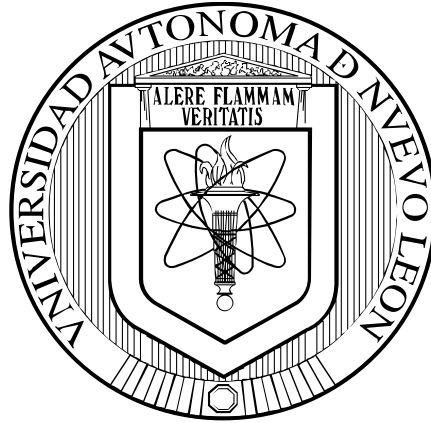


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE UNA CLONA DE
Mycobacterium tuberculosis RESISTENTE A TODOS LOS
MEDICAMENTOS ANTI-TUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA”**

PRESENTADO POR:

Q.B.P. YAZMIN BERENICE MARTÍNEZ MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

SEPTIEMBRE DE 2014

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE UNA CLONA DE
Mycobacterium tuberculosis RESISTENTE A TODOS LOS
MEDICAMENTOS ANTI-TUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA”**

PRESENTADO POR:

Q.B.P. YAZMIN BERENICE MARTÍNEZ MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

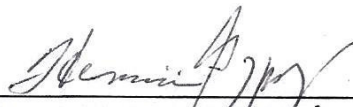
SEPTIEMBRE DE 2014

**SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE UNA CLONA DE *Mycobacterium tuberculosis*
RESISTENTE A TODOS LOS MEDICAMENTOS ANTI-TUBERCULOSIS DE
PRIMERA LÍNEA**

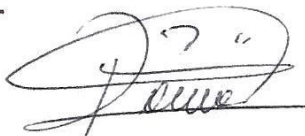
Aprobación de la Tesis:



DR. C. SALVADOR LUIS SAID Y FERNÁNDEZ
Director de Tesis



DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Co-Director de Tesis



DRA. C. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Miembro de Tesis

DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

“Si no conozco una cosa, la investigaré.”

Louis Pasteur

**“No basta saber las cosas, es necesario
practicarlas”.**

San Juan Bosco

“El genio es 1% inspiración y 99% transpiración”

T. Alva Edison

**“Para trabajar con éxito, téngase caridad en el
corazón y paciencia en la ejecución.”**

San Juan Bosco

**“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha
ciencia devuelve a Él.”**

Louis Pasteur

**Si he logrado ver más lejos, ha sido porque he
subido a hombros de gigantes”**

Bernardo de Chartres.

DEDICATORIA

A **Dios**, por permitirme hacer este trabajo, y darme todo y solo lo que necesito y lo mejor para mí. Porque sin él nada soy.

A **mis Padres**, por enseñarme la importancia del estudio, de la dedicación, y de hacer algo bueno de mi vida. Por el apoyo siempre otorgado para poder continuar mis estudios, y el amor dedicado día a día a mí y a mis hermanos.

A **mis hermanos**, porque somos parte de la misma familia. Gracias por las experiencias vividas.

A **mi novio**, Alejandro, por su apoyo incondicional, su ayuda. Por soportarme aún en mis días más estresados, y su comprensión en cuanto a los horarios.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Al **Dr. Salvador Said**. Muchas gracias por todas sus enseñanzas, sus consejos, las correcciones que me hizo por mi bien. Por todos los conocimientos que me ha compartido, y el tiempo dedicado a conducirme por los senderos de la ciencia e investigación. Gracias por su paciencia, y por estar siempre dispuesto a apoyarme en todos los ámbitos que necesitara. Por enseñarme que la cortesía, integridad, calidad y calidez humana no deben desligarse nunca del ser investigador. Por sus frases siempre tan atinadas a las circunstancias. Muchas gracias por aceptarme como una de sus alumnas, y creer en mí.

A la **Dra. Herminia Martínez**. Muchas gracias por su amabilidad, sus consejos y sugerencias para mi desarrollo personal, y científico. Por su ejemplo de mujer trabajadora e incansable, siempre dispuesta a buscar la verdad. Por su ejemplo de liderazgo, integridad y rectitud. Muchas gracias por su apoyo dentro, y fuera de la maestría.

A la **Dra. Rocío Ortiz**. Muchas gracias por su apoyo siempre tan amable y su disposición durante todo el trabajo. Porque a pesar de sus ocupaciones, dedicó su tiempo para atender mis cuestionamientos. Muchas gracias por su gran colaboración y dirección para el desarrollo de este proyecto.

A la **Dra. Gloria Molina**. Gracias por conducirme y enseñarme tantas cosas en la ciencia e investigación, y por su amistad.

A la **Dra. Katia Peñuelas**. Gracias por ser un modelo para mí en forma de trabajo. Porque aprendí la manera de organización, metodología y bioseguridad. Porque aprendí a hacer las cosas bien hechas.

Al **Dr. Lucio Vera**. Por su apoyo y colaboración en el desarrollo de una parte de la experimentación en la tesis. Por el aporte de sus conocimientos.

A la **Dra. Gloria González**. Porque su colaboración nos facilitó el arranque del proyecto. Por los equipos prestados, y la amabilidad siempre presente.

A los **L.B.G. Ramiro Elizondo y Ramsés González**. Por su colaboración en la elaboración del proyecto, y sus amables contribuciones. Por su amistad brindada.

A los **Q.C.B Carlos Cancela y la M.C. Paola Rivera**. Por su apoyo en el cumplimiento de metas para el término del trabajo.

A los **Técnicos Jorge Ortega y Oscar Limón**, por su soporte y apoyo en el laboratorio de Bioensayos, lugar de desarrollo del trabajo.

A todos **mis maestros de Posgrado**, por compartir sus conocimientos. Y algunos de ellos también sus equipos, y ayudarme a resolver mis dudas.

A **mis compañeros de posgrado**, por escucharme, darme consejos, por compartir las horas de estrés, desvelos y preocupaciones, al igual que los momentos de alegrías,

reconocimientos, metas cumplidas, logros profesionales y personales, además de todos esos momentos que vivimos juntos. Brenda, Rolando, Mauricio, Jesús, Selene, Vanessa, Gysela, Memo, Muza, Abraham, Nidia y Ulrich, gracias por su amistad y compañía.

Al **Centro de Investigación Biomédica del Noreste, del IMSS**, por la donación tan amable de la cepa.

Al **Laboratorio de Bioquímica y Medicina Molecular, al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, y a la facultad de Medicina**, por permitirme el uso de las instalaciones para mi aprendizaje y desarrollo.

A los **directivos de la Subdirección de Estudios de Posgrado** de esta facultad.

Al **Conacyt**, por la beca otorgada durante la realización de la Maestría, con el número de registro 486689.

Índice

	Página
Lista de tablas	i
Lista de figuras	ii
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
<i>I.1. Datos epidemiológicos</i>	2
<i>I.2 Descripción del agente etiológico</i>	2
<i>I.3 Mecanismos de patogenicidad y virulencia de MTB</i>	2
<i>I.4 Resistencia a fármacos</i>	3
<i>I.5 Importancia epidemiológica de la TBP-MFR</i>	5
<i>I.6 Mecanismo de acción de los fármacos de primera línea</i>	5
I.6.1. Estreptomicina.....	7
I.6.2. Isoniazida.....	7
I.6.3. Rifampicina.....	7
I.6.4. Etambutol.....	7
I.6.5. Pirazinamida.....	9
<i>I.7 Genes de MTB que le confieren resistencia a los fármacos de primera línea</i>	10
II. ANTECEDENTES	12
<i>II.1 Composición genética de MTB H37Rv</i>	12
<i>II.2 Aislado clínico CIBIN-99</i>	13
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. HIPÓTESIS	15
V. OBJETIVOS	16
V.1. OBJETIVO GENERAL.....	16
V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
VI. METAS	17
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	18

<i>VII.1 Medidas de bioseguridad observadas en este trabajo.....</i>	<i>18</i>
<i>VII.2 Micobacterias.....</i>	<i>18</i>
<i>VII.3 Obtención de las clonas de MTB.....</i>	<i>18</i>
<i>VII.4 Caracterización de las cepas progenitoras de H37Rv y CIBIN-99, y de sus clonas.....</i>	<i>19</i>
VII.4.1 Tinción de Ziehl-Neelsen.....	19
VII.4.2 Morfología de colonias.....	19
VII.4.3 Determinación del perfil de susceptibilidad a fármacos....	20
VII.4.3.1 Ensayo en microplaca con Alamar Azul (MABA).....	20
VII.4.3.1.1 Preparación de la suspensión bacteriana de trabajo.....	21
VII.4.3.1.2 Preparación de la microplaca.....	21
VII.4.3.1.3 Revelado de las microplacas.....	22
VII.4.3.2 Prueba de pirazinamidasas.....	22
VII.4.4 Genotipificación (RFLP-IS6110).....	23
VII.4.5 Determinación de velocidad de crecimiento.....	25
<i>VII.5 Secuenciación de una clona aislada de CIBIN-99.....</i>	<i>25</i>
VII.5.1 Extracción de ADN.....	25
VII.5.2 Secuenciación.....	26
<i>VII.6 Análisis Bioinformático</i>	<i>26</i>
VII.6.1 Ensamblaje y detección de diferencias genómicas entre H37RV y CIBIN-99-C1.....	26
VII.6.2 Identificación de los genes mutantes involucrados en las rutas biosintéticas afectadas por SIREP.....	27
<i>VII.7 Validación de los resultados de la secuenciación.....</i>	<i>27</i>
<i>VII.8 Propuesta de un mecanismo integrado de resistencia a fármacos.....</i>	<i>28</i>

VIII. RESULTADOS	29
<i>VIII.1 Obtención de las clonas de MTB</i>	29
<i>VIII.2 Caracterización de las cepas progenitoras H37Rv y CIBIN-99 y de sus clonas</i>	29
VIII.2.1 Tinción de Ziehl-Neelsen.....	29
VIII.2.2 Morfología de colonias.....	31
VIII.2.3 Determinación del perfil de susceptibilidad a fármacos.....	31
VIII.2.3.1 MABA.....	31
VIII.2.3.2 Prueba de pirazinamidasas.....	35
VIII.2.4 Genotipificación (RFLP-IS6110).....	35
VIII.2.5 Determinación de velocidad de crecimiento.....	38
<i>VIII.3 Secuenciación CIBIN-99-C1</i>	40
VIII.3.1 Extracción de ADN.....	40
VIII.3.2 Secuenciación.....	40
<i>VIII.4 Ensamblaje y detección de diferencias genómicas entre H37RV y CIBIN-99-C1</i>	41
<i>VIII.5 Identificación de los genes mutantes involucrados en las rutas biosintéticas afectadas por SIREP</i>	42
VIII.5.1 Identificación de mutaciones en los genes que confieren resistencia a CIBIN-99-C1 a cada fármaco de primera línea.....	46
VIII.5.1.1. Estreptomina.....	46
VIII.5.1.2. Isoniazida.....	48
VIII.5.1.3. Rifampicina.....	57
VIII.5.1.4. Etambutol.....	59
VIII.5.1.5. Pirazinamida.....	66
Validación de los resultados de la secuenciación.....	62, 66
IX. DISCUSIÓN	70
<i>IX.1. Resistencia a fármacos</i>	71
IX.1.1. Resistencia a estreptomina.....	73
IX.1.2. Resistencia a isoniazida.....	73
IX.1.3. Resistencia a rifampicina.....	75
IX.1.4. Resistencia a etambutol.....	75
IX.1.5. Resistencia a pirazinamida.....	76

<i>IX.2. Propuesta de un mecanismo integrado de mutaciones significativas en CIBIN-99.....</i>	76
<i>IX.3. Resistencia a fluoroquinolonas.....</i>	78
X.CONCLUSIONES.....	80
XI. PERSPECTIVAS.....	81
XII. REFERENCIAS.....	82



Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Genes causantes de resistencia a fármacos de primera línea.....	11
Tabla 2. Concentraciones iniciales utilizadas de los fármacos ($\mu\text{g/mL}$).....	21
Tabla 3. Programas utilizados para el análisis de proteínas.....	28
Tabla 4. CMI para cada fármaco, para las clonas y la cepa progenitora de H37Rv.....	34
Tabla 5. CMI para cada fármaco, para las clonas y la cepa progenitora de CIBIN-99.....	34
Tabla 6. Perfil de susceptibilidad a fármacos de las cepas originales y clonas trabajadas en este estudio.....	36
Tabla 7. Resultados de extracción de ADN de CIBIN-99-C1.....	40
Tabla 8. Resultados de secuenciación genómica de CIBIN-99-C1.....	42
Tabla 9. Genes analizados, involucrados en resistencia a fármacos.....	43
Tabla 10. Gen mutado relacionado con resistencia a estreptomicina.....	46
Tabla 11. Genes mutados relacionados con resistencia a isoniazida.....	49
Tabla 12. Gen mutado relacionado con resistencia a rifampicina.....	57
Tabla 13. Genes mutados relacionados con resistencia a etambutol.....	60
Tabla 14. Diseño de iniciadores para amplificar la región con delección en <i>embC</i>	63
Tabla 15. Condiciones de PCR para <i>embC</i>	63
Tabla 16. Gen mutado relacionado con resistencia a pirazinamida	66
Tabla 17. Diseño de iniciadores para amplificar la región con delección en <i>pncA</i>	66
Tabla 18. Propuesta de un mecanismo integrado de resistencia a fármacos.....	79



LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Porcentaje de nuevos casos con TB-MFR en el mundo.....	6
Figura 2. Principales dianas de los fármacos anti-TB.....	6
Figura 3. Mecanismo de acción de estreptomicina.....	8
Figura 4. Mecanismo de acción de isoniazida.....	8
Figura 5. Mecanismo de acción de rifampicina.....	8
Figura 6. Mecanismo de acción de etambutol.....	9
Figura 7. Mecanismo de acción de pirazinamida.....	9
Figura 8. Genoma de MTB H37Rv.....	13
Figura 9. Distribución de las placas de MABA.....	20
Figura 10. Control de reactivos para tinción de Ziehl-Neelsen en <i>Escherichia coli</i>	29
Figura 11. Tinción de Ziehl-Neelsen en diferentes preparaciones de MTB...	30
Figura 12. Morfología de las colonias de H37Rv y de sus clonas.....	32
Figura 13. Morfología de las colonias de CIBIN-99 y de sus clonas.....	32
Figura 14. Resultados representativos en ensayos de MABA en H37Rv y CIBIN-99.....	33
Figura 15. Prueba de presencia de la enzima pirazinamidasa.....	36
Figura 16. Integridad del ADN genómico antes de la digestión con PvuII....	37
Figura 17. ADN genómico digerido con la enzima PvuII.....	37
Figura 18. Patrón de bandeo de RFLP- <i>IS6110</i>	38
Figura 19. Curva de crecimiento de H37Rv.....	39
Figura 20. Curva de crecimiento de CIBIN-99.....	39
Figura 21. Imagen del mapeo de similitudes entre el genoma de H37Rv y el de CIBIN-99-C1.....	42
Figura 22. Alineamiento de proteínas de rpsL, entre H37Rv y CIBIN-99-C1	46
Figura 23. Modelaje de la proteína rpsL.....	47
Figura 24. Red de interacciones de la Estreptomicina.....	47
Figura 25. Red de interacciones de rpsL.....	48
Figura 26. Alineamiento de proteínas de katG, entre H37Rv y CIBIN-99-C1	50
Figura 27. Modelaje de la proteína katG.....	50
Figura 28. Red de interacciones de la isoniazida.....	51
Figura 29. Red de interacciones de katG.....	51



Figura 30. Alineamiento de proteínas de <i>ahpC</i> , entre H37Rvy CIBIN-99-C1.....	53
Figura 31. Modelaje de la proteína <i>ahpC</i>	53
Figura 32. Red de interacciones de <i>ahpC</i>	53
Figura 33. Alineamiento de proteínas de <i>efpA</i> , entre H37Rvy CIBIN-99-C1	55
Figura 34. Red de interacciones de <i>efpA</i>	55
Figura 35. Alineamiento de proteínas de <i>Rv1592c</i> , entre H37Rvy CIBIN-99-C1.....	56
Figura 36. Red de interacciones de <i>Rv1592c</i>	56
Figura 37. Alineamiento de proteínas de <i>rpoB</i> , entre H37Rv y CIBIN-99-C1	58
Figura 38. Modelaje de la proteína <i>rpoB</i>	58
Figura 39. Red de interacciones de la rifampicina.....	58
Figura 40. Red de interacciones de <i>rpoB</i>	59
Figura 41. Alineamiento de proteínas de <i>embB</i> , entre H37Rvy CIBIN-99-C1.....	61
Figura 42. Modelaje de la proteína <i>embB</i>	61
Figura 43. Red de interacciones de <i>embB</i>	61
Figura 44. Electroforesis capilar de la amplificación de <i>embC</i>	64
Figura 45. Alineamiento de proteínas de <i>embC</i> , entre H37Rvy CIBIN-99-C1.....	64
Figura 46. Red de interacciones de <i>embC</i>	65
Figura 47. Electroforesis capilar de la amplificación de <i>pncA</i> y CIBIN-99-C1.....	67
Figura 48. Alineamiento de proteínas de <i>pncA</i> , entre H37Rv y CIBIN-99-C1	67
Figura 49. Modelaje de la proteína <i>pncA</i>	68
Figura 50. Red de interacciones de pirazinamida.....	69
Figura 51. Red de interacciones de <i>pncA</i>	69



RESUMEN

**Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular. Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Nuevo León.**

Presenta: Q.B.P. Yazmin Berenice Martínez Martínez

SECUENCIACIÓN DEL GENOMA DE UNA CLONA DE *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTE A TODOS LOS MEDICAMENTOS ANTI-TUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA

Aún no se comprenden cabalmente las causas de multifármaco-resistencia (MFR) de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). La secuenciación masiva de genoma completo permite tener un panorama más amplio de los cambios que están ocurriendo en el genoma. **Objetivo.** Identificar las mutaciones presentes en la clona MFR de MTB CIBIN:UMF:15:99 (CIBIN-99), consistentes con los mecanismos de resistencia al conjunto de estreptomycin, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida (SIREP), aceptados hasta ahora, y proponer un mecanismo integral que explique la resistencia a SIREP de CIBIN-99. **Material y Métodos.** Aislamos y caracterizamos seis clonas de CIBIN-99. De estas clonas, seleccionamos la clona 1 (CIBIN-99-C1), que presentó el fenotipo más parecido a la cepa progenitora. Secuenciamos el ADN total de CIBIN-99-C1. Ensamblamos la secuencia completa de CIBIN-99-C1, determinamos el número de sitios de origen de replicación que contenía el ADN total de CIBIN-99-C1 e identificamos todas las mutaciones en los genes involucrados en las rutas biosintéticas afectadas por SIREP. Además, investigamos la función que tiene cada uno de estos genes en el metabolismo y su papel en la resistencia a SIREP de MTB. Con esta información, propusimos un mecanismo integrado de resistencia de CIBIN-99-C1 a SIREP. **Resultados.** El genoma de CIBIN-99-C1 consta de 4.25×10^9 bases. El contenido genético entre H37Rv (cepa de referencia) y CIBIN-99-C1 es muy parecido. Sólo encontramos un origen de replicación. Se analizaron 55 genes que podrían estar involucrados en el mecanismo de fármacorresistencia. De los 55, 19 genes estaban mutados y 10 de ellos confieren resistencia a fármacos de primera línea. De éstos, cinco presentaron mutaciones sinónimas, cuatro genes contenían mutaciones que resultan en cambios de un aminoácido por otro y en alteraciones de la estructura terciaria de los productos proteicos correspondientes. Estos genes y los medicamentos a los que confirieron resistencia fueron los siguientes: *rpsL* a estreptomycin, *katG* a isoniazida, *rpoB* a rifampicina y *embB* a etambutol. Además un gen, *pncA*, implicado en la resistencia a pirazinamida, presentó un corrimiento en el marco de lectura, causando, como consecuencia, una proteína truncada, no funcional. **Discusión y Conclusiones.** Dado que el fenotipo de CIBIN-99-C1 es muy parecido a su cepa progenitora, las características genotípicas de CIBIN-99-C1, identificadas en el presente estudio, son las predominantes de CIBIN-99. Concluimos, por analogía que las características genotípicas de CIBIN-99 y de CIBIN-99-C1 son comparables. El único sitio de replicación identificado en el ADN completo de CIBIN-99-C1 indica que este sitio es el de replicación del genoma y por lo tanto CIBIN-99 no contiene plásmidos. Por lo tanto, descartamos la posibilidad de que un plásmido esté confiriendo la condición de MFR a CIBIN-99. Se sostiene nuestra hipótesis de que la condición de MFR se debe a mutaciones en el ADN genómico. El mecanismo integrado de resistencia a SIREP de CIBIN-99 se debe, a la combinación de mutaciones en los cinco genes arriba mencionados, los cuales resultan en alteraciones de la estructura terciaria de proteínas y a la producción de una proteína truncada. Lo anterior no descarta la posibilidad de que también haya expresión de bombas de eflujo o mutaciones en los mecanismos de transporte de los fármacos. Hasta donde nosotros sabemos, esta es la primera cepa de MTB resistente a SIREP, cuyo genoma completo se ha secuenciado en México, y de las primeras cepas de MTB secuenciadas en América Latina.

Dr. C. Salvador Luis Said y Fernández
Director de Tesis

Dra. C. Herminia G. Martínez Rodríguez
Co-Director de Tesis



I. INTRODUCCIÓN

1.1 Datos epidemiológicos

La tuberculosis (TB) es la segunda enfermedad trasmisible con mayor morbi-mortalidad en el mundo. Un tercio de la población mundial está infectada por MTB(1, 2).

Se calcula que en 2012 hubo 8.6 millones de nuevos casos de TB (un 13% coinfectados por el VIH) y que 1.3 millones de personas murieron por esta causa (cerca de 1 millón seronegativas para el VIH, y 320 000 seropositivas)(3).

De acuerdo con la información disponible en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en nuestro país se registran cada año cerca de 15,000 casos nuevos de Tuberculosis pulmonar (TBP) y aproximadamente 2,000 defunciones por esta causa. La edad promedio de individuos con TBP activa es de 54 años. Estas cifras representan una importante pérdida de años de vida saludable y un obstáculo para el desarrollo socio-económico de México(4). El total de casos notificados en México en el 2012 fue de 21,348 según el reporte del 2013 de la OMS (5). En Nuevo León, en el 2010 se reportaron 961 casos de TBP, representando una tasa de 20.7 casos por cada 100 mil habitantes (6).

1.2 Descripción del agente etiológico

La TB es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), aunque otras especies del complejo *M. tuberculosis* (*M. bovis*, *M. africanum*. y *M. microti*) también son agentes causales de TB. MTB pertenece al filo *Actinobacteria*, al orden *Actinomycetales*, y a la Familia *Mycobacteriaceae*. Es un bacilo de crecimiento lento (de entre 5 a 8 semanas), aerobio, intracelular y facultativo. MTB tiene extremidades redondeadas, una longitud de 2-5 μm y 0.2 a 0.3 μm de diámetro, es inmóvil, carece de cápsula o esporas, no tiene ramificaciones y se tiñe de color rojo violáceo con el método de Ziehl-Neelsen. Una vez teñido, MTB es resistente a la decoloración con la mezcla de ácidos minerales fuertes y alcohol. De ahí el nombre de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)(7-9). Forma colonias secas, rugosas y con aspecto de coliflor.

1.3 Mecanismos de patogenicidad y virulencia de MTB

La TB afecta principalmente a los pulmones, porque ésa es la vía de entrada más frecuente de MTB. La TB se transmite vía aérea a través de pequeñas gotas de saliva



(gotas de Flügge) expulsadas por pacientes bacilíferos al hablar o toser(2). Los síntomas comunes de la tuberculosis pulmonar activa son tos productiva, dolores torácicos, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudores nocturnos.

En cultivo, MTB forma cordones parecidos a serpientes. Robert Koch fue el primero que hizo esta observación y que asoció el *factor de cuerda* (*cord factor*) con la virulencia de MTB. La estructura de la pared celular de MTB merece una atención especial, porque ésta es única entre los procariontes y es el mayor determinante de la virulencia de MTB. La pared contiene un peptidoglicano y lípidos complejos. Más del 60% de la pared celular de MTB son lípidos. La fracción lipídica está constituida por ácidos micólicos, el factor de cuerda y la cera-D(10).

Los ácidos micólicos son los únicos ácidos grasos con ramificaciones en el carbono α . Estas moléculas se encuentran en las paredes de *Mycobacterium* y *Corynebacterium*. Los ácidos micólicos constituyen el 50% del peso seco de la pared celular. Estas moléculas son fuertemente hidrofóbicas y forman una coraza que rodea a la bacteria (11). Se considera que, junto con el factor de cuerda, los ácidos micólicos forman parte del mecanismo de virulencia de MTB. Los ácidos micólicos le confieren resistencia a las micobacterias fagocitadas contra el ataque de proteínas catiónicas, lisozima y radicales de oxígeno de los gránulos de los fagocitos. Además, protegen a las micobacterias contra la acción del complemento del suero. El *factor de cuerda* es tóxico para las células de mamífero e inhibe la migración de los leucocitos polimorfonucleares (PMN). Las cepas virulentas de MTB producen abundantemente el factor de cuerda, el cual está constituido exclusivamente por trehalosa-6,6'-dimicolato(12).

Aún no se conoce a la mayoría de los factores de virulencia de MTB; pero la secuencia del genoma de este microorganismo contiene muchos genes candidatos(13). Estos genes incluyen fosfolipasas extracelulares(14) y citolisinas putativas(15). Todos estos factores podrían conferir a MTB su habilidad para sobrevivir dentro de los macrófagos (16).

1.4 Resistencia a fármacos

MTB es naturalmente resistente a muchos antibióticos. Esta circunstancia dificulta mucho el tratamiento contra la TB(17). La resistencia de MTB a los antibióticos es, en gran medida, debida a la pared celular de los bacilos; la cual es muy hidrofóbica y actúa como una barrera de permeabilidad(18). Por otro lado, mucho del potencial de



resistencia de MTB está codificado en su genoma(19). Éste incluye genes que codifican para enzimas hidrolíticas y para enzimas modificadoras de fármacos, como las beta-lactamasas y las aminoglicósido-acetil-transferasas. Además de diversas proteínas transportadoras de eflujo (*efflux*), tales como 14 miembros de la superfamilia mayor facilitadora (*Major Facilitator Superfamily*), y numerosos transportadores tipo ABC (*Adenosine Triphosphate Binding Cassetes*). Por otro lado, se conocen diversas mutaciones que confieren resistencia a MTB contra los medicamentos de primera y segunda líneas, utilizados para el tratamiento de MTB. Uno de cada 1×10^6 - 1×10^8 bacilos de MTB (dependiendo del fármaco)(20, 21) son mutantes espontáneos en su cromosoma, y resistentes a la acción de fármacos contra la TB de primera línea (11). Estas bacterias están distribuidas en todo el mundo. Generalmente, el surgimiento de cepas de MTB resistentes a fármacos es el resultado de un tratamiento inadecuado.

Los medicamentos contra la tuberculosis de primera línea son estreptomina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida. Los más eficaces son isoniazida y rifampicina. Los fármacos de segunda línea son menos eficaces, más tóxicos o tienen ambas características, y sólo se recurre a ellos en casos extremos, cuando se detecta resistencia de MTB a isoniazida y rifampicina. A esta condición se le llama, a la tuberculosis y a las cepas de MTB, multifármacorresistentes (MFR). Generalmente la resistencia a rifampicina está asociada a otros dos o tres fármacos de primera línea (22). Los fármacos de segunda línea más utilizados contra la TB-MFR son kanamicina, amikacina, capreomicina, etionamida, cicloserina, además de varias fluoroquinolonas, entre ellas ofloxacina y ciprofloxacina(11).

La TB-MFR es resultado de una infección por organismos inicialmente resistentes a los medicamentos (resistencia primaria), o que desarrollaron resistencia durante el curso de tratamiento de un paciente (resistencia adquirida o secundaria).

Hoy en día, el Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) ha sido aceptado oficialmente por todos los países que conforman a la Organización Mundial de la Salud (OMS). El TAES tiene una duración de seis meses y los medicamentos utilizados pueden adquirirse en una forma relativamente sencilla; mientras que el tratamiento de la mayoría de los pacientes con TB-MFR (TAES-plus) requiere un promedio de 20 meses y medicamentos importados. Además, el TAES-plus es 100 veces más costoso que el TAES y los fármacos de segunda línea utilizados en el



TAES-plus tienen efectos colaterales indeseables y se deben administrar por un largo tiempo(23).

1.5 Importancia epidemiológica de la TBP-MFR

El número de casos de TB- MFR notificados en los 27 países con alta prevalencia de TB-MFR se duplicó entre 2009 y 2011, y llegó a cerca de 60,000 en todo el mundo. Es decir, uno de cada cinco casos de TB es TB- MFR. En 2011, hubo 310,000 casos de TB- MFR entre los pacientes con TBP. El 60% de estos casos se encontraban en la India, China y la Federación Rusa. Se calcula que, en el ámbito mundial, el 3,7% de los nuevos casos y el 20% de los tratados con anterioridad padecen TB-MFR. Las mayores proporciones de pacientes con TB-MFR se encuentran en Europa Oriental y Asia Central. Se ha estimado que solamente se detecta el 7% de la prevalencia mundial real de TB-MFR(23). La figura 1 (Página 6) muestra el porcentaje de nuevos casos de TB-MFR en el mundo.

En 2011, hubo en México 370 nuevos casos de TB-MFR. Entre los casos nuevos, 97 pacientes estaban en retratamiento (5). Al considerar los casos acumulados TB-MFR en el año 2010, la prevalencia en el ámbito nacional fue de 297 casos. Entre los cuales, el 82% del se concentró en 14 entidades federativas. Nuevo León ocupó el tercer lugar en prevalencia de TB-MFR con 28 casos (4).

