos se disolvieron a una concentración aproximada de 0,5 mg/ml en cloroformo-metanol en proporción de 2/1.

El análisis por espectrometría de masas fue realizado en un ESI-TOF modelo 6220 de la marca Agilent conectado a un cromatógrafo líquido serie 1200 de Agilent y operando en modo de ionización negativo, en un rango de m/z de 100 a 2.000 y mediante inyección directa. La fase móvil utilizada consistió en metanol/agua en una proporción 3/1, conteniendo 0,1% de ácido fórmico y 0,5 mM de formiato amónico.

El método utilizado para la obtención de FIMs fue descrito por Hsu y colaboradores.⁶⁶ Los espectros fueron adquiridos en condiciones estándar en el modo centroide.⁶⁷ Los FIM se identificaron acorde a su masa exacta (calculada en www.chemcal.org con error por debajo de cinco ppm). Los datos de FIM de *M. bovis* BCG fueron empleados como referencia.^{66,68}

Las parejas de cepas fueron analizadas una vez en el mismo día con un periodo de 10 minutos entre análisis de muestras, empleando la misma referencia de calibración del sistema. La relación de lípidos entre las parejas de cepas (mutantes phoP frente a cepa parental) fueron calculadas a partir del área de la corriente total de iones y las intensidades de los diferentes iones monoisotópicos de cada uno de los FIM, usando la siguiente ecuación:

$$rF = iF_m \times CTI_p / iF_p \times CTI_m$$

rF= Ratio de diacil-FIM₂

iF_m= intensidad de diacil-FIM₂ del mutante

CTI_p= CTI de la cepa parental

iF_p= intensidad de diacil-FIM₂ de cepa parental

CTI_m= CTI de la cepa mutante

- **di-AMP cíclico (c-di-AMP)**

Cromatografía: La columna utilizada fue la X Bridge BEH amida (Waters) con unas dimensiones de 2.1 x 100 mm, con un tamaño de partícula de 3.5 µm y un salva columnas X Bridge BEH amida de 2.1 x 5 mm y 3.5 µm de tamaño de partícula (Waters). La fase móvil A consistía en agua con un 0.1% de amoníaco (Acros organics) y la fase móvil B consistía en acetonitrilo (Merck) con 0.1% de amoníaco (figura 9). El flujo utilizado fue de 300 µL/min. El volumen de inyección fue de 7 µL. La carrera cromatográfica total fue de 7.2 minutos.

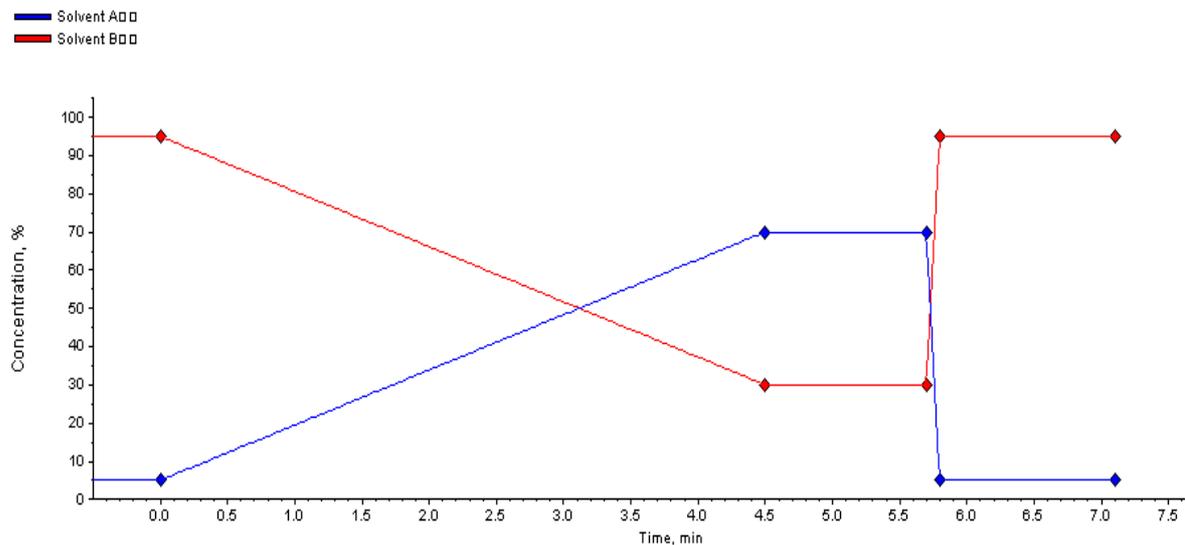


Figura 9. Representación del gradiente utilizado para el método cromatográfico durante el análisis.

Los estándares para preparar la curva de calibración se prepararon añadiendo 2 µL del di-AMP cíclico de una solución acuosa a una concentración de 0.1 mg/ml en una solución de 100 µL de metanol y agua (50/50). La concentración más alta del estándar se preparó a una

concentración de 1890 ng/ml en un volumen final de 106 μ L (a partir de aquí se preparan 8 puntos de dilución a 1/2) donde el punto más diluido del estándar se encontraba a 14.7 ng/ml.

Igualmente, el estándar de di-GMP cíclico se preparó a partir de un stock a una concentración de 0,1 mg/ml una solución a 25 μ g/ml, de la que se añadieron cuatro μ L a la solución de agua y metanol. Después se añadieron 200 μ L de acetonitrilo frío con el 0,1% de ácido fórmico, se agitó durante un minuto en vortex y se centrifugó durante cinco minutos a 3700 rpm a 4 °C. Posteriormente se recogió el sobrenadante para llevar a cabo el análisis por CLEM.

Espectrometría: Para el análisis de metabolitos específicos han sido utilizadas dos instrumentaciones distintas: un espectrómetro de masas triple cuadrupolo API4000 de la marca SCIEX y un espectrómetro de masas tiempo de vuelo 6220 (Agilent). El modo de trabajo con los equipos que presentan una celda de colisión, para poder fragmentar, y realizar el análisis de moléculas concretas, sería la monitorización de reacción múltiple (MRM), y es necesario el uso de patrones comerciales para poder caracterizar la molécula que queremos cuantificar. Ésta forma de trabajo presenta una alta sensibilidad y especificidad en la detección de la molécula dentro de una muestra compleja.

Además, permite obtener espectros de masas altamente selectivos, con gran sensibilidad, pero con pocos iones (poca información). Es muy útil en los procesos en los que se requiere analizar unas sustancias muy concretas, de las que se conoce el peso molecular y el patrón de fragmentación, en los casos en los que no hay disponibilidad de patrones.

Para la cuantificación de di-AMP cíclico se usó como base del análisis la infusión directa de un patrón comercial que fue adquirido de InvivoGen, usando para esto una jeringa Hamilton (Teknokroma) a una concentración de 0,5 μ M. La mezcla se preparó en una solución que contenía acetonitrilo/agua desionizada (50/50) con 0,1% de ácido fórmico. Previamente a la infusión del patrón se analiza una solución del solvente donde se ha preparado la muestra para verificar que no hay ninguna señal de masas que puede interferir para la detección de nuestra molécula. Para la detección se usó la sonda de electroespray y la polaridad del voltaje aplicado en el capilar fue en modo negativo. En el modo de ionización mediante electroespray, la muestra se hizo pasar por un capilar, en el que es aplicado un alto potencial eléctrico. Tras la salida del capilar la solución se dispersa en spray formado por pequeñas gotas cargadas, que se van a evaporar muy rápido por un proceso de desorción del campo eléctrico o de evaporación del solvente, liberando moléculas protonadas a la fase gaseosa. Los iones generados pueden estar protonados de forma múltiple, dando lugar a diferentes especies para una misma molécula. El

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

flujo de trabajo fue de 20 μ l/minuto para un rango de 300 a 750 Da. Una vez que conseguimos una señal estable sin fluctuaciones se identificó la señal m/z a la que se detecta nuestro compuesto de interés. La señal m/z obtenida para el AMP dicíclico fue de 657.3 (figura 10).

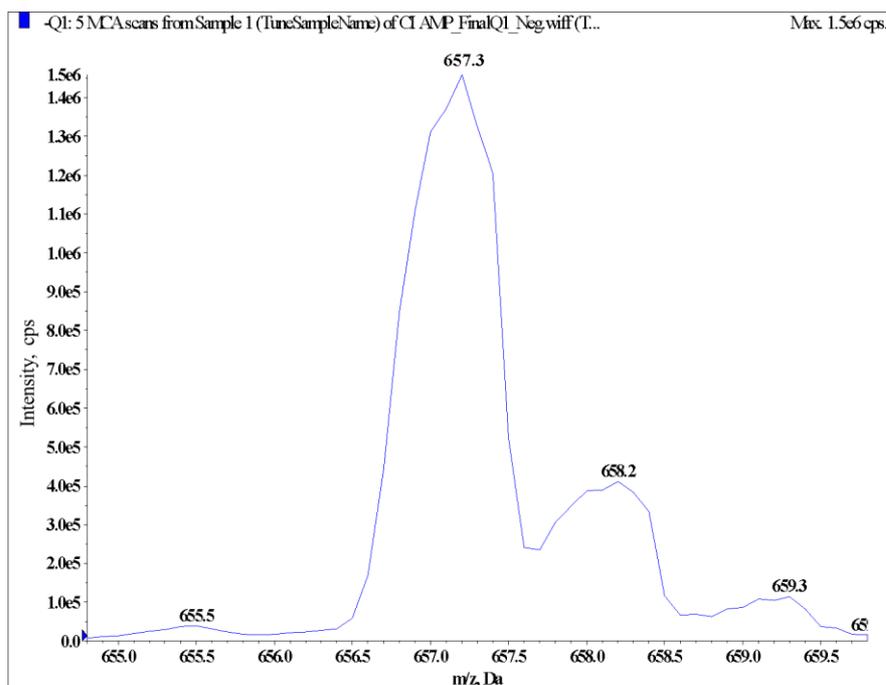


Figura 10. Espectro de masas obtenido para el d-ci-AMP con una relación de m/z: 657.3

Se optimizaron los parámetros relacionados con la fuente de ionización para favorecer la obtención de la máxima señal. El primer parámetro que evaluamos fue el potencial de focalización, que se mide en voltios. Para ello se aplicó una rampa con potenciales que van de -400 a 5 voltios, y se escogió el valor que nos proporcione la máxima señal de nuestra moléculas. El valor óptimo para el DP fue de -114 voltios (figura 11).

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

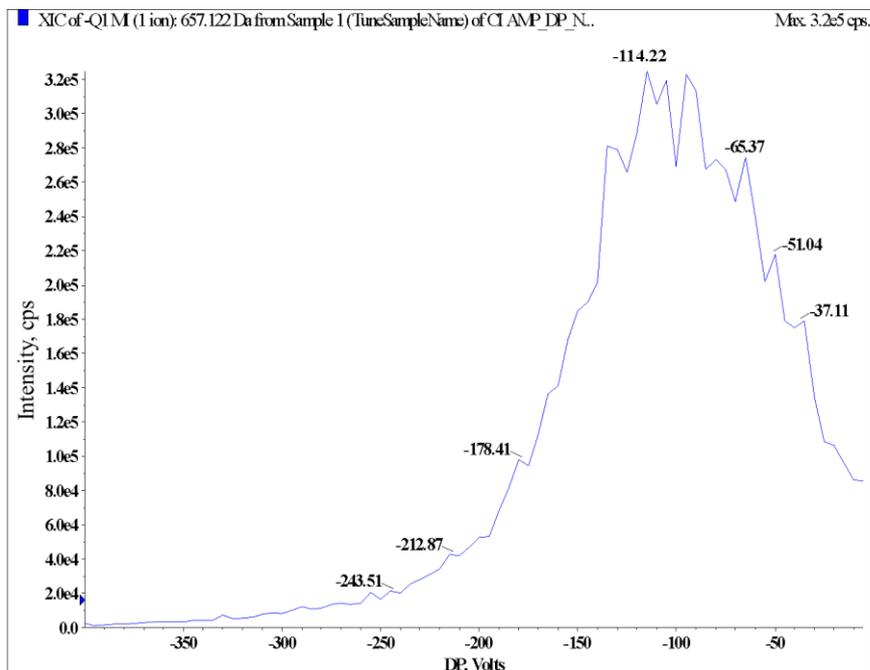


Figura 11. Intensidad obtenida durante la aplicación de la rampa para optimizar el potencial de focalización (DP).

Se procedió a la fragmentación de la molécula en la celda de colisión utilizando una rampa con un potencial de voltaje que osciló entre -130 y -5 voltios. Tras los resultados obtenidos con el valor de -52 voltios para la energía de colisión, conjuntamente se identificaron los fragmentos con mayor intensidad y respuesta a la ionización, que fueron recogidos en el segundo detector del espectrómetro de masas. Los tres fragmentos mayoritarios obtenidos en orden de más intensidad fueron los siguientes m/z 134.0, 328.2 y 522.0 (figura 12).

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

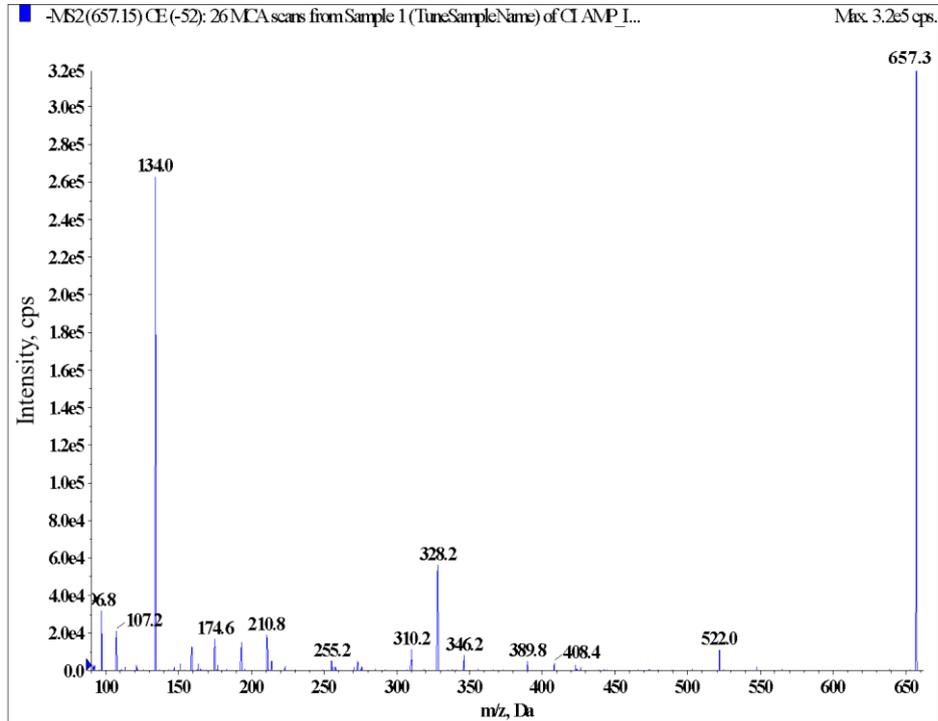


Figura 12. Espectro de fragmentación para el c-di-AMP utilizando una energía de colisión de -52 eV.

Para los tres fragmentos obtenidos con mayor intensidad se utilizaron distintas energías de colisión, ya que durante la creación del método es posible usar distintos valores de fragmentación. Para el fragmento m/z 134.1 se obtuvo la máxima intensidad y la máxima señal se produjo a una energía de colisión de -72 voltios y el fragmento m/z 328.1 fue el segundo más intenso y la energía de colisión que propició una mejor respuesta fue a un valor de -43 voltios. El tercer ion fragmentado más intenso fue el m/z 96.8, al poseer una masa inferior a 100 Da se considera un fragmento inespecífico, por lo que no será considerado a la hora de diseñar nuestro método (figura 13).

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

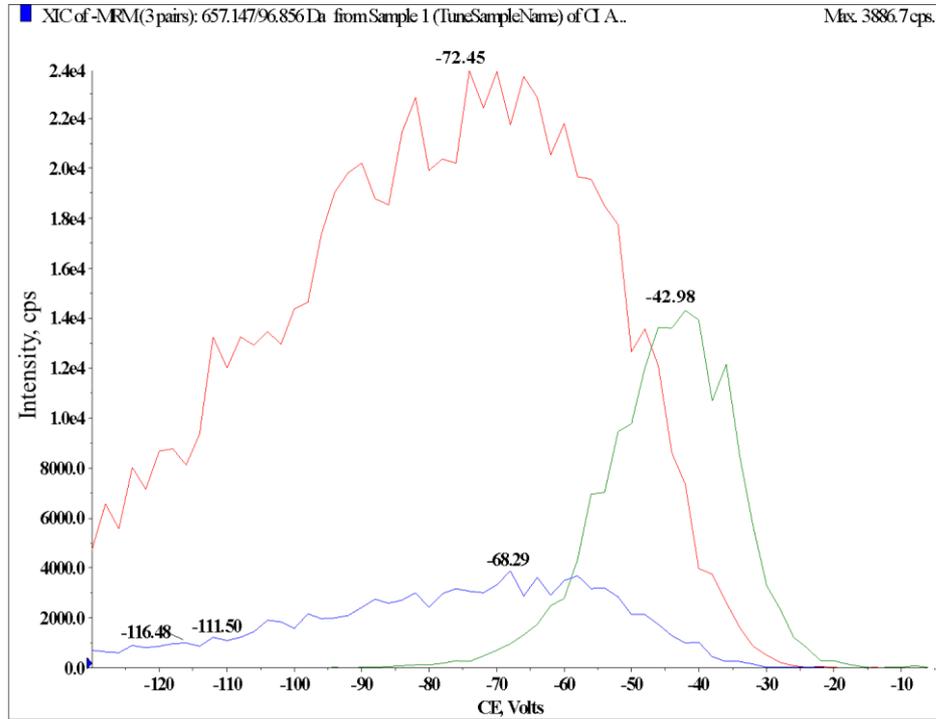


Figura 13. Intensidad obtenida para los tres fragmentos mayoritarios aplicando una rampa de energía de colisión de -130 a -5 voltios. La línea de color rojo representa al ion m/z 134.1, la línea de color verde representa el ion m/z 328.1 y la línea de color azul representa el ion m/z 96.8.

Para los dos fragmentos m/z 134.1 y 328.1 se optimizó el potencial que se aplica a la salida de la celda de colisión (CXP), conocido como la diferencia de potencial entre la celda de colisión y Q3 donde se encuentra el segundo detector del equipo. Se aplicó un rango de voltaje que iba desde -55 a -1 voltios para ambos iones. El valor que propició la mejor respuesta de ionización para el fragmento m/z 134.1 fue de -7 voltios y para el fragmento m/z 328.1 fue de -11 voltios (figura 14).

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

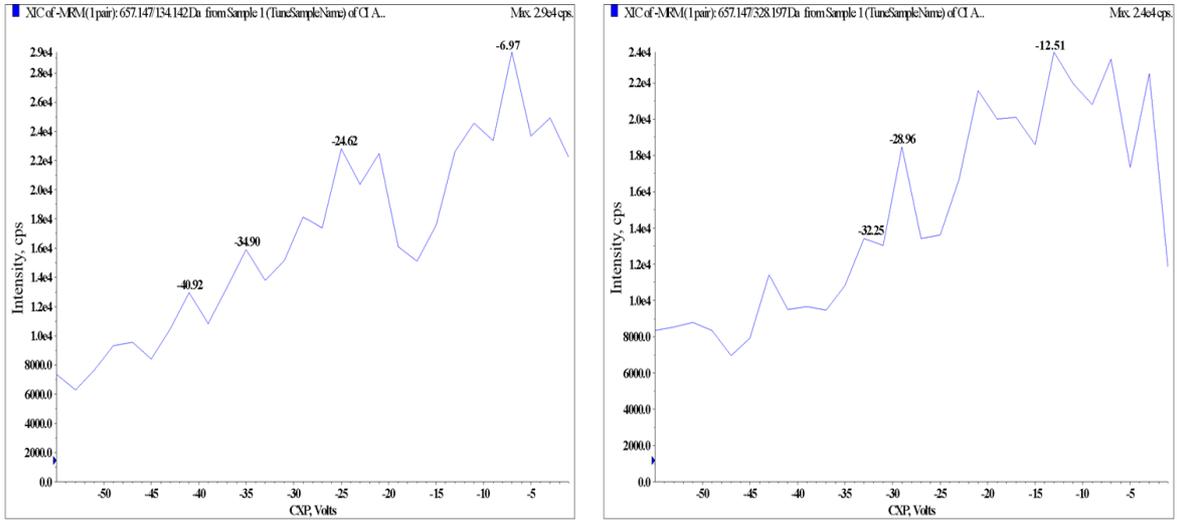


Figura 14. Respuestas de ionización de: A. CXP para el fragmento 134.1. B. CXP para el fragmento 328.2

Una vez optimizados los parámetros anteriores se seleccionaron los dos fragmentos mayoritarios para diseñar nuestro método con monitorización de las señales m/z 657.2/134.1 y 657.2/328.2. Los valores escogidos para el Gas 1 fueron de 50 psi y para el Gas 2 se usó el mismo valor de 50 psi, estos gases de Nitrógeno van ayudar a la evaporación de las gotas de spray que se han formado en las muestras en la fuente de ionización. El voltaje que se aplicó a la sonda de electroespray fue de -4500 voltios y la Temperatura de la fuente de ionización para ayudar a la evaporación 550°C. El gas cortina que se aplica para evitar la contaminación en el equipo fue de 20 psi. Por último, el gas de colisión, que se aplica en la celda de colisión fue igual a 4 psi.

En el desarrollo del método analítico utilizando la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, es necesario la utilización de un compuesto que presente unas propiedades físico-químicas similares a nuestra molécula problema. Se recomienda utilizar la misma molécula marcada con algún isótopo estable y cuando la adquisición de la misma presenta dificultad o un coste excesivo, se recurre a un compuesto con un comportamiento cromatográfico y una ionización parecida a la molécula que se desea cuantificar. En este caso se seleccionó el di-GMP cíclico, como estándar interno, por su similitud con las propiedades físico-químicas de la molécula a analizar, y así utilizarlo para poder corregir las oscilaciones producidas en las señales durante el análisis. Además de esto, se podría aprovechar la metodología por CL/EM puesta a punto para llevar a cabo análisis en los que fuera necesaria la cuantificación de esta

molécula. La infusión para la optimización de la molécula fue llevada a cabo como previamente se ha descrito. La sonda utilizada fue igualmente, electrospray y el voltaje, en modo negativo. La relación de señal carga/masa obtenida para el di-GMP cíclico fue de 680.2 (figura 15).

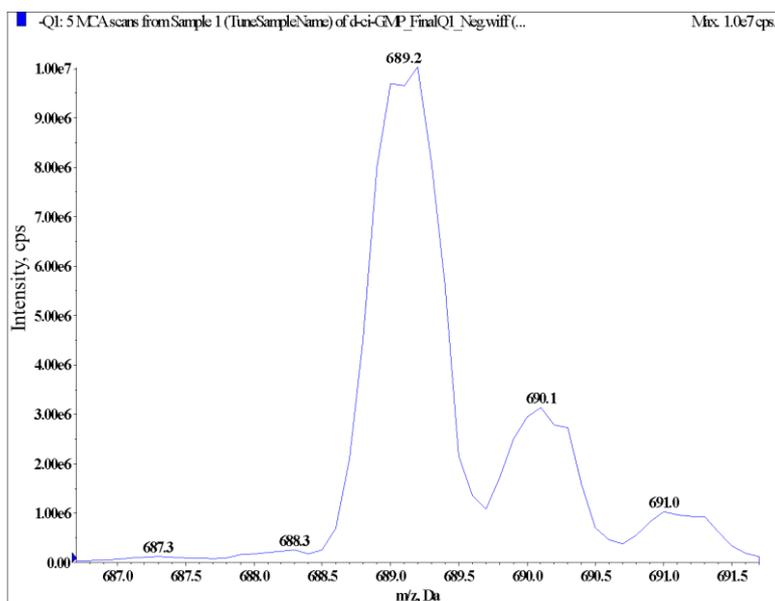


Figura 15. Espectro de masas obtenido para el c-di-GMP con una relación de m/z: 680.2

Se optimizaron los parámetros relacionados con la fuente de ionización para favorecer a la obtención de la máxima señal de la molécula que se quiere detectar. Al igual que con el d-c-AMP, el primer parámetro evaluado fue el potencial de focalización, para esto se aplicó una rampa con potenciales que van de -400 a 5 voltios, y se escogió el valor que nos proporcionó la máxima señal para el di-GMP cíclico (figura 16).

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

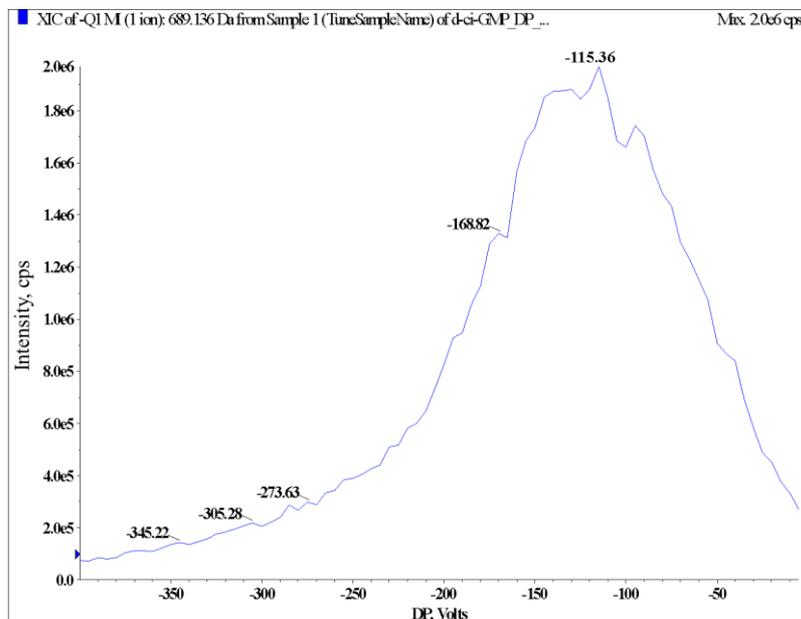


Figura 16. Intensidad obtenida para los distintos valores utilizados en la rampa de potencial de focalización (DP).

El valor óptimo de DP para la señal de di-GMP cíclico es -115 voltios. Una vez obtenido el valor de DP, se realizó la fragmentación de la molécula en la celda de colisión utilizando un valor de -52 voltios, donde se identificaron los fragmentos que mayor respuesta a la ionización produjeron en el segundo detector del espectrómetro de masas. Los tres fragmentos mayoritarios obtenidos en orden de máxima intensidad son el m/z 150.0, 344.0 y 133.2 (figura 17).

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

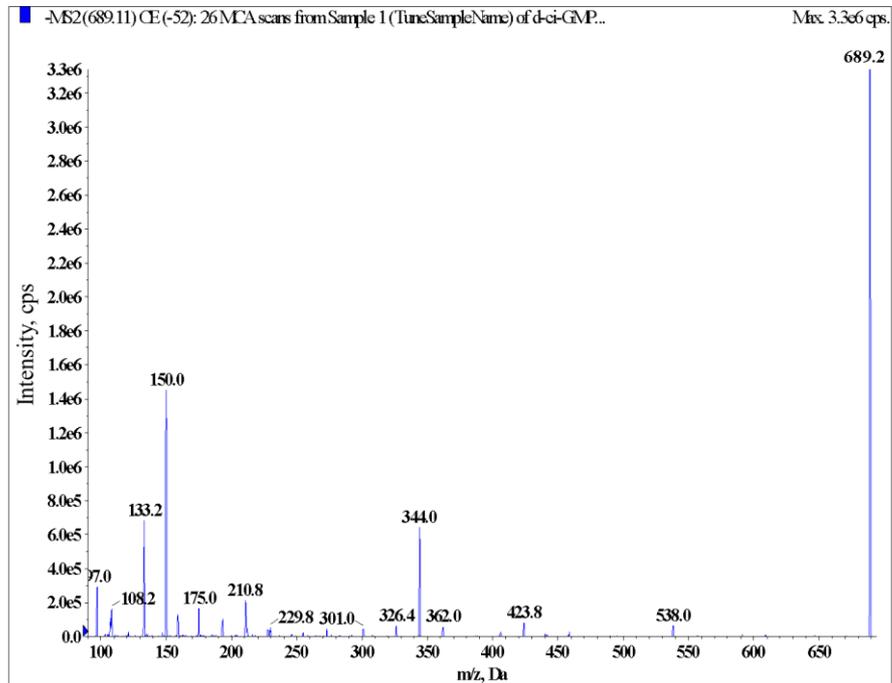


Figura 17. Espectro de fragmentación para el d-ci-GMP utilizando una energía de -52 eV.

Se aplicó una rampa de energía de colisión en un rango de -130 a -5 voltios, para poder seleccionar la energía de colisión que nos proporcionara la mayor señal de los iones obtenidos tras la fragmentación. Para el fragmento m/z 133.2, la máxima señal obtenida fue para una energía de colisión de -100 voltios y para el fragmento m/z 150.0 la energía de colisión que proporcionó una mejor respuesta fue para un valor de -67 voltios. El tercer ion fragmentado m/z 344.0 presentó la máxima señal cuando se le aplicó una energía de colisión de -46 V (figura 18).

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

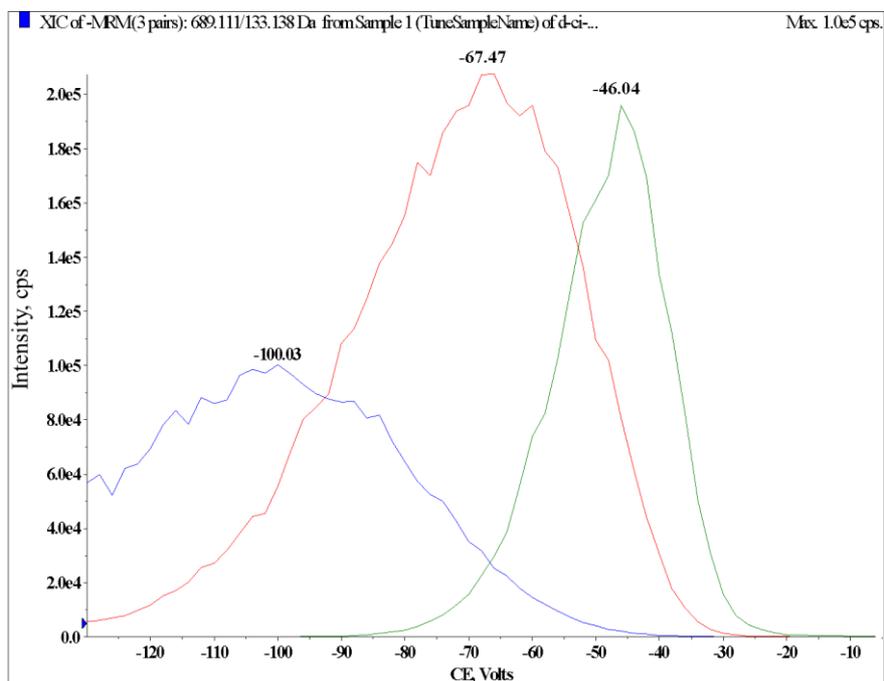


Figura 18. Intensidad obtenida para los tres fragmentos mayoritarios aplicando una rampa de energía de colisión de -130 a -5 voltios. La línea de color rojo representa al ion m/z 150.0, la línea de color verde representa el ion m/z 344.0 y la línea de color azul representa el ion m/z 133.2.

Para los dos fragmentos m/z 155.0 y 344.0 fue optimizado el valor para CXP. El valor que propició la mejor respuesta de ionización para el fragmento m/z 155.0 fue de -7 voltios y para el fragmento m/z 344.0 fue de -9 voltios (figura 19).

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

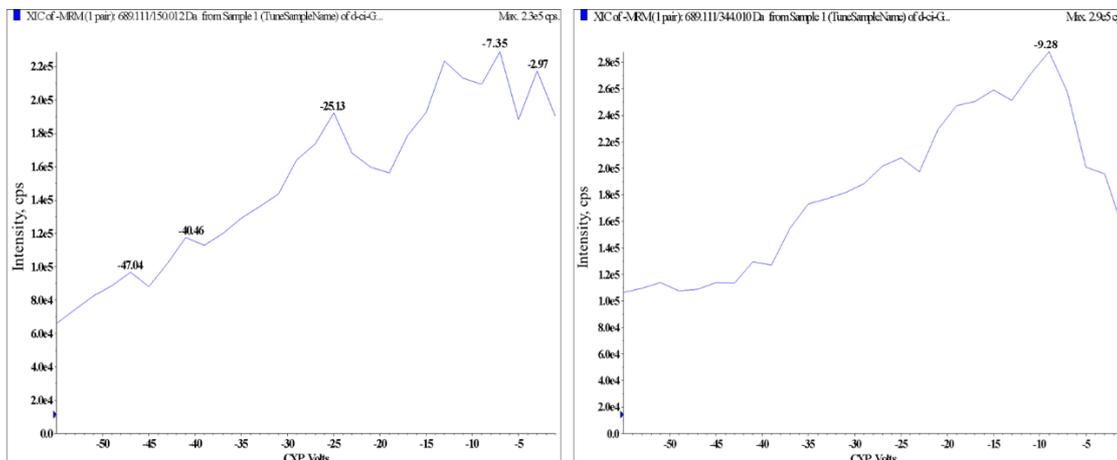


Figura 19. Respuestas de ionización de: A. CXP para el fragmento 155.0. B. CXP para el fragmento 328.2

Una vez optimizados los parámetros anteriores se seleccionaron los dos fragmentos mayoritarios para diseñar nuestro método con monitorización de las señales m/z 680.1/155.0 y 680.1/344.0. El resto de parámetros relacionados con la optimización en la fuente de ionización presentaban los mismos valores descritos para el método de cuantificación de la molécula c-di-AMP.

4. RESULTADOS

A continuación, se detallan los resultados de los diferentes análisis de metabolómica no dirigida.

4.1 Cromatografía en fase reversa y modo de ionización electroespray positivo

La matriz proveniente de *Markerview* tras la evaluación de las señales con interés biológico contenía 214 variables con la intensidad obtenida durante el análisis. La matriz fue procesada con la herramienta pública *Metaboanalyst*, donde se procedió a la normalización previa a la aplicación del análisis estadístico. Se utilizó el test multivariable de análisis de componentes principales para poder observar si las distintas variables en cada grupo producían una clara separación entre las cepas que queríamos diferenciar a partir de nuestro análisis metabolómico y, así, además a partir de esta representación poder detectar los posibles *outliers*. El análisis por componentes principales (figura 20) de las variables seleccionadas presentó claramente una agrupación de las réplicas biológicas de nuestras cepas, no se detectaron además *outliers* en ninguno de los grupos. La utilización de solo dos ejes explicaba en un 90,7% la separación de las cepas por la presencia de las 214 variables seleccionadas.

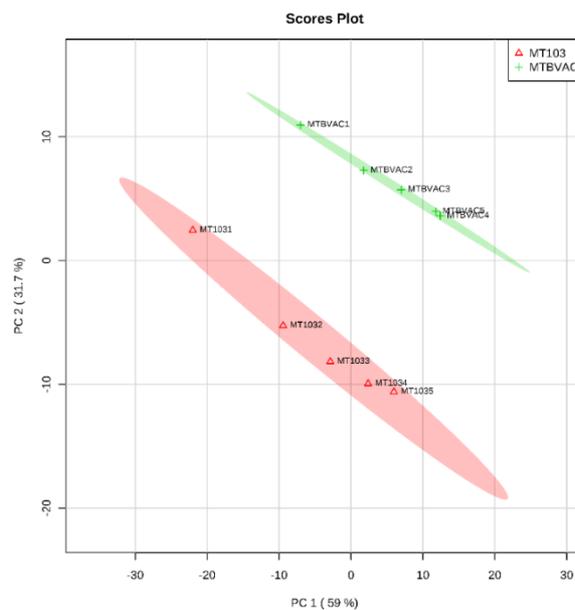


Figura 20. Análisis de componentes principales para la matriz en el análisis de cromatografía reversa y modo de ionización positivo, los triángulos rojos representan cada una de las cepas de MTBVAC y las cruces verdes cada una de las cepas de MT103.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

Posteriormente a este paso, se aplicó el test t de Student para seleccionar las variables que podían considerarse significativas considerando un p. valor < 0.05 usando para ello un factor de corrección de Benjamini Holchber. Para elegir los metabolitos considerados con diferente expresión se tuvo en cuenta una diferencia de más de dos veces entre los metabolitos de las distintas cepas. Tras aplicar ambos test se obtuvieron 38 metabolitos diferenciales.

Una vez hecha la selección de los candidatos, se procedió a estudiar en detalle cada una de las cargas/masas escogidas con esos criterios. Para ello lo primero que realizamos, fue revisar los espectros obtenidos uno a uno, para ver el valor de carga presentaban, evaluar qué iones podían haber sido seleccionados más de una vez, por presentar aductos distintos durante el análisis, y evaluar la calidad de los espectros de masas y picos cromatográficos obtenidos. De esos metabolitos se descartaron 14, hecho que se debió principalmente a que presentaban un espectro de masas muy pobre, asociado a un pico cromatográfico con una intensidad demasiado baja para ser fiable las medidas comparativas de áreas entre las muestras incluidas en el análisis. Consecuentemente, quedaron 24 metabolitos que se muestran en la tabla. Aunque hay que destacar que en la tabla 7 aparecen dos m/z que corresponden al mismo metabolito, se han marcado en rojo las dos formas ionizadas que se comentan. Finalmente se redujo la lista de metabolitos después de identificar cómo el mismo metabolito al m/ 723.4224 cogiendo dos cargas positivas que en un caso parece tratarse de dos protones y en el caso de m/z 745.4352 de dos átomos de sodio, realizada la comparación de tiempos de retención, espectros de fragmentación, error de masas y diferencias de datos de área entre los grupos, se concluyó a partir de la información obtenida que se trata del mismo metabolito, por lo que finalmente la selección de metabolitos quedaría reducida a 23.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

Tabla 7. Variables seleccionadas en el análisis por cromatografía reversa y modo de ionización positivo teniendo en cuenta el p. valor y las veces de cambio.

Masa/carga	P. valor	FDR	Veces de cambio
413.2247	4.77E-04	8.18E-03	12.848
457.2518	3.71E-04	8.18E-03	13.908
479.2650	6.89E-04	8.28E-03	11.554
501.2777	1.37E-03	1.28E-02	8.681
540.3535	7.18E-03	4.40E-02	0.352
635.3707	4.73E-03	2.98E-02	0.252
676.3404	4.06E-03	2.64E-02	8.458
679.4009	3.37E-03	2.26E-02	0.221
680.3686	3.32E-03	2.26E-02	8.937
720.3664	1.92E-03	1.65E-02	11.177
723.4224	2.50E-03	1.91E-02	0.193
724.3950	1.09E-03	1.17E-02	12.032
745.4352	3.39E-03	2.26E-02	0.213
764.3904	6.97E-04	8.28E-03	14.759
767.4498	1.38E-03	1.28E-02	0.158
768.4251	5.98E-04	8.18E-03	15.396
769.3460	5.22E-04	8.18E-03	21.816
774.4357	7.74E-03	4.46E-02	0.272
825.6275	2.00E-04	8.18E-03	0.099
846.6026	5.33E-04	8.18E-03	0.060
847.6066	5.11E-04	8.18E-03	0.087
852.4388	1.67E-04	8.18E-03	25.323
861.6205	5.70E-04	8.18E-03	0.101
863.5814	1.30E-03	1.28E-02	0.123

A su vez se han encontrado otros metabolitos que se repiten en los análisis de otros tipos, por los que han sido eliminados posteriormente de las listas de metabolitos seleccionados como diferenciales.

Para llevar a cabo la identificación de las moléculas fueron revisados todos los espectros de cada una de las masas/cargas encontradas durante nuestro análisis, además de examinar la integración de todos los picos cromatográficos obtenidos. Es necesario conocer la carga de los metabolitos a fin de poder asignar una identificación correcta. En este análisis encontramos un número alto de moléculas que presentaban una carga doble, nueve de los 23 metabolitos, por lo que tenían un peso molecular alto que dificulta la identificación debido al gran número de

fórmulas moleculares que pueden asociarse a la m/z con un error de masas por debajo de cinco ppm.

En la figura 21 aparece un cromatograma representativo de una de las cepas de cada grupo, donde pueden verse diferentes intensidades en diversas zonas. En la muestra de MT103 aparece una zona de señales aumentadas entre los minutos cuatro y seis. Por el contrario, puede observarse una mayor intensidad en la zona final del cromatograma correspondiente a la cepa vacuna donde estarían los compuestos más apolares, algunos de los cuales han podido ser identificados en diferentes niveles de clasificación.

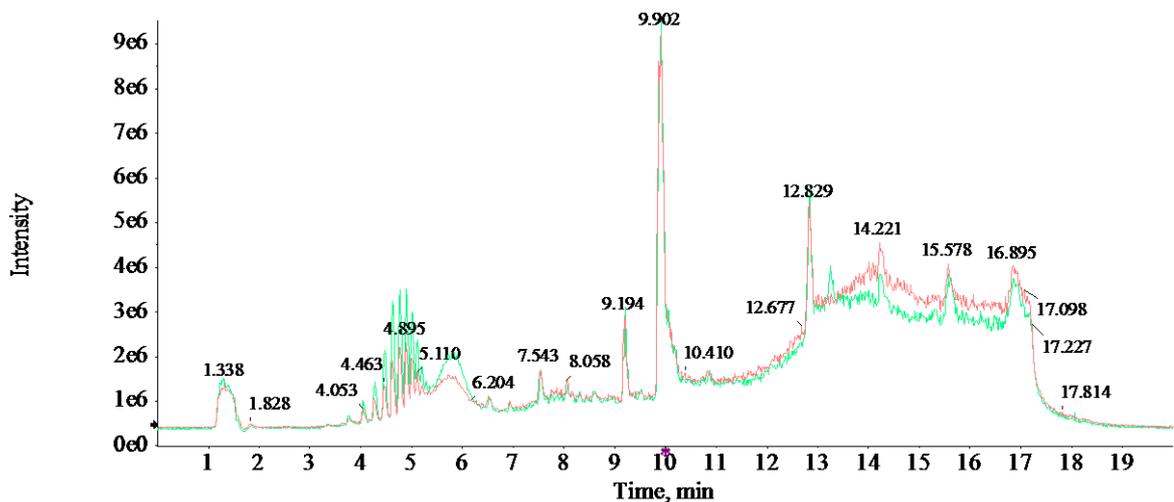


Figura 21. Corriente total de iones de las dos cepas. La línea verde corresponde a una muestra de MT103 y la línea roja a una muestra de MTBVAC.

Se revisaron todas las señales en detalle para las moléculas seleccionadas como diferenciales, con el objetivo de intentar identificar el máximo posible de metabolitos.

Se procedió a asignar una fórmula molecular para todos ellos, y a la consulta de distintas bases de datos. La molécula con m/z 540.3535 fue identificada con la fórmula $C_{30}H_{45}N_5O_4$ con un error de masas de -0.8 ppm. Gracias al estudio llevado a cabo por Lau y colaboradores⁶⁹ se pudo acceder al espectro de fragmentación de la molécula 1- tuberculosiniladenosina, y por la comparación de los espectros de fragmentación fue factible confirmar la identidad de esta molécula encontrada como diferencial a un tiempo de retención de 8-56 minutos.

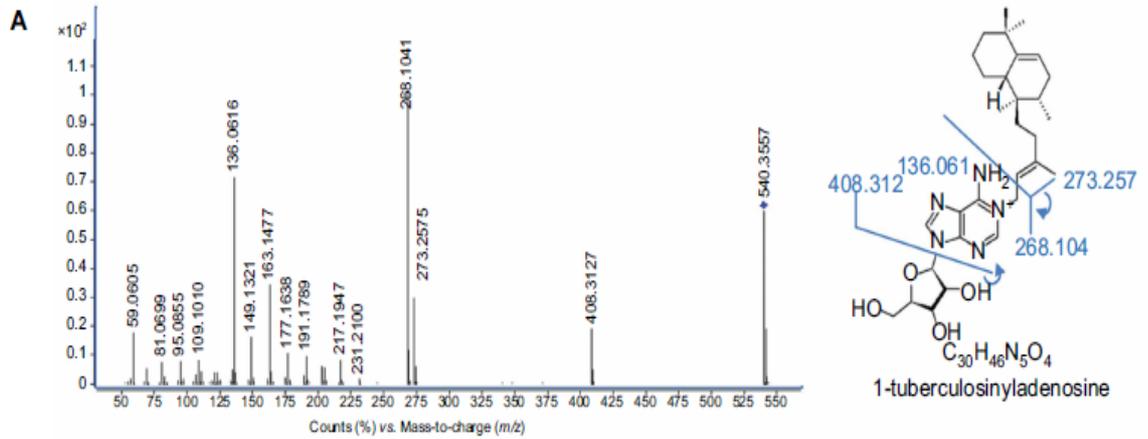


Figura 22. Espectro de fragmentación de 1-tuberculosinyladenosine de Lau y colaboradores 2018. Eje x: m/z; eje y: Intensidad (%).

El espectro de fragmentación obtenido durante el análisis es mostrado en la figura 23. Puede verse la similitud con el espectro obtenido por el grupo de Lau, en la presencia de los principales fragmentos como en relación de sus intensidades, aportando, de este modo, esa información una alta probabilidad para la asignación correcta de esa estructura correspondiente con la m/z 540.3535.

