



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOLOGÍA**

**TESIS:**

Análisis bioinformático del efecto de mutaciones en el gen *katG* de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de Michoacán y Querétaro, sobre la estructura y función de la proteína codificada.

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO  
FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

ADRIAN SIERRA MAYA

**DIRECTORA DE TESIS:**

D.C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS

**CO-DIRECTORA DE TESIS:**

D.C. ANA LAURA GUILLEN NEPITA

Morelia, Mich. Octubre, 2017



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme llegar hasta este día, por brindarme la oportunidad de obtener otro triunfo personal, y darme salud, sabiduría, entendimiento para lograr esta meta, por guiarme y ayudarme en todo momento.

A mis padres Ruth y Andrés Mariano, por haberme dado educación, un hogar donde crecer, equivocarme, desarrollarme, aprender y donde adquirí los valores que hoy definen mi vida. Por su ejemplo de superación y confianza. Por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional.

A mi hermano Edgar por los recuerdos compartidos y el apoyo brindado en todos los sentidos.

A mi madrina Mati por su apoyo incondicional y su forma de estar al pendiente. Por sus consejos y los momentos compartidos, ya que sin su apoyo, llegar a este punto de mi vida no hubiera sido posible.

A la máxima casa de estudios del estado de Michoacán la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por brindarme los conocimientos y valores necesarios para llegar a graduarme como Químico Farmacobiólogo y así ser un profesionista orgullosamente Nicolaita.

A mi asesor la Dra. Soledad, por brindarme la oportunidad y la confianza de ver en mí el potencial para realizar este proyecto, por compartir sus conocimientos y brindarme un espacio en su equipo de trabajo, el cual me permitió conocer excelentes compañeros y amigos.

A mi co – asesor la Dra. Ana por su tiempo y dedicación en el desarrollo de este proyecto. Por sus consejos, conocimientos brindados y amistad.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Paulina, Erandi, Mariana, Mar, Rubén, Estela, Edgardo, Eva, Claudia, Elda, por resolver mis dudas en todo momento que lo necesite, por su enseñanza y por su gran amistad.

A mis abuelos Ángel y Ángela, mis tíos y tías, Ceci, Nana, Miguel, Sami, mi primo José Ángel. Por siempre estar al pendiente y apoyándome para seguir adelante con mis metas y sueños.

A mis amigos de licenciatura Fernando, Rubén, Miguel, Marco, Manuel, Mincitar, Jesús, Rafa, Carlos, Erika, Gina, Denia, Rubí, Gaby, Yesly, Adonay, Nelly, Aneth, Jany, por vivir momentos inolvidables y brindarme su gran amistad durante todo este tiempo.

A Luis Tobías mi mejor amigo por ser una persona increíble, por su complicidad, su cariño, su confianza, su apoyo y comprensión, en resumen... por su amistad.

Gracias a toda mi familia, compañeros de laboratorio, amigos y a todas las personas que de alguna manera colaboraron para que esto fuera posible.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la U.M.S.N.H., bajo la dirección de D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y la Co-dirección de la D. en C. Ana Laura Guillén Nepita, en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán.

Se contó con el apoyo de los proyectos:

- 16.4/CIC-UMSNH “Determinantes genéticos de la resistencia a antibióticos en cepas de *M. tuberculosis* de Michoacán”.
- CONACyT/FORDECyT/ST 346/2012, “Análisis genómico epidemiológico del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en los estados de Querétaro, Guanajuato y Michoacán”.
- MICH-2012-C05-197631 “Hacia una estrategia integral para el control y tratamiento de la tuberculosis humana en Michoacán: evidencia epidemiológica y genética del Fondo Mixto Conacyt-Gobierno del Estado de Michoacán.”

# CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII

# ÍNDICE GENERAL

<b>1.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Tuberculosis.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Epidemiología.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. Cuadro clínico.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. Tratamiento.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.4. Características bioquímicas del agente causal.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.5. Técnicas de genotipificación molecular para CMTB.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Mecanismos de resistencia.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1. Mecanismos de Resistencia Intrínseca.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.2. Mecanismos de Resistencia Adquirida.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.3. Resistencia a antibióticos antituberculosos.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Isoniazida.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.1. Estructura y mecanismo de acción.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.2. Mutaciones relacionadas con la resistencia a Isoniazida.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.3. Genes involucrados en la resistencia a Isoniazida.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.4. El gen <i>katG</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.5. Enzima catalasa-peroxidasa.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4. Modelado comparativo de proteínas (Homology modelling).....</b>	<b>19</b>
<b>1.5. Resistencia a los antibióticos en Michoacán.....</b>	<b>20</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Objetivo general.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>23</b>
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>24</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>

<b>6.1. Material biológico.</b>	25
<b>6.2. Manejo de muestras.</b>	27
<b>6.3. Extracción de ADN.</b>	27
<b>6.4. Amplificación por PCR.</b>	27
<b>6.5. Secuenciación.</b>	28
<b>6.6. Análisis de datos.</b>	28
<b>6.7. Modelado por homología.</b>	29
<b>6.8. Predicción de SNP's.</b>	29
<b>7. RESULTADOS</b>	31
<b>7.1. Calidad del ADN obtenido</b>	31
<b>7.2. Amplificación por PCR del gen <i>katG</i></b>	31
<b>7.3. Secuencias de los fragmentos amplificados.</b>	32
<b>7.4. Detección de SNP's.</b>	32
<b>7.5. Relación entre mutación y genotipo.</b>	35
<b>7.6. Modelo proteico de la enzima catalasa-peroxidasa.</b>	37
<b>7.7. Determinación de los pronósticos proteicos.</b>	39
<b>8. DISCUSIÓN</b>	41
<b>9. RESUMEN DE RESULTADOS</b>	44
<b>10. CONCLUSIÓN</b>	45
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	46

# ÍNDICE DE TABLAS

No.	Descripción	Página
1.	Comparación de polimorfismos encontrados en el gen <i>katG</i> de cepas aisladas en diferentes periodos.....	20
2.	Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizadas en este estudio.....	25
3.	Polimorfismos encontrados en el gen <i>katG</i> .....	34
4.	Relación de mutaciones y genotipos de aislados provenientes de los estados de Michoacán y Querétaro.....	36
5.	Resultados de los pronósticos de SNP's analizados en mutaciones del gen <i>katG</i> utilizando el servidor DUET .....	39
6.	Pronósticos utilizando el servidor SIFT del efecto de los SNP's en el gen <i>katG</i> .....	40



# ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Descripción	Página
1.	Estructura química de la isoniazida.....	13
2.	Ruta metabólica de la síntesis de ácidos micólicos y acción de inhibición enzimática de la peroxidasa micobacteriana.....	14
3.	Porcentaje de cepas sensibles y resistentes en los periodos 2009-2011 y 2012-2014 en el estado de Michoacán.....	21
4.	ADN de las cepas de estudio.....	31
5.	Amplificación del gen <i>katG</i> con el ADN de cada una de las cepas de estudio.....	32
6.	Electroferogramas.....	32
7.	Detección de SNP's en el gen <i>katG</i> en las cepas de estudio.....	33
8.	Distribución de mutaciones presentes en el gen <i>katG</i> de las cepas provenientes de Michoacán y Querétaro.....	35
9.	Porcentaje de cepas de cada genotipo por entidad que presentaron mutaciones en el gen <i>katG</i> .....	37
10.	Modelos proteicos de la región estudiada de la catalasa-peroxidasa codificada por el gen <i>katG</i> .....	38

## ABREVIATURAS

3D:	Tercera Dimensión
A.R.D.:	Accesibilidad Relativa al Disolvente
A:	Adenina
ADN:	Acido Desoxirribonucleico
ADS:	Dodecilsulfato sódico
Ala:	Alanina
Arg:	Arginina
BLAST:	Basic Local Aligment Search Tool
C:	Citosina
CENAPRECE:	Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
CMTB:	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Cys:	Cisteína
dNTP:	Deoxinucleosido Trifosfato
DR:	Repetidos directos
EAI:	Este Africo-Indio
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
G:	Guanina
HGMS:	Hospital General Dr. Miguel Silva
IMSS:	Instituto Mexicano del Seguro social
INH:	Isoniazida
kb:	Kilobase
kDa:	Kilodalton
L:	Leucina
LAM:	Latino-América-Mediterráneo
LESP:	Laboratorio Estatal de Salud Pública
Leu:	Leucina
MDR-TB:	Multidrogorresistente
Met:	Metionina
MICH:	Michoacán
MIRU:	Unidades Intercaladas Repetitivas de Micobacterias
mM:	Milimolar

MTB:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NA:	No Aplica
NAD:	Nicotinamida Adenina Dinucleotido
NADH:	Nicotinamida Adenina Dinucleotido de Hidrogeno
ND:	No Determinado
ng:	Nanogramos
NOM:	Norma Oficial Mexicana
ODM:	Objetivos del Desarrollo del Milenio
OMS:	Organización Mundial de la Salud
P:	Prolina
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en Cadena de la Plimerasa
Pro:	Prolina
QRO:	Querétaro
R:	Arginina
S:	Serina
Ser:	Serina
SNP:	Polimorfismo de un solo Nucleótido
SNR EA:	Epoligotipo No Reportado del Linaje Euro-Americano
SNR IO:	Espoligotipo No Reportado del Linaje Indo-Oceanico
SVMs:	Support Vector Machines
T:	Timina
TB:	Tuberculosis
Thr:	Treonina
Trp:	Triptofano
Tyr:	Tirosina
U:	Unidades
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VNTR:	Numero Variable de Repeticiones en Tándem
WHO:	World Health Oeganization
XDR-TB:	Extremadamente resistente

## RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria que es adquirida por vía aérea y afecta mayoritariamente al sistema respiratorio. La TB se considera la segunda enfermedad infecciosa después del VIH en países en desarrollo. La Organización Mundial de la Salud reportó en el 2015, 10 millones de casos de TB activa, con un estimado de 1.5 millones de muertes asociadas. Esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública por su alta capacidad de desarrollar farmacorresistencia, encontrándose cepas Multidrogorresistentes (MDR-TB) y extremadamente drogorresistentes (XDR-TB). Uno de los mecanismos moleculares de resistencia a isoniazida (INH) son mutaciones en el gen *katG*. La frecuencia de mutación en dicho gen difiere según la ubicación geográfica y periodos analizados. En este trabajo se analizaron 39 aislados, de los cuales 20 pertenecen al estado de Michoacán aislados en el periodo 2014 - 2015 y 19 del estado de Querétaro aislados en 2015. Las mutaciones en el gen *katG* se detectaron mediante PCR, secuenciación y comparación en GenBank. El alineamiento múltiple se realizó con los programas ClustalX 2.1 y MEGA 7.0.14. La frecuencia de mutación para el gen analizado en los aislados de Michoacán fue de 35%, encontrándose las mutaciones S315T, R463L y P325S. Para el caso de Querétaro la frecuencia de mutación fue de 26.3% pero sólo se observaron las mutaciones S315T y R463L. Además se analizó *in silico* si dichas mutaciones afectaban la estabilidad de la estructura de la proteína codificada por *katG*. El servidor DUET predijo que el 100% de las mutaciones encontradas afectaban la formación del homodímero de la proteína codificada. El servidor SIFT predijo que el 40% de las mutaciones encontradas son toleradas y 60% no lo son. El análisis estructural de la proteína con el programa UCSF Chimera demostró una afectación de la función proteica, sugiriendo la resistencia a INH de las cepas que lo presentan.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, isoniazida, polimorfismos, *katG*, resistencia.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*; a bacterium that is acquired by air and mainly affects the respiratory system. TB is considered the second infectious disease after HIV in developing countries. The World Health Organization reported in 2005, 10 million cases of active TB, with an estimated 1.5 million associated deaths. This disease has become a public health problem because of its high capacity to develop drug resistance, with multidrug-resistant (MDR-TB) and extremely drug-resistant (XDR-TB) strains. One of the molecular mechanisms of resistance to isoniazid (INH) are mutations in the *katG* gene. The frequency of mutation in this gene differs according to the geographic location and periods analyzed. In this work, 39 isolates were analyzed; of which 20 belong to the state of Michoacán isolated in the period 2014 - 2015 and 19 of the state of Querétaro isolated in 2015. Mutations in the *katG* gene were detected by PCR, sequencing and comparison in GenBank. The multiple alignment was performed with the ClustalX 2.1 and MEGA 7.0.14 programs. The mutation frequency for the gene analyzed in the Michoacán isolates was 35%, with the mutations S315T, R463L and P325S. For the case of Querétaro the mutation frequency was 26.3% but only the S315T and R463L mutations were observed. In addition, an *in silico* analysis was performed to analyze if such mutations affected the stability of the protein structure encoded by *katG*. The DUET server predicted that 100% of the mutations found affected the homodimer formation of the encoded protein. The SIFT server predicted that 40% of the mutations found were tolerated and 60% were not. Structural analysis of the protein with the UCSF Chimera program showed an impairment of protein function, suggesting the resistance to INH of the strains presenting it.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, isoniazid, polymorphisms, *katG*, resistance.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica generalmente sistémica y que afecta mayoritariamente al sistema respiratorio, causada por la adquisición vía aérea principalmente, de un miembro del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), que está integrado por *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti*, todos ellos agentes patógenos para los seres humanos y *M. bovis*, principalmente para el ganado vacuno (Dávila G, 2012).

Los estudios en genómica indican que todas las especies CMTB tienen entre 95% de relación en su ADN (Schito et al., 2016), estos estudios han revelado la existencia de 16RD (Regiones de Diferenciación), de un tamaño promedio entre 2 y 12,7 kb, presentes en los miembros del complejo, los cuales confieren una diferenciación entre especies, lo que explica la predisposición por sus reservorios (Naillet Arráiz R., 2007). Los principales tipos de bacilos tuberculosos patógenos para el hombre son *M. tuberculosis* y *M. bovis* con una frecuencia de infecciones del 95% y 5% respectivamente (Secretaría de Salud, 2011).

Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen un riesgo a lo largo de la vida de enfermar de tuberculosis de un 10%. En cambio, las personas inmunodeprimidas, por ejemplo las que padecen VIH, desnutrición o diabetes, y los consumidores de tabaco corren un riesgo mucho mayor de padecer la enfermedad (World Health Organization, 2014).

La desigual distribución geográfica y propagación de especies del CMTB significa que los resultados de las investigaciones individuales de un país o región no pueden ser generalizados en todo el continente o el mundo. Por lo que este padecimiento sigue siendo un problema importante de salud pública y ahora es la causa de enfermedad infecciosa más común de muerte. El informe anual de tuberculosis de la organización Mundial de la Salud para el 2016 indica que había 10 millones de casos de tuberculosis activa en el año 2015, con un estimado de 1.5 millones de muertes asociadas. Una enorme cantidad de recursos y esfuerzos

se han invertido en el desarrollo de nuevos diagnósticos de TB, regímenes de tratamiento y vacunas. Sin embargo, estudios moleculares y clínicos combinados con análisis genómicos han demostrado una importante diversidad de cepas entre los diferentes miembros del CMTB.

### **1.1.1. Epidemiología.**

La TB es una de las principales amenazas para la salud pública, compitiendo con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como la causa de muerte por enfermedades infecciosas en todo el mundo. Es una enfermedad relacionada con la pobreza (Sulis et al., 2014).

De acuerdo a la Organización Mundial de Salud (OMS), 10.4 millones de personas murieron de TB en 2015 y ahora la enfermedad es la causa número uno de muerte en todo el mundo (Schito et al., 2016). El 60% de los casos nuevos se dieron en seis países: India, Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica. Los progresos que se den en el mundo dependen de los avances fundamentales en la prevención y la atención de la TB que se produzca en estos países. En ese mismo año se notificaron 6.1 millones de casos nuevos de TB con un aumento del 34% en las notificaciones procedentes de la India. A nivel mundial se registró un desfase de 4.3 millones entre casos incidentes y notificados, los cuales tuvieron lugar en la India, Indonesia y Nigeria. Igualmente en ese mismo año se trataron 125 000 de las 580 000 (20%) personas candidatas a iniciar un tratamiento contra TB-MDR (Tuberculosis Multidrogorresistente). El 60% de este desfase se observó en la India, China, Federación de Rusia, Indonesia y Nigeria (OMS, 2016).

Aun así, la mortalidad por TB ha descendido en un 47% desde 1990, y casi la totalidad de esa mejora se ha producido a partir de 2000, cuando se establecieron los ODM (Objetivos del Desarrollo del Milenio). Se estima que el diagnóstico y tratamiento eficaces de la TB han permitido salvar 43 millones de vidas entre 2000 y 2014. A nivel mundial, la incidencia de la TB ha disminuido en un promedio de un 1.5% por año desde 2000 y es actualmente un 18% más baja que en 2000. En 2014, 1.5 millones de personas (1.1 millones VIH-negativas y 0.4 millones VIH-positivas) fallecieron a consecuencia de esta enfermedad: 890 000 hombres, 480

000 mujeres y 140 000 niños (World Health Organization, 2014).

Se calcula que el 3.3% de los nuevos casos mundiales de TB y el 20% de los tratados anteriormente tienen TB-MDR. La cifra estimada de fallecidos por TB-MDR en 2014 fue de 190 000. En 2015 se han notificado casos de TB ultrarresistente (TB-XR) en 105 países. Se calcula que el 9.7% de los casos de TB-MDR tienen TB-XR (World Health Organization, 2014).

En México se ha reconocido al sexo masculino como más afectado que el femenino. Con una media nacional de 13.7 casos por 100 mil habitantes, siendo para hombres de 17.5 y para mujeres de 10.1 casos nuevos. Se registran cada año cerca de 15 mil casos nuevos de tuberculosis pulmonar y cerca de dos mil defunciones por esta causa. En el año 2003, se diagnosticaron alrededor de 17 mil casos nuevos y casi 2 500 defunciones por esta causa. Todas las formas, pulmonar, meníngea y otras formas desde 1998 al 2009 muestra que la TB pulmonar respecto a todas las formas, sigue siendo la más alta. La tasa de incidencia nacional de Tuberculosis pulmonar se ubicó en 13.7 casos por cada 100 mil habitantes, con un total de casos nuevos de 15 384, las tres entidades federativas con las mayores tasas fueron: Baja California, Tamaulipas y Guerrero (Secretaria de Salud, 2011).

En el estado de Michoacán para 2015 se registraron: 249 casos nuevos de TB Pulmonar, 1 caso nuevo de TB Meníngea y 66 casos nuevos de TB otras formas (CENAPRECE, 2015).

### **1.1.2. Cuadro clínico.**

El patógeno se adapta a un estilo de vida intracelular, lo que le permite sobrevivir y replicarse dentro de su célula huésped principal, el macrófago. La TB afecta principalmente a los pulmones (tuberculosis pulmonar) y se transmite generalmente por la inhalación de gotitas muy pequeñas (aerosoles) que contiene bacterias (Brandenburg y Reiling, 2016).

Hay dos formas de TB: tuberculosis activa y latente. TB latente es un estado en el que *M. tuberculosis* sobrevive en el cuerpo sin causar signo y síntomas



manifiestos. Las personas con TB latente son no contagiosas. Sin embargo, *M. tuberculosis* puede llegar a ser activo en el cuerpo, multiplicarse y provocar la tuberculosis abierta (Mortaz et al., 2016).

Las lesiones pulmonares tempranas por lo general se curan sin dejar alteraciones residuales, salvo calcificaciones ocasionales en los pulmones o en los ganglios linfáticos traqueobronquiales. Cerca de 10% de los individuos que contraen la infección a la larga presentan la enfermedad activa, la mitad de ellos durante los dos primeros años después de infectarse; 90% de los individuos infectados no tratados jamás padecerán TB activa (Dávila, 2012).

Después de haber entrado en el pulmón, *M. tuberculosis* es ingerido por los macrófagos alveolares y provoca una respuesta inflamatoria localizada, que por la producción de una serie de citocinas y quimiocinas, lleva a reclutamiento temprano de las células mononucleares y polimorfas de los vasos sanguíneos vecinos al foco de infección. Esto conduce a la formación de un grupo de células inmunes llamado granuloma. Las etapas iniciales se caracterizan principalmente por una masa amorfa de macrófagos derivados de monocitos. La diferenciación de células T vírgenes es impulsada por las células dendríticas presentadoras de antígeno que han migrado a los ganglios linfáticos cercanos al pulmón. Posteriormente las células T específicas de antígeno entran en el sitio de infección y las lesiones se estratifican formando un granuloma. Durante la progresión de la enfermedad, algunas células se diferencian en células gigantes multinucleadas y macrófagos espumosos. Los macrófagos infectados en el núcleo del granuloma están encerrados por los macrófagos no infectados y macrófagos espumosos, que, a su vez, están rodeados por diferentes fracciones de linfocitos T y B en la periferia. Una desintegración funcional del granuloma en última instancia, conduce a la liberación de micobacterias viables, extracelulares en las vías respiratorias. Esto facilita la transmisión de la enfermedad por la tos y el estornudo del paciente (Brandenburg y Reiling, 2016).

La TB extrapulmonar es menos común que la pulmonar. Los niños y las personas con inmunodeficiencias, como las seropositivas para el VIH, tienen un mayor riesgo de TB extrapulmonar. La enfermedad puede afectar a cualquier órgano o

tejido; se localiza en la pleura, el pericardio, los riñones, los huesos y articulaciones, la laringe, el oído medio, la piel, los intestinos, el peritoneo y los ojos, el Sistema Nervioso Central (meníngea) y los ganglios linfáticos (miliar); siendo las dos últimas las presentaciones de mayor gravedad (Dávila G, 2012).

### **1.1.3. Tratamiento.**

Los fármacos utilizados en el tratamiento contra la TB pueden ser clasificados de primera y segunda línea. Los fármacos de primera línea son considerados así en función de su eficacia y tolerabilidad, los más importantes son la isoniazida y la rifampicina. Los otros son pirazinamida, etambutol y estreptomina (Morse y Carroll, 2010). La eficacia de estos fármacos se da por su elevado poder bactericida contra bacilos metabólicamente activos y una actividad esterilizante contra bacilos en estado de latencia. La rifampicina es el único medicamento que presenta actividad bactericida tanto en bacilos en estado de latencia como metabólicamente activos y previene la resistencia. La isoniazida, estreptomina y otros aminoglucósidos son bactericidas contra los microorganismos que se localizan en el medio extracelular. La isoniazida también resulta bactericida contra los bacilos intracelulares. La pirazinamida solo es bactericida contra aquellos bacilos intracelulares, y actúa muy bien en medio ácido en la fase inflamatoria de la enfermedad. Todos estos fármacos actúan sobre la ruta metabólica de síntesis de ácidos micólicos de las micobacterias a excepción de la rifampicina la cual actúa sobre la síntesis de ARN mensajero (Ramos et al., 2003).