En un estudio realizado en Nuevo León por Becerril-Montes y Cols., de 139 casos reportados con tuberculosis pulmonar (TBP) de la clínica 28 del IMSS, en un período de cuatro años, 66 cepas eran resistentes al menos a un fármaco, 13 polirresistentes (más de un fármaco, sin ser resistentes a Isoniazida más Rifampicina), y al menos 24 eran MFR (22).

1.6 Mecanismo de acción de los fármacos de primera línea

Se han descrito algunas de las moléculas de MTB que son dianas, de los fármacos de primera línea contra las micobacterias. Sin embargo, aún no se conocen todas las moléculas cuya expresión o actividad pos-traducciona se altera en una forma positiva o negativa por la acción de los fármacos anti-TB de primera línea. El mecanismo de acción de los fármacos de primera línea se resume en la figura 2 (Página 6), y se describe con detalle en las páginas siguientes.

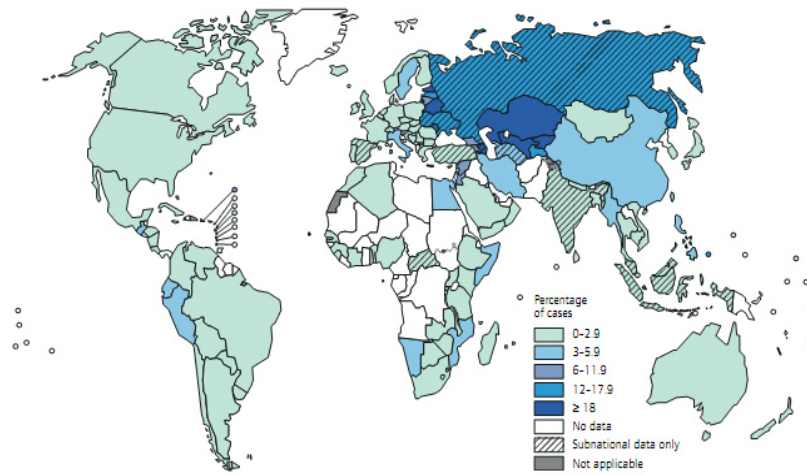


Figura 1.- Porcentaje de nuevos casos con TB-MFR en el mundo en 2011.
(Mapa tomado del informe mundial sobre la tuberculosis 2012, OMS) (3)

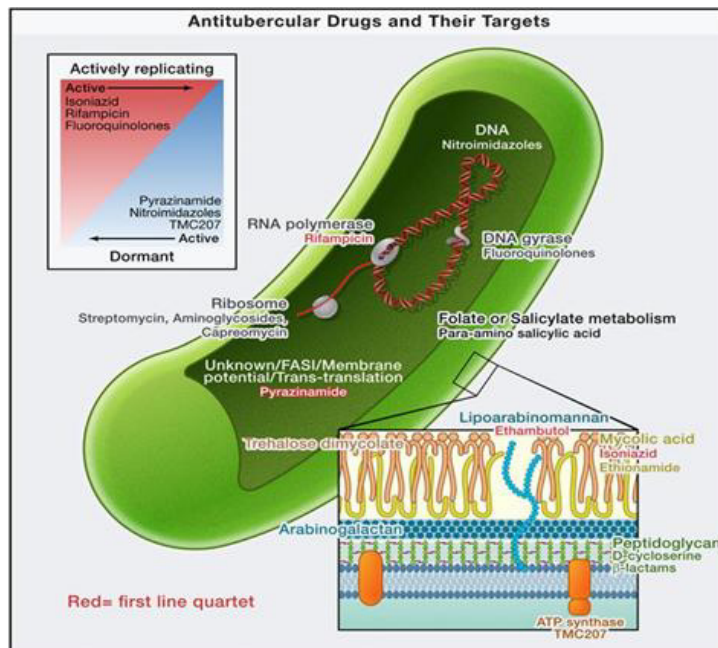


Figura 2.- Principales dianas de los fármacos anti-TB. (24). Los fármacos cuya función se ilustra en esta figura interfieren con las siguientes funciones en MTB: La estreptomycina con la traducción del ARN mensajero, la rifampicina con la transcripción del ARN y la isoniazida, el etambutol y la pirazinamida con la biosíntesis de pared celular.



I.6.1. Estreptomina

La estreptomina es un aminoglicósido que interfiere con la traducción del ARN mensajero en MTB. La estreptomina se une a la proteína ribosomal S12, que es un componente de la subunidad 30S del complejo ribosomal, por lo que la estreptomina inhibe la síntesis de proteínas micobacterianas (25). En la figura 3 (Página 8) se muestra el mecanismo de acción de la estreptomina.

I.6.2. Isoniazida

La isoniazida, interfiere con la biosíntesis de pared celular en MTB. La isoniazida es un pro-fármaco que es convertido a su forma activa por la catalasa-peroxidasa (codificada por el gen *katG* de la micobacteria). La isoniazida activada inhibe la acción de la proteína acarreadora enoil-acil reductasa (*inhA*). *InhA* es un importante enzima, componente del complejo de la sintetasa de ácidos grasos (FAS-II). FAS-II está involucrada en la síntesis de ácidos micólicos de cadena larga. Los ácidos micólicos son componentes estructurales esenciales de la pared celular de las micobacterias, y están unidos a la capa de arabinogalactano (26). En la figura 4 (Página 8) se muestra el mecanismo de acción de la isoniazida.

I.6.3. Rifampicina

La rifampicina interfiere con la transcripción del ARN en MTB. La rifampicina se une a la subunidad β del complejo enzimático que conforma la ARN polimerasa dependiente de ADN, e inhibe la transcripción de los ARN mensajeros (ARNm). Los transcritos de ARNm son esenciales para la síntesis de proteínas (traducción) (21). La figura 5 (página 8) muestra el mecanismo de acción de la rifampicina.

I.6.4. Etambutol

El etambutol interfiere con la biosíntesis de pared celular en MTB. Este compuesto inhibe la acción de la arabinosil transferasa (codificada por *emb A, B y C* de MTB). *EmbB* es una enzima asociada a membranas, involucrada en la síntesis de arabinogalactano. El arabinogalactano es un componente estructural esencial en la pared de las micobacterias (27, 28). En la figura 6 (página 9) se muestra el mecanismo de acción del etambutol.

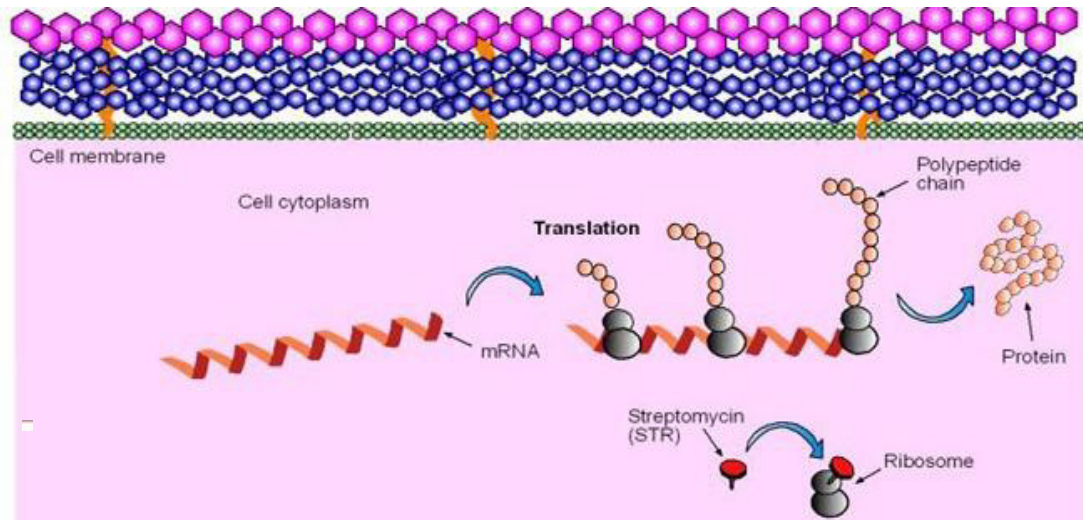


Figura 3.- Mecanismo de acción de estreptomicina.(29) La estreptomicina se une a la proteína ribosomal S12, interfiriendo con la traducción del ARN mensajero.

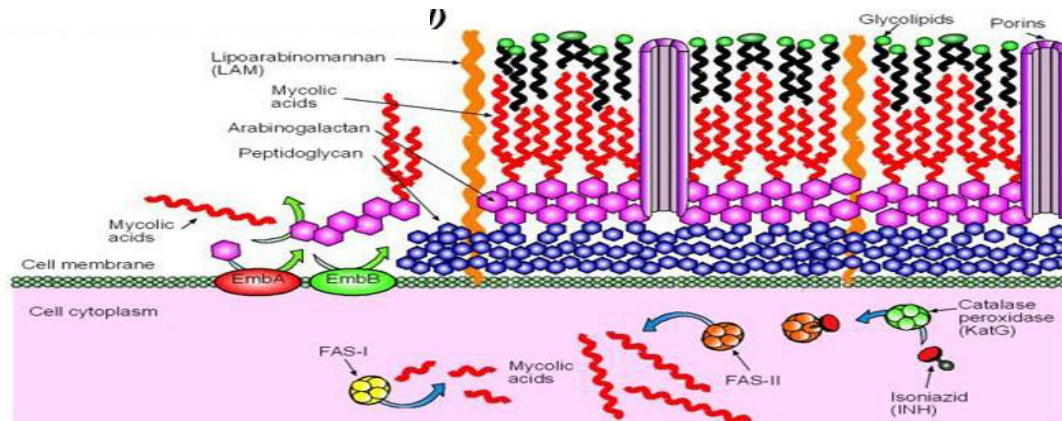


Figura 4.- Mecanismo de acción de isoniazida.(29) La isoniazida es un profármaco activado por la enzima catalasa-peroxidasa, que una vez activo interfiere con la sintetasa de los ácidos micólicos de cadena larga (FAS-II).

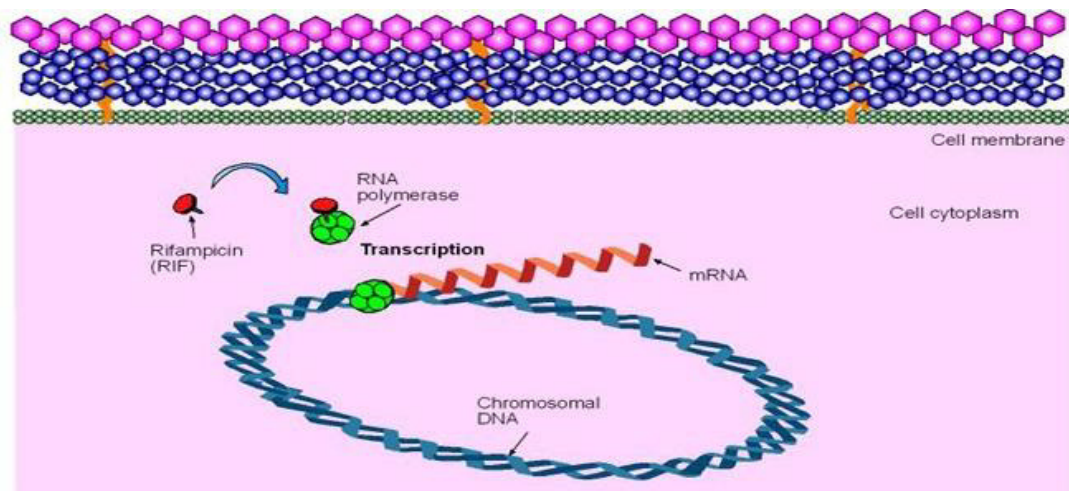


Figura 5.- Mecanismo de acción de la rifampicina.(29) La rifampicina interfiere con la transcripción del ARN mensajero al unirse a la subunidad β de la ARN polimerasa.

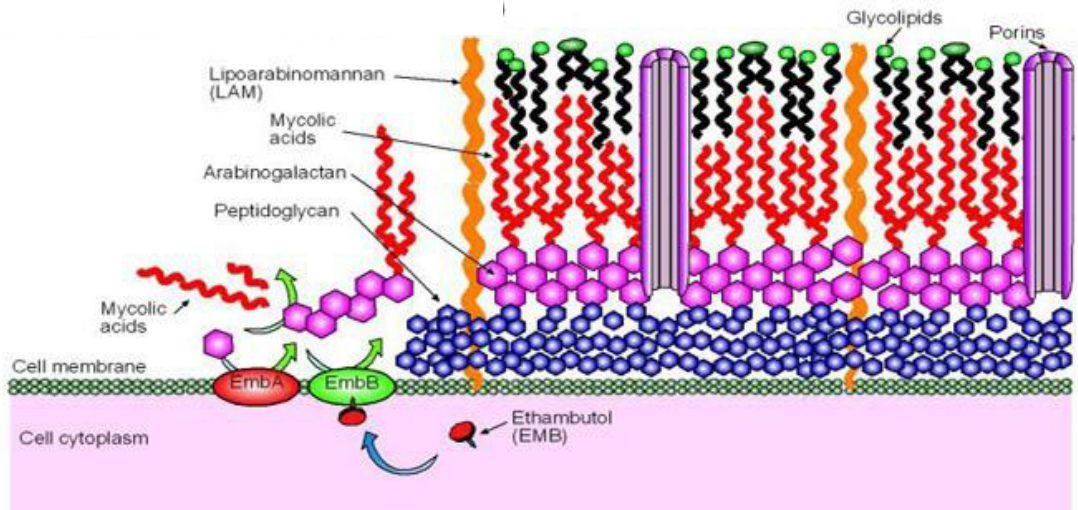


Figura 6.- Mecanismo de acción del etambutol.(29) El etambutol interfiere con la biosíntesis de pared celular en MTB, inhibiendo a la arabinosil transferasa.

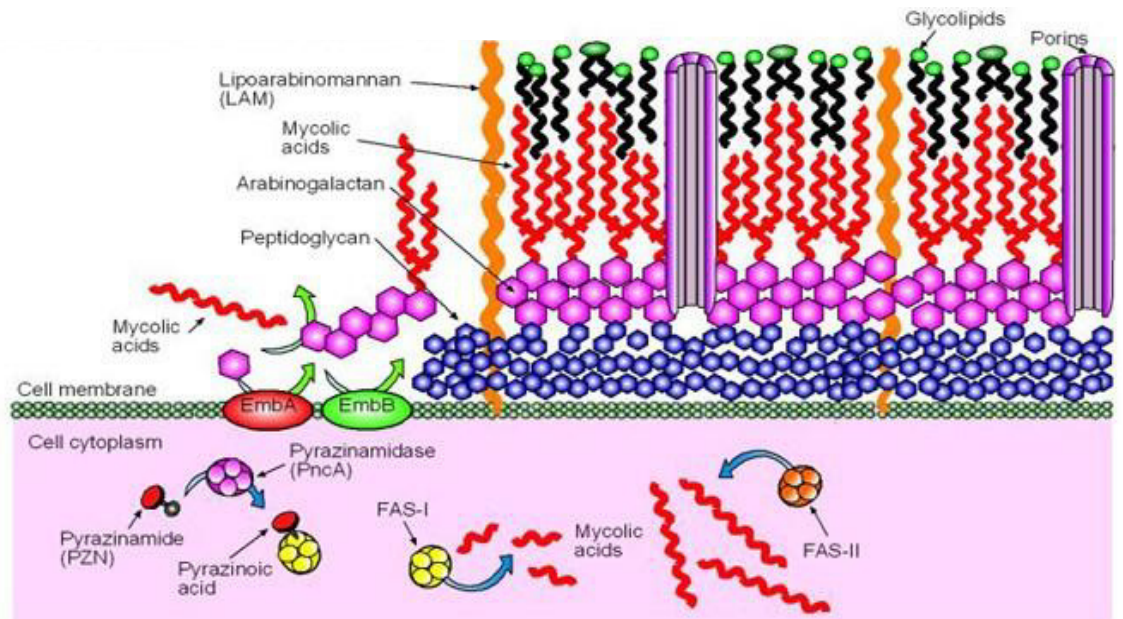


Figura 7.- Mecanismo de acción de pirazinamida.(29) La pirazinamida es un profármaco activado por la enzima pirazinamidasa, que una vez activo inhibe la sintetasa de ácidos micólicos de cadena corta (FAS-I).

I.6.5. Pirazinamida

La pirazinamida interfiere con la biosíntesis de pared celular en MTB. La pirazinamida es un pro-fármaco, y es convertida a su forma activa (ácido pirazinoico) por la enzima peroxidasa-nicotinamidasa, conocida como pirazinamidasa (codificada por *pncA* de MTB). El ácido pirazinoico inhibe la acción de la sintetasa de ácidos grasos I (FAS-I). FAS-I está involucrada en la síntesis de ácidos micólicos de cadena corta. Los ácidos micólicos son componentes estructurales esenciales de la pared celular



micobacteriana, y están unidos a la capa de arabinogalactano. La figura 7 (página 9) muestra el mecanismo de acción de este fármaco.

1.7 Genes de MTB que le confieren resistencia a los fármacos de primera línea

Se han propuesto dos mecanismos para la resistencia a fármacos de MTB. El primero son las bombas de eflujo, que expulsan los fármacos. Varios autores han descrito el papel que juegan las bombas de eflujo en la resistencia a fármacos en micobacterias (30-32).

El segundo mecanismo son los genes de resistencia a fármacos. Los genes bacterianos de resistencia en muchos casos están codificados en los plásmidos; sin embargo, no todas las bacterias contienen plásmidos. La presencia de éstos ha sido demostrada en algunas especies de micobacterias como *M. fortuitum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. ulcerans*, *M. celatum* y *M. scrofulaceum*(33-38). Estos plásmidos le confieren a las micobacterias ciertas características, como resistencia a antibióticos y metales pesados (como cobre y mercurio). Además, se ha involucrado a los plásmidos en la virulencia de las cepas que los poseen.

La mayoría de los investigadores acepta que, en MTB, la resistencia a fármacos se debe a mutaciones que ocurren espontáneamente en posición *cis* de su genoma (21, 38-40). Sin embargo, existe una controversia debido a que Katti describió un plásmido de 18 kb en la cepa H37Rv de MTB(41). Entonces, para los fines de este estudio, nosotros decidimos poner a prueba esa controversia con respecto a la posibilidad de que en nuestra cepa MDR-CIBIN:UMF:15:99-(descrita en la página 13) pudiese existir un plásmido que le confiriera a MTB resistencia a alguno de los fármacos anti-TB de primera línea.

Se han estudiado los genes causantes de resistencia a fármacos de primera línea en algunas cepas de MTB. Estos genes y las respectivas funciones del fármaco al cual causan resistencia se muestran en la Tabla 1 (página 11).



Tabla 1.- Genes causantes de resistencia a fármacos de primera línea

FÁRMACO	MECANISMO*	GEN REPORTADO
Str	Bloquea traducción de ARNm	<i>rrs, rpsL, gidB</i>
Inh	Impide síntesis de ácidos micólicos	<i>katG, inhA, oxyR, ahpC, iniA, iniB, iniC, furA, kasA, ndh, fbpC, embB, mabA, Rv1592, Rv1772, srmR homólogo, fabD efpA, fadE24, nhoA</i>
Rif	Inhibe transcripción por subunidad β de la polimerasa	<i>rpoB, embB</i>
Emb	Inhibe biosíntesis de pared	<i>embB, embA, embC, Rv0340, iniA, iniB, iniC, embR, Rv3124, Rv3125c, Rv3126, rmlA2, rmlD</i>
Pza	Inhibe síntesis de precursores de ácidos grasos de cadena corta de pared.	<i>pncA</i>

*Del fármaco

Str= Estreptomicina, Inh= Isoniazida, Rif= Rifampicina, Emb= Etambutol, Pza= Pirazinamida



II. ANTECEDENTES

El rápido desarrollo de la tecnología para secuenciar ácidos nucleicos ha permitido reducir costos y tiempos de ejecución (42). La secuenciación del genoma completo de MTBse ha utilizado para investigar una amplia gama de temas sobre la Biología Celular y Molecular de este microorganismo. Ahora tenemos la capacidad, sin precedente, de utilizar la secuenciación de nueva generación, o secuenciación masiva; y así analizar en forma global el genoma completo de MTB, y por tanto empezar a comprender la relación entre la diversidad genética de MTB y su patogenicidad y resistencia a medicamentos nuevos y tradicionales.

II.1 Composición genética de MTB H37Rv

H37Rv es una de las cepas más usadas para el estudio de la Biología Celular y Molecular de MTB(43). Ésta es una de las cepas de laboratorio preferidas como estándar, debido a su virulencia estable en modelos animales. Además, H37Rv es susceptible a todos los medicamentos de primera línea contra la TB, y es dócil a manipulación genética(19). H37Rv fue aislada a partir de esputo de un paciente de 19 años con TBP avanzada hace más de 100 años y desde entonces ha mantenido su virulencia en animales de laboratorio(44). H37Rv es la cepa de MTB mejor caracterizada, y fue la primera de la cual se describió su genoma completo, mediante secuenciación tipo Sanger (19). El genoma completo de H37RV está depositado en el GenBank (número de acceso NC_000962.2). Este genoma es un cromosoma circular de 4.411,529 pb; contiene 3,924genes (lo cual implica alrededor del 91% de capacidad codificante del genoma) y tiene un contenido muy alto de guanina y citosina (GC [65.6%]). Este alto contenido de GC se refleja en el contenido sesgado de aminoácidos en las proteínas. MTB difiere radicalmente de otras bacterias en que una gran cantidad de su capacidad codificante está dirigida a la producción de enzimas involucradas en lipogénesis y lipólisis.(19). La figura 8 (página 13) muestra esquemáticamente el genoma de H37Rv.

H37Rv tiene un genoma rico en ADN repetitivo; especialmente de elementos de inserción; como IS6110, del que se han identificado 16 copias en una sola cepa. Por otro lado, también están muy repetidas las nuevas familias multigénicas PE y PPE y genes constitutivos (*house keeping*). Estas nuevas familias de proteínas, las PE(motivos Pro-Glu a nivel del extremo N-terminal) y las PPE(Pro-Pro-Glu), se caracterizan precisamente por ser ricas en glicina. El hecho de que estas proteínas



sean muy polimórficas, sugiere que estas moléculas son antigénicas. Se han identificado 32 elementos diferentes de inserción, en la secuencia, de los cuales muchos están agrupados, lo cual sugiere la existencia de puntos propensos a inserción (*hot-spots*) que previenen la inactivación de genes. El 59% de los genes se transcriben en la misma dirección en la que sucede la replicación. (19).

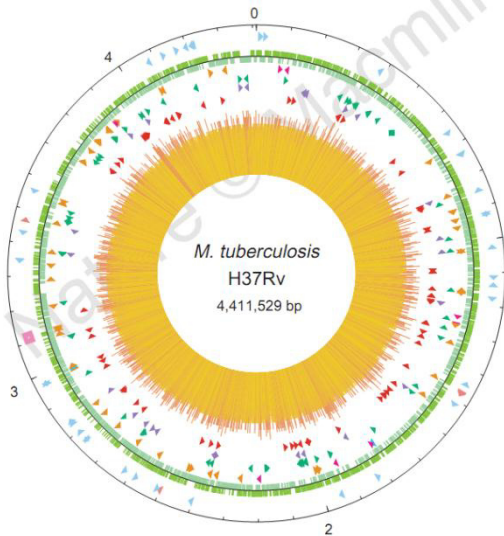


Figura 8.- Genoma de MTB H37Rv. (Esquema tomado de Cole ST y Cols., 1998) (19). El círculo externo muestra la escala en Mb, con el 0 representando el origen de replicación. Del exterior hacia adentro: 1er círculo: posición de genes estables de ARN. 2do círculo: secuencias codificantes por cadena (en sentido del reloj, verde oscuro; en contrasentido, verde claro). 3er círculo: ADN repetitivo. 4to círculo: posición de los miembros de la familia PPE. 5to círculo: Miembros de la familia PE. 6to círculo: Posición de las secuencias PGRS. El histograma (centro) representa el contenido de G+C (<65% de G+C en amarillo, >65% en rojo) (19).

II.2 Aislado clínico CIBIN-99

CIBIN:UMF:15:99 (CIBIN-99) es una cepa de MTB que fue aislada de un paciente con TBP avanzada que se atendía en la Unidad de Medicina Familiar No. 15 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en Monterrey, Nuevo León, México. Esta cepa fue identificada y caracterizada en el laboratorio de Micobacteriología del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN), IMSS. CIBIN-99 es resistente a SIREP (45).

En nuestro grupo de investigación se han realizado diversos trabajos con CIBIN-99, los cuales incluyen perfiles de susceptibilidad a nuevos extractos naturales(45-53) y estudios de virulencia en animales (54). Por la importancia que tiene, se ha estudiado el proteoma de CIBIN-99(55), sus perfiles de expresión génica, y se ha realizado su caracterización genotípica. Considerando su genotipo, determinado por la técnica llamada Spoligotyping, CIBIN-99 pertenece a la familia X1(56).



III. JUSTIFICACIÓN

La cepa CIBIN-99 tiene una gran importancia por ser una cepa resistente a los cinco fármacos de primera línea, por ello, al iniciar este proyecto, se requería un estudio integral de su genoma para conocer los genes mutados o las alteraciones genómicas responsables de la resistencia a cada uno de los medicamentos anti-TB. Esto con el fin de proponer un mecanismo que explique, al menos en parte, el fenotipo que tiene CIBIN-99 a todos los fármacos anti-tuberculosis de primera línea.



IV. HIPÓTESIS

IV.1 La secuenciación masiva de genoma completo de la cepa de MTB CIBIN-99 permite realizar un análisis global de mutaciones en los genes de esta cepa.

IV.2 Los genes mutados de CIBIN-99 están ubicados en el ADN genómico y no en un plásmido.

IV.3. El genoma de CIBIN-99 contiene genes cuya función y mutaciones son consistentes con la resistencia a cada uno de los cinco fármacos de primera línea (SIREP).



V. OBJETIVOS

V.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar aquellas mutaciones presentes en una clona de MTB CIBIN-99 que son consistentes con los mecanismos de resistencia a SIREP y proponer un mecanismo integral que explique la resistencia a SIREP de CIBIN-99-C1, y por analogía, a CIBIN-99.

V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

V.2.1. Identificar las mutaciones en el ADN genómico o en los plásmidos de una clona de CIBIN-99, relacionadas con las rutas biosintéticas de MTB que son afectadas por cada uno de los medicamentos anti-TB de primera línea, utilizando como referencia las secuencias correspondientes en el genoma de H37Rv—disponible en línea—.

V.2.2. Proponer un mecanismo integral de resistencia a SIREP, que esté basado en la función biológica de los genes mutantes en MTB CIBIN-99 relacionados con su condición de resistencia a SIREP.



VI.- METAS

- VI.1 Aislar seis clonas de H37Rv y seis clonas de CIBIN-99
- VI.2 Caracterizar la cepa progenitora de H37Rv y sus seis clonas, mediante el análisis de bacilos teñidos con la técnica de Ziehl-Neelsen, morfología de las colonias, determinar la susceptibilidad a SIREP, determinar la velocidad de crecimiento en caldo de Middlebrook 7H9, y genotipificar la cepa progenitora mediante RFLP-IS6110 (*Restriction Fragment Length Polymorphism* [polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción] del elemento IS6110).
- VI.3 Caracterizar la cepa progenitora de CIBIN-99 y sus seis clonas, mediante la inspección microscópica de bacilos teñidos con la técnica de Ziehl-Neelsen, morfología de las colonias, determinar la susceptibilidad a SIREP, determinar su velocidad de crecimiento en caldo de Middlebrook 7H9, y genotipificar las cepas progenitoras y las clonas mediante RFLP-IS6110 (*Restriction Fragment Length Polymorphism* [polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción] del elemento IS6110).
- VI.4 Seleccionar la clona más parecida a la cepa progenitora CIBIN-99
- VI.5 Obtener 2 ng de ADN de alta calidad de la clona seleccionada de CIBIN-99.
- VI.6 Secuenciar la clona seleccionada de CIBIN-99 utilizando el sistema MiSeq (Illumina).
- VI.7 Ensamblar e identificar las diferencias entre el genoma de la clona seleccionada de CIBIN-99 y el genoma de H37Rv (disponible en línea).
- VI.8 Identificar los genes mutantes de CIBIN-99 involucrados en las rutas biosintéticas afectadas por SIREP.
- VI.9 Proponer un mecanismo integrado de la resistencia a SIREP de la clona seleccionada de CIBIN-99.



VII.- MATERIAL Y MÉTODOS

VII.1 Medidas de bioseguridad observadas en este trabajo

Realizamos todos los procedimientos que involucraron manejo de bacilos viables MTB bajo estrictas normas de bioseguridad y en un laboratorio con prácticas de bioseguridad microbiológica nivel 3, ubicado en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El personal involucrado en el manejo de cepas de MTB MFR está sometido a un programa de control sanitario estricto, con pruebas de PPD, radiografía de tórax, y cultivo de esputo, según lo establece la norma NOM-006-SSA2-1993, para la prevención y control de tuberculosis en la atención primaria a la salud.

VII.2 Micobacterias

Utilizamos las cepas de MTB H37Rv (ATCC 27294) (susceptible a todos los fármacos de primera línea: estreptomina, isoniazida, rifampicina, etambutol, y pirazinamida) y CIBIN-99 (resistente a todos los fármacos de primera línea), ambas cepas amablemente donadas por el Centro de Investigación Biomédica del Noreste, del IMSS, en Monterrey, Nuevo León, México.