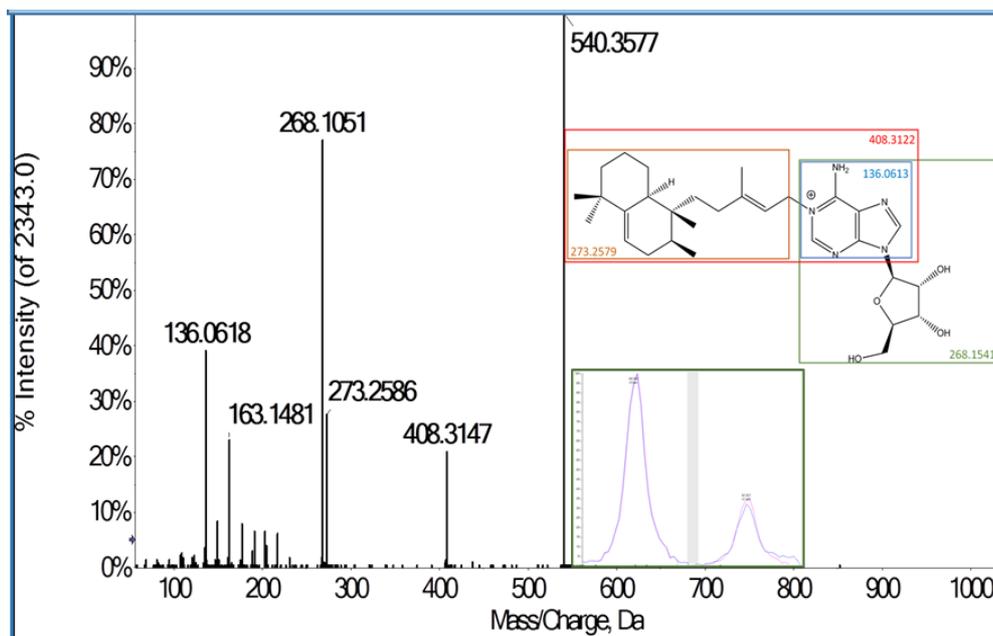


Figura 23. Espectro de fragmentación obtenido para 1-tuberculosiniladenosina. Interpretación de los fragmentos mayoritarios de la estructura.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

En este análisis la molécula identificada como candidato más fiable fue la 1-tuberculosisiladenosina, en el nivel dos de la clasificación de Schymanzsky.⁶⁵ En los demás casos fue muy difícil asignar una identidad. En muchos casos el problema fue la no obtención de fragmentos de la molécula parental, a lo que se le suma que casi la mitad de las moléculas presentaban una carga doble con una masa atómica considerable que proporciona muchas posibilidades de asignación molecular, de ahí que resulte difícil asignar la fórmula molecular exacta.

La identificación del resto de metabolitos a partir de los espectros obtenidos se llevó a cabo siguiendo los mismos pasos anteriores. Para la m/z 863.5805, la asignación de una fórmula molecular utilizando la herramienta *Formula finder* nos proporcionó la fórmula $C_{49}H_{87}O_{12}P$ con un error de masas de -0.6 ppm. El espectro de fragmentación (figura 24) no aportó mucha información sobre la estructura de la molécula porque solamente se obtuvo un fragmento, que correspondía a 847.6049. En relación al tiempo de retención obtenido de 13.27 minutos y por la consulta de la base de datos de *Metlin* podríamos hacer una identificación tentativa como estructura lipídica, clasificada dentro de los fosfolípidos, y perteneciente al grupo fosfatidilinositol. Este fosfolípido presentaría dos cadenas de ácidos grasos con cinco enlaces dobles y una estructura con la siguiente composición FI ($R_1CO_2H+R_2CO_2H=40:5$).

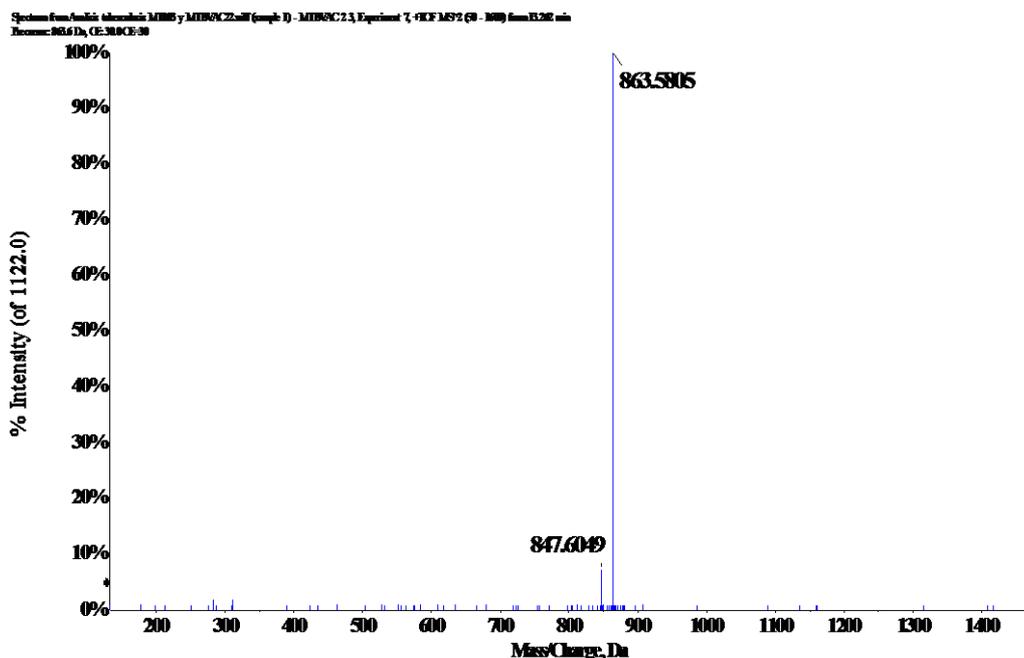


Figura 24. Espectro de fragmentación del metabolito con m/z de 863.5805 obtenido a una EC de 30 voltios.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

A partir de la información adquirida no podemos concluir específicamente de que tipo de FI se trata, ya que con esa fórmula molecular habría varias posibilidades en cuanto a longitud de las cadenas ácidos grasos y número de enlaces dobles en cada una de ellas. La forma ionizada de la molécula se obtuvo por la pérdida de dos moléculas de agua y la adición de un protón.

En relación al metabolito obtenido con una señal m/z de 861.6202, la asignación de la fórmula molecular con un error de masas de -0.8 ppm utilizando *Formula Finder*, nos indicó como fórmula molecular más probable $C_{47}H_{91}O_{12}P$, que de acuerdo con la base de datos *Metlin* se correspondería a un fosfolípido de la familia de Fosfatidilinositol con la estructura FI(R1CO₂H+R2CO₂H=38:0), formada por dos cadenas de ácidos grasos saturadas. La molécula fue detectado en este caso por la forma ionizada a partir de la pérdida de una molécula de agua y la adquisición de un protón. El espectro de fragmentación (figura 25), al igual que en el caso anterior, no muestra información complementaria para reforzar la asignación de la identificación. El tiempo de retención de 13.8 minutos podría corresponderse con el tiempo esperado para una moléculas con estas características.

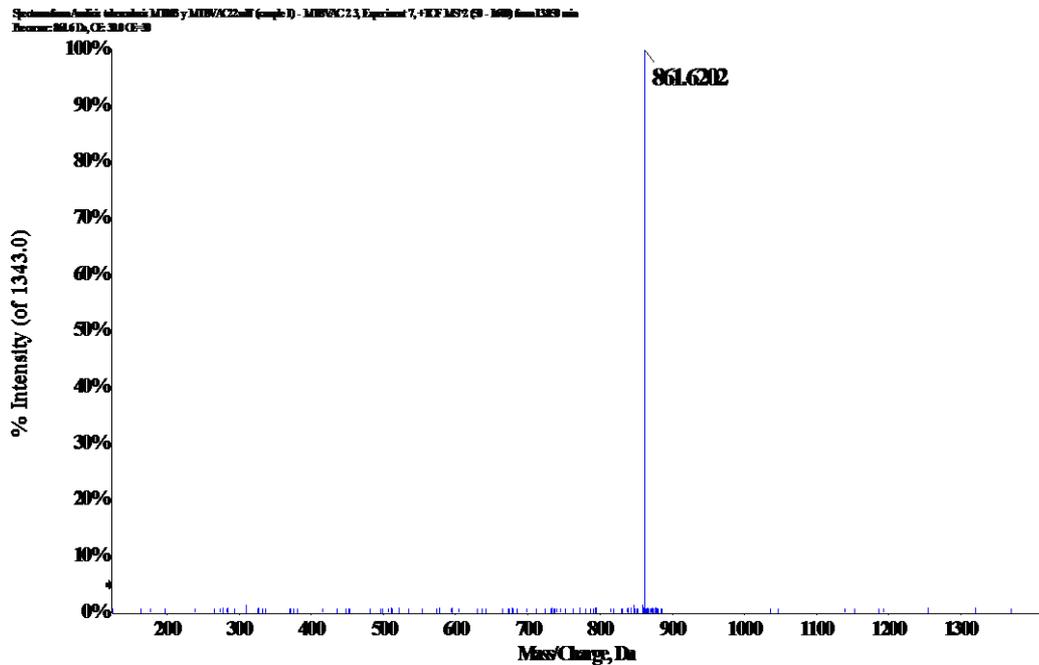


Figura 25. Espectro de fragmentación del metabolito con m/z de 861.6202 obtenido a una EC de 30 V.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

Para el metabolito con m/z de 847.6066, igualmente se le asignó la fórmula $C_{46}H_{89}O_{12}P$ con un error de masas de -0.1 ppm y se identificó con un fosfolípido de la familia de los fosfatidilinositoles. La forma ionizada se obtuvo por pérdida de una molécula de agua y adquisición de un protón. A la vista del espectro de fragmentación (figura 26), no pudimos aportar más información sobre la estructura. Sin embargo, si consideramos el tiempo de retención de 13.25 minutos, la identificación del metabolito diferencial con un posible fosfolípido estaría más respaldada. La estructura más probable que proponemos es FI(R1CO₂H+R2CO₂H=37:0).

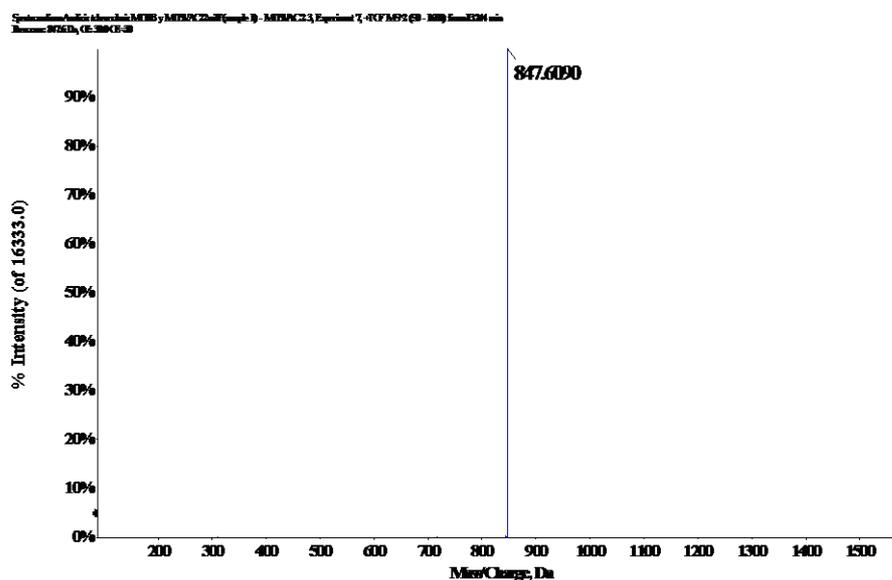


Figura 26. Espectro de fragmentación del metabolito con m/z de 847.6090 a una EC de 30 voltios.

Para la m/z de 846.5986 obtenida a un tiempo de retención de 12.04 minutos le fue asignada la fórmula $C_{49}H_{84}NO_8P$ con un error de masas de dos ppm y como posible estructura un fosfolípido de la familia fosfatidiletanolamina. A la vista del espectro de fragmentación (figura 27) no podemos conocer más sobre la identidad de la molécula, de modo que la estructura estaría representada como FE(R1CO₂H+R2CO₂H=42:7), constituida por dos cadenas de ácidos grasos que en total presentarían siete enlaces dobles. Los fragmentos en el espectro que aparece en la figura, no alcanzaron la suficiente intensidad para poder ser bien detectados.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

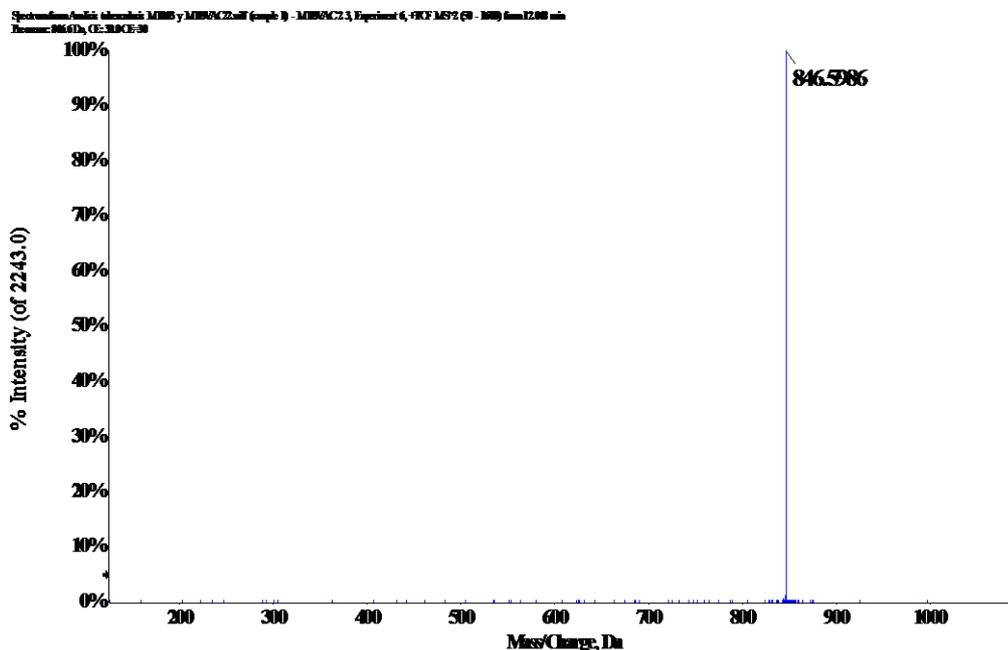


Figura 27. Espectro de fragmentación del metabolito con m/z de 846.5986 obtenido a una EC de 30 V.

El último metabolito diferencial al que se le pudo asignar una identidad fue el obtenido para una m/z de 413.2247, con el espectro de fragmentación que aparece en la figura 28. La molécula presenta carga doble y aparece en un tiempo de retención del cromatograma en una zona intermedia en el minuto 5.50. Se asignó a la molécula la fórmula $C_{39}H_{47}O_{11}P_2$ con un error de masas de 0.8 ppm. Según la base de datos Metlin se trata de un fosfolípido: dioleoil glicerol pirofosfato (DGPF) (18:1(9Z))/18:1((9Z)) que contenía dos grupos fosfato. En este caso se obtuvo la señal de la molécula ionizada a partir de la unión de dos cargas a su estructura, que en este caso se trataba de una ionización por la captura de 2 átomos de sodio. No se pudo obtener un espectro de fragmentación experimental de la molécula identificada de modo tentativo, por lo que no fue posible aportar mas información para confirmar la estructura del metabolito.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

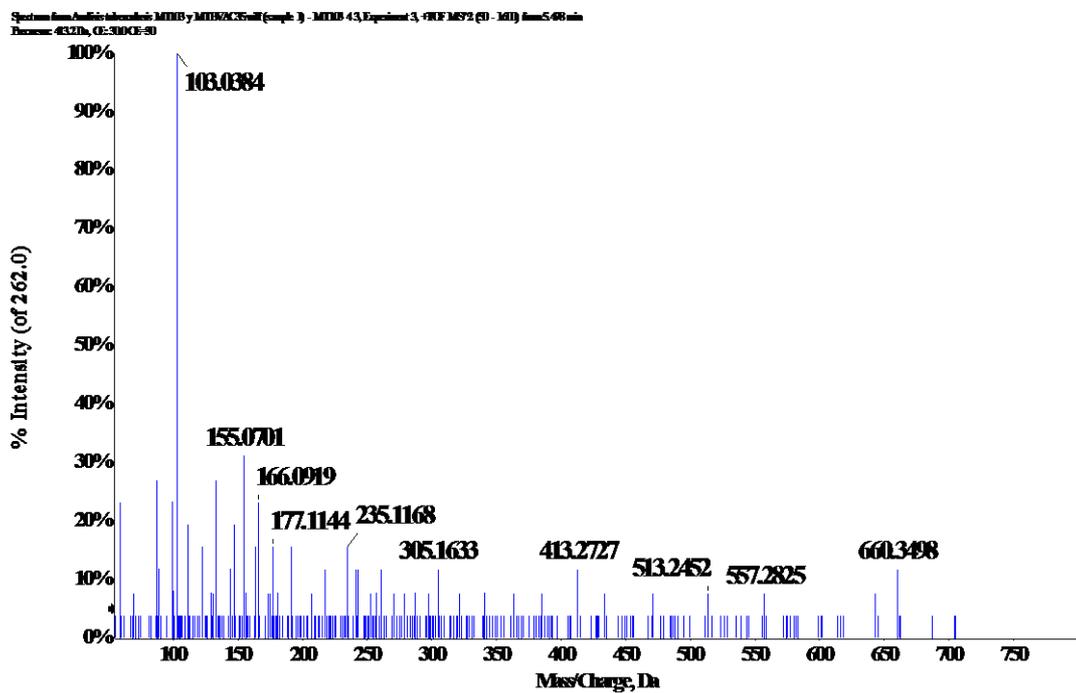


Figura 28. Espectro de fragmentación del metabolito con m/z de 413.2247 obtenido a un EC de -30 V.

4.2 Cromatografía en fase reversa y modo de ionización electrospray negativo

La matriz de datos procesada utilizando *Markerview*, tras realizar todo el filtrado, contenía 267 variables. La matriz fue procesada utilizando la herramienta pública *Metaboanalyst* donde se procedió a la normalización y a la transformación de nuestros datos, como en el apartado anterior, que fue verificada visualmente por la representación de los mismos en una distribución Gaussiana. Igualmente, la matriz obtenida fue procesada utilizando el análisis de componentes principales (figura 29).

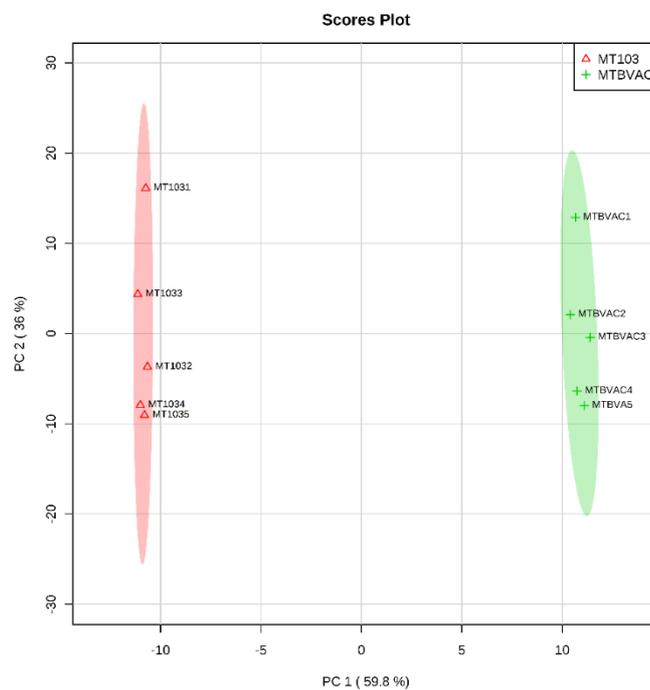


Figura 29. Análisis de componentes principales para la matriz en el análisis de cromatografía reversa y modo de ionización negativo. Los triángulos rojos representan cada una de las cepas de MTBVAC y las cruces verdes cada una de las cepas de MT103.

El análisis por componentes principales de las variables seleccionadas mostró la diferenciación entre los dos grupos a partir de la matriz de 267 variables, además ninguna de las muestras, dentro de las réplicas biológicas fue considerada como un *outlier*. La utilización de solo dos ejes explicaba en un 95.8% la variabilidad del modelo.

Posteriormente a la normalización de la matriz de datos se aplicó el test t de Student para seleccionar las variables que podían evaluarse como significativas, considerando un p valor < 0.05 y una diferencia de dos veces o más entre los metabolitos de las distintas cepas. Tras aplicar ambos el test y teniendo en cuenta las diferencias entre las variables se obtuvieron 42 metabolitos

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

diferenciales que aparecen en la tabla 8. Aunque en un principio se seleccionaron 60, de los que se han eliminado 18 señales por mala calidad de los espectros.

Tabla 8. Variables seleccionadas en el análisis por cromatografía reversa y modo de ionización negativo teniendo en cuenta el p. valor y las veces de cambio.

Masa/carga	P. valor	FDR	Veces de cambio
421.0654	1.73E-06	7.82E-06	0.481
525.2192	3.76E-05	1.23E-04	3.077
529.2478	9.60E-07	4.66E-06	4.195
569.2419	6.90E-07	3.48E-06	3.776
573.2732	2.00E-07	1.24E-06	5.217
584.3440	2.21E-05	7.76E-05	0.286
613.2664	2.60E-07	1.58E-06	5.208
617.2596	4.51E-08	3.57E-07	7.122
652.3269	2.93E-05	9.92E-05	0.290
657.2932	4.26E-08	3.57E-07	6.811
661.2844	2.16E-08	2.13E-07	10.162
679.2782	4.01E-08	3.57E-07	6.647
702.3238	3.81E-08	3.57E-07	9.624
705.3521	7.87E-09	1.31E-07	12.238
723.3005	9.06E-09	1.38E-07	8.759
745.3493	5.73E-09	1.28E-07	12.664
789.3738	5.49E-09	1.28E-07	12.563
793.4011	2.15E-09	1.11E-07	14.250
805.5985	4.42E-06	1.74E-05	0.041
823.6067	8.14E-06	3.02E-05	0.017
823.6074	1.07E-08	1.38E-07	0.053
837.4302	9.96E-09	1.38E-07	11.752
839.6409	1.55E-08	1.66E-07	0.066
855.3825	2.38E-09	1.11E-07	13.712
881.4550	4.42E-08	3.57E-07	6.526
885.6111	3.83E-07	2.00E-06	0.143
899.4088	7.55E-09	1.31E-07	12.561
901.6047	1.72E-08	1.77E-07	0.046
905.0859	4.37E-06	1.74E-05	2.106
921.4509	1.15E-08	1.38E-07	11.323
925.6127	3.64E-07	1.94E-06	0.099
937.5952	1.88E-09	1.11E-07	0.054
965.4810	4.03E-08	3.57E-07	9.238
1009.4954	3.04E-06	1.27E-05	5.464
1013.5347	2.76E-06	1.21E-05	0.338

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

1057.5527	1.26E-06	5.88E-06	0.257
1233.6597	1.26E-07	8.83E-07	0.136
1247.6463	2.92E-05	9.92E-05	0.423
1277.6876	2.97E-07	1.73E-06	0.124
1291.6682	4.39E-06	1.74E-05	0.344
1423.7437	1.87E-07	1.19E-06	0.131
1437.7236	3.58E-05	1.18E-04	0.343

De las muestras seleccionadas se han marcado en rojo en la tabla, aquellas que aparecen repetidas en varios análisis. Se ha encontrado coincidencia en los análisis de reversa positiva y negativa para tres metabolitos m/z 723.3005, 805.5985 y 823.6067. Teniendo en cuenta la diferencia en el error de masas, los tiempos de retención, los espectros de fragmentación en los casos que ha sido posible y la variabilidad entre las cepas podemos concluir que esas masas/cargas representan al mismo metabolito, y no serían contadas como otras moléculas diferenciales dentro de este tipo de análisis. Finalmente, tras eliminar los metabolitos seleccionados en el análisis de cromatografía reversa y modo de ionización negativo el número diferencial de metabolitos sería finalmente de 39.

En el cromatograma que aparece en la figura 30 puede verse una muestra representativa para cada cepa. Destacan dos zonas con una mayor intensidad para la cepa MTBVAC: una entre el minuto 5.4 hasta el minuto seis y otra que iría entre el minuto 11 y 12. A su vez existen un par de señales muy concretas con una mayor intensidad en la cepa MT103, una correspondería con el minuto nueve y la otra con el minuto 13.8.

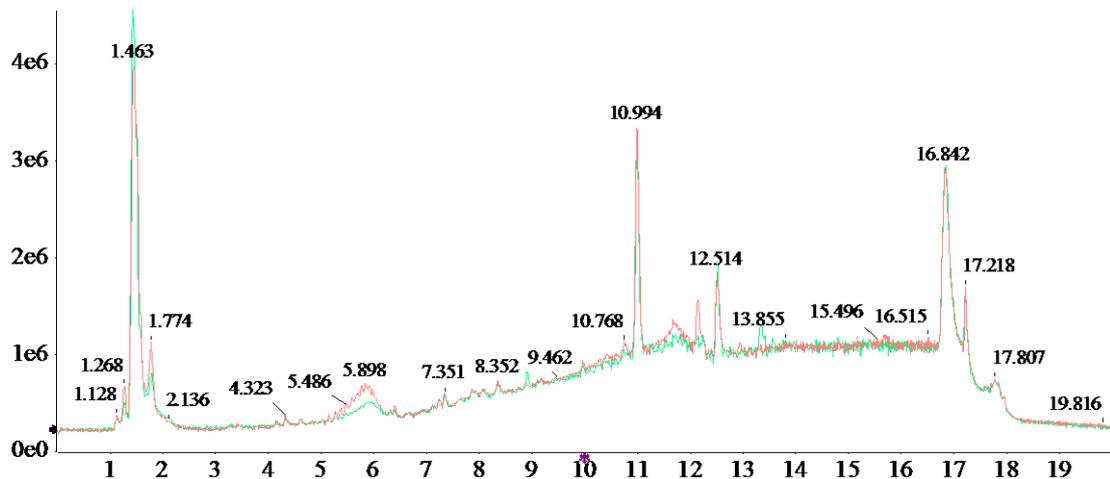


Figura 30. Corriente total de iones de las dos cepas. La línea verde corresponde a una muestra de MT103 y la línea roja a una muestra de MTBVAC.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

El metabolito m/z 421.0654 está aumentado en la cepa vacuna en casi tres veces más que en la cepa MT103. Con el espectro de fragmentación que aparece en la figura 31. Se le asignó la fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{14}S$ con un error de solo -0.1 ppm. Por su tiempo de retención mínimo en 1.51 minuto, sugería que se trataba de una molécula de naturaleza polar, probablemente de la 2-sulfo-trehalosa, componente muy importante en micobacterias para la formación de estructuras que forman parte de la membrana y que están involucradas directamente en la virulencia de algunas cepas.

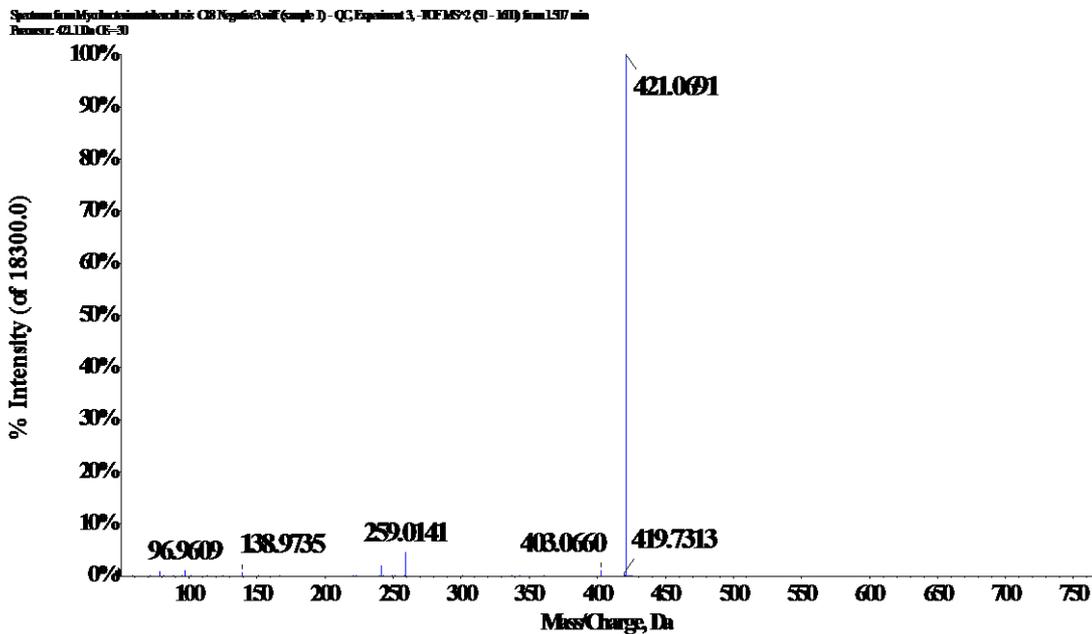


Figura 31. Espectro de fragmentación para el metabolito m/z 421.0654 a EC de -30 V.

Para el metabolito m/z 1013.5415 fue asignada la fórmula molecular $C_{47}H_{86}O_{16}P_2$ con un error de masas de -0.6 ppm. Este lípido podría clasificarse dentro de la subclase de los Glicero-fosfoinositol fosfato (FIF) y su estructura coincidiría según la base de datos Metlin con FIF(R1CO₂H+R2CO₂H=38:3). La asignación de esta estructura viene dada por la captura de una molécula de ácido fórmico y la pérdida de un protón en el proceso de ionización. El espectro de fragmentación se muestra en la figura 32; a destacar un fragmento de 983.4723 que a partir de la molécula parental podría representar la pérdida de un grupo C_2H_6 .

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

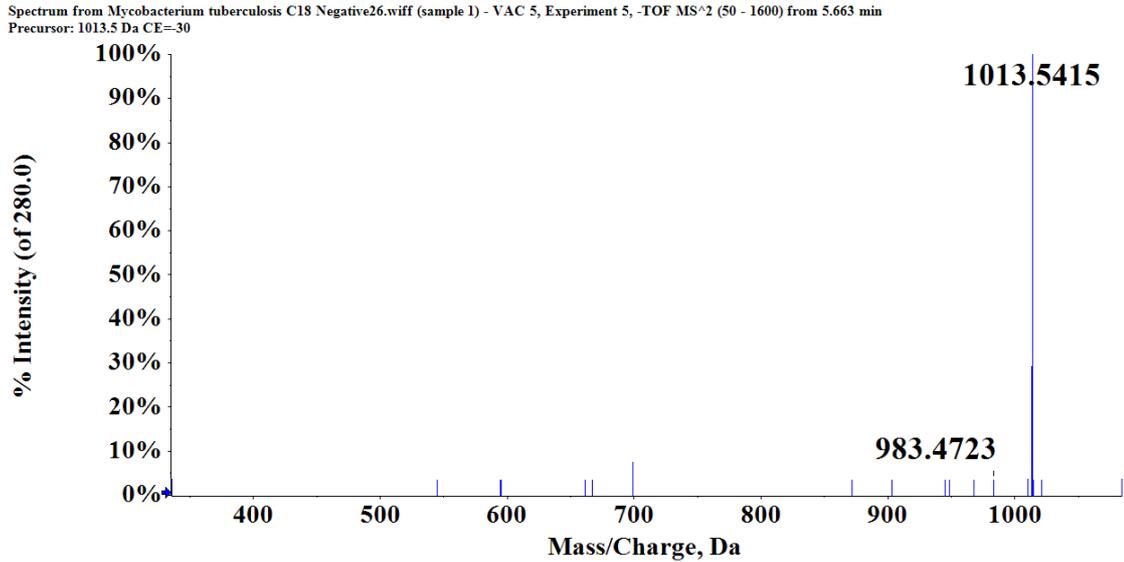


Figura 32. Espectro de fragmentación para m/z 1013.5415 a una EC de -30 V.

El metabolito con m/z 937.5952 que presenta dos fragmentos mayoritarios el 823.6149 y el 112.9854 (figura 33). Se ha obtenido una fórmula molecular de $C_{47}H_{89}O_{13}P$ con un error de masas de -3.0 ppm. A su vez consultando la base de datos Metlin se ha identificado como un fosfolípido, en este caso un FI, con la estructura $FI(R1CO_2H+R2CO_2H=40:2)$, formada por dos cadenas de ácidos grasos que contenían dos enlaces dobles. La forma ionizada detectada fue por la unión de una molécula de ácido fórmico y la pérdida de un protón. El tiempo de retención obtenido para este metabolito a 13.3 minutos, respaldaría la conducta no polar del compuesto.

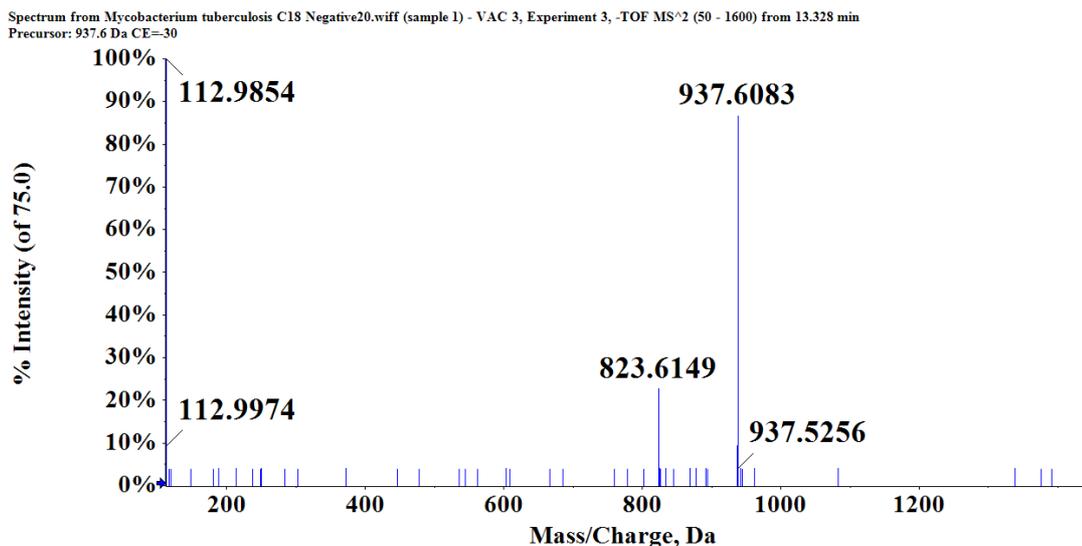


Figura 33. Espectro de fragmentación para m/z 937.5952 a una EC de -30 V.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

El metabolito con m/z 925.6127, una de las fórmulas que presentaba una buena relación isotópica, teórica y experimental, que coincidió con la fórmula $C_{51}H_{91}O_{12}P$ y un error de masa de 5.0 ppm. No se obtuvo el espectro de fragmentación, no hubo posibilidad de poder asumir con más fiabilidad la estructura e igualmente el tiempo de retención fue de 11.0 minutos, lo que indicaba que se trataba de una molécula no polar. La consulta en las bases de datos nos sugiere que podría tratarse de un fosfolípido de la familia FI, en cuyo caso estaría formando la estructura FI ($R1CO_2H+R2CO_2H=42:4$).

El siguiente metabolito con m/z 927.6280 apareció aumentado en la cepa atenuada y, le fue asignada la fórmula molecular $C_{51}H_{95}O_{13}P$, con un error de masas de 4.9 ppm. La molécula presentó un tiempo de retención de 13.3 minutos, lo que indicaba su naturaleza apolar. La consulta en Metlin nos proporcionó como posible estructura un fosfolípido de la familia FI, correspondiente a la estructura FI($R1CO_2H+R2CO_2H=44:2$). La forma ionizada de la molécula se correspondía con la pérdida de una molécula de agua y un protón. En la figura 34 puede verse su espectro de fragmentación.

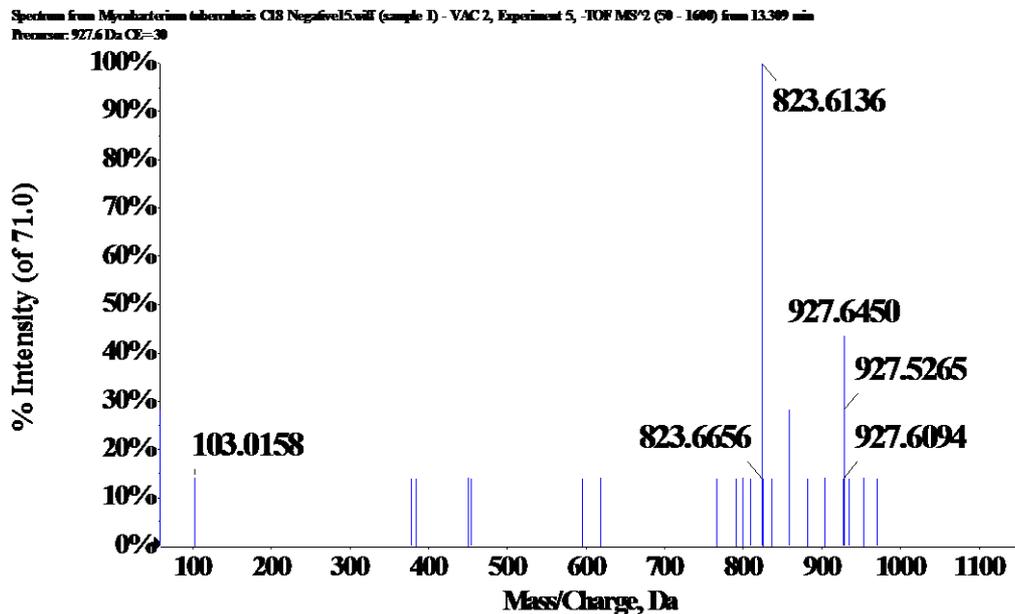


Figura 34. Espectro de fragmentación de m/z 927.6280 obtenido a una EC de -30 V.

Para el metabolito con m/z 839.6409 seleccionado como diferencial se asignó una fórmula molecular que correspondía a $C_{51}H_{86}O_6$ con un error de masas de 0.2 ppm. Se pudo asignar como identidad la de un lípido, en este caso un triglicérido. En la figura 35 puede verse su espectro de fragmentación, se obtuvieron dos fragmentos mayoritarios el 824.6193 y el 752.5381.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

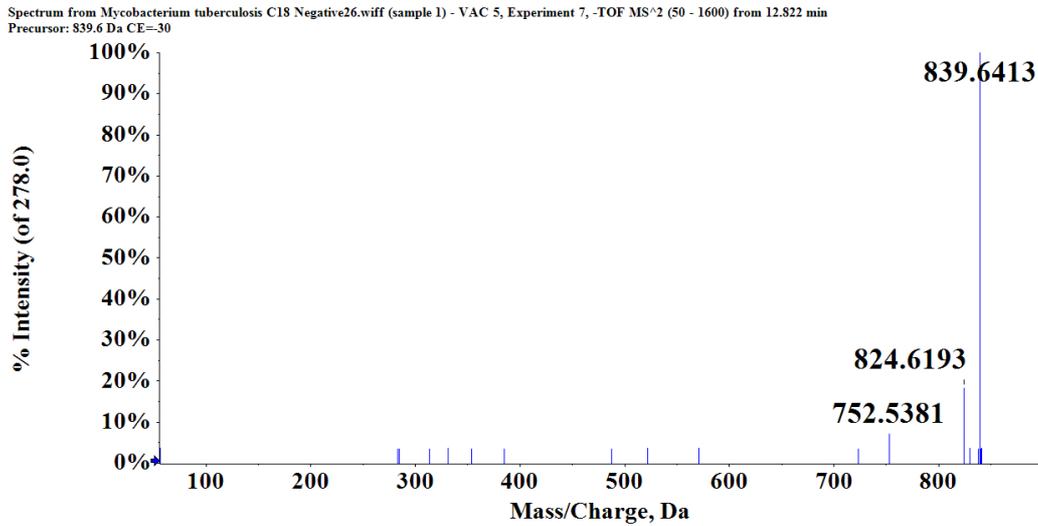


Figura 35. Espectro de fragmentación para m/z 839.6413 a una EC de -30 V.

La ionización de esta molécula fue a partir de la captura de una molécula de ácido fórmico y pérdida de un protón. Igual que en las ocasiones anteriores su tiempo de retención correspondía a 12.82 minutos, lo que indicaba que se trataba de una molécula apolar.

Del metabolito con la relación m/z 823.6112, se encontraron fragmentos en el espectro de masas/masas con una intensidad muy baja que no se pudieron detectar, si exceptuamos un fragmento que correspondía con la m/z de 125.9002 (figura 36) Se le asignó la fórmula molecular que correspondía a $C_{43}H_{87}O_9P$ con un error de masas de 0.3 ppm. Para esa formula la base de datos nos devolvió la identidad de un fosfolípido FG(R1CO₂H+R2CO₂H=37:0). La detección de la molécula ionizada fue con la adición de ácido fórmico y la pérdida de un protón. El tiempo de retención de 12.2 minutos coincidiría con el de una estructura de naturaleza apolar.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

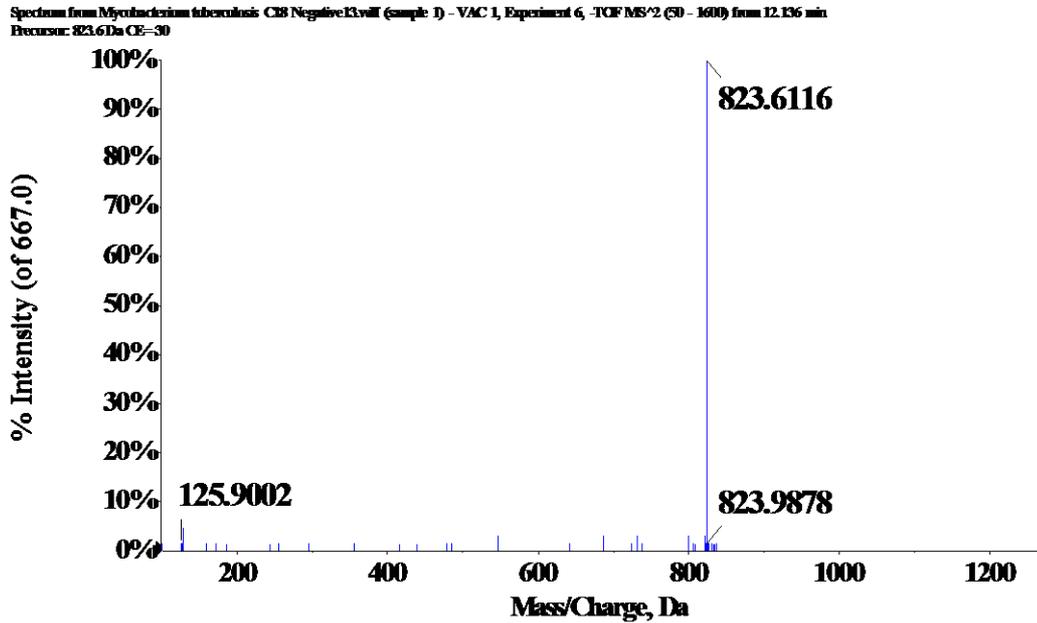


Figura 36. Espectro de fragmentación para la m/z 823.6067 a una EC de -30 V.

Para el metabolito m/z 805.5985 se le asignó la fórmula molecular $C_{44}H_{89}O_{10}P$, que presentaba un error de masas de dos ppm. Se le pudo asignar la identificación como un posible fosfolípido, en este caso, $FG(R1CO_2H+R2CO_2H=38:0)$. El espectro de fragmentación puede verse en la figura 37.

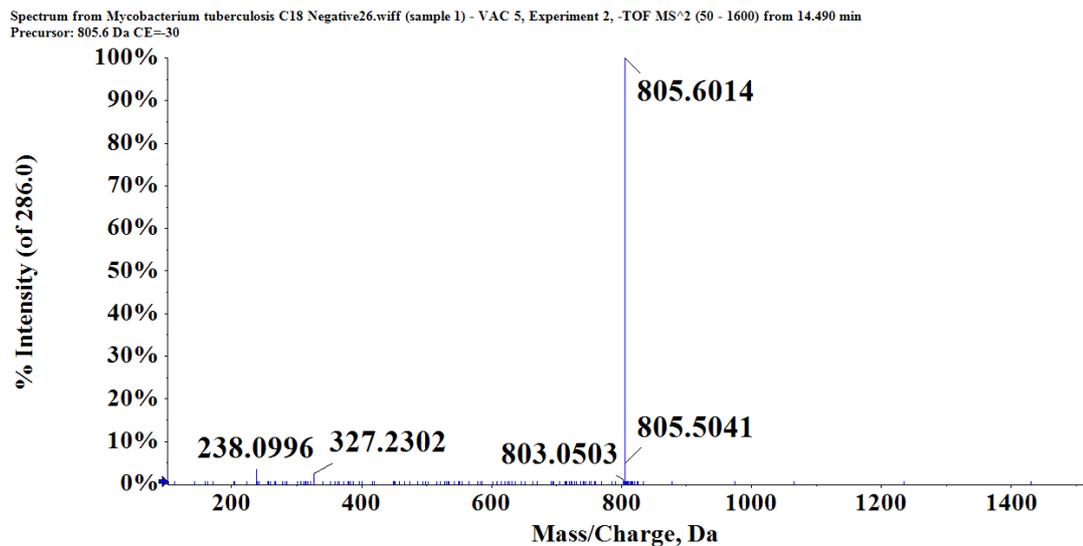


Figura 37. Espectro de fragmentación del metabolito m/z 805.6014 a una EC de -30 V.