Los fármacos de segunda línea son considerados como más tóxicos, menos eficaces o con ambas características y se recurre a ellos cuando se ha presentado un cuadro de ineficacia terapéutica y resistencia a múltiples fármacos de primera línea. En esta categoría se encuentran kanamicina, capreomicina, etionamida, cicloserina, ofloxacina y ciprofloxacina (Morse y Carroll, 2010).

El tratamiento se administra en cualquiera de sus formas farmacéuticas, el esquema de tratamiento se distingue en primario acortado, retratamiento con fármacos de primera línea, retratamiento estandarizado con fármacos de segunda línea para TB-MFR (Tuberculosis Multifarmacoresistente) y retratamiento

individualizado con fármacos de segunda línea para TB-MFR o de acuerdo a antecedente de tratamiento (NOM-017-SSA2-2012, 2013).

Para poder garantizar una estrategia de tratamiento se ha realizado un esquema llamado Pirámide de Éxito de Tratamiento el cual señala lo siguiente:

- Casos nuevos: Tratamiento primario (6 meses), utilizando cuatro fármacos de primera línea.
- Abandono, recaída o reconquista: Retratamiento primario (8 meses), utilizando cinco fármacos de primera línea.
- Fracaso al tratamiento y retratamiento primario: Estandarizado utilizando fármacos de primera y segunda línea durante 24 meses.
- Fracaso al retratamiento estandarizado: Retratamiento individualizado (NOM-017-SSA2-2012, 2013).

#### **1.1.4. Características bioquímicas del agente causal.**

*M. tuberculosis* es considerada una bacteria aerobia facultativa de lento crecimiento, con una fase en estado de latencia y posee una envoltura celular compleja. Presenta una patogenicidad intracelular y una homogeneidad genética (Rivera y Camargo., 2015). En los tejidos, los bacilos tuberculosos son estructuras rectas cilíndricas que miden 0.4 x 3 µm. En medios artificiales se les identifica por ser formas cocoides y filamentosas (Morse y Carroll, 2010).

Es inmóvil, carece de cápsula o espora, no tiene ramificaciones y se tiñe de color rojo violáceo con el método de Ziehl-Neelsen y una vez teñido es resistente a la decoloración con la mezcla de ácidos minerales fuertes y alcohol, de ahí que ha recibido el término de ácido alcohol resistente (Dávila G, 2012). Presenta una pared celular la cual es rica en peptidoglucano, glicolípidos y polisacáridos que junto con otros componentes como los ácidos micólicos, ácido micoserosido, fenoltiocerol, lipoarabinomanano y arabinogalactano contribuyen a la longevidad, a la respuesta inflamatoria y a la patogénesis de la micobacteria. Dado que las micobacterias sintetizan grandes cantidades de compuestos lipídicos, se ha reportado que cerca del 8% del genoma está dedicado a la síntesis de éste,

aunque se ha observado la utilización de carbohidratos cuando crece *in vitro* y ácidos grasos cuando infecta a sus huéspedes (Rivera y Camargo., 2015).

### **1.1.5. Técnicas de genotipificación molecular para CMTB.**

Conocer el genoma completo de *M. tuberculosis* fue de gran ayuda para su diagnóstico, identificación y posterior tipificación, dado que se han observado regiones bien conservadas de su ADN específicas del género y regiones hipervariables específicas de especie. Estos últimos son las que se utilizan como dianas, siendo las más estudiadas: el gen *hsp65*, que codifica la proteína de 65 kDa, regiones genómicas de la subunidad 16S, la región intergénica 16S-23S y los elementos de inserción (González-Martin, 2014).

Las técnicas de tipificación molecular se enfocan al análisis epidemiológico molecular, ya que se desconocen los genotipos que producen la tuberculosis en ciertas regiones o países del mundo, por lo que es importante determinar si pertenecen o no al mismo genotipo a los que producen dicha enfermedad y si alguna predomina ante las demás. Estos estudios se basan en tomar regiones del genoma bacteriano, que son utilizados como marcadores genéticos. Cada técnica produce un perfil genético que es específico para la cepa examinada y esos perfiles son referidos como huellas digitales (García, 2009).

Estudios han revelado que dentro de una familia hay cepas más virulentas o bien más transmisibles que otras, lo cual anteriormente se desconocía (González-Martin, 2014). También ha permitido documentar más contaminaciones cruzadas en los laboratorios de las que se sospechaban. Por lo que estas técnicas son de gran importancia en Epidemiología Molecular. Algunas de las técnicas más utilizadas son:

a) *Análisis de los Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (IS6110 RFLP)*, se basa en una diferencia en la secuencia de nucleótidos que permite reconocer los distintos alelos mediante digestión del DNA con enzimas de restricción, ya que la presencia o ausencia de un

lugar de restricción hace que se generen fragmentos de distinta longitud. La secuencia IS6110 permite conocer el número de copias y el tamaño de los fragmentos generados por la digestión (González-Martin, 2014). Esta técnica permite el reconocimiento de brotes y cadenas de contagio, así los aislamientos pueden ser relacionados epidemiológicamente de los que no lo están. Dado por su selectividad para distinguir a *M. tuberculosis* y *M. bovis* únicamente dentro del complejo (Vázquez-Heredia, 2017; (Rosero y Corral., 2008).

b) *Space oligonucleotide typing* o *spoligotyping*, se basa en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), esta técnica permite la identificación de cepas de *M. tuberculosis* mediante espaciadores presentes en las repeticiones directas en la región DR del cromosoma (Gori et al., 2005). Los espaciadores son amplificados juntos e hibridizados contra 43 oligonucleotidos específicos fijados a un soporte de membrana. Los patrones revelan los espaciadores presentes en cada cepa, permitiendo diferenciar e identificar cepas iguales dentro del CMTB, y así poder ser clasificados en *clusters* y en cepas únicas que no presentan un patrón compartido (Sequera C et al., 2008), (González-Martin, 2014).

c) MIRU-VNTR, se basa en el Número Variable de Repeticiones en Tándem (VNTRs) de unidades repetitivas intercaladas de micobacterias (MIRU). La técnica utiliza un conjunto de 12 o 24 *loci*, y el número de unidades repetidas puede determinarse por el tamaño de todo el *locus* (González-Martin, 2014); (Jafarian et al., 2010). El poder discriminatorio de la tipificación con esta técnica depende del número y el conjunto de *loci* utilizados y puede ser mejorado por la inclusión de *loci* hipervariable en lugares donde predominan geográficamente genotipos altamente homogéneos, pertenecientes al CMTB (Nikolayevskyy et al., 2016).

## **1.2 Mecanismos de resistencia.**

Los mecanismos de resistencia que presenta *M. tuberculosis* se puede clasificar en dos grupos: mecanismos de resistencia intrínseca y mecanismos de resistencia intrínseca.

### **1.2.1. Mecanismos de Resistencia Intrínseca.**

Son mecanismos que permiten neutralizar la acción de los antibióticos y no sólo limitan la aplicación de los medicamentos disponibles, sino que obstaculizan el desarrollo de nuevos fármacos (Smith y et al., 2013).

a) La impermeabilidad de la pared, que funciona como una barrera efectiva que impide la penetración de los antibióticos, ya que es muy gruesa, formada por múltiples capas y con variada hidrofobicidad. Su composición es la siguiente: sáculos de péptido glucano están cubiertos por una capa de arabinogalactano; ambas capas están covalentemente unidas a una capa externa de ácidos micólicos, largas cadenas de ácidos grasos que forman una cera, restringiendo la penetración de moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas (Smith et al., 2013).

b) Las porinas, proteínas localizadas en las capas externas de la pared celular, que permiten importar nutrientes y pequeñas moléculas que se requieren en el crecimiento, también están involucradas en el paso de los antibióticos al interior de la célula. Aunque en *M. smegmatis* ya se ha estudiado la sobreexpresión de estos elementos, en *M. tuberculosis* no se ha demostrado directamente la relación entre las porinas y la susceptibilidad a medicamentos (Smith et al., 2013).

c) Modificación estructural de los puntos de acción de los medicamentos: un ejemplo es la resistencia natural de *M. tuberculosis* a macrólidos. Estos antibióticos detienen el crecimiento de las bacterias inhibiendo la maquinaria de síntesis de proteínas, al unirse a

un sitio específico del RNA ribosomal (Smith et al., 2013).

d) Modificación química de los medicamentos: un ejemplo es la acción de la enzima acetiltransferasa sobre los aminoglucósidos, lo que le confiere la resistencia a *M. tuberculosis* a medicamentos de éste grupo (Smith et al., 2013).

e) Degradación enzimática de los medicamentos: a través de enzimas hidrolasas, como las  $\beta$ -lactamasas (Smith et al., 2013).

f) Bombas de eflujo: muchas de estas proteínas de membrana participan en la fisiología de la bacteria: transportando nutrientes, toxinas, desechos y moléculas a través de la membrana. Sus funciones en la resistencia a antibióticos pueden ser secundarias y debidas a transportación no específica, expulsando el medicamento al exterior (Smith et al., 2013).

### **1.2.2. Mecanismos de Resistencia Adquirida.**

Son mutaciones cromosomales específicas que son seleccionadas bajo presión selectiva del antibiótico en uso. En *M. tuberculosis*, la transferencia horizontal de genes de resistencia vía plásmidos o transposones no ha sido reportada. Como cualquier otro rasgo durante la evolución selectiva, las cepas resistentes a antibióticos solo serán predominantes en la población de *M. tuberculosis* si el fenotipo resistente proporciona mutantes con ventajas de supervivencia sobre sus contrapartes sensibles. La prolongada exposición a los medicamentos debido a los largos tratamientos pueden contribuir de manera importante a la selección evolutiva de cepas resistentes que de otra manera apenas sobresaldrían entre la población debido a su reducido metabolismo comparado con cepas sensibles. Recientes estudios mostraron que la exposición de las bacterias a niveles sub letales promueve mutagénesis celular, incrementando las tasas de mutaciones en los genes de resistencia. Los mecanismos de resistencia adquirida están frecuentemente asociados a una reducción del metabolismo en las mutantes resistentes. Se han observado mecanismos compensatorios en éstas cepas, por

ejemplo, sobre-expresión de enzimas o mutaciones adicionales que corrigen el costo metabólico (Smith et al., 2013).

Los principales genes en los que se encuentran localizadas mutaciones relacionadas con resistencia a medicamentos son: *katG* y *prom mabA* (INH), *rpoB* (RIF), *embB* (EMB), *rrs* y *rpsL* (SM) y *pncA* (PZA). Este tipo de mutaciones independientes se localizan en genes que codifican ya sea el blanco de acción del medicamento o la enzima involucrada en la activación del medicamento. Sin embargo, las bases genéticas de la resistencia a algunos agentes anti-TB no son totalmente conocidas (De Rossi et al., 2006).