VII.3 Obtención de las clonas de MTB

Obtuvimos seis clonas de CIBIN-99, y seis de H37Rv. De un cultivo de cada cepa en medio Löwenstein-Jensen (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Seleccionamos y aislamos seis colonias con morfologías típicas de MTB (colonias en forma de coliflor), separadas entre sí y bien desarrolladas. Depositamos las colonias, por separado, en tubos estériles de borosilicato con tapón de rosca. Cada tubo contenía seis perlas de vidrio y 3-mL de medio Middlebrook 7H9 (BD DIFCO, Sparks, MD, USA) suplementado con 10% de enriquecimiento OADC (*Oleic Albumin Dextrose Catalase*, USBiological, Swampscott, MA, USA). Agitamos los tubos por 1-min con un vórtex (Labnet S0200 Modelo VX-200 Vórtex Mixer, Woodbridge, NJ, USA) y los dejamos reposar por 20-min para evitar la formación de aerosoles. Sembramos las bacterias siguiendo la técnica de estría cruzada, en placas de medio Middlebrook 7H10 (BD DIFCO) suplementado con 10% de enriquecimiento OADC. Incubamos las placas a 37°C con 5% de CO₂ durante 2-5 semanas (hasta observar colonias típicas, aisladas y vigorosas). Este procedimiento se repitió tres veces con cada clona. Una vez que



obtuvimos las seis clonas de cada cepa, sembramos las clonas por separado, en medio Löwenstein-Jensen para su uso posterior.

VII.4 Caracterización de las cepas progenitoras de H37Rv y CIBIN-99, y de sus clonas

VII.4.1 Tinción de Ziehl-Neelsen

Tomamos una colonia vigorosa de cada cultivo. Suspendimos uniformemente las bacterias con una gota de solución salina isotónica, pH 7.0 en un portaobjetos previamente etiquetado. Extendimos un frotis y lo fijamos con calor. Los frotis se cubrieron con una solución de Tb-color carbol fucsina, del kit "Tb-color kit de tinción"(Merck, Darmstadt, Alemania) y los dejamos reposar a temperatura ambiente por 5-min. Lavamos los frotis con agua corriente, hasta que ya no se observaron nubes coloreadas. Decoloramos las preparaciones, cubriéndolas completamente con Tb-color ácido clorhídrico-alcohol. Dejamos actuar a la solución ácido/alcohol por 15- a 30-seg a temperatura ambiente. Enjuagamos las preparaciones con agua corriente y contra-teñimos las preparaciones incubándolas por 1-min con Tb-color verde malaquita en solución. Enjuagamos los frotis cuidadosamente con agua corriente y los dejamos secar a temperatura ambiente. Observamos los frotis con un microscopio equipado con un objetivo de inmersión (100X). Los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) se observaron como bastones individuales, cadenas de bastones o cordones teñidos de rojo oscuro con un tono violáceo.

Verificamos la calidad de los reactivos teñiendo un frotis de *Escherichia coli* (ATCC 25972 (no BAAR), amablemente donados por la Dra. Gloria González González (de la Facultad de Medicina, perteneciente a la Universidad Autónoma de Nuevo León, en Monterrey, Nuevo León, México). Estas tinciones de control se realizaron a partir de cultivos en Caldo Soja Tripticasa (BD Bacto) que se dejaron crecer por 5-h. Teñimos dos frotis de *E. coli*; en uno detuvimos el proceso de tinción inmediatamente antes de realizar la decoloración de los bacilos y completamos la otra tinción hasta el último paso, como se hizo con las preparaciones de MTB.

VII.4.2 Morfología de colonias

Tomamos una asada de H37Rv o de CIBIN-99 de cultivos crecidos en caldo Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de OADC, e inoculamos cada cepa en placas de medio Middlebrook 7H10 con 10% de OADC. Incubamos las placas a 37°C



en atmósfera de CO₂ al 5% por 2-5 semanas, hasta observar colonias típicas, vigorosas y claramente separadas entre sí.

VII.4.3 Determinación del perfil de susceptibilidad a fármacos

VII.4.3.1 Ensayo en microplaca con Alamar Azul (MABA)

Realizamos las pruebas de sensibilidad de H37Rv, CIBIN-99 y cada una de sus clonas a SIREP. Utilizamos clofazimina como control porque éste es un fármaco anti-TB de segunda línea al que son susceptibles H37Rv y CIBIN-99. Para realizar los bioensayos utilizamos la técnica descrita por Franzblau y Cols.(57), modificada por Molina-Salinas y Cols.(45). Esta técnica es la de Alamar Azul en Microplaca (MABA, por sus siglas en inglés, *Microplate Alamar Blue Assay*), La figura 9 (Página 20) muestra la distribución de las mezclas de ensayo en un experimento típico.

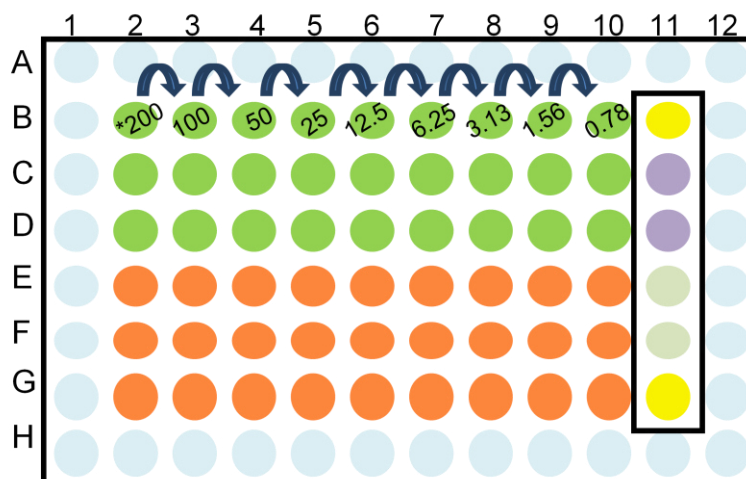


Figura 9.- Distribución de las placas de MABA. En cada placa ensayamos dos fármacos sobre una misma cepa, o clona. En el rectángulo interior (en color negro) del lado derecho se observan los controles en cada placa. Cada pozo contenía 100 μ L de medio 7H9 con fármaco diluido (con la dirección de dilución indicada por las flechas), y 100 μ L de suspensión bacteriana de trabajo. En color celeste aparecen los pozos que contenían agua mQ, en color verde los pozos con el fármaco 1, color naranja: fármaco 2, color amarillo: control de medio, color morado: control de bacteria diluida 1:100, y color verde claro: control de bacteria usada.
* Concentración expresada en μ g/mL.



VII.4.3.1.1 Preparación de la suspensión bacteriana de trabajo

Suspensión A: Tomamos una alícuota de 1-mL de un cultivo joven de micobacterias, crecidas en medio 7H9 (7H9 con 0.2% glicerol, y 10% de OADC), y lo transferimos a un tubo de 13 × 100 mm. Con la ayuda de un nefelómetro (BD PhoenixSpec, MY, USA) igualamos la turbiedad de la suspensión al estándar No. 1 de McFarland diluyendo el cultivo con medio de cultivo 7H9.

Suspensión B: Diluimos 1:50 la suspensión A con el medio 7H9 (6×10^6 UFC/mL).

VII.4.3.1.2 Preparación de la microplaca

Llenamos todos los pozos de la periferia de una placa de 96 pozos (Costar Corning, New York, NY, USA) con 200- μ L de agua grado Mili-Q estéril. Llenamos el primer pozo de cada hilera (de nueve pozos que no se hayan llenado con agua) con 100- μ L de los fármacos a probar (Tabla 2, página 21):

Tabla 2.- Concentraciones iniciales utilizadas de los fármacos (μg/mL)		
Fármaco	H37Rv	CIBIN-99
Estreptomina	32	800
Isoniazida	32	800
Rifampicina	32	800
Etambutol	32	32
Pirazinamida	800	800
Clofazimina	32	32

Todos los antibióticos eran grado reactivo (Sigma-Aldrich), excepto el etambutol, el cual se adquirió de MP Biomedicals (Solon, OH, USA). Probamos cada fármaco por triplicado para cada uno de los 14 cultivos. Hicimos diluciones seriadas en pasos de 2 en 2. Adicionamos 100 μ L de la suspensión de micobacterias B a los pozos a ensayar con fármaco. Incluimos en cada microplaca los siguientes controles (mostrados en la figura 9, página 20): 1) dos pozos con una dilución 1:100 de las bacterias provenientes



de la suspensión B, 2) dos pozos con la suspensión B de bacterias, y 3) dos pozos con medio 7H9 sin microorganismos. Incubamos las microplacas por 5-d a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

VII.4.3.1.3 Revelado de las microplacas

Observamos las microplacas en un microscopio invertido (con una amplificación de 400 diámetros) y revisamos el crecimiento bacteriano en uno de los pozos control, sembrados con la suspensión B de bacilos (sin antibióticos). Cuando apreciamos que el cultivo ya estaba suficientemente crecido, agregamos 12 µL de Tween-80) (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) y 20 µL de Alamar Azul (abD Serotec, BioRad, GE, UK) a uno de los pozos conteniendo la suspensión B de micobacterias. Si a las 24-h el color del pozo viraba de azul a rosa revelábamos la placa completa, agregando 12 µL de Tween-80 y 20 µL de Alamar Azul. Incubamos la microplaca por 24-h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Si los controles de la suspensión 1:50 de micobacterias se observaban de color rosa intenso y los controles de bacterias 1:100 permanecían azules era un resultado indicativo de que todo el procedimiento estuvo correcto y procedíamos a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de los antibióticos para cada una de las clonas y de las cepas progenitoras, considerando la concentración del fármaco del último pozo que permaneció azul (sin crecimiento) como CMI. Expresamos estos valores como µg del compuesto de interés/mL.

VII.4.3.2 Prueba de pirazinamidasa

Para confirmar la susceptibilidad o resistencia al fármaco pirazinamida, realizamos la prueba de pirazinamidasa(58, 59). Un microorganismo sin actividad de pirazinamidasa es resistente a pirazinamida debido a su inhabilidad para metabolizar dicho fármaco a ácido pirazinoico (componente activo) y amonio(58). Para llevar a cabo el procedimiento, inoculamos una azada de micobacterias que estaban en crecimiento vigoroso en medio Löwenstein-Jensen hacia un tubo con agar Dubos (BD Difco) y 100 µg/mL de pirazinamida. Al cuarto día agregamos 1-mL de sulfato ferroso de amonio disuelto al 1% (Productos Químicos Monterrey, S.A., N.L. México), y esperamos 30-min para permitir la aparición de una banda rosa—en caso de que la bacteria produjera pirazinamidasa y pudiera metabolizar el fármaco—; es decir, si aparecía una banda rosa, clasificamos a las micobacterias como susceptibles a la pirazinamida. Como control negativo inoculamos medio de cultivo en lugar de una asada de micobacterias.



VII.4.4 Genotipificación (RFLP-IS6110)

Llevamos a cabo el análisis de RFLP-IS6110 mediante hibridación de ADN transferido de Southern blot con una sonda IS6110(60). Para realizar la genotipificación mediante RFLP-IS6110, obtuvimos 4.5 µg de ADN genómico de las cepas progenitoras (CIBIN-99 o H37Rv) y de cada clona de CIBIN-99.

Digestión enzimática. Digerimos el ADN con 20 µL de una mezcla de digestión que contenía 10.0 U de la endonucleasa de restricción *PvuII* (10 U/µL, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 1.0 µg de RNasa (Promega, Madison, Wisconsin, USA) amortiguador de digestión 1X (Buffer de digestión 10X, buffer 4, New England Biolabs, Whitby, Ontario, Canadá) y aforamos a 20 µL con agua destilada. La digestión del ADN se llevó a cabo a 37 °C por 4-h. Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis de los productos en gel de agarosa al 0.8 % (80 V por 10-min y 20-h a 35-V) con 2 µg de bromuro de etidio/mL.

Southern blot. Tratamos el gel de agarosa conteniendo los fragmentos de ADN con una solución de desnaturalización (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) por 20-min en agitación ocasional y posteriormente realizamos un lavado con una solución de neutralización (1.5 M NaCl, 1 M Tris pH 8 (Sigma-Aldrich) por 20-min en agitación ocasional. Después volvimos a lavar con agua destilada.

Construimos un sistema para llevar a cabo el Southern blot mediante capilaridad, de la siguiente forma: sobre una superficie plana colocamos un papel filtro grueso saturado en SSC 20X. Encima colocamos el gel y sobre éste, pusimos una membrana de nylon cargada positivamente, saturada en SSC 20X (Hybond N+, GE Healthcare, Upsala, Suiza). Encima colocamos papeles filtro delgados saturados en SSC 20X, sanitas y por último una pesa de 1-kg.

Después de 4-h, retiramos la membrana del gel y la lavamos por 5-min en SSC 2X. Colocamos la membrana en un crosslinker (CL-1000 UV, UVP, Upland, CA, EUA) para fijar el ADN con un tiempo de exposición total de 5,000 microJoules/cm².

Sonda IS6110. Realizamos una PCR con los siguientes iniciadores: 5'-CGTGACGGCATCGAGGTGGC-3' y 5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAA- A-3' (Alpha ADN, Montreal, Canadá). Realizamos esta PCR en un volumen final de 50 µL, con una mezcla de reacción a una concentración final de 1x de buffer de PCR, 3 mM de MgCl₂



2.5 mM de cada dNTP, 300 nM de cada primer, 1 U de Taq ADN polimerasa y 30 μ l de ADN de H37Rv (5 ng/ μ L). Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 96°C por 3-min, seguido de 30 ciclos de 96°C por 1-min, 65°C por 1-min y 72°C por 1-min, terminando con un paso de extensión final a 72°C por 6-min.

Llevamos a cabo la electroforesis del producto en gel de agarosa al 1% con 2 μ g de bromuro de etidio/mL y visualizamos el gel en el transiluminador de UV. El tamaño del producto esperado fue de 245 pb.

Etiquetado de la sonda. Cuantificamos la sonda (700 ng), la desnaturalizamos por 5-min en agua hirviendo y la enfriamos rápidamente en hielo por 5-min. La centrifugamos por unos segundos a 11,000 $\times g$ y añadimos un volumen equivalente del reactivo de etiquetado de ADN (ECL kit, GE Healthcare, Upsala, Suiza) y un volumen equivalente de glutaraldehído; la mezclamos en vórtex, la centrifugamos por unos segundos a 11,000 $\times g$ y la incubamos por 1-h a 37°C.

Hibridación: Luego pre-hibridamos la membrana en 20-mL de buffer de hibridación (Kit ECL, GE Healthcare, Upsala, Suiza) por 4 h a 42°C en un horno de hibridación (HC-3000 HybridCycler, UVP, Upland, CA, EUA) con rotación constante. Luego vertimos este buffer a un tubo al cual se le agregó la sonda etiquetada, la mezclamos y la pusimos de nuevo en contacto con la membrana. La dejamos hibridando toda la noche a 42°C y después retiramos la solución y añadimos 100-mL del buffer de lavado primario por 5-min dos veces y 100-mL del buffer de lavado secundario por 5-min, tres veces.

Visualización de las bandas. En un cuarto oscuro con luz roja, drenamos la membrana y la transferimos con fórceps a una caja de plástico limpia con 10-mL de cada uno de los reactivos del kit ECL (GE Healthcare, Upsala, Suiza). Incubamos con agitación por 1.5-min y después colocamos la membrana en un soporte cubierto con plástico. Sobre ella colocamos una película fotográfica (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA) y expusimos la membrana por 5- a 120-min (dependiendo de la intensidad esperada de la reacción). Después expusimos la película mediante incubación por 0.5-2-min en líquidos de fotografía convencionales (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA), lavando con agua, incubando por 1-min en el fijador y lavando con agua de nuevo.



Interpretación de los resultados. Analizamos los patrones obtenidos por el número y posiciones de las copias IS6110, visualizadas como bandas de ADN.

VII.4.5 Determinación de velocidad de crecimiento

Retiramos una colonia de cada clona y cepa progenitora crecida y aislada en medio de Lowenstein-Jensen, y la depositamos en un tubo estéril conteniendo seis perlas de vidrio y 3-mL de medio Middlebrook 7H9 suplementado más 10% de OADC. Agitamos cada tubo 1-min en vórtex y su turbiedad se igualó al estándar 1 de McFarland. De esta suspensión tomamos 100 μ L y los depositamos en un tubo nuevo conteniendo 3-mL de medio Middlebrook 7H9 con 10% de OADC. Incubamos estos tubos a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 30 días. Cada 48 h (empezando por el día cero) agitamos el tubo en vórtex durante 10-seg, dejamos reposar por 10-seg y leímos la turbidez con un nefelómetro (BD PhoenixSpec).

VII.5 Secuenciación de una clona aislada de CIBIN-99

La secuenciación se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Rocío Ortiz López, mediante la tecnología de secuenciación masiva de nueva generación, MiSeq de Illumina. Secuenciamos la clona más parecida a la cepa progenitora tanto en sus características fenotípicas como en las genotípicas.

VII.5.1 Extracción de ADN

Utilizamos el método CTAB-Lisozima, descrito por Larsen y Cols (61).

Brevemente: agregamos 1% de glicina (p/v) (Sigma-aldrich), al cultivo del MTB en medio Middlebrook 7H9. Incubamos por 24-h a 37°C. Centrifugamos el cultivo y adicionamos el pellet con 450 μ L de Buffer GTE [Glucosa, Tris-EDTA, (Tris marca Amresco, Solon, Ohio, USA) (EDTA marca Promega, Madison, Wisconsin, USA)] y 50 μ L de una solución de lisozima estéril (10 mg/mL, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Incubamos toda la noche a 37°C. Agregamos 150 μ L de una solución 2:1 (v/p) de SDS al 10% (Promega, Madison, Wisconsin) y proteinasa K (10 mg/mL, Promega, Madison, Wisconsin, USA) e incubamos por 40-min a 55°C. Agregamos 200 μ L de NaCl 5M y 160 μ L de CTAB (Sigma-Aldrich) e incubamos por 10-min a 65°C. A esta



solución le agregamos 1.0 mL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 (SEVAG), (Sigma-aldrich) y la centrifugamos a 11,000 $\times g$ por 5-min. Transferimos 900 μL de sobrenadante acuoso a un tubo nuevo, y agregamos 900 μL de SEVAG. Centrifugamos a 11,000 g por 5-min. Transferimos 800 μL del sobrenadante acuoso a un tubo nuevo y agregamos 0.7 volúmenes de isopropanol. Incubamos la preparación por 5-min a temperatura ambiente y la centrifugamos a 11,000 $\times g$ por 10-min. Descartamos el sobrenadante y agregamos 1-mL de etanol al 70%.

Centrifugamos a 11,000 $\times g$ por 10-min. Descartamos el sobrenadante y dejamos secar el tubo. Agregamos 50- μL de TE (Tris-EDTA, pH 8) para re-suspender el ADN. Almacenamos el ADN a $-20^{\circ}C$. Corroboramos la integridad del ADN mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (90 V por 30 min). Cuantificamos el ADN mediante el sistema espectrofotométrico NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) y el sistema fluorométrico Qubit (por picogreen) (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA).

VII.5.2 Secuenciación

Llevamos a cabo la secuenciación de los genomas correspondientes con el sistema MiSeq (Illumina, San Diego, California, USA) y utilizamos el método de secuenciación tipo Paired-End (PE) de Illumina. Preparamos las muestras de ADN de acuerdo con el método para muestras a analizarse mediante el sistema MiSeq, descrito por el fabricante. Inicialmente utilizamos 2ng de ADN genómico para la preparación de la muestra. Fragmentamos y etiquetamos el ADN genómico mediante un proceso llamado Tagmentación, por el kit de Nextera XT. Hicimos el aislamiento de ADN por el kit AMPure XP beads. Normalizamos la librería genómica y la secuenciamos por MiSeq de Illumina con el método Paired-End y amplificación por puenteo, haciendo una corrida de 2×150 pb.

VII.6 Análisis Bioinformático

VII.6.1 Ensamblaje y detección de diferencias genómicas entre H37RV (disponible en línea) y CIBIN-99-C1



Realizamos el ensamblaje del ADN de CIBIN-99-C1 mediante los programas BWA (62) y Newbler (63), y los alineamientos de los genomas completos mediante el programa MUMMER 3.1 (64).

Para identificación de plásmidos, hicimos una búsqueda del gen *dnaA*, el cual es considerado el origen de replicación del genoma o de algún plásmido (equivalente a *oriC*).

VII.6.2 Identificación de los genes mutantes involucrados en las rutas biosintéticas afectadas por SIREP

Realizamos una búsqueda de los genes reportados (por otros autores) que confieren resistencia a los fármacos anti-tuberculosis. Esta búsqueda la realizamos en la base de datos TB Drug Resistance Mutation Database (<https://tbdreamdb.ki.se/Info/>)(65). Esta base de datos contiene 40 genes relacionados a resistencia a fármacos de primera línea, los cuales analizamos mediante alineamiento con los genes de H37Rv. Realizamos análisis de ocho genes de resistencia a fármacos de segunda línea usando la misma metodología.

También, según Zhang y colaboradores (66) 15 genes fueron asociados a resistencia y son considerados esenciales para *Mycobacterium tuberculosis*. Realizamos búsqueda de mutaciones en estos genes.

Realizamos el alineamiento de genes mutantes de la clona de CIBIN-99 mediante la consulta en línea de los genes de H37Rv en el banco de GenBank, del NCBI (National Center of Biotechnology Information) y el alineamiento de genes por el programa Blast2seq(67). Utilizamos el programa UGENE para la detección de mutaciones y cambios en el marco de lectura.

VII.7 Validación de los resultados de la secuenciación

Para los genes que contuvieran inserciones o deleciones decidimos hacer validación de los resultados. Realizamos diseño de *primers* que amplificaran la región que contuviera la deleción, y realizamos con ellos amplificación por PCR. Después sometimos a electroforesis capilar los productos de PCR para encontrar el número de pares de bases que amplificaron tanto en el control (H37Rv) como en la muestra problema (clona de CIBIN-99). Para este análisis utilizamos el secuenciador 3130



Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) para la electroforesis capilar, con el software Gene Mapper ID V3.2 (Applied Biosystems). La mezcla fue de 15- μ L de formamida, 1- μ L de producto de PCR, y 0.3- μ L del marcador de peso molecular LIZ500.

VII.8 Propuesta de un mecanismo integrado de resistencia a fármacos

Con la lista de genes mutantes de MTB CIBIN-99, seleccionamos aquellos que estuvieran involucrados en síntesis de ácidos grasos de cadena corta, síntesis de ácidos micólicos, síntesis de pared, transcripción y traducción (rutas afectadas por SIREP), e hicimos diferentes análisis de las proteínas mutadas, con programas independientes (tabla 3, página 28):

Tabla 3.- Programas utilizados para el análisis de proteínas	
Estudio	Programa usado
Alineamiento de proteínas	Clustal W(68)
Modelaje de proteína	Swiss-Model(69)
Interacciones proteína-proteína	String(70)
Interacciones proteína-químicos	Stitch v.4 (71)
Accesibilidad al solvente de la proteína (10 aa más cercanos)	NetSurfP(72)
Predicción de estabilidad en la proteína en mutaciones de 1 aa	Mupro (73) /PopMusic v2.1 (74)



VIII. RESULTADOS

VIII.1 Obtención de las clonas de MTB

Realizamos este trabajo utilizando las cepas originales del CIBIN de H37Rv y de CIBIN-99. Obtuvimos seis clonas de cada una de estas cepas, más las originales, es decir, trabajamos con siete cultivos para H37Rv y con siete para CIBIN-99.

VIII.2 Caracterización de las cepas progenitoras de H37Rv y CIBIN-99, y de sus clonas.

Realizamos la caracterización de las clonas, tanto genótipicamente (RFLP-IS6110), como fenotípicamente (Tinción de Ziehl-Neelsen, morfología de las colonias, determinación de perfil de susceptibilidad a fármacos, y determinación de velocidad de crecimiento).

VIII.2.1 Tinción de Ziehl-Neelsen

Control de reactivos: realizamos una tinción de Ziehl-Neelsen a un cultivo bacteriano que fuera AAR- (Ácido-Alcohol Resistente negativo). Este control se realizó con *E. coli* (Figura 10, página 29) como está previamente descrito en la metodología. Los reactivos estaban en buenas condiciones, tiñendo de color rojo-violáceo con la solución de carbolfucsina, y decolorando, y de color verde con la solución de verde de malaquita.

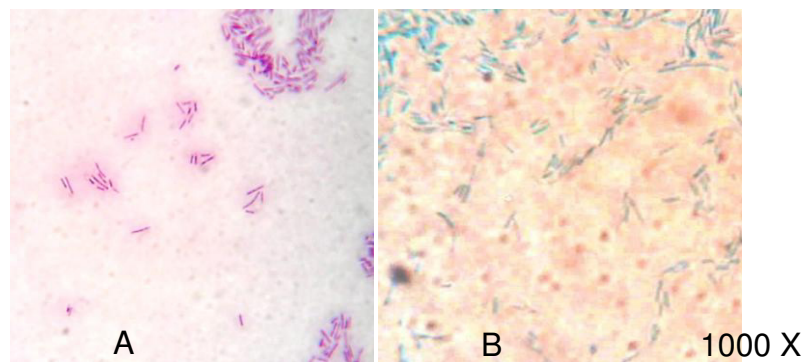


Figura 10.- Control de reactivos para tinción de Ziehl-Neelsen en *E. coli*. Recuadro(A) Tinción incompleta hasta el paso antes de la decoloración con ácido-alcohol. Recuadro (B) Tinción completa de Ziehl-Neelsen. En ambas tinciones se observó con objetivo de 100 aumentos, y una amplificación de 1000X. Se comprobó que los reactivos estaban en buenas condiciones.

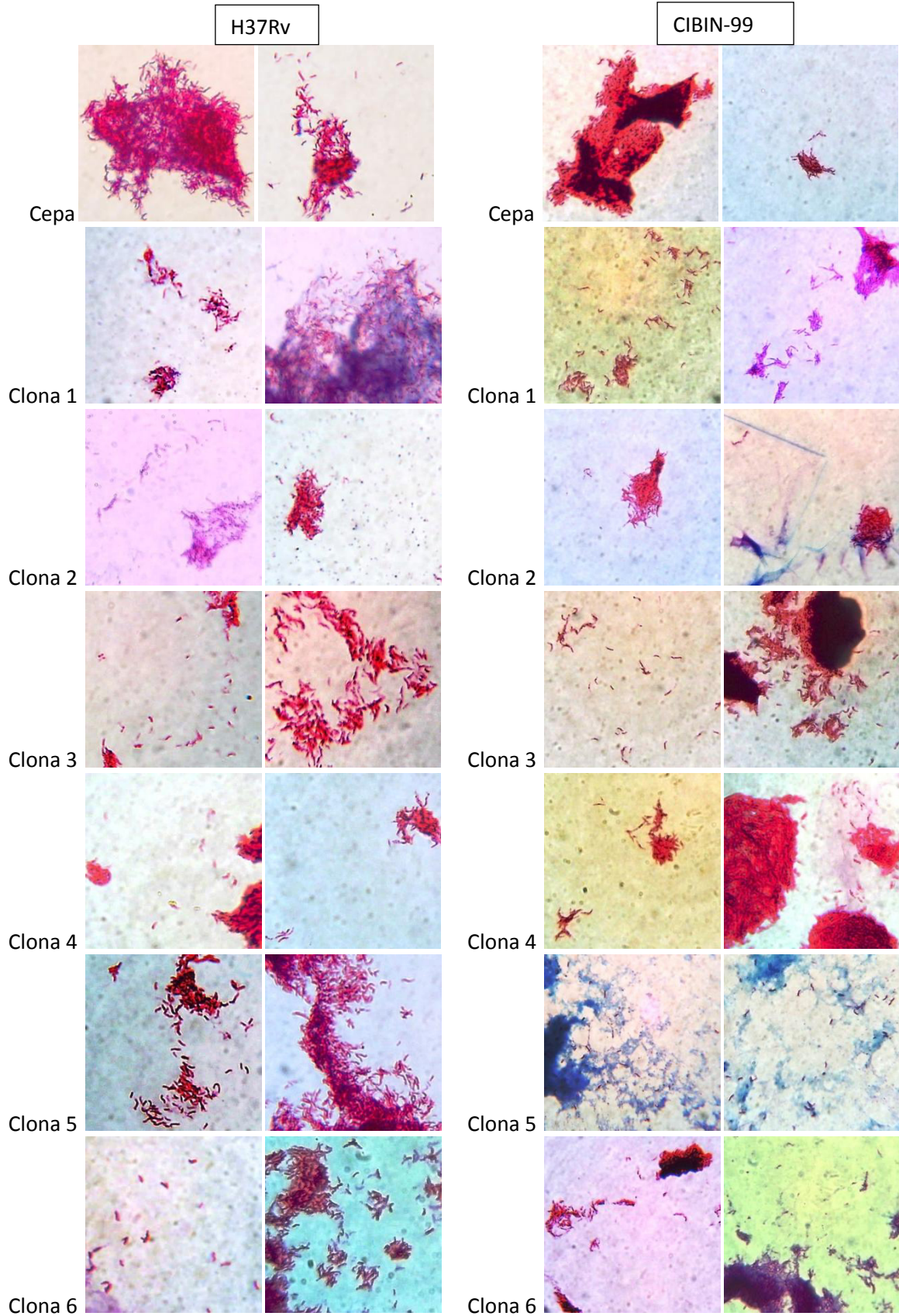


Figura 11.- Tinciones de Ziehl-Neelsen de MTB (1000 diámetros). Se observan dos imágenes representativas de cada clona, en donde se aprecian los bacilos ácido alcohol-resistentes (rojos).



En las imágenes de la figura 11 (página 30), podemos observar los bacilos color rojo-violáceo, y que todos los cultivos (tanto en las cepas originales como las clonas, dos imágenes de cada uno) de H37Rv y de CIBIN-99 son ácido alcohol resistentes, demostrando su resistencia a la decoloración debido a su pared celular. Se observan bacilos aislados, y otros agrupados por el factor cuerda de las micobacterias.

VIII.2.2 Morfología de colonias

En cuanto a la morfología de las colonias, a partir de cultivos de un mes realizamos siembras por estría cruzada, o también conocidas como en cuatro cuadrantes. Esto con el fin de obtener colonias aisladas a las cuales se pudiera observar su morfología. La morfología esperada es rugosa, en forma de coliflor, con colonias secas. Se observa la morfología de las colonias de H37Rv y sus clonas en la figura 12, y de CIBIN-99 en la figura 13 (página 32).