El metabolito m/z 921.455 se encontró aumentado en la cepa MT103 con una diferencia de más de 11 veces. Le fue asignado como fórmula molecular $C_{47}H_{75}N_5O_{10}Fe$ con un error de masas

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

de 3.1 ppm. La búsqueda en las distintas bases no presentaba información en relación a esta fórmula, aunque finalmente consultando la base de datos creada por Sartain y colaboradores conocida como Mtb LipidDB⁴⁸, hallamos que para esa fórmula molecular había una posible identificación dentro de las moléculas conocidas como Micobactina, en cuyo caso correspondería a esta estructura Mbt +Fe (R=20:1). El tiempo de retención para la misma fue de 6.02 minutos, lo que indicaba una polaridad intermedia. En la figura 38 puede verse el espectro de fragmentación obtenido para nuestro metabolito diferencial.

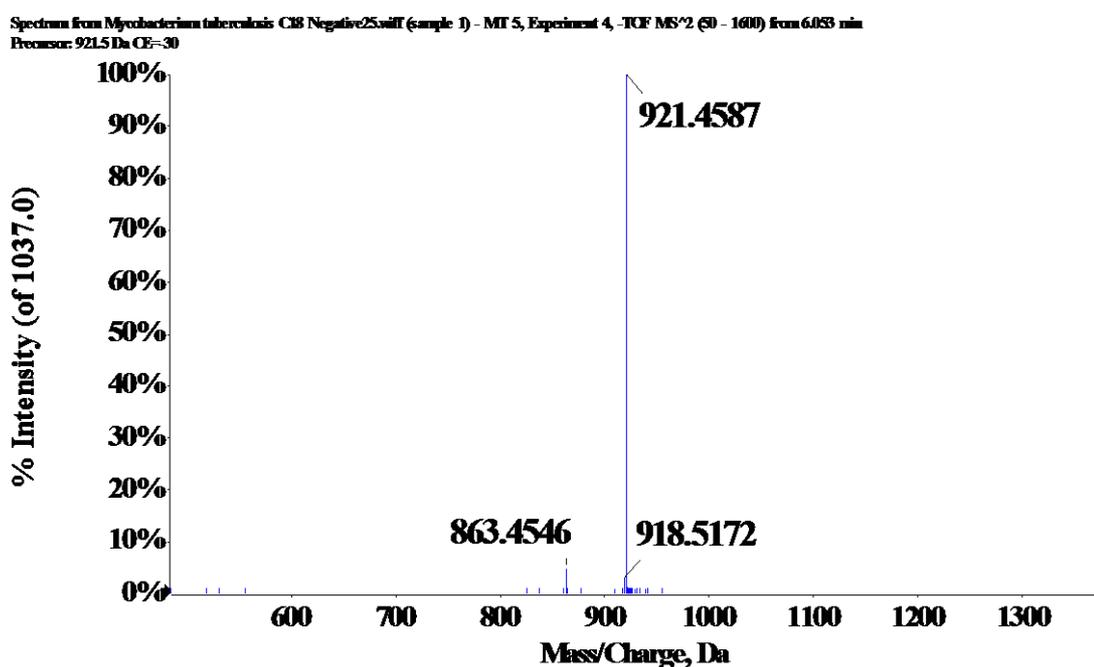


Figura 38. Espectro de fragmentación para el m/z 921.4509 a una EC de -30 V.

4.3. Cromatografía en modo HILIC y modo de ionización electrospray positivo

La matriz de datos filtrada utilizando *markerview* contenía 271 variables y se procesó utilizando la herramienta *Metaboanalyst*. Aquí se procedió a la normalización y análisis estadísticos. Igual que en los anteriores análisis la matriz obtenida fue procesada utilizando un análisis de componentes principales (figura 39).

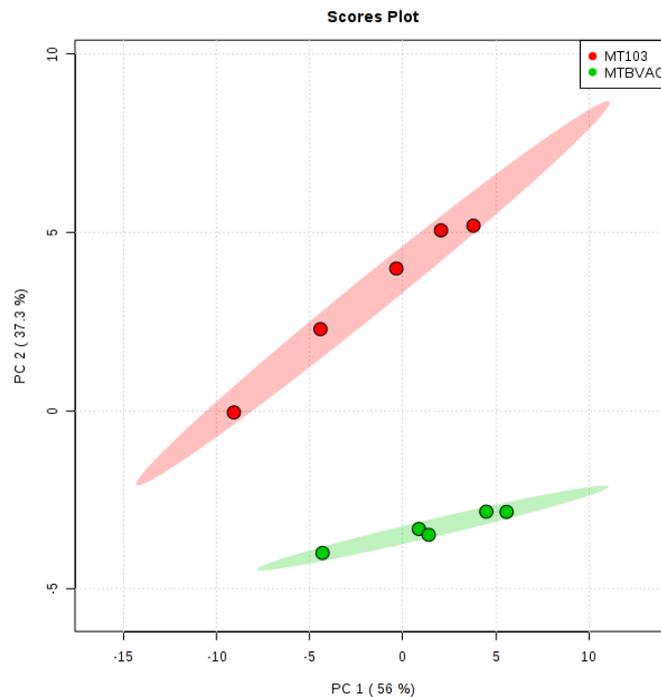


Figura 39. Análisis de componentes principales para la matriz en el análisis de cromatografía de interacción hidrofílica y modo de ionización positivo, los círculos rojos representan cada una de las cepas de MTBVAC y los círculos verdes cada una de las cepas de MT103.

Con el análisis por componentes principales de las variables seleccionadas pudo observarse que las cepas formaban dos grupos claramente diferenciados y ninguna de las réplicas biológicas fue considerada como outlier. Los dos ejes explicaban en un 93.3% la separación de las cepas con las variables seleccionadas.

Posteriormente, una vez los datos presentaban una distribución normal se aplicó el test t de Student para seleccionar las variables que podían considerarse significativas, y se comparó la . Después de aplicar ambos criterios de selección se obtuvieron los metabolitos diferenciales que aparecen en la tabla, esto es, un total de 28 metabolitos (tabla 9). Previamente habían sido 48 los metabolitos que cumplían estas características, pero al no presentar unos espectros de buena calidad y con una buena intensidad se eliminaron

Tabla 9. Variables seleccionadas en el análisis por cromatografía de interacción hidrofílica y modo de ionización positivo teniendo en cuenta el p. valor y las veces de cambio.

Masa/carga	P. valor	FDR	Veces de cambio
415.7021	6.13E-03	2.44E-02	19.593
487.1579	1.31E-03	7.74E-03	52.488
564.8187	3.84E-03	1.71E-02	0.367
579.5307	2.70E-03	1.26E-02	0.251
586.8351	2.49E-03	1.19E-02	0.345
606.3708	2.13E-03	1.07E-02	0.359
615.8366	8.72E-04	5.73E-03	0.233
630.8619	9.75E-04	6.00E-03	0.284
659.8590	3.07E-04	3.15E-03	0.190
681.8761	2.40E-04	2.98E-03	0.183
696.8956	4.35E-04	4.06E-03	0.238
710.8767	6.01E-03	2.43E-02	0.375
720.5516	4.61E-04	4.17E-03	0.235
725.9020	9.17E-05	1.95E-03	0.149
754.9056	8.20E-04	5.73E-03	0.249
762.9409	2.64E-04	2.98E-03	0.206
768.4217	7.70E-03	2.90E-02	6.853
776.9148	5.61E-04	4.79E-03	0.212
791.9398	1.31E-05	1.09E-03	0.082
796.4500	2.62E-04	2.98E-03	0.219
798.9284	2.55E-04	2.98E-03	0.178
804.4850	2.05E-04	2.92E-03	0.184
818.4637	8.44E-05	1.95E-03	0.154
820.9449	9.37E-05	1.95E-03	0.140
825.4585	4.73E-03	1.94E-02	0.403
842.9565	4.72E-05	1.42E-03	0.102
847.4677	6.98E-04	5.25E-03	0.296
852.4410	7.63E-03	2.90E-02	14.752

Se buscaron posibles coincidencias para el mismo metabolito con distintas formas de ionización y se encontraron varios casos en los que los metabolitos habían sido ionizados con captura de uno o dos protones y de uno o dos sodios. Así, tras examinar esos picos, algunas señales, como m/z 564.8187 y 586.8351, 593.8235 y 615.8366, 637.8487 y 659.859, 674.8844 y 696.8956, 732.8915 y 754.9056, 747.9126 y 791.9398, 776.9148 y 798.8767, 796.45 y 818.4637, 820.9449

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

y 842.9565 y 825.4585 y 847.4677 son parejas de iones para el mismo metabolito. Solamente se tuvieron en cuenta los relacionados con un aducto (marcados en azul).

Después de la revisión de las masas/cargas conjuntamente con el resto del análisis, se hallaron posibles metabolitos comunes entre distintos tipos de análisis. Los m/z comunes que se han encontrado utilizando cromatografía hidrofílica y modo de ionización positivo no serán tenidos en cuenta en su análisis cuando haya coincidencia con otros análisis, como sería en el caso de señales comunes que han sido revisadas en el análisis positivo con cromatografía reversa, no considerando en esta selección, los m/z 768.4217 y 852.441 (marcados en rojo). Una vez revisada la presencia en ambos, se comprobaron los tiempos de retención que tenían que ser distintos, debido a las diferencias de comportamiento en las retenciones como consecuencia de las columnas utilizadas. Además se compararon los espectros de fragmentación en los casos en los que fue posible y, por último, los valores obtenidos en cuanto a las diferencias encontradas entre las cepas, dentro de cada análisis. Por otro lado, se han encontrado en común con el análisis de HILIC negativo un m/z 720.5516 (marcado en verde) que presenta el mismo tiempo de retención. En cuanto al espectro de fragmentación, no hay mucha coincidencia, pero en estos casos entre positivo y negativo las similitudes pueden ser mínimas y en relación al p valor, el error de masas y las diferencias entre cepas podemos suponer que se trata del mismo metabolito.

Después de no tener en cuenta los metabolitos coincidentes por otros análisis y los que han ionizado de distinto modo, los metabolitos resultantes son 18.

En el análisis utilizando la cromatografía de interacción hidrofílica y usando el modo de ionización positivo se obtuvieron finalmente 18 señales diferenciales con un buen perfil cromatográfico y espectral. Una vez obtenida la lista de los posibles metabolitos se procedió como en los casos anteriores a la evaluación de cada una de las señales identificadas con el objeto de asignar la carga masa adecuada para intentar conseguir asignar una fórmula molecular e identidad a los metabolitos. En la figura 40 se muestra la corriente total de iones correspondiente a una réplica de cada una de las cepas.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

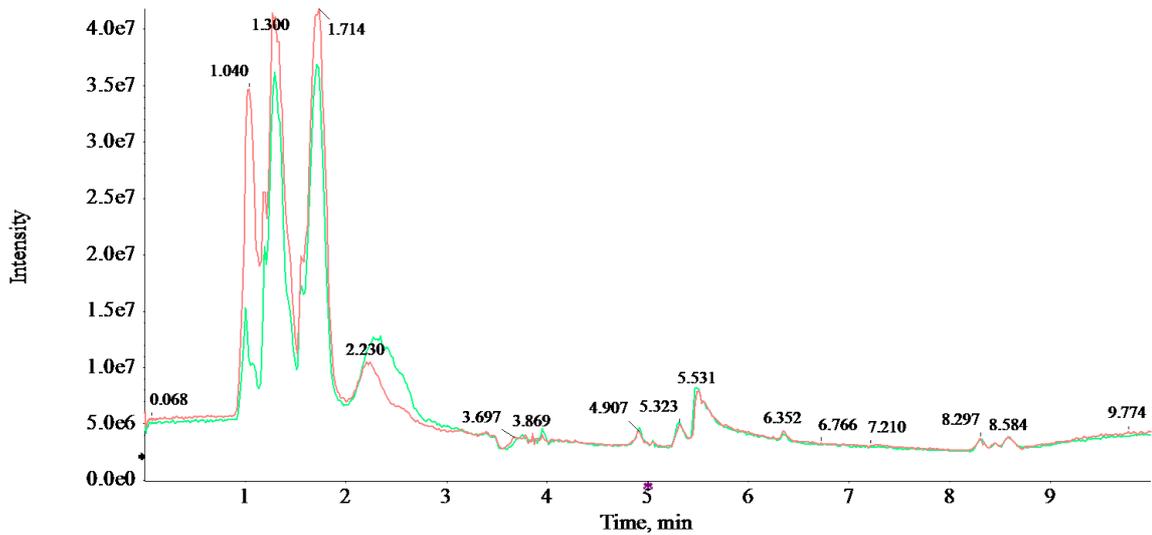


Figura 40. Corriente total de iones de las dos cepas. La línea verde corresponde a una muestra de MT103 y la línea roja a una muestra de MTBVAC.

Se puede observar en la primera parte del mismo, en la zona correspondiente entre el minuto uno y dos, las señales aumentadas en la cepa atenuada. Se podría decir que había un incremento en las moléculas con características más apolares. Igualmente, en el análisis de cromatografía reversa positiva, la zona más aumentada para la cepa atenuada correspondía a la zona final del cromatograma donde eluían las moléculas más apolares. La zona entre el minuto 2.2 y 3.0 sin embargo, presentaba la señal más aumentada para la cepa MT103. En esta parte las moléculas no serían tan apolares como las anteriores. En el resto del cromatograma no se aprecian muchos cambios entre ambas cepas.

El metabolito diferencial obtenido con una distinción de más de 50 veces, aumentado en la cepa MT103 con una m/z de 487.1588, nos proporcionó como fórmula más fiable con un error de masas de -0.9 ppm la siguiente, $C_{17}H_{30}N_2O_{12}S$. A partir del error de masas y de la comparación de la relación isotópica que puede verse en la figura 41, parece con bastante probabilidad que se trata de esta fórmula. La consulta en distintas bases no devolvió ninguna identidad para esta masa con un error de masas tan bajo como el de esta fórmula y con una relación isotópica tan perfecta.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

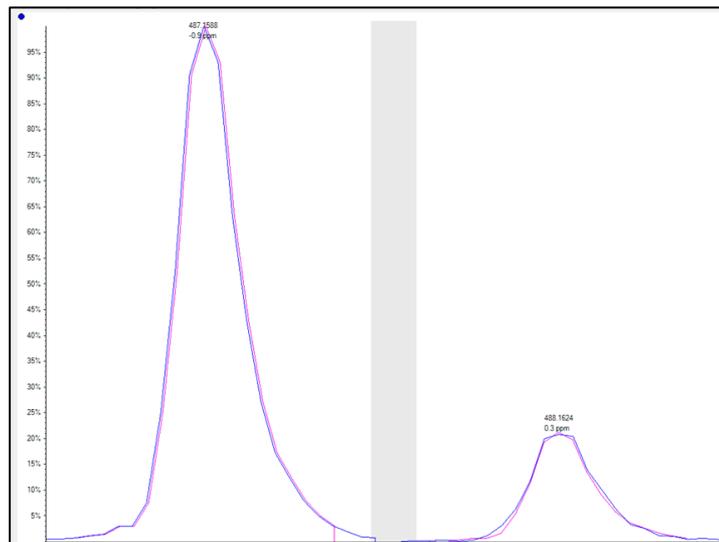


Figura 41. Relación isotópica entre el espectro de masas teórico obtenido para la fórmula $C_{17}H_{30}N_2O_{12}S$ y el obtenido para el metabolito m/z 487.1588.

Parecía que se trataba de la molécula micotiol. Se procedió a hacer una búsqueda bibliográfica para encontrar algún espectro de fragmentación obtenido en análisis de espectrometría de masas, pero no fue posible. Esta molécula es un tiol inusual que forma parte de las Actinobacterias, compuesto por un residuo de cisteína con un grupo amino acetilado por donde se une a una molécula de glucosamina que a su vez se agrega a un grupo inositol.⁷⁰ Utilizando la herramienta *formula finder* y cargando la estructura de la molécula se asignaron los fragmentos a una parte de la molécula específica y en todos los casos fue posible atribuir esa identidad con un error mínimo de masas (figura 42).

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

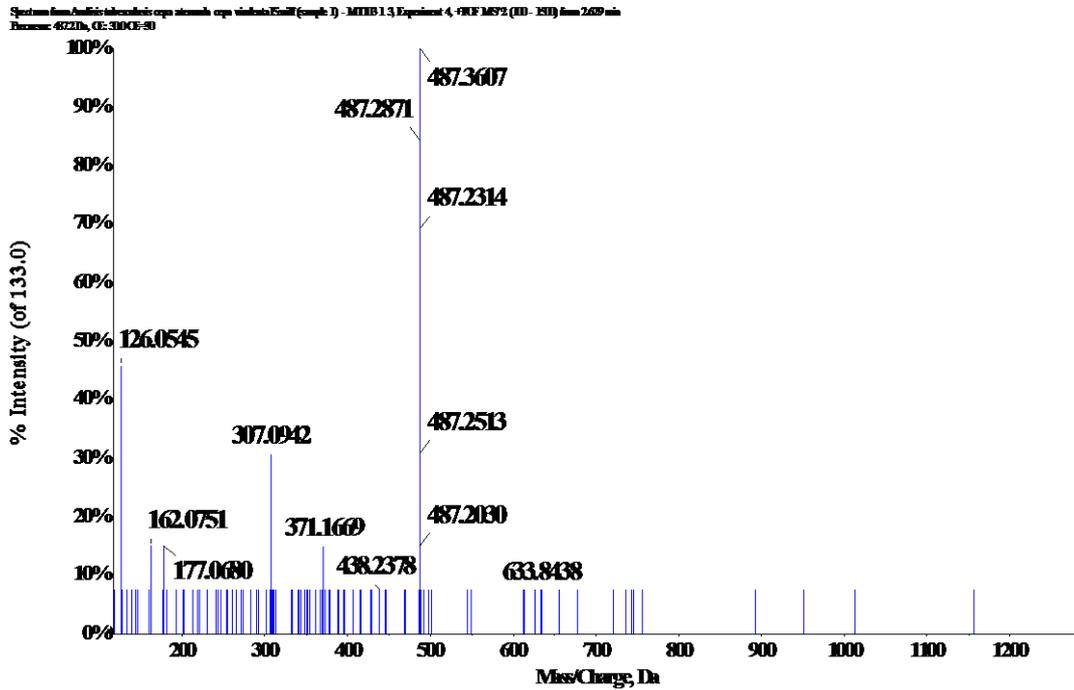


Figura 42. Espectro de fragmentación para m/z 487.1577 a una EC de -30 V.

Encontramos dos señales idénticas con el mismo espectro de fragmentación a dos tiempos de retención distintos, uno a 2.6 minutos y otro a 4.8 minutos. Revisando las muestras analizadas, observamos que el pico que presentó una elución más tardía, y que por lo tanto mostraba una mayor polaridad, se encontraba en una relación parecida en los dos grupos que estábamos comparando. Sin embargo, el pico de 2.61 minutos solo estaba presente en las muestras de la cepa MT103. A partir de aquí se sugirió la hipótesis de que la señal que se encuentra en una cantidad parecida en las dos cepas, se trataría de la molécula de micotiol, y, en cambio, la que aparece solo en la cepa MT103 y con un carácter menos polar podría ser una molécula conjugada con el micotiol en su papel de detoxificación, que parece no estar formándose en la cepa de la vacuna, o lo está haciendo a niveles no detectables.

4.4. Cromatografía HILIC y modo de ionización electroespray negativo

La matriz de datos procesada utilizando *Markerview*, que tras el análisis contenía 142 variables, fue procesada como en los casos anteriores utilizando la herramienta pública *Metaboanalyst*. Una vez comprobado que los datos presentaban una distribución normal, se aplicó el análisis por componentes principales (figura 43).

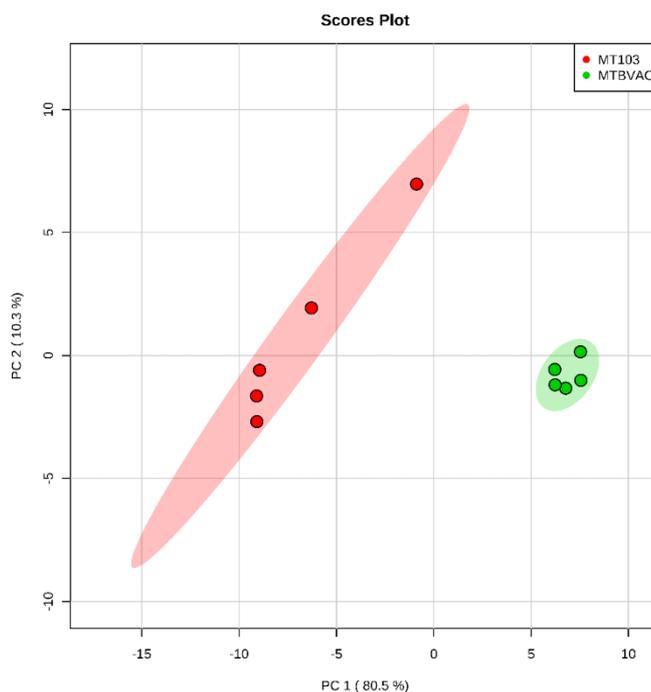


Figura 43. Análisis de componentes principales para la matriz en el análisis de cromatografía de interacción hidrofílica y modo de ionización negativo, los círculos rojos representan cada una de las cepas de MTBVAC y los círculos verdes cada una de las cepas de MT103.

El análisis por componentes principales de las variables seleccionadas presentaba las cepas agrupadas en clúster y ninguna de las réplicas fue considerada un *outlier*. Los dos ejes explicaban en un 90.8% la separación de las cepas con las variables seleccionadas.

Posteriormente, una vez que los datos presentaban una distribución normal, se realizó el test t de Student para escoger las variables significativas, teniendo en cuenta un p. valor < 0.05 y una diferencia de dos veces o más entre los metabolitos y entre los dos grupos de cepas. Después de la aplicación de estos 2 criterios se obtuvieron como metabolitos diferenciales un total de 31, que tras la eliminación de aquellas señales que no cumplían los requisitos en cuanto a calidad e intensidad de los espectros se redujo a un total de 26 (tabla 10).

Tabla 10. Variables seleccionadas en el análisis por cromatografía HILIC y modo de ionización negativo teniendo en cuenta el p. valor y las veces de cambio.

Masa/carga	P. valor	FDR	Veces de cambio
145.0624	1.08E-08	1.60E-07	2.860
146.0466	1.90E-09	7.89E-08	2.023
181.0726	3.76E-09	7.89E-08	12.344
299.0670	8.12E-07	4.97E-06	2.254
315.0818	1.60E-08	1.96E-07	3.045
324.0212	1.05E-09	7.89E-08	52.531
364.8697	3.46E-06	1.54E-05	2.008
421.0726	1.71E-06	8.98E-06	0.383
571.2871	2.78E-08	2.73E-07	0.503
600.7772	3.33E-06	1.53E-05	2.072
662.0997	4.57E-07	3.20E-06	2.049
690.5047	4.97E-03	8.32E-03	0.336
704.5236	1.47E-03	3.13E-03	0.217
716.5197	2.11E-03	4.31E-03	0.278
718.5360	5.11E-03	8.35E-03	0.328
730.5395	5.62E-03	9.08E-03	0.376
744.5553	8.60E-03	1.82E-02	0.402
746.5670	7.90E-03	1.22E-02	0.336
747.5132	2.41E-06	1.16E-05	3.055
786.5276	4.17E-03	7.22E-03	0.273
835.5319	1.18E-04	2.89E-04	0.297
837.5469	5.20E-04	1.19E-03	0.309
865.5763	2.35E-03	4.60E-03	0.276
903.5199	3.21E-04	7.50E-04	0.236
905.5352	5.60E-04	1.27E-03	0.274
977.0880	2.51E-08	2.63E-07	2.497

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

El análisis no dirigido que se desarrolló empleando cromatografía de tipo HILIC y modo de ionización negativo, fue en el análisis en que mayor número de metabolitos se pudo identificar, con un nivel de asignación de estructura más probable. Se evaluaron uno a uno los picos cromatográficos, los espectros de masas y los de fragmentación, así como los tiempos de retención. A partir de aquí se procedió a buscar la fórmula molecular que les podría corresponderse con nuestro metabolito. En la figura 44 se muestran dos cromatogramas superpuestos de las dos cepas estudiadas.

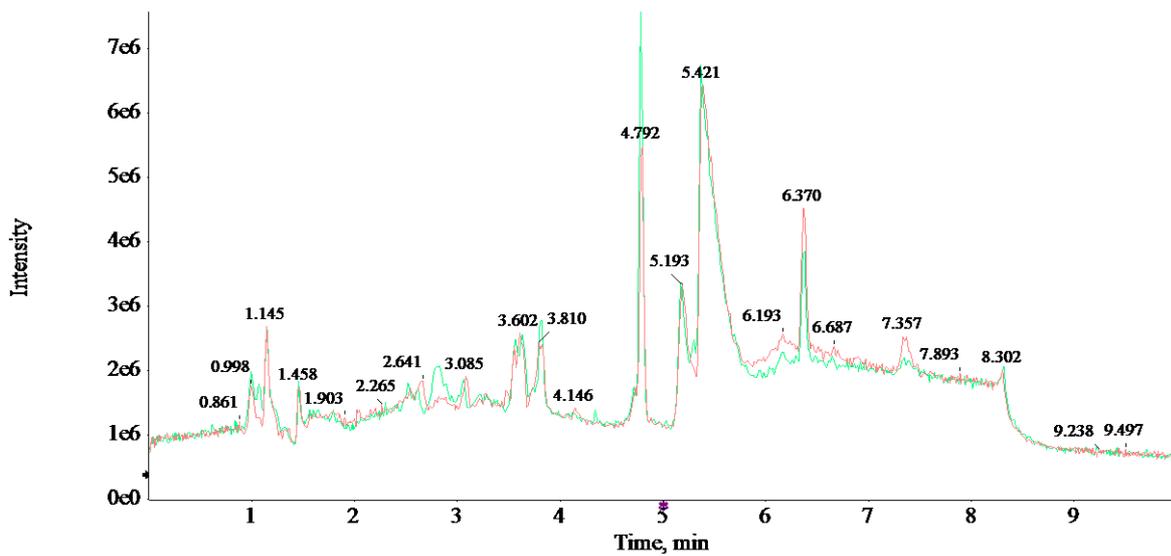


Figura 44. Corriente total de iones de las dos cepas. La línea verde corresponde a MT103, y la línea roja, a una muestra de MTBVAC.

Se observa una zona al principio donde han sido detectadas las moléculas apolares en la que se aprecia una señal mayor para MT103 seguida de una mayor para MTBVAC. Hay que destacar una señal cerca del minuto tres en el que se observa una zona destacable para MT103 y que no aparece en el cromatograma de la cepa atenuada y que correspondería a moléculas de polaridad intermedia. En la zona cercana al minuto seis, y concretamente en el minuto 7.3 podemos ver que las señales obtenidas son mayores en la cepa vacuna, hecho que indicaría una mayor presencia de metabolitos polares.

El metabolito m/z 145.0617 se encontró aumentado en la cepa MT103 con una diferencia de casi tres veces, se la asignó la fórmula molecular $C_5H_{10}N_2O_3$ con un error de 3.1 ppm.

Hemos consultado distintas bases de datos y observado que la estructura más probable obtenida es el aminoácido, glutamina. En la figura 45 se puede ver el espectro de fragmentación obtenido para este metabolito.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

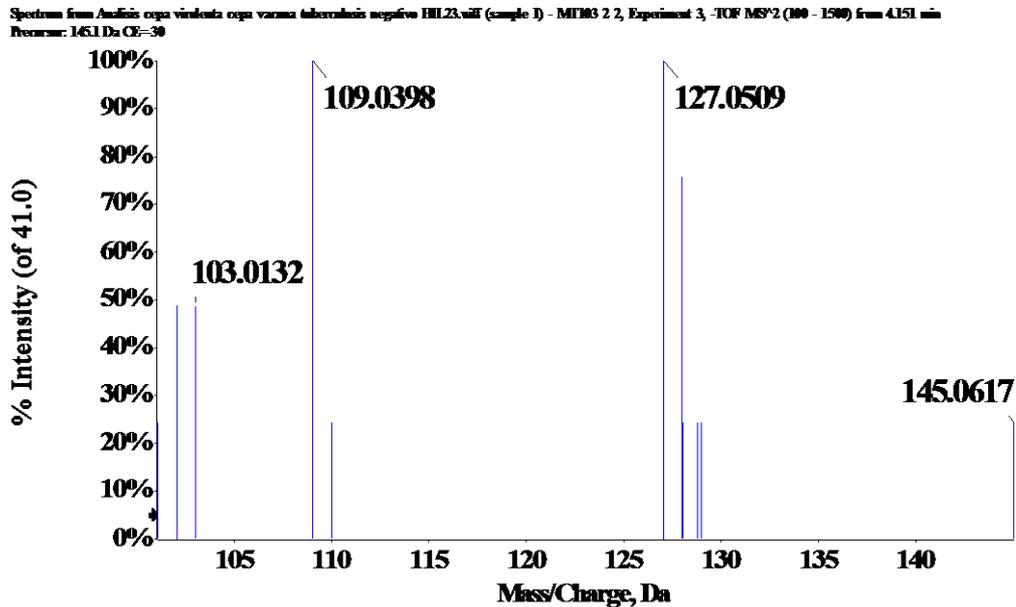


Figura 45. Espectro de fragmentación para el metabolito 145.0617 a una EC de -30 V.

Es obligado destacar dos fragmentos mayoritarios el 127.0569 y el 109.0398, seguido de otro fragmento de menor intensidad: el 103.0132. El tiempo de retención de 4.13 minutos indica que puede tratarse de este tipo de molécula por su carácter polar. Consultando la base de datos NIST hallamos el espectro de fragmentación obtenido utilizando un espectrómetro de masas con una trampa de iones de la compañía Thermo (Thermo Finnigan Elite Orbitrap). La energía de colisión que se empleó fue de -35 voltios, la más parecida a la utilizada durante nuestro análisis. Como puede verse en el espectro de fragmentación (figura 46), aparecen los dos fragmentos mayoritarios que habíamos obtenido, en principio, el 127.0518, y con una intensidad mucho menor, el 109.0412.

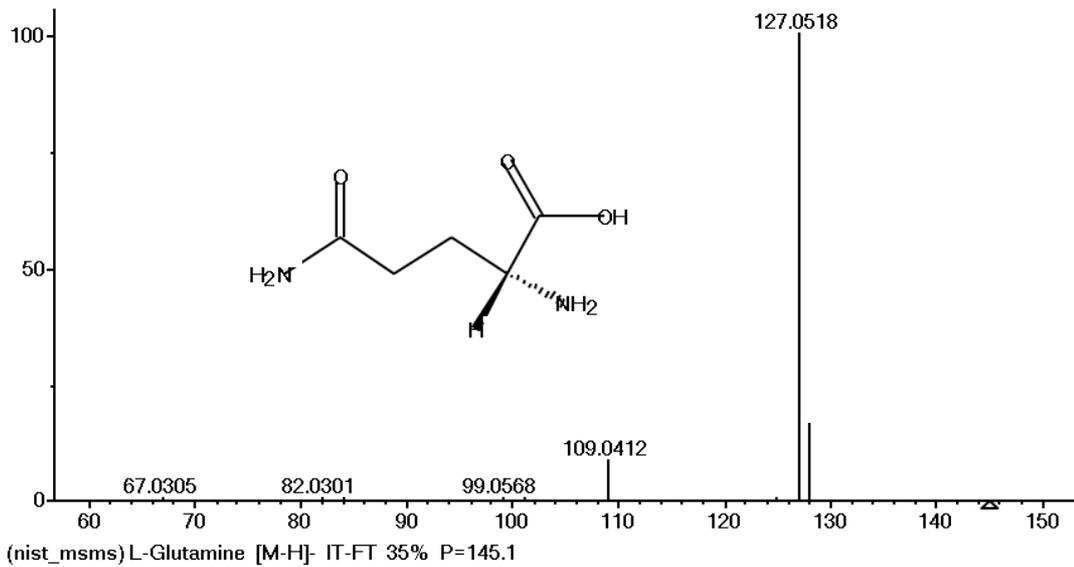


Figura 46. Espectro de fragmentación de glutamina obtenido de la base de datos NIST. Eje x: m/z; eje y: Intensidad (%).

El metabolito m/z de 146.0455, que apareció con una mayor intensidad en la cepa salvaje.

Se procedió a asignar una fórmula molecular que con un error de masas de dos ppm nos devolvía la fórmula $C_5H_9NO_4$. Haciendo una búsqueda por distintas bases de datos, siempre obtuvimos la misma estructura, en este caso de nuevo un aminoácido, pero esta vez se trataba de glutamato. Durante el análisis se consiguió un espectro de fragmentación que se muestra en la figura 47. Su tiempo de retención, fue además de 3.85 minutos, lo que indicaba que la molécula presentaba una polaridad intermedia. Los fragmentos mayoritarios obtenidos fueron en primer lugar el 102.0558 y en segundo lugar el 128.0343, seguido de otros fragmentos minoritarios. Tras consultar la base de datos NIST encontramos un espectro de fragmentación obtenido haciendo uso de una trampa de iones con una energía de colisión de -23 voltios, que presentaba estos dos fragmentos con intensidades muy parecidas a las obtenidas en el espectro de fragmentación, que se obtuvo para la molécula durante el análisis (Figura 48).

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

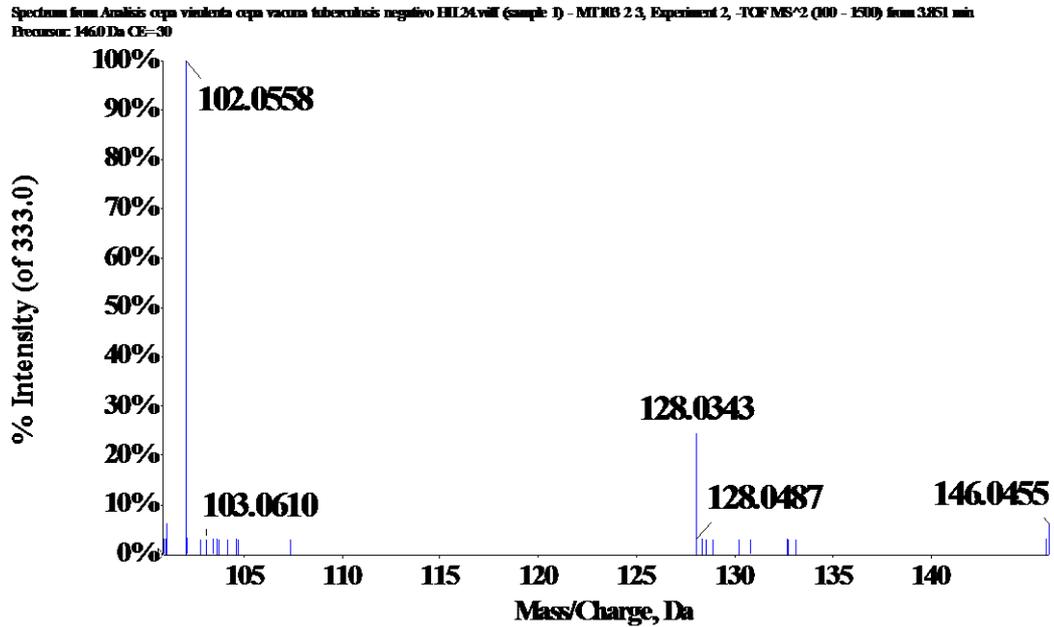


Figura 47. Espectro de fragmentación obtenido para el metabolito m/z 146.0455 a una EC de -30 V.

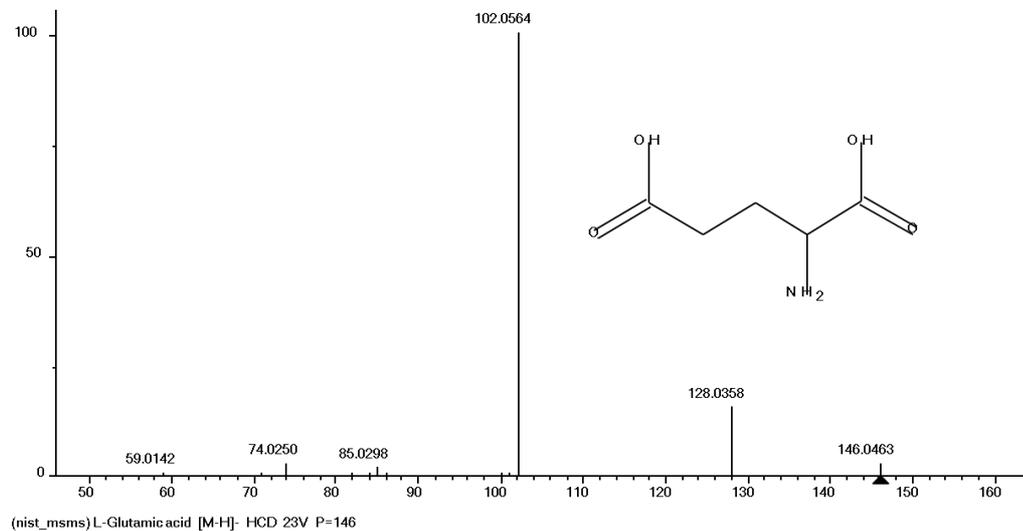


Figura 48 Espectro de fragmentación de glutámico obtenido de la base de datos NIST a una EC de -23 V. Eje x: m/z; eje y: Intensidad (%).

El metabolito m/z 181.0726 fue identificado con la siguiente fórmula molecular $C_6H_{14}O_6$ con un error de masas de una ppm. La consulta en las distintas bases de datos nos proporcionaba diferentes estructuras moleculares con una gran dificultad para poder distinguir unas de otras por lo que recurrimos al uso de patrones. En el cromatograma de la figura 49 puede verse el pico perteneciente a la señal diferencial obtenida.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

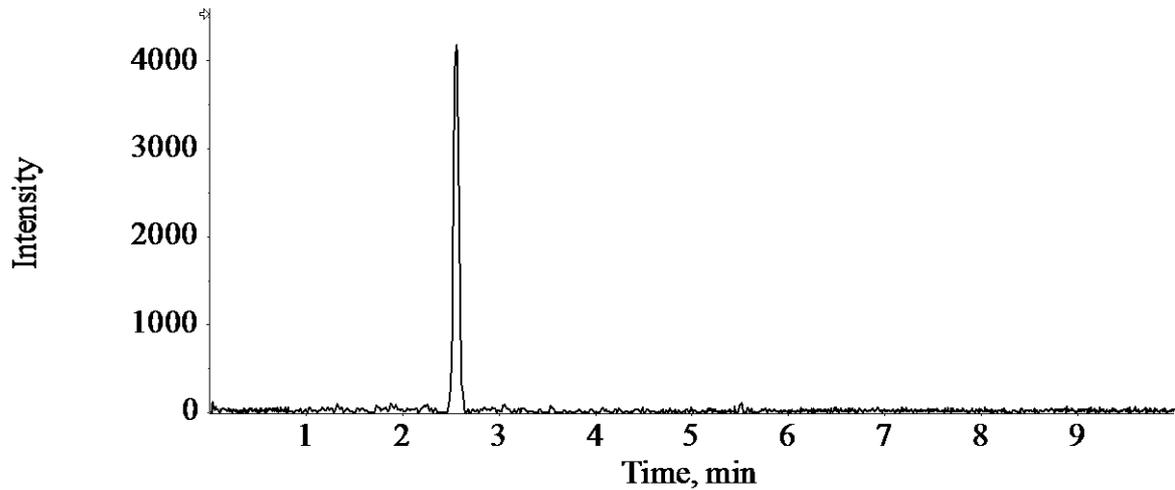


Figura 49. Pico cromatográfico obtenido para nuestro metabolito m/z 181.0726 de una muestra de MT103.

Una solución con sorbitol y otra con manitol fueron preparadas y analizadas con la misma metodología. Después de comparar los tiempos de retención y los espectros de fragmentación obtenidos, concluimos que el metabolito que habíamos detectado en nuestro análisis era manitol.

En la figura 50 se puede ver el cromatograma para el patrón manitol.

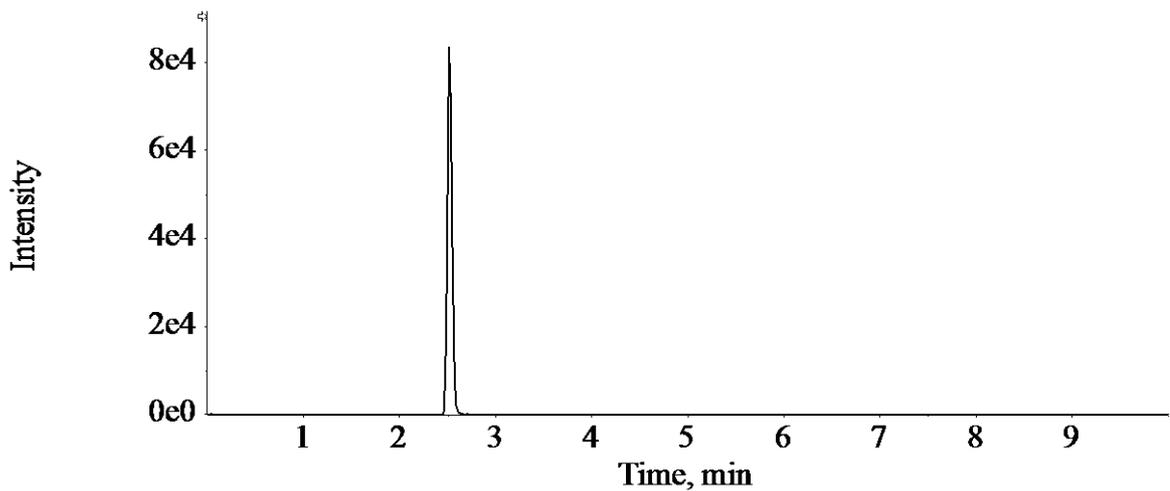


Figura 50. Pico cromatográfico obtenido para el estándar comercial de manitol.

Los espectros de fragmentación obtenidos para el metabolito presente en nuestras muestras y el patrón utilizado pueden verse en las figuras 51 y 52 respectivamente.

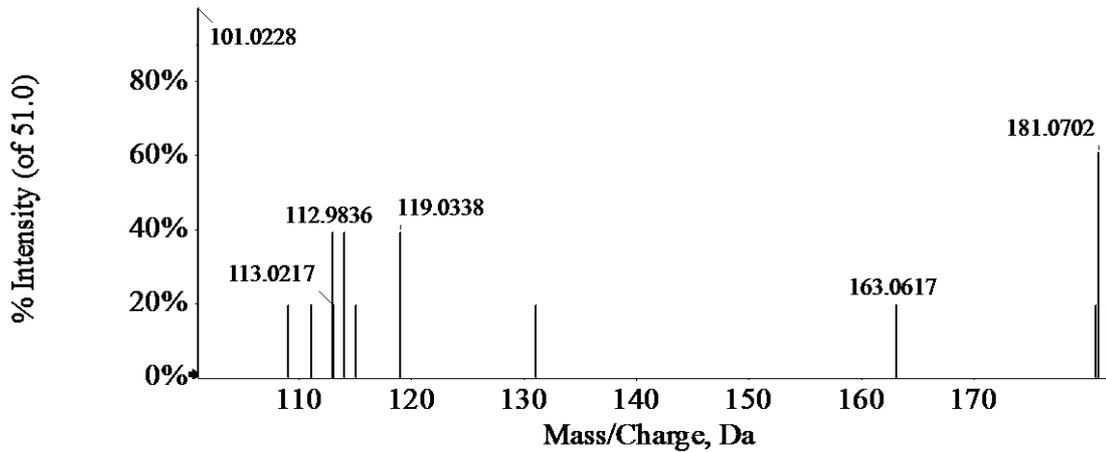


Figura 51. Espectro de fragmentación experimental obtenido por el metabolito m/z 181.0702

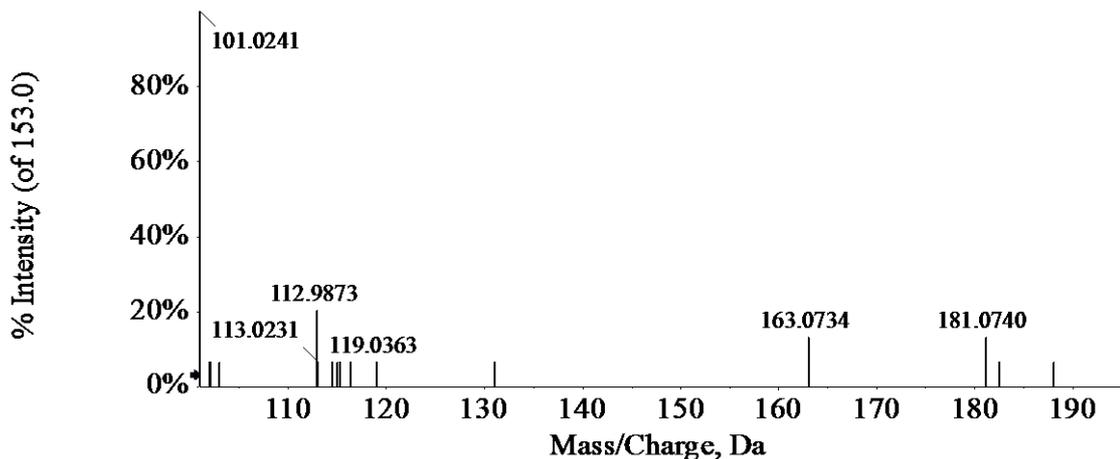


Figura 52. Espectro de fragmentación obtenido del estándar manitol a una EC de -30 V.