### **1.2.3. Resistencia a antibióticos antituberculosos.**

El tratamiento antituberculoso se inició en la década de 1940. Al aparecer los primeros fármacos para el tratamiento, comenzaron a aparecer con la resistencia de las cepas de *M. tuberculosis*. Durante varias décadas el problema se detectó entre pacientes previamente tratados. En la actualidad la resistencia se ha convertido en un gran problema que sigue creciendo con los años. La TB Multifarmacorresistente o Multirresistente (TB-MR) es un problema que ha alcanzado proporciones epidémicas en varias regiones del mundo (Montoro et al., 2011).

La propagación de la TB multirresistente (TB-MR) y Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XR) a los medicamentos dificulta a los esfuerzos globales en la lucha contra la tuberculosis. Es necesario el desarrollo y evaluación de las pruebas de diagnóstico rápidas y eficientes, de las muestras y cepas, para su caracterización a farmacorresistencia (Tessema et al., 2017).

La resistencia a los medicamentos se desarrolla como resultado del tratamiento inadecuado de TB, la adherencia incompleta al tratamiento, o a los niveles de fármaco subterapéuticos (resistencia adquirida), aunque puede desarrollarse de igual manera después de varias rondas de tratamientos ineficaces, incluyendo el uso de medicamentos de segunda línea, o por la infección directa con una cepa resistente. La forma más grave de resistencia implica por lo menos cuatro fármacos de primera y segunda línea por lo que la tasa de éxito al tratamiento es



menor del 40% en la mayoría de los pacientes y la tasa de mortalidad es de 50 a 80% (Shah et al., 2017).

Por lo tanto, las epidemias de cepas resistentes pueden deberse a tres mecanismos:

- Conversión de cepas silvestres pansusceptibles durante el tratamiento (resistencia adquirida).
- Incremento del desarrollo de la resistencia en cepas debido a una quimioterapia apropiada (resistencia amplificada).
- Transmisión de cepas mutantes a personas susceptibles produciendo casos nuevos o recaídas de TB resistente (resistencia transmitida) (Mendoza Ticona., 2008).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud los casos de farmacorresistencia pueden ser clasificados en dos grupos, tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR) y tuberculosis multidrogorresistente (TB-MR), esto dependerá de la capacidad que presentan las cepas de resistir a los fármacos de primera y segunda línea (Chen et al., 2013).

La Tuberculosis multidrogorresistente se define por la resistencia del bacilo a, como mínimo Isoniazida y Rifampicina. Ambos siendo tuberculostáticos más potentes pertenecientes a los fármacos de primera línea (Chen et al., 2013).

El término TB extremadamente drogorresistente (TB-XDR) se refiere a la TB producida por una cepa de *M. tuberculosis* con una resistencia demostrada a por lo menos: Isoniazida, rifampicina, una fluoroquinolona (ciprofloxacino, levofloxacino, ofloxacino o maxifloxacino) y un fármaco parenteral de segunda línea (aminoglucósidos: kanamicina y amikacina o capreomicina) (Mendoza Ticona., 2008).

En 2015 el número estimado de nuevos casos de TB-MR fue de 480 000, más 100 000 casos de TB resistente a la rifampicina, por otro lado datos recientes muestran una tasa de éxito en el tratamiento de 52% para TB-MR y 28% en la TB-XDR. Países de África y Asia ya han introducido pautas de tratamiento para la TB-MR (OMS, 2016). A nivel mundial se ha buscado garantizar el acceso a una prueba de sensibilidad que permita evaluar la resistencia a isoniazida y rifampicina. Es por

ello, que el uso de técnicas de biología molecular para la identificación rápida en los genes relacionados con polimorfismos que confieren resistencia, sería en muy poco tiempo. Esto a su vez conlleva a repercusiones terapéuticas y epidemiológicas para el control de la enfermedad (Espinoza, 2004).

### **1.3. Isoniazida.**

#### **1.3.1. Estructura y mecanismo de acción.**

La isoniazida es la hidrazida del ácido isonicotínico, descubierto tras observar que la nicotinamida posee actividad anti-tuberculosa (Flóres y Armijo., 2014). Es uno de los principales medicamentos para el tratamiento de la tuberculosis. Tiene una estructura simple que contiene un anillo de piridina y un grupo hidrazida Fig. 1., ambos componentes son esenciales para favorecer una mayor actividad contra *M. tuberculosis* (da Silva y Palomino., 2011).

Es bacteriostático para los bacilos en etapa de reposo, pero es bactericida si están en fase de división rápida. Se considera un profármaco, ya que la enzima micobacteriana catalasa-peroxidasa convierte a la isoniácida en su metabolito activo. Su acción consiste en inhibir la biosíntesis de ácidos micólicos, los cuales se caracterizan por ser lípidos largos y ramificados (90 átomos de carbono), unidos a un polisacárido único, el arabinogalactano, para formar parte de la pared celular micobacteriana y que le proporciona en gran medida la característica de ser impermeable. El blanco molecular de acción es la enzima *enoil*-ACP reductasa codificada por el gen *inhA* la cual está involucrada en la vía de síntesis de los ácidos micólicos. La isoniazida es activada por la enzima catalasa-peroxidasa codificada por el gen *katG* y se une al producto genético de *inhA* (*enoil*-ACP reductasa). Al reaccionar el NADH con la *enoil*-ACP reductasa forma un aducto isoniazida-NAD causando su inactivación (Cossio et al., 2007). Dando como resultado la nula conversión de los ácidos grasos insaturados en ácidos grasos saturados, en la vía biosintética del ácido micólico, lo que resulta con la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos y por lo tanto la muerte celular bacteriana (Coll, 2009).

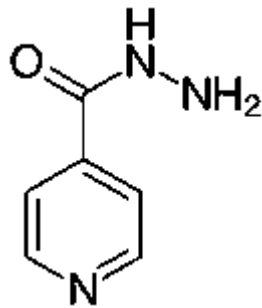
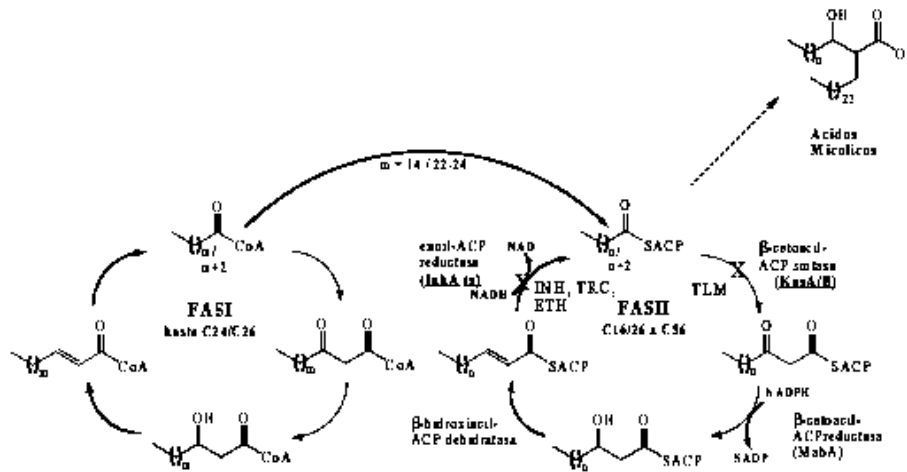


Fig. 1. Estructura química de la isoniazida.

Estos ácidos micólicos son exclusivos de esta clase de bacterias lo que da como resultado un alto grado de selectividad de la actividad antimicrobiana. La isoniazida también puede inhibir a la peroxidasa micobacteriana, que es la enzima que activa al fármaco, lo que da como resultado el aumento de la probabilidad de



dañar a las micobacterias con oxígeno reactivo y  $H_2O_2$  (Cossio et al., 2007).

Figura. 2. Ruta metabólica de la síntesis de ácidos micólicos y la acción de inhibición enzimática de la peroxidasa micobacteriana por acción de la Isoniazida (INH) (Cossio et al., 2007).

## **1.3.2. Mutaciones relacionadas con la resistencia a**

### **Isoniazida.**

La resistencia es un proceso complejo. Las mutaciones que han sido asociadas con resistencia a isoniazida son, *katG*, *ahpc*, *inhA*, *Kasa* y NDH. Pero solo dos mecanismos han podido demostrar ser la principal causa de resistencia: mutaciones en *katG* y en *inhA*. Se han observado mutaciones con sentido y sin sentido, inserciones, deleciones, truncamiento y más raramente supresión de genes (da Silva y Palomino., 2011).

El gen *katG* es un gen no esencial y, por lo tanto, no se puede considerar como blanco farmacológico. Por lo que el metabolito de la isoniazida en su forma activa va enfocado al gen *inhA* que codifica para una enzima esencial, ya que este gen solo puede soportar una cierta cantidad de remplazos de aminoácidos sin alterar su función enzimática. En cambio *katG* es una enzima no esencial y su pérdida impide la activación de la isoniazida (De La Iglesia y Morbidoni., 2006).

La mutación mayormente reportada y más conocida es S315T, en el gen *katG*, lo que da una deficiencia en la formación del aducto isoniazida-NAD relacionado con actividad antimicrobiana. Esta mutación se ha relacionado con mayor frecuencia en cepas multidrogoresistentes (MDR) que en las cepas monorresistentes. Se ha observado que esta mutación es de segunda etapa, que ocurre después de un largo periodo de quimioterapia inapropiado (da Silva y Palomino., 2011).

Las mutaciones en *inhA* causan resistencia a isoniazida y a etionamida relacionada estructuralmente con fármacos de segunda línea. Esta mutación es más común que ocurra en su región promotora y se ha observado con mayor frecuencia asociada con cepas monorresistentes (da Silva y Palomino., 2011).

Otro mecanismo de resistencia se da por una mutación del gen *kasA*, este gen se ha reportado como funcional dentro de la biosíntesis de ácidos micólicos. Otras mutaciones como la de la Deshidrogenasa del Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina Reducido (NADH) también confieren resistencia (Cossio et al., 2007).

### **1.3.3. Genes involucrados en la resistencia a Isoniazida.**

La cepa de *M. tuberculosis* más estudiada es la H37Rv. Su genoma consta de 4 011 genes y comprende 4 411 529 pb con un contenido de 65.6% de Guanina y Citosina (G/C), por lo que es considerada una de las secuencias bacterianas más grande (Rivera y Camargo., 2015).

Como ya se ha mencionado, los principales genes relacionados con resistencia isoniazida son el *katG* y el *inhA*. Se ha observado que del 30% - 65% de las mutaciones en *katG* se localizan en el codón 315, aunque también se han reportado otras mutaciones de menor frecuencia en los codones 300, 321, 463, 501, 525, 587, 700. Se ha estimado que la relación de mutación en ambos genes en relación a la resistencia a isoniazida es del 70% - 80%, pero también se ha observado que un porcentaje posee el genotipo silvestre, por lo que se piensa deben existir otros mecanismos de resistencia (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas., 2010).