VIII.2.3 Determinación del perfil de susceptibilidad a fármacos

VIII.2.3.1 MABA

Realizamos los ensayos de microplaca con Alamar Azul (MABA) para determinar la CMI de cada cepa y clona de MTB hacia SIREPC. En total hicimos 42 placas de MABA (2 fármacos por placa, 6 fármacos en total, por lo tanto 3 placas por cepa progenitora o clona. 14 cultivos \times 3 microplacas = 42 placas). En la figura 14 (página 33) se observan los ejemplos de tres placas con los seis fármacos para una sola cepa, con los resultados representativos para H37Rv, y tres placas con los seis fármacos, con los resultados representativos para CIBIN-99. Obsérvese que los resultados son los mismos para el fármaco Clofazimina, al que ambas cepas y clonas fueron susceptibles. En pirazinamida no fue posible observar su CMI, ya que es un fármaco que requiere un medio ácido para poderse metabolizar. Se realizaron pruebas con medio a pH5.5, variaciones en el medio, en el fármaco y en el cultivo bacteriano, pero no logramos obtener un perfil de crecimiento o de inhibición, por lo que realizamos una prueba de la enzima pirazinamidasa.

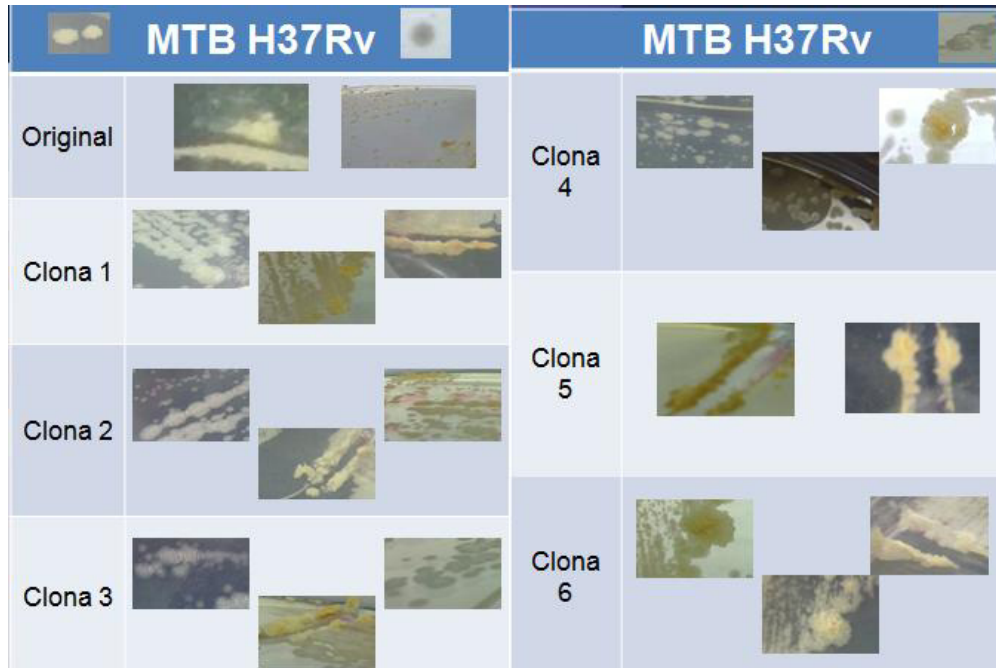


Figura 12.- Morfología de las colonias de H37Rv y de sus clonas. Se observan tres imágenes representativas de cada clona, y se aprecia la morfología típica de las colonias de MTB, en formas de coliflor, secas y rugosas.



Figura 13.- Morfología de las colonias de CIBIN-99 y de sus clonas. Se observan tres imágenes representativas de cada clona, y se aprecia la morfología típica de las colonias de MTB, en formas de coliflor, secas y rugosas.

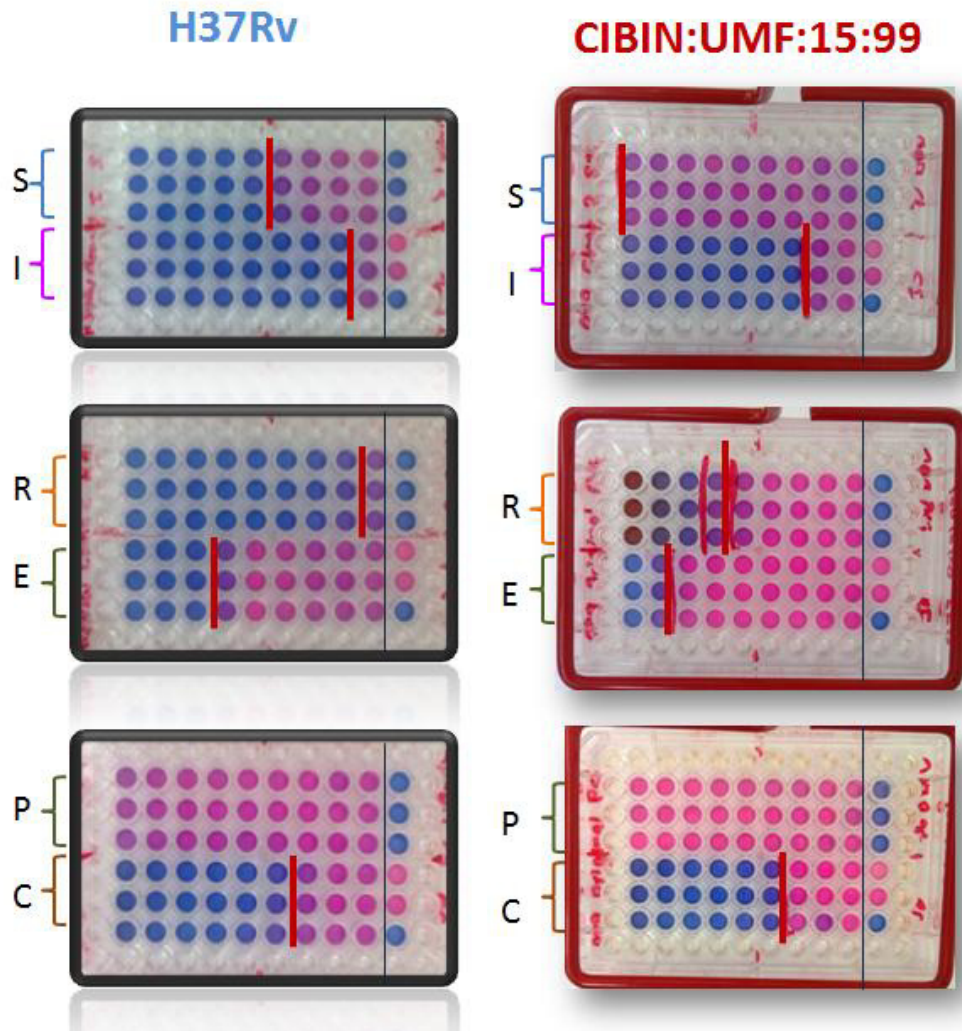


Figura 14.- Resultados representativos en ensayos de MABA para H37Rv y para CIBIN-99. Del lado izquierdo podemos observar las 3 placas representativas con los 6 fármacos para H37Rv, y del lado derecho observamos las tres microplacas representativas con los 6 fármacos para CIBIN-99. Se observan las hileras de la periferia de cada placa con agua para evitar la desecación de las placas, y del lado derecho de cada placa se observa una línea negra que divide los controles de la placa del ensayo. S=Estreptomicina, I= Isoniazida, R=Rifampicina, E= Etambutol, P=Pirazinamida, C=Clofazimina.

En las tablas 4 y 5 (página 34) se observan las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de cada fármaco a las cepas susceptible (H37Rv) y resistente (CIBIN-99), respectivamente. También se observan los puntos de corte del fármaco para considerar una cepa resistente.



Tabla 4.- CMI de cada fármaco, sobre H37Rv y sus clonas

CLONA	CMI FÁRMACO (µg/mL)					
	S	I	R	E	P	C
Original	0.5	0.06	0.06	2	X	0.25
Clona 1	0.5	0.06	0.06	2	X	0.25
Clona 2	0.5	0.06	0.06	2	X	0.25
Clona 3	0.5	0.06	0.06	2	X	0.25
Clona 4	0.5	0.12	0.12	2	X	0.25
Clona 5	0.5	0.06	0.06	2	X	0.25
Clona 6	0.5	0.06	0.12	2	X	0.25
Punto de corte	2	0.25	0.25	2.5	100	2

S=Estreptomina, I= Isoniazida, R=Rifampicina, E= Etambutol, P=Pirazinamida, C=Clofazimina.

Tabla 5.- CMI de cada fármaco sobre CIBIN-99 y sus clonas

CLONA	CMI FÁRMACO (µg/mL)					
	S	I	R	E	P	C
Original	>200	3.13	25	4	X	0.25
Clona 1	>200	3.13	25	4	X	0.25
Clona 2	>200	3.13	25	4	X	0.25
Clona 3	>200	3.13	25	4	X	0.25
Clona 4	>200	3.13	25	4	X	0.25
Clona 5	>200	3.13	25	4	X	0.25
Clona 6	>200	3.13	25	4	X	0.25
Punto de corte	2	0.25	0.25	2.5	100	2

S=Estreptomina, I= Isoniazida, R=Rifampicina, E= Etambutol, P=Pirazinamida, C=Clofazimina.



VIII.2.3.2 Prueba de pirazinamidasas

En la prueba de la pirazinamidasas, observamos susceptibilidad a pirazinamida por la aparición de una banda rosa en la superficie del medio, donde está la bacteria creciendo, indicando la actividad de la enzima pirazinamidasas, que metaboliza al pro-fármaco. En la figura 15 (página 36) podemos observar que el control negativo, en el cual sólo se agregó medio Löwenstein-Jensen, no hubo formación de banda color rosa. Se observa la presencia de una banda color rosa en la superficie en todos los cultivos de H37Rv, indicando susceptibilidad a pirazinamida. En los cultivos de CIBIN-99 no se observa presencia de banda, excepto en la clona 5, que por la aparición de la banda se determinó que es susceptible a pirazinamida, y que cambió su susceptibilidad a comparación con su cepa progenitora.

En la tabla 6 (página 36) se observa el perfil completo de susceptibilidad a fármacos de todas las clonas y cepas progenitoras de H37Rv y de CIBIN-99. Observamos que la clona 5 de CIBIN-99 es susceptible a pirazinamida, mientras que las demás clonas de esta cepa son resistentes.

VIII.2.4 Genotipificación (RFLP-IS6110)

En la genotipificación, solamente se hizo para la cepa original de H37Rv (no para sus clonas); y para la cepa original y clonas de CIBIN-99. Se realizó por RFLP-IS6110, según la metodología de Van Embden y Cols., previamente descrita en la sección de metodología. Corrimos un gel para observar la integridad del ADN genómico antes de digerir (figura 16, página 37). Corrimos otro gel después de digerido con la enzima de restricción PvuII (figura 17, página 37), se observa la digestión del ADN genómico completo, por el barrido en cada carril. En la imagen aparecen dos carriles con la muestra de la clona 5, debido a que la primera vez no se logró digerir. El patrón de bandeo resultante de los RFLP's se observa en la figura 18 (página 38). No hubo cambios en el patrón de bandeo de las clonas.

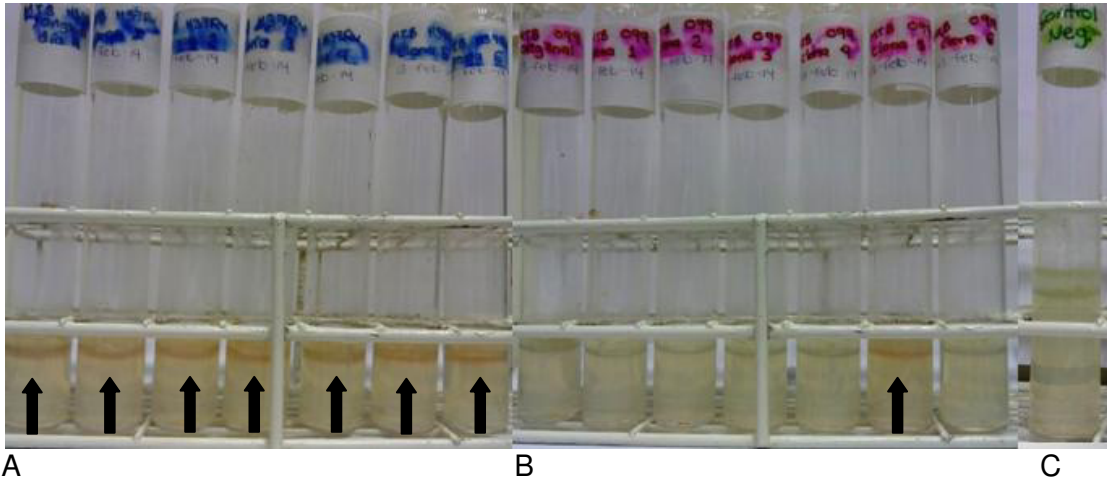


Figura 15.- Prueba de presencia de la enzima pirazinamidasas. A) Cultivos de H37Rv. B) Cultivos de CIBIN-99. En las imágenes A y B el orden de los cultivos es: tubo 1: Cepa original, tubo 2: Clona 1, tubo 3: clona 2, tubo 4: clona 3, tubo 5: clona 4, tubo 6: clona 5, y tubo 7: clona 6. C) Control negativo. Las flechas en color negro indican la presencia de una banda rosa, por lo tanto, de la enzima pirazinamidasas y susceptibilidad a pirazinamida.

Tabla 6.- PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD A FÁRMACOS de las cepas originales y clonas trabajadas en este estudio.							
CEPA	CLONA	S	I	R	E	P	C
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Original	ss	ss	ss	ss	ss	ss
	1	ss	ss	ss	ss	ss	ss
	2	ss	ss	ss	ss	ss	ss
	3	ss	ss	ss	ss	ss	ss
	4	ss	ss	ss	ss	ss	ss
	5	ss	ss	ss	ss	ss	ss
	6	ss	ss	ss	ss	ss	ss
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CIBIN99	Original	rr	rr	rr	rr	rr	ss
	1	rr	rr	rr	rr	rr	ss
	2	rr	rr	rr	rr	rr	ss
	3	rr	rr	rr	rr	rr	ss
	4	rr	rr	rr	rr	rr	ss
	5	rr	rr	rr	rr	ss	ss
	6	rr	rr	rr	rr	rr	ss

ss= Susceptible, rr = resistente. S= Estreptomycin, I=Isoniazida, R=Rifampicina, E=Etambutol, P=Pirazinamida, C=Clofazimina.

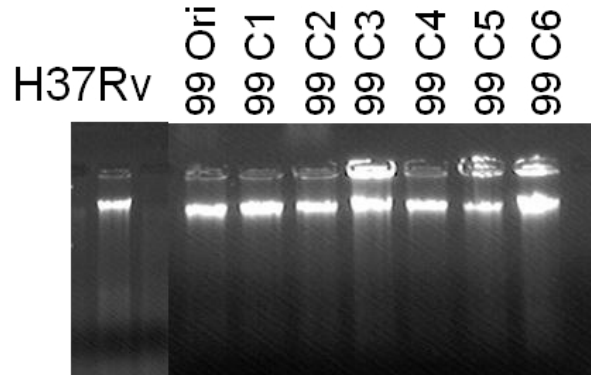


Figura 16. Integridad del ADN genómico antes de la digestión con PvuII. Se observan en la parte superior qué muestra contenía cada carril. 99=CIBIN-99, Ori=Original, C=Clona.

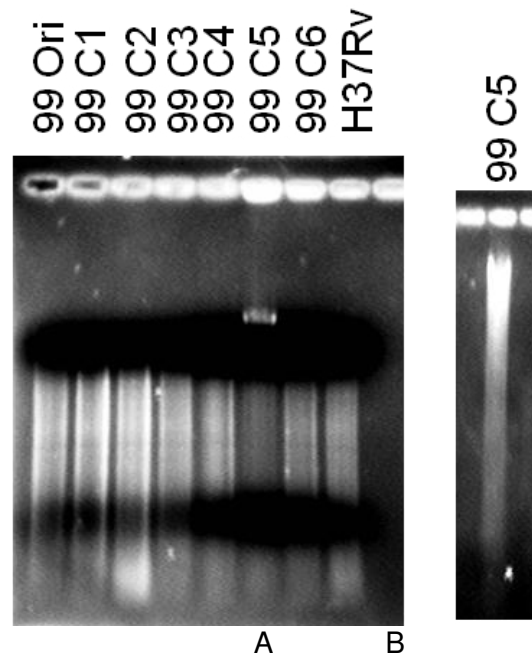


Figura 17.-ADN genómico digerido con la enzima PvuII. Se muestran en la parte superior qué muestra contenía cada carril. A) Digestión con la enzima PvuII, La clona 5 no se pudo digerir, por lo que se repitió esta digestión. B) Clona 5 digerida con la enzima de restricción PvuII. 99=CIBIN-99, Ori= Original, C=Clona.

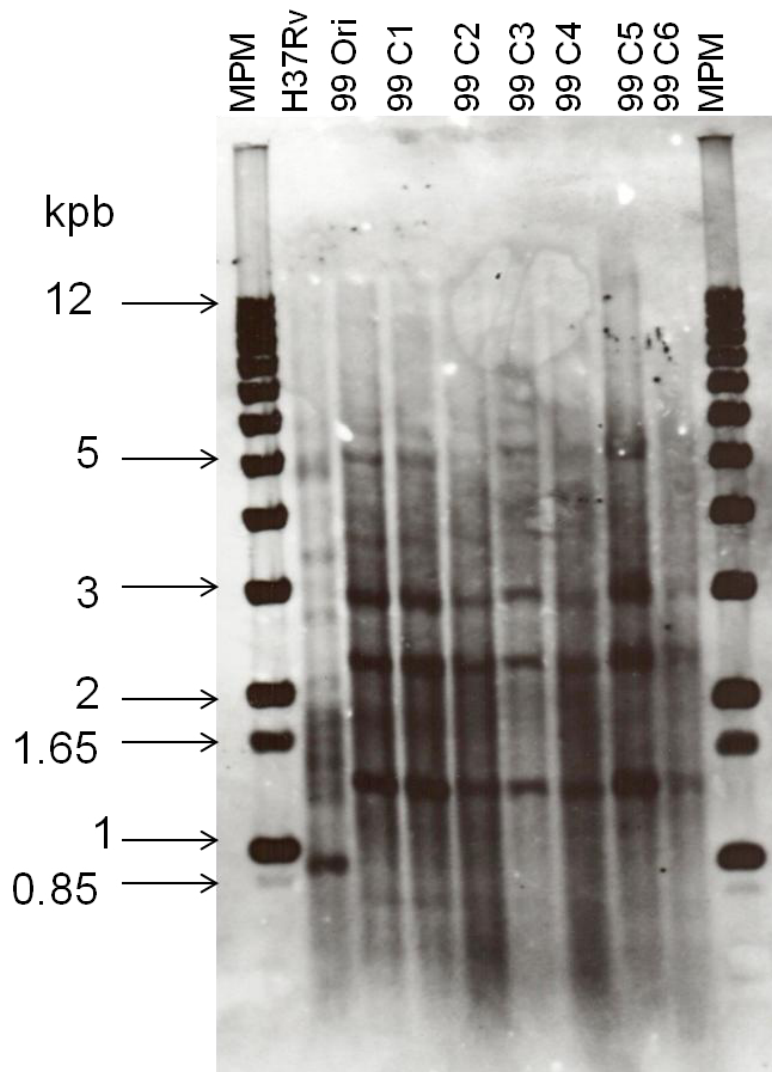


Figura 18.- Patrón de bandeo de RFLPs-IS6110. Kpb= Kilopares de bases. MPM= Marcador de Peso Molecular, 99=CIBIN-99, Ori= Original, C=Clona.

VIII.2.5 Determinación de velocidad de crecimiento

Al determinar la velocidad de crecimiento por nefelometría, observamos que las curvas de control de crecimiento se comportaron de distinta manera. Para H37Rv (figura 19, página 39) se observa un crecimiento similar en las clonas con la cepa original (azul), excepto en la clona 5 de H37Rv. Para CIBIN-99, (figura 20, página 39) se observó el crecimiento más vigoroso en la cepa original (color azul) que en las clonas. La clona 1 (color rojo) fue la que más se acercó en crecimiento.

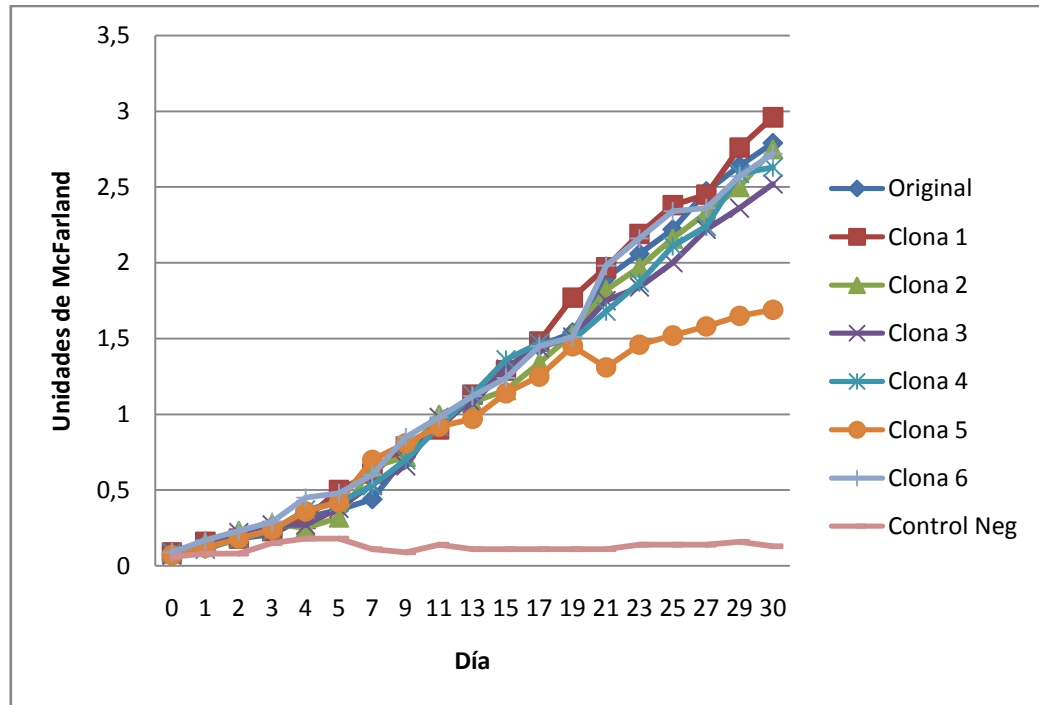


Figura 19.- Curva de crecimiento de H37Rv. Los colores de los puntos en la curva determinan la clona que se estaba utilizando. Se puede observar que todas las clonas, excepto la clona 5 (círculos en color naranja), tuvieron un crecimiento similar a la cepa original (rombos color azul marino).

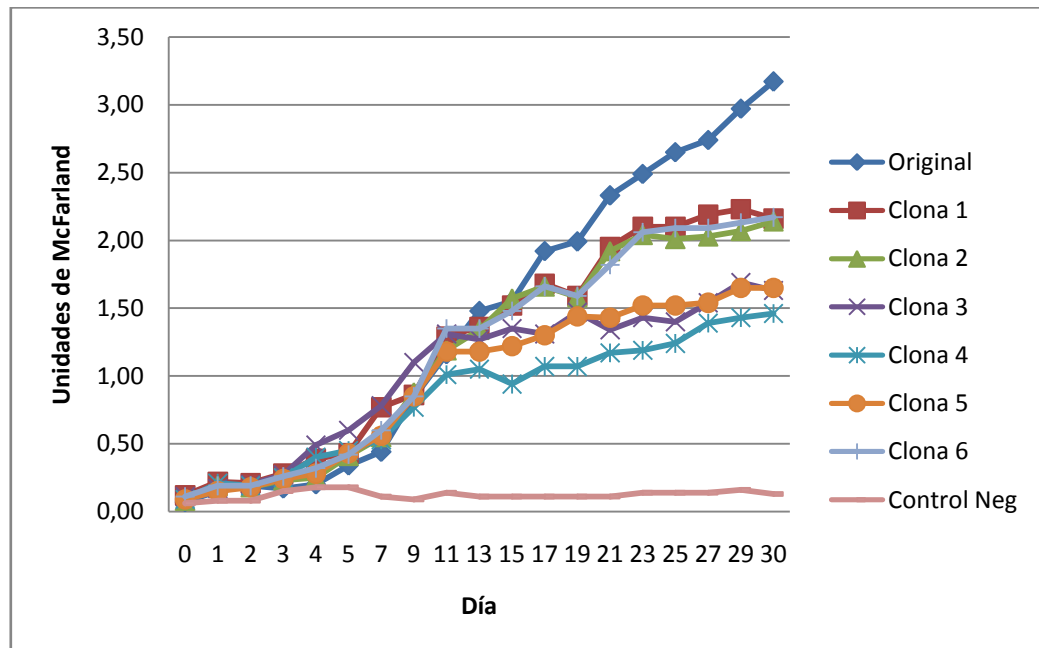


Figura 20.- Curva de crecimiento de CIBIN-99. Los colores de los puntos en la curva determinan la clona que se estaba utilizando. Se puede observar que todas las clonas crecieron con menor vigor que la cepa original (rombos color azul marino). La clona que más se acercó al crecimiento de la cepa original, fue la clona 1 (cuadrados color rojo).

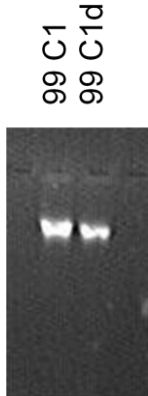


VIII.3 Secuenciación de CIBIN-99-C1

La clona de CIBIN-99 que se eligió para secuenciar fue la Clona 1 (CIBIN-99-C1), debido a su mayor parecido en las características a la cepa progenitora.

VIII.3.1 Extracción de ADN

Se realizó extracción de ADN a la Clona 1, y a un duplicado de la misma por el método de CTAB-Lisozima, descrito por Larsen y Cols. (sección materiales y métodos). Realizamos electroforesis para verificar integridad genómica, y cuantificamos el ADN por NanoDrop y por Qubit con picogreen. Se eligió el ADN del duplicado. Los resultados se muestran en la tabla 7:

Tabla 7.- Resultados de extracción de ADN de la Clona 1 de CIBIN-99		
Análisis	Resultado	
Integridad genómica		
Cuantificación por NanoDrop	Concentración:	49.5 ng/ μ L
	Rel 260/280:	1.92
Cuantificación por Qubit	Concentración:	48.68 ng/ μ L

99 C1= CIBIN-99 Clona 1; 99 C1d= duplicado de CIBIN-99 Clona 1. Rel = Relación.

VIII.3.2 Secuenciación

Realizamos secuenciación genómica mediante la tecnología de MiSeq de Illumina. Los resultados se muestran en la tabla 8 (página 42).



En los resultados que arrojó nuestra secuenciación, fueron 4.250,000 pb, un contenido de GC de 65.19%, 396 lecturas continuas del genoma, llamados contigs, la mitad de las lecturas estaban ensambladas en 39 mil bases o más largas (N50), y la cobertura promedio fue de 64.46, lo que significa que cada nucleótido fue leído en promedio 64 veces.

VIII.4 Ensamblaje y detección de diferencias genómicas entre H37RV y CIBIN-99-C1.

El ensamblaje y la detección de diferencias genómicas se realizó por el programa Mummer. En la imagen del mapeo (figura 21, página 42) se muestran las posiciones genómicas de H37Rv (genoma disponible en línea) en el eje de las X y se compara con cada uno de los nodos, o contigs (lecturas continuas) generados para CIBIN-99-C1, ubicados en el eje de las Y.

En el lado derecho de la imagen se muestra el código de color que indica el porcentaje de similitud entre un genoma y otro, siendo el color negro un 0% de similitud, y el color rojo un 100% de similitud entre ambos genomas. Se observa que el contenido genético es muy parecido. Los puntos que están fuera de la línea tienen una similitud del 80% o mayor.

Búsqueda de plásmidos: Se realizó un análisis del gen *dnaA*, el cual es considerado el origen de replicación del genoma o de algún plásmido. Sólo se encontró una posición de este gen, en el genoma secuenciado.



Tabla 8.- Resultados de secuenciación genómica de CIBIN-99-C1	
Muestra	MTB CIBIN-99-C1
Conteo de bases	4,250, 023 bases
%GC	65.19%
Número de contigs	396
N50	39, 768
Longitud promedio de contigs	10, 702 bases
Longitud máxima de contigs	123, 932 bases
Cobertura promedio	64.46X

C1= Clona 1

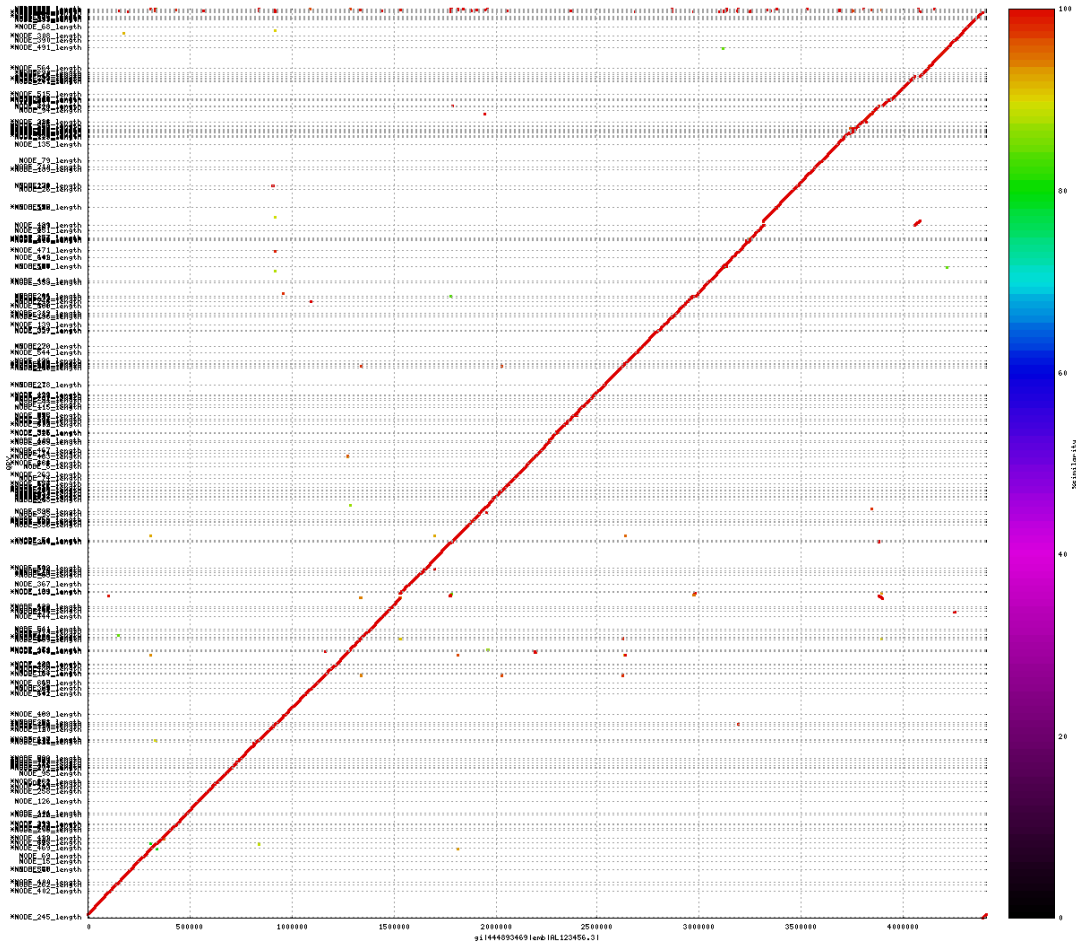


Figura 21.- Imagen del mapeo de similitudes entre el genoma de H37Rv contra CIBIN-99-C1. En el eje de las X se observa el genoma de H37Rv, y en el eje de las Y se encuentran los contigs de CIBIN-99-C1.