Comparando el tiempo de retención obtenido por el estándar y nuestro metabolito en los dos cromatogramas y gracias a la comparación de la fragmentación, de los espectros de masas/masas, se pudo confirmar que la molécula diferencial es manitol. Esta molécula se encontró considerablemente aumentada en la cepa MT103.

El siguiente metabolito al que se le pudo dar una identidad presentaba la m/z 421.0747. La asignación de la fórmula molecular que pudimos obtener fue $C_{12}H_{23}O_{14}P$ con un error de masas de -1.3 ppm. Después de la consulta en distintas bases de datos, una de las estructuras con menor error y más probabilidad de su existencia en *M. tuberculosis*, fue la trehalosa-6-fosfato, componente muy importante, involucrado en la formación de diversas estructuras de carácter virulento. En la figura 53 se puede ver el espectro de fragmentación obtenido para el metabolito aumentado en la cepa atenuada.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

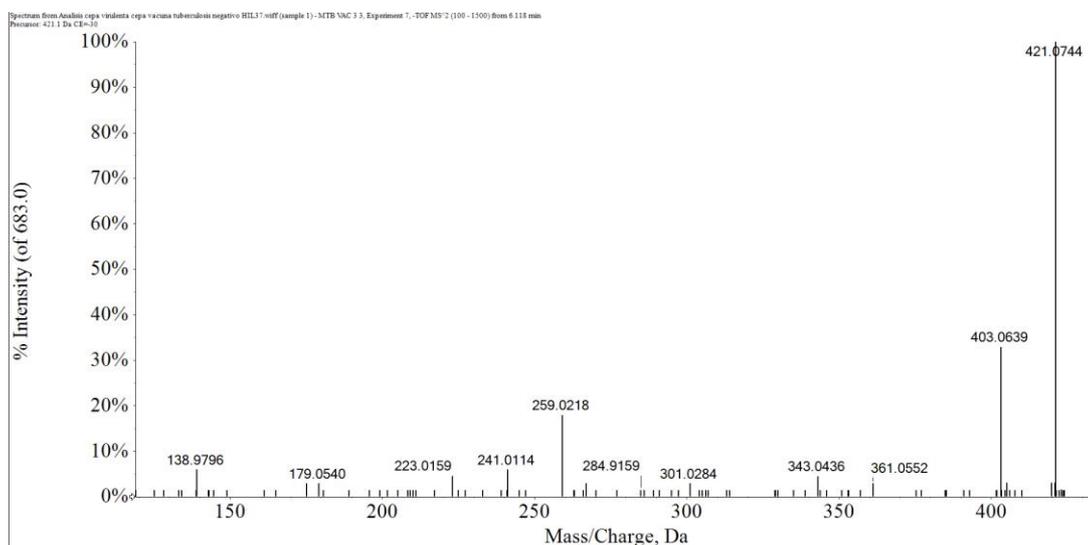


Figura 53. Espectro de fragmentación para m/z 421.0747 a EC de -30 V.

Cabe destacar la aparición de dos fragmentos mayoritarios el fragmento m/z 403.0639, que probablemente sea la pérdida de agua de la molécula, y el fragmento m/z 259.0218, que se correspondería con la estructura formada por uno de los azúcares y el grupo fosfato unido a este.

Consultando la base de datos NIST, obtuvimos el espectro de fragmentación para la molécula, que puede verse en la figura 54. La muestra fue adquirida usando un espectrómetro de masas con una trampa de iones de Thermo y utilizando una energía de colisión de -33 voltios. Podemos ver hasta tres fragmentos comunes, entre nuestro espectro y el obtenido de la fragmentación del patrón proporcionado por la base de datos NIST.

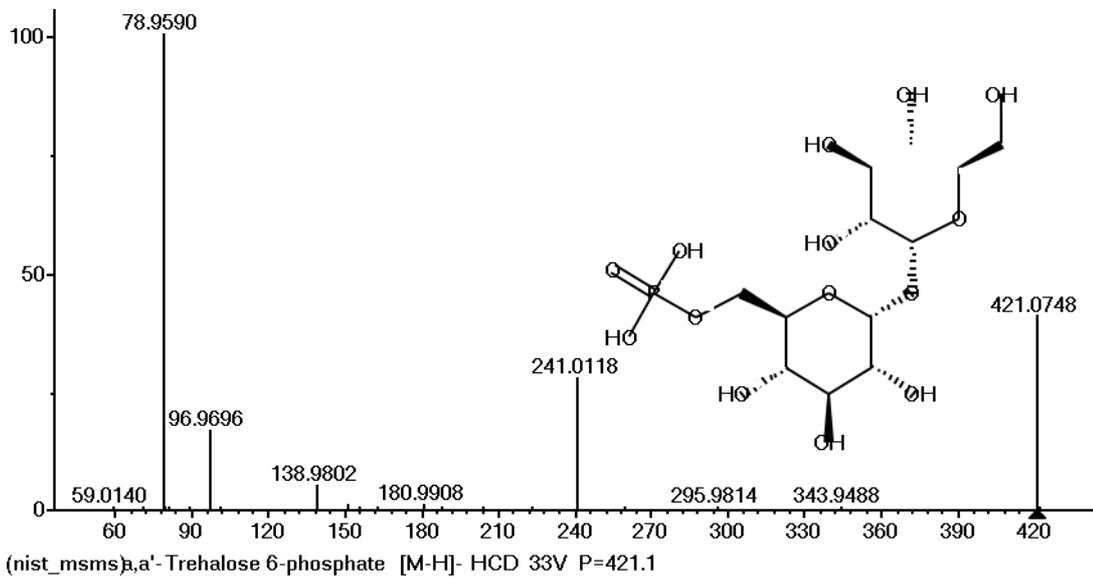


Figura 54. Espectro de fragmentación para trehalosa-6-fosfato a una EC de -33 V. Eje x: m/z; eje y: Intensidad (%).

En el espectro se puede ver que los fragmentos 138.9802, 241.0118 y 343.9488 son comunes para los dos análisis, por lo que parece claramente que se trataría de esta molécula.

El siguiente metabolito que tratamos de identificar, se encontró aumentado en la cepa MTBVAC, el valor de m/z que se obtuvo para este, fue 571.2871. Además, dirigido a este metabolito con ionización en negativo se asignó la fórmula molecular $C_{25}H_{49}O_{12}P$ con un error de masas de -2.3 ppm. La búsqueda en distintas bases de datos nos proporcionó la identidad de este metabolito, como la de un fosfolípido de la familia fosfatidilinositol FI(16:0/0:0). El tiempo de retención de 3.27 minutos también apoyaba a la posibilidad de que se tratara de este tipo de moléculas. En la figura 55 se puede observar el espectro de fragmentación obtenido durante nuestro análisis, donde aparecen señales comunes, que pueden verse en los espectros de fragmentación obtenidos de la base de datos NIST, a través de Lipidmaps (figura 56).

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

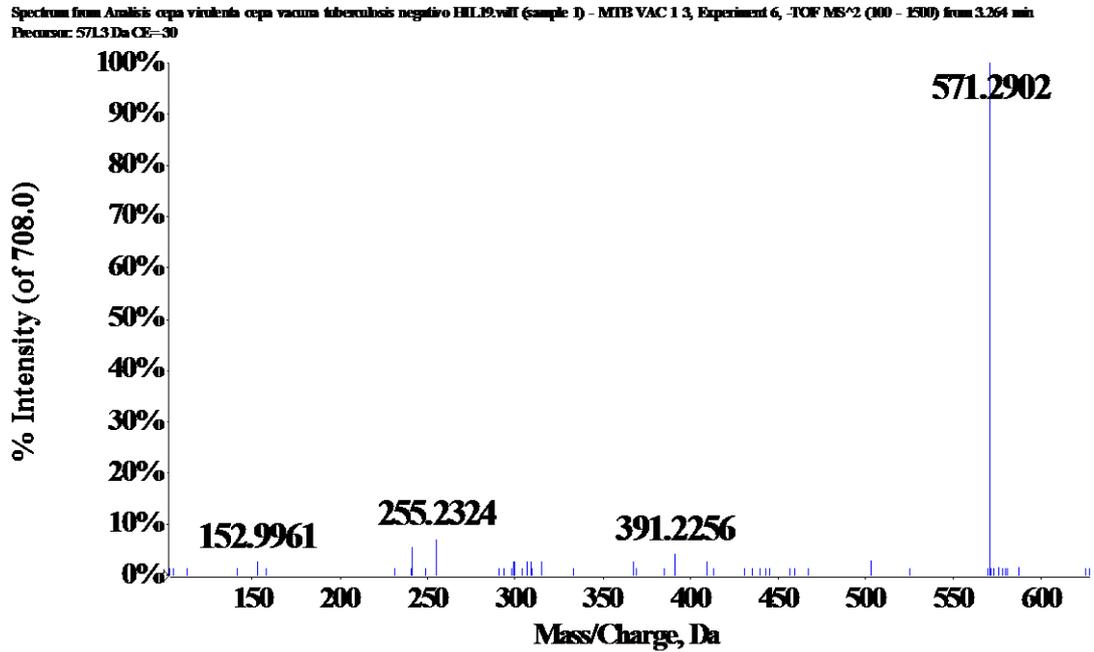


Figura 55. Espectro de fragmentación obtenido para el metabolito m/z 571.2871 a una EC de -30 V.

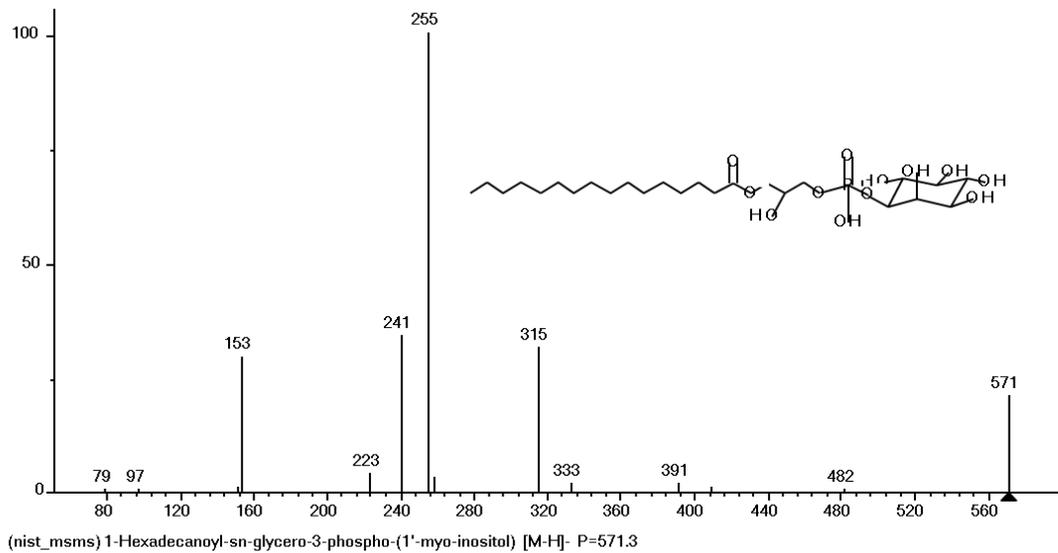


Figura 56. Espectro de fragmentación obtenido de la base de datos NIST a partir de Lipidmaps para la molécula FI(16:0/0:0). Eje x: m/z; eje y: Intensidad (%).

Para la molécula con m/z 662.102 que aparecía diferencial con una media de área mayor para la cepa MT103, se encontró la fórmula molecular $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$ con un error de masas de -0.5 ppm.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

Spectrum from Analisis cepa virulenta cepa vacuna tuberculosis negativo HIL23.wiff (sample 1) - MT103 2.2, Experiment 6, TOFMS/2 (100 - 1500) from 5.850 min
Precursor: 662.1 Da CE=30

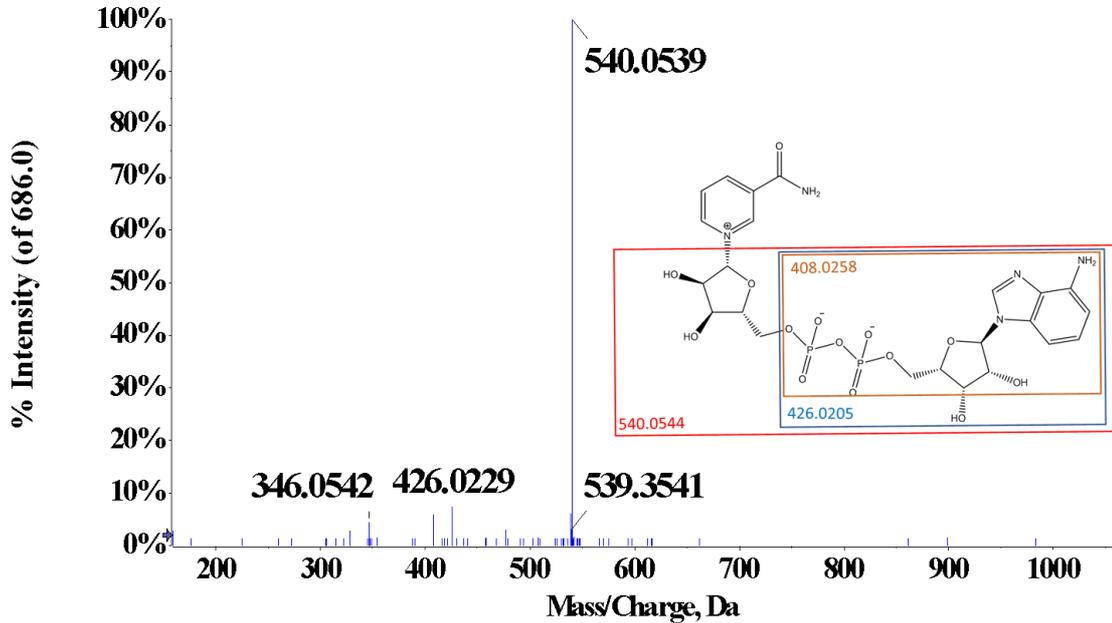


Figura 57. Espectro de fragmentación de NAD a EC de -30 voltios y asignación de fragmentos.

El espectro de fragmentación de nuestro metabolito (figura 57) fue comparado con el que aparecía en la base de datos NIST (figura 58), obtenido utilizando un espectrómetro de masas de Thermo. Presentaba tres fragmentos característicos idénticos, que además coincidían perfectamente con las partes de la molécula que aparecen representadas en la figura 57, con un error de masas para cada fragmento por debajo de cinco ppm en todos los casos. Debido a este parecido espectral podemos confirmar prácticamente que se trataba del coenzima Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Además, el tiempo de retención de 5.85 minutos obtenido durante el análisis encaja perfectamente con las características de una molécula polar, como sería este cofactor enzimático.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

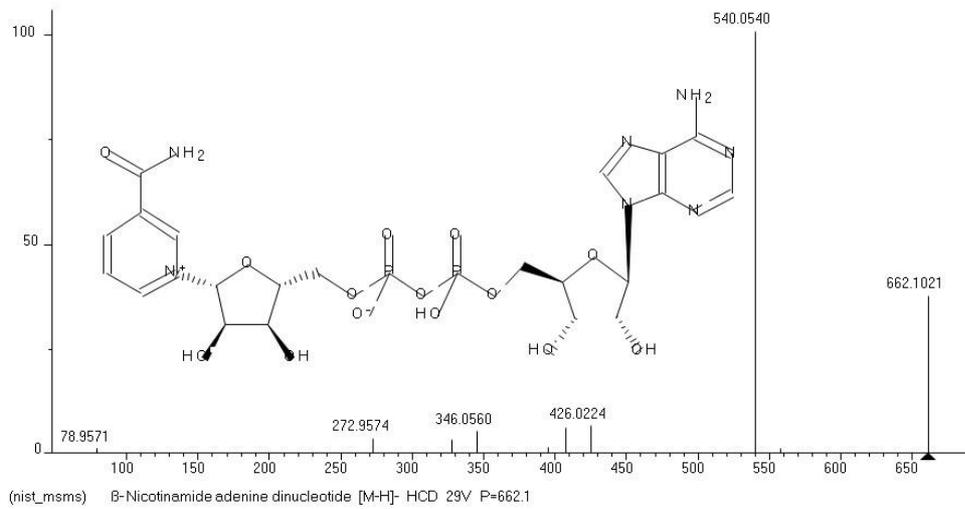


Figura 58. Espectro de fragmentación de la base de datos NIST para NAD a una EC de -29 eV. Eje x: m/z; eje y: Intensidad (%).

El espectro de fragmentación que podemos ver en la figura 58 a partir del patrón, es muy parecido al obtenido experimentalmente, en cuanto a la m/z y a la relación de intensidades de los fragmentos. Los cuatro fragmentos mayoritarios, como 540.0540 que aparece claramente destacado en cuanto a intensidad con respecto a los demás, y el resto 426.0224, 346.0560 y 272.9574, todos, con una intensidad parecida entre ellos, se encuentran en las dos adquisiciones con una diferencia mínima en cuanto a error de masas y a la relación de intensidad entre los distintos fragmentos obtenidos.

El metabolito con m/z 690.5047, que apareció aumentado en una relación de tres veces más en la cepa MTBVAC, presentaba un tiempo de retención mínimo de 1.58 minutos por lo que parecía indicar que se trataba de una molécula muy apolar. Se procedió a asignar la fórmula molecular, obteniendo para el espectro de masas como probable la fórmula $C_{37}H_{74}O_8NP$ con un error de masas de -1.6 ppm. Debajo, en la figura 59, puede verse el espectro de fragmentación obtenido. La consulta en la base de datos sugería como estructura más probable un fosfolípido de la familia FE.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

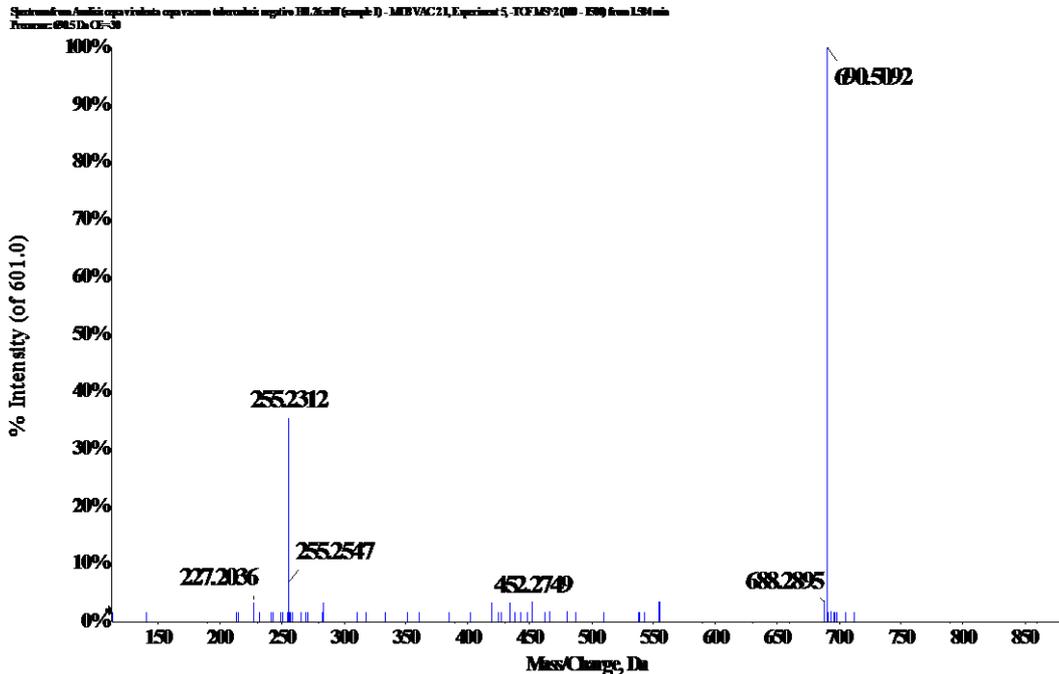


Figura 59. Espectro de fragmentación del metabolito 690.5092 a una EC de -30 voltios.

La comparación con el espectro de fragmentación obtenido, usando un patrón y un equipo con trampa de iones Api4000 Qtrap de SCIEX a una EC de -40, de la molécula FE(16:0/16:0), nos muestra una gran similitud con nuestro metabolito diferencial (figura 60). En el espectro obtenido, podemos ver, que los tres fragmentos mayoritarios, que están presentes en el patrón, primero 255 después 452 y por último 436. Se encuentran con la misma relación de intensidades en nuestra muestra de MTBVAC. El resto de las señales no se identifican por una falta de sensibilidad, ya que el área obtenida para esta molécula no fue muy grande.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

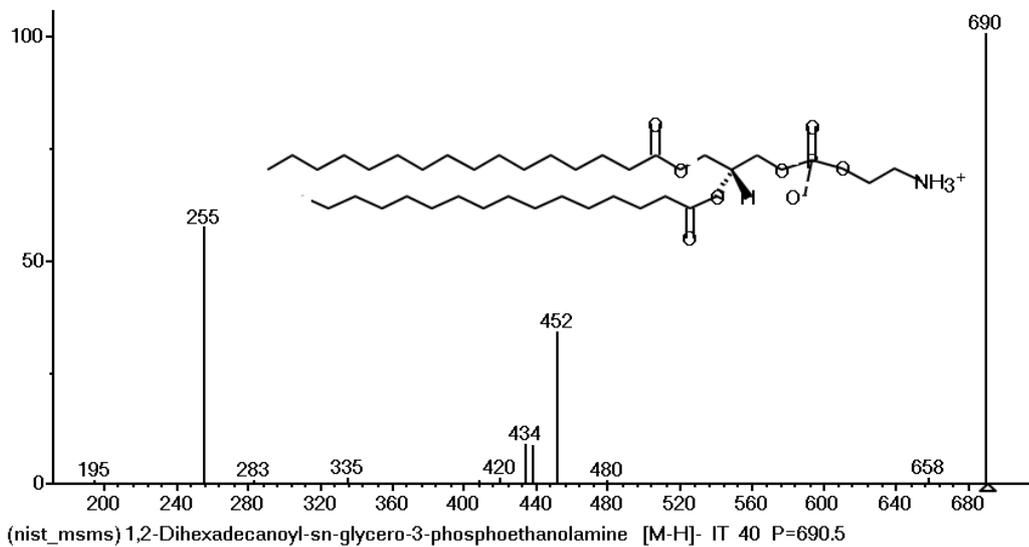


Figura 60. Espectro de fragmentación para FE (16:0/16:0) a una EC -40 voltios obtenido de la base de datos NIST. Eje x: m/z; eje y: Intensidad (%).

En el mismo tiempo de retención, a 1.58 minutos con una m/z de 704.5236 apareció una molécula con una polaridad muy parecida a la anterior y, una relación casi cinco veces mayor para la cepa atenuada. Se le asignó la siguiente fórmula molecular $C_{38}H_{76}O_8NP$ con un error de masas de -1.3 ppm. Para su identificación a partir de la m/z y la comparación de su espectro con algunos espectros obtenidos disponibles, podemos decir tentativamente que se trata de un fosfolípido de la familia FE. En este caso con un grupo metilo más en la parte correspondiente a la molécula de etanolamina, FE-NMe (16:0/16:0). El espectro de fragmentación es parecido también al metabolito anterior (figuras 61 y 62), puesto que son moléculas similares con la diferencia de un grupo CH_2 . En la figura se muestra el espectro de fragmentación de la base de datos NIST obtenido para el patrón de este fosfolípido utilizando el mismo equipo que para la molécula anterior, a una EC de -40 voltios.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

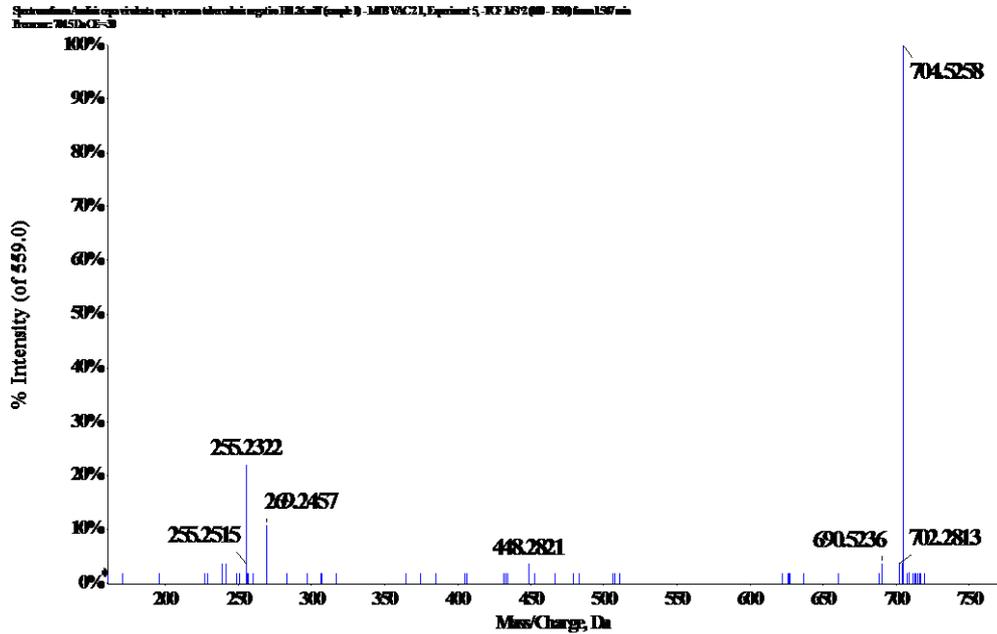


Figura 61. Espectro de fragmentación para el metabolito m/z 704.5258 a una EC -30 V.

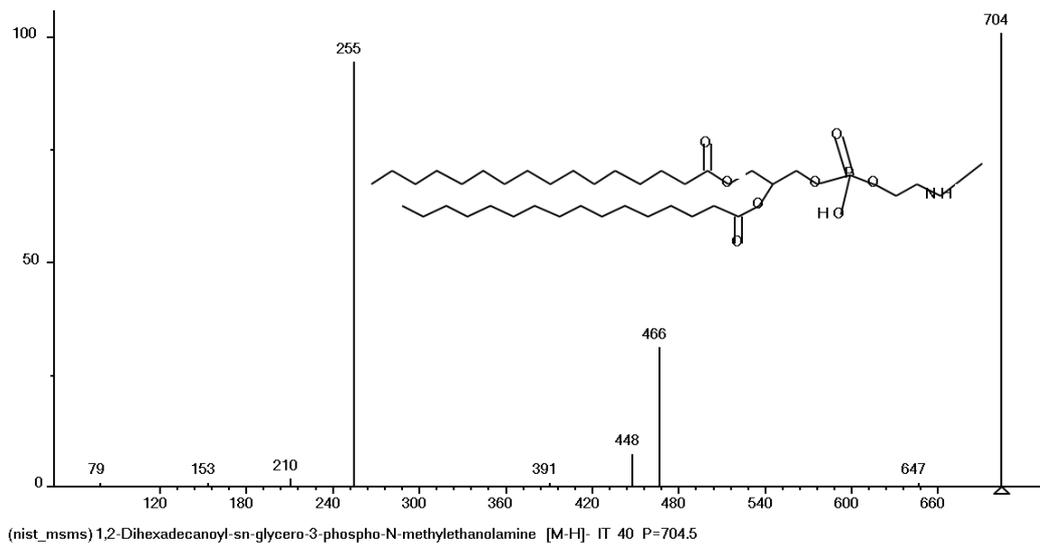


Figura 62. Espectro de fragmentación para FE-NMe (16:0/16:0) a una EC -40 voltios obtenido de la base de datos NIST. Eje x: m/z; eje y: Intensidad (%).

En los dos espectros hay cierta similitud, por la presencia de dos fragmentos que se encuentran en las dos adquisiciones, el que aparece con una mayor intensidad a 255 y el fragmento de 448 con una menor intensidad. Las señales de los fragmentos en nuestro análisis presentan una menor intensidad que los obtenidos en el análisis del patrón.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

El siguiente metabolito diferencial con m/z de 716.5228, fue poco retenido en el análisis, con tiempo de retención similar a los dos anteriores. Se le asignó la fórmula $C_{39}H_{76}NO_8P$ con error de masas de -1.1 ppm. Se obtuvo un espectro de fragmentación que es mostrado en la figura 63 y fue identificado como un fosfolípido, por consulta en distintas bases de datos a partir del valor de m/z obtenido, y por comparación de espectros de fragmentación mediante patrones adquiridos.

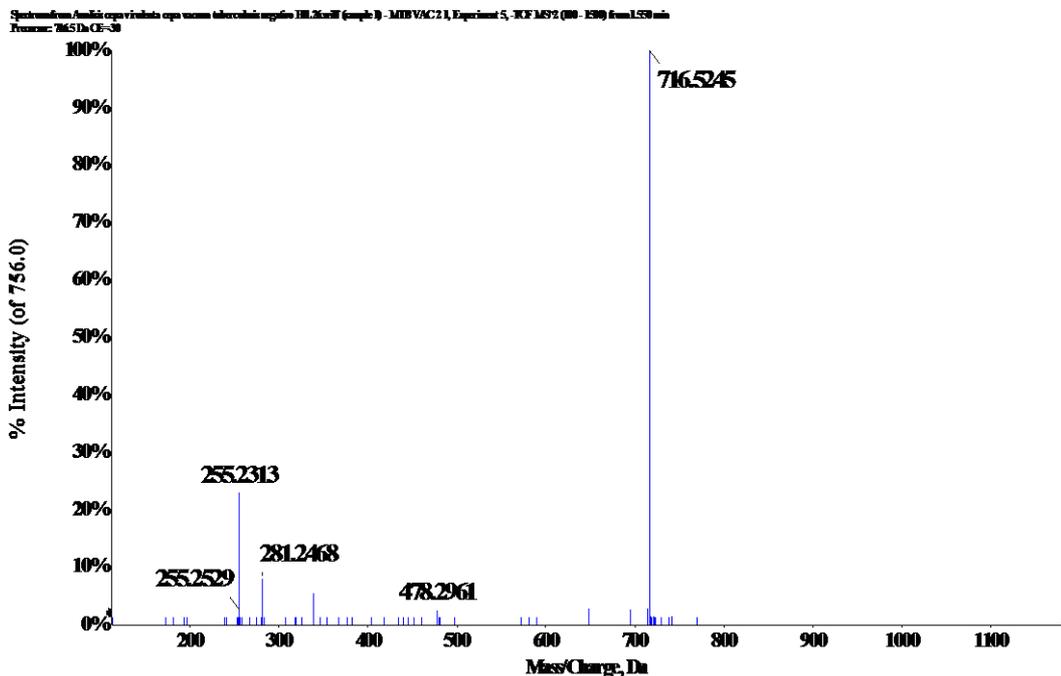


Figura 63. Espectro de fragmentación del metabolito m/z 716.5228 a una EC de -30 V.

Se trataba de nuevo de la familia FE, con la estructura FE(16:0/18:1(9Z)) que se pudo proponer, a partir del espectro de fragmentación, utilizando un patrón, y obtenido con un espectrómetro de masas con trampa de iones y a partir de la base de datos NIST (figura 64). Presentaban fragmentos comunes y con la misma relación de intensidad, en primer lugar, 255.2313, después, 281.2468, y con menor intensidad, 478.2961.

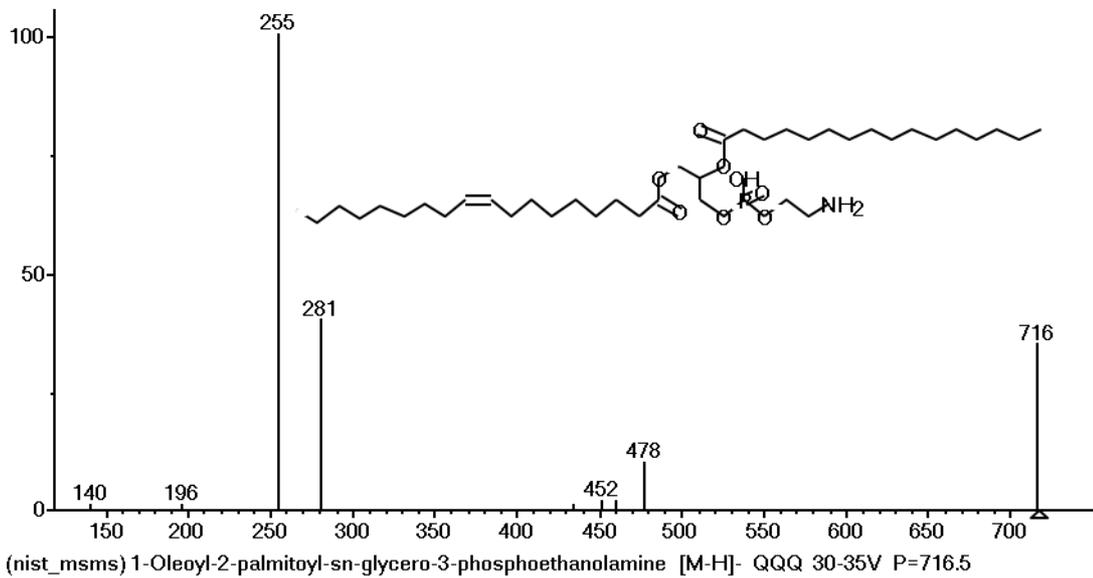


Figura 64. Espectro de fragmentación para FE(18:1/16:0) con una rampa de EC de -30 a -35 V

En el mismo tiempo de retención, se encontró otro metabolito diferencial, que igual que en el caso anterior, estaba aumentado en la cepa MTBVAC. Tras la asignación de la fórmula molecular $C_{39}H_{78}NO_8P$ con un error de masas de -1.2 ppm y la consulta en las bases de datos, fue identificado como la misma estructura anterior pero en este caso sin la presencia de un doble enlace. Era un fosfolípido con una cadena de ácido graso saturado, en lugar de la insaturación que presentaba la FE en el caso anterior, tratándose ahora de FE(16:0/18:0). En la figura 65, puede verse el espectro de fragmentación obtenido. Los fragmentos del espectro comparados con los fragmentos obtenidos para FE(16:0/18:1(9Z)) (figura 65) cambian en dos unidades en el fragmento 283 y en el 480, indicando claramente la ganancia de 2 hidrógenos en esas partes de la molécula, que contienen el ácido graso oleico.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

de masas de 0.1 ppm. Esta era la más probable $C_{40}H_{78}NO_8P$ y tras la consulta en distintas bases de datos podría tratarse de un fosfolípido de la familia FE, pero al no tener ningún fragmento, no se pudo dar con exactitud la longitud de las cadenas de ácido grasos que lo forman.

Se propone como estructura tentativa $FE(R1CO_2H+R2CO_2H=35:1)$, con dos cadenas de ácidos grasos, que en total presentan 35 C y un enlace doble.

El siguiente metabolito que se trató de identificar, fue el correspondiente con la m/z 744.5553, no presentó prácticamente retención en la columna cromatográfica. Igualmente presentaba características apolares como el resto de FE identificadas. Le asignamos la fórmula molecular $C_{41}H_{80}NO_8P$, con un error de masas de -0.4 ppm. No encontramos ningún espectro de fragmentación teórico con semejanza para poder saber el tipo de estructura. Sin embargo, a partir de un espectro de fragmentación predictivo con una EC de -20 voltios obtenido de la base de datos del metaboloma humano (figura 72), encontramos que los dos fragmentos que aparecían eran el 281 y el 283 que podían corresponder a dos ácidos grasos con 18 átomos de C, uno saturado y otro con un enlace doble. Con esta información podemos asignar tentativamente la estructura para este metabolito como un fosfolípido de la familia de FE, en este caso $FE(18:0/18:1)$.

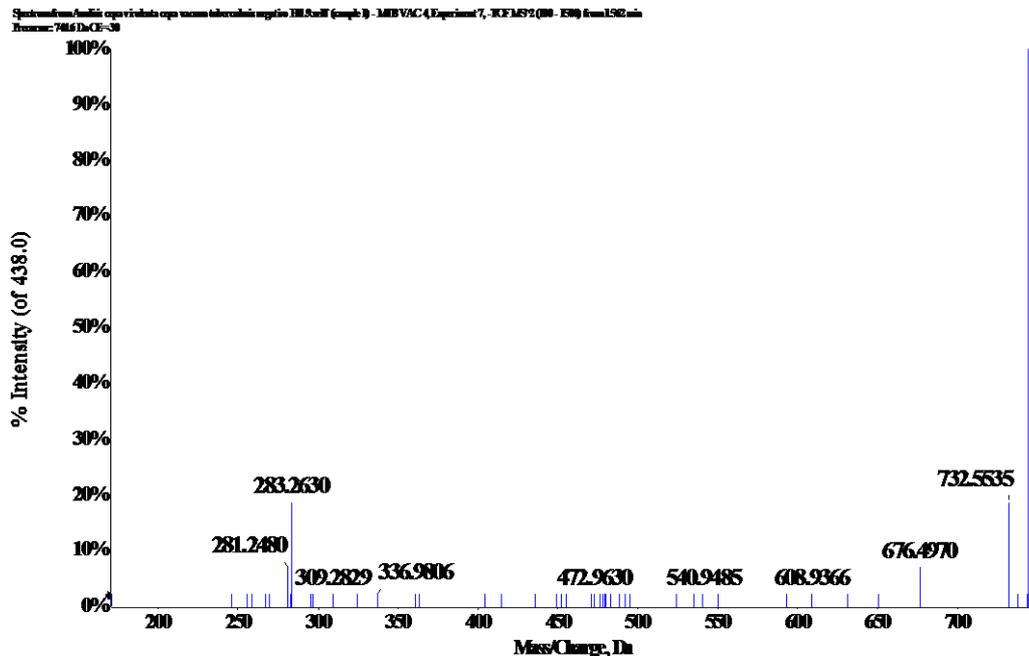


Figura 67. Espectro de fragmentación del metabolito con m/z 744.5553 a una EC -30 V.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

El metabolito 746.5670 presentó un tiempo de retención de 1.61 minutos, indicando de nuevo que se trataba de una molécula apolar. Una de las fórmulas moleculares probables fue $C_{41}H_{82}NO_8P$ con un error de masas de -3.1 ppm. El espectro de fragmentación obtenido puede verse en la figura 68 y presentaba un fragmento de 283, como en el caso del fragmento anterior de la FE, resultado de un ácido graso oleico. De ellos se infiere, que quizás se tratara de un fosfolípido, ya que además su tiempo de retención se correspondía con esta clase de moléculas y las bases de datos nos proponían como posible una FE. A partir de estos resultados podemos proponer la estructura $FE(R1CO_2H+R2CO_2H=36:0)$.

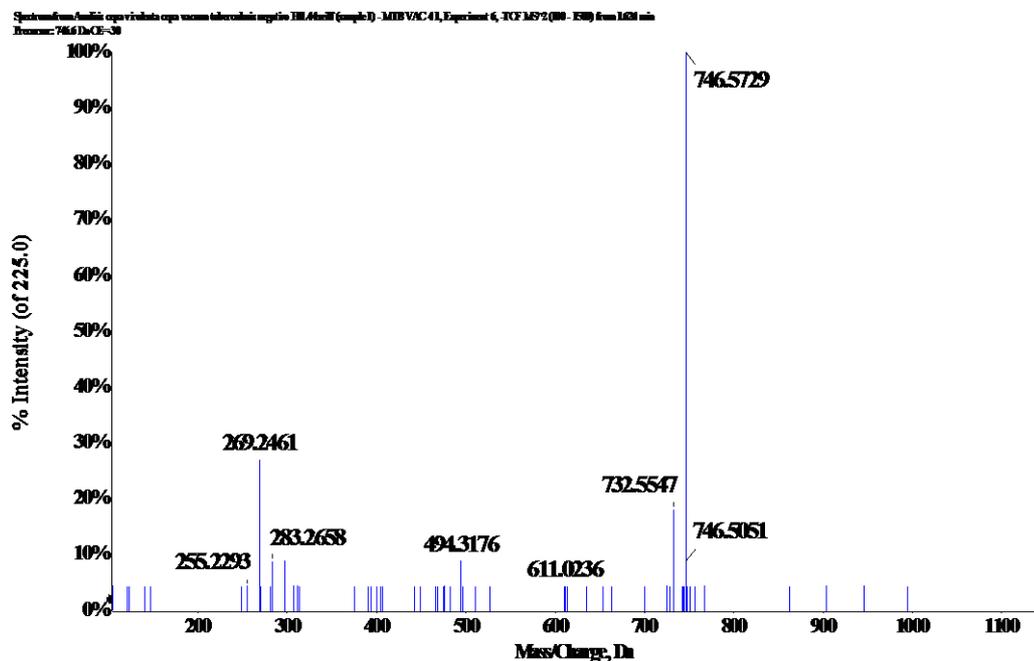


Figura 68. Espectro de fragmentación m/z 746.5670 a una EC -30 V.

El siguiente metabolito con m/z 747.5159 apareció aumentado unas tres veces en la cepa MT103, a un tiempo de retención de 1.70 minutos, le fue asignada la fórmula $C_{40}H_{75}O_{10}P$, con un error de masas de una ppm. A partir de esa fórmula y con la información de las diferentes bases de datos parecía que podría tratarse de un fosfolípido, en este caso, de la familia de FG. Además se revisó el espectro de fragmentación obtenido, que puede verse en la figura 69, donde destacan por intensidad los fragmentos 281 y 255, que podían corresponder con dos ácidos grasos, lo que nos permite proponer como estructura tentativa, $FG(16:0/18:1(9Z))$. Con la comparación en la base de datos NIST de los fragmentos del patrón adquirido con un equipo de alta resolución QTOF de la marca Agilent a una EC de -27 voltios (figura 70) podemos sugerir

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

que este fosfolípido podría tratarse de la misma molécula, utilizando de apoyo para esta afirmación también la relación isotópica y el tiempo de retención del metabolito.

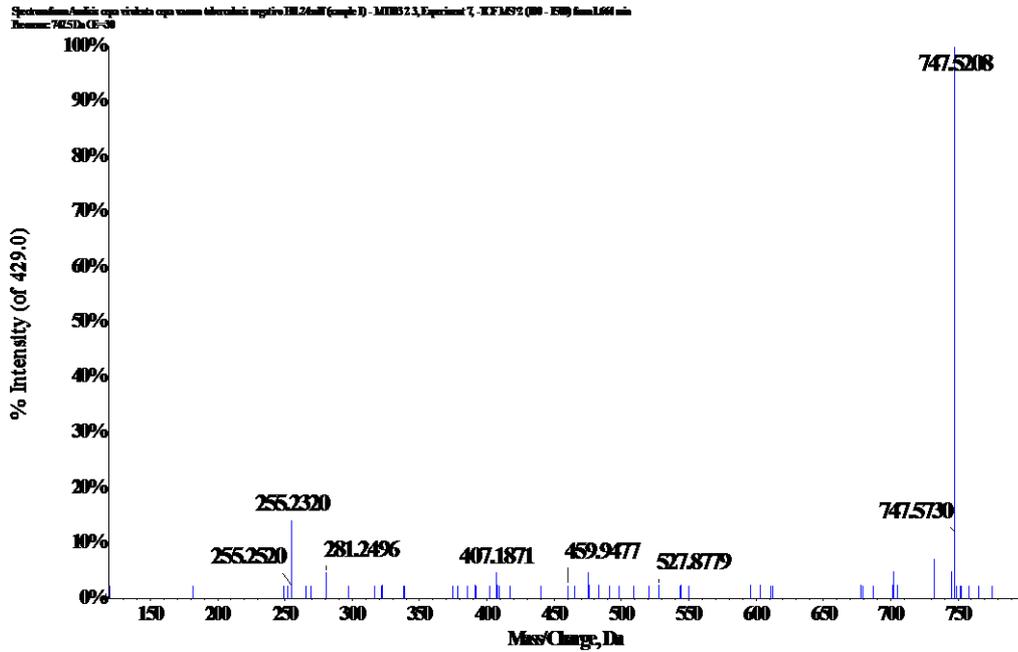


Figura 69. Espectro de fragmentación para la m/z 747.5159 a una EC de -30 V.

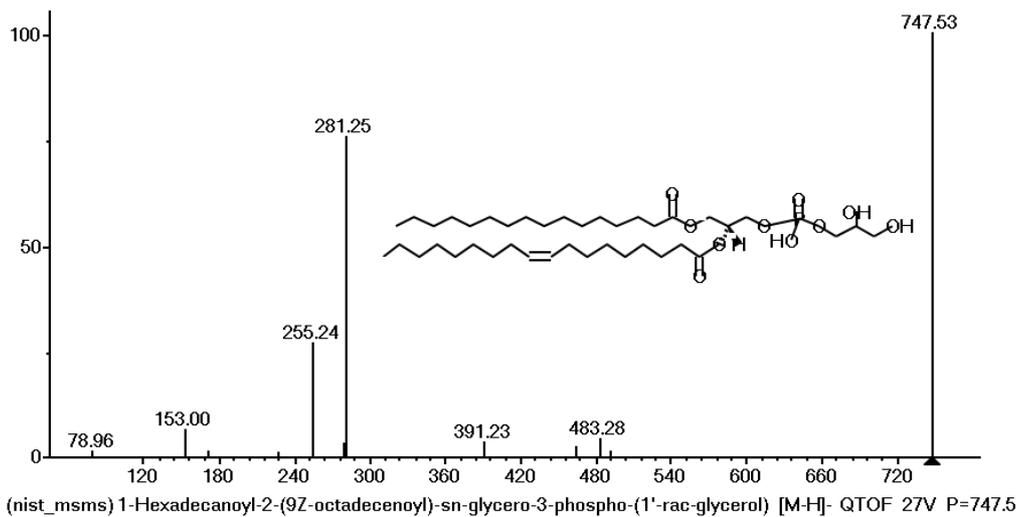


Figura 70. Espectro de fragmentación de la NIST para FG(16:0/18:1(9Z)) a EC -27 V. Eje x: m/z, eje y: Intensidad (%).