Una de estas mutaciones es la del gen *ahpC*, que codifica para la enzima Alquil hidropoxidasa tipo C. Esta proteína es capaz de detoxificar peróxidos orgánicos y probablemente, también peróxido de hidrógeno. La peroxiredoxina *ahpC* difiere de otras proteínas *ahp*, ya que mediante estudios mutagénicos, se ha observado tres residuos de Cisteína, que son esenciales para la actividad catalítica. La elevada expresión de este gen se asocia con resistencia a la isoniazida cuando presenta mutación a nivel de la región promotora (Rivera y Camargo., 2015). Otros estudios demuestran que el aumento en la expresión de dicho gen parece ser una mutación compensatoria para la pérdida de actividad de la catalasa-peroxidasa en lugar de la base de la resistencia a la isoniazida (da Silva y Palomino., 2011).

Otro gen en que se han reportado mutaciones es el *ndh*, donde se ha observado reducción en la actividad de la NADH deshidrogenasa y producen por lo tanto resistencia a la isoniazida y la etionamida, aunque es común que vaya acompañado con otras mutaciones tales como *inhA* y *katG*. Aunque también se han reportado con menor frecuencia mutaciones en A13B, V18A, junto con NADH y *katG* (da Silva y Palomino., 2011).

El gen *oxyR* se encarga de regular la respuesta al estrés oxidativo y de nitratos,

también regula algunos genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo, incluye el gen *ahpC*, *katG*, *gorA*, *fur*, *dps* y *oxyS*. Se ha observado una estrecha relación con el gen *ahpC* (Rivera y Camargo., 2015). Parece ser que mutaciones en esta relación produce la reducción del nivel de expresión de *inhA* y por ello con la resistencia a la isoniazida (da Silva y Palomino., 2011).

El gen *fur* se localiza río arriba de la región de inicio del codón de *katG*. Esta región contiene un marco de lectura que codifica para la proteína *furA* (regulador de captación férrica A), un homólogo de *fur* que actúa como regulador de la captación del hierro y en la detoxificación de radicales de oxígeno (Rivera y Camargo., 2015). La baja regulación de expresión de *katG* también ha sido demostrada, por presentar resistencia a la isoniazida, dada por la presencia de mutaciones en la región intergénica *furA-katG* (da Silva y Palomino., 2011).

También se han observado que cepas resistentes presentan mutaciones en el locus *kasA*, el cual implica otro posible blanco de la isoniazida, es la proteína *kasA*, involucrada en el mecanismo de elongación de los ácidos grasos (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas., 2010).

#### **1.3.4. El gen *katG*.**

Las micobacterias patógenas usan diversas estrategias para sobrevivir dentro de las células fagocíticas, ya que deben evitar los mecanismos bactericidas de estas células, como las enzimas lisosomales, actividad de reactivos intermediarios del oxígeno y del nitrógeno. Uno de estos mecanismos puede llevarse a nivel génico con la producción de enzimas como la *catalasa/ peroxidasa* codificada por el gen *katG* la cual contribuye a la detoxificación de los reactivos intermediarios de oxígeno o nitrógeno. Por lo tanto esto le confiere protección a *M. tuberculosis* (Chacón, 2004).

La catalasa-peroxidasa codificada por este gen es una proteína de 80 kDa, compuesta por 740 aminoácidos, que se encuentra en una región relativamente inestable, haciendo esto susceptible de sufrir inserciones, deleciones y mutaciones. (Rivera y Camargo, 2014). Este gen tiene una longitud de 2223 pares

de bases (pb), se encuentra ubicado del codón 2153889 al codón 2156111 (2153.89 kb) (Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST, 2011).

### **1.3.5. Enzima catalasa-peroxidasa.**

Esta enzima es nombrada bifuncional ya que posee actividad de peroxidasa y de catalasa, en otras palabras, es una hemoproteína bi-funcional que pertenece a la clase I de la superfamilia de peroxidases (plantas, hongos y bacterias). Presenta una alta homología de secuencia con peroxidases procarióticas, y una actividad catalítica equivalente a la de las catalasas monofuncionales a pesar de tener baja homología (Ghiladi et al., 2005). Como con otras catalasa-peroxidases, su actividad muestra una dependencia significativa del pH, con una actividad máxima a pH 7.0 (Johnsson et al., 1997) y una cinética enzimática de  $K_M = 192 \mu\text{M}$  para la isoniazida a pH de 7.2 (Kozak et al., 2012).

Esta proteína es un homodímero al presentar dos dominios los cuales han sido catalogados como cadenas A y B en su estructura (Zhao et al., 2006). Poseen un grupo prostético Hem que contiene un alto spin hierro férrico, por lo que la especificidad de la reacción se determina al parecer por la proteína alrededor del grupo Hem (Zémocký, 2004).

Casi todos los genes *katG* contienen dos copias fusionadas del gen de peroxidasa primordial. La copia traducida en el dominio N-terminal participa en la catálisis y posee el grupo prostético Hemo, pero la función catalítica del dominio C-terminal no es aparente, y por lo tanto el papel de la parte correspondiente de la proteína también se desconoce (Zémocký, 2004).

Una característica que está relacionada con la actividad catalítica en esta proteína es la presencia de dos enlaces covalentes entre las cadenas laterales de tres aminoácidos, Trp 107, Tyr 229, y Met 255 (numeración *M. tuberculosis*) situados en el lado distal del sitio activo Hem. Varios estudios de mutagénesis han confirmado que se requiere el entrecruzamiento para la actividad catalítica, pero no para la actividad peroxidasa. (Ghiladi et al., 2005). Una herramienta de gran utilidad usada para analizar estas características es la realización de modelos proteicos ya que permiten el análisis de su función molecular, su historia evolutiva

o mejor aún, para estudiar el efecto de mutaciones puntuales (Singh y Dominy, 2010) (Kellogg et al., 2011).

#### **1.4. Modelado comparativo de proteínas (Homology modelling).**

El análisis de modelado comparativo de proteínas es una herramienta de gran utilidad en bioinformática. Es una técnica predictiva que permite obtener una aproximación de la estructura atómica de una cadena polipeptídica a base de estructuras conocidas de proteínas relacionadas, estos reciben el término de moldes o templados. Entre sus muchas aplicaciones se incluyen, el análisis del efecto de mutaciones hasta la predicción de ligandos y actividades catalíticas, esto dado en función de la calidad de los modelos, que dependen de su semejanza con las estructuras molde utilizadas (Contreras-Moreira, 2011).

Estos modelos comparativos se fabrican con ayuda de un software específico, que convierte una tarea compleja en algo sencillo. Básicamente se lleva a cabo siguiendo una serie de pasos (algoritmo genérico comparativo) (Contreras-Moreira, 2011): el cual consiste primeramente en la identificación de estructuras relacionadas en bases de datos en línea, una vez identificado se realiza la selección del templado, para posteriormente realizar la alineación de secuencia objetivo con la estructura del templado seleccionado. La construcción del modelo objetivo se realiza utilizando la información de la estructura del templado previamente evaluando la calidad del modelo (Contreras-Moreira, 2011).

Durante el modelado, el porcentaje de identidad entre la secuencia de interés y el templado deben ser lo suficientemente alto como para ser detectado como secuencia de alineamiento en formatos BLAST o FASTA. Para identificarlos el programa compara la secuencia de consulta con todas las secuencias de estructuras conocidas en el PDB (Krieger et al., 2003).

La incorporación de estas herramientas bioinformáticas, en conjunto con datos y estudios moleculares realizados en el estado de Michoacán, relacionado con resistencia a los antibióticos podría arrojar gran información sobre la influencia que



ejercen estas mutaciones sobre la estructura, función catalítica y variabilidad con la que se encuentran, ya que actualmente no se estudian las variantes locales de los genes de interés clínico.

### **1.5. Resistencia a los antibióticos en Michoacán.**

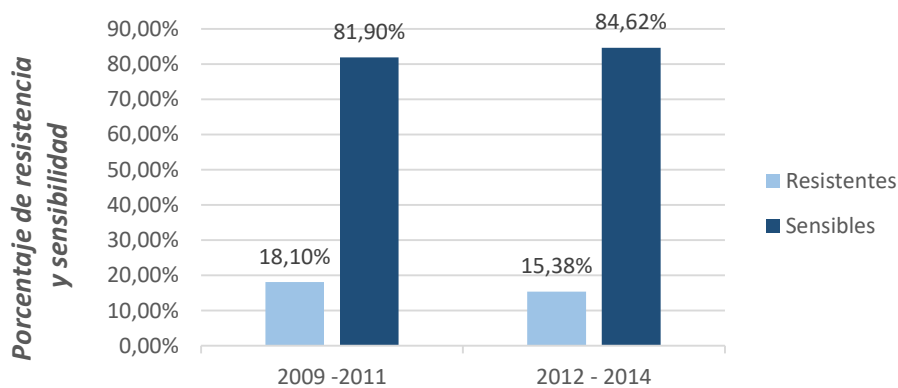
Los estudios realizados por Pérez-Reyes (2011) y Alcázar-Contreras (2014), con cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Michoacán, en los cuales se analizaron varios genes relacionados con resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea, reportan que el gen *katG* fue el que presentó mayor cantidad de mutaciones. Para el primer estudio la mutación Ser315Thr fue la más común al igual que la mutación Arg463Leu, ambas mutaciones son comúnmente reportadas en el estado, mientras que en el segundo estudio la más frecuente fue Arg463Leu seguida de Ser315Thr.

Del total de cepas analizadas en esos períodos, solo se obtuvieron 8 cepas (10.5%) con presencia de resistencia a isoniazida y solo dos (2.63%) de las ocho cepas presentaron resistencia pero carecían de la presencia de mutación. En el periodo de 2009-2011 la presencia de resistencia a isoniazida fue del 18.1%, en una relación mutación-resistencia se observó un 9.09% para la mutación Ser315Thr y 3.03% para Tyr413Cis, esta última no ha sido reportada en las bases de datos. Mientras que en el periodo 2012-2014 el 15.38% de cepas resistentes presentó la mutación Ser315Thr. Pudiendo determinarse así un incremento y persistencia de esta mutación en el estado de Michoacán.

**Tabla 1. Comparación de polimorfismos encontrados en el gen *katG* de cepas aisladas en diferentes periodos**

Periodo de aislamiento	No. CEPA	MUTACIÓN	NUCLEÓTIDO	CODÓN	CAMBIO DE AA	ANTIBIOGRAMA
2009-2011	004	G---T	1388	463	Arg413Leu	S
	012	A---G	1238	413	Tyr413Cis	R
	015	G---A	1516	506	Glu506Lys	S
	016	G---C	944	315	Ser315Thr	R
	017	G---C	944	315	Ser315Thr	R
	018	G---T	1388	463	Arg463Leu	S
	024	G---C	944	315	Ser315Thr	R
	025	---	---	---	---	R
	027	G---T	1388	463	Arg463Leu	S
	040	---	---	---	---	R
2012-2014	045	C---G	1233	411	Ala411Ala	S
	049	C---G	1233	411	Ala411Ala	S
	59	G---C	944	315	Ser315Thr	R
	60	C---G	1233	411	Ala411Ala	S
	62	G---T	1388	463	Arg411Ala	S
	65	G---C	944	315	Ser315Thr	R
	71	G---T	1388	463	Arg463Leu	S
	72	C---T	1388	463	Arg463Leu	S

R. Resistente; S. Sensible.



**Figura 3.** Porcentaje de cepas de *M. tuberculosis* sensibles y resistentes aisladas en los periodos 2009-2011 y 2012-2014 en el estado de Michoacán.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Es de gran importancia realizar estudios moleculares y clínicos para la detección de marcadores moleculares de resistencia, para demostrar e identificar la diversidad de mutaciones de las cepas circulantes en cada región, ya que la frecuencia de mutaciones en los genes asociados a resistencia a isoniazida (INH) varía de acuerdo a la zona geográfica; además, constantemente se están reportando mutaciones nuevas. De esta manera se pueden observar e identificar mutaciones de mayor prevalencia para cada caso y así poder tener un mayor potencial diagnóstico y epidemiológico en cada región.