VIII.5 Identificación de los genes mutantes involucrados en las rutas biosintéticas afectadas por SIREP

Para la identificación de genes mutantes realizamos alineamiento de genes reportados, como está descrito anteriormente en la metodología. Los genes a los cuáles decidimos realizar alineamiento con los genes de H37Rv, fueron los 63 genes de la tabla 9. Algunos genes se repiten, pero esto porque estaban reportados para ambos fármacos, y las mutaciones reportadas eran diferentes. Sin contar los genes repetidos hicimos análisis de 55 genes diferentes.

Tabla 9.- Genes analizados, involucrados en resistencia a fármacos anti-tuberculosis				
Grupo de genes	Fármaco	Gen analizado	# mutaciones	Mutación*
Base de datos TBDREAM (65)	S	<i>rrs</i>	0	
		<i>rpsL</i>	1	A128G
		<i>gidB</i>	0	
	I	<i>katG</i>	2	G944C G1434C
		<i>inhA</i>	0	
		<i>oxyR</i>	0	
		<i>ahpC</i>	2	T77G G217C
		<i>iniA</i>	0	
		<i>iniB</i>	0	
		<i>iniC</i>	0	
		<i>furA</i>	0	
		<i>kasA</i>	0	
		<i>ndh</i>	0	
		<i>fbpC</i>	0	
		<i>embB</i>	0	
		<i>mabA</i>	0	
		<i>Rv1592c</i>	2	A963G A964G
		<i>Rv1772</i>	0	
		<i>srmR</i> homólogo	0	
		<i>fabD</i>	0	
		<i>efpA</i>	1	C639A
<i>fadE24</i>	0			
<i>nhoA</i>	0			
<i>accD6</i>	1	T600C		



	R	<i>rpoB</i>	1	C1349T
		<i>embB</i>	0	
	E	<i>embB</i>	3	G918A G2895A C3165A
		<i>embA</i>	0	
		<i>embC</i>	4	Pbl C2543- Pbl A2544- C2781T G2941C
		<i>Rv0340</i>	0	
		<i>iniA</i>	0	
		<i>iniB</i>	0	
		<i>iniC</i>	0	
		<i>embR</i>	0	
		<i>Rv3124</i>	0	
		<i>Rv3125c</i>	0	
		<i>Rv3126</i>	0	
	<i>mIA2</i>	0		
	<i>rmlD</i>	0		
	P	<i>pncA</i>	1	Pbl G453-
	A	<i>rrs</i>	0	
<i>tlyA</i>		0		
N	<i>mabA</i>	0		
	<i>inhA</i>	0		
	<i>ethA</i>	0		
F	<i>gyrA</i>	3	G61C G284C G2003A	
	<i>gyrB</i>	0		
PAS	<i>thyA</i>	0		
Artículo Zhang y Cols...	NE	<i>faD30</i>	1	Promotor (-42)
		<i>rpoC</i>	4	G1298A C1397T G1781A G4045A
		<i>Rv0812</i>	1	A435G
		<i>Rv0893c</i>	0	
		<i>cysN</i>	1	C1563G



		<i>pyrB</i>	3	T402C T749C A755G
		<i>Rv1465</i>	0	
		<i>EtaR (ethR)</i>	1	A4C
		<i>pks8</i>	0	
		<i>pks17</i>	0	
		<i>pyrG</i>	0	
		<i>dlaT</i>	0	
		<i>folC</i>	1	G118C
		<i>cyp141</i>	1	A469G
		<i>Rv3806c</i>	0	

*Cambio en el nucleótido de CIBIN-99-C1: Nucleótido original de H37Rv, número de nucleótido mutado, nucleótido mutado en CIBIN-99-C1. S: Estreptomicina, I: Isoniazida, R: Rifampicina, E: Etambutol, P: Pirazinamida, A: Aminoglicósidos (Amikacina, Capreomicina, Kanamicina, Viomicina), N: Etionamida, F: Fluoroquinolonas (Ofloxacina, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Moxifloxacina, Sparfloxacina), PAS: Ácido Para-aminosalicílico, NE: No Especificado, Pbl: posible.

De estos 55 genes, 19 estaban mutados: 10 para fármacos de primera línea (*rpsL*, *katG*, *ahpC*, *accD6*, *efpA*, *Rv1592c*, *rpoB*, *embB*, *embC* y *pncA*), un gen para fármacos de segunda línea (*gyrA*), y ocho recientemente reportados con asociación a fármaco-resistencia (*fadD30*, *rpoC*, *Rv0812*, *cysN*, *pyrB*, *EtaR*, *folC* y *cyp141*).

Debido a que no se hizo análisis fenotípico de resistencia a fármacos de segunda línea en la cepa, y a que los genes reportados por Zhang y Cols. no están bien estudiados ni entendido su papel en la fármaco-resistencia, decidimos analizar con mayor detalle sólo los primeros 10 genes mutados.



VIII.5.1 Identificación de mutaciones en los genes que confieren resistencia a CIBIN-99-C1 a cada fármaco de primera línea

VIII.5.1.1. Estreptomicina

Para estreptomicina sólo se detectó un gen mutado, el *rpsL* (tabla 10). Este gen codifica para la proteína S12 de la subunidad 30S del ribosoma. El cambio fue en el aminoácido 43 de lisina por arginina (Figura 22).

Gen mutado	Acción/ efecto	Polimorfismo	Posición del nucleótido	Posición del codón	Aminoácido	Tipo de mutación	Reportado por:
<i>rpsL</i> 124aa	proteína ribosomal S12 (30S)	AAG/AGG	128	43	Lys/Arg (ambos básicos)	Transición. Mutación neutra	(75-78)

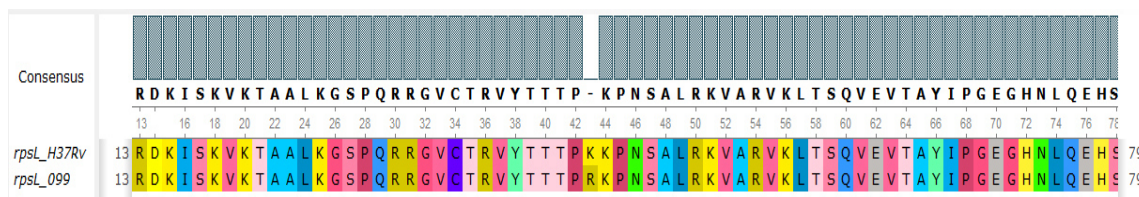


Figura 22.- Alineamiento de proteínas de *rpsL*, entre H37Rv y CIBIN-99-C1. Alineamiento realizado con el programa Clustal W. 099= CIBIN-99-C1. Los números representan el número de aminoácido.

También se realizó modelaje de proteínas (Figura 23, página 47), usando como modelo de proteína por homología el 2gy9L, pero sólo con similitud del 75.2%, pues la proteína de *M. tuberculosis*, o alguna que sea más parecida al modelo usado no ha sido cristalizada. En la Figura 24 (página 47), se observa la red de interacciones entre la estreptomicina y algunas proteínas, por ejemplo, se observa la interacción con *rpsL*; y en la figura 25 (página 48) presentamos la red de interacciones de *rpsL* con otras proteínas, por ejemplo con otras subunidades del ribosoma.



Figura 23.- Modelaje de la proteína rpsL. La imagen de la derecha solo representa del aminoácido 23 al 123, con una identidad del 75.2% al modelo de homología 2gy9L.

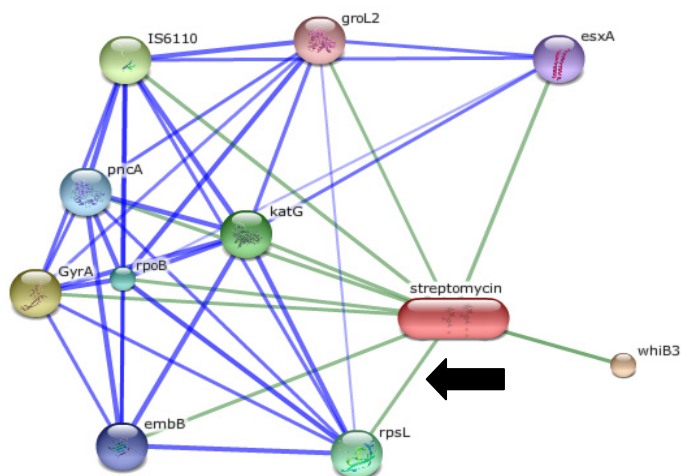
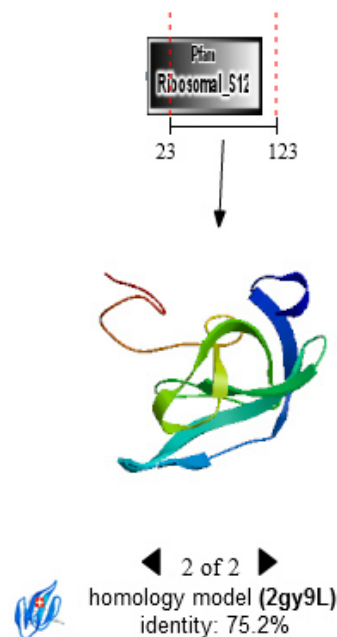


Figura 24.- Red de interacciones de la Estreptomicina. El modelaje se realizó con el programa Stitch. En la imagen de la izquierda, las líneas en color azul muestran la interacción entre dos proteínas, y en color verde muestran la interacción de un químico con una proteína. Obsérvese la relación de la estreptomicina con *rpsL* (señalada con una flecha negra). La tabla inferior muestra el puntaje de la asociación, y una breve descripción de cada proteína

Your Input:

streptomycin streptomycin (1457.4 g/mol)
(*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv)

Predicted Functional Partners:

		Score
whiB3	transcriptional regulatory protein WHIB-like WHIB3 (102 aa)	0.823
GyrA	DNA gyrase subunit A; DNA gyrase negatively supercoils closed circular double- stranded DNA in [...] (838 aa)	0.667
IS6110	transposase (108 aa)	0.657
katG	catalase-peroxidase-peroxynitritase T KATG (740 aa)	0.657
rpsL	30S ribosomal protein S12; Interacts with and stabilizes bases of the 16S rRNA that are involve [...] (124 aa)	0.657
rpoB	DNA-directed RNA polymerase subunit beta (1172 aa)	0.657
pncA	pyrazinamidase/nicotinamidase PNCA (PZase) (186 aa)	0.654
embB	integral membrane indolylacetylinsitol arabinosyltransferase EMBB (arabinosylindolylacetylins [...]) (1098 aa)	0.652
esxA	6 kDa early secretory antigenic target ESXA (ESAT-6); Not known. Elicits high level of IFN-gamm [...] (95 aa)	0.647
groL2	chaperonin GroEL; Prevents misfolding and promotes the refolding and proper assembly of unfold [...] (540 aa)	0.646

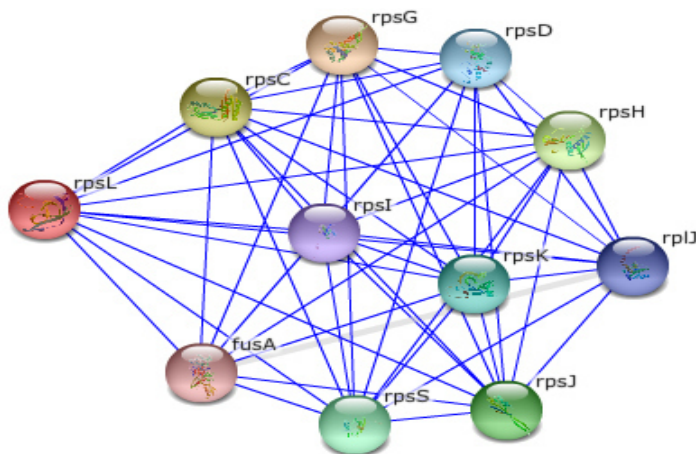


Figura 25.- Red de interacciones de *rpsL*. El modelaje se realizó con el programa String. En la imagen de la izquierda, las líneas en color azul muestran la unión entre dos proteínas. Obsérvese la unión de *rpsL* con otras proteínas del ribosoma. La tabla inferior muestra el modo de acción de una proteína con otra, y el puntaje de la asociación, y una breve descripción de cada proteína.

Your Input:

- *rpsL* 30S ribosomal protein S12; Interacts with and stabilizes bases of the 16S rRNA that are involved in tRNA selection in the A site and with the mRNA backbone. Located at the interface of the 30S and 50S subunits, it traverses the body of the 30S subunit contacting proteins on the other side and probably holding the rRNA structure together. The combined cluster of proteins S8, S12 and S17 appears to hold together the shoulder and platform of the 30S subunit (By similarity) (124 aa) (*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*)

Predicted Functional Partners:

	Activation	Inhibition	Binding	Phenotype	Catalysis	Post-transl. m	Reaction	Expression	Score
● <i>rpsG</i> 30S ribosomal protein S7; One of the primary rRNA binding proteins, it binds directly to 16S rR [...] (156 aa)			●						0.999
● <i>rpsC</i> 30S ribosomal protein S3; Binds the lower part of the 30S subunit head. Binds mRNA in the 70S r [...] (274 aa)			●						0.991
● <i>rpsH</i> 30S ribosomal protein S8; One of the primary rRNA binding proteins, it binds directly to 16S rR [...] (132 aa)			●						0.989
● <i>rpsJ</i> 30S ribosomal protein S10; Involved in the binding of tRNA to the ribosomes (By similarity) (101 aa)			●						0.989
● <i>rpsS</i> 30S ribosomal protein S19; Protein S19 forms a complex with S13 that binds strongly to the 16S [...] (93 aa)			●						0.989
● <i>rpsK</i> 30S ribosomal protein S11; Located on the platform of the 30S subunit, it bridges several dispa [...] (139 aa)			●						0.987
● <i>rpsD</i> 30S ribosomal protein S4; One of the primary rRNA binding proteins, it binds directly to 16S rR [...] (201 aa)			●						0.987
● <i>rplJ</i> 50S ribosomal protein L10 (178 aa)			●						0.986
● <i>rpsI</i> 30S ribosomal protein S9 (151 aa)			●						0.986
● <i>fusA</i> elongation factor G; This protein promotes the GTP-dependent translocation of the nascent prote [...] (701 aa)			●						0.985

Se decidió realizar un análisis para conocer si la mutación incrementa o reduce la estabilidad de la proteína. Esto podría ser indicio de las modificaciones en el vigor de las cepas, y si podrían crecer o adaptarse más rápido.

En cuanto al análisis de exposición al solvente de los aminoácidos, no hubo cambio de la exposición de ninguno de los 10 aminoácidos más cercanos, al mutar el aminoácido in silico. En el análisis se encontró que esa mutación incrementa la estabilidad de la proteína.

VIII.5.1.2. Isoniazida

Para isoniazida fueron cinco genes mutados en CIBIN-99-C1: *katG*, *ahpC*, *accD6*, *efpA* y *Rv1592c* (tabla 11, página 49).



Tabla 11.- Genes mutados relacionados con resistencia a isoniazida							
Gen mutado	Acción / efecto	Polimorfismo	Posición del nucleótido	Posición del codón	Aminoácido	Tipo de mutación	Reportado por
<i>katG</i> 740 aa	catalasa- peroxidasa- peroxinitritasa T	AGC/ ACC	944	315	Ser/Thr (ambos polares)	Transversión. Mutación neutra.	(76, 77, 79, 80)
		GCG/ GCC	1434	478	Ala/Ala	Transversión. Mutación sinónima.	NR
<i>ahpC</i> 195 aa	Alquil hidroperóxido reductasa C	GTC/ GGC	77	26	Val/Gly (ambos no polares)	Transversión. Mutación neutra.	NR
		GAC/ CAC	217	73	Asp/His (ácido a básico)	Transversión. Cambio de sentido.	NR
<i>accD6</i> 474 aa	Acetil/propionil- CoA carboxilasa (subunidad β)	GAT/ GAC	600	200	Asp/Asp	Transición. Mutación sinónima.	NR
<i>efpA</i> 530 aa	Posible proteína eflujo integral de membrana	AAC/ AAA	639	213	Asn/Lys (de polar a básico)	Transversión. Cambio de sentido.	NR
<i>Rv1592c</i> 446 aa	Proteína hipotética	GAA/ GAG	963	321	Glu/Glu	Transición. Mutación sinónima.	NR
		ATT/ GTT	964	322	Ile/Val (ambos no polares)	Transición. Mutación neutra.	NR

NR: Mutación no reportada como responsable de resistencia



katG

Este gen codifica para la enzima catalasa-peroxidasa-peroxinitritasa T. En este gen se dieron dos mutaciones, una de ellas sinónima (aa 478), es decir, sin cambio de aminoácido, y la segunda mutación fue en el codón 315, con un cambio de serina por treonina (Figura 26):

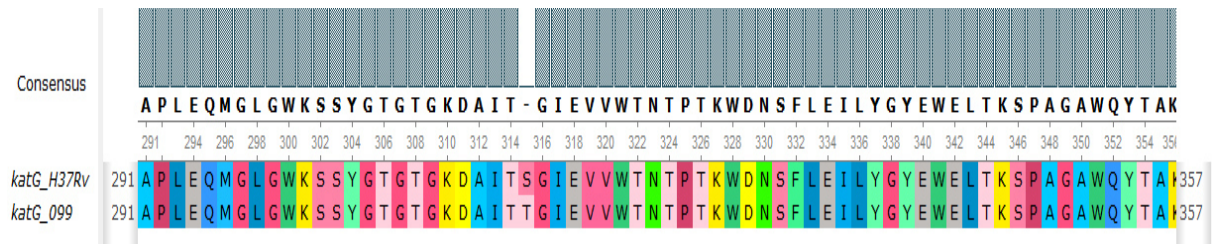


Figura 26.- Alineamiento de proteínas de *katG*, entre H37Rv y CIBIN-99-C1. Alineamiento realizado con el programa Clustal W. 099= CIBIN-99-C1. Los números representan el número de aminoácido.

También se realizó modelaje de proteínas (Figura 27). Aquí se observa la proteína dimérica, con la mutación en el aminoácido 315 en color rojo, y el ligando de la proteína en color verde. También se observa la estrecha relación y cercanía entre el aminoácido mutado y el ligando de la proteína.

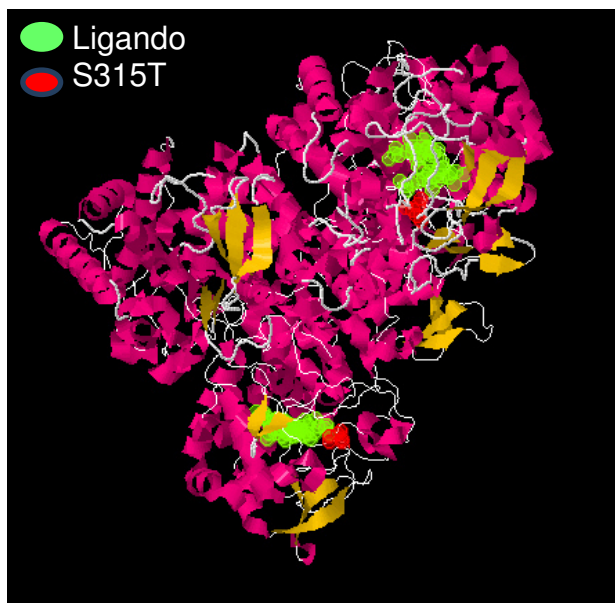


Figura 27.- Modelaje de la proteína *katG*. Proteína dimérica, con el ligando resaltado en color verde, y el aminoácido mutado en color rojo.

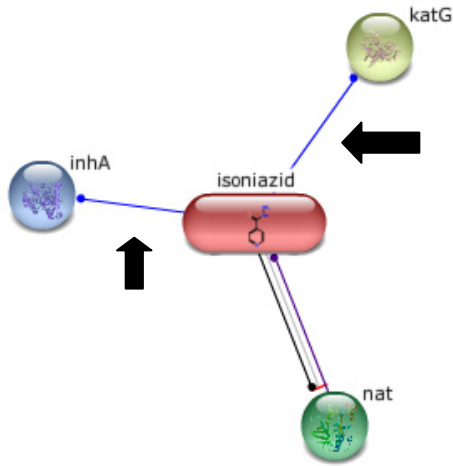


Figura 28.- Red de interacciones de la Isoniazida. El modelaje se realizó con el programa Stitch. En la imagen de la izquierda, las líneas en color azul muestran la unión entre dos proteínas, en color morado muestran la catálisis, en color negro la reacción, y en color rojo la inhibición. Obsérvese la unión de la isoniazida con *katG* y con *inhA* (señalada con una flecha negra). La tabla inferior muestra el puntaje de la asociación, el tipo de acción, y una breve descripción de cada proteína.

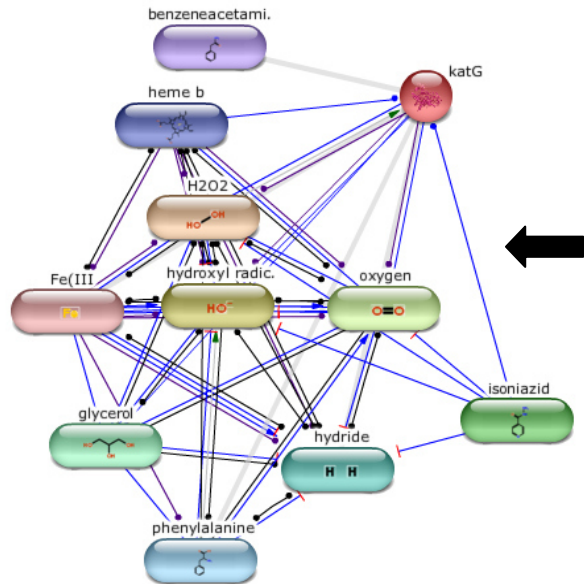
Your Input:

isoniazid Isoniazid (Laniazid, Nydrazid), also known as isonicotinyldiazine (INH), is an organic compound that is the first-line medication in prevention and treatment of tuberculosis. The compound was first synthesized in the early 20th century, but its activity against tuberculosis was first reported in the early 1950s, and three pharmaceutical companies attempted unsuccessfully to simultaneously patent the drug (the most prominent one being Roche, which launched its version, [http://www.rocheusa.com/about/history.html Rimifon], in 1952). (137.1 g/mol) (*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*)

Predicted Functional Partners:

Protein	Description	Activation	Inhibition	Binding	Phenotype	Catalysis	Post-transl. m	Reaction	Expression	Score
katG	catalase-peroxidase-peroxynitritase T KATG (740 aa)									0.910
nat	arylamine n-acetyltransferase nat (arylamine acetylase); Could have a role in acetylating, and [...]									0.900
inhA	enoyl-(acyl carrier protein) reductase (269 aa)									0.800

Figura 29.- Red de interacciones de *katG*. El modelaje se realizó con el programa Stitch. En la imagen de la derecha, las líneas en color azul muestran la unión entre dos proteínas, en color morado muestran la catálisis, y en color verde la activación. Obsérvese la unión de *katG* con las especies reactivas del oxígeno, y con la isoniazida (señalada con una flecha negra), y su activación con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La tabla inferior muestra el puntaje de la asociación, el tipo de acción, y una breve descripción de cada proteína.



Your Input:

katG catalase-peroxidase-peroxynitritase T KATG (740 aa) (*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*)

Predicted Functional Partners:

Protein	Description	Activation	Inhibition	Binding	Phenotype	Catalysis	Post-transl. m	Reaction	Expression	Score
H2O2	Hydrogen peroxide is the simplest peroxide (a compound with an oxygen-oxygen single bond). It [...]									0.955
hydroxyl radic.	hydroxyl radicals; Heavy water, formally called deuterium oxide or or D2O, is a form of water t [...]									0.955
oxygen	An element with atomic symbol o, atomic number 8, and atomic weight [15.99903; 15.99977]. it is [...]									0.940
isoniazid	Isoniazid (Laniazid, Nydrazid), also known as isonicotinyldiazine (INH), is an organic compou [...]									0.910
glycerol	Glycerol (or glycerine, glycerin) is a simple polyol (sugar alcohol) compound. It is a colorles [...]									0.900
hydride	In chemistry, a hydron is the general name for a cationic form of atomic hydrogen, represented [...]									0.900
phenylalanine	The synthetic dextro isomer of phenylalanine, an essential amino acid with anti-depressant and [...]									0.900
heme b	Heme B or haem B (also known as protoheme IX) is the most abundant heme, both hemoglobin and my [...]									0.900
benzeneacetami.	benzeneacetamide (135.2 g/mol)									0.900
Fe(III)	A metallic element found in certain minerals, in nearly all soils, and in mineral waters. It is [...]									0.900



En la Figura 28 (página 51), observamos la red de interacciones entre la isoniazida y algunas proteínas, por ejemplo, se observa la unión con *katG* y con *inhA*, y la inhibición, reacción y catálisis con *nat*. En la figura 29 (página 51) observamos la red de interacciones de *katG*, y sus funciones principales con relación a las especies reactivas de oxígeno.

En cuanto al análisis de exposición al solvente de los aminoácidos, al hacer la mutación en el codón 315, los aminoácidos 312, 314, 315 y 320 cambian su exposición de estar expuestos al solvente, a estar al interior de la proteína. En cuanto al análisis de predicción de estabilidad de la proteína, según el programa PopMusic (el cual se basa en estructura y requiere un templado de la proteína) esta mutación es desestabilizante, mientras que según Mupro (con y sin templado de proteína) esta mutación le confiere estabilidad a la proteína. Estos análisis son en base a cálculos, y sólo nos sugieren comportamientos, sin embargo habría que verificarlos experimentalmente.

ahpC

Este gen codifica para la subunidad C de la enzima Alquil hidroperóxido reductasa. En este gen se dieron dos mutaciones, una en el aminoácido 26 con cambio de valina por glicina y la segunda mutación fue en el codón 73, con un cambio de ácido aspártico por histidina, con cambio de sentido (figura 30, página 53).

También se realizó modelaje de proteínas (figura 31, página 53) (identificador PDB 2bmx). En la figura se observan las subunidades de la proteína en diferentes colores. En la figura 32 (página 53) observamos la red de interacciones de *ahpC*, y sus funciones principales con relación a las especies reactivas de oxígeno.

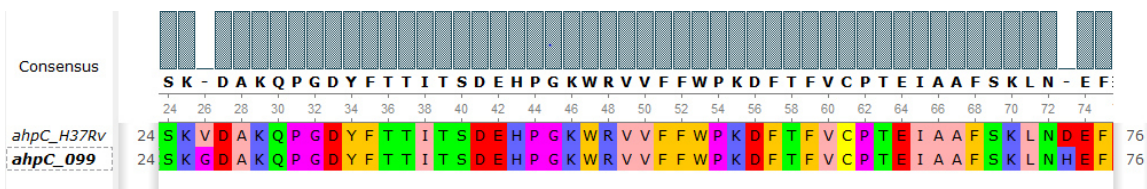


Figura 30.- Alineamiento de proteínas de ahpC, entre H37Rv y CIBIN-99-C1. Alineamiento realizado con el programa Clustal W. 099= CIBIN-99-C1. Los números representan el número de aminoácido.



Figura 31.- Modelaje de la proteína ahpC. Proteína multimérica. Subunidades de la proteína en diferentes colores.

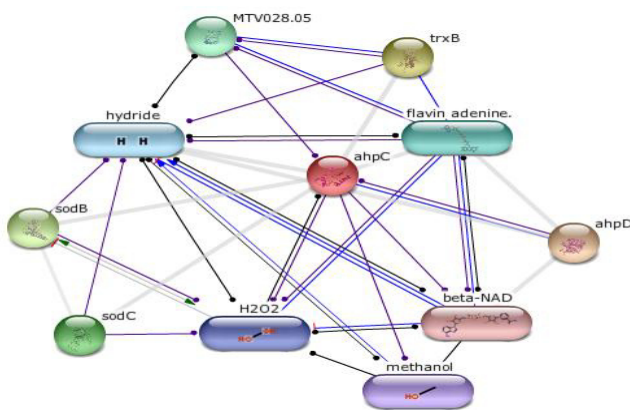


Figura 32.- Red de interacciones de ahpC. El modelaje se realizó con el programa Stitch. En la imagen de la izquierda, las líneas en color azul muestran la unión entre dos proteínas, en color morado muestran la catálisis, y en color negro la reacción. Obsérvese su catálisis de especies reactivas del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂); y su unión a la subunidad ahpD. La tabla inferior muestra el puntaje de la asociación, el tipo de acción, y una breve descripción de cada proteína.