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

A un tiempo mínimo de retención de, 1.6 minutos encontramos el metabolito con m/z 786.5276 que apareció aumentado en la cepa de la vacuna. No se pudo obtener espectro de fragmentación. Se consultaron diversas bases de datos, para la fórmula $C_{41}H_{76}NO_8P$, con la unión de una molécula de ácido fórmico y pérdida de un protón en la ionización y un error de masas de -1.9 ppm, sugerimos que podría tratarse de un fosfolípido de nuevo de la familia FE, cuya estructura podría ser FE (R1CO₂H+R2CO₂H=36:3).

El metabolito m/z 835.5325 apareció a un tiempo de retención de 2.74 minutos y estaba aumentado en la cepa MTBVAC con una diferencia de más de tres veces. La asignación de la fórmula molecular nos devolvió $C_{43}H_{81}O_{13}P$ con un error de masas de -2.0 ppm. Se le trató de atribuir una posible estructura visitando distintas bases de datos, en las que varias proponían un fosfolípido de la familia de FI. A partir del espectro de fragmentación obtenido (figura 71) y comparándolo con un espectro adquirido de un patrón de FI (16:0/18:(9Z)) empleando el equipo Orbitrap de Thermo a una energía de colisión de -42 voltios (figura 72), pudimos comprobar el parentesco entre ambos espectros, presentando como fragmentos comunes los, 152, 241, 391, 417 y 579. La similitud entre los espectros de fragmentación, prácticamente nos confirma esta molécula, como el metabolito diferencial obtenido.

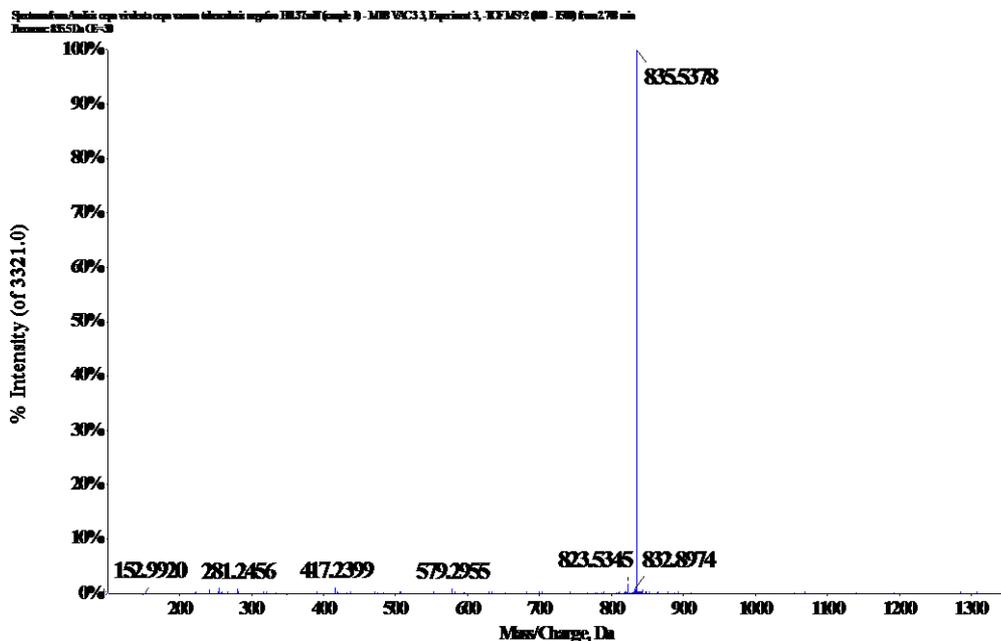


Figura 71. Espectro de fragmentación del metabolito con m/z 835.5325 a una EC de -30 V. Eje x: m/z; eje y: Intensidad (%).

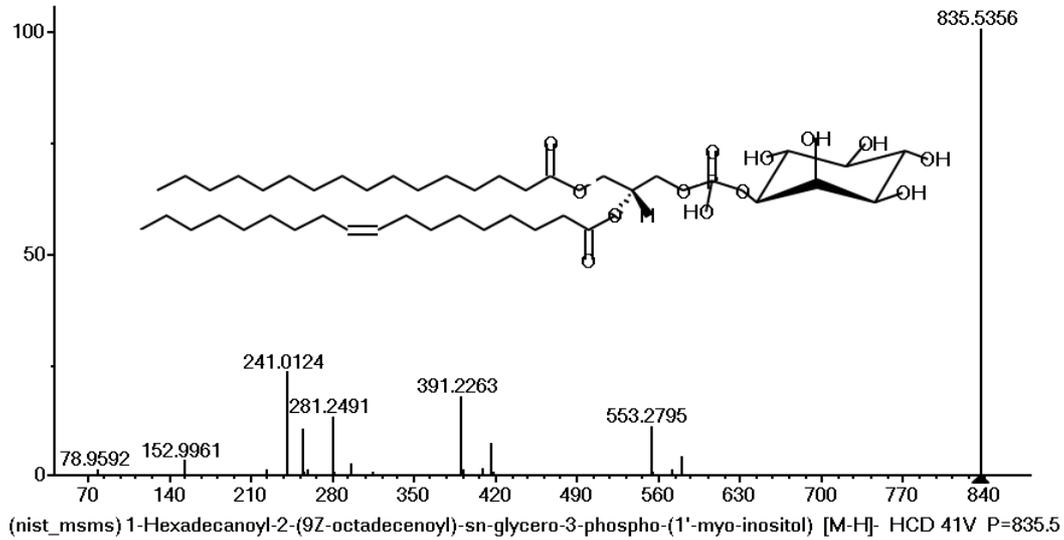


Figura 72. Espectro de la base de datos NIST para FI(16:0/18:1(9Z)) a una EC de -41 V.

A un tiempo de retención muy parecido de 2.79 minutos igualmente presente en mayor cantidad de más de tres veces en la cepa modificada genéticamente se identificó el metabolito con m/z de 837.5477. La asignación de una fórmula molecular para este metabolito fue $C_{43}H_{83}O_{13}P$, muy parecida a la fórmula obtenida para el metabolito anterior, con dos hidrógenos más, y con un error de masas de -2.6 ppm. Esto nos indicaba que podría tratarse de una estructura similar a la anterior, excepto la diferencia de un ácido graso insaturado, por uno de tipo saturado. Con la consulta de distintas bases de datos, se apoyaba esta hipótesis proponiéndonos la identidad de la molécula como un fosfolípido de la familia de FI, con diferentes estructuras dependiendo de la longitud de las cadenas de ácidos grasos. La comparación del espectro de fragmentación con la molécula anterior (figura 73) coincidía en algunos fragmentos y en otros podría verse claramente la suma de los 2 hidrógenos, por lo que podemos pensar que se trata de la misma FI pero sin el enlace doble FI (16:0/18:0).

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

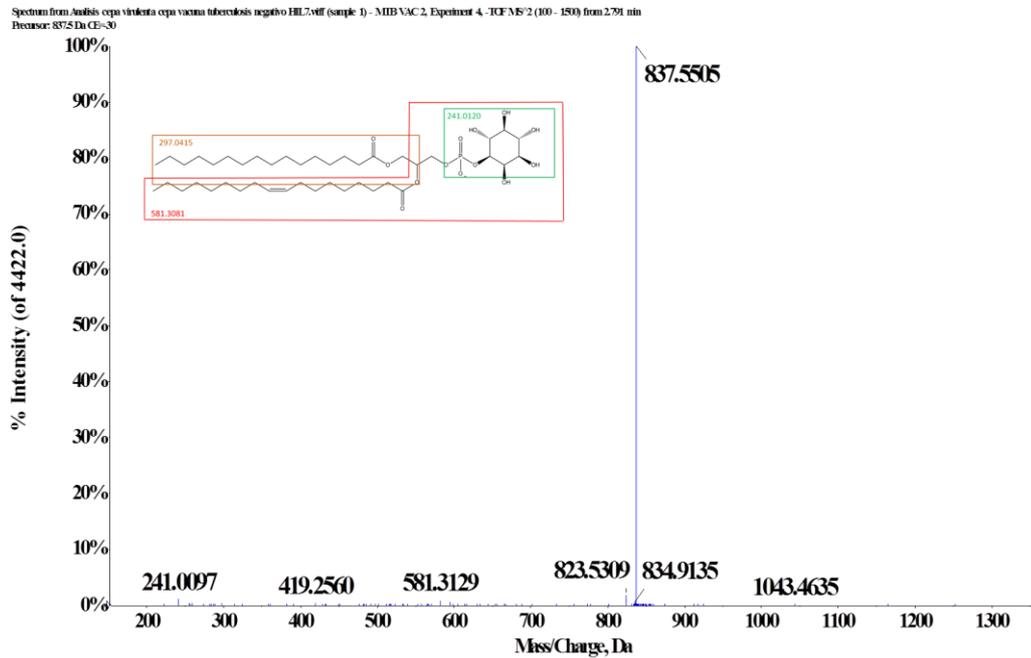


Figura 73. Espectro de fragmentación para el metabolito m/z 837.5477 a una EC de -30 .V

La molécula con m/z 865.5763 fue encontrada aumentada en la cepa vacuna. Se le trató de asignar una fórmula molecular con un error de masas menor, en este caso fue de -1.1 ppm para $C_{45}H_{87}O_{13}P$. La búsqueda en diferentes bases de datos nos proporcionó la identidad de un fosfolípido de la familia de FI que presentaría la estructura FI(R1CO2H+R2CO2H=36:0). El tiempo de retención obtenido fue de 2.88 minutos, lo que concuerda con la identificación tentativa obtenida. Su espectro de fragmentación puede verse en la figura 74 y, como en los espectros anteriores, presenta un fragmento característico de 241.0097 que corresponde al grupo inositol unido con el grupo fosfato.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

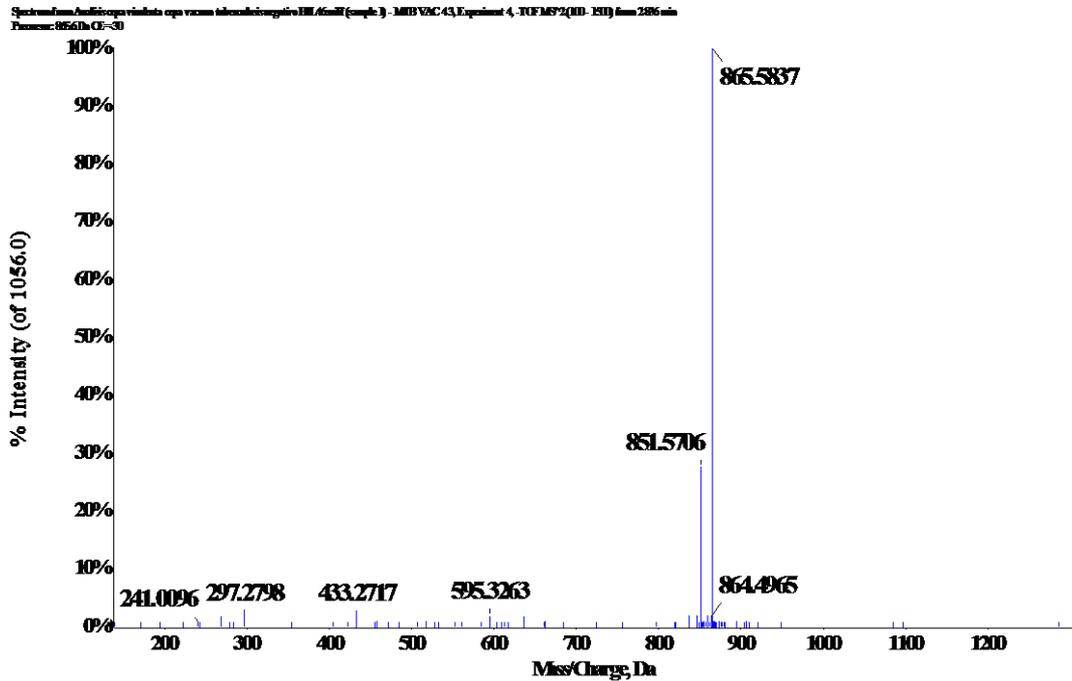


Figura 75. Espectro de fragmentación para el metabolito con m/z 865.5837 a una EC de -30 voltios.

El siguiente metabolito que se trató de identificar, se encontró a un tiempo de retención similar a los anteriores, con una m/z de 903.5199, por lo que también podría ser una molécula con características parecidas a las anteriores. La asignación de la fórmula nos sugería muchas posibilidades, de ahí que intentáramos quedarnos con una que encajará muy bien su relación isotópica y con un error de masas bajo, en esta caso fue de 4.0 ppm para la siguiente fórmula molecular $C_{45}H_{79}O_{13}P$. A partir de esa fórmula molecular, teniendo en cuenta su tiempo de retención, la consulta en las bases de datos y los espectros obtenidos por la fragmentación (figura 76) podríamos proponer como estructura posible de nuevo un fosfolípido de la familia de FI. Aquí no podemos especificar en el número de átomos de carbono de las cadenas de ácido grasos, por lo que indicaríamos que se trata de esta estructura $FI(R1CO_2H+R2CO_2H=36:4)$. La identificación tentativa con la ionización en negativo pudo llevarse a cabo gracias a la posible formación de un aducto, que consistió en la captura de una molécula de ácido fórmico y en la pérdida de un protón.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

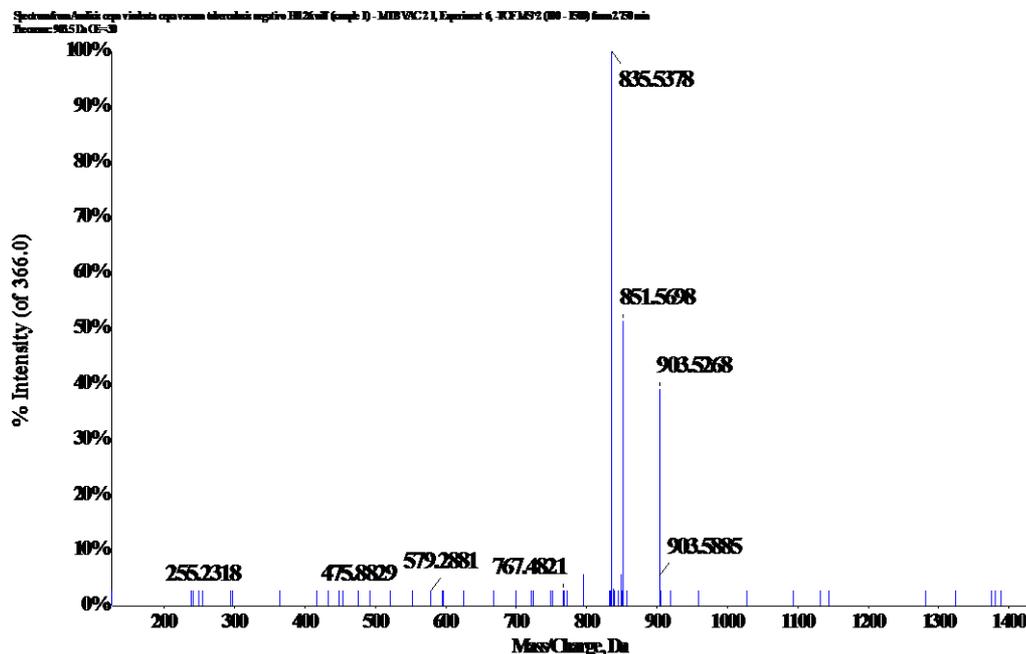


Figura 76. Espectro de fragmentación para el metabolito m/z 903.5199 a una EC de -30 V.

La última molécula que pudimos identificar durante este análisis, también fue un metabolito que tuvo poca retención en la columna, lo que sugería su naturaleza apolar. De este modo, la m/z obtenida fue de 905.5352, y la fórmula molecular que pudimos asignar con un error de masas de cuatro ppm fue $C_{45}H_{81}O_{13}P$, muy parecida a la del metabolito anterior, esta vez con dos hidrógenos más.

El espectro de fragmentación aparece en la figura 77, y como puede observarse, igualmente, guarda cierta similitud con la molécula diferencial anterior, por lo que la identificación tentativa, propuesta para esta molécula fue la de un fosfolípido, también de la familia de fosfatidilinositol que presentaría esta estructura $PI(R1CO_2H+R2CO_2H=36:3)$. La forma ionizada en modo negativo para este análisis la obtuvimos con la captura de una molécula de ácido fórmico y pérdida de un protón, como en el caso de la molécula anterior.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

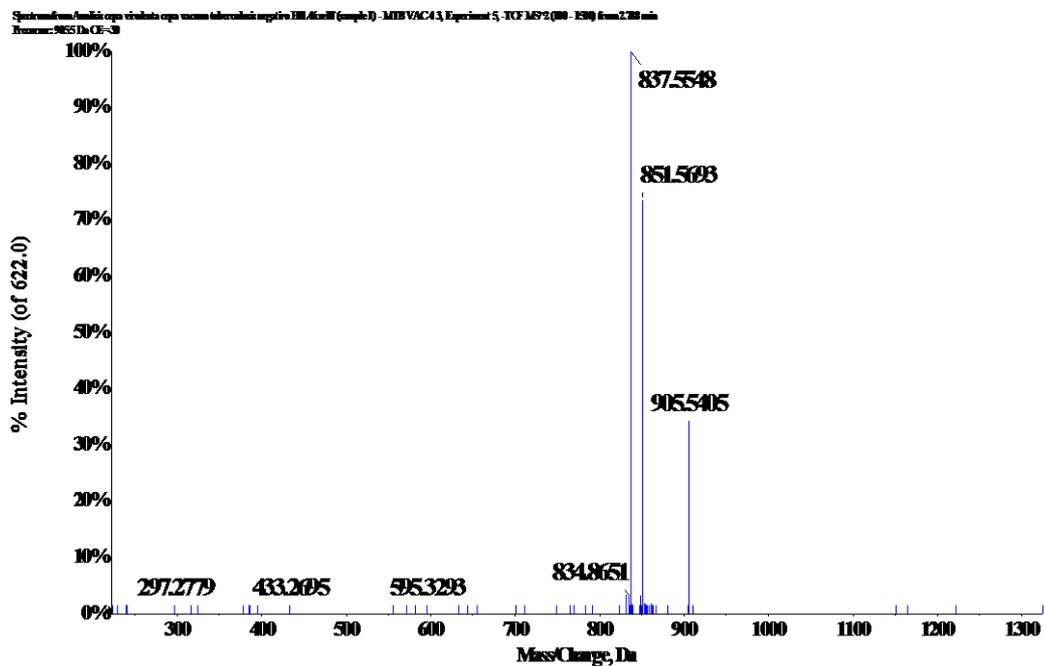


Figura 77. Espectro de fragmentación para el metabolito m/z 905.5352 a una EC de -30 V.

4.5. Identificación de metabolitos en metabolómica no dirigida (Endometaboloma)

Después de realizar los cuatro análisis y su evaluación de los mismos para tratar de asignar la identidad de los metabolitos diferenciales, se ha podido atribuir una estructura para un total de 36 de ellos con distintos niveles de identificación. El número de metabolitos al que se le ha podido dar una asignación molecular ha sido muy diferente en cada uno de los análisis. La cromatografía HILIC con modo de ionización negativo fue el análisis en el que se identificaron el mayor número de metabolitos. Sin embargo, en el análisis con cromatografía HILIC con ionización positiva solamente fue posible la identificación de una molécula.

Para el análisis con cromatografía reversa y modo de ionización positiva se identificaron seis moléculas, 1-tuberculosiniladenosina, tres fosfatidilinositoles, FI(R1CO₂H+R2CO₂H=37:0), FI(R1CO₂H+R2CO₂H=38:0), FI(R1CO₂H+R2CO₂H=40:5), fosfatidiletanolamina FE(R1CO₂H+R2CO₂H=42:7) y por último DFPG(18:1(9Z)/18:1(9Z)). En el análisis con cromatografía reversa y modo de ionización negativo han sido identificadas un total de nueve moléculas que serían las siguientes 2-sulfotrehalosa, tres fosfatidilinositoles, FI(R1CO₂H+R2CO₂H=40:2), FI(R1CO₂H+R2CO₂H=42:4), FI(R1CO₂H+R2CO₂H=44:2), dosfosfatidilglicerol, FG(R1CO₂H+R2CO₂H=37:0) y FG(R1CO₂H+R2CO₂H=38:0), un triglicérido, una molécula de glicerofosfoinositol fosfato y por último la molécula micobactina + hierro (R=20:1). En el análisis usando cromatografía HILIC y modo de ionización positivo solo fue posible la identificación de un metabolito que correspondía a una molécula de micotiol conjugada con otra molécula. Por último en el proceso de identificación llevado a cabo a partir del análisis de cromatografía HILIC con modo de ionización negativo se pudo asignar la siguiente identidad molecular a los metabolitos diferenciales, glutamina, glutámico, manitol, trehalosa-6-fosfato, NAD, seis clases de fosfatidilinositoles, se detallan a continuación FI(16:0/0:0), FI(16:0/18:0), FI(16:0/18:1(9Z)), FI(R1CO₂H+R2CO₂H=36:0), FI(R1CO₂H+R2CO₂H=36:4), FI(R1CO₂H+R2CO₂H=36:3), siete clases de fosfatidiletanolaminas, que serían FE(16:0/16:0), FE(16:0/18:0), FE(16:0/18:1(9Z)), FE(18:0/18:1(9Z)), FE-N-Me(16:0/16:0), FE(R1CO₂H+R2CO₂H=36:0), FE(R1CO₂H+R2CO₂H=36:3) y por último una molécula de fosfatidilglicerol, FG(16:0/18:1(9Z)).

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

La mayoría de moléculas identificadas corresponden a lípidos, a moléculas de naturaleza apolar. Aunque la elección de los cuatro métodos analíticos pretendía cubrir el rango metabolómico de moléculas de bajo peso molecular y con distinta naturaleza química, realmente se identificaron muy pocas moléculas polares, por un lado, es lógico si se considera que el 60% de la composición de *Mycobacterium tuberculosis* corresponde a estructuras lipídicas y así mismo es obligado subrayar que el 75% de las moléculas polares identificadas se hizo utilizando una cromatografía que favorece la retención de moléculas polares. Todas las moléculas con la m/z que han sido identificadas, su forma ionizada, el error de masas, su estructura tentativa, su nivel de clasificación, el análisis en el que ha sido determinada, las veces de cambio y su p. valor corregido se muestran en las tablas 11 y 12.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

Tabla 11. Metabolitos lipídicos diferenciales entre MT103 y MTBVAC. Las veces de cambio positivas indican que los metabolitos están aumentados para la cepa MT103 y las negativas indican que están aumentadas en la cepa MTBVAC.

Estructura tentativa	m/z	Aducto	CL	Tiempo retención	Δ ppm	(FDR)	Veces de cambio	Clasificación Schhymanski y col.
DGPF(18:1(9Z))/18:1(9Z))	413.2247	+2 Na	Reversa	5.50	1.00	8.0E-03	12.80	Nivel 2
FI(16:0/0:0)	571.2871	-H	HILIC	3.27	-2.30	2.7E-07	-2.03	Nivel 2
FE(16:0/16:0)	690.5047	-H	HILIC	1.58	-1.60	5.0E-03	-2.94	Nivel 2
FE-NMe(16:0/16:0)	704.5236	-H	HILIC	1.58	-1.30	3.1E-03	-4.55	Nivel 2
FE(16:0/18:1(9Z))	716.5228	-H	HILIC	1.55	-1.10	4.1E-03	-3.57	Nivel 2
FE(16:0/18:0)	718.5360	-H	HILIC	1.59	-2.10	8.4E-03	-3.03	Nivel 2
FE(R1CO2H+R2CO2H=35:1)	730.5395	-H	HILIC	1.55	0.10	9.1E-03	-2.67	Nivel 3
FE(R1CO2H+R2CO2H=36:1)	744.5553	-H	HILIC	1.54	-0.40	1.8E-02	-2.47	Nivel 3
FE(R1CO2H+R2CO2H=36:0)	746.5670	-H	HILIC	1.61	-3.10	1.2E-02	-2.94	Nivel 3
FG(16:0/18:1(9Z))	747.5159	-H	HILIC	1.71	-3.00	1.2E-05	3.06	Nivel 2
FE(R1CO2H+R2CO2H=36:3)	786.5276	-H	HILIC	1.60	-1.90	7.2E-03	-3.66	Nivel 3
FG(R1CO2H+R2CO2H=38:0)	805.5985	-H	Reversa	14.47	1.20	1.7E-05	-24.39	Nivel 3
FG(R1CO2H+R2CO2H=37:0)	823.6067	+FA-H	Reversa	12.15	0.40	3.0E-05	-58.80	Nivel 3
FI(16:0/18:1(9Z))	835.5325	-H	HILIC	2.74	-2.00	2.9E-04	-3.33	Nivel 2
FI(16:0/18:0)	837.5477	-H	HILIC	2.79	-2.60	1.2E-03	-3.23	Nivel 2
TG(R1CO2H+R2CO2H+R3CO2H=48:6)	839.6409	+FA-H	Reversa	12.82	0.20	1.7E-07	-15.15	Nivel 3
FE(R1CO2H+R2CO2H=42:7)	846.6026	+H	Reversa	12.07	-1.00	5.3E-05	-16.67	Nivel 3
FI(R1CO2H+R2CO2H=37:0)	847.6066	+H-H2O	Reversa	13.24	0.00	8.0E-03	-11.63	Nivel 3
FI(R1CO2H+R2CO2H=38:0)	861.6226	+H-H2O	Reversa	13.85	1.20	8.0E-03	-10.00	Nivel 3
FI(R1CO2H+R2CO2H=40:5)	863.5814	+H-2H2O	Reversa	13.27	0.60	1.2E-02	-8.07	Nivel 3
FI(R1CO2H+R2CO2H=36:0)	865.5763	-H	HILIC	2.88	-1.10	4.6E-03	-3.57	Nivel 3
FI(R1CO2H+R2CO2H=36:4)	903.5199	+FA-H	HILIC	2.74	4.00	7.5E-04	-4.34	Nivel 3
FI(R1CO2H+R2CO2H=36:3)	905.5352	+FA-H	HILIC	2.78	4.00	1.3E-03	-3.70	Nivel 3
Mbt +Fe (R=20:1)	921.4509	-H	Reversa	6.05	-2.60	1.4E-07	11.30	Nivel 2
FI(R1CO2H+R2CO2H=42:3)	925.6127	-H	Reversa	11.01	5.00	1.9E-06	-10.10	Nivel 3
FI(R1CO2H+R2CO2H=44:2)	927.6259	-H2O-H	Reversa	13.34	-3.40	1.4E-07	-12.98	Nivel 3
FI(R1CO2H+R2CO2H=40:2)	937.599	+FA-H	Reversa	13.34	-3.70	1.1E-07	-18.52	Nivel 3
FIF(R1CO2H+R2CO2H=38:3)	1013.5347	+FA-H	Reversa	5.66	0.60	1.2E-05	-2.95	Nivel 3

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

Tabla 12. Metabolitos no lipídicos entre MT103 y MTBVAC. Las veces de cambio positivas indican que los metabolitos están aumentados para la cepa MT103 y las negativas indican que están aumentadas en la cepa MTBVAC.

Estructura tentativa	m/z	Aducto	CL	Tiempo retención	Δ ppm	FDR	Veces de cambio	Clasificación Shymanski y col.
Glutamina	145.0624	-H	HILIC	4.13	3.0	1.60E-07	2.86	Nivel 2
Glutamato	146.0466	-H	HILIC	3.83	2.0	7.89E-08	2.01	Nivel 2
Manitol	181.0718	-H	HILIC	3.78	0.2	7.89E-08	12.34	Nivel 1
2-Sulfotrehalosa	421.0654	-H	Reversa	1.52	0.1	7.82E-06	2.08	Nivel 2
Trehalosa 6-fosfato	421.0747	-H	HILIC	6.10	-1.3	1.60E-07	-2.63	Nivel 2
Conjugado de micotiol	487.1588	+H	HILIC	2.61	-0.9	7.74E-03	>52.49	Nivel 2
1-Tuberculosinil adenosina	540.3536	+H	Reversa	8.56	-0.8	4.40E-02	-2.86	Nivel 2
NAD+	662.0997	-H	HILIC	5.85	-0.5	4.57E-07	2.05	Nivel 2

Las demás moléculas que no pudieron ser identificadas en cada uno de los análisis y que habían sido seleccionadas en el estudio por ser diferenciales significativamente y por presentar diferencias de más de dos veces de cambio pueden verse en las tablas 13-16. En los casos en los que la molécula pudo ser fragmentada, se han añadido los principales fragmentos que presentaban una mayor intensidad.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

Tabla 13. Señales no identificadas obtenidas diferenciales en el análisis con reversa positiva modo de ionización positivo.

m/z	Fragmentos	Carga	Tiempo retención	p. valor (FDR)	Veces de cambio
435.2380	704.3790, 451.2198, 133.0832, 103.0370	2	5.59	8.18E-03	16.00
457.2518	645.3442, 557.2856, 133.0869, 103.0366	2	5.64	8.18E-03	13.90
479.2650	704.3623, 297.1484, 219.1209, 103.0381	2	5.71	8.28E-03	11.60
501.2777	706.3909, 235.1151, 133.0816, 103.0373	2	5.78	1.28E-02	8.70
635.3707	No fragmentación	1	5.60	2.97E-02	-4.00
676.3404	No fragmentación	1	5.24	2.60E-02	8.50
679.4009	1103.6124, 670.8859, 662.3744, 133.0864	2	5.67	2.26E-02	-4.50
680.3686	663.3440, 323.1665, 279.1467, 103.0382	1	5.38	2.26E-02	8.90
720.3664	703.3403, 657.3334, 407.1923, 103.0365	1	5.33	1.64E-02	11.20
723.4224	1164.6729, 714.9160, 239.1487, 133.0866	2	5.75	1.90E-02	-5.30
724.3950	707.3670, 661.3697, 279.1427, 177.1093	1	5.46	1.16E-02	12.00
764.3904	747.3670, 701.3652, 451.2121, 363.1697	1	5.43	8.28E-03	14.80
767.4498	1384.8092, 758.9383, 767.4563, 750.4215	2	5.83	1.28E-02	-6.30
768.4251	751.3940, 411.2228, 235.1171, 147.0638	1	5.55	8.17E-03	15.40
769.3460	764.3952, 711.3417	1	5.41	8.17E-03	21.80
774.4357	970.5442, 765.9296, 757.4173, 446.2589	2	5.93	4.45E-02	-3.70
825.6275	753.5809, 735.5737, 717.5618, 187.0753	1	13.24	2.26E-02	-10.10
852.4388	835.4183, 407.1917, 279.1439, 235.1147	1	5.57	8.17E-03	25.30

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

Tabla 14. Señales no identificadas obtenidas diferenciales en el análisis con cromatografía reversa y modo de ionización negativo.

m/z	Fragmentos	Carga	Tiempo retención	p. valor (FDR)	Veces de cambio
525.2192	467.2135, 423.1976	-1	5.24	1.23E-04	3.1
529.2478	No fragmentación	-1	5.41	4.66E-06	4.2
569.2419	525.2615, 511.2418, 467.2176, 75.0121	-1	5.37	3.48E-06	3.8
573.2732	573.2767, 529.2922, 515.2695	-1	5.52	1.24E-06	5.2
584.3440	538.3423, 406.2971, 134.0465	-1	8.89	1.69E-06	-3.5
613.2664	569.2822, 555.2640, 511.2397	-1	5.48	1.58E-06	5.2
617.2983	559.2954, 515.2761, 339.1849	-1	5.63	3.57E-07	7.1
652.3269	606.3235, 134.0473, 112.9842	-1	8.93	9.92E-05	-3.4
657.2932	599.2925, 555.2696	-1	5.52	3.57E-07	6.8
661.3247	603.3242, 559.2965, 427.2210	-1	5.73	2.13E-07	10.2
702.3238	644.3181, 600.2931, 363.3760	-1	5.68	3.57E-07	9.6
705.3521	647.3495, 603.3350	-1	5.81	1.31E-07	12.2
723.3005	701.3247, 625.3074, 273.1265	-1	5.70	1.38E-07	8.8
789.3738	731.3710, 687.3423, 365.1787	-1	5.84	1.28E-07	12.6
793.4011	735.4012, 691.3732	-1	5.97	1.11E-07	14.3
837.4302	779.4296	-1	6.02	1.38E-07	11.7
839.6409	824.6192, 752.5454	-1	12.84	1.66E-07	-15.2
855.3825	833.4109, 775.3990	-1	5.92	1.11E-07	13.7
881.4550	837.4886, 823.4646	-1	6.09	3.57E-07	6.5
883.6280	837.6272, 579.2930, 303.2325, 241.0116	-1	13.95	1.28E-07	-12.2
885.6111	825.6869, 825.6869, 303.2340, 241.0116	-1	10.98	2.00E-06	-7.0
899.4088	877.4347, 705.0854, 409.2358	-1	5.99	1.31E-07	12.6
901.6047	837.5933, 833.5229, 819.5835, 213.0551	-1	11.55	1.77E-07	-21.6
905.0859	847.1383, 869.1114, 689.0478, 685.0736	-1	1.78	1.74E-05	2.1
965.4810	907.4764, 806.0284, 599.4125	-1	6.10	3.57E-07	11.3
1009.4954	951.4980, 917.4375, 765.5227	-1	6.15	1.27E-05	5.5
1057.5527	1027.5319, 1012.8414, 680.5001, 588.2288	-1	5.71	5.88E-06	-3.0
1233.6597	1159.6132, 1101.1691, 741.6350	-1	5.92	8.83E-07	-7.4
1247.6463	1217.5735, 713.2941	-1	6.01	9.92E-05	-2.4
1277.6876	No fragmentación	-1	5.96	1.73E-06	-8.1
1291.6682	No fragmentación	-1	6.04	1.74E-05	-2.9
1423.7437	No fragmentación	-1	6.15	1.19E-06	-7.6
1437.7236	No fragmentación	-1	6.26	1.18E-04	-2.9

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

Tabla 15. Lista de señales no identificadas obtenidas diferenciales en el análisis con cromatografía HILIC y modo de ionización positivo.

m/z	Fragmentos	Carga	Tiempo retención	p. valor (FDR)	Veces de cambio
415.7021	665.2988, 623.2908, 579.2638, 133.0853	2	1.61	2.44E-02	19.6
579.5307	123.1178	1	2.87	1.26E-02	-4.0
606.3708	586.3430, 287.1485, 177.1127, 133.0856	2	2.53	1.07E-02	-2.8
630.8619	1111.6090, 106.5811, 1023.5574, 622.3470	2	2.55	6.00E-03	-3.6
681.8761	1213.6417, 1169.6161, 1125.5908, 673.3637	2	2.44	2.98E-03	-5.6
710.8767	1125.5873, 702.3657, 495.2424, 451.2173	2	2.34	2.43E-02	-2.7
725.9020	1257.6654, 1213.6411, 1125.5838, 717.3881	2	2.46	1.95E-03	-6.7
762.9409	No fragmentación	2	2.64	2.98E-03	-4.9
776.9148	No fragmentación	2	2.39	4.79E-03	-4.7
796.4500	No fragmentación	2	2.39	2.98E-03	-4.6
804.4850	1397.8083, 795.9723, 787.4606, 177.1122	2	2.64	2.92E-03	-5.4
820.9449	No fragmentación	2	2.42	1.95E-03	-7.1
825.4585	No fragmentación	2	2.32	1.94E-02	-2.5

Tabla 16. Señales no identificadas obtenidas diferenciales en el análisis con cromatografía HILIC y modo de ionización negativo.

m/z	Fragmentos	Carga	Tiempo retención	p. valor (FDR)	Veces de cambio
299.0670	281.0570, 255.0754, 207.0737, 193.0588	-1	3.49	4.97E-06	2.3
315.0818	168.0269, 146.0453, 128.0348, 102.0558	-1	3.83	1.96E-07	3.0
324.0212	306.0121, 263.0001, 219.9864, 119.9457	-1	2.45	7.89E-07	52.5
364.8697	297.1505, 281.1108, 196.9457, 112.9845	-1	2.64	3.46E-06	2.0
600.7772	No fragmentación	-1	2.65	1.53E-05	2.1
977.0880	931.0854, 885.0809, 869.1218, 723.0183	-1	7.36	2.63E-07	2.5

4.6. Metabolómica dirigida a FIMs

A partir de los resultados obtenidos en la comparación de metabolitos intracelulares entre las cepas, hemos tenido en cuenta una de las clases mayoritarias de metabolitos identificadas pertenecientes a la familia de fosfolípidos FI, además de su presencia aumentada en la cepa atenuada. Se planteó la posibilidad de que este incremento podía tener una relación directa con la producción de derivados de determinados glicolípidos, concretamente de FIMs. Por lo mismo que se propuso realizar un estudio más extenso para este tipo de moléculas, desarrollando un análisis para la búsqueda dirigida de este tipo de componentes estructurales de semejante naturaleza. Además, para poder relacionar de mejor modo, la aparición de este fenotipo, se incluyeron dentro del estudio, otro tipo de cepas mutantes del gen *phoP* y las cepas parentales sin mutar, que serían la cepa H37Rv y el aislado clínico GC1237, perteneciente a los linajes cuatro y dos respectivamente.

Los FIM tienen una estructura muy homogénea y pueden contener hasta cuatro ácidos grasos y seis moléculas de manosa. Las formas predominantes son las formas triaciladas denominadas AcFIM₂ y AcFIM₆, que llevan dos y seis manosas respectivamente. FIM₂ constituye el motivo de anclaje de un componente importante de la pared celular de micobacterias, los lipoarabinomananos (LAM) y tanto FIM como LAM son agonistas de los receptores tipo Toll implicados en la inmunidad innata.^{68,71}

En la figura 78 se puede observar un espectro de masas perteneciente a la cepa MT103 y a la cepa atenuada MTBVAC obtenidos durante el análisis dirigido, donde se encuentran los iones principales en relación a FIM₂. Los principales iones monoisotópicos detectados y cuantificados pueden verse a modo de resumen en la tabla 17.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

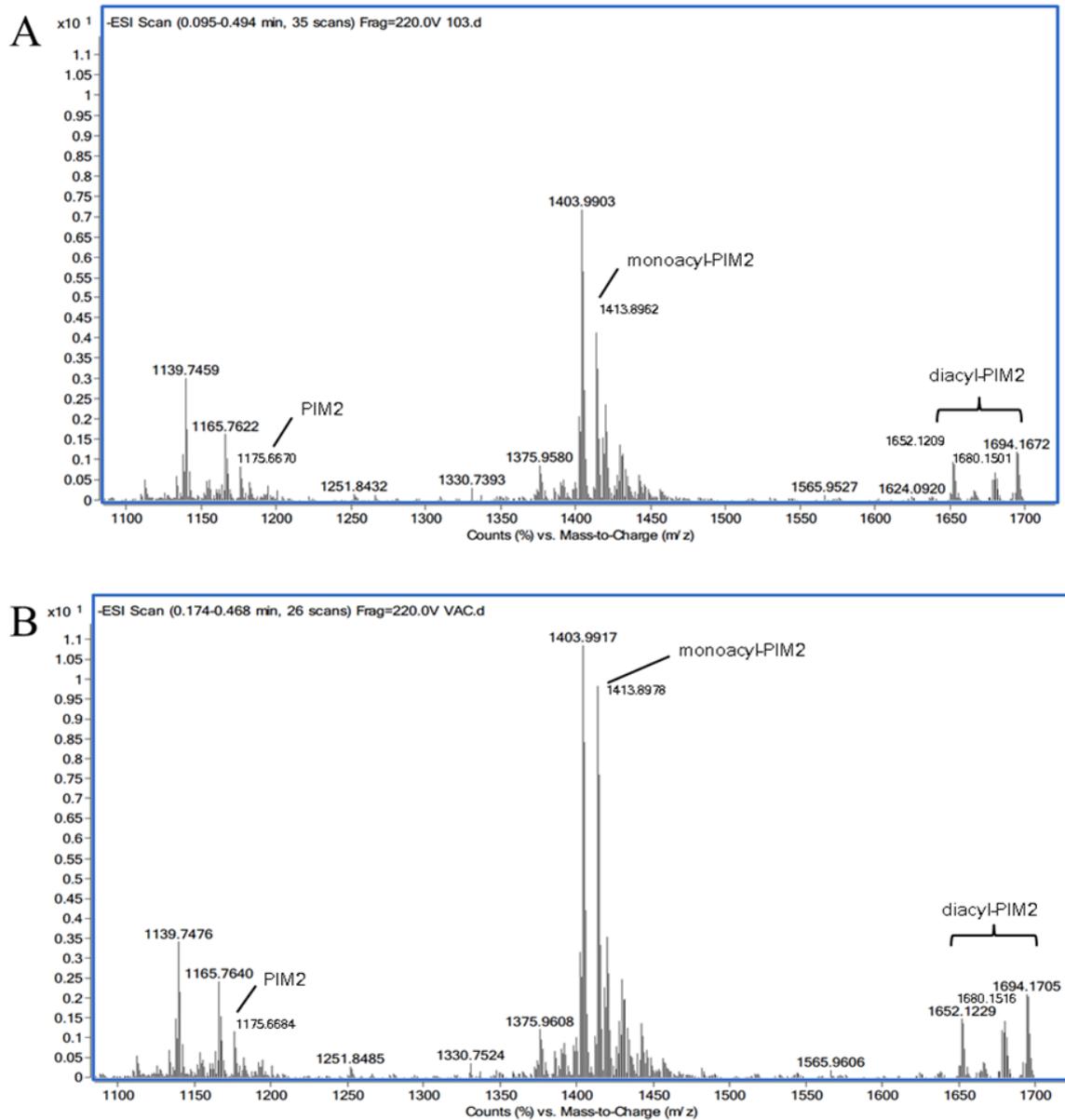


Figura 78. Análisis por EM de FIM₂ en (A) *M. tuberculosis* MT103 y (B) MTBVAC. Los ratios de FIMs entre las cepas están calculados en la tabla 18, y la identificación de las diferentes especies está detallada en la tabla 17. Los iones usados para detectar cada subclase de FIM son: para FIM₂, el ion considerado fue m/z 1175.6694; para monoacil-FIM₂, m/z 1423.8999; y para diacil-FIM₂, m/z 1652.1295, m/z 1680.1580 y m/z 1694.1798. Eje x: m/z; eje y: Intensidad (%).

Tabla 17. Identificación con EM de las principales estructuras de FIMs detectados en micobacterias. TBS: Ácido tuberculoesteárico.

FIMs	Masa exacta monoisotópica	Ácidos grasos sobre glicerol		Otros ácidos grasos*
		<i>sn-1</i>	<i>sn-2</i>	
FIM ₂	1175.6694	TBS	16:00	-
monoacil-FIM ₂	1413.8999	TBS	16:00	16:0 (inositol)
diacil-FIM ₂	1652.1295	TBS	16:00	16:0 (inositol) + 16:0 (manosa)
	1680.158	TBS	16:00	18:0 (inositol) + 18:0 (manosa)
	1694.1798	TBS	16:00	18:0 (inositol) + TBS (manosa)

A modo de resumen se muestran en la tabla 18, las diferencias en intensidades para los FIMs, en las distintas cepas de tuberculosis y sus mutantes para el gen *phoP*. En todas las cepas mutadas aparecen los FIMs en una relación mayor, algunos con una diferencia muy alta como sería el caso de FIM₂ en el mutante *phoP* de la cepa H37Rv donde esta molécula aparece hasta casi nueve veces más. Es preciso señalar que, el diacil-FIM₂ aparece 3.2 veces más aumentado y para el monoacil-FIM₂ casi no hay diferencia. En la cepa MTBVAC las tres moléculas aparecen aumentadas, aunque FIM₂ solamente en una relación de 1.1, monoacil-FIM₂ se encuentra incrementada casi dos veces y la molécula diacil-FIM₂ 1.4 veces. Finalmente, en el mutante GC1237 las tres moléculas se hallan en una mayor cantidad, FIM₂ se encontró en los análisis en una relación de casi cuatro veces mayor, y monoacil-FIM₂ y diacil-FIM₂ del orden de 1.7 y 3.2 respectivamente. Esto confirma los resultados encontrados en el análisis no dirigido.

Tabla 18. Comparación de la abundancia de FIMs en mutantes *phoP* de *M. tuberculosis* relativo a sus cepas salvajes.

Cepas	FIMs		
	FIM ₂	monoacil-FIM ₂	diacil-FIM ₂
MTBVAC versus MT103	1.1	1.8	1.4
GC1237 Δ <i>PhoP</i> versus GC1237 wt	3.9	1.7	2.4
H37Rv Δ <i>PhoP</i> versus H37Rv wt	8.9	1.1	3.2

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

A partir de estos experimentos podemos concluir que los mutantes *phoP* de las tres cepas escogidas, presentan un aumento en las moléculas de la familia de los FIMs identificadas en el análisis, por lo que parece clara la relación con la delección de este gen y su relación con la acumulación de este tipo de moléculas, debido probablemente a una menor síntesis de estructuras más complejas como serían los lipoarabinomanano.

4.7 Metabolómica dirigida a di-AMP cíclico

Como se indicó al principio, se ha puesto a punto la determinación de di-AMP cíclico, aunque los aspectos puramente técnicos se describen en material y métodos.