El laboratorio de Genética Molecular Microbiana cuenta con una colección de 120 cepas de *M. tuberculosis*, recolectadas a partir del año 2009 que incluye datos epidemiológicos de los pacientes, como: ubicación de la enfermedad, edad, género, comorbilidad y jurisdicción de procedencia. Estudios similares se realizaron en 2011 y 2014, en los cuales se estudiaron los determinantes genéticos asociados a la resistencia a antibióticos en 76 cepas del estado de Michoacán, en los cuales se incluye fármacos de primera línea y el análisis del gen *katG* relacionado con la isoniazida (INH). Las mutaciones que presentaron mayor número de resistencia fue S315T, reportada en la literatura como la más frecuente relacionada a resistencia a este fármaco (Pérez-Reyes, 2011; Alcázar-Contreras, 2014). La colección de cepas también ha sido tipificada utilizando las técnicas de espigotipificación, MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of Repeats), análisis de deleciones específicas de especie de 8 regiones genómicas. Con estas técnicas se determinó la especie dentro del CMTB a la que pertenece cada aislado, familia y linaje (Vázquez Heredia, 2017; Pérez-Reyes, 2011; Frutos-Hernández, 2015).

Resulta interesante realizar estudios sobre marcadores de la resistencia a isoniazida (INH), ya que ésta recibe gran atención por su importancia terapéutica, para así poder diseñar marcadores y programas terapéuticos que puedan ser utilizados en la región de Michoacán y Querétaro para un diagnóstico más oportuno y eficaz.

### **3. HIPÓTESIS**

Mutaciones en la enzima catalasa/peroxidasa codificada por el gen *katG* de *M. tuberculosis* afectan *in silico* la estructura y función en cepas obtenidas de los estados de Michoacán y Querétaro.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general.**

Establecer mediante modelos proteicos, la influencia de las mutaciones presentes en el gen *katG* de cepas obtenidas en Michoacán y Querétaro.

#### **4.2. Objetivos específicos.**

- Identificar mutaciones en el gen *katG* de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en 2011-2014 en Michoacán y en Querétaro.
- Realizar un análisis comparativo entre las mutaciones encontradas y los genotipos reportados de las cepas aisladas en Michoacán y Querétaro.
- Analizar *in silico* la influencia de las mutaciones encontradas, sobre la estructura y función de la proteína codificada por *katG*.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Material biológico.

Para este estudio se incluyeron 39 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con tuberculosis pulmonar, de las cuales 20 de los aislados pertenecen al estado de Michoacán y 19 al estado de Querétaro; recolectadas durante el año 2015 (Tabla 2) y aisladas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán (LESP), el "Hospital General Dr. Miguel Silva" (HGMS), la Clínica no. 75 y el Hospital General del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Morelia Michoacán.

Se utilizó la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv donada por el D.C. Antonio Enciso Moreno, de la Unidad de Investigación del IMSS Zacateca.

**Tabla. 2. Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* utilizadas en este estudio.**

No. CEPA	ESTADO	ESPECIE	GENOTIPO
073	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	Uganda I
076	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
078	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	ND
080	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	LAM
081	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	S
082	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	S
083	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	NA
085	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	ND
087	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
088	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv
089	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
090	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
091	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
092	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	S

093	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	Este de África
094	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	S
095	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	S
096	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
097	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
098	MICH.	<i>M. tuberculosis</i>	Este de África
099	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	LAM
100	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	LAM
101	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	LAM
102	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
103	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
106	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
107	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	S
108	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	Este de África
109	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
110	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	Bovis
111	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	S
112	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
113	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	EAI
114	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	Bovis
115	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	LAM
116	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem
117	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	S
119	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	S
120	QRO.	<i>M. tuberculosis</i>	S

**LAM:** Latino-América-Mediterráneo; **EAI:** Este Africano-Indio; **SNR EA:** Espoligotipo No reportado del linaje Euro-Americano; **SNR IO:** Espoligotipo No Reportado del linaje Indo-Oceánico; **ND:** No determinado; **NA:** No aplica.

## **6.2. Manejo de muestras.**

Las resiembras de las cepas y la extracción de ADN se llevaron a cabo en campana de bioseguridad tipo IIA, con prácticas Nivel III (en un área aislada, con uso de mascarilla No. 98 y vestimenta de protección adecuada).

## **6.3. Extracción de ADN.**

Las cepas se resembraron en medio Lowestein-Jensen y se incubaron a 37°C por tres a ocho semanas. Se tomaron las colonias crecidas y se suspendieron en 600µL de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM pH8, SDS 10%, NaCl 5 M, EDTA 0.5M). Se inactivaron a 80°C por 60 minutos. Se agregaron 600µL de fenol-cloroformo (1:1). Las muestras se agitaron fuertemente y se centrifugaron a 9.3g por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 600µL de fenol-cloroformo (1:1). Tras una fuerte agitación se centrifugaron a 9.3g por 10 minutos. Una vez más, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, al cual se le agregaron 600µL de isopropanol frío mezclando suavemente por inversión e incubando a -20°C por 10 minutos. En seguida se centrifugó la muestra a 9.3 g por 10 minutos. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se lavó una vez con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca la pastilla, esta se resuspendió en 30µL de agua desionizada estéril. A continuación se realizó el tratamiento con ARNasa adicionando 3µL de enzima Pure Link ARNasa de Invitrogen e incubando a 37°C por 30 minutos. Posteriormente la muestra se centrifugó por 10 minutos a 9.3 g, se lavó dos veces con 200µL de etanol al 70% y se dejó evaporar a sequedad. La pastilla de ADN se resuspendió en 50µL de agua y se mantuvo en congelación a -20°C hasta su uso (Sambrok y Russell et al., 2001).

## **6.4. Amplificación por PCR.**

Se estandarizaron las condiciones de amplificación del gen *katG*, utilizando el ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y los iniciadores MTB38F: GCATGGCCATGAACGACGTC y MTB38R: CGTTGACCTCCCACCCGACTT



(Chia et al., 2012).

Las reacciones de 25µL contenían una solución reguladora (Tris-HCl 20mM, pH 8.4; KCl 50nM), MgCl<sub>2</sub> 1.5nM, dNTP's 0.2mM, 1µM de cada iniciador, 1ng/µL de ADN y 0.04 U/µL de Taq DNA polimerasa recombinante de Invitrogen.

Para realizar las amplificaciones se utilizó un termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler para estandarizar las temperaturas de amplificación y para obtener las amplificaciones finales de cada cepa. El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial a 95°C/15 min; 30 ciclos con: desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 68°C por 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg; y una extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio, usando un fotodocumentador Chemi Doc de BioRad.

## **6.5. Secuenciación.**

Los productos amplificados fueron secuenciados por la empresa Elim Biopharm utilizando un secuenciador de electroforesis capilar ABI 3730xl de Applied Biosystems.

## **6.6. Análisis de datos.**

Una vez obtenidas las secuencias del gen de interés *katG* de las 39 cepas analizadas, se realizó una edición en las secuencias utilizando el programa BIOEDIT, Sequence Alignment Editor.

La búsqueda de SNP's se realizó mediante un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas en el programa ClustalX y Mega para un segundo alineamiento, para el gen *katG* de las 39 cepas y la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (obtenidas de la página Gen Bank, número de acceso NC\_000962).

## **6.7. Modelado por homología.**

Se utilizaron las secuencias de cada una de las cepas utilizadas. Esto se realizó únicamente para ejemplificar la estructura de la *catalasa-peroxidasa*, la región amplificada en la proteína y la posición de la mutación. Para este fin se utilizó un servidor en línea llamado SWISS-MODEL, el cual es una base de datos de moldes o templados (templates) de estructuras proteicas obtenidas por rayos X. Una vez seleccionado el templado se validó su calidad utilizando un programa en línea llamado ProSA-MODEL, este programa es una herramienta que permite validar la estructura, reconociendo los errores en modelos experimentales y teóricos, usados comúnmente en la predicción de estructuras y los modelados (Wiederstein y Sippl., 2007).

Una vez validado el templado, se inserta en el programa UCSF Chimera versión 1.11.12. El programa permite la visualización en 3D interactiva, el análisis de estructuras moleculares y los datos relacionados, alineamientos de secuencias, resultados de acoplamiento, trayectorias y conjuntos conformacionales (Meng, et al., 2006).

## **6.8. Predicción de SNP's.**

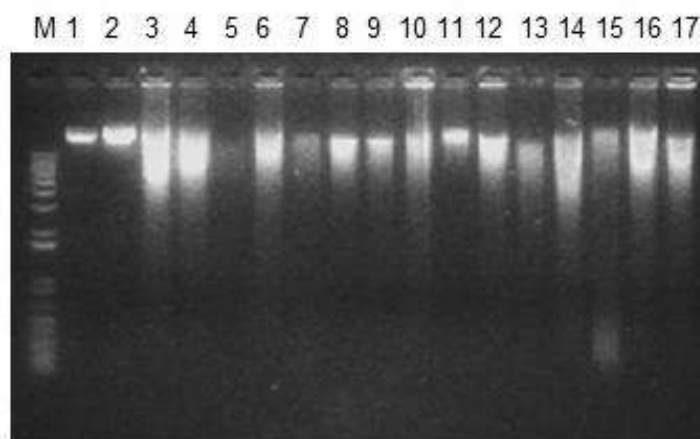
El análisis de la estabilidad proteica permite determinar la eficacia de su función. Para determinar la pérdida de la función es importante analizar la estabilidad proteica. La predicción se realizó con la finalidad de entender el impacto y función en la estructura en el proteoma de la enzima codificada por el gen *katG* (*catalasa-peroxidasa*), y predecir los efectos de los SNP's (Polimorfismo de Nucleótido Único), y por lo tanto su estabilidad. Para llevar a cabo este pronóstico se trabajaron con herramientas en servidores en línea, uno de ellos es SIFT (Structure Integration with Function, Taxonomy and Sequences resource) el cual se basa en el grado de conservación de residuos de aminoácidos en la secuencia de alineaciones derivadas, con secuencias estrechamente relacionadas, comparadas a través de PSI-BLAST (Standard Protein BLAST) (Velankar et al., 2013).