Your Input:

- ahpC alkyl hydroperoxide reductase subunit C (195 aa) (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv)

Predicted Functional Partners:

Protein	Description	Score
ahpD	alkyl hydroperoxide reductase subunit D; Antioxidant protein with alkyl hydroperoxidase activit [...]	0.997
trxB	thioredoxin reductase TRXB2 (335 aa)	0.945
sodB	superoxide dismutase [Fe] SODA; Destroys radicals which are normally produced within the cells [...]	0.933
sodC	periplasmic superoxide dismutase [Cu-Zn] SodC; Destroys radicals which are normally produced wi [...]	0.929
MTV028.05	thioredoxin TrxC (TRX) (MPT46); Participates in various redox reactions through the reversible [...]	0.920
flavin adenine.	flavin adenine dinucleotide; In biochemistry, flavin adenine dinucleotide (FAD) is a redox cofa [...]	0.900
hydride	In chemistry, a hydron is the general name for a cationic form of atomic hydrogen, represented [...]	0.900
H2O2	Hydrogen peroxide is the simplest peroxide (a compound with an oxygen-oxygen single bond). It [...]	0.900
methanol	Methanol, also known as methyl alcohol, wood alcohol, wood naphtha or wood spirits, is a chemic [...]	0.900
beta-NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide, abbreviated NAD+, is a coenzyme found in all living cells. T [...]	0.900



En cuanto al análisis de exposición al solvente de los aminoácidos, al hacer la mutación en el codón 73 no se da cambio en la exposición. Al hacer la mutación en el aminoácido 26, éste no cambia su exposición al solvente (expuesto), pero el aminoácido 28 cambia su exposición de estar expuesto al solvente, a estar al interior de la proteína. En cuanto al análisis de predicción de estabilidad de la proteína, según el programa PopMusic (el cual se basa en estructura y requiere un templado de la proteína) ambas mutaciones son desestabilizantes, mientras que según Mupro (con y sin templado de proteína) estas mutaciones le confieren estabilidad a la proteína. Estos análisis son en base a cálculos, y sólo nos sugieren comportamientos, sin embargo habría que verificarlos experimentalmente.

accD6

Para *accD6* no hicimos análisis de proteína, pues la mutación en el codón 200 no confirió cambio de aminoácido.

efpA

Este gen codifica para una posible proteína de eflujo integral de membrana. En este gen hubo una mutación en el aminoácido 213 con cambio de asparagina por lisina (Figura 33, página 55). No se logró hacer modelaje de proteínas, pues no existe una proteína cristalizada con una buena homología. En la figura 34 (página 55) observamos la red de interacciones de *efpA*, sin embargo esta proteína permanece sin ser estudiada a detalle.

En cuanto al análisis de exposición al solvente de los aminoácidos, al hacer la mutación en el aminoácido 213, éste no cambia su exposición al solvente (al interior de la proteína), pero el aminoácido 216 cambia su exposición de estar al interior de la proteína, a estar expuesto al solvente.

En cuanto al análisis de predicción de estabilidad de la proteína, según el programa Mupro (sin templado de proteína) esta mutación le confiere estabilidad a la proteína.

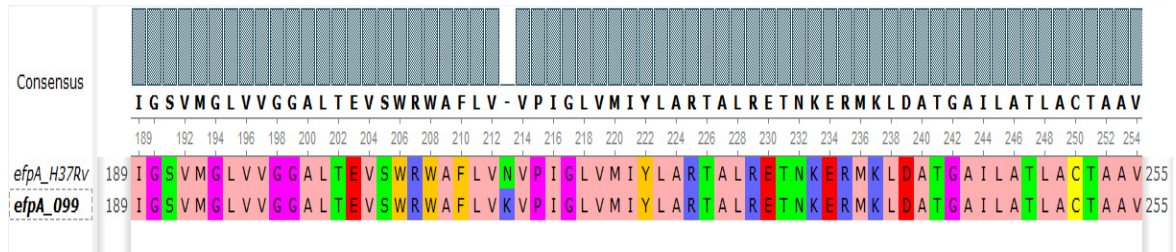


Figura 33.- Alineamiento de proteínas de *efpA*, entre H37Rv y CIBIN-99-C1. Alineamiento realizado con el programa Clustal W. 099= CIBIN-99-C1. Los números representan el número de aminoácido.

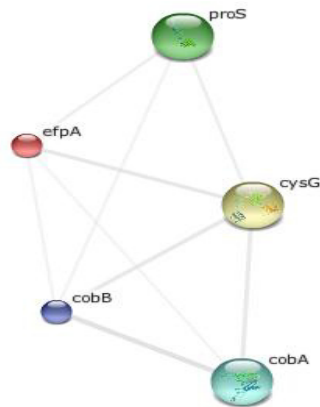


Figura 34.- Red de interacciones de *efpA*. El modelaje se realizó con el programa String. La tabla inferior muestra el puntaje de la asociación, el tipo de acción, y una breve descripción de cada proteína. Permanece mucha información sin conocer de esta proteína.

Your Input:

- efpA integral membrane efflux protein EfpA (530 aa) (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv)

Predicted Functional Partners:

	Activation	Inhibition	Binding	Phenotype	Catalysis	Post-transl. m	Reaction	Expression	Score
● cysG multifunctional uroporphyrinogen III methylase/precorrin-2 oxidase/ferrochelatase (405 aa)									0.774
● proS prolyl-tRNA synthetase; Catalyzes the attachment of proline to tRNA(Pro) in a two-step reaction [...]									0.602
● cobA cob(1)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase (207 aa)									0.423
● cobB cobyrinic acid a,c-diamide synthase; Responsible for the amidation of carboxylic groups at posi [...]									0.423

Rv1592c

Este gen codifica para una proteína hipotética, de la cual se desconoce su función. En este gen se identificaron 2 mutaciones seguidas, una en el aminoácido 321 con una mutación sinónima (sin cambio de aa), y la segunda mutación fue en el codón 322, con un cambio de isoleucina por valina (figura 35, página 56).

También se realizó modelaje de proteínas, con el modelo de homología 3guuB, pero con una pobre similitud del 29%, por lo que no es considerado confiable. En la figura 36(página 56) observamos la red de interacciones de *Rv1592c* (homólogo con *MT1628*), sin embargo, esta proteína también permanece sin ser estudiada a detalle.



En cuanto al análisis de exposición al solvente de los aminoácidos, al hacer la mutación en el aminoácido 322, éste no cambia su exposición al solvente (al interior de la proteína). En el análisis de predicción de estabilidad de la proteína, según el programa Mupro (sin templado de proteína) esta mutación le confiere estabilidad a la proteína.

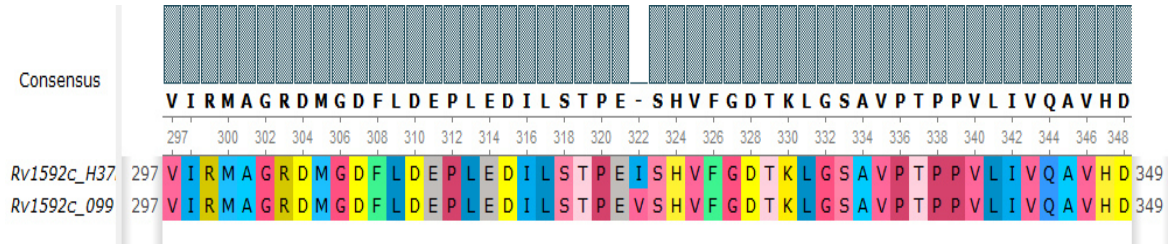


Figura 35.- Alineamiento de proteínas de *Rv1592c*, entre H37Rv y CIBIN-99-C1. Alineamiento realizado con el programa Clustal W. 099= CIBIN-99-C1. Los números representan el número de aminoácido.

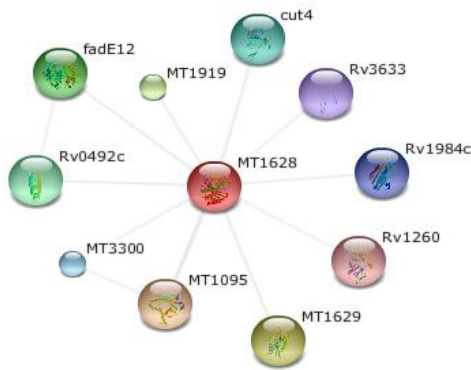


Figura 36.- Red de interacciones de *Rv1592c*. El modelaje se realizó con el programa String. La tabla inferior muestra el puntaje de la asociación, el tipo de acción, y una breve descripción de cada proteína. Permanece mucha información sin conocer de esta proteína.

Your Input:

● MT1628 hypothetical protein (446 aa)
(*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*)

Predicted Functional Partners:

	Activation	Inhibition	Binding	Phenotype	Catalysis	Post-transl. m	Reaction	Expression	Score
● MT1095 hypothetical protein (188 aa)									0.708
● MT1629 hypothetical protein (236 aa)									0.621
● MT1919 hypothetical protein (211 aa)									0.593
● fadE12 acyl-CoA dehydrogenase FADE12 (388 aa)									0.589
● Rv0492c oxidoreductase GMC-type (629 aa)									0.566
● cut4 cutinase precursor CUT4 (226 aa)									0.565
● MT3300 hypothetical protein (292 aa)									0.553
● Rv1984c cutinase precursor CFP21 (217 aa)									0.515
● Rv3633 hypothetical protein (291 aa)									0.460
● Rv1260 hypothetical protein (372 aa)									0.450



VIII.5.1.3. Rifampicina

Para rifampicina sólo fue un gen mutado, el *rpoB* (tabla 12). Este gen codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa. El cambio fue en el aminoácido 450 de serina por leucina (figura 37, página 58). Esta mutación ya ha sido reportada por otros autores como causante de resistencia a rifampicina.

Gen mutado	Acción/ efecto	Polimorfismo	Posición del nucleótido	Posición del codón	Aminoácido	Tipo de mutación	Reportado por:
<i>rpoB</i> 1172aa	subunidad β de la ARN polimerasa	TCG/ TTG	1349	450	Ser/Leu (polar a no polar)	Transición. Cambio de sentido.	(76, 81, 82)

También se realizó modelaje de proteínas (figura 38, página 58), usando como modelo de proteína por homología el 4llg.2.C, pero con una pobre similitud del 56.34%, pues la proteína de *M. tuberculosis*, o alguna que sea más parecida al modelo usado no ha sido cristalizada. En la figura 39 (página 58), observamos la red de interacciones entre la rifampicina y algunas proteínas, por ejemplo, se observa la inhibición a *rpoB*, y en la figura 40 (página 59) observamos la red de interacciones de *rpoB* con otras proteínas, por ejemplo con otras subunidades de la ARN polimerasa.

En cuanto al análisis de exposición al solvente de los aminoácidos, al hacer la mutación en el aminoácido 450, éste no cambia su exposición al solvente (al interior de la proteína), pero sí cambia el aminoácido 455 de estar expuesto, a estar al interior de la proteína.

Al analizar la estabilidad de la estructura de la proteína con la mutación in silico, observamos que esa mutación incrementa la estabilidad de la proteína.

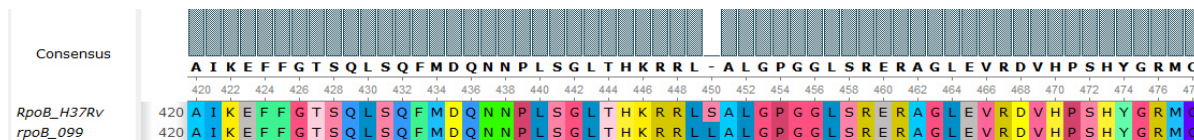


Figura 37.- Alineamiento de proteínas de *rpoB*, entre H37Rv y CIBIN-99-C1. Alineamiento realizado con el programa Clustal W. 099= CIBIN-99-C1. Los números representan el número de aminoácido.

Figura 38.- Modelaje de la proteína *rpoB*. La imagen de la derecha tiene una pobre similitud del 56.34% y está basada en el modelo de homología 4llg.2.C .

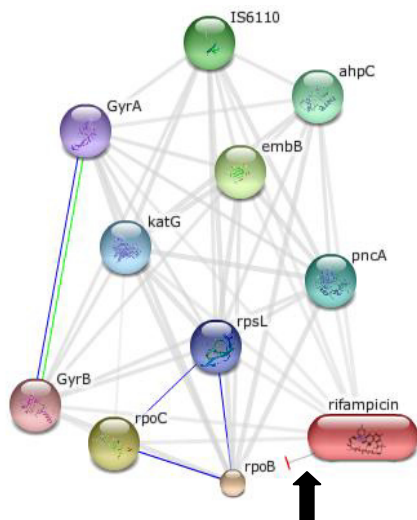


Figura 39.- Red de interacciones de la Rifampicina. El modelaje se realizó con el programa Stitch. En la imagen de la izquierda, las líneas en color azul muestran la unión entre dos proteínas, en color verde la activación, y en color rojo la inhibición. Obsérvese la inhibición de la rifampicina a *rpoB* (señalada con una flecha negra), y su activación con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La tabla inferior muestra el puntaje de la asociación, el tipo de acción, y una breve descripción de cada proteína.

Your Input:

■ rifampicin Rifampicin (INN) or rifampin (USAN) is a bactericidal antibiotic drug of the rifamycin group. It is a semisynthetic compound derived from "Amycolatopsis rifamycinica " (formerly known as "Amycolatopsis mediterranei" and "Streptomyces mediterranei"). (822.9 g/mol) (*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*)

Predicted Functional Partners:

		Activation	Inhibition	Binding	Phenotype	Catalysis	Post-transl. m	Reaction	Expression	Score
●	rpoB		●							0.946
●	rpoC									0.693
●	embB									0.657
●	IS6110									0.657
●	ahpC									0.657
●	pncA									0.657
●	katG									0.657
●	rpsL									0.657
●	GyrA									0.657
●	GyrB									0.647

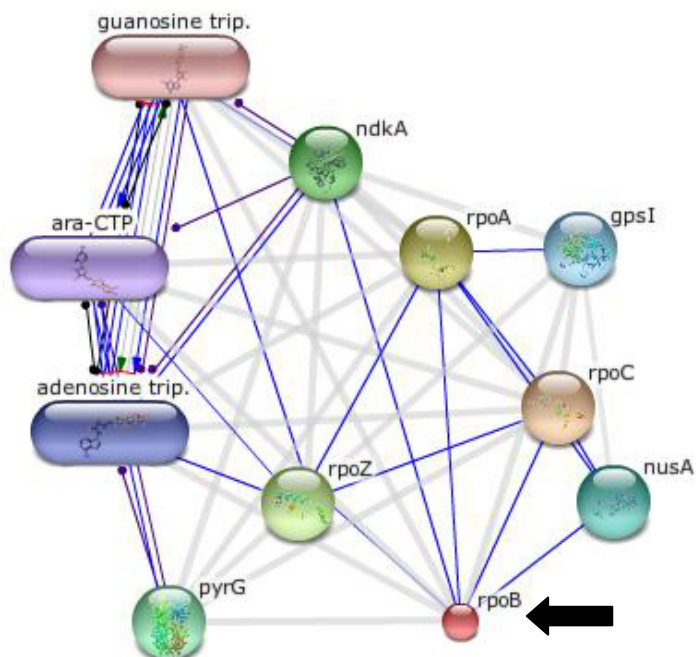


Figura 40.- Red de interacciones de *rpoB*. El modelaje se realizó con el programa Stitch. En la imagen de la izquierda, las líneas en color azul muestran la unión entre dos proteínas. Obsérvese la unión de *rpoB* (señalado con una flecha negra) con otras proteínas del ribosoma. La tabla inferior muestra el modo de acción de una proteína con otra, y el puntaje de la asociación, y una breve descripción de cada proteína.

Your Input:

- rpoB DNA-directed RNA polymerase subunit beta (1172 aa) (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv)

Predicted Functional Partners:

		Activation	Inhibition	Binding	Phenotype	Catalysis	Post-transl. m	Reaction	Expression	Score
●	rpoC									0.999
●	rpoA									0.998
●	rpoZ									0.987
●	ndkA									0.960
●	pyrG									0.960
●	nusA									0.944
●	gpsI									0.942
●	adenosine trip.									0.935
●	ara-CTP									0.935
●	guanosine trip.									0.935

VIII.5.1.4. Etambutol

Para etambutol encontramos 2 genes mutados en CIBIN-99-C1: *embB*, y *embC* (tabla 13, página 60). Ambos genes codifican para una proteína integral de membrana.

embB

Este gen codifica para la proteína indolil acetil inositol arabinosil transferasa. En este gen se dieron tres mutaciones, dos de ellas sinónimas (aa 965 y 1055), es decir, sin cambio de aminoácido, y la tercera mutación fue en el codón 306, con un cambio de metionina por isoleucina (Figura 41, página 61). Ésta mutación ya ha sido reportada por otros autores como causante de resistencia a etambutol.



Tabla 13.- Genes mutados relacionados con resistencia a E							
Gen mutado	Acción / efecto	Polimorfismo	Posición del nucleótido	Posición del codón	Aminoácido	Tipo de mutación	Reportado por
embB 1098 aa	Proteína integral de membrana, indolil acetil inositol arabinosil transferasa	ATG/ATA	918	306	Met/Ile (ambos no polares)	Transición. Mutación neutra.	(76, 83)
		CCG/CCA	2895	965	Pro/Pro	Transición. Mutación sinónima.	NR
		CGC/CGA	3165	1055	Arg/Arg	Transversión. Mutación sinónima.	NR
embC 1094 aa	Proteína integral de membrana, indolil acetil inositol arabinosil transferasa	Probable CA/--	2543 2544	848	Stop en aa 926	Delección. Corrimiento en el marco de lectura. Terminación prematura.	NR
		CGC/CGT	2781	927	Arg/Arg	Transición. Mutación sinónima.	NR
		GTG/CTG	2941	981	Val/Leu (ambos no polares)	Transversión. Mutación neutra.	NR

NR: Mutación no reportada como responsable de resistencia

También se realizó modelaje de la proteína (figura 42, página 61). Se observa la proteína en dos modelos, ambos con poca similitud (solamente del 30 al 40%), y en ninguno de los dos es la proteína completa, por lo que no fue posible realizar el modelaje.

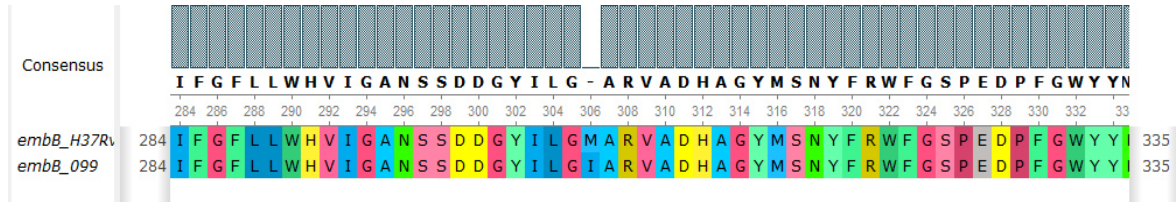


Figura 41.- Alineamiento de proteínas de *embB*, entre H37Rv y CIBIN-99-C1. Alineamiento realizado con el programa Clustal W. 099= CIBIN-99-C1. Los números representan el número de aminoácido.

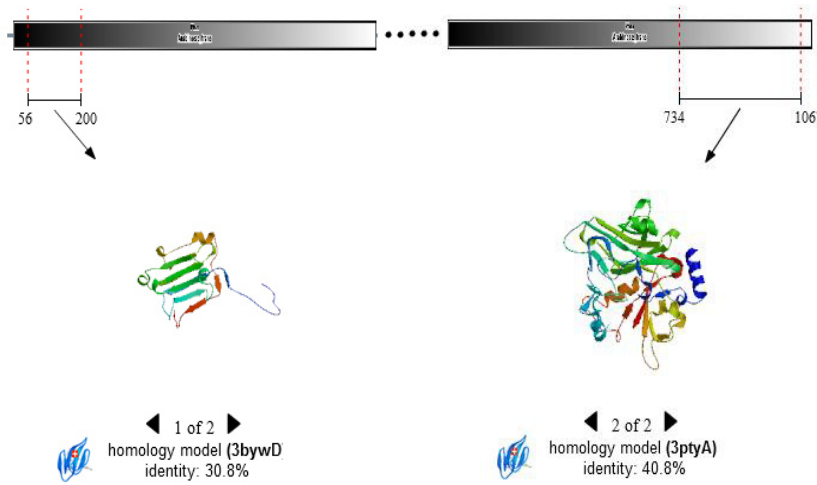


Figura 42.- Modelaje de la proteína *embB*. Las imágenes de la izquierda representan dos modelos de homología del aminoácido 56 al 200, y del 734 al 1067 con una pobre similitud del 30.8 y del 40.8% a los modelos de homología 3bywD y 3ptyA respectivamente.

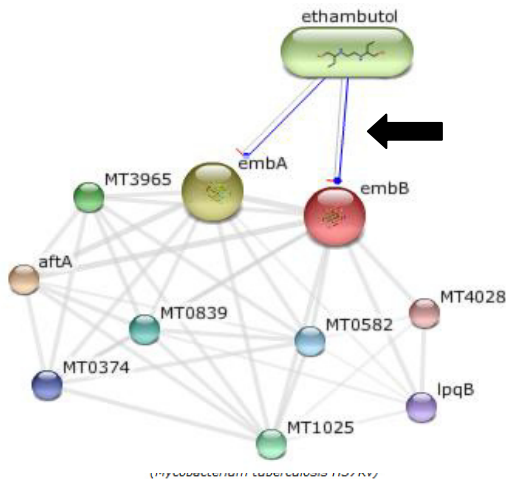


Figura 43.- Red de interacciones de *embB*. El modelaje se realizó con el programa Stitch. En la imagen de la izquierda, las líneas en color azul muestran la unión de dos proteínas o reactivos, y en color rojo la inhibición. Obsérvase la unión e inhibición de etambutol con *embA* y con *embB* (señalada con una flecha negra). La tabla inferior muestra el puntaje de la asociación, el tipo de acción, y una breve descripción de cada proteína.

Predicted Functional Partners:

Protein	Description	Score
aftA	transmembrane protein; Involved in cell wall arabinan biosynthesis. Catalyzes the addition of t [...] (643 aa)	0.939
embA	integral membrane indolylacetylinsitol arabinosyltransferase EMBA (arabinosylindolylacetylins [...] (1094 aa)	0.884
ethambutol	Ethambutol (commonly abbreviated EMB or simply E) is a bacteriostatic antimycobacterial drug pr [...] (204.3 g/mol)	0.800
MT3965	hypothetical protein (218 aa)	0.766
MT1025	transmembrane protein (358 aa)	0.766
MT0839	hypothetical protein (270 aa)	0.766
MT0582	transmembrane protein (171 aa)	0.765
MT0374	hypothetical protein (215 aa)	0.765
IpqB	lipoprotein LpqB (583 aa)	0.764
MT4028	hypothetical protein (802 aa)	0.763



En la figura 43 (página 61), observamos la red de interacciones de *embB*. Se muestra la interacción entre etambutol y algunas proteínas, por ejemplo, se observa la unión e inhibición a las subunidades *embA* y *embB* de la arabinosil transferasa.

En cuanto al análisis de exposición al solvente de los aminoácidos, no hubo cambio de la exposición de ninguno de los 10 aminoácidos más cercanos, al mutar el aminoácido 306 *in silico*.

En cuanto al análisis de predicción de estabilidad de la proteína, según el programa Mupro (sin templado de proteína) esta mutación le confiere estabilidad a la proteína.

embC

Este gen codifica para la proteína indolil acetil inositol arabinosil transferasa. En este gen se encontraron tres mutaciones (tabla 13, página 60): la primera un corrimiento en el marco de lectura causado por la delección de dos nucleótidos en las posiciones 2543 y 2544 (las cuales decidimos validar). Estas delecciones causarían un corrimiento en el marco de lectura y una terminación prematura de la proteína con un codón de paro en el aminoácido 926. Las otras dos mutaciones se explican más adelante.

Validación de los resultados de la secuenciación

Decidimos hacer validación de las delecciones en este gen, debido a que el resultado lo tomamos con reserva pues estaba después de 10 nucleótidos que no pudieron ser leídos, y aparecían como N's. Para validar la delección, diseñamos los *primers* descritos en la tabla14 (página 63). Con estos *primers* amplificamos una región que flanqueaba las delecciones de interés. Realizamos la amplificación mediante PCR, siguiendo las condiciones que aparecen en la tabla 15 (página 63) y posterior electroforesis capilar. Observamos que no existía tal delección (figura 44, página 64), ya que el producto de PCR amplificado de CIBIN-99-C1 migró a la misma distancia que el producto amplificado de H37Rv.



Tabla 14.- Diseño de primers para amplificar la región con delección en *embC*.

Primer	Secuencia
Fwd	AGCGAACCCGGCACCGAAG
Rvs	GTTGGTGGGCAGCCGGTAC

Tabla 15.- Condiciones de PCR para *embC*.

Desnat. inicial	94°C / 5'
Desnaturalización	94°C / 1'
Alineamiento	58.6°C / 45''
Extensión	72°C / 1'
Extensión final	72°C / 7'



Figura 44.- Electroforesis capilar de la amplificación de *embC*. En la primera y tercera fila se observan diferentes amplificadores de la cepa control H37Rv, y en la segunda fila se observa el amplificado de CIBIN-99-C1. En la cuarta fila es el control negativo de la PCR. Los picos en amarillo indican el marcador de peso molecular, y los picos en azul marino indican el amplificado de los productos de PCR. Los números en el eje horizontal indican la cantidad de nucleótidos. Obsérvese que no hay movimiento de cantidad de nucleótidos en el corrimiento electroforético, por lo que no existe la delección.

Las otras dos mutaciones fueron: una mutación sinónima en el aminoácido 927 y una mutación con cambio de valina por leucina en el aminoácido 981 (figura 45):

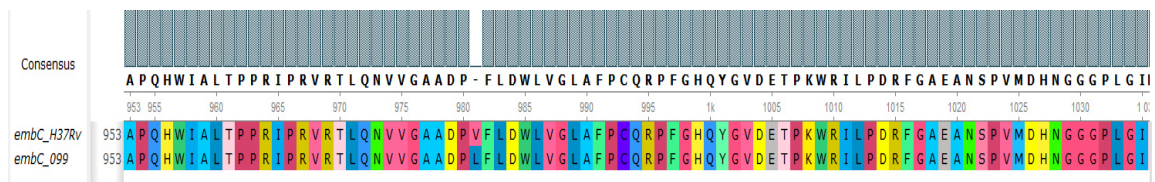


Figura 45.- Alineamiento de proteínas de *embC*, entre H37Rv y CIBIN-99-C1. Alineamiento realizado con el programa Clustal W. 099= CIBIN-99-C1. Los números representan el número de aminoácido.



Intentamos realizar un modelaje de proteínas (identificador PDB 3bywB y 3pty) pero la cobertura de la proteína era muy baja (del aminoácido 57 al 223 y del 719 al 1094 respectivamente). Además, aún no se cuenta con una proteína completa de *embC* cristalizada para realizar un análisis de difracción de rayos X. Por esas razones no obtuvimos el modelo de la proteína de interés. En la figura 46 (página 65) se observa la red de interacciones de *embC*, y la inhibición y unión por parte del etambutol.

En cuanto al análisis de exposición al solvente de los aminoácidos, no hubo cambio de la exposición de ninguno de los 10 aminoácidos más cercanos, al mutar el aminoácido 981 *in silico*. En el análisis de predicción de estabilidad de la proteína, según el programa Mupro (sin templado de proteína) esta mutación le confiere estabilidad a la proteína.

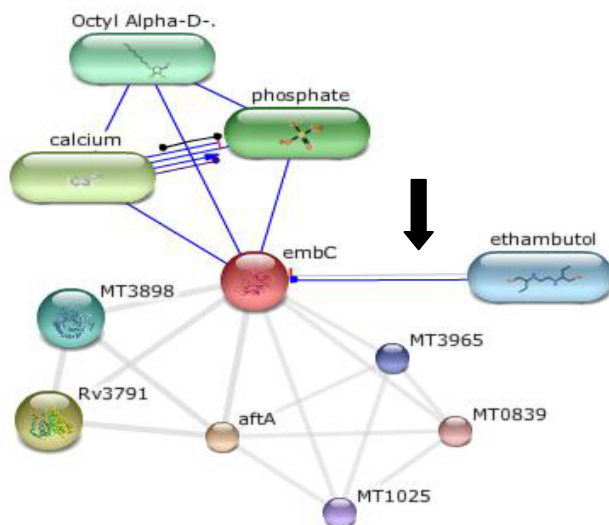


Figura 46.- Red de interacciones de *embC*. El modelaje se realizó con el programa Stitch. En la imagen de la izquierda, las líneas en color azul muestran la unión de dos proteínas o reactivos, y en color rojo la inhibición. Obsérvese la unión e inhibición de etambutol con *embC* (señalada con una flecha negra). La tabla inferior muestra el puntaje de la asociación, el tipo de acción, y una breve descripción de cada proteína.