La validación analítica para la cuantificación di-AMP cíclico se llevó a cabo dos días distintos, para conocer la variabilidad de nuestro método analítico en el mismo día y en diferentes. Los métodos analíticos usando CL/EM deben validarse teniendo en cuenta la reproducibilidad a lo largo del tiempo. De estos resultados se obtuvo un rango lineal para su cuantificación entre las concentraciones cuya R fue siempre mayor de 0.995. El rango con objeto de llevar a cabo las determinaciones para esta molécula se estableció desde 14.8 ng/ml como límite inferior de cuantificación hasta 1896 ng/ml valor que indicaba el límite superior de cuantificación. Por lo que concierne al límite de detección obtenido para la molécula, fue igual a siete ng/ml. Durante la validación analítica se evaluaron los siguientes parámetros que medían la exactitud, precisión, especificidad y sensibilidad del método analítico desarrollado.

Una vez determinado el rango de concentración para el análisis de nuestra molécula de interés, se procedió a verificar si se producía algún tipo de arrastre de la molécula entre inyecciones de análisis consecutivas. Tras evaluar el arrastre con una muestra blanca después de la inyección del límite superior de cuantificación, se concluyó que el arrastre era eliminado después de la primera inyección de una muestra blanca, muestra que contenía solamente un solvente orgánico y agua.

Los resultados de la validación analítica para las señales obtenidas en las curvas de calibración y para los controles de calidad pueden verse a continuación (figura 79, tablas 19 y 20) para el día 1 de la validación analítica:

La ecuación de la recta obtenida fue $y = 0.000484 x + 0.000633$ ($r = 0.9970$) $1/x$

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

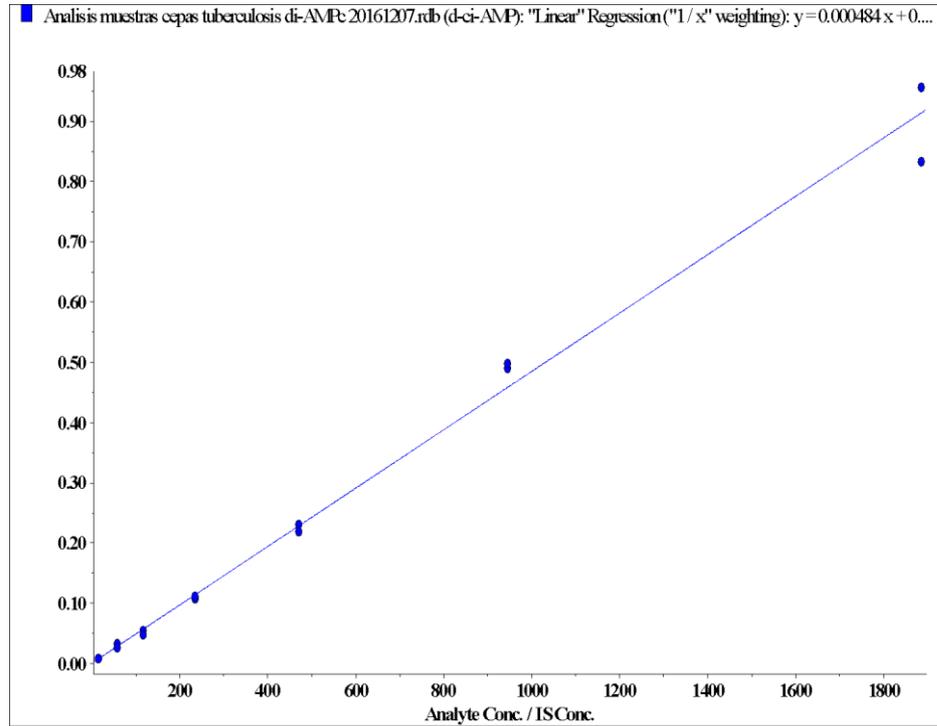


Figura 79. Curva de calibración día obtenida el primer día de la validación.
Eje x: Concentración (ng/ml); eje y: Área estándar/área estándar interno,

Tabla 19. Resumen de las concentraciones obtenidas de los estándares analíticos el día 1 de la validación.

Concentración esperada	Número de muestras	Media de la concentración calculada	% Exactitud	Coficiente de variación
14.7	2.0	16.6	113.2	7.0
58.9	2.0	58.5	99.4	16.8
118.0	2.0	104.4	88.5	8.5
236.0	2.0	224.4	95.1	2.8
472.0	2.0	462.0	97.9	3.8
945.0	2.0	1018.2	107.7	1.1
1890.0	2.0	1845.4	97.6	9.8

Tabla 20. Concentraciones obtenidas para las muestras de control de calidad preparadas para el día 1 de la validación.

Concentración esperada	Número de muestras	Media de la concentración calculada	% Exactitud	Coefficiente de variación
14.7	5.0	12.9	88.1	18.0
629.0	4.0	534.9	85.0	6.8
1890.0	6.0	1621.3	85.8	7.7

Las muestras preparadas fueron inyectadas para el análisis de di-AMP cíclico, pero lamentablemente no se obtuvo una señal cuantificable, por lo que se decidió concentrar la muestra 10 veces y volver a analizarla. Se partió de un ml de cada una de las muestras y bajo una atmósfera de nitrógeno fueron evaporadas, una vez estuvieron totalmente secas, fueron reconstituidas en 100 μ l de una mezcla de metanol/agua (50/50). Las muestras obtenidas presentaban algo de turbidez, porque algunos de sus compuestos no estaban del todo solubles, aun así, se decidió inyectarlas, suponiendo que, además, podríamos encontrarnos con problemas de supresión iónica, por el aumento de la concentración de las moléculas presentes.

En este caso si se encontró el di-AMP cíclico en todas las muestras, y aumentado claramente en todas las muestras procedentes de las cepas MTBVAC. En la figura 80 puede verse un ejemplo de un cromatograma de MTBVAC, así como la tabla 21 en la que se recogen cada una de las áreas obtenidas para cada una de las muestras analizadas, junto con la media y el coeficiente de variación obtenido en cada uno de los grupos estudiados.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

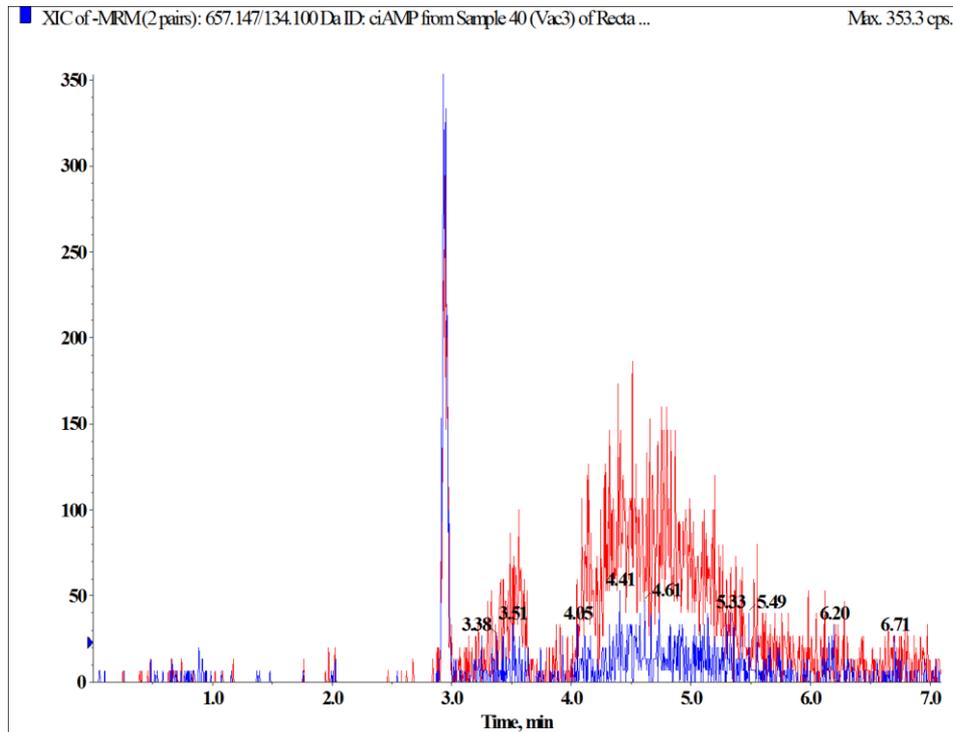


Figura 80. Cromatograma de di-AMP cíclico en una réplica de MTBVAC. Eje x: tiempo (minutos), eje y: Intensidad.

A partir de la media de las áreas de cada una de las señales obtenidas para el di-AMP cíclico se calculó la diferencia en la producción de la misma entre ambas cepas, obteniendo una producción de 3.84 veces mayor en la cepa MTBVAC. Teniendo en cuenta el valor de las áreas y el coeficiente de variación obtenidos en cada caso, podemos observar un comportamiento muy similar en las réplicas biológicas, solamente un valor del 7,74 para el coeficiente de variación entre la cepa MTBVAC y del 19,01 en la cepa MT103, un poco más alto en este caso, pero aceptable, si tenemos en cuenta que en los análisis por espectrometría de masas puede considerarse hasta un 20% de variabilidad analítica. Es necesario destacar que las señales detectadas para c-di-AMP en la cepa MT103 están cerca del nivel de ruido, por lo que no entrarían dentro de nuestro límite de cuantificación, aunque sí de detección. Por esta razón, no se puede hacer una cuantificación absoluta. Se han comparado las áreas y calculado las veces de cambio de diferencia entre ambas cepas.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

Tabla 21. Relación de áreas obtenidas entre MT103 y MTBVAC por el análisis por CL/MS

Cepas	Area	Altura	Media	Desviación estándar	Coefficiente variación
MT103 1	166.0	66.0			
MT103 2	211.0	93.0			
MT103 3	283.0	75.0	221.2	42.1	19.0
MT103 4	216.0	81.0			
MT103 5	230.0	96.0			
MTBVAC 1	941.0	316.0			
MTBVAC 2	778.0	346.0			
MTBVAC 3	890.0	311.0	849.6	65.7	7.7
MTBVAC 4	833.0	392.0			
MTBVAC 5	806.0	386.0			

4.8. Análisis de los sobrenadantes por cromatografía reversa y modo de ionización negativo

Se analizaron los sobrenadantes de las cinco cepas después del filtrado, se procedió a la evaluación de los tiempos de retención, la reducción a variables monoisotópicas, la eliminación de las señales provenientes de los solventes, eliminación de señales que presentaron un coeficiente de variación mayor del 30% y evaluación de la calidad del análisis. Todo este trabajo se realizó siguiendo los mismos pasos que en el resto de análisis no dirigido. Finalmente, y después de hacer la revisión de todas las señales obtenidas, se obtuvo una matriz que contenía 402 posibles candidatos. Con esta matriz y utilizando *Metaboanalyst* se pasó a la normalización, igual que en apartados anteriores, con suma, escalado de Pareto y transformado aplicando la raíz cúbica. A partir de los datos normalizados se aplicó el test multivariable de ACP (figura 81), incluyendo los cinco grupos y además utilizando solo los grupos que comprendían MTBVAC y MT103.

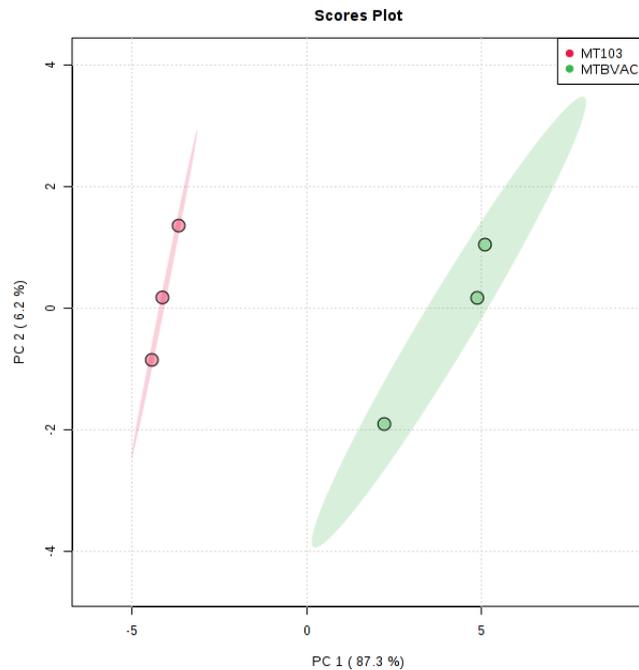


Figura 81. Análisis de componentes principales para la matriz en el análisis de cromatografía reversa y modo de ionización positivo, los círculos verdes representan cada una de las cepas de MTBVAC y los círculos rojos cada una de las cepas de MT103.

La diferenciación entre los grupos es muy evidente, pues hay dos clústers claramente diferenciados y el modelo con el uso de dos componentes explicaría un 93.5%. No se observa ningún *outlier* entre las réplicas de los dos grupos. La figura 82 corresponde al ACP para los cinco grupos que se incluyeron en el análisis.

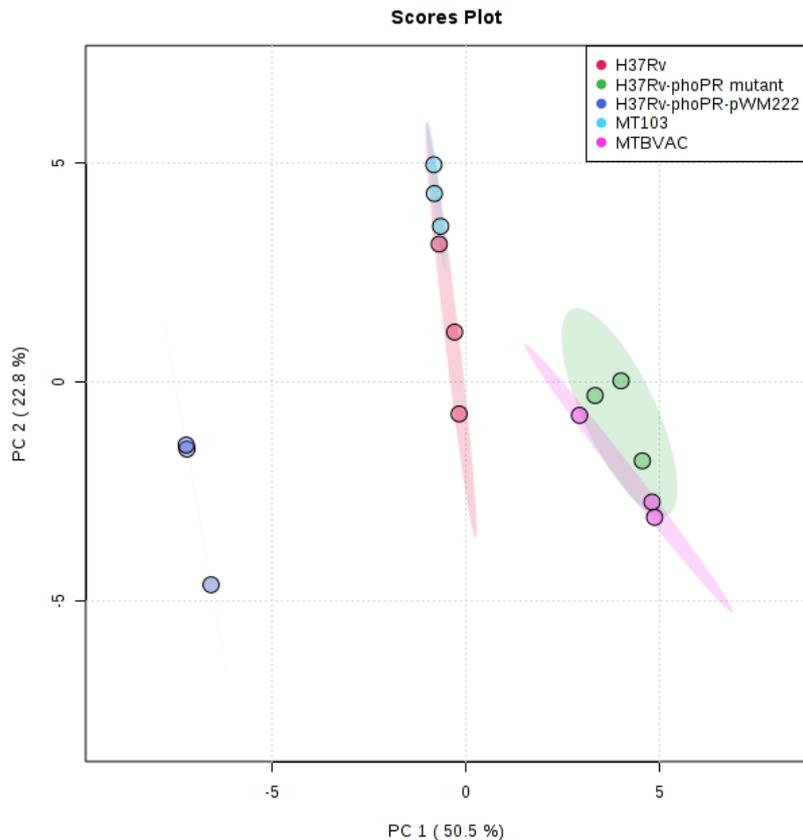


Figura 82. Análisis de componentes principales para la matriz en el análisis de cromatografía reversa y modo de ionización negativo, los círculos rojos representan cada una de las réplicas de H37Rv, los círculos verdes corresponden a cada una de las réplicas de H37Rv Δ *PhoP*, los círculos azul oscuro reflejan cada una de las réplicas de H37Rv Δ *PhoP*pWM222, los círculos azules representan cada una de las réplicas de MT103 y los círculos rosas se corresponden con cada una de las réplicas de MTBVAC.

El ACP que incluyó los cinco grupos muestra claramente el parentesco entre las variables para los grupos que presentan entre sí cierta homología. En este caso la representación en el plano explicaba el 71.3% de la variabilidad en el modelo. Pueden apreciarse en la figura 84 las réplicas entre si formando cada una un clúster. Además, la cercanía entre los mutantes de *phoP*, H37Rv y MTBVAC se encuentran prácticamente solapadas, al igual que pasa con las cepas de tuberculosis MT103 y H37Rv, que aparecen muy próximas. Se observa que la cepa mutante con

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

el plásmido conteniendo múltiples copias de *phoP* se halla alejada del resto de los grupos y en solitario.

El análisis estadístico desarrollado mediante la aplicación del test de t-Student para datos normales y varianzas desiguales y el cálculo de las veces de cambio entre la cepa MTBVAC y la MT103 fue llevado a cabo para seleccionar todas aquellas señales variables que presentaron un p. valor < 0.05 y una diferencia superior a dos veces en cuanto a las áreas obtenidas para las m/z.

La selección de metabolitos que cumplió con esos criterios fue de un total de 30, de estos eliminamos uno de los escogidos, por mala calidad de los espectros y una baja intensidad, reduciendo el número a 29 metabolitos diferenciales significativamente. La asignación de una identidad, se hizo siguiendo las mismas pautas que en el resto de los análisis de metabolómica no dirigida realizados anteriormente. Para todos los metabolitos que habían sido seleccionados, fueron revisados sus espectros con el fin de atribuir el estado de carga correcto, y así, poder llevar a cabo la identificación. En todos los casos la carga adquirida fue de -1. En la tabla 22 está recogida la información correspondiente a las señales seleccionadas con el p.valor, el p. valor corregido y la variabilidad de áreas recogida en veces de cambio.

Tabla 22. Variables seleccionadas en el análisis por cromatografía reversa y modo de ionización negativo teniendo en cuenta el p. valor y las veces de cambio.

m/z	p. valor	FDR	Veces de cambio
259.1906	0.0000146	0.001999	-45.3741
500.9195	0.0028093	0.011865	-2.1172
502.9177	0.0031775	0.012615	-2.1791
643.3167	0.0010893	0.005766	2.3709
687.3426	0.0005229	0.003348	2.8624
767.4227	0.0097784	0.022836	3.7060
771.4372	0.0007133	0.004164	2.8719
797.4109	0.0001018	0.001999	2.3398
811.4335	0.0004460	0.003064	3.1121
815.2258	0.0000022	0.000865	197.4200
815.4595	0.0002609	0.002409	2.7848
841.4424	0.0001910	0.002106	2.1943
855.4560	0.0003819	0.002808	2.7755
859.4530	0.0003385	0.002635	2.5415
873.4681	0.0004476	0.003064	2.2061
875.4843	0.0002609	0.002409	-2.1759
885.4701	0.0001683	0.002023	2.0788
899.4832	0.0004757	0.003096	2.4789
903.4765	0.0000711	0.001999	2.3000
925.5284	0.0010311	0.005532	3.1720
927.5519	0.0000766	0.001999	7.4686
943.5106	0.0002958	0.002456	2.0874
969.5565	0.0006501	0.003852	3.9102
971.5704	0.0001624	0.002023	5.5937
1013.5800	0.0003531	0.002695	4.6011
1015.5920	0.0001580	0.002023	4.4630
1057.6140	0.0001856	0.002105	4.2502
1085.6380	0.0050397	0.017864	6.4661
1101.6240	0.0000358	0.001999	3.6133

El metabolito m/z 259.1906 fue identificado con la fórmula molecular $C_{14}H_{28}O_4$ con un error de masas de -2.3 ppm y con un tiempo de retención de 8.6 minutos, por lo que se trataba de una molécula de naturaleza apolar. Este metabolito apareció aumentado hasta 45 veces más en la cepa atenuada. La consulta en distintas bases de datos indicaba que podría tratarse de un ácido graso. En la figura 83 se puede ver su espectro de fragmentación.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

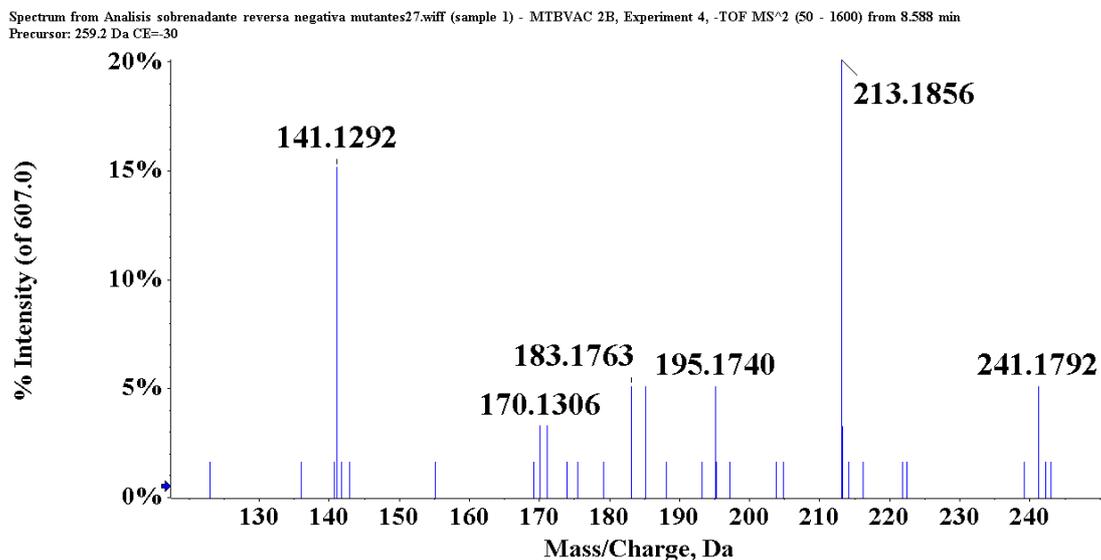


Figura 83. Espectro de fragmentación para m/z 259.1906 a una EC de -30 voltios

Para el resto de los metabolitos que se pudo dar una identificación tentativa, los espectros de masas/masas fueron muy pobres, por lo que no se pudo asignar una identidad con un mayor nivel de confianza.

El metabolito m/z 873.4681 se halló aumentado en la cepa MT103. Su tiempo de retención fue de 7.4 minutos. Le fue asignada la fórmula molecular $C_{44}H_{76}O_{13}P_2$ con un error de masas de 1-1 ppm. Con la consulta en distintas bases de datos se le asignó como estructura tentativa la de un glicerofosfolípido concretamente fosfatidilglicerolfosfato (FGF) que presenta la estructura $FGF(R_1CO_2H+R_2CO_2H=38:6)$.

Otro metabolito al que se le pudo atribuir una identificación tentativa fue al m/z 875.4843 con un tiempo de retención parecido al obtenido para la molécula anterior de 6.9 minutos. Le fue asignado como posible fórmula molecular $C_{44}H_{78}O_{13}P_2$ con un error de masas por debajo de una ppm. La molécula fue identificada con una estructura semejante a la anterior, pero en este caso presentaba un enlace doble menos en una de las cadenas pertenecientes a un ácido graso, siendo $FGF(R_1CO_2H+R_2CO_2H=38:5)$ la estructura propuesta para este metabolito diferencial.

El siguiente metabolito m/z 899.4832 que apareció aumentado en la cepa MT103 apareció en la zona intermedia del cromatograma, cercano al tiempo de retención de las dos moléculas anteriores. La fórmula que se pudo asignar: $C_{46}H_{78}O_{13}P_2$ cuyo error de masas fue de una ppm, coincidió en la búsqueda utilizando MMC con la siguiente estructura $FGF(R_1CO_2H+R_2CO_2H=40:7)$. En los tres casos no devolvía la identidad de moléculas muy

relacionadas entre sí. En todos los casos se trataba de fosfolípidos de la familia fosfatidilglicerolfosfato.

Otro de los metabolitos al que se le pudo dar una identificación tentativa fue al m/z correspondiente a 925.5284. Se le asignó la fórmula molecular $C_{45}H_{83}O_{17}P$ con un error de masas de una ppm. La búsqueda en las bases de datos, nos devolvió como posible identidad la de un lípido perteneciente a la familia de los FIMs, concretamente un FIM₁, cuya estructura tendría la composición FIM₁(16:0/14:0). La ionización de la molécula fue a partir de la pérdida de una molécula de agua y de un protón. Su tiempo de retención de 9.8 minutos fue el correspondiente al de una molécula no polar.

Continuando con la identificación de metabolitos para este análisis, el metabolito m/z 969.5565, presente en mayor cantidad en la cepa MT103 se obtuvo con un tiempo de retención de 9.8 minutos, al igual que la molécula anterior, lo que sugería que se trataba de una molécula parecida. La fórmula que se le asignó con un error de masas de una ppm sería la siguiente $C_{47}H_{87}O_{18}P$, que además se pudo identificar de manera tentativa como un lípido, relacionado directamente con el anterior, un FIM₁, en este caso presentaría diferentes cadenas de ácidos grasos que la molécula anterior. Como estructura probable podíamos decir que se trata de la siguiente FIM₁(R1CO₂H+R2CO₂H=32:1). La longitud exacta de las cadenas de ácidos grasos no se puede establecer, porque podrían ser varias las estructuras propuestas.

Al siguiente metabolito con la m/z de 971.5704 se le asignó como mejor fórmula molecular $C_{47}H_{89}O_{18}P$ con un error de solo una ppm. Se puede observar que se trataría de una molécula parecida a la anterior, ya que solamente se diferencian en dos átomos de hidrógeno y además presentan tiempos de retención muy parecidos, para este concretamente de nueve minutos. Teniendo en cuenta esto y la identidad que nos proporcionaron las distintas bases de datos se podría proponer como posible estructura de FIM₁ que presentaría la siguiente composición FIM₁(R1CO₂H+R2CO₂H=32:0), de tal modo que quizás se traten de la misma molécula diferenciándose solamente por la presencia de un doble enlace en uno de los dos ácidos grasos.

El metabolito 1015.5920 con un error de masas de -3.1 ppm y encontrado en el tiempo de retención de 12.1 minutos fue identificado como una posible cardiolipina y encontrado mayoritario en la cepa MT103.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

En la tabla 23 pueden verse los metabolitos identificados, con el error de masas en relación a su masa teórica, el tiempo de retención, la forma ionizada en que ha sido detectada, así como el p. valor corregido, las veces de cambio y el nivel de clasificación basado en los enunciados de Schymansky y colaboradores.⁶⁵

Tabla 23. Metabolitos identificados tentativamente en el análisis de los sobrenadantes. El valor de veces de cambio de los valores en positivo corresponden con el valor aumentado en la cepa MT103 y los valores en negativo corresponden con el valor aumentado en MTBVAC.

Estructura tentativa	m/z	Aducto	T.R.	Appm	FDR	Veces de cambio	Clasificación Shymanski y col.
Ácido graso hidroxilado	259.1906	-H	8.6	-1.2	2.00E-03	-45.46	Nivel 2
FGF(R1CO2H+R2CO2H=38:6)	873.4681	-H	7.4	-0.2	3.06E-03	2.21	Nivel 3
FGF(R1CO ₂ H+R2CO ₂ H=38:5)	875.4843	-H	6.9	0.5	2.41E-03	-2.18	Nivel 3
FGF(R1CO ₂ H+R2CO ₂ H=40:5)	899.4832	-H	8.1	-0.8	3.10E-03	2.48	Nivel 3
FIM1(16:0/14:0)	925.5284	-H ₂ O-H	9.8	-0.5	5.53E-03	3.17	Nivel 3
FIM1(R1CO ₂ H+R2CO ₂ H=32:1)	969.5565	-H	9.8	1.4	3.85E-03	3.91	Nivel 3
FIM1(R1CO ₂ H+R2CO ₂ H=32:0)	971.5704	-H	9.0	-0.4	2.02E-03	5.59	Nivel 3
Cl(R1CO ₂ H+R2CO ₂ H+R3CO ₂ H+R4CO ₂ H=40:0)	1015.5920	-H	12.1	-3.2	2.02E-03	4.46	Nivel 3

Por otro lado se hizo la evaluación de los metabolitos que habían sido identificados tentativamente en el resto de las cepas. Se aplicó un test estadístico para comparar las variables entre todos los grupos que se habían incluido en el análisis, a fin de ver si podían considerarse significativas las diferencias entre ellos. En este caso un test ANOVA y paramétrico, además de calcular las veces de cambio entre las distintas cepas de aquellos metabolitos que presentaban un p. valor < 0.05.

A continuación, en las tablas 24-25 se muestran el p. valor y las veces de cambio para las áreas entre los distintos grupos.

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

Tabla 24. Análisis ANOVA para los metabolitos identificados tentativamente significativamente diferenciales. Incluyen el valor de FDR y las diferencias en veces de cambio en las cepas.

m/c	p. valor	FDR	Análisis de cepas 2 a 2	Veces de cambio
259.1906	1.547E-11	6.3715E-10	H37Rv - H37Rv-phoPR mutante	2.65
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv	9.46
			MTBVAC - H37Rv	37.81
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv-phoPR mutante	25.04
			MT103 - H37Rv-phoPR mutante	2.21
			MTBVAC - H37Rv-phoPR mutante	100.06
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MT103	11.36
			MTBVAC - H37Rv-phoPR-pWM222	4.00
			MTBVAC - MT103	45.38
873.4681	4.514E-10	5.6763E-09	H37Rv - H37Rv-phoPR mutante	3.77
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv	1.56
			H37Rv - MT103	1.47
			H37Rv - MTBVAC	3.24
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv-phoPR mutante	5.90
			MT103 - H37Rv-phoPR mutante	2.57
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MT103	2.30
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MTBVAC	5.07
			MT103 - MTBVAC	2.21
875.4843	3.637E-08	1.5607E-07	H37Rv-phoPR mutante - H37Rv	2.50
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv	1.32
			MTBVAC - H37Rv	2.11
			H37Rv-phoPR mutante - H37Rv-phoPR-pWM222	1.89
			H37Rv-phoPR mutante - MT103	2.58
			H37Rv-phoPR mutante - MTBVAC	1.19
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MT103	1.37
			MTBVAC - H37Rv-phoPR-pWM222	1.59
			MTBVAC - MT103	2.18
899.4832	7.926E-09	4.1865E-08	H37Rv - H37Rv-phoPR mutante	2.81
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv	1.53
			H37Rv - MTBVAC	2.57
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv-phoPR mutante	4.28
			MT103 - H37Rv-phoPR mutante	2.71
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MT103	1.58
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MTBVAC	3.92
			MT103 - MTBVAC	2.48
1015.5920	2.64E-09	1.98E-08	H37Rv - H37Rv-phoPR mutante	4.78
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv	1.33
			H37Rv - MTBVAC	5.35
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv-phoPR mutante	6.38
			MT103 - H37Rv-phoPR mutante	3.99
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MT103	1.60
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MTBVAC	7.13
			MT103 - MTBVAC	4.46

A partir de los resultados obtenidos podemos decir que el ácido graso en el sobrenadante aparece aumentado en la cepa de la vacuna, con relación a su cepa mutada, también con una gran diferencia frente a la cepa H37Rv y a su mutante, y en una relación mucho menor al mutante que contiene el plásmido con muchas copias de *phoP*. Por otra parte, si comparamos las señales obtenidas entre H37Rv y su mutante podemos decir que hay diferencias significativas entre ambas cepas, pero realmente no son muy acusadas, como sería en el caso de la cepa atenuada de la vacuna. Sin embargo, cuando se compara la cepa que contiene el plásmido con la cepa salvaje y con su mutante *phoP* las cantidades de éste ácido graso aparecen en una mayor cantidad considerable y son significativas. De ahí que podamos plantearnos que de algún modo el gen *phoP* está actuando en esta ruta, aunque por otra parte las mínimas diferencias en la cepa H37Rv y su mutante podrían apoyar que las diferencias realmente se deben a la delección de *fad2D6* y a la interrupción en la síntesis de lípidos más complejos. En la cepa de la vacuna la ausencia de este gen está promoviendo la presencia en el sobrenadante de este metabolito, quizás porque en algún paso posterior haya algún paso interrumpido, de modo que este producto intermedio se esté acumulando. Tal vez la presencia o ausencia de este gen tiene un efecto indirecto en las cantidades que aparecen del ácido graso encontrado diferencial excretados al medio. La gran diferencia en la producción del mismo y conocer su identidad confirmada podrían servir para profundizar más en el estudio de esta molécula con la finalidad de poder encontrar un marcador que pudiera, incluso servir para indicar el éxito en la vacunación.

Para el metabolito con m/z 873.4681 se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos. Realmente las diferencias más destacadas en cuanto a la abundancia del mismo, sería la mayor cantidad de hasta más de cinco veces en la cepa que contiene las copias del gen *phoP* frente a los dos mutantes. Igualmente, en las cepas que presentan el gen *phoP* existe una mayor cantidad de ese metabolito en relación con las cepas del mismo tipo que presentan la delección de este gen, aunque en menor cantidad que en el caso anterior.

El metabolito m/z 875.4843 presentó diferencias significativas en diferentes parejas de cepas, pero esas diferencias en cuanto a la intensidad no fueron demasiado consistentes, solamente en cuatro de las comparaciones dos a dos, estuvieron por encima de dos veces de cambio, destacando el aumento del metabolito en las cepas que no contienen el gen *phoP* en relación a las cepas que no presentan modificaciones genéticas.

Para el metabolito m/z 899.4832 también hubo diferencias significativas entre los distintos grupos que fueron comparados. Las mayores diferencias encontradas entre los grupos se encontraron entre la cepa que contenía las copias del plásmido y las cepas que no presentaban el

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

gen *phoP*. A su vez las cepas que no presentaban mutaciones también presentaron una mayor cantidad del metabolito en relación a las cepas que habían perdido el gen, pero las diferencias eran menores si eran comparadas con la cepa que presentaba las copias del gen. Parece que hay una relación clara con la presencia del gen *phoP* y la cantidad de este metabolito, pudiendo tener una relación directa con la ruta de síntesis del mismo.

Tabla 25. Análisis ANOVA para los metabolitos identificados tentativamente significativamente diferenciales. Incluyen el valor de FDR y las diferencias en veces de cambio entre las cepas.

m/c	p. valor	FDR	Análisis de cepas 2 a 2	Veces de cambio
925.5284	1.119E-10	2.3393E-09	H37Rv - H37Rv-phoPR mutante	11.71
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv	14.15
			H37Rv - MT103	1.51
			H37Rv - MTBVAC	4.79
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv-phoPR mutante	34.56
			MTBVAC - H37Rv-phoPR mutante	2.44
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MT103	4.46
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MTBVAC	14.15
			MT103 - MTBVAC	3.17
			969.5565	1.445E-10
H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv	2.12			
H37Rv - MT103	1.35			
H37Rv - MTBVAC	5.28			
H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv-phoPR mutante	25.00			
MTBVAC - H37Rv-phoPR mutante	2.23			
H37Rv-phoPR-pWM222 - MT103	2.87			
H37Rv-phoPR-pWM222 - MTBVAC	11.22			
MT103 - MTBVAC	3.91			
971.5704	3.988E-10	5.3004E-09		
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv	1.47
			H37Rv - MTBVAC	7.00
			H37Rv-phoPR-pWM222 - H37Rv-phoPR mutante	10.35
			MT103 - H37Rv-phoPR mutante	5.63
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MT103	1.84
			H37Rv-phoPR-pWM222 - MTBVAC	10.29
			MT103 - MTBVAC	5.59

Los resultados obtenidos significativamente diferenciales entre los grupos comparados dos a dos para los tres compuestos FIM₁ identificados tentativamente, presentan un perfil parecido en cuanto a las diferencias que aparecen en cuanto a su abundancia en los diferentes tipos de cepas. Los tres metabolitos aparecen claramente aumentados en el mutante que contiene las

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

copias del gen *phoP* en un plásmido, si se comparan con las cepas que presentan la delección del gen MTBVAC y el mutante H37Rv. Las diferencias en cuanto a la cantidad que se ha detectado en el sobrenadante para el m/z 925.5284 fueron hasta más de 34 veces comparando la cepa H37Rv-phoPR-mutante con H37Rv. Para los tres metabolitos esta fue la comparación entre cepas que presentó más variabilidad. Por otro lado si comparamos los mutantes con la delección con cualquiera de las cepas que no presentan ningún tipo de modificación genética para el gen *phoP* en el caso de los 3 metabolitos aparecen en una cantidad menor en todos los casos.

Claramente hay una relación que parece ligada directamente a la presencia del gen *phoP* y a la producción y excreción al medio, de este tipo de metabolitos que tienen una relación directa con la respuesta inmune del humano frente a la tuberculosis e intervienen en la síntesis de otras moléculas de mayor complejidad que intervienen en la virulencia de *M. tuberculosis*.

5. DISCUSIÓN

5.1 Estrategia analítica

Cualquier investigación metabolómica requiere una estrategia analítica y un considerable esfuerzo de ajuste de la metodología a los objetivos que se persiguen. En este estudio hemos realizado dos aproximaciones generales (dirigida y no dirigida) y varias aproximaciones analíticas, resultando un conjunto de procesos que han resultado adecuados a los fines del trabajo.

La aproximación dirigida dispone de estándares internos y permite la identificación y cuantificación de los metabolitos^{72,73}. Una de las instrumentaciones analíticas con mejores resultados para llevar a cabo este tipo de estudios serían los espectrómetros de masas compuestos por un triple cuadrupolo y los espectrómetros de masas que presentan una trampa de iones, ambos son equipos muy reproducibles y con una gran sensibilidad, características imprescindibles en los análisis dirigidos. En nuestro caso, se han llevado a cabo dos aproximaciones dirigidas para encontrar las diferencias en la producción de di-AMP cíclico y de fosfatidilinositol manósidos entre MTBVAC y MT103.

El di-AMP cíclico ha sido detectado en extractos celulares de distintas bacterias patógenas, entre ellas, *M. tuberculosis*. Hay evidencias de su participación en la regulación de la síntesis de ácidos grasos⁷⁴. Por otra parte, se ha visto que interviene en la ruta citoplasmática de vigilancia del huésped, la cual es crucial para la defensa antimicrobiana y necesaria para la respuesta de interferón tipo I. Sin embargo, el mecanismo y papel de señalización de esta molécula en la virulencia de *M. tuberculosis* no se conoce. Se ha demostrado que la resistencia a tuberculosis requiere de la ruta de vigilancia citoplasmática mediada por di-AMP cíclico y que los niveles de esta molécula pueden modular el desarrollo de la infección. Se ha podido demostrar que la sobreexpresión de AMP diadenilato ciclasa de *M. tuberculosis* activa la ruta del factor de regulación de interferón, con niveles mejorados de IFN- β , observándose una autofagia aumentada en macrófagos y presenta una atenuación sustancial de la virulencia en ratones. Éstos resultados sugieren que la modulación de los niveles de esta pequeña molécula puede conducir a nuevas estrategias inmunoterapéuticas contra la tuberculosis⁷⁵. Nuestro trabajo, aparte de mostrar diferencias entre las cepas atenuada y otras, ha desarrollado su determinación cuantitativa como biomarcador de virulencia.

Los fosfatidilinositol-manósidos (FIMs) son glucolípidos formados por ácidos grasos y glicerol

unidos por un grupo fosfodiéster a un azúcar manósido. En micobacterias los ácidos grasos predominantes son el palmítico (C16), el tuberculoesteárico (10-metil-octadecanoico, C19), el mirístico (C14) y el octadecanoico, y suelen encontrarse presencia de esteárico (C18), hexadecanoico (C16:1) y heptadecanoico (C17). Son componentes de la membrana citoplasmática y de la pared celular de micobacterias, pudiendo encontrarse de manera independiente o formando estructuras más complejas como lipomanan y lipoarabinomano. Todas las especies de *Mycobacterium* poseen 2 formas aciladas de FIMs, tri y tetra-acilados FIM₂ y tri y tetra-acilados FIM₆ y diferentes versiones aciladas de lipomanan y lipoarabinomano. Los FIMs, lipomanan y lipoarabinomano muestran varias propiedades inmunomoduladoras por interacción con diferentes receptores. Principalmente lipomanan está asociado con receptores de señalización *Toll*, mientras los FIMs de orden superior y el lipoarabinomano son reconocidos por receptores tipo lectinas tipo C en las células dendríticas y por los receptores de manosa de macrófagos. FIM₂ promueve la producción de citoquinas proinflamatorias por macrófagos y el reclutamiento de células T natural killer, responsables principales en la respuesta granulomatosa. Finalmente, los FIMs entre otros lípidos de micobacterias se intercambian activamente fuera de esta, lo que sugiere un papel potencial para estos componentes en la extensión de la influencia de la bacteria sobre su entorno^{66,76}. Se trata por tanto de compuestos que pueden servir como marcadores de inmunogenicidad.

Para llevar a cabo la caracterización metabolómica no dirigida es necesario utilizar técnicas analíticas capaces de medir una amplia variedad de moléculas y en un amplio rango dinámico de concentraciones⁷⁷. Las principales técnicas son: la resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM). Nosotros nos hemos decantado por la EM, a sabiendas de que la RMN es más potente a la hora de identificar las moléculas. La espectrometría de masas tiene la ventaja de alta sensibilidad y selectividad, además de un alto rendimiento y con una amplia cobertura.

Si se realiza inyección directa, disminuye el tiempo de análisis, pero teniendo resultados más complejos y con un efecto por supresión iónica mucho mayor, al llegar todos los iones a la misma vez al detector e interfiriendo en la intensidad de las señales. Para evitar estos problemas se suele trabajar con técnicas de separación previas, siendo las más utilizadas la cromatografía líquida, la cromatografía de gases y en menor medida la electroforesis capilar. Nosotros nos hemos decantado por la cromatografía líquida, aunque somos conscientes que la cromatografía de gases tiene una mayor resolución cromatográfica, pero la estabilidad térmica de la fase estacionaria, los metabolitos y sus derivatizaciones limitan el análisis del metaboloma

limitándolo a ciertas sustancias^{78,43,79}. Varias clases de compuestos (azúcares, aminoácidos, nucleósidos, etc.) no pueden ser analizados directamente debido a su polaridad y falta de volatilidad. La cromatografía líquida muestra una alta sensibilidad y un amplio rango de moléculas que pueden ser analizadas. Se puede utilizar junto con herramientas estadísticas quimiométricas para obtener un cuadro integrado de los metabolitos, incluyendo péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, polifenoles, alcaloides y especies inorgánicas que actúan como pequeñas moléculas o biomarcadores que representan el fenotipo funcional en una célula, tejido u organismo.

Lo normal en metabolómica es seguir una aproximación no dirigida, lo que supone un barrido de todos los metabolitos⁸⁰. Este objetivo es difícil de conseguir con una sola analítica, ya que las moléculas que se pueden detectarse varían, dependiendo de la fase móvil, fase estacionaria y el modo de ionización, etc. (ver más adelante). En nuestro caso la hemos utilizado fundamentalmente para el análisis de las diferencias entre la cepa MTBVAC y su cepa parental MT103. La contrapartida de este tipo de enfoque es que pueden producirse identificaciones falsas de metabolitos o sesgos en las señales debidas a los efectos de la matriz y a la falta de estándares. La falta de cuantificación absoluta dificulta el análisis comparativo de los niveles de metabolitos y por tanto la comparación de resultados entre laboratorios.

Debido a la gran complejidad de las muestras biológicas desde un punto de vista químico⁸¹, la elección para llevar a cabo nuestro análisis fue el uso de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. Para cubrir el mayor número de metabolitos utilizamos dos tipos distintos de análisis cromatográficos en paralelo: la cromatografía fase inversa utilizada para la separación de compuestos de naturaleza apolar y de polaridad intermedia y la de interacción hidrofílica dirigida a la separación de pequeñas moléculas de carácter polar⁸².

Es importante considerar el modo de ionización usado en espectrometría de masas en los análisis de metabolómica. Es difícil cubrir todos los tipos de moléculas con una sola técnica, de modo que algunos metabolitos son ionizados mejor de un modo, mientras otros son ionizados más eficientemente en otro modo. En este trabajo se usó para la ionización electrospray en dos modos de ionización, positivo y negativo. En resumen, hemos estudiado el metaboloma mediante cuatro análisis complementarios.

5.2. Metabólica de MTBVAC y su relación con otras cepas

Este estudio representa un avance en la caracterización de MTBVAC, y hasta dónde sabemos, es el primero utilizando una aproximación metabolómica completa para comparar esta cepa viva atenuada con su cepa parental. Además, supone un avance en el conocimiento de las mutaciones de los genes *phoP* y *fadD26* en la vacuna MTBVAC al completar los estudios de genómica, transcriptómica y proteómica^{27,28,35,26,61,62}. El análisis metabolómico efectuado corrobora una disminución de la capacidad infectiva del patógeno, así como otras modificaciones que representan perfiles metabolómicos específicos para la cepa atenuada, aunque en alguno de estos casos no podamos asignar la estructura completa de los metabolitos.

Hemos encontrado 106 metabolitos diferentes entre las dos cepas estudiadas, con buenos espectros y picos cromatográficos. No hemos podido identificar estructuralmente todos los metabolitos por no existir referencias, lo que nos sugiere que se trata de estructuras novedosas, que no están descritas hasta el momento. Esto no sería de extrañar, ya que el número de metabolitos conocidos de *M. tuberculosis* es muy limitado.⁶⁹ debido en buena parte a la falta de estándares⁸³ y a la escasez de espectros de masas y espectros de fragmentación para alimentar las distintas bases de datos disponibles. En este sentido, nuestro trabajo aporta información relevante a esas bases de datos.

Se han encontrado numerosos metabolitos involucrados en la síntesis de la pared celular como sería el caso de los fosfolípidos. Dentro de estos hemos encontrado tres familias con distinta abundancia entre las cepas, que pertenecerían a la familia de fosfatidilinositol (FI), fosfatidilglicerol (FG) y por último fosfatidiletanolamina (FE). En todos los casos se ha tratado de diferentes estructuras dentro de cada clase/familia los que han sido identificados como diferenciales entre las 2 cepas.