Otro servidor utilizado fue DUET el cual combina MCSM (Machine Cutoff Scanning Matrix) y SDM en un consenso de predicción, mediante la comparación de los resultados de los métodos por separado en un pronóstico optimizado utilizando Support Vector Machines (SVMs) para predecir los efectos de las mutaciones erróneas sobre la estabilidad de la proteína (Pires et al., 2014).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Calidad del ADN obtenido

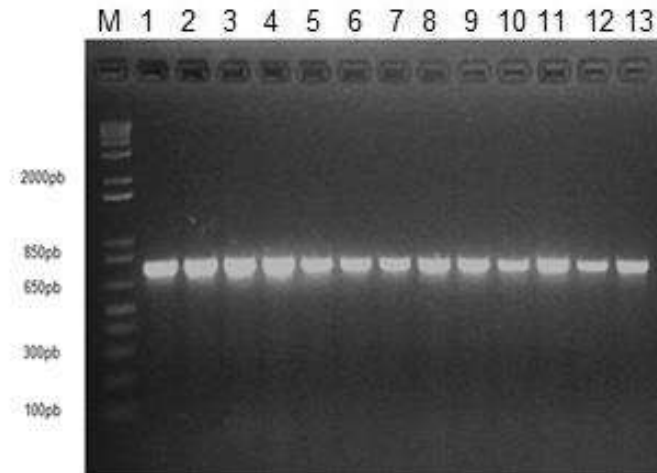
El ADN extraído de las 39 cepas de estudio, fue de alto peso molecular y de calidad adecuada para la realización de los experimentos posteriores (Fig. 4).



**Figura 4. ADN de las cepas de estudio.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra: carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder, Invitrogen), 1: ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv; 2-17 ADN de las cepas 073, 076, 078, 080, 081,082, 083, 085, 087, 088, 089, 090, 091, 092, 093, 094.

### 7.2. Amplificación por PCR del gen *katG*

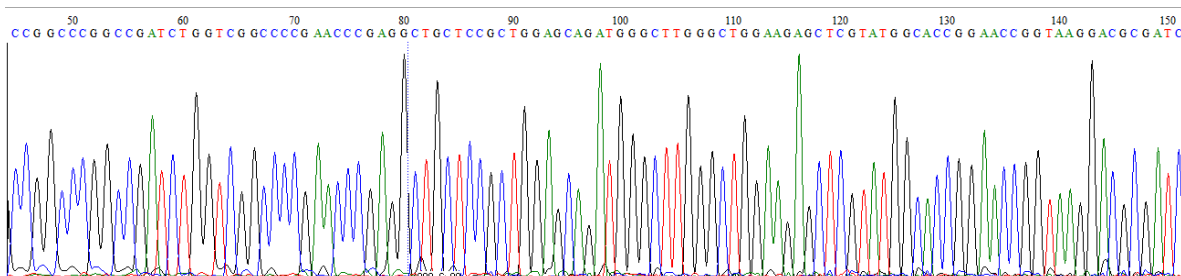
Se estandarizaron las condiciones de amplificación del gen *katG* utilizando el ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv. Tanto para la cepa de referencia como para las 39 cepas de estudio, se obtuvo el amplicón del tamaño esperado de 765pb (Fig. 5).



**Figura 5. Amplificación del gen *katG* con el ADN de cada una de las cepas de estudio.** Geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestran Carriles: M, marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA ladder de Invitrogen los amplicones obtenidos con: carril 1 correspondiente al ADN de cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, del carril 2 - 11: amplificaciones obtenidas con el ADN de las cepas de estudio: 073, 076, 078, 080, 081, 082, 083, 085, 087, 088, 089, 090.

### 7.3. Secuencias de los fragmentos amplificados.

Los amplicones obtenidos de las 39 cepas se mandaron secuenciar obteniéndose los correspondientes electroferogramas, en los que se observaron picos definidos, sin ruido de fondo y con pocas indeterminaciones (Fig. 6).



**Figura 6. Electroferogramas.** Electroferograma obtenido en la secuenciación del gen *katG* de la cepa 073.

### 7.4. Detección de SNP's.

De las 39 cepas analizadas pertenecientes a los estados de Michoacán y



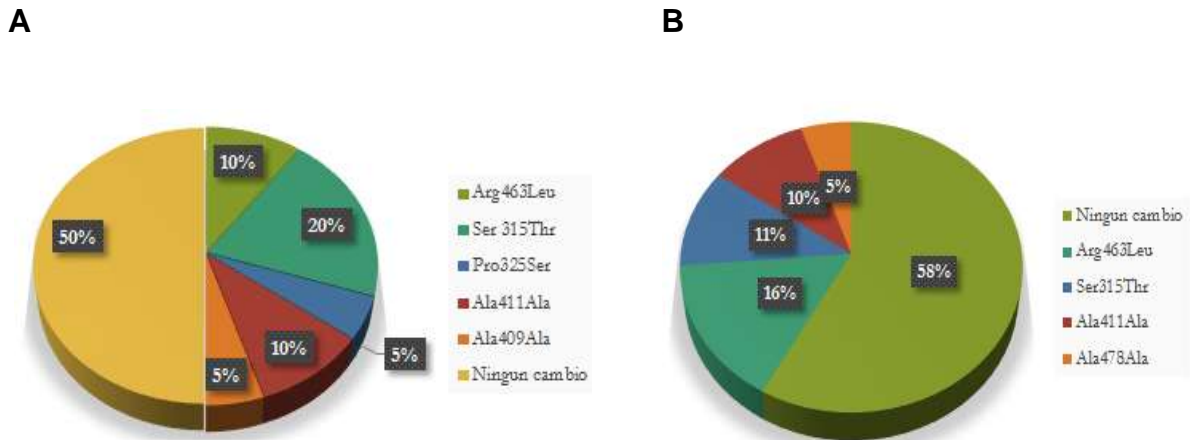
113, y 114.

**Tabla 3. Polimorfismos encontrados en el gen *katG***

CEPA	MUTACIÓN	NUCLEOTIDO	CODÓN	CAMBIO a.a.	S/NS	ENTIDAD
078	G---T	1388	463	Arg463Leu	NS	MICH.
080	G---C	944	315	Ser315Thr	NS	MICH.
081	C---T	973	325	Pro325Ser	NS	MICH.
082	G---C	944	315	Ser315Thr	NS	MICH.
	C---T	1227	409	Ala409Ala	S	
	C---G	1233	411	Ala411Ala	S	
083	G---C	944	315	Ser315Thr	NS	MICH.
085	G---T	1388	463	Arg463Leu	NS	MICH.
092	C---G	1233	411	Ala411Ala	S	MICH.
098	G---C	944	315	Ser315Thr	NS	MICH.
100	G---C	944	315	Ser315Thr	NS	QRO.
101	G---C	944	315	Ser315Thr	NS	QRO.
107	C---G	1233	411	Ala411Ala	S	QRO.
108	G---C	1434	478	Ala478Ala	S	QRO.
110	G---T	1388	463	Arg463Leu	NS	QRO.
111	C---G	1233	411	Ala411Ala	S	QRO.
113	G---T	1388	463	Arg463Leu	NS	QRO.
114	G---T	1388	463	Arg463Leu	NS	QRO.

**S:** sinónimo; **NS:** no sinónimo.

En las cepas de Michoacán las mutaciones sinónimas más prevalentes fueron C1227T y C41233G, que conservan un residuo de alanina. Por otro lado, en las cepas del estado de Querétaro se encontraron las mutaciones G1434C y C1233G, que conservan un residuo de alanina, ésta última fue la más prevalente en ambos estados.



**Figura 8.** Distribución de mutaciones (SNP's) presentes en el gen *katG* de las cepas provenientes de A) Michoacán y B) Querétaro.

## 7.5. Relación entre mutación y genotipo.

Al realizar el análisis comparativo entre mutación y los genotipos de las cepas (Tabla 4), se observó una relación del genotipo LAM con la mutación Ser315Thr, lo mismo se observó en el genotipo Bovis en el cual todas las cepas de este genotipo presentan la mutación Arg463Leu. El resto de los aislados no presentó ninguna tendencia relevante o característica en común con las mutaciones encontradas.

Una vez obtenidos los resultados de los análisis comparativos generales se realizó el análisis particular para cada entidad.

En este caso la variabilidad genotípica en el estado de Michoacán no muestra ninguna relevancia relacionada con alguna mutación, ya que en el genotipo S (29%), observado mayoritariamente en el estado, lo conforman las mutaciones Pro325Thr, Ser315Thr (Fig. 9<sup>a</sup>). En el genotipo LAM (14%) se observa la mutación Ser315Thr y Este África I (14%) igualmente se observa la mutación Ser315Thr. La mutación Ser315Thr se ve distribuida en tres de los genotipos observados en Michoacán. Para el estado de Querétaro los genotipos que se presentaron como los más predominantes fueron LAM con 40% (2/5) (Fig. 9B), Bovis con 40% con dos aislados de cinco que presentaron mutación. Otro genotipo que se presentó

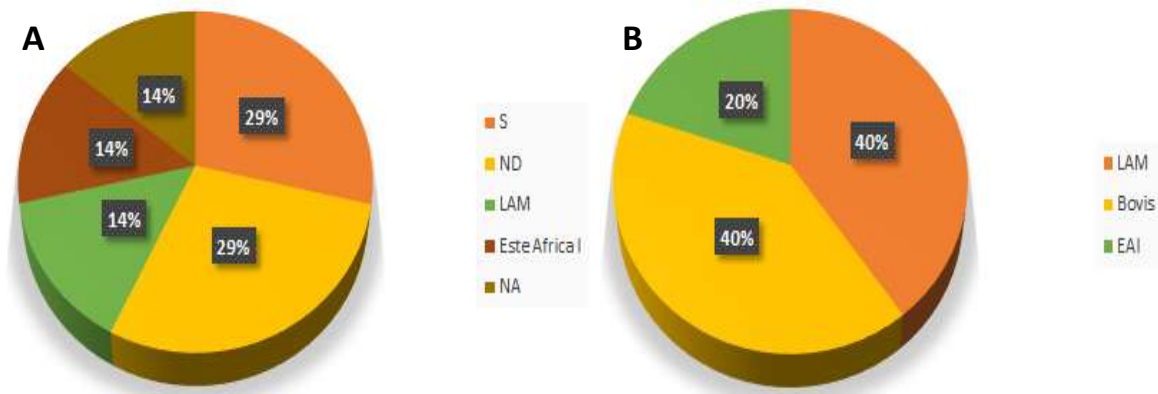


fue EAI con 20% (1/5) que presentaron mutaciones en *katG*. En ambas entidades se observó una proporción distinta en los genotipos compartidos, pero en el estado de Querétaro se encontró el genotipo Bovis ausente en Michoacán, lo que marca una diferencia entre ambos estados. En este estado al contrario de Michoacán los dos aislados que presentan el genotipo LAM, presentan también la mutación Ser315Thr, al igual que sucede con el genotipo Bovis en el cual todos presentan la mutación Arg463Leu.