Your Input:

- embC integral membrane indolylacetylinoitol arabinosyltransferase EmbC (arabinosylindolylacetylinoitol synthase); Arabinosyl transferase responsible for the polymerization of arabinose into the arabinan of arabinogalactan (1094 aa) (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv)

Predicted Functional Partners:

		Activation	Inhibition	Binding	Phenotype	Catalysis	Post-transl. m	Reaction	Expression	Score
aftA	transmembrane protein; Involved in cell wall arabinan biosynthesis. Catalyzes the addition of t [...] (643 aa)									0.979
Rv3791	short chain dehydrogenase (254 aa)									0.927
calcium	Calcium hydride is the chemical compound with the formula CaH2. This grey powder (white if pure [...] (40.1 g/mol)								•	0.900
phosphate	Phosphoric acid (also known as orthophosphoric acid or phosphoric(V) acid) is a mineral (inorga [...] (97.0 g/mol)								•	0.900
Octyl Alpha-D-	Octyl Alpha-D-Arabinofuranoside (262.3 g/mol)									0.900
MT3898	oxidoreductase (461 aa)									0.889
ethambutol	Ethambutol (commonly abbreviated EMB or simply E) is a bacteriostatic antimycobacterial drug pr [...] (204.3 g/mol)								•	0.800
MT3965	hypothetical protein (218 aa)									0.766
MT1025	transmembrane protein (358 aa)									0.766
MT0839	hypothetical protein (270 aa)									0.766



VIII.5.1.5.Pirazinamida

Para pirazinamida sólo se identificó un gen mutado, el *pncA* (tabla 16, página 66). Este gen codifica para la proteína pirazinamidasas/ nicotinamidasas. Encontramos una deleción de un nucleótido (453) que causa cambio en el marco de lectura y una terminación prematura de la proteína en el aminoácido 158. Hicimos una validación de este hallazgo.

Gen mutado	Acción/ efecto	Polimorfismo	Posición del nucleótido	Posición del codón	Aminoácido	Tipo de mutación	Reportado por:
<i>pncA</i> 187aa	Pirazinamidasas/ nicotinamidasas	G/-	453	151	Stop en aa 158	Deleción. Corrimiento en el marco de lectura. Terminación prematura.	NR

NR: No reportado hasta la fecha

Validación de los resultados de la secuenciación

Para validar la presencia de la deleción, diseñamos los iniciadores, cuya secuencia se muestra en la tabla17 (página 66). Estos iniciadores amplificaron una región que flanquea las deleciones que nosotros detectamos inicialmente. Realizamos la amplificación del gen de interés siguiendo las condiciones que aparecen en la tabla 15 (página 63). Estas condiciones son las mismas que las que usamos para amplificar *embC*. Realizamos una electroforesis capilar y con ello confirmamos la existencia de la deleción (figura 47, página 67), ya que el producto de PCR amplificado de CIBIN-99-C1 migró a diferente distancia (un nucleótido menos) que el producto amplificado de H37Rv.

Primer	Secuencia
Fwd	TCATTGTGTGCGCCAGACGG
Rvs	GTCAGGTCCACCAGCACCT

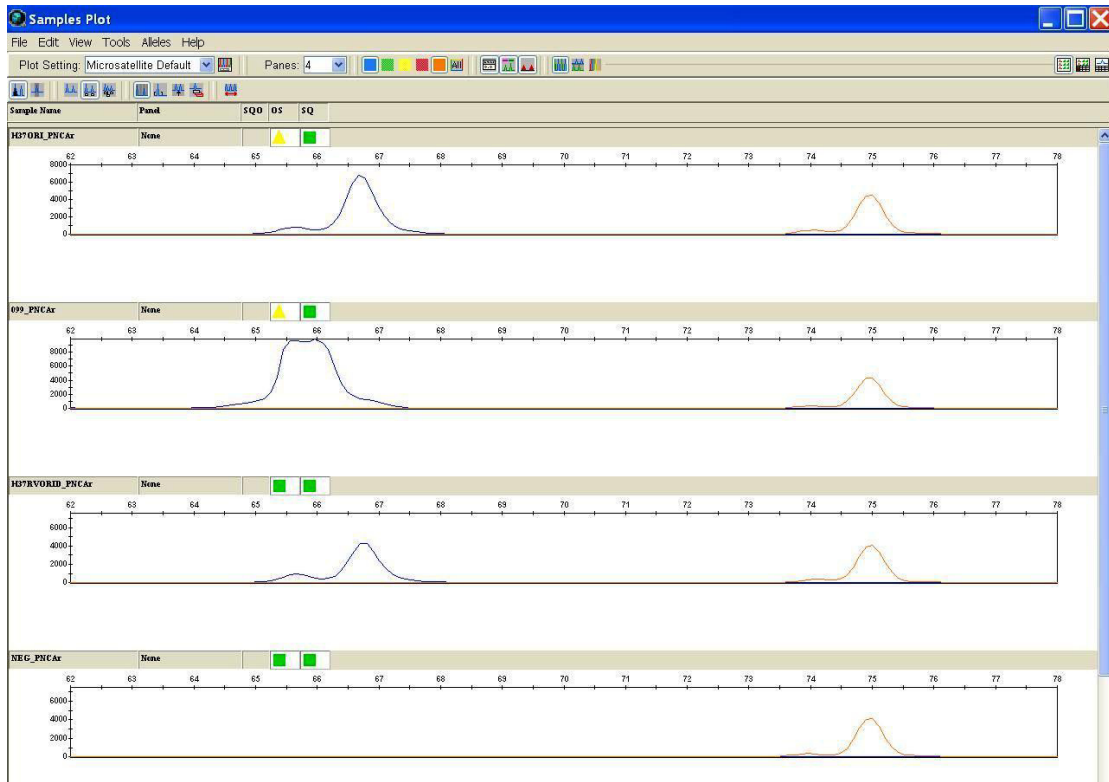


Figura 47.- Electroforesis capilar de la amplificación de *pncA*. En la primera y tercera fila se observan diferentes amplificados de la cepa control H37Rv, y en la segunda fila se observa el amplificado de CIBIN-99-C1. En la cuarta fila es el control negativo de la PCR. Los picos en amarillo indican el marcador de peso molecular, y los picos en azul marino indican el amplificado de los productos de PCR. Los números en el eje horizontal indican la cantidad de nucleótidos. Obsérvese que si hay movimiento de cantidad de nucleótidos (cambio de 67 a 66 nucleótidos) en el corrimiento electroforético, por lo que sí existe la delección.

Realizamos un alineamiento de proteínas de interés (figura 48, página 67), observando que hay un cambio de aminoácidos a partir del codón 152, y una proteína trunca después del aminoácido 158.

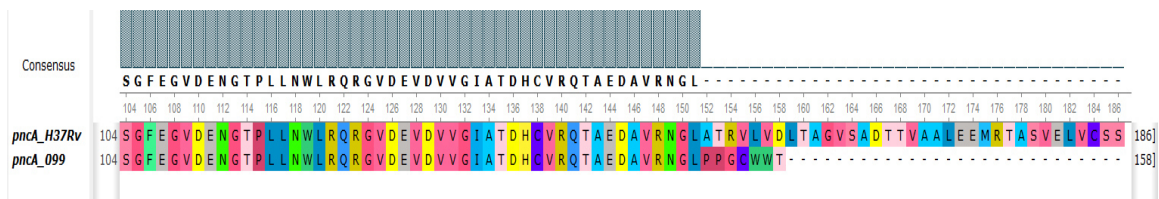


Figura 48. Alineamiento de proteínas de *pncA*, entre H37Rv y CIBIN-99-C1. Alineamiento realizado con el programa Clustal W. 099= CIBIN-99-C1. Los números representan el número de aminoácido.



También realizamos un modelaje de proteínas. En la figura 49 (página 68), se observa la enzima de H37Rv del lado izquierdo, y la de CIBIN-99-C1 en la parte central, vistas de distintos ángulos. Se observa en los recuadros rojos la parte que perdió la enzima de la clona fármaco-resistente. En la imagen de la derecha se observa que la parte que se perdió de la enzima está a partir del aminoácido 158 (estrella).

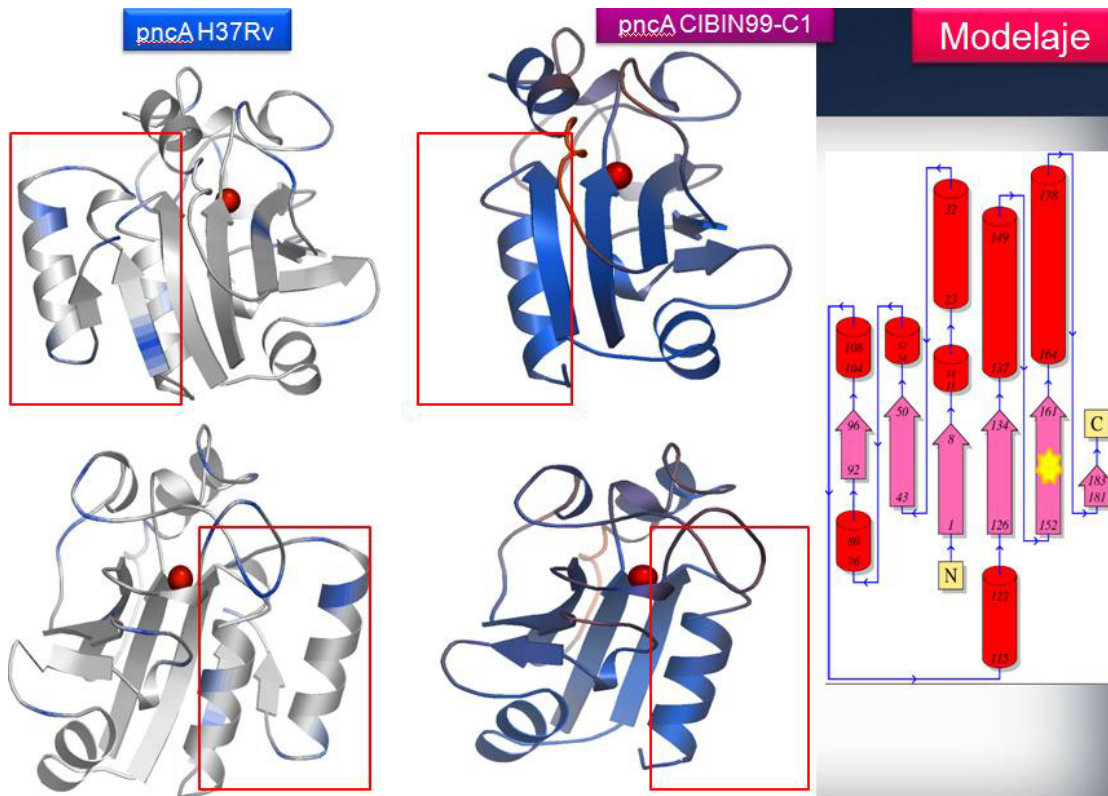


Figura 49.- Modelaje de la proteína *pncA*. En la imagen se observan 3 secciones, en las secciones izquierda y central está el modelaje de *pncA*. En la región izquierda se encuentra el modelaje de la enzima de H37Rv, vista desde diferentes ángulos, y la de CIBIN-99-C1 en la parte central. En los recuadros rojos aparece la parte de la enzima que perdió la cepa fármaco-resistente. En la región de la derecha se encuentra la estructura de la proteína, y se observa con una estrella en amarillo a partir de donde perdió la proteína.

En la figura 50 (página 69), se observa la red de interacciones de la pirazinamida. Se aprecia la interacción con *pncA*, ya que lo cataliza; y su unión e inhibición de la sintetasa de ácidos grasos (*fas*). En la figura 51 (página 69) aparece la red de interacciones de *pncA* con otras proteínas, por ejemplo la catálisis al ácido pirazinoico, de los radicales hidroxilos, del amonio, y la niacina.

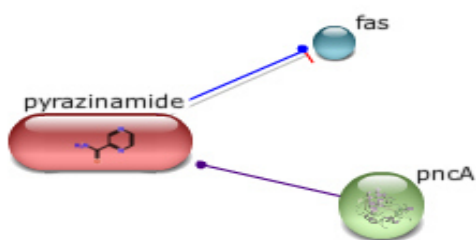


Figura 50.- Red de interacciones de la Pirazinamida. El modelaje se realizó con el programa Stitch. En la imagen de la izquierda, las líneas en color azul muestran la unión de dos proteínas o reactivos, en color morado la catálisis, y en color rojo la inhibición. Obsérvese su relación de catálisis con *pncA*. La tabla inferior muestra el puntaje de la asociación, el tipo de acción, y una breve descripción de cada proteína.

Your Input:

● pyrazinamide Pyrazinamide is a drug used to treat tuberculosis. The drug is largely bacteriostatic, but can be bacteriocidal on actively replicating tuberculosis bacteria. (123.1 g/mol) (*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*)

Predicted Functional Partners:

		Activation	Inhibition	Binding	Phenotype	Catalysis	Post-transl. m	Reaction	Expression	Score
● pncA	pyrazinamidase/nicotinamidas PNCA (PZase) (186 aa)					●				0.900
● fas	fatty acid synthase (3069 aa)		●							0.800

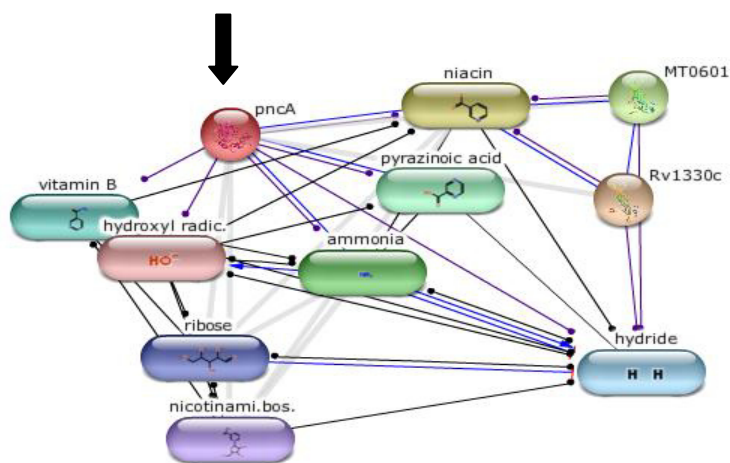


Figura 51.- Red de interacciones de *pncA*. El modelaje se realizó con el programa Stitch. En la imagen de la izquierda, las líneas en color azul muestran la unión de dos proteínas o reactivos, en color morado la catálisis, y en color rojo la inhibición. Obsérvese la catálisis de otras moléculas por esta enzima (señalada con una flecha negra). La tabla inferior muestra el puntaje de la asociación, el

tipo de acción, y una breve descripción de cada proteína.

Your Input:

● pncA pyrazinamidase/nicotinamidas PNCA (PZase) (186 aa) (*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*)

Predicted Functional Partners:

		Activation	Inhibition	Binding	Phenotype	Catalysis	Post-transl. m	Reaction	Expression	Score
● Rv1330c	nicotinate phosphoribosyltransferase; Catalyzes the conversion of nicotinic acid (NA) to NA mon [...] (448 aa)					●				0.963
● niacin	Niacin (also known as vitamin B3, nicotinic acid, or less commonly vitamin PP; archaic terms in [...] (122.1 g/mol)					●				0.944
● MT0601	nicotinate phosphoribosyltransferase (463 aa)					●				0.944
● ammonia	Ammonia or azane is a compound of nitrogen and hydrogen with the formula NH3. It is a colourles [...] (17.0 g/mol)					●				0.940
● pyrazinoic acid	Pyrazinoic acid is a pyrazinamide metabolite. (124.1 g/mol)					●				0.940
● vitamin B	Nicotinamide, also known as niacinamide and nicotinic acid amide, is the amide of nicotinic aci [...] (122.1 g/mol)					●				0.937
● hydride	In chemistry, a hydron is the general name for a cationic form of atomic hydrogen, represented [...] (2.0 g/mol)					●				0.900
● ribose	Lyxose is an aldopentose mdash; a monosaccharide containing five carbon atoms, and including a [...] (150.1 g/mol)					●				0.900
● nicotinami.bos.	nicotinamide riboside (255.2 g/mol)					●				0.900
● hydroxyl radic.	hydroxyl radicals; Heavy water, formally called deuterium oxide or or D2O, is a form of water t [...] (17.0 g/mol)					●				0.900



IX. DISCUSIÓN

El rápido desarrollo de las tecnologías de nueva generación, como la secuenciación de ácidos nucleicos, ha permitido revolucionar la manera de estudiar a las bacterias. Se ha secuenciado el genoma de diversos aislados de MTB, desde que se realizó la secuenciación de la cepa de referencia MTB H37Rv; que fue la primera (19). En este trabajo secuenciamos el genoma completo de CIBIN-99-C1, una clona aislada de CIBIN-99, una cepa resistente a la mezcla de los cinco fármacos de primera línea—SIREP—.

Secuenciar esta cepa fue de suma importancia, ya que se están haciendo diferentes estudios con ella, en varios países del mundo (algunos trabajos reportan a CIBIN-99 como “cepa Monterrey”)(53, 54) tanto de virulencia en animales, como de nuevos extractos naturales contra la tuberculosis(48-52); además, se conoce su proteoma en presencia de cuatro de los cinco fármacos de primera línea (SIRE)(55), y su expresión génica(56), sin embargo, hasta ahora, no se conocían las secuencias de los genes responsables de resistencia a SIREP.

Para obtener una población homogénea de H37Rv y CIBIN-99, fue necesario aislar clonas de cada cepa y así disminuir la variabilidad en el estudio. Una vez aisladas las clonas, elegimos las clonas cuyo fenotipo fuera el más parecido a las cepas progenitoras para secuenciar su ADN completo.

Los resultados de tinción por Ziehl-Neelsen, morfología de colonias, y RFLP fueron los esperados, tanto en las cepas progenitoras, como en las clonas. A pesar de que la velocidad de crecimiento y la densidad máxima alcanzadas por las clonas de CIBIN-99 fueron diferentes a la cepa progenitora, la clona que elegimos para secuenciar su ADN total fue sólo ligeramente diferente a la velocidad y densidad máximas mostradas por la cepa progenitora. Por esta razón, nosotros consideramos que dichas clonas eran representativas de la mayor parte de la población de las cepas progenitoras y, por analogía, consideramos que nuestros hallazgos en las clonas son aplicables a las cepas. La heterogeneidad fenotípica y genotípica de las cepas es un fenómeno universal. Nuestros hallazgos son congruentes con lo ya reportado por otros autores (ver p.e. Andreu y Gibert)(43), quienes hicieron un análisis sistemático de clonas individuales aisladas de MTB H37Rv subcultivada, y de un stock sin cultivar. Ellos estudiaron dos indicadores de virulencia: tinción con rojo neutro, y contenido de pthiocerol dimicocerosatos (PDIMs); y encontraron que H37Rv estaba compuesta por



una población mixta conteniendo células *wild-type*, así como mutantes a rojo neutro y PDIMs. De hecho, la población del stock original ya era una población heterogénea. Nosotros observamos una menor heterogeneidad en H37Rv que en CIBIN-99, siendo la primera una cepa ampliamente estable, ya que ésta se aisló por primera vez hace más de 100 años (44) y continúa siendo virulenta para ratones BALBc (84) y otros animales de laboratorio. En las clonas de H37Rv, sólo la clona 5 tuvo un crecimiento claramente diferente a la cepa progenitora.

Salvo la clona 5 de CIBIN-99 (susceptible a pirazinamida), todas las demás clonas mostraron un perfil de susceptibilidad o resistencia idéntico a sus respectivas cepas progenitoras, respecto a todos los medicamentos anti-TB evaluados. Por ahora, no conocemos la razón de la diferencia en susceptibilidad a pirazinamida de la clona 5 de CIBIN-99 con respecto a las otras clonas y la cepa progenitora. Para conocer la razón, podríamos seguir diferentes estrategias: Por ejemplo, estudiar el gen de *pncA* (codificante de la enzima pirazinamidasa) y sus mutaciones, ya que, si *pncA* de CIBIN-99-C1 contiene una delección, en la clona 5 de CIBIN-99 podría haber existido una reversión de la delección, que regresara el marco de lectura, pero esto no se conocerá hasta que se realicen experimentos fehacientes.

Aunque en las clonas 4 y 6 de H37Rv no cambió el perfil de susceptibilidad con respecto a la cepa progenitora, sí cambió la CMI para isoniazida y rifampicina, ya que en la cepa original la CMI era de 0.06 µg/mL para ambos fármacos, mientras que en las clonas 4 y 6 de H37Rv la MIC de isoniazida y rifampicina fue 0.12 µg/mL.

IX.1. Resistencia a fármacos

Entre los objetivos de este trabajo, estaba contemplada la búsqueda de plásmidos. El único reporte de plásmidos en MTB, fue el realizado por Katti en el 2001 (41); sin embargo, en este estudio sólo se describió su presencia en MTB, pero no se demostró que ese plásmido tuviera alguna función en fármacorresistencia. Por el contrario, Katti (41) menciona que la presencia de plásmidos en MTB no puede ser atribuida a virulencia, ni a fármacorresistencia, porque observó que todas las especies de micobacterias que analizó contenían plásmidos. Aun así, *la ausencia de evidencia no es evidencia de ausencia*, y el papel que puedan tener los plásmidos en la resistencia de las micobacterias hacia los fármacos, hasta ahora, no ha sido estudiado exhaustivamente. En el presente trabajo, nosotros identificamos un sólo origen de replicación en el ADN total. Lo cual sugiere fuertemente que dicho origen de



replicación corresponde exclusivamente al del ADN cromosomal, ya que la definición de plásmido es ADN extra-cromosomal con capacidad de replicación independiente. Consecuentemente, la resistencia de la clona usada en el presente estudio no se debe a plásmidos, sino a mutaciones en el genoma de CIBIN-99. Es muy interesante el hecho de que todas las especies de micobacterias estudiadas por Katii (41) contenían plásmidos, incluyendo a MTB; y sin embargo no hay reportes de plásmidos en aislados clínicos de MTB. Nosotros proponemos la hipótesis de que ese fenómeno se debe a que, al ser MTB una bacteria que se trasmite encerrada en gotitas de Flügge(2) e inmediatamente invade a su huésped y las células del huésped (neumocitos y macrófagos, principalmente(16)), MTB no intercambia plásmidos con otras bacterias porque esta especie tiene escasas o nulas oportunidades de hacerlo, pero no carece de esa capacidad.

En este trabajo, seleccionamos 55 genes para analizar su contribución en la fármacorresistencia de CIBIN-99-C1. De éstos, identificamos 19 genes mutados en CIBIN-99-C1, 10 de ellos relacionados a resistencia de MTB a estreptomycin, isonizida, rifampicina, etambutol o pirazinamida, además de ocho de los 19 genes asociados a fármaco-resistencia, pero no analizados a profundidad, y un gen relacionado a resistencia a fármacos de segunda línea. De éstos 19, analizamos 10 genes que eran los relacionados a resistencia de primera línea. Cuatro de estos 10 genes (*rpsL*, *katG*, *rpoB* y *embB*) tenían las mismas mutaciones que se han reportado como responsables de resistencia a estreptomycin, isoniazida, rifampicina y etambutol, respectivamente (75-83, 85). Más adelante, analizamos los otros seis genes de este grupo.

La base de datos TBDREAM (65) que nosotros utilizamos para analizar el genoma de CIBIN-99-C1 fue crucial para identificar mutaciones significativas para la fármacorresistencia de nuestra clona; sin embargo, aún pueden existir genes mutados, asociados a resistencia sin identificar. Esto, es debido a los criterios con los que se está construyendo TBDREAM. Los criterios de inclusión para los genes de esta base de datos son los siguientes: 1) deben haber sido estudios realizados en aislados clínicos de MTB; 2) debe haber sido un tamaño de muestra grande, en cuanto al número de aislados clínicos de MTB fármacorresistentes. Los números mínimos aceptables de aislados secuenciados son los siguientes: para estreptomycin, 36, para isoniazida o rifampicina, 100; para etambutol, 50 y para pirazinamida, 33 aislados. Además, se debe cumplir con los siguientes requisitos: i) realizar los reportes



basándose en las pruebas de susceptibilidad a fármacos; ii) usar métodos validados para identificación de mutaciones asociadas a fármaco-resistencia; iii) identificar la posición del nucleótido y el cambio del nucleótido, y iv) especificar el número de aislados susceptibles y resistentes que contienen esa mutación. Entonces, los resultados de estudios realizados con una menor cantidad de aislados, como el de Ramaswamy y Cols.(76) no se incorporan a TBDREAM; sin importar que la mutación esté en una alta proporción, como la mutación en el aa 450 para *rpoB*(75).

IX.1.1. Resistencia a estreptomycin

Las mutaciones en dos genes, *rrs* y *rpsL*, son responsables de la mayoría de los casos de resistencia a estreptomycin(25). Las mutaciones en *rpsL* causan el 50% de los casos de resistencia a estreptomycin(75). La mutación en el nucleótido 43 de *rpsL* resulta en un cambio de arginina por lisina, que altera la diana de la estreptomycin(86). Esta mutación es la más común en *rpsL*, y causa un alto nivel de resistencia a estreptomycin(86-88).

En un estudio que realizaron Cuevas-Córdoba y Cols. en Orizaba, Veracruz, México (78), se identificaron mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs* en 91 aislados de MTB resistentes a estreptomycin. La mutación K43R en *rpsL*—la misma que nosotros encontramos en CIBIN-99-C1—fue la más frecuente entre las mutaciones de *rpsL* causantes de resistencia. Esta mutación fue encontrada en 12 aislados (13% de las cepas).

IX.1.2. Resistencia a isoniazida

El mecanismo de resistencia de MTB a isoniazida es más complejo; involucra una mayor cantidad de genes mutados. Sin embargo, las mutaciones en *katG* e *inhA* son las causas más frecuentes de resistencia a isoniazida. *katG* codifica para una catalasa-peroxidasa que activa a la isoniazida. Isoniazida es un pro-fármaco que al ser activado por KatG genera radicales reactivos. Por otro lado, *inhA* es la diana de la isoniazida activada. La mutación de *katG* S315T es causa de la mayor frecuencia de resistencia a isoniazida(85, 89). Esta mutación se ha encontrado en el 50-95% de las cepas resistentes a isoniazida y nosotros la detectamos en este estudio.

Zhao y Cols.(90) reportaron que la mutación S315T en *katG* disminuye el canal de acceso de substratos con diámetros de 6Å a 4.7Å; lo cual dificulta el acceso al substrato de la catalasa-peroxidasa.



Las mutaciones en el gen *ahpC*, que codifica para la alquil hidroperóxido reductasa, pueden compensar la pérdida o la disminución en la función de la catalasa, y estas mutaciones han sido propuestas como indicadoras de resistencia (91). Se encontraron dos mutaciones en el gen *ahpC*: V26G y D73H, esta segunda fue reportada por Hazbón y Cols. en el 2006 (85), tanto en cepas susceptibles, como en resistentes, por lo que esta mutación es poco probable que cause resistencia. Sobre la primera mutación no se han encontrado reportes.

Nosotros encontramos cinco mutaciones sinónimas en diferentes genes (una en *katG*, una en *Rv1592c*, dos en *embB* y una en *embC*) y una en el codón 200 del gen *accD6*. Ramaswamy y Cols.(92)reportaron la misma mutación en *accD6*. Como las mutaciones sinónimas no resultan en cambio de aminoácidos, es poco probable que este tipo de mutaciones participe en el mecanismo de fármacorresistencia. Sin embargo, esta posibilidad no puede descartarse del todo, debido a la preferencia de usanza de codones que tienen todas las especies vivientes(93-95); y si el tARN que reconoce un triplete determinado no está presente con suficiente abundancia en MTB, aunque sea una mutación sinónima, la síntesis de ciertas enzimas podría ser deficiente y resultar en fármacorresistencia.

Encontramos en el gen *efpA* de CIBIN-99-C1, que codifica para una bomba de eflujo (96), una mutación no sinónima, que resulta en un cambio de asparagina por lisina en el codón 213. Hasta el momento no hemos encontrado reportes sobre esta mutación. Lo que se sabe sobre mutaciones de bombas de eflujo es que el producto proteico de *efpA* está altamente conservado en cepas de MTB fármaco-susceptibles o MFR(96). Rodrigues y Cols.(97)cuantificaron la expresión génica de bombas de eflujo por Rt-qPCR, y encontraron que cepas con resistencia inducida a isoniazida presentaban una sobreexpresión en los genes de bombas de eflujo, como *efpA*. Contrario a esto, Li y Cols.(98) construyeron mutantes de *M. smegmatis*, con el homólogo de *efpA* deletado por un corrimiento en el marco de lectura. La delección de este homólogo incrementó la susceptibilidad a fluoroquinolonas, bromuro de etidio y acriflavina; e inesperadamente, una menor susceptibilidad a rifamicinas, isoniazida, y cloranfenicol. Con respecto a la mutación que nosotros encontramos, se requiere hacer estudios específicos sobre el eflujo de fluoroquinolonas e isoniazida para saber cómo influye dicha mutación en la fármacorresistencia de CIBIN-99.



Identificamos en el gen *Rv1592c* una mutación sinónima y una no sinónima, en los codones 321 y 322, respectivamente; sin embargo, Ramaswamy y Cols.(92) propusieron que estas mutaciones son muy antiguas y que se han conservado durante la evolución del complejo *M. tuberculosis*. Ellos sugieren que dichas mutaciones pueden ser útiles para clasificar a las cepas de MTB en los grupos 1 o 2. Por ahora, la clasificación de cepas de MTB en los grupos 1 o 2 se basa en polimorfismos de los genes *gyrA* y en *katG*. Por otro lado, es poco probable que las mutaciones en *Rv1592c* que nosotros encontramos en CIBIN-99-C1 sean causa de resistencia.

IX.1.3. Resistencia a rifampicina

Las mutaciones en la región del gen *rpoB*, llamada RRDR por sus siglas en inglés (*RIF-resistance-determining región*) contiene 81 pb. Esta región codifica para la secuencia de aminoácidos 507-533, según la numeración asignada a *E. coli*. Las mutaciones de esta región en el gen *rpoB* son responsables de resistencia a rifampicina en el 97% de las cepas (40, 99). Las mutaciones en el aminoácido H526P/D/Y y S531L afectan al 60-86% de las cepas resistentes a rifampicina(100). La mutación que nosotros encontramos en el gen *rpoB* fue en el triplete correspondiente al aminoácido 450. Ioerger y Cols.(101) aclararon que esta mutación es la equivalente a la mutación en el aminoácido 531, considerando la numeración convencional asignada a *E. coli*.