Otros metabolitos que intervienen en la síntesis de la pared celular tales como la trehalosa 6-fosfato y la 2-sulfotrehalosa también se encontraron en distinta proporción entre la cepa salvaje y la cepa vacuna. Estos hallazgos son de interés, puesto que, junto a micolatos y un set de lípidos enlazados no covalentemente que incluyen dimicocerosatos de tiocerol, aciltrehalosas, micolatos trehalosas, sulfátidas y fosfatidil mioinositol manósidos.^{84,85} (figura 84) son clave en la capacidad de *M. tuberculosis* para infectar las células del huésped⁴⁰, su virulencia y su patogénesis⁴⁸.

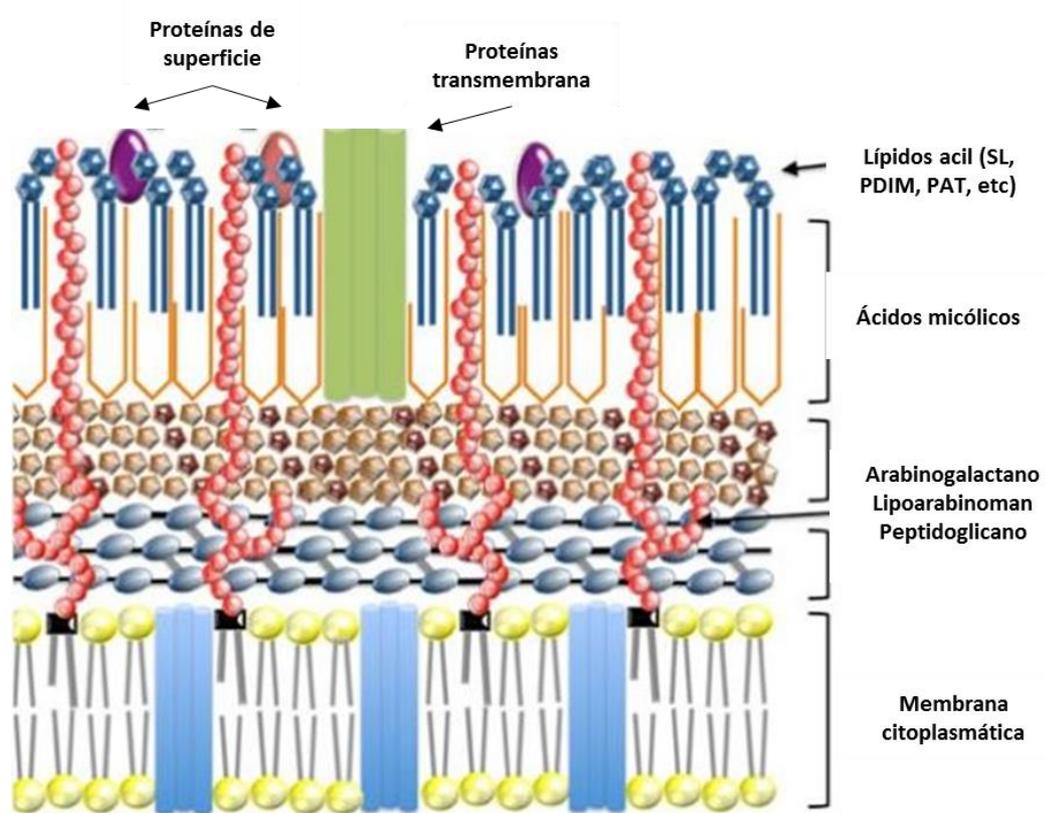


Figura 84. Representación de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. SL: sulfolípidos, TDIM: dimicocerosatos de tiocerol, PAT: poliaciltrehalosas.

De especial interés han sido los hallazgos encontrados en la familia FI. Estos compuestos desempeñan un importante papel estructural, fisiológico e inmunológico en *M. tuberculosis* y en la interacción con el huésped, estas moléculas y algunos de sus derivados metabólicos en los que FI constituye el anclaje lipídico a la cubierta celular, como sería el caso de FIM, o de complejos lipoglicanos (tales como lipomanoan lineal y ramificados junto con lipoarabinomano). FI y FIM son considerados como esenciales para la estabilidad de la membrana y por lo mismo, para la viabilidad celular.⁸⁶ Además presentan un papel clave en modular la respuesta del huésped durante la infección.⁷⁶

En la figura 85 puede verse la ruta biosintética de lipoarabinomano a partir de FI, de donde se obtiene en primer lugar FIM₁ que puede ser transformado en FIM₂, o en los derivados acilados de FIM₁, a partir de ambos se pueden obtener las dos formas aciladas de FIM₂ que son consideradas como productos finales de metabolismo e intermediarios en la biosíntesis de

unidades más complejas como serían las 2 formas aciladas de FIM₆, lipomanan y lipoarabinomanano.⁸⁷

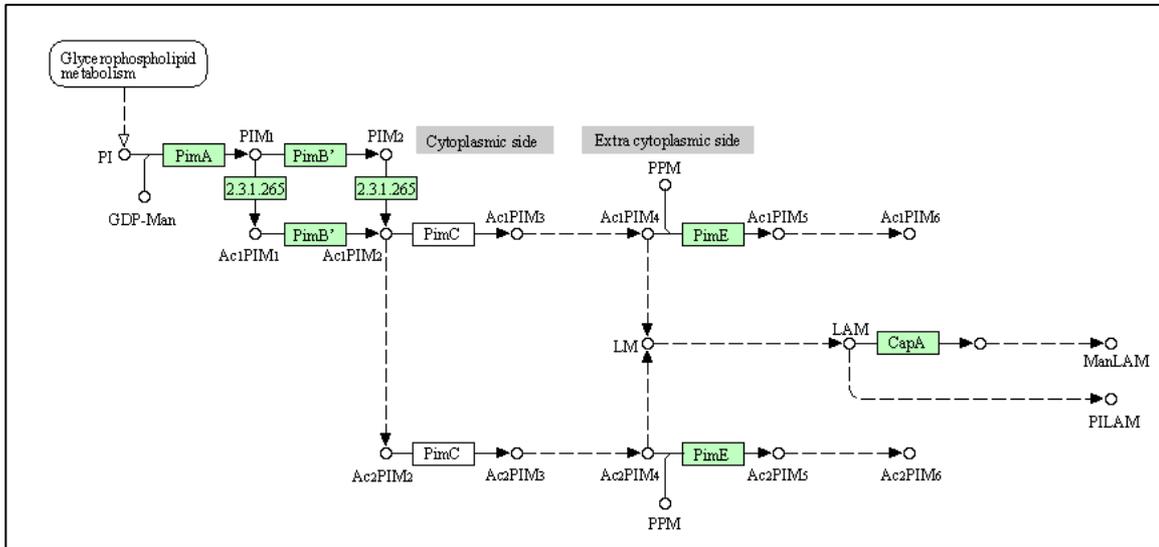


Figura 85. Ruta metabólica de glicerofosfolípidos. Síntesis de FIM, Lipomanan y Lipoarabinomanano en *M. tuberculosis*. PI: fosfatidilinositol, GDP-Man: GDP-Manosa, PimA: fosfatidil-mio-inositol alfa-manosiltransferasa, PIM: fosfatidilinositol manósido, 2.3.1.265: fosfatidilinositol dimanósido aciltransferasa, Ac1PIM: triacilado fosfatidil mio-inositol manósido, Ac2PIM: tetracilado fosfatidil mio-inositol manósido, pimB': fosfatidil-mio-inositol dimanosido sintasa, pimC: alfa-1,6-manosil transferasa, PPM: beta-D-manosilfosfodecaprenol, pimE: alfa-1,2-manosil transferasa, LM: lipomanan, LAM: lipoarabinomanano, CapA: manosiltransferasa, ManLAM: lipoarabinomanano cubierto de manosa, PILAM: lipoarabinomanano cubierto de fosfatidil-mio-inositol. Los cuadrados verdes incluyen las enzimas que catalizan las reacciones.

Lipoarabinomanano es un importante modulador de la respuesta inmune durante el transcurso de la tuberculosis. Además esta molécula actúa como ligando clave en la interacción entre *M. tuberculosis* y los macrófagos, facilitando la supervivencia del bacilo dentro de las células fagocíticas.⁸⁸ De este modo todas estas moléculas actuarían como moduladores de la respuesta inmune y de los factores de virulencia. Las diferencias encontradas en cuanto a las diferentes clases y cantidad de FI entre ambas cepas, donde claramente se puede ver que esta clase de lípidos está aumentada considerablemente en la cepa vacuna, nos hizo plantearnos que la mayor cantidad de estas moléculas libres puede reflejar una menor producción de células más complejas, involucradas directamente en la proliferación de *M. tuberculosis*. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos y de la hipótesis planteada, se llevó a cabo el análisis dirigido para la búsqueda de FIM₂ en cepas de tuberculosis y sus mutantes para el gen *phoP*, con el

objetivo de demostrar la hipótesis planteada y además poder relacionarlo directamente con la presencia o ausencia de *phoP*. Tras la realización del análisis se pudo confirmar que existía una composición diferente en FIM entre MTBVAC y MT103. Este fenotipo no fue exclusivo para la vacuna, y todos los mutantes que no presentaban el gen *phoP*, pertenecientes a los linajes dos y cuatro, linajes más extendidos de *M. tuberculosis*, presentaron igualmente una mayor presencia de estas moléculas. En consecuencia, la síntesis de FIM₂ representa un fenotipo regulado por *phoP* aún desconocido en *M. tuberculosis*. Esta concentración aumentada de FI libre y FIM₂ puede estar relacionada con la atenuación de los mutantes de *phoP*, como resultado de una reducción en el número de lípidos anclados tales como lipoglicanos.^{60,89,61}

Otra familia de metabolitos de gran interés y que se presenta de forma diferencial son los fosfoglicéridos (FFG). En micobacterias estas moléculas son intermediarios en la síntesis de otros fosfolípidos, incluyendo FI, cardiolipinas y FG lisinados.⁸ En nuestro trabajo se ha encontrado que la forma correspondiente a FG(16:0/18:1) estaba aumentada en MT103, mientras el resto de fosfolípidos pertenecientes a esta clase fueron identificados como diferenciales y mayoritarios en la cepa atenuada. Los hallazgos en relación a la diferencia en la producción de estos metabolitos apoyan la inmunidad de la vacuna. En algunos estudios recientes los FG aparecen como una firma molecular de la infección que permite el reconocimiento inmune de la infección bacteriana. Se han encontrado evidencias de que estas moléculas pueden actuar como antígenos para la activación de células T y células natural killer T^{90,91}, con la consecuente activación del sistema de defensa.

Dentro del grupo de fosfolípidos encontrados como diferenciales, la familia FE apareció con una mayor intensidad en la cepa MTBVAC. Se hallaron hasta nueve tipos distintos en función de la longitud de sus cadenas y en todos los casos aparecieron aumentadas en la cepa de la vacuna. A diferencia de FI, los fosfolípidos FE parecen no ser esenciales en *Mycobacterium*, ya que el gen para la fosfatidilserina sintetasa envuelto en la síntesis de FE no se considera necesario para la supervivencia de la bacteria.⁹² Aunque la FE generalmente se encuentra en todos los organismos, es particularmente abundante en las membranas plasmáticas bacterianas.⁹³ Aun así, las funciones para estas moléculas están poco definidas a parte de su papel estructural como componentes de la membrana plasmática. Otras posibles funciones implican su función en el crecimiento, la motilidad, la quimiotaxis, el transporte de solutos o la sensibilidad hacia algunos antibióticos.^{94,95} Por otro lado mutantes de *E. coli* deficientes de FE presentan crecimiento filamentoso, que pudieran reflejar un defecto en la interacción de *FtsZ* con la

membrana.⁹⁶ En otros microorganismos patógenos de mamíferos como *Brucella abortus*, FE es requerida para que su virulencia sea efectiva y para la interacción sostenida con el huésped.⁹⁷

En relación a *M. tuberculosis* existen evidencias de las funciones relacionadas con la virulencia y la inmunogenicidad de distintos componentes de membrana, que incluyen, como ya se ha visto, otros tipos de fosfolípidos. La función estructural para FE es conocida, pero se desconoce si existen otras funciones relacionadas con la patogenia de *M. tuberculosis* para este fosfolípido. Se ha sugerido que junto con FI y cardiolipinas, FE puede ser liberada por el microorganismo durante la infección, pudiendo desempeñar un papel en la infectividad y persistencia dentro del huésped⁹⁸. A su vez, nuestros resultados del análisis del exometaboloma han encontrado una mayor cantidad, de cardiolipinas en el medio extracelular de MT103, y la disminución en la cepa vacuna, lo que explicaría la menor virulencia de esta. Por otro lado, la presencia aumentada de FE en las membranas de la cepa atenuada, podría ser beneficiosa en el caso de una hipotética infección por la cepa vacuna. La presencia aumentada de este componente estructural en bacterias, tanto en Gram positivas como en Gram negativas, puede resultar en un descenso de la permeabilidad frente a determinados antibióticos, capaces de promover la formación de dominios de membrana, y, por lo mismo, mostrando una mayor eficacia en su acción bactericida.⁹³ De esto modo la presencia aumentada de FE en MTBVAC podría presentar algunas ventajas favorables frente a la permeabilidad de la membrana de la cepa vacuna ante la cepa salvaje.

Otros de los componentes implicados en la formación de la pared celular de *M. tuberculosis* y para el que se han encontrado diferencias es la trehalosa fosfato. La trehalosa es un disacárido de glucosa, muy abundante en micobacterias que pueden presentarse de forma más libre y formando glicoconjugados. Se puede encontrar en el citoplasma y en la pared celular.^{99,100} Los glicolípidos de la cubierta de Micobacterias presentan dos grandes grupos, en virtud de la presencia de dos tipos de carbohidratos, uno de ellos presentaría trehalosa en su estructura. La síntesis y degradación de trehalosa interviene en el proceso de movilización del carbono mediante la envoltura celular, especialmente durante la infección, donde la regulación de lípidos que contienen trehalosa pueden modularse por factores ambientales y fisiológicos, que afectan tanto a *M. tuberculosis* como al huésped, y además estarían los glicolípidos compuestos por manosa, algunas de estas moléculas de *M. tuberculosis* imitan a las del huésped beneficiándose de esta condición para establecer un nicho intracelular único dentro del anfitrión. Existe otro grupo en esta categoría que serían los que presentan 6-deoxi-piranosas, aunque estaría restringido

a unas pocas cepas del complejo de *M. tuberculosis*. Dentro del grupo de glicolípidos compuestos por trehalosa a su vez se establecen cuatro categorías, encargados de formar la cubierta de *M. tuberculosis*, donde se incluyen los que presentan trehalosa di-, tri y poliaciladas (DAT, TAT, PAT), el grupo que engloba trehalosa mono y di-micolato (TMM, TDM), el siguiente estaría formado por los sulfolípidos y en último lugar se encontrarían los lipooligosacáridos (LOSs).^{84,101} Las diferencias en las concentraciones detectadas para este metabolito sugieren una variabilidad en la producción entre MT103 y MTBVAC. En estudios previos no pudo demostrarse esta relación al usar cromatografía en capa fina y cromatografía de gases con propionato marcado con ¹⁴C. Aunque los análisis mostraron bandas significativamente con más baja intensidad en los mutantes, no fue posible comparar exactamente la composición de ácidos grasos de cadena larga metil ramificados, debido a la emigración conjunta de los ácidos grasos de interés con otros compuestos derivados del propionato.

Se investigó la presencia de trehalosa defosforilada, y se encontró que la producción de esta molécula entre las cepas comparadas no aparecía de forma diferencial. Hasta el momento hay tres posibles vías descritas para la síntesis de esta molécula fosforilada. La ruta OtsA-OtsB, en la que OtsA es una enzima conocida como trehalosa-6-fosfato sintasa que lleva a cabo la reacción de glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa, para formar trehalosa-6-fosfato. OtsB es una enzima con actividad desfosforilasa que libera de nuevo la molécula de trehalosa del grupo fosfato. Esta ruta representa el modelo dominante requerido para el crecimiento de *M. tuberculosis* en los cultivos en laboratorio y para los modelos de virulencia en ratones.^{102,103} Tras los resultados obtenidos se sugiere que una mayor concentración de trehalosa-6-fosfato en MTBVAC puede estar relacionada con una actividad alterada de OtsA-OtsB. Además, este azúcar sirve como precursor biosintético para un rango de glicolípidos que ocupan tanto la membrana externa como la interna de la cubierta celular. Dos de estos componentes principales son por un lado la TMM y por otro la TDM, conocido también este último como “factor cuerda”. En ellos la trehalosa es esterificada por una o dos cadenas de ácidos micólicos respectivamente. TDM contribuye a la protección de *M. tuberculosis* de ser eliminado por la acción de los macrófagos, actúa como un potente modulador de la activación de los macrófagos y además proporciona una poderosa arma para aumentar la resistencia de micobacteria frente a los antibióticos.¹⁰⁴ Un incremento de la síntesis de la trehalosa en su forma fosforilada en la cepa atenuada podría indicar una mayor actividad de la enzima OtsA favoreciendo así la fosforilación de este disacárido y la menor presencia de la forma libre implicada en la producción de moléculas más complejas como TMM y TDM, que

de este modo podrían presentar una disminución en su síntesis y consecuentemente contribuir a la ausencia de formación del factor *cuerda*²⁶ y la atenuación de la cepa MTBVAC.

Los sulfolípidos (SL) representan una familia de glicolípidos trehalosa-2-sulfato poliacylados esterificados con la presencia de dos hasta cuatro cadenas ácidos grasos. El primer paso llevado a cabo en la síntesis de este tipo de moléculas es la transferencia de un grupo sulfato a la posición dos de trehalosa en una reacción catalizada por la sulfotransferasa *Stf0*.¹⁰⁵ La síntesis de sulfolípidos parece estar estrechamente regulada durante el curso de la infección. *PhoP* es requerido para la producción de este tipo de moléculas,^{34,61} y la sustitución en la posición 219 de serina por leucina dentro del gen *phoP* en la cepa H37Ra es responsable de la ausencia de sulfolípidos, DAT y PAT en esta cepa.⁶² La aparición de la molécula trehalosa-2-sulfato disminuida en las muestras analizadas de la cepa vacuna durante el análisis contribuye a la explicación de la ausencia de sulfolípidos como consecuencia de la delección del gen *phoP* en la cepa mutada. Resulta muy interesante la descripción de que la complementación de uno de los mutantes con los genes *phoP* restauró la producción de SL, PAT y DAT, indicando que *phoP* es requerido para la producción de ácidos grasos metil ramificados que contienen aciltrehalosas en *M. tuberculosis*. Las cantidades de SL producidas por MT1237 parecían estar relacionadas directamente con los niveles de expresión de *phoP*²⁶.

En el análisis metabolómico no dirigido utilizando cromatografía de interacción hidrofílica y modo de ionización negativo, encontramos como metabolitos diferenciales los aminoácidos, glutamina y glutamato que aparecían con menor intensidad en la cepa MTBVAC, estos aminoácidos clave en el metabolismo del nitrógeno son los principales aminoácidos que intervienen de forma intracelular en la síntesis de moléculas¹⁰⁶. Estas además son los dos principales metabolitos de un ciclo de retroalimentación metabólica que integra información del metabolismo de carbono y del nitrógeno en el control de la relación carbono-nitrógeno en la célula.¹⁰⁷ En micobacterias, la asimilación de nitrógeno inorgánico y su conversión a glutamina y glutamato es llevado a cabo por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintetasa.¹⁰⁸ La primera de estas enzimas ha sido relacionada tradicionalmente con la virulencia y patogenicidad de *M. tuberculosis*. Las formas virulentas de micobacteria segregan grandes cantidades de la enzima glutamina sintetasa al medio extracelular, por lo que se ha especulado que la enzima en este entorno puede además ejercer un papel en la producción de poli-L-glutamina-glutamato, un polímero encontrado en la pared celular de micobacterias patógenas y/o que la actividad extracelular de la misma puede modular el pH del fagosoma y, por lo tanto evitar la fusión entre este y el lisosoma.¹⁰⁹ A partir de los datos obtenidos durante nuestro análisis, planteamos la

hipótesis de que una concentración elevada de estos aminoácidos podría estar relacionado con una mayor actividad de glutamina sintetasa y por lo tanto con una mayor virulencia de *M. tuberculosis*.

En este mismo análisis además se encontró que el cofactor NAD⁺ estaba presente en la cepa MT103 de forma diferencial, y en mayor cantidad. Esta molécula es un cofactor esencial requerido para el equilibrio redox. NAD actúa extensamente en el catabolismo del aminoácido glutamato con el objeto de formar α -cetoglutarato mediante la actividad de la enzima glutamato dependiente de NAD⁺ y puede ser reducido por glutamato deshidrogenasa (GDH) para formar de nuevo glutamato. Estas reacciones además sirven como ramificaciones metabólicas enzimáticas debido a que la enzima GDH está implicada en la reacción que regula el flujo de intermediarios tales como α -cetoglutarato entre el ciclo de Krebs y el metabolismo del nitrógeno.^{108,106} Estas tres moléculas muestran una relación muy cercana y están directamente involucradas en la producción de energía para *M. tuberculosis*. Estas tres moléculas NAD, glutamina y glutamato mostraron un claro aumento en MT103 comparado con MTBVAC, lo que podría explicar el fenotipo atenuado de la cepa vacuna en el contexto de un metabolismo desfavorecido energéticamente.

La molécula identificada con una mayor diferencia entre ambas cepas, en el análisis no dirigido, durante la comparación de los metabolitos intracelulares, fue un derivado de micotiol.

Realmente en este caso, consideramos el nivel del ruido como un valor del área en las cepas MTBVAC. Podríamos decir tras la revisión de los cromatogramas que el conjugado con micotiol no estaba presente en la cepa atenuada. Se llegó a la deducción de que se trata de un derivado de micotiol y no de la molécula libre, tras encontrar dos picos diferentes con el mismo m/z y los mismos fragmentos comunes en ambos espectros. Estos ya se habían que se encontrado separados analíticamente del minuto 2.6 al minuto 4.9 en una carrera cromatográfica de 10 minutos. La molécula con una menor retención, se consideró como el conjugado, por dos razones principalmente. Una fue porque la molécula con mayor retención estaba presente en ambas cepas en una cantidad muy similar y porque la primera solo aparecía en la cepa MT103 y no en MTBVAC, posiblemente no se estaba dando esa transformación, o en el caso que se diera, sería con una producción bastante minoritaria.

La molécula micotiol presenta un papel importante en el metabolismo de Micobacterias y es considerado el equivalente funcional de glutatión¹¹⁰, y se encuentra asociada con la producción de *M. tuberculosis* frente a antibióticos y estrés oxidativo.¹¹¹ Por lo tanto altas concentraciones celulares de este metabolito puede aumentar la capacidad de las especies de

Mycobacterium para mitigar los efectos negativos del estrés oxidativo, y además contribuye a establecer los patrones de resistencia frente a isoniazida y rifampicina.

Hay tres enzimas involucradas en el metabolismo de micotiol y en los procesos de detoxificación: MSH-S-transferasa, micotiol-S-conjugado amidasa y por último micotiol reductasa NADPH dependiente.^{112,113} A partir de los resultados obtenidos en el análisis no dirigido con cromatografía de interacción hidrofílica y modo de ionización positivo, confirmamos que la capacidad antioxidante de la cepa atenuada debe encontrarse disminuida y a partir de esto, nos planteamos la hipótesis de que algunas de las enzimas biosintéticas de micotiol, y probablemente la MSH-S transferasa, podría haber disminuido la actividad en MTBVAC y por consiguiente haber bajado la producción del conjugado de micotiol. En la figura 86 aparecen representadas las rutas principales en las que interviene la molécula micotiol.

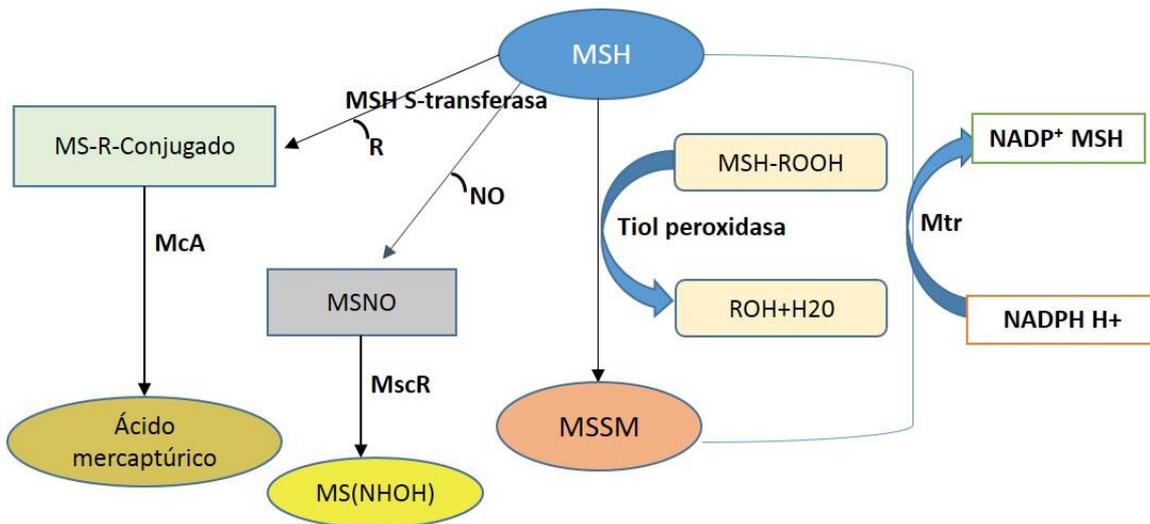


Figura 86. Esquema representativo de las biotransformaciones de la molécula micotiol. De las siglas en inglés: MSH: Micotiol, MSH S-transferasa: Micotiol-S-transferasa, MSSM: Disulfuro de Micotiol, Mtr: Micotiol disulfuro reductasa, McA: Micotiol amidasa, MscR: Nitrosotiol reductasa, MSNO: Nitrosomicotiol, MS(NHOH): Micotiol sulfinamida.

El metabolito 1-tuberculosiniladenosina (1-TbAd) fue encontrado diferencial en nuestro estudio. Esta molécula es un nucleósido terpénico para el que aún no se ha podido determinar su función principal.¹¹⁴

La formación de esta molécula se produce por la ciclación de geranilgeranil pirofosfato en tuberculosino pirofosfato llevado a cabo por la enzima Rv3377c, posteriormente la enzima Rv3378c, tuberculosinil transferasa daría lugar a la molécula 1-TbAd, que puede reorganizarse

a N6-TbAd.^{115,116} Hasta ahora 1-TbAd ha sido detectado solo en *M. tuberculosis* por lo que su expresión se correlaciona con la evolución de la virulencia. Hasta el momento ha sido estudiada solo en cepas adaptadas de laboratorio, de ahí que el mecanismo por el que se produce en el huésped permanece desconocido. Se ha utilizado la bioinformática por medio de herramientas predictivas para intentar aclarar su papel en *M. tuberculosis* pero no han servido de utilidad porque no se pudieron identificar genes biosintéticos ortólogos o similares a purinas en otras especies.¹¹⁷

Se conoce que *M. tuberculosis* es capaz de resistir la acidificación, mediante la exclusión de la función lisosómica con fagosomas infectados por un mecanismo de inmuno-evasión, resultante del bloqueo bacteriano de la entrega de vesículas ATPasa a fagosomas infectados. Aunque el mecanismo conocido limita el bombeo de protones en compartimentos infectados, se presentan nuevos estudios que proponen mecanismos complementarios que actúan dentro del fagosoma para recoger protones que llegan. Estos se basan en la alta producción observada de 1-TbAd y la reinterpretación de un trasposón que muestra que Rv3377c y Rv3378c controlan la acidificación fagosómica de *M. tuberculosis*, por lo que se plantea la hipótesis de que 1-TbAd podría actuar como una exotoxina que controla el pH del fagolisosoma, debido a que solo *M. tuberculosis* presenta esta capacidad y además es el único que sintetiza esta molécula.^{118,119} Se realizaron una serie de experimentos para intentar demostrar la función anti-ácida de 1-TbAd. Los genes involucrados en la producción de esta molécula fueron transferidos a *Mycobacterium kansasii* y se detectó utilizando espectrometría de masas la presencia de 1-TbAd. El crecimiento del microorganismo a pH neutro no se vio afectada, pero si se observó que el crecimiento aumentaba a pH entre 5,1-5,4 lo que se asemeja al que presentan los macrófagos activos. Así mismo, las cepas de *M. tuberculosis* que perdieron los genes relacionados con la producción de 1-TbAd, disminuyeron la supervivencia a ese pH. Recientemente se han llevado a cabo estudios en modelos de ratón infectados con cepas de *M. kansasii* salvaje y *M. kansasii* mutante con los genes correspondientes a Rv3377c y Rv3378c. Los resultados obtenidos demuestran una ventaja temprana en la replicación bacteriana durante la infección pulmonar consistente en una mayor supervivencia en macrófagos alveolares, sin embargo *M.kansasii::Rv3377c* y *Rv3378c* fue superado por el tipo salvaje a largo plazo de la infección murina. Además, refuerza esta teoría la comparación de esta molécula con cloroquina y los efectos que confiere de función antiácida, observando valores similares de pKa, potencia y función fisiológica de ambas moléculas, apuntando a 1-TbAd como inhibidor de la autofagia. Estas observaciones apoyan el desarrollo de sintéticos de 1-TbAd y análogos como posibles fármacos disruptores de lisosomas.¹²⁰

Otros de los hallazgos recientes sobre esta molécula es la capacidad de alta producción de las cepas que se han aislado de pacientes, poniendo así de manifiesto el fracaso del desconocimiento durante décadas de investigación de tuberculosis de esta molécula, que quizás podría servir como un biomarcador en el diagnóstico de la tuberculosis, y más importante aún de un biomarcador para conocer la evolución de la enfermedad.

En cuanto al manitol, se encontró que este polialcohol apareció con una diferencia de más de 12 veces en la cepa salvaje MT103 en relación a la cepa vacuna. La ruta de producción de manitol en *M. tuberculosis* no está del todo clara. Hasta la fecha se ha descrito la utilización de esta molécula como una fuente de azúcar para el crecimiento de micobacteria. La ruta biosintética de algunos microorganismos eucariotas y procariotas que son capaces de producir esta molécula está bien caracterizada a partir de fructosa y NADPH. Aunque no está del todo claro la producción en *M. tuberculosis*, recientemente se ha demostrado la producción de manitol por la especie *Mycobacterium smegmatis*, microorganismo que en los últimos años se está utilizando como modelo para estudiar el mecanismo regulador de genes de especies virulentas de micobacterias.¹²¹ En ese estudio se demuestra que el gen Ms5575 codifica un represor transcripcional, similar a GntR y al gen Ms5576 que codifica a la enzima manitol 2-deshidrogenasa que puede producir D-manitol a partir de D-manosa. La búsqueda que realizaron en KEGG reveló que Ms5576 estaba descrita como D-manonato oxidoreductasa o manitol 2-deshidrogenasa. Un experimento llevado a cabo en el que se utilizó como mezcla de reacción sustrato D-manosa y la proteína Ms5576 dio lugar a la aparición de manitol, demostrando que la enzima Ms5576 actúa como manitol deshidrogenasa, además de la descripción de la ruta de producción de manitol. En nuestro estudio se puso de manifiesto la implicación de manitol en la producción de biofilm, a través de la vía de Ms0179, un factor de transcripción que activa la expresión de los genes que regulan el metabolismo de D-manitol lo que conducía a un aumento de la formación de biofilm en *M. smegmatis*, que puede darse a través de dos mecanismos, el primero, por el metabolismo de manitol intracelular que posteriormente es transportado a la matriz extracelular como una composición de matriz de biofilm y puede activar su formación, y en segundo lugar, el manitol actúa como protector de especies reactivas de oxígeno por lo que puede evitar que las bacterias formen biofilm bajo estrés oxidativo.¹²¹

Los hallazgos en nuestro análisis ponen de manifiesto la producción endógena por *M. tuberculosis* de manitol. Así mismo, la producción aumentada en la cepa salvaje, que podría explicar una menor capacidad en la formación de biofilm en la cepa atenuada. La producción de biofilm en *M. tuberculosis* tiene lugar a partir de tres modelos de formación, que van a depender

de la fisiología de la bacteria residente y de la naturaleza del biomaterial que mantiene esa masa bacteriana junta. Esos modelos incluyen las películas de biofilm formadas en la interfaz líquido –aire de los cultivos, biopelículas inducidas por lisado de leucocitos y biopelículas inducidas por estrés reductor de tiol.¹²²

La composición de la sustancia celular polimérica es variable, pudiendo formar parte de esta, polisacáridos, proteínas estructurales, ADN extracelular y lípidos. Durante un largo periodo se pensó que los lípidos y concretamente los ácidos micólicos, eran los componentes principales de las biopelículas en *M. tuberculosis*. Pero en los últimos años esta idea ha cambiado proponiendo a los polisacáridos como los principales componentes.^{123,124}

Además de las funciones descritas para la formación de biopelículas, cabe destacar el efecto que puede tener esta matriz extracelular en la patogenia *in vivo* de *M. tuberculosis*, Así, Wright y col. pusieron de manifiesto mediante un sistema *in vitro* de un modelo de granuloma, constituido a partir de células mononucleares de sangre periférica, macrófagos, células gigantes multinucleadas, células B y células T, la presencia e importancia de biofilm en la infección *in vivo*.^{125, 126}

Por último, dentro de los metabolitos intracelulares diferenciales en el análisis de metabolómica no dirigida, destacan las diferencias encontradas en la molécula micobactina (R=20:1). Esta molécula identificada tentativamente fue encontrada en la cepa salvaje aumentada en más de 11 veces de diferencia. Las micobactinas son esenciales para el crecimiento *in vivo* y la supervivencia de *M. tuberculosis*.¹²⁷ Se trata de un lípido cuya función principal es la captura de hierro, y constituye una familia que presentan una estructura peptídica común con ligandos de Fe hexadentados de alta afinidad que neutraliza el catión y lo une a la cadena lipídica que presenta, y que así mismo puede mostrar una cadena de ácido graso de 16 a 22 C.¹²⁸ Los sideróforos de micobactina desempeñan un papel esencial en la captura de hierro no hemo. Como se ha podido observar tras la atenuación del crecimiento después de la eliminación de los genes en mutantes para la producción de micobactina sintasa. *M. tuberculosis* puede captar el hierro del huésped para poder llevar a cabo las reacciones de síntesis de ADN y la respiración de dos modos, de forma libre y, en este caso, lo hacen las micobactinas, o de la sangre en forma de grupo hemo realizado por otro tipo de sideróforos, en este caso, carboximicobactinas.^{129,130}

Parece que la micobactina es necesaria para la virulencia de *M. tuberculosis*, pero su biosíntesis se entiende de forma incompleta. En un intento por esclarecer estos procesos de

síntesis se realizó un estudio por Madigan y colaboradores, donde fueron eliminados los genes MbtN y MbtK potencialmente necesarios para generar la cola de lípidos de micobactina.^{131,132}

La eliminación de MbtK cambió específicamente el comportamiento lipídico de la micobactina y produjo la privación extrema de hierro que limitó el crecimiento de *M. tuberculosis* en ratones infectados con el mutante. La combinación de la pérdida de este gen y la falta de hierro en el organismo desencadenó un agotamiento general de fosfolípidos, elementos clave en la membrana bacteriana. De este modo se concluyó que las micobactinas actúan de modo independiente a la vía de adquisición del grupo hemo, impactando en la homeostasis lipídica y en la supervivencia de *M. tuberculosis*. Además la captura y la sobrecarga de hierro se han visto relacionadas directamente con el aumento del riesgo de tuberculosis, del fracaso en el tratamiento de esta enfermedad y con la mortalidad de los infectados por *M. tuberculosis*. Por todo ello la disminución de esta molécula en la cepa vacuna respalda y refuerza la menor virulencia en relación a una mayor síntesis de esta molécula en la cepa salvaje.

La molécula di-AMP cíclico es el segundo dinucleótido cíclico hallado en bacterias. Este hecho se produjo en 2.008 mediante estudios de cristalización de la proteína DisA enlazado a ADN de *Bacillus subtilis* y *Thermotoga maritima*.¹³³ El primer dinucleótido descubierto de este tipo fue di-GMP cíclico. Se trata de un segundo mensajero que actúa en el control de la expresión génica y, se han realizado estudios donde aparece como implicado en la formación de biofilm y en la expresión de genes de virulencia en *P. aeruginosa*.¹³⁴ Posteriormente, se realizaron distintas investigaciones y no se encontraron indicios de su posible presencia en eucariotas¹³⁵. Sin embargo esta molécula puede actuar como una señal de activación sobre las propiedades inmunomoduladoras e inmunoestimuladoras ante este tipo de células. La diferencia más acusada entre ambas moléculas es que di-AMP-cíclico sí es una molécula esencial para la célula, mientras que di-GMP no lo es. Esto ha quedado patente en diferentes estudios con *Listeria monocytogenes*,¹³⁶ *Mycoplasma pulmonis* o *Streptococcus pneumoniae* donde la ausencia o la falta de función de adenilato ciclasa producía bacterias no viables.⁷⁴ Estos dos nucleótidos cíclicos representan una categoría de moléculas pequeñas que durante la infección actúan como activadores para la respuesta inmune innata.

El di-AMP cíclico es sintetizado a partir de dos moléculas de ATP por acción de la enzima diadenilato ciclasa, en tanto que la degradación la realiza una enzima fosfodiesterasa, con la formación de AMP.^{74,137,138} Se trató de encontrar una función a este segundo mensajero y en un estudio realizado con *Staphylococcus aureus* se demostró que podía servir de ayuda para hacer frente al estrés de la pared celular y que podía regular el tamaño celular.¹³⁹ Aun así estos

resultados previos, estaban lejos todavía de las principales funciones de esta molécula en distintos patógenos. La primera evidencia de liberación de esta molécula al citoplasma de una célula huésped por *L. monocytogenes* fue llevado a cabo por el grupo de Woodward que puso de manifiesto la estimulación de la respuesta inmune del huésped mediada por interferón- γ (INF- γ)¹³⁶.

Posteriormente se detectó el dinucleótido en extractos de *Streptococcus pyogenes* y *B. subtilis*. En este último se observó una relación directa con la esporulación.¹⁴⁰ Otras funciones le han sido atribuidas como la regulación de la síntesis de ácidos grasos en *M. smegmatis*. En el genoma de *M. tuberculosis* se encontró la secuencia de ADN que codificaba para la enzima di-adenilato ciclasa que sintetiza di-AMP-cíclico a partir de ATP o ADP y el gen *cnpB* que codifica para la fosfodiesterasa. Ortólogos de esta enzima están presentes en todos los genomas de micobacterias con la excepción de *Mycobacterium leprae*. Los datos obtenidos sobre otras infecciones bacterianas intracelulares sugieren que di-AMP-cíclico estimula la secreción de INF tipo I. En *M. tuberculosis* se ha encontrado esta misma función y la autofagia durante la infección. Al igual que en otros microorganismos patógenos se halló que *M. tuberculosis* secretaba c-di-AMP al citosol de macrófagos infectados.

Con el fin de confirmar la actividad de di-adenilato ciclasa se construyeron unos mutantes que sobreexpresaban la enzima. La producción de c-di-AMP aumento unas 20 veces en relación a la cepa salvaje. Para comprobar la asociación entre esta molécula y la respuesta del huésped IFN tipo I, fueron infectados macrófagos de ratón con mutantes que sobreexpresaban la enzima, cepas deficientes de la enzima y la cepa salvaje. Los resultados obtenidos mostraron claramente que la infección con la cepa que sobreexpresaba *disA* aumentaba la inducción de IFN- β y la producción de factor de necrosis tumoral, comparado con el resto de las cepas. También se produjo un aumento de citoquinas pro-inflamatorias. Otro factor importante en la defensa frente a *M. tuberculosis* es la autofagia por parte de los macrófagos que a su vez puede beneficiarse por la activación de la respuesta IFN tipo I. Las diferencias en la inducción de IFN- γ por aislados clínicos de *M. tuberculosis* en di-adenilato ciclasa y en fosfodiesterasa sugieren una asociación potencial con formas de enfermedad de la tuberculosis en humanos. Es preciso resaltar la importancia de la detección de c-di-AMP en la resistencia innata del huésped a la tuberculosis. La capacidad de esta molécula para gobernar el resultado de la infección intracelular evidencia nuevos enfoques para el tratamiento y la prevención de la tuberculosis, así como de otras enfermedades relacionadas.¹³⁹

Posteriormente a estos hallazgos, se realizaron estudios con BCG. La adición de IFN tipo I mejoró su inmunogenicidad *in vitro*, así como la vacunación con BCG junto con INF tipo I protege a los ratones contra *Mycobacterium lepraemurium*¹⁴¹. Estas observaciones implican que el defecto en la inducción de IFN tipo I es una de las razones del fracaso de BCG. Ha sido bien establecido por otra parte que M. tuberculosis ESX-1 es necesario para la respuesta IFN tipo I tanto *in vivo* como *in vitro*.¹⁴² ESX-1 está parcialmente codificado por genes en la región de diferencia 1, un locus en el genoma de *M. tuberculosis* no presente en BCG.¹⁴³ En esta región se encuentran los genes *esxA* y *esxB* que codifican para ESAT-6 y CFP-10. ESAT-6 es esencial para la ruptura de la membrana fagosómica y liberando los componentes micobacterianos en el citosol de la célula huésped.^{144,145,146} Un reciente estudio reveló que ESX-1 es necesaria para permeabilizar la membrana del fagosoma.¹⁴⁷ Se demostró que c-di-AMP puede ser secretada por MtbΔcnp pero no por BCGΔcnp. La maquinaria de secreción y RD1 se requiere para inducir la respuesta inmune IFN tipo I mediada por c-di-AMP. Proteínas codificadas por ESX-1 facilitan la liberación de c-di-AMP al citoplasma del macrófago, mientras tanto el ADN de *M. tuberculosis* es liberado también y activa la producción de CGAMP (el último dinucleótido cíclico descrito). Ambos dinucleótidos son detectados por STING que induce la respuesta tipo I. La vacuna BCG con ESX-1 de *Mycobacterium marinum* induce IFN tipo I y una respuesta de células T más fuerte, que proporciona mejor protección contra *M. tuberculosis*, sugiriendo su beneficio. Los autores de este estudio exponen la limitación de BCG en la prevención de la epidemia de tuberculosis y proponen que la manipulación de la secreción de c-di-AMP de BCG y su liberación en el fagosoma del huésped durante la vacunación permitirá a BCG inducir a IFN tipo I, que podría mejorar su inmunogenicidad.¹⁴⁸

c-di-AMP ha sido explorado como un adyuvante para vacunas e induce una fuerte inmunidad humoral y celular. Por lo que un BCG basado en *cnpB* y la modificación de la maquinaria de secreción de c-di-AMP puede incrementar la eficacia de la vacuna. A partir de estos resultados y otros similares un grupo de investigadores construyeron un recombinante para BCG que sobreexpresaba *DisA*, demostrando que *DisA* induce respuestas humorales y celulares más elevadas que BCG. Estos datos sugieren que la respuesta inmune se beneficia principalmente del aumento de la acumulación endógena de c-di-AMP, pero menos por inmunogenicidad de *DisA* que por sí misma. La elevación de c-di-AMP en BCG mejora la inmunogenicidad de la vacuna e induce una respuesta inmune más fuerte en macrófagos y ratones inmunizados, especialmente después de la infección por *M. tuberculosis*, que se relaciona

con la inmunidad adquirida. Por la tanto DisA, y c-di-AMP deben evaluarse más a fondo como prometedores inmunomoduladores para múltiples potenciales de aplicación en tuberculosis u otras enfermedades infecciosas, e incluso en la terapia contra el cáncer.¹⁴⁹ Los resultados obtenidos en cuanto a esta molécula en la cepa vacuna, respaldan y apoyan la inmunidad de la vacuna MTBVAC frente a la cepa salvaje, además de proporcionar una ventaja importante en cuanto a la vacuna actual BCG contra la tuberculosis.

A modo de resumen en la figura 87, pueden verse todos los metabolitos intracelulares identificados en el análisis de metabolómica no dirigida y dirigida, junto con algunas de las funciones más representativas en relación a la seguridad y eficacia de la cepa atenuada MTBVAC.