Nosotros hicimos una búsqueda de la mutación S450L del gen *rpoB* en las bases de datos, y sólo encontramos cinco artículos donde se reportó esta mutación(40, 76, 81, 82, 101)la cual corresponde a un cambio en el aminoácido que ocupa la posición 450 de la subunidad β de la ARN polimerasa. Es importante aclarar que la mutación S450L se refiere a la posición de la mutación en MTB y que en *E. coli* esta misma mutación corresponde a la posición 531.

IX.1.4. Resistencia a etambutol

El etambutol es un agente bacteriostático que interrumpe la síntesis de arabinogalactano de la pared celular porque inhibe a la arabinosil transferasa, codificada por los genes *emb A,B* y *C*. El mecanismo más común de resistencia a etambutol es la sobre-expresión, o la alteración estructural de las proteínas Emb; particularmente EmbB. La mutación específica en el codón 306 de *embB* ha sido implicada en la resistencia a etambutol(102), de hecho Telenti y Cols.(27) mencionan que esta mutación es la causante del 47-62% de las cepas resistentes y que confiere



una alta resistencia. La mutación en la posición 306 normalmente cambia de M a L/V o I. Plinke y Cols. en el 2006 (103) encontraron estas mutaciones en el 68% de sus aislamientos de MTB, y sólo en cepas resistentes. Nosotros encontramos la mutación M306I en CIBIN-99-C1; sin embargo, a diferencia de lo que mencionan Telenti y Cols., el nivel de resistencia en nuestra clona fue bajo. Nuestros hallazgos son congruentes con los de Sreevatsan y Cols.(83), quienes mencionan que los cambios de M306 por L o V generalmente confieren mayores valores de CMI que M306I.

Por otro lado, nosotros encontramos la mutación V981L en el gen *embC* de CIBIN-99-C1. Esta mutación fue reportada previamente por Sreevatsan y Cols.(83). En 2010, Plinke y Cols.(104) la mencionaron como un marcador filogenético de cepas Haarlem, más que de resistencia a fármacos.

IX.1.5. Resistencia a pirazinamida

Las mutaciones en *pncA* son la principal causa de resistencia a pirazinamida. Se ha encontrado este gen como responsable de resistencia a pirazinamida en el 72-97% de los casos (21). Estas mutaciones son muy variables, y se han encontrado distribuidas en todo el gen, siendo reportadas hasta 120 posibles mutaciones causantes de resistencia (105). Las mutaciones encontradas son las siguientes: sustituciones de un solo nucleótido. Éstas son las más comunes; le siguen mutaciones múltiples, inserciones y deleciones (106).

En cuanto a la resistencia a pirazinamida en CIBIN-99-C1, nosotros encontramos una deleción en el nucleótido 453 del gen *pncA*, con corrimiento de marco de lectura; lo cual causa una terminación prematura en la proteína. No se han encontrado reportes de esta deleción. Si la deleción fue antes en la proteína, hay mayor probabilidad de causar un cambio. Se han reportado por otros autores otras siete inserciones o deleciones después del nucleótido 453 como causantes de resistencia a pirazinamida. Éstas son: inserción de una T en el nucleótido 465 (107), deleción de una C en el nucleótido 475 (108), inserción de un tetranucleótido de TGAC en la posición 480 (107), inserción de un dinucleótido CG en la posición 501 (109), deleción de C en el nucleótido 512 (110), inserción de 5 nucleótidos en la posición 518 (108), e inserción de C en el nucleótido 532(107).

IX.2. Propuesta de un mecanismo integrado de mutaciones significativas en CIBIN-99



En un estudio realizado con 37 cepas MDR de Monterrey, México, Ramaswamy y Cols. en 2004 reportaron las mutaciones asociadas a resistencia. Las más frecuentes fueron las siguientes: para estreptomycinina Lys43Arg en el gen *rpsL* (24%), para isoniazida Ser315Thr en el gen *katG* (67.6%), para rifampicina, la mutación Ser450Leu en *rpoB* (41.7%), y para etambutol, las mutaciones Met306Ile/Val/Leu en *embB* (66.7%). Ellos no estudiaron la resistencia a pirazinamida(76).

Estas mismas mutaciones que encontraron en mayor proporción en diferentes cepas, son las mutaciones que identificamos “juntas” en la cepa CIBIN-99-C1. Estos resultados son muy interesantes, ya que existen muchas otras mutaciones que confieren resistencia a fármacos, y el hecho de que coincidan las mutaciones de mayor proporción de los aislados clínicos de Monterrey con las de CIBIN-99 sugieren fuertemente que existe una relación estrecha entre las cepas estudiadas por Ramaswamy y Cols. (76) y CIBIN-99. Podría tratarse de una microepidemia como la que nosotros encontramos en un estudio previo(111).

En este estudio de Ramaswamy y Cols. (76), no hubo cepas en específico que tuvieran exactamente las mismas mutaciones que CIBIN-99-C1. La cepa más parecida en las mutaciones de CIBIN-99-C1 fue el aislado 730, que tenía las mismas mutaciones en *katG*, *rpsL* y *rpoB*, además, esta cepa (al igual que CIBIN-99-C1) era wild type en *inhA* y *rrs*. La diferencia entre las mutaciones de la cepa CIBIN-99-C1 y el aislado 730 radicaba en el gen *embB*, ya que aunque era el mismo cambio de aminoácido (Metionina por Isoleucina), el nucleótido que cambiaba en el codón 306 no fue de ATG a ATA, sino a ATC en ese aislado.

Además, en el mismo estudio de Ramaswamy, los aislados 616, 943 y 1227 tenían las mismas mutaciones que CIBIN-99-C1 para *katG*, *embB* y *rpoB*; y eran wild-type en *inhA* y *rrs*; pero en el gen *rpsL* estas cepas no tenían mutaciones (eran wild-type).

Para proponer un mecanismo integral de resistencia a SIREP de CIBIN-99, decidimos hacer diferentes estudios de las proteínas cuyos genes mutados detectamos en el presente estudio. El análisis consistió en determinar *in silico* el cambio en la estructura primaria, secundaria o terciaria que implica cada una de las mutaciones que nosotros detectamos en CIBIN-99-C1. Además, analizamos las interacciones que tienen las proteínas mutantes con otras proteínas, con sus sustratos y con los fármacos de primera línea de las que son blanco las proteínas mutantes o las nativas de MTB.



Los genes mutados que se proponen que causan resistencia aparecen en la tabla 18 (página 79). La resistencia para estreptomycin, rifampicina y etambutol es debida a la mutación en las proteínas blanco de cada uno de dichos fármacos. En todos los casos las mutaciones que nosotros detectamos dificultan o impiden la unión de estreptomycin, rifampicina o etambutol y por lo tanto los fármacos en comento no pueden llevar a cabo su acción farmacológica. Por otro lado, la resistencia a isoniazida y pirazinamida de CIBIN-99 se debe a la modificación estructural de las enzimas activadoras de isoniazida o de pirazinamida, ya que ambos compuestos son pro-fármacos. Estos cambios estructurales resultan en la inactivación de la catalasa o la pirazinamidasa respectivamente, y por lo tanto los pro-fármacos no se activan y permanecen inocuos para MTB. Todos los hechos anteriores apoyan la hipótesis planteada y concuerdan con Casali y Cols.(81), quienes mencionan que la resistencia a fármacos está mediada exclusivamente por mutaciones en el cromosoma. Lo cual resulta en modificaciones de la estructura de las proteínas-blanco de los fármacos, o de las enzimas modificadoras de los medicamentos anti-tuberculosis.

Las cinco mutaciones encontradas por nosotros en *rpsL*, *katG*, *rpoB*, *embB* y *pncA* de CIBIN-99-C1, están reportadas como regiones de alta confianza asociadas a resistencia según la base de datos TBDREAM.

IX.3. Resistencia a fluoroquinolonas

Además de los objetivos planteados en esta tesis, nosotros analizamos ocho genes asociados a resistencia a fármacos de segunda línea (tabla 9, página 43), de los cuales sólo encontramos mutado al gen *gyrA*. Este gen codifica para la ADN girasa/topoisomerasa II y sus mutaciones causan resistencia a fluoroquinolonas. CIBIN-99 tiene tres mutaciones en *gyrA*. Dos de ellas son mutaciones de cambio de sentido, y la otra mutación es causa de cambio de serina por treonina en el aminoácido 95; sin embargo, estas mismas tres mutaciones en conjunto se reportaron por Kapur y Cols. (112) como polimorfismos, más que como causantes de resistencia a fármacos de segunda línea.

Hasta donde nosotros sabemos, esta es la primera cepa de MTB resistente a fármacos (los cinco de primera línea) a la que se le realiza secuenciación de genoma completo en México y en América latina, y de las primeras cepas de MTBsecuenciadas en América Latina. Con la secuenciación masiva nos fue posible analizar en paralelo 55 genes asociados a resistencia a fármacos. Encontramos 19



genes mutados, y aunque nuestra aproximación fue la de buscar mutaciones en genes previamente reportados en causar resistencia (por lo cual sería difícil encontrar nuevos genes mutados), aún así encontramos una delección en el gen *pncA*, que no había sido reportada por otros autores.

Tabla 18.- Propuesta de un mecanismo integrado de resistencia a fármacos.			
FÁRMACO	MECANISMO*	CAUSA (GEN)/ MUTACIÓN	RESISTENCIA DEBIDA A:
Estreptomina	Bloquea traducción de RNAm, por unión a proteína ribosomal (codificada por <i>rpsL</i>).	<i>rpsL</i> Lys43Arg	Imposibilidad de unión del fármaco a su blanco.
Isoniazida	Impide síntesis de ácidos micólicos. (pro-fármaco, que requiere ser activado por la enzima codificada por <i>katG</i>)	<i>katG</i> Ser315Thr	Modificación de enzima activadora del pro-fármaco.
Rifampicina	Inhibe transcripción por unión a subunidad β de la polimerasa (codificada por <i>rpoB</i>).	<i>rpoB</i> Ser450Leu (S531L en base a la numeración de <i>E. coli</i>)	Imposibilidad de unión del fármaco a su blanco.
Etambutol	Inhibe biosíntesis de pared, por unión a arabinosil-transferasa (codificada por <i>embA, B y C</i>).	<i>embB</i> Met306Ile	Imposibilidad de unión del fármaco a su blanco.
Pirazinamida	Inhibe síntesis de precursores de ácidos grasos de cadena corta de pared. (pro-fármaco, que requiere ser activado por la enzima codificada por <i>pncA</i>).	<i>pncA</i> G453-	Modificación de enzima activadora del pro-fármaco.

*Del fármaco



X. CONCLUSIONES

1. CIBIN-99-C1 no contiene plásmidos, por lo tanto se descarta la posibilidad de que un plásmido haya conferido MFR a CIBIN-99-C1.
2. Aún no podemos descartar la participación de bombas de eflujo como un mecanismo de MFR en CIBIN-99-C1.
3. El genoma de CIBIN-99-C1 contiene cuatro genes mutados, reportados como responsables de resistencia a SIRE: *rpsL* para estreptomycin, *katG* para isoniazida, *rpoB* para rifampicina, *embB* para etambutol; y el gen *pncA* con corrimiento en el marco de lectura, implicado en la resistencia a pirazinamida. Por lo que la resistencia a SIREP se debe al menos a mutaciones de genes ubicados en el ADN genómico de CIBIN-15:99.



XI. PERSPECTIVAS

1. Analizar los nuevos genes reportados, asociados a fármaco-resistencia que están mutados en la cepa CIBIN-99.
2. Analizar las diferencias específicas entre los genomas de MTB H37Rv y CIBIN-99.
3. Analizar la resistencia de CIBIN-99-C1 a fármacos de segunda línea, y en caso de existir, buscar genes mutados relacionados a resistencia a estos fármacos.
4. Realizar un análisis del transcriptoma de CIBIN-99 en cultivos en presencia de SIRE.
5. Evaluar la eficacia de nuevos compuestos contra CIBIN-99, teniendo como blanco otras enzimas o proteínas estructurales, vitales para MTB.
6. Clonar los genes *wild-type* de H37Rv y transformar a CIBIN-99-C1, con cada uno de ellos, para confirmar que los genes mutados están directamente relacionados con el mecanismo de resistencia.



XII.REFERENCIAS

1. WHO (World Health Organization). TUBERCULOSIS. WHO Global Tuberculosis Report 2012. 2012; Available from: www.who.int/.
2. Organización mundial de la salud. [Febrero 2013]; Available from: <http://www.who.int/topics/tuberculosis/es/>.
3. Organización mundial de la salud. Global tuberculosis report 2013. 2013; Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf?ua=1.
4. SINAVE. SINAVE/DGE/SALUD/Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México, Julio 2012. 2012; Available from: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/Monografia_s5_Tuberculosis_Mex_junio12.pdf.
5. Organización mundial de la Salud Perfil de tuberculosis. México. Available from: www.who.int/tb/data.
6. SSA. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología. Indicadores demográficos 1990-2030 CONAPO; corte 2010, marzo 2011.
7. Dirección General de Epidemiología. Manual para la Vigilancia Epidemiológica de la Tuberculosis. Cuarta ed. ed. México.: Secretaría de Salud.; 1999.
8. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Capítulo 24. Micobacterias. Microbiología médica de Jawetz, Melnik y Adelberg 2002.
9. Gao B, Gupta RS. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum *Actinobacteria*. Microbiol Mol Biol Rev. 2012;76(1):66-112. Epub 2012/03/07.
10. Noll H, Bloch H, Asselineau J, Lederer E. The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. Biochim Biophys Acta. 1956;20(2):299-309. Epub 1956/05/01.
11. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Cap. 23. Micobacterias. Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología Médica. 25 ed: McGraw Hill Interamericana; 2011. p. 289-99.
12. Todar K. *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis. Online Todar's Text book on Bacteriology. p. 1-4.



13. Young DB. Blueprint for the white plague. *Nature*. 1998;393(6685):515-6. Epub 1998/06/20.
14. Songer JG. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol*. 1997;5(4):156-61. Epub 1997/04/01.
15. Wren BW, Stabler RA, Das SS, Butcher PD, Mangan JA, Clarke JD, et al. Characterization of a haemolysin from *Mycobacterium tuberculosis* with homology to a virulence factor of *Serpulina hyodysenteriae*. *Microbiology*. 1998;144 (Pt 5):1205-11. Epub 1998/06/05.
16. Shaun Lott J. Using Structural Genomics to Understand *Mycobacterium tuberculosis*. . Showcase on Research. . Australian Biochemist [Internet]. 2003; 34:[15-7 pp.]. Available from: http://www.asbmb.org.au/magazine/2003-August_Issue34-2/Showcase%20-%20Lott.pdf.
17. Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS. Capítulo 35. *Mycobacterium*. *Microbiología Médica*. Segunda ed: Harcourt Brace; 1997.
18. Gorocica P, Jiménez-Martínez MC, Garfias Y, Sada I, Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. . *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2005;18 (N2):142-53. Epub Abril-Junio 2005, segunda época.
19. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393(6685):537-44. Epub 1998/06/20.
20. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(2):267-74. Epub 2002/01/18.
21. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13(11):1320-30. Epub 2009/10/29.
22. Becerril-Montes P, Said-Fernandez S, Luna-Herrera J, Caballero-Olin G, Enciso-Moreno JA, Martínez-Rodríguez HG, et al. A population-based study of first and second-line drug-resistant tuberculosis in a high-burden area of the Mexico/United States border. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(2):160-6. Epub 2013/04/13.
23. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la tuberculosis 2012. Sinopsis. 2012; Available from: [http://www.who.int/tb/publications/global_report/qtbr12_executivesummary es..pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/qtbr12_executivesummary_es..pdf).



24. Goldberg DE, Siliciano RF, Jacobs WR, Jr. Outwitting evolution: fighting drug-resistant TB, malaria, and HIV. *Cell*. 2012;148(6):1271-83. Epub 2012/03/20.
25. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN, Musser JM. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(4):1024-6. Epub 1996/04/01.
26. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 1992;358(6387):591-3. Epub 1992/08/13.
27. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, et al. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med*. 1997;3(5):567-70. Epub 1997/05/01.
28. Takayama K, Kilburn JO. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33(9):1493-9. Epub 1989/09/01.
29. TB Drugs-First Line. Available from: <http://immunopaedia.org.za/index.php?id=260>.
30. da Silva PE, Von Groll A, Martin A, Palomino JC. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;63(1):1-9. Epub 2011/06/15.
31. Spies FS, da Silva PE, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2947-9. Epub 2008/06/11.
32. De Rossi E, Arrigo P, Bellinzoni M, Silva PA, Martin C, Ainsa JA, et al. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med*. 2002;8(11):714-24. Epub 2003/01/10.
33. Hull SI, Wallace RJ, Jr., Bobey DG, Price KE, Goodhines RA, Swenson JM, et al. Presence of aminoglycoside acetyltransferase and plasmids in *Mycobacterium fortuitum*. Lack of correlation with intrinsic aminoglycoside resistance. *Am Rev Respir Dis*. 1984;129(4):614-8. Epub 1984/04/01.
34. Meissner PS, Falkinham JO, 3rd. Plasmid-encoded mercuric reductase in *Mycobacterium scrofulaceum*. *J Bacteriol*. 1984;157(2):669-72. Epub 1984/02/01.



35. Rauzier J, Moniz-Pereira J, Gicquel-Sanzey B. Complete nucleotide sequence of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene*. 1988;71(2):315-21. Epub 1988/11/30.
36. Le Dantec C, Winter N, Gicquel B, Vincent V, Picardeau M. Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid: evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems. *J Bacteriol*. 2001;183(7):2157-64. Epub 2001/03/13.
37. Kirby C, Waring A, Griffin TJ, Falkinham JO, 3rd, Grindley ND, Derbyshire KM. Cryptic plasmids of *Mycobacterium avium*: Tn552 to the rescue. *Mol Microbiol*. 2002;43(1):173-86. Epub 2002/02/19.
38. Stinear TP, Pryor MJ, Porter JL, Cole ST. Functional analysis and annotation of the virulence plasmid pMUM001 from *Mycobacterium ulcerans*. *Microbiology*. 2005;151(Pt 3):683-92. Epub 2005/03/11.
39. Quirós-Roldán E, Airoidi M, Moretti F, Carosi G. Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista de Diagnóstico Biológico*. 2001;50:200-3.
40. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis*. 1998;79(1):3-29. Epub 2000/01/25.
41. Katti MK. Plasmids of mycobacteria. *J Med Microbiol*. 2001;50(6):575-6. Epub 2001/06/08.
42. Ford C, Yusim K, Ioerger T, Feng S, Chase M, Greene M, et al. *Mycobacterium tuberculosis*--heterogeneity revealed through whole genome sequencing. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012;92(3):194-201. Epub 2012/01/06.
43. Andreu N, Gibert I. Cell population heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008;88(6):553-9. Epub 2008/05/27.
44. Steenken W, Jr., Gardner LU. History of H37 strain of tubercle bacillus. *Am Rev Tuberc*. 1946;54:62-6. Epub 1946/07/01.
45. Molina-Salinas GM, Ramos-Guerra MC, Vargas-Villarreal J, Mata-Cardenas BD, Becerril-Montes P, Said-Fernandez S. Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res*. 2006;37(1):45-9. Epub 2005/11/30.
46. Molina-Salinas GM, Perez-Lopez A, Becerril-Montes P, Salazar-Aranda R, Said-Fernandez S, de Torres NW. Evaluation of the flora of northern Mexico for in vitro



antimicrobial and antituberculosis activity. *J Ethnopharmacol.* 2007;109(3):435-41. Epub 2006/09/27.

47. Molina-Salinas GM, Borquez J, Said-Fernandez S, Loyola LA, Yam-Puc A, Becerril-Montes P, et al. Antituberculosis activity of alkylated mulinane diterpenoids. *Fitoterapia.* 2010;81(3):219-22. Epub 2009/09/29.

48. Molina-Salinas GM, Pena-Rodriguez LM, Mata-Cardenas BD, Escalante-Erosa F, Gonzalez-Hernandez S, Torres de la Cruz VM, et al. Flourensia cernua: Hexane Extracts a Very Active Mycobactericidal Fraction from an Inactive Leaf Decoction against Pansensitive and Panresistant Mycobacterium tuberculosis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:782503. Epub 2011/05/18.

49. Molina-Salinas GM, Rivas-Galindo VM, Said-Fernandez S, Lankin DC, Munoz MA, Joseph-Nathan P, et al. Stereochemical analysis of leubethanol, an anti-TB-active serrulatane, from *Leucophyllum frutescens*. *J Nat Prod.* 2011;74(9):1842-50. Epub 2011/08/24.

50. Borges-Argaez R, Canche-Chay CI, Pena-Rodriguez LM, Said-Fernandez S, Molina-Salinas GM. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoterapia.* 2007;78(5):370-2. Epub 2007/05/15.

51. Jimenez-Arellanes A, Leon-Diaz R, Meckes M, Tapia A, Molina-Salinas GM, Luna-Herrera J, et al. Antiprotozoal and Antimycobacterial Activities of Pure Compounds from *Aristolochia elegans* Rhizomes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:593403. Epub 2012/03/29.

52. Uc-Cachon AH, Borges-Argaez R, Said-Fernandez S, Vargas-Villarreal J, Gonzalez-Salazar F, Mendez-Gonzalez M, et al. Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013. Epub 2013/08/24.

53. Leon-Diaz R, Meckes-Fischer M, Valdovinos-Martinez L, Campos MG, Hernandez-Pando R, Jimenez-Arellanes MA. Antitubercular activity and the subacute toxicity of (-)-Licarin A in BALB/c mice: a neolignan isolated from *Aristolochia taliscana*. *Arch Med Res.* 2013;44(2):99-104. Epub 2013/01/08.

54. Del Olmo E, Molina-Salinas GM, Escarcena R, Alves M, Lopez-Perez JL, Hernandez-Pando R, et al. Simple dihydrosphingosine analogues with potent activity against MDR-*Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19(19):5764-8. Epub 2009/08/26.



55. Torres de la Cruz VM. Comparación de la expresión del proteoma de una clona sensible y de una resistente de *Mycobacterium tuberculosis* a los medicamentos de primera línea. . Monterrey, Nuevo León, México.: Universidad Autónoma de Nuevo León.; 2011.
56. Penuelas-Urquides K, Gonzalez-Escalante L, Villarreal-Trevino L, Silva-Ramirez B, Gutierrez-Fuentes DJ, Mojica-Espinosa R, et al. Comparison of Gene Expression Profiles Between Pansensitive and Multidrug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Microbiol*. 2013;67(3):362-71. Epub 2013/05/08.
57. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol*. 1998;36(2):362-6. Epub 1998/02/18.
58. Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*. 1974;109(1):147-51. Epub 1974/01/01.
59. Isenberg DH. 3.12.17-3.12.19. *Clinical Microbiology Procedures Handbook* 1992.
60. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*. 1993;31(2):406-9. Epub 1993/02/01.
61. Larsen MH, Biermann K, Tandberg S, Hsu T, Jacobs WR, Jr. Genetic Manipulation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Protocols in Microbiology* 2007. p. 10A2.1 - A2.21.
62. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60. Epub 2009/05/20.
63. Roche. Available from: <http://www.454.com/products/analysis-software/>.
64. Delcher AL, Salzberg SL, Phillippy AM. Using MUMmer to identify similar regions in large sequence sets. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2003;Chapter 10:Unit 10.3. Epub 2008/04/23.
65. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med*. 2009;6(2):e2. Epub 2009/02/13.
66. Zhang H, Li D, Zhao L, Fleming J, Lin N, Wang T, et al. Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic



regions associated with drug resistance. *Nat Genet.* 2013;45(10):1255-60. Epub 2013/09/03.

67. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue):W5-9. Epub 2008/04/29.

68. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947-8. Epub 2007/09/12.

69. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 2014. Epub 2014/05/02.

70. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D808-15. Epub 2012/12/04.

71. Kuhn M, Szklarczyk D, Pletscher-Frankild S, Blicher TH, von Mering C, Jensen LJ, et al. STITCH 4: integration of protein-chemical interactions with user data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D401-7. Epub 2013/12/03.

72. Petersen B, Petersen TN, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct Biol.* 2009;9:51. Epub 2009/08/04.

73. Cheng J, Randall A, Baldi P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins.* 2006;62(4):1125-32. Epub 2005/12/24.

74. Dehouck Y, Kwasigroch JM, Gillis D, Rooman M. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:151. Epub 2011/05/17.

75. Nair J, Rouse DA, Bai GH, Morris SL. The rpsL gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 1993;10(3):521-7. Epub 1993/11/01.

76. Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, Yang Z, Cave MD, Graviss EA. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 2):107-13. Epub 2004/01/20.

77. Niemann S, Koser CU, Gagneux S, Plinke C, Homolka S, Bignell H, et al. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of



Mycobacterium tuberculosis with identical DNA fingerprints. PLoS One. 2009;4(10):e7407. Epub 2009/10/14.

78. Cuevas-Cordoba B, Cuellar-Sanchez A, Pasissi-Crivelli A, Santana-Alvarez CA, Hernandez-Illezcas J, Zenteno-Cuevas R. *rrs* and *rpsL* mutations in streptomycin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. J Microbiol Immunol Infect. 2013;46(1):30-4. Epub 2012/10/09.

79. Musser JM, Kapur V, Williams DL, Kreiswirth BN, van Soolingen D, van Embden JD. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. J Infect Dis. 1996;173(1):196-202. Epub 1996/01/01.

80. Heym B, Alzari PM, Honore N, Cole ST. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 1995;15(2):235-45. Epub 1995/01/01.

81. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Harris SR, et al. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. Genome Res. 2012;22(4):735-45. Epub 2012/02/02.

82. Gomez DI, Fisher-Hoch SP, Bordt AS, Quitugua TN, Robledo J, Alvarez N, et al. Systematic interpretation of molecular beacon polymerase chain reaction for identifying *rpoB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates with mixed resistant and susceptible bacteria. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010;67(1):37-46. Epub 2010/03/17.

83. Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR, Jr., et al. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(8):1677-81. Epub 1997/08/01.

84. Bini EI, Mata Espinosa D, Marquina Castillo B, Barrios Payan J, Colucci D, Cruz AF, et al. The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. PLoS One. 2014;9(4):e93831. Epub 2014/04/12.

85. Hazbon MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(8):2640-9. Epub 2006/07/28.



86. Cooksey RC, Morlock GP, McQueen A, Glickman SE, Crawford JT. Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(5):1186-8. Epub 1996/05/01.
87. Honore N, Cole ST. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(2):238-42. Epub 1994/02/01.
88. Finken M, Kirschner P, Meier A, Wrede A, Bottger EC. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol.* 1993;9(6):1239-46. Epub 1993/09/01.
89. Wade MM, Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci.* 2004;9:975-94. Epub 2004/02/10.
90. Zhao X, Yu H, Yu S, Wang F, Sacchettini JC, Magliozzo RS. Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant. *Biochemistry.* 2006;45(13):4131-40. Epub 2006/03/29.
91. Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN, Roux L, York DF. Genomic mutations in the katG, inhA and aphC genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa. *Tuber Lung Dis.* 2000;80(1):47-56. Epub 2000/07/18.
92. Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(4):1241-50. Epub 2003/03/26.
93. Wain-Hobson S, Nussinov R, Brown RJ, Sussman JL. Preferential codon usage in genes. *Gene.* 1981;13(4):355-64.
94. Grosjean H, Fiers W. Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. *Gene.* 1982;18(3):199-209.
95. Qian W, Yang JR, Pearson NM, Maclean C, Zhang J. Balanced codon usage optimizes eukaryotic translational efficiency. *PLoS Genet.* 2012;8(3):e1002603. Epub 2012/04/06.



96. Doran JL, Pang Y, Mdluli KE, Moran AJ, Victor TC, Stokes RW, et al. *Mycobacterium tuberculosis* *efpA* encodes an efflux protein of the QacA transporter family. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997;4(1):23-32. Epub 1997/01/01.
97. Rodrigues L, Machado D, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol.* 2012;12(4):695-700. Epub 2011/08/30.
98. Li XZ, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7):2415-23. Epub 2004/06/25.
99. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 1993;341(8846):647-50. Epub 1993/03/13.
100. Lorenzo D, Mousa SA. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta Trop.* 2011;119(1):5-10. Epub 2011/04/26.
101. Ioerger TR, Feng Y, Chen X, Dobos KM, Victor TC, Streicher EM, et al. The non-clonality of drug resistance in Beijing-genotype isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the Western Cape of South Africa. *BMC Genomics.* 2010;11:670. Epub 2010/11/30.
102. Plinke C, Walter K, Aly S, Ehlers S, Niemann S. *Mycobacterium tuberculosis* *embB* codon 306 mutations confer moderately increased resistance to ethambutol in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2891-6. Epub 2011/03/30.
103. Plinke C, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Significance of mutations in *embB* codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(5):1900-2. Epub 2006/04/28.
104. Plinke C, Cox HS, Zarkua N, Karimovich HA, Braker K, Diel R, et al. *embCAB* sequence variation among ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates without *embB306* mutation. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(7):1359-67. Epub 2010/04/30.
105. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):528-32. Epub 2000/02/19.



106. Jureen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5):1852-4. Epub 2008/03/05.
107. Lee KW, Lee JM, Jung KS. Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J Korean Med Sci.* 2001;16(5):537-43. Epub 2001/10/20.
108. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, et al. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(3):540-3. Epub 1997/03/01.
109. Hou L, Osei-Hyiaman D, Zhang Z, Wang B, Yang A, Kano K. Molecular characterization of *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *Epidemiol Infect.* 2000;124(2):227-32. Epub 2000/05/17.
110. Mestdagh M, Fonteyne PA, Realini L, Rossau R, Jannes G, Mijs W, et al. Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(9):2317-9. Epub 1999/09/03.
111. Peñuelas-Urquides K, Martínez-Rodríguez HG, Enciso-Moreno JA, Molina-Salinas GM, Silva-Ramírez B, Padilla-Rivas GR, et al. Correlation between mayor risk factors and closely related *Mycobacterium tuberculosis* isolates, grouped by three current genotyping procedures. a population-based study in Northeast Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* Manuscrito en revisión.
112. Kapur V, Li LL, Hamrick MR, Plikaytis BB, Shinnick TM, Telenti A, et al. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 1995;119(2):131-8. Epub 1995/02/01.