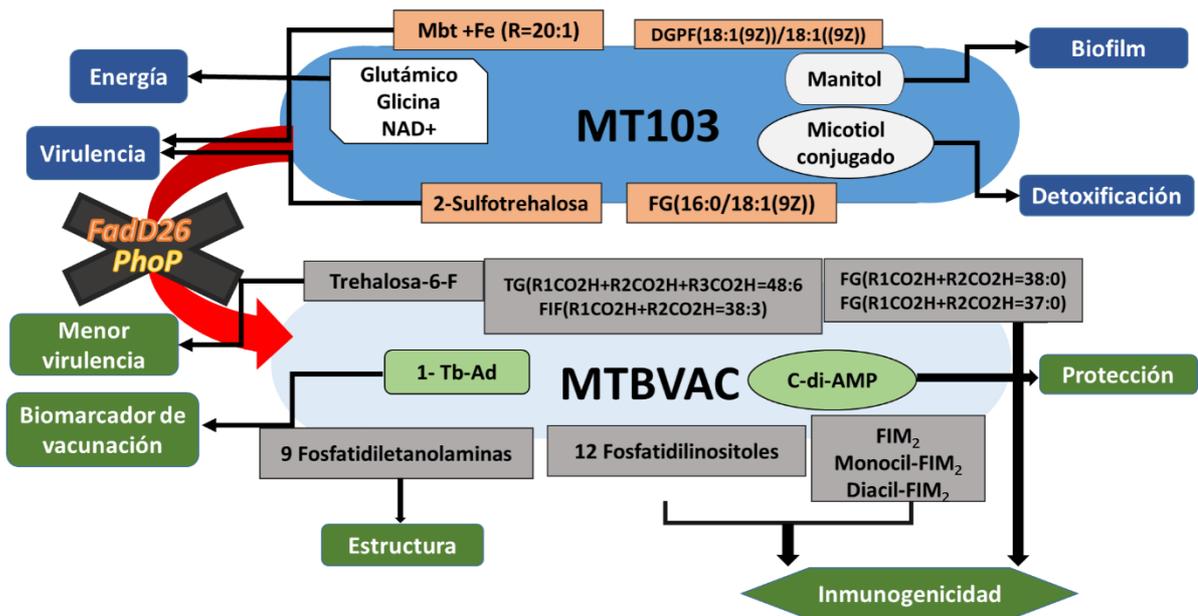


Figura 87. Metabolitos intracelulares diferenciales entre MT103 y MTBVAC con algunas de sus funciones destacadas. Mbt: Micobactina, DGPF: Dioleoil glicerol pirofosfato, 1-TbAd: 1-Tuberculosiniladenosina, FIM: fosfatidilinositol manósido

5.3 Metabolitos extracelulares

Uno de los aspectos más destacados en cuanto a la infección por *M. tuberculosis* dentro del hospedador, sería su capacidad de evasión dentro de los macrófagos. La principal línea defensiva realizada por este tipo de células conlleva a la internalización del bacilo dentro de una vacuola conocida como fagosoma, que adquiere características microbicidas y de degradación por procesos de maduración. *M. tuberculosis* ha adoptado estrategias notables para sobrevivir y proliferar dentro de los fagosomas de macrófagos, donde su supervivencia depende principalmente de la capacidad para tomar el control del procesamiento fagosómico, a través de la inhibición de los procesos de acidificación y biogénesis de fagolisosomas. *M. tuberculosis* una vez dentro del fagosoma, es capaz de reclutar marcadores endosomales tempranos Rab5, permaneciendo accesible a los marcadores de reciclaje del endosoma Rab11. Además, TACO es reclutada y retenida en la superficie del fagosoma, donde activa las señales de Ca-calcineurina para bloquear la fusión de lisosomas con los fagosomas de micobacteria. Por otro lado, ManLAM y la fosfatasa SapM segregada inhibe la actividad regulatoria del lípido de membrana fosfatidilinositol 3-fosfato, lo que dificulta la adquisición fagosómica de carga lisosomal y la liberación de enzimas hidrolíticas desde el aparato de Golgi. En cuanto a impedir la acidificación, proceso esencial para la defensa por el macrófago, el patógeno trata de inhibir el ensamblaje de la maquinaria de H⁺ V-ATPasa, utilizando para ello la fosfatasa PtpA secretada por este y capaz de impedir la unión de la subunidad H de este complejo, o con otros mecanismos mediados por la interacción de TMD con receptores lectina tipo C¹⁵⁰. En los procesos de escapada de los fagosomas, además son claves el papel de ESX-1 y de los lípidos de membrana DIM/TDIM. Estos procesos son determinantes para las respuestas inmunitarias específicas y los programas de muerte celular, para poder acabar con éstas células finalmente^{144,146,40}. La comprensión de los eventos moleculares que gobiernan la supervivencia en macrófagos es fundamental para la mejora de estrategias terapéuticas y basadas en vacunas para ayudar al huésped a defenderse mejor en la batalla contra el invasor *M. tuberculosis*. A priori utilizar los sobrenadantes de los cultivos entre la cepa MTBVAC y MT103 para intentar buscar diferencias en la excreción de algunos de metabolitos, podría ser una estrategia importante para identificar moléculas que puedan tener cierta relación con la virulencia de *M. tuberculosis*, y podría servir de base, para experimentos más complejos de cultivos *in vitro* de macrófagos infectados

Los hallazgos encontrados en el análisis de metabolitos extracelulares aportaron poca información en cuanto a la asignación de estructuras. Este hecho está relacionado con la falta de

espectros de fragmentación. Sólo cuatro metabolitos pudieron identificarse con un error de masas mínimo dentro del grupo de las cardiolipinas (son componentes estructurales de la envuelta celular de *Micobacterium*, al igual que otros fosfolípidos como, FE y FG) pero a diferencia de estas no parece que tengan una relación directa con el crecimiento del microorganismo.^{84, 151}

En un estudio llevado a cabo por Fisher y colaboradores¹⁵² se pone de manifiesto la formación de liso-cardiolipina y diliso-cardiolipina por parte *M. tuberculosis*, a partir de cardiolipina de su envuelta celular empleando la fosfolipasa A2 independiente de Ca²⁺ presente en los lisosomas de macrófagos infectados. La cardiolipina por sí sola se relacionó con las micobacterias durante el periodo de infección, mientras que la molécula liso-cardiolipina fue transportada fuera del fagosoma mediante vesículas.

Se ha demostrado que los liso-fosfolípidos pueden suprimir la secreción de IL-2 de células T CD4 activadas e inhibir la fusión de los fagosomas.^{153,154} Las micobacterias patógenas sobreviven en macrófagos y residen dentro de los fagosomas que no se fusionan con los lisosomas. Por lo mismo, la liso-cardiolipina puede ser un lípido candidato involucrado en la prevención de la fusión de fagolisosomas o la supresión de las funciones de las células T CD4. En cuanto a las diferencias encontradas en nuestros análisis, fueron tres derivados de diliso-cardiolipinas y una cardiolipina. Los metabolitos que aparecieron como diferenciales, dentro de estos, tres de ellos estaban aumentados en MT103 y uno solo en MTBVAC. Realmente si existe una relación con estas moléculas y la prevención de la fagocitosis por el huésped, la menor presencia de estas en la cepa vacuna sería beneficiosa, al actuar directamente sobre los mecanismos de defensa de *M. tuberculosis*.

Por lo que respecta FIM₁, los tres tipos diferían entre sí por la longitud de las cadenas de ácido grasos que lo constituyen, y se encontraban aumentados en la cepa MT103. Este glicerofosfolípido sería el primer componente en la síntesis de las moléculas conocidas como FIM. Anteriormente se ha descrito la implicación de este tipo de moléculas y derivados en la inmunidad de *M. tuberculosis*. Con estos hallazgos en el sobrenadante, y con las diferencias que aparece en el mutante con varias copias del gen *phoP*, parece muy clara la relación de este con la producción de FIM₁ y su secreción, así como su implicación en la virulencia. La menor secreción de este metabolito posiblemente aporte una ventaja en cuanto a la seguridad de la vacuna. En los análisis realizados de metabolitos intracelulares no se han encontrado aparentemente diferencias respecto a la abundancia de esta clase concreta de FIM. Sin embargo, sí que intracelularmente se han encontrado FIM₂ y derivados de este, en una cantidad mayor en

Análisis metabólico entre MT103 y MTBVAC

las cepas que carecían del gen *phoP*. Así, esa mayor síntesis de este tipo de moléculas, que además son excretadas, en la cepa MT103 y su posible papel en la virulencia no han sido reportados por el momento. Sin embargo, a partir de estos resultados y por la posible implicación del gen *phoP* en las diferencias de la excreción de este tipo de moléculas quizás habría que plantearse un papel más importante de las mismas en los procesos de infección y de la virulencia de *M. tuberculosis*.

6. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado y validado una metodología analítica y una estrategia metabolómica que permiten una caracterización casi completa de *M. tuberculosis*.
- El perfil metabolómico de MTBVAC indica claramente una disminución de la capacidad infectiva del patógeno, así como otras modificaciones que demuestran un perfil metabolómico específico para la cepa atenuada. Las diferencias moleculares encontradas respaldan la seguridad de la vacuna. Algunos de los metabolitos identificados podrían proponerse para uso clínico como biomarcadores de la enfermedad e incluso puede que de la vacunación. Las diferencias en la producción de di-AMP cíclico en MTBVAC sugieren una mejora de esta nueva vacuna frente a la vacuna BCG existente.

7. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Parte de los resultados generados han sido difundidos como se detalla a continuación.:

- Séptimo congreso europeo de Microbiología (FEMS 2017) póster "Comparative metabolomics analysis between *Mycobacterium tuberculosis* and a tuberculosis vaccine candidate MTBVAC (Valencia, 9-13 Julio 2017).
- Congreso ECCMID 2018 celebrado en Madrid del 21-24 de abril "Contribution of the *phoP* virulence gene to the metabolomic profile of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in the MTBVAC vaccine" en poster oral. (Madrid 21-24 abril 2018).
- revista ACS infectious diseases Artículo:
Comparative Metabolomics between *Mycobacterium tuberculosis* and the MTBVAC Vaccine Candidate. C Díaz, JDP Pérez, PL Valero-Guillén, PG Mena, I Pérez, F Vicente, Carlos Martin, Olga Genilloud, Antonio Sánchez-Pozo, Jesus Gonzalo-Asensio.
ACS infectious diseases 5 (8), 1317-1326. (Mayo 2019). Doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00008
Impact factor: 4.96
- Congreso Internacional European RFMF Metabomeeting del 22 al 24 de Enero en Toulouse (Francia) charla titulada "Searching for differential metabolites between *Mycobacterium tuberculosis* and the MTBVAC vaccine using non-targeted approach metabolomics (Toulouse 22-24 enero 2020).

8. AGRADECIMIENTOS

Mis queridos directores Dra. Francisca Vicente y Dr. Antonio Sánchez Pozo me faltarían palabras para decir todo el apoyo y confianza que me han transmitido, habéis sido indispensables en este camino difícil (lo digo sobre todo por la situación actual), aportando lo mejor de cada uno siempre. Resaltar que el Dr. Antonio como siempre, ha sido el gran profesor que es y ha hecho que no deje de aprender durante este tiempo. La Dra. Vicente ha estado disponible siempre, a cualquier hora, incansable y siempre amable. Muchas gracias a los dos por formar parte de esto, sin vosotros no hubiese sido posible.

Al Dr. Carlos Martín Montañés le estaré eternamente agradecida por dejarme aportar mi granito de arena a su gran labor con la humanidad, la vacuna contra la tuberculosis, espero que dentro de poco tiempo MTBVAC salve millones de vidas. Al Dr. Jesús Gonzalo-Asensio por su ayuda incondicional, ha sido muy importante todo este tiempo, he de decir que es un científico excelente, y un privilegio trabajar con él. Me siento muy afortunada de haber formado parte de vuestro proyecto.

A la Fundación MEDINA, por poner al alcance de mi mano la posibilidad de crecer profesionalmente y permitirme llegar lejos. Por tantas cosas que he aprendido durante este tiempo, realmente es una gran satisfacción formar parte de este equipo y haber tenido y seguir teniendo unos compañeros excelentes. Gracias Dani, Carmen, Mercedes, Thomas, María, Pepe, Berna, Teresa, Fernando, Pili, y a otros tantos. Ángeles y Patri siempre me hacéis el trabajo más fácil, me escucháis, aguantáis mis cambios de humor, e incluso de conducta, sois muy importantes para mí.

Ahora mis niñas, bueno ya no tanto. Mis biólogas, Ana, Carmen, María, Elena, Reme, Amparo e Iraya, porque siempre estáis ahí para apoyarme, para reírnos, contarnos cualquier cosa, discutir los avances en ciencia, e incluso pelearnos, pero siempre seréis mis grandes compañeras.

A Lucía, Loli, Juanma, Fran agradeceros tantos buenos momentos, tanto que me dais sin esperar nada a cambio, poder contar con vosotros siempre y sentirnos siempre partícipes de mis logros.

A mi familia, a mis maravillosos padres, a mis súper hermanas y a mis adorables sobrinos. Porque este año ha sido muy difícil para todos, pero hemos estado más unidos que nunca, por eso no puedo estar más orgullosa de la familia que tengo.

Análisis metabolómico entre MT103 y MTBVAC

A Javi, por sus más y sus menos, porque siempre tiene algo que enseñarme e inculcarme, aunque a veces no me lo tome del todo bien. Tu tan perfecto y yo tan imperfecta en ciertas cosas, pero no me lo tengas en cuenta.

Espero no dejarme a nadie, si es así disculparme, son los nervios del directo, esto casi acaba con una pandemia por medio, y con miedo, pero sin perder la esperanza, porque vendrán nuevas vacunas.

Mil gracias a todos, y de nuevo a mis padres porque a ellos les debo todo y por ser lo mejor que tengo. A mi hermana Toñi por ser una luchadora y enseñarme a ser más fuerte.

9. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Greenwood BM, Targett GAT. Malaria vaccines and the new malaria agenda. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(11):1600-1607. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03612.x
2. Rappuoli R, Aderem A. A 2020 vision for vaccines against HIV tuberculosis and malaria. *Nature.* 2011;473(7348):463-469. doi:10.1038/nature10124
3. Margaret A. Liu. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev.* 2011;239(1):62-84. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x/full>.
4. Nabel GJ. Designing Tomorrow's Vaccines. 2013:551-560. doi:10.1056/NEJMra1204186
5. MacNeil A, Glaziou P, Sismanidis C, Date A, Maloney S, Floyd K. Global Epidemiology of Tuberculosis and Progress Toward Meeting Global Targets — Worldwide, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(11):281-285. doi:10.15585/mmwr.mm6911a2
6. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO. *Tuberculosis Surveillance in Europe 2009.*; 2011. doi:10.2900/28358
7. Maitre T, Aubry A, Jarlier V, et al. Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis. *Médecine Mal Infect.* 2017;47(1):3-10. doi:10.1016/j.medmal.2016.07.006
8. Maloney E, Stankowska D, Zhang J, Fol M, Cheng Q, Lun S. The Two-Domain LysX Protein of Mycobacterium tuberculosis Is Required for Production of Lysinylated Phosphatidylglycerol and Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides. 2009;5(7). doi:10.1371/journal.ppat.1000534
9. Brewer TF. Preventing Tuberculosis with Bacillus Calmette-Guérin Vaccine: A Meta-Analysis of the Literature. *Clin Infect Dis.* 2000;31(Supplement_3):S64-S67. doi:10.1086/314072
10. Clark M, Cameron DW. The benefits and risks of bacille Calmette-Guérin vaccination among infants at high risk for both tuberculosis and severe combined immunodeficiency: Assessment by Markov model. *BMC Pediatr.* 2006;6:1-12. doi:10.1186/1471-2431-6-5
11. Wu Y, Cai M, Ma J, et al. Heterologous Boost Following Mycobacterium bovis BCG Reduces the Late Persistent, Rather Than the Early Stage of Intranasal Tuberculosis Challenge Infection. *Front Immunol.* 2018;9(October):2439.

- doi:10.3389/fimmu.2018.02439
12. Martín Montañés C, Gicquel B. New tuberculosis vaccines. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(SUPPL. 1):57-62. doi:10.1016/S0213-005X(11)70019-2
 13. Mack U, Migliori GB, Sester M, et al. LTBI: Latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J*. 2009;33(5):956-973. doi:10.1183/09031936.00120908
 14. Zhu B, Dockrell HM, Ottenhoff THM, Evans TG, Zhang Y. Tuberculosis vaccines: Opportunities and challenges. *Respirology*. 2018;23(4):359-368. doi:10.1111/resp.13245
 15. Martin C, Aguilo N, Marinova D, Gonzalo-Asensio J. Update on TB vaccine pipeline. *Appl Sci*. 2020;10(7):1-15. doi:10.3390/app10072632
 16. Soto CY, Menéndez MC, Pérez E, et al. IS6110 Mediates Increased Transcription of the *phoP* Virulence Gene in a Multidrug-Resistant Clinical Isolate Responsible for Tuberculosis Outbreaks. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):212-219. doi:10.1128/JCM.42.1.212-219.2004
 17. Brites D, Gagneux S. Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. *Immunol Rev*. 2015;264(1):6-24. doi:10.1111/imr.12264
 18. Aguilo N, Uranga S, Marinova D, Monzon M, Badiola J, Martin C. MTBVAC vaccine is safe, immunogenic and confers protective efficacy against Mycobacterium tuberculosis in newborn mice. *Tuberculosis*. 2016;96:71-74. doi:10.1016/j.tube.2015.10.010
 19. Solans L, Uranga S, Aguilo N, et al. Hyper-attenuated MTBVAC erp mutant protects against tuberculosis in mice. *Vaccine*. 2014;32(40):5192-5197. doi:10.1016/j.vaccine.2014.07.047
 20. Aguilo N, Alvarez-Arguedas S, Uranga S, et al. Pulmonary but not subcutaneous delivery of BCG vaccine confers protection to tuberculosis-susceptible mice by an interleukin 17-dependent mechanism. *J Infect Dis*. 2015;212(11):831-839. doi:10.1093/infdis/jiv503
 21. Spertini F, Audran R, Chakour R, et al. Safety of human immunisation with a live-attenuated Mycobacterium tuberculosis vaccine: A randomised, double-blind, controlled phase I trial. *Lancet Respir Med*. 2015;3(12):953-962. doi:10.1016/S2213-2600(15)00435-X
 22. Broset E, Saubi N, Guitart N, et al. MTBVAC-Based TB-HIV Vaccine Is Safe, Elicits HIV-T Cell Responses, and Protects against Mycobacterium tuberculosis in Mice. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2019;13(June):253-264. doi:10.1016/j.omtm.2019.01.014

23. Tameris M, Mearns H, Penn-nicholson A, et al. Live-attenuated Mycobacterium tuberculosis vaccine MTBVAC versus BCG in adults and neonates : a randomised controlled , double-blind dose-escalation trial. 2019;7(September):757-770. doi:10.1016/S2213-2600(19)30251-6
24. De Castro MJ, Pardo-Seco J, Martínón-Torres F. Nonspecific (heterologous) protection of neonatal BCG vaccination against hospitalization due to respiratory infection and sepsis. *Clin Infect Dis.* 2015;60(11):1611-1619. doi:10.1093/cid/civ144
25. Bordas Y, Pe E, Guilhot C, Gicquel B, Martı C. An essential role for phoP in Mycobacterium tuberculosis virulence. 2001;41:179-187.
26. Asensio G, Maia C, Ferrer NL, et al. The Virulence-associated Two- component PhoP-PhoR System Controls the Biosynthesis of Polyketide-derived Lipids in Mycobacterium tuberculosis *. 2006;281(3):1313-1316. doi:10.1074/jbc.C500388200
27. Gonzalo-Asensio J, Marinova D, Martin C, Aguilo N. MTBVAC: Attenuating the Human Pathogen of Tuberculosis (TB) Toward a Promising Vaccine against the TB Epidemic. *Front Immunol.* 2017;8(December):1-8. doi:10.3389/fimmu.2017.01803
28. Gonzalo-Asensio J, Mostowy S, Harders-Westerveen J, et al. PhoP: A missing piece in the intricate puzzle of Mycobacterium tuberculosis virulence. *PLoS One.* 2008;3(10):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0003496
29. Rohde KH, Abramovitch RB, Russell DG. Mycobacterium tuberculosis Invasion of Macrophages: Linking Bacterial Gene Expression to Environmental Cues. *Cell Host Microbe.* 2007;2(5):352-364. doi:10.1016/j.chom.2007.09.006
30. Tailleux L, Waddel SJ, Pelizzola M, et al. Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both Mycobacterium tuberculosis and infected human dendritic cells and macrophages. *PLoS One.* 2008;3(1). doi:10.1371/journal.pone.0001403
31. Honaker RW, Stewart A, Schittone S, Izzo A, Klein MR, Voskuil MI. Mycobacterium bovis BCG vaccine strains lack narK2 and narX induction and exhibit altered phenotypes during dormancy. *Infect Immun.* 2008;76(6):2587-2593. doi:10.1128/IAI.01235-07
32. Reed MB, Gagneux S, DeRiemer K, Small PM, Barry CE. The W-Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated. *J Bacteriol.* 2007;189(7):2583-2589. doi:10.1128/JB.01670-06

33. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol.* 2002;46(3):709-717. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03237.x
34. Walters SB, Dubnau E, Laval F, Daffe M, Smith I. The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. 2006;60:312-330. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05102.x
35. Solans L, Aguiló N, Samper S, et al. A Specific Polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Causes Differential ESAT-6 Expression and Identifies WhiB6 as a. 2014;82(8):3446-3456. doi:10.1128/IAI.01824-14
36. Romagnoli A, Etna MP, Giacomini E, et al. ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *Autophagy.* 2012;8(9):1357-1370. doi:10.4161/auto.20881
37. Aguilo JI, Alonso H, Uranga S, et al. ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol.* 2013;15(12):1994-2005. doi:10.1111/cmi.12169
38. Day TA, Mittler JE, Nixon MR, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains lacking surface lipid phthiocerol dimycocerosate are susceptible to killing by an early innate host response. *Infect Immun.* 2014;82(12):5214-5222. doi:10.1128/IAI.01340-13
39. Passemar C, Arbués A, Malaga W, et al. Multiple deletions in the polyketide synthase gene repertoire of *Mycobacterium tuberculosis* reveal functional overlap of cell envelope lipids in host-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 2014;16(2):195-213. doi:10.1111/cmi.12214
40. Augenreich J, Arbues A, Simeone R, et al. ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of *Mycobacterium tuberculosis* act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell Microbiol.* 2017;19(7):1-19. doi:10.1111/cmi.12726
41. Rhee KY, Pedro L, Carvalho S De, et al. Central carbon metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: an unexpected frontier. *Trends Microbiol.* 2011;19(7):307-314. doi:10.1016/j.tim.2011.03.008
42. Hawe JS, Theis FJ, Heinig M. Inferring interaction networks from multi-omics data. *Front Genet.* 2019;10(JUN):1-13. doi:10.3389/fgene.2019.00535
43. Ulaszewska MM, Weinert CH, Trimigno A, et al. Nutrimetabolomics: An Integrative

- Action for Metabolomic Analyses in Human Nutritional Studies. *Mol Nutr Food Res.* 2019;63(1):1-38. doi:10.1002/mnfr.201800384
44. Wang X, Sun H, Zhang A, Sun W, Wang P, Wang Z. Potential role of metabolomics approaches in the area of traditional Chinese medicine: As pillars of the bridge between Chinese and Western medicine. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(5):859-868. doi:10.1016/j.jpba.2011.01.042
45. ZHAO F, XUE C, WANG M, WANG X, LU W. A Comparative Metabolomics Analysis of *Saccharopolyspora spinosa* WT, WH124, and LU104 Revealed Metabolic Mechanisms Correlated with Increases in Spinosad Yield. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013;77(8):1661-1668. doi:10.1271/bbb.130169
46. du Preez I, Luies L, Loots DT. The application of metabolomics toward pulmonary tuberculosis research. *Tuberculosis.* 2019;115(February):126-139. doi:10.1016/j.tube.2019.03.003
47. M Z, M K, M G, et al. Integration of Metabolomics and Transcriptomics Reveals a Complex Diet of *Mycobacterium tuberculosis* during. *mSystems.* 2017;2(4):1-18.
48. Sartain MJ, Dick DL, Rithner CD, Crick DC, Belisle JT. Lipidomic analyses of *Mycobacterium tuberculosis* based on accurate mass measurements and the novel “Mtb LipidDB.” *J Lipid Res.* 2011;52(5):861-872. doi:10.1194/jlr.M010363
49. Das MK, Bishwal SC, Das A, et al. Deregulated tyrosine-phenylalanine metabolism in pulmonary tuberculosis patients. *J Proteome Res.* 2015;14(4):1947-1956. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00016
50. Du Preez I, Loots DT. New sputum metabolite markers implicating adaptations of the host to *Mycobacterium tuberculosis*, and vice versa. *Tuberculosis.* 2013;93(3):330-337. doi:10.1016/j.tube.2013.02.008
51. Isa F, Collins S, Lee MH, et al. Mass Spectrometric Identification of Urinary Biomarkers of Pulmonary Tuberculosis. *EBioMedicine.* 2018;31:157-165. doi:10.1016/j.ebiom.2018.04.014
52. Koen N, van Breda SV, Loots DT. Elucidating the antimicrobial mechanisms of colistin sulfate on *Mycobacterium tuberculosis* using metabolomics. *Tuberculosis.* 2018;111(May):14-19. doi:10.1016/j.tube.2018.05.001
53. Li F, Miao Y, Zhang L, Neuenswander SA, Douglas JT, Ma X. Metabolomic analysis

- reveals novel Isoniazid metabolites and hydrazones in human urine. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011;26(6):569-576. doi:10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-055
54. Loots DT. An altered Mycobacterium tuberculosis metabolome induced by katG mutations resulting in isoniazid resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2144-2149. doi:10.1128/AAC.02344-13
55. Loots DT. New insights into the survival mechanisms of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(3):655-660. doi:10.1093/jac/dkv406
56. Mahapatra S, Hess AM, Johnson JL, et al. A metabolic biosignature of early response to anti-tuberculosis treatment. *BMC Infect Dis.* 2014;14(1):1-11. doi:10.1186/1471-2334-14-53
57. Tientcheu LD, Maertzdorf J, Weiner J, Adetifa IM. Europe PMC Funders Group Differential transcriptomic and metabolic profiles of M. africanum - and M. tuberculosis - infected patients after , but not before drug treatment. 2016;16(5):347-355. doi:10.1038/gene.2015.21.Differential
58. Moffett JR, Arun P, Puthillathu N, et al. Quinolate as a Marker for Kynurenine Metabolite Formation and the Unresolved Question of NAD⁺ Synthesis During Inflammation and Infection. *Front Immunol.* 2020;11(February):1-27. doi:10.3389/fimmu.2020.00031
59. Preez I, Luies L, Loots DT. Metabolomics biomarkers for tuberculosis diagnostics : current status and future objectives. 2017.
60. Arbues A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J, et al. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated M. tuberculosis-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine.* 2013;31(42):4867-4873. doi:10.1016/j.vaccine.2013.07.051
61. Gonzalo-asensio J, Malaga W, Pawlik A, Astarie-dequeker C. Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. 2014;111(31). doi:10.1073/pnas.1406693111
62. Chesne-Seck ML, Barilone N, Boudou F, et al. A point mutation in the two-component regulator PhoP-PhoR accounts for the absence of polyketide-derived acyltrehaloses but not that of phthiocerol dimycocerosates in Mycobacterium tuberculosis H37Ra. *J Bacteriol.* 2008;190(4):1329-1334. doi:10.1128/JB.01465-07
63. Peces SR, Navarro CD, López CM, et al. Untargeted LC-HRMS-based metabolomics for

- searching new biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma: A pilot study. *SLAS Discov.* 2017;22(4):348-359. doi:10.1177/1087057116671490
64. Thissen D, Steinberg L, Kuang D. Quick and easy implementation of the Benjamini-Hochberg procedure for controlling the false positive rate in multiple comparisons. *J Educ Behav Stat.* 2002;27(1):77-83. doi:10.3102/10769986027001077
 65. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, et al. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. 2014:2097-2098.
 66. Hsu FF, Turk J, Owens RM, Rhoades ER, Russell DG. Structural Characterization of Phosphatidyl-myo-Inositol Mannosides from Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guérin by Multiple-Stage Quadrupole Ion-Trap Mass Spectrometry with Electrospray Ionization. II. Monoacyl- and Diacyl-PIMs. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2007;18(3):479-492. doi:10.1016/j.jasms.2006.10.020
 67. Valero-Guillén PL, Fernández-Natal I, Marrodán-Ciordia T, Tauch A, Soriano F. Ether-linked lipids of Dermabacter hominis, a human skin actinobacterium. *Chem Phys Lipids.* 2016;196:24-32. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.02.002
 68. Gilleron M, Quesniaux VFJ, Puzo G. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guérin and Mycobacterium tuberculosis H37Rv and its implication in toll-like receptor response. *J Biol Chem.* 2003;278(32):29880-29889. doi:10.1074/jbc.M303446200
 69. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011;162(6):1239-1249. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x
 70. Newton GL, Buchmeier N, Fahey RC. Biosynthesis and Functions of Mycothiol, the Unique Protective Thiol of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72(3):471-494. doi:10.1128/mmbr.00008-08
 71. Fukuda T, Matsumura T, Ato M, et al. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. *MBio.* 2013;4(1):8-10. doi:10.1128/mBio.00472-12
 72. Ribbenstedt A, Ziarrusta H, Benskin JP. Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLoS One.* 2018;13(11):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0207082
 73. Lee HJ, Kremer DM, Sajjakulnukit P, Zhang L, Lyssiotis CA. A large-scale analysis of

- targeted metabolomics data from heterogeneous biological samples provides insights into metabolite dynamics. *Metabolomics*. 2019;15(7):1-13. doi:10.1007/s11306-019-1564-8
74. Corrigan RM, Gründling A. Cyclic di-AMP: Another second messenger enters the fray. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(8):513-524. doi:10.1038/nrmicro3069
 75. Kanwar JR, Kanwar RK. Gut health immunomodulatory and anti-inflammatory functions of gut enzyme digested high protein micro-nutrient dietary supplement-Enprocal. *BMC Immunol*. 2009;10:7. doi:10.1186/1471-2172-10-7
 76. Mishra AK, Driessen NN, Appelmelk BJ, Besra GS. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: Structure, biogenesis and role in Mycobacterium tuberculosis physiology and host-pathogen interaction. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35(6):1126-1157. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00276.x
 77. Kuehnbaum NL, Britz-McKibbin P. New Advances in Separation Science for Metabolomics Resolving. *Chem Rev*. 2013;113:2437-2468.
 78. Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48(1):653-683. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094715
 79. Aldridge BB, Rhee KY. Microbial metabolomics: Innovation, application, insight. *Curr Opin Microbiol*. 2014;19(1):90-96. doi:10.1016/j.mib.2014.06.009
 80. Bingol K. Recent advances in targeted and untargeted metabolomics by NMR and MS/NMR methods. *High-Throughput*. 2018;7(2). doi:10.3390/ht7020009
 81. Creek DJ, Jankevics A, Breitling R, Watson DG, Barrett MP, Burgess KEV. Toward global metabolomics analysis with hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry: Improved metabolite identification by retention time prediction. *Anal Chem*. 2011;83(22):8703-8710. doi:10.1021/ac2021823
 82. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem*. 2012;402(1):231-247. doi:10.1007/s00216-011-5308-5
 83. Uppal K, Walker DI, Jones DP. xMSannotator: An R package for network-based annotation of high-resolution metabolomics data. *Anal Chem*. 2017;89(2):1063-1067. doi:10.1021/acs.analchem.6b01214
 84. Kaur D, Guerin ME, Škovierová H, Brennan PJ. *Biogenesis of the Cell Wall and Other*

- Glycoconjugates*. Vol 69.; 2009. doi:10.1016/S0065-2164(09)69002-X.Biogenesis
85. Daffé M, Crick DC, Jackson M. Genetics of Capsular Polysaccharides and Cell Envelope (Glyco)lipids. *Microbiol Spectr*. 2014;2(4):1-46. doi:10.1128/microbiolspec.mgm2-0021-2013
 86. Clarke OB, Tomasek D, Jorge CD, et al. Structural basis for phosphatidylinositol-phosphate biosynthesis. *Nat Commun*. 2015;6. doi:10.1038/ncomms9505
 87. Guerin ME, Korduláková J, Alzari PM, Brennan PJ, Jackson M. Molecular Basis of Phosphatidyl-myo-inositol Mannoside Biosynthesis and Regulation in Mycobacteria. *J Biol Chem*. 2010;285(44):33577-33583. doi:10.1074/jbc.R110.168328
 88. Fukuda T, Matsumura T, Ato M, et al. Critical Roles for Lipomannan and Lipoarabinomannan in Cell Wall Integrity of Mycobacteria and Pathogenesis of Tuberculosis. 2013;4(1):8-10. doi:10.1128/mBio.00472-12.Invited
 89. Pérez E, Samper S, Bordas Y, Guilhot C, Gicquel B, Martín C. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol*. 2001;41(1):179-187. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02500.x
 90. Wolf BJ, Tatituri RV V., Almeida CF, et al. Identification of a Potent Microbial Lipid Antigen for Diverse NKT Cells. *J Immunol*. 2015;195(6):2540-2551. doi:10.4049/jimmunol.1501019
 91. Rhijn I Van, Berlo T Van, Hilmenyuk T, Cheng T, Wolf BJ, Tatituri RV V. Human autoreactive T cells recognize CD1b. 2016;113(2). doi:10.1073/pnas.1520947112
 92. Jackson M, Crick DC, Brennan PJ. Phosphatidylinositol Is an Essential Phospholipid of Mycobacteria *. 2000;275(39):30092-30099. doi:10.1074/jbc.M004658200
 93. Epanand RM, Epanand RF. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2009;1788(1):289-294. doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.023
 94. Dowhan W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem*. 1997;66:199-232. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.199
 95. Dowhan W. A retrospective: Use of *Escherichia coli* as a vehicle to study phospholipid synthesis and function. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2013;1831(3):471-494. doi:10.1016/j.bbalip.2012.08.007
 96. Mileykovskaya E, Sun Q, Margolin W, Dowhan W. Localization and function of early cell

- division proteins in filamentous *Escherichia coli* cells lacking phosphatidylethanolamine. *J Bacteriol.* 1998;180(16):4252-4257. doi:10.1128/jb.180.16.4252-4257.1998
97. Bukata L, Altabe S, De Mendoza D, Ugalde RA, Comerci DJ. Phosphatidylethanolamine synthesis is required for optimal virulence of *Brucella abortus*. *J Bacteriol.* 2008;190(24):8197-8203. doi:10.1128/JB.01069-08
98. Su CC, Klenotic PA, Bolla JR, Purdy GE, Robinson C V., Yu EW. MmpL3 is a lipid transporter that binds trehalose monomycolate and phosphatidylethanolamine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;166(23):11241-11246. doi:10.1073/pnas.1901346116
99. Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology.* 2003;13(4):17-27. doi:10.1093/glycob/cwg047
100. Nobre A, Alarico S, Maranhã A, Mendes V, Empadinhas N. The molecular biology of mycobacterial trehalose in the quest for advanced tuberculosis therapies. *Microbiol (United Kingdom).* 2014;160(PART 8):1547-1570. doi:10.1099/mic.0.075895-0
101. Garcia-Vilanova A, Chan J, Torrelles JB. Underestimated Manipulative Roles of Mycobacterium tuberculosis Cell Envelope Glycolipids During Infection. *Front Immunol.* 2019;10(December). doi:10.3389/fimmu.2019.02909
102. Murphy HN, Stewart GR, Mischenko V V., et al. The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem.* 2005;280(15):14524-14529. doi:10.1074/jbc.M414232200
103. Korte J, Alber M, Trujillo CM, et al. Trehalose-6-Phosphate-Mediated Toxicity Determines Essentiality of OtsB2 in Mycobacterium tuberculosis In Vitro and in Mice. *PLoS Pathog.* 2016;12(12):1-22. doi:10.1371/journal.ppat.1006043
104. Angala SK, Belardinelli JM, Huc-claustre E, Wheat WH, Jackson M. *The Cell Envelope Glycoconjugates of Mycobacterium Tuberculosis The Cell Envelope Glycoconjugates of Mycobacterium Tuberculosis.*; 2014. doi:10.3109/10409238.2014.925420
105. Mougous JD, Petzold CJ, Senaratne RH, et al. Identification, function and structure of the mycobacterial sulfotransferase that initiates sulfolipid-1 biosynthesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(8):721-729. doi:10.1038/nsmb802
106. Newsholme P, Procopio J, Ramos Lima MM, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate - Their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct.* 2003;21(1):1-9. doi:10.1002/cbf.1003

107. Berney M, Berney-meyer L. HHS Public Access. 2017;5(3):1-26. doi:10.1128/microbiolspec.TBTB2-0030-2016.Mycobacterium
108. Harper CJ, Hayward D, Kidd M, Wiid I, Helden P Van. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase are regulated in response to nitrogen availability in Mycobacterium smegmatis. 2010.
109. Tullius M V, Horwitz M a. High Extracellular Levels of. *Society*. 2001;69(10):6348-6363. doi:10.1128/IAI.69.10.6348
110. Rawat M, Av-gay Y. Mycothiol-dependent proteins in actinomycetes. 2007;31:278-292. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00062.x
111. Buchmeier NA, Newton GL, Koledin T, Fahey RC. Association of mycothiol with protection of Mycobacterium tuberculosis from toxic oxidants and antibiotics. *Mol Microbiol*. 2003;47(6):1723-1732. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03416.x
112. Newton GL, Fahey RC. Mycothiol biochemistry. 2002:388-389. doi:10.1007/s00203-002-0469-4
113. Riordan SW, Field JJ, Corkran HM, et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Synthesis of mycothiol conjugate analogues and evaluation of their antimycobacterial activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015:3-6. doi:10.1016/j.bmcl.2015.03.070
114. Layre E, Jun H, Young DC, Jezek A, Buter J, Minnaard AJ. Molecular profiling of Mycobacterium tuberculosis identifies tuberculosinyl nucleoside products of the. 2014:2-7. doi:10.1073/pnas.1315883111
115. Layre E, Lee HJ, Young DC, et al. Molecular profiling of Mycobacterium tuberculosis identifies tuberculosinyl nucleoside products of the virulence-associated enzyme Rv3378c. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(8):2978-2983. doi:10.1073/pnas.1315883111
116. Young DC, Layre E, Pan SJ, et al. In vivo biosynthesis of terpene nucleosides provides unique chemical markers of mycobacterium tuberculosis infection. *Chem Biol*. 2015;22(4):516-526. doi:10.1016/j.chembiol.2015.03.015
117. Lau SKP, Lam CW, Curreem SOT, et al. Identification of specific metabolites in culture supernatant of Mycobacterium tuberculosis using metabolomics: Exploration of potential biomarkers. *Emerg Microbes Infect*. 2015;4(1):0. doi:10.1038/emi.2015.6
118. Vandal OH, Nathan CF, Ehrt S. Acid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J Bacteriol*. 2009;191(15):4714-4721. doi:10.1128/JB.00305-09

119. Buter J, Heijnen D, Wan IC, et al. Stereoselective Synthesis of 1-Tuberculosinyl Adenosine; A Virulence Factor of Mycobacterium tuberculosis. *J Org Chem.* 2016;81(15):6686-6696. doi:10.1021/acs.joc.6b01332
120. Buter J, Cheng TY, Ghanem M, et al. Mycobacterium tuberculosis releases an antacid that remodels phagosomes. *Nat Chem Biol.* 2019;15(9):889-899. doi:10.1038/s41589-019-0336-0
121. Hu J, Zhang H, Zhou S, Li W, He ZG. Characterization of a novel regulatory pathway for mannitol metabolism and its coordination with biofilm formation in Mycobacterium smegmatis. *J Genet Genomics.* 2018;45(9):477-488. doi:10.1016/j.jgg.2018.06.007
122. Chakraborty P, Kumar A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: Could we shorten the treatment of mycobacterial infections? *Microb Cell.* 2019;6(2):105-122. doi:10.15698/mic2019.02.667
123. Marsollier L, Brodin P, Jackson M, et al. Impact of Mycobacterium ulcerans biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2007;3(5):0582-0594. doi:10.1371/journal.ppat.0030062
124. Ackart DF, Hascall-Dove L, Caceres SM, et al. Expression of antimicrobial drug tolerance by attached communities of Mycobacterium tuberculosis. *Pathog Dis.* 2014;70(3):359-369. doi:10.1111/2049-632X.12144
125. Mycobacterium T, Wright CC, Hsu F, et al. crossm. 2017;85(8):1-17.
126. Brennan MJ. Biofilms and Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 2017;85(10):2017. doi:10.1128/IAI.00411-17
127. De Voss JJ, Rutter K, Schroeder BG, Su H, Zhu Y, Barry CE. The salicylate-derived mycobactin siderophores of Mycobacterium tuberculosis are essential for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(3):1252-1257. doi:10.1073/pnas.97.3.1252
128. Mitra A, Ko YH, Cingolani G, Niederweis M. Heme and hemoglobin utilization by Mycobacterium tuberculosis. *Nat Commun.* 2019;10(1):1-14. doi:10.1038/s41467-019-12109-5
129. Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep.* 2010;27(5):637-657. doi:10.1039/b906679a
130. Jones CM, Wells RM, Madduri AVR, et al. Self-poisoning of Mycobacterium tuberculosis

- by interrupting siderophore recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(5):1945-1950. doi:10.1073/pnas.1311402111
131. Madigan CA, Cheng TY, Layre E, et al. Lipidomic discovery of deoxysiderophores reveals a revised mycobactin biosynthesis pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(4):1257-1262. doi:10.1073/pnas.1109958109
 132. Madigan CA, Martinot AJ, Wei J, Madduri A. Lipidomic Analysis Links Mycobactin Synthase K to Iron Uptake and Virulence in *M. tuberculosis*. 2015:1-21. doi:10.1371/journal.ppat.1004792
 133. Witte G, Hartung S, Büttner K, Hopfner KP. Structural Biochemistry of a Bacterial Checkpoint Protein Reveals Diadenylate Cyclase Activity Regulated by DNA Recombination Intermediates. *Mol Cell*. 2008;30(2):167-178. doi:10.1016/j.molcel.2008.02.020
 134. Hengge R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(4):263-273. doi:10.1038/nrmicro2109
 135. Römling U. Great times for small molecules: C-di-AMP, a second messenger candidate in bacteria and archaea. *Sci Signal*. 2008;1(33):8-12. doi:10.1126/scisignal.133pe39
 136. Woodward JJ, Lavarone AT, Portnoy DA. C-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* (80-). 2010;328(5986):1703-1705. doi:10.1126/science.1189801
 137. Bai Y, Yang J, Zhou X, Ding X, Eisele LE, Bai G. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3586 (DacA) is a diadenylate cyclase that converts ATP or ADP into c-di-amp. *PLoS One*. 2012;7(4):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0035206
 138. Manikandan K, Sabareesh V, Singh N, Saigal K, Mechold U, Sinha KM. Two-step synthesis and hydrolysis of cyclic di-AMP in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0086096
 139. Dey B, Dey RJ, Cheung LS, et al. A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis. *Nat Med*. 2015;21(4):401-408. doi:10.1038/nm.3813
 140. Oppenheimer-Shaanan Y, Wexselblatt E, Katzhendler J, Yavin E, Ben-Yehuda S. C-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. *EMBO Rep*. 2011;12(6):594-601. doi:10.1038/embor.2011.77

141. Guerrero GG, Rangel-Moreno J, Islas-Trujillo S, Rojas-Espinosa O. Successive intramuscular boosting with IFN-alpha protects mycobacterium bovis BCG-vaccinated mice against M. lepraemurium infection. *Biomed Res Int.* 2015;2015(Mlm):1-9. doi:10.1155/2015/414027
142. Stanley SA, Johndrow JE, Manzanillo P, Cox JS. The Type I IFN Response to Infection with Mycobacterium tuberculosis Requires ESX-1-Mediated Secretion and Contributes to Pathogenesis. *J Immunol.* 2007;178(5):3143-3152. doi:10.4049/jimmunol.178.5.3143
143. Gordon S V., Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol.* 1999;32(3):643-655. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01383.x
144. Houben D, Demangel C, van Ingen J, et al. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol.* 2012;14(8):1287-1298. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01799.x
145. Simeone R, Bobard A, Lippmann J, et al. Phagosomal rupture by Mycobacterium tuberculosis results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog.* 2012;8(2). doi:10.1371/journal.ppat.1002507
146. Simeone R, Sayes F, Song O, et al. Cytosolic Access of Mycobacterium tuberculosis: Critical Impact of Phagosomal Acidification Control and Demonstration of Occurrence In Vivo. *PLoS Pathog.* 2015;11(2):1-24. doi:10.1371/journal.ppat.1004650
147. Conrad WH, Osman MM, Shanahan JK, et al. Mycobacterial ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(6):1371-1376. doi:10.1073/pnas.1620133114
148. Zhang Y, Yang J, Bai G. Cyclic di-AMP-mediated interaction between Mycobacterium tuberculosis Δ cnpB and macrophages implicates a novel strategy for improving BCG vaccination. *Pathog Dis.* 2018;76(2):1-9. doi:10.1093/femspd/fty008
149. Ning H, Wang L, Zhou J, et al. Recombinant BCG with Bacterial Signaling Molecule Cyclic di-AMP as Endogenous Adjuvant Induces Elevated Immune Responses after Mycobacterium tuberculosis Infection. *Front Immunol.* 2019;10(JULY). doi:10.3389/fimmu.2019.01519
150. Queval CJ, Brosch R, Simeone R. The macrophage: A disputed fortress in the battle against Mycobacterium tuberculosis. *Front Microbiol.* 2017;8(NOV):1-11.

doi:10.3389/fmicb.2017.02284

151. Jackson M. The Mycobacterial Cell Envelope — Lipids. 2014.
152. Fischer K, Chatterjee D, Torrelles J, Brennan PJ, Kaufmann SHE, Schaible UE. Mycobacterial Lysocardiolipin Is Exported from Phagosomes upon Cleavage of Cardiolipin by a Macrophage-Derived Lysosomal Phospholipase A 2 . *J Immunol.* 2001;167(4):2187-2192. doi:10.4049/jimmunol.167.4.2187
153. Basáñez G, Goñi FM, Alonso A. Effect of single chain lipids on phospholipase C-promoted vesicle fusion. A test for the stalk hypothesis of membrane fusion. *Biochemistry.* 1998;37(11):3901-3908. doi:10.1021/bi9728497
154. Goetzl EJ, Kong Y, Voice JK. Cutting Edge: Differential Constitutive Expression of Functional Receptors for Lysophosphatidic Acid by Human Blood Lymphocytes. *J Immunol.* 2000;164(10):4996-4999. doi:10.4049/jimmunol.164.10.4996