**Tabla 4. Relación de mutaciones y genotipos de aislados provenientes de los estados de Michoacán y Querétaro.**

CEPA	SNP's	GENOTIPO	ESTADO
078	Arg463Leu	ND	Michoacán
080	Ser315Thr	LAM	Michoacán
081	Pro325Ser	S	Michoacán
082	Ser315Thr	S	Michoacán
083	Ser315Thr	NA	Michoacán
085	Arg463Leu	ND	Michoacán
098	Ser315Thr	Este África I	Michoacán
100	Ser315Thr	LAM	Querétaro
101	Ser315Thr	LAM	Querétaro
110	Arg463Leu	Bovis	Querétaro
113	Arg463Leu	EAI	Querétaro
114	Arg463Leu	Bovis	Querétaro

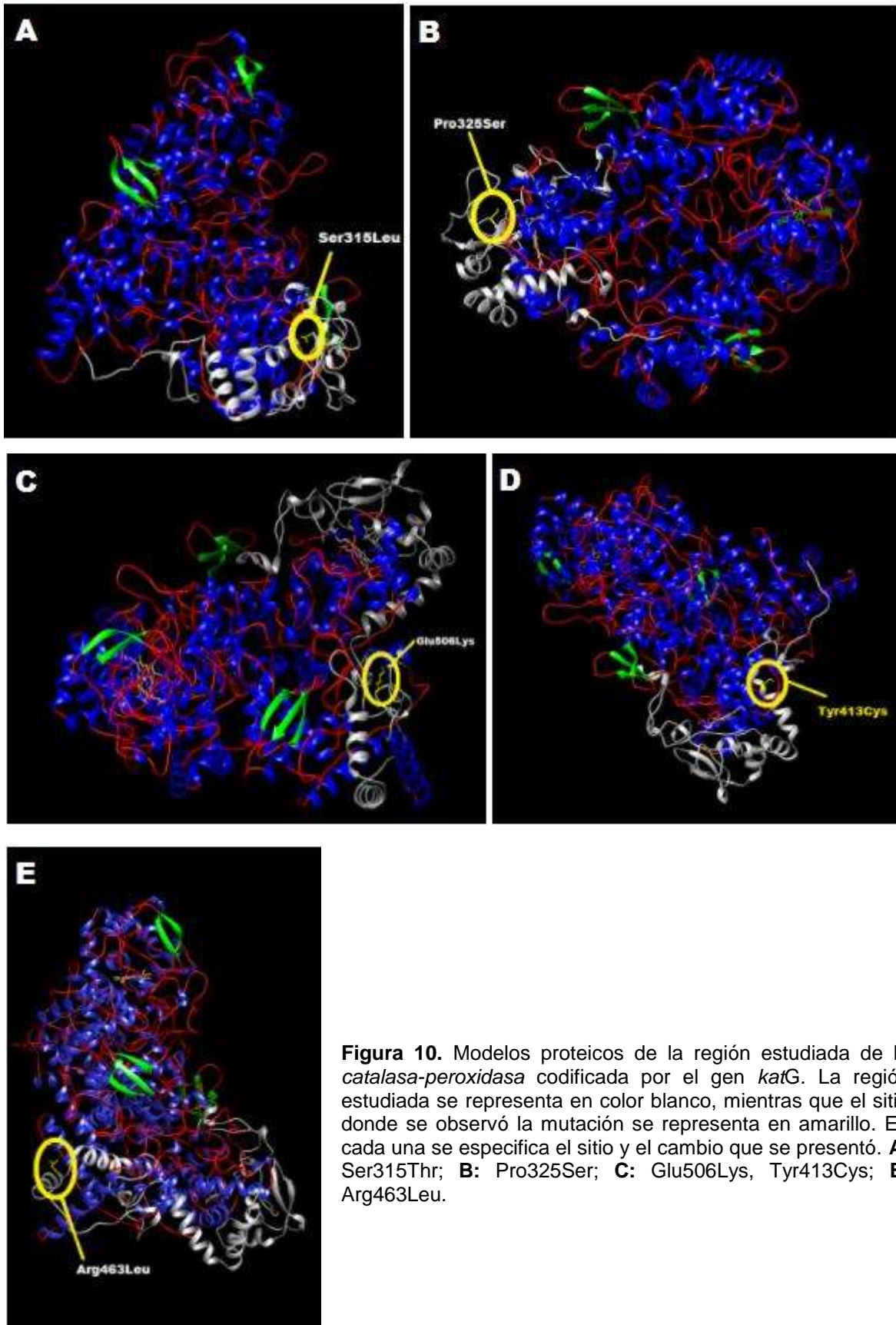
**NA:** No aplica; **ND:** No determinado; **LAM:** Latino-América-Mediterráneo; **EAI:** Este Africo-Indio.



**Figura 9.** Porcentaje de cepas de cada genotipo por entidad que presentaron mutaciones en el gen *katG*. A) Michoacán, B) Querétaro

## 7.6. Modelo proteico de la enzima catalasa-peroxidasa.

Se realizó el modelaje de la estructura proteica de la catalasa-peroxidasa con el fin de ubicar la región codificada por la región amplificada dentro de la proteína y la posición de las diferentes mutaciones dentro de esta región. Se realizaron modelados de las diferentes mutaciones de cada uno de los aislados incluyendo los datos de los periodos 2009 - 2011 y 2012 - 2014, (Fig. 11). Los aislados se agruparon de acuerdo a la mutación que presentaron. Cada una de estas mutaciones (Ser315Leu, Pro325Ser, Glu506Lys, Tyr413Cys y Arg463Leu) fueron analizadas individualmente para posteriormente analizar la estabilidad proteica.



## 7.7. Determinación de los pronósticos proteicos.

Se determinó el impacto que tenían los SNP's encontrados en las secuencias sobre la estabilidad en la estructura proteica de la catalasa peroxidasa, y así predecir su estabilidad de la función.

Se hizo el pronóstico para cada una de las mutaciones: Arg463Leu, Ser315Thr, Pro325Ser, Glu506Lys, Tyr413Cys. Se determinó que dichas mutaciones aportan un gran impacto en la función enzimática dada por la desestabilización de la estructura proteica. La *catalasa-peroxidasa* al ser una proteína homodimérica, presenta dos cadenas iguales A y B, las cuales fueron analizadas por separado en el servidor DUET (Tabla 5).

**Tabla 5. Resultados de los pronósticos de SNP's analizados en mutaciones del gen *katG* utilizando el servidor DUET.**

MUTACIÓN	DUET ( $\Delta\Delta G$ ) kcal/mol	CADENA	A. R. D.	ESTRUCTURA SECUNDARIA	RESULTADO
Arg463Leu	-0.512	A	29.9	Hélice alfa	Desestabiliza
	-0.459	B	30	Hélice alfa	Desestabiliza
Ser315Thr	-0.124	A	27.9	Curva	Desestabiliza
	-0.81	B	28.4	Curva	Desestabiliza
Pro325Ser	-2.796	A	5	H-bonded turn	Desestabiliza
	-2.816	B	4.9	H-bonded turn	Desestabiliza
Tyr413Cys	-0.995	A	3	Hélice alfa	Desestabiliza
	-0.769	B	2.7	Hélice alfa	Desestabiliza
Glu506Lys	-0.273	A	55	Loop o irregular	Desestabiliza

Resultados de los pronósticos para cada una de las mutaciones encontradas en el total de aislados, la ubicación en la proteína y por separado se muestra la cadena A y B. Los resultados predichos se expresan como la variación libre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) y los valores negativos indican mutaciones que desestabilizan. **A.R.D.:** Accesibilidad relativa al disolvente, estos cálculos se basan en el método Richards (Pires et al., 2014)

El servidor SIFT predijo a tres de las mutaciones como no toleradas siendo estas mutaciones: Ser315Thr, Pro325Ser y Tyr413Cys. Las mutaciones Arg463Leu y Glu506Lys fueron reportadas por el servidor como toleradas (Tabla 6). Cabe mencionar que Glu506Lys no ha sido reportada en ninguna base de datos hasta el momento.

**Tabla 6. Pronósticos utilizando el servidor SIFT del efecto de los SNP,s en el gen *katG***

MUTACIÓN	CONSERVACIÓN MEDIA DE LA SECUENCIA	SCORE DE PREDICCIÓN	FUNCIÓN PROTEICA	PREDICCIÓN
Ser315Thr	3.23	0.00	Afectada	No tolerada
Pro325Ser	3.23	0.00	Afectada	No tolerada
Tyr413Cys	3.23	0.00	Afectada	No tolerada
Arg413Leu	3.23	0.00	No afectada	Tolerada
Glu506Lys	3.23	0.00	No afectada	Tolerada

Resultados obtenidos utilizando el servidor SIFT para cada una de las mutaciones encontradas en el total de los aislados. Los resultados son expresados como Tolerados cuando el polimorfismo no afecta a la función proteica mientras que los No tolerados son aquellos que tendrán un cambio en la función proteica.

## 8. DISCUSIÓN

La tuberculosis es la enfermedad infecciosa que más ha afectado a la humanidad a lo largo de la historia, siendo aún hoy en día una causa de enfermedad y muerte, principalmente en las poblaciones más pobres de la sociedad. La tuberculosis puede ser una infección latente o en una enfermedad activa, presentándose esta última en su forma pulmonar o extrapulmonar. Otra de las características por las que cobra gran interés es su facilidad de desarrollar cepas farmacorresistentes, principalmente multi-drogorresistentes (MDR) y extremadamente drogo-resistentes (XDR), las cuales resultan en una morbimortalidad elevada, principalmente en países en vías de desarrollo (Barrios-Payán et al., 2010). Todo lo anterior hace importante el control epidemiológico y el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico molecular efectivas (Zumla et al., 2013). Por ello, en este estudio se llevó a cabo la detección de mutaciones en la secuencia del gen *katG* de cepas obtenidas en los estados de Michoacán y Querétaro, asociado con resistencia a isoniazida.

El 30.7% de las cepas (12/39) presentaron mutación en el gen *katG*, siendo la mutación Ser315Thr la más predominante, tal y como lo marca la literatura (Coll, 2009). Cabe señalar que únicamente se obtuvo la secuencia parcial del gen, comprendiendo la región donde de acuerdo a la literatura se encuentran las mutaciones más comunes (Sekiguchi et al., 2007). Esta mutación se presenta más comúnmente en cepas multi-drogorresistentes (MDR) al contrario de aquellas que solo presentan resistencia monovalente. Esto puede explicarse por la hipótesis de que esta mutación en el gen *katG* es el resultado de un largo periodo de quimioterapia inadecuada (da Silva y Palomino, 2011).

A pesar de lo anteriormente señalado, no se puede asegurar que el total de mutaciones están asociadas a farmacorresistencia, ya que no se realizaron pruebas de sensibilidad para confirmar esta capacidad bacteriana. Pero se puede considerar a la mutación Ser315Thr como un posible marcador de resistencia a isoniazida, pues se ha conservado desde el año 2009 al 2015 (Pérez Reyes, 2011;

Alcázar-Contreras, 2014).

La mutación encontrada en segundo lugar de abundancia fue Arg463Leu, en 5 cepas analizadas que ha sido reportada como prevalente en algunas zonas geográficas (Jagielski et al., 2013). Esta mutación es considerada por no tener una relación estricta con la resistencia a isoniazida, ya que no interfiere con la función de la actividad catalítica y tampoco con la estructura proteica, pero podría estar relacionada en la restauración de la actividad de virulencia y catalasa en cepas *katG*-negativas (Soolingen et al., 2001).

En Michoacán el gen *katG* no presentó ninguna mutación en el 50% de las cepas (10/20), mientras que la mutación prevalente en el resto, fue Ser315Thr con un 20% (4/20), reportada en el país como una de las mutaciones prevalentes relacionadas con *katG*. La mutación Arg463Leu presentó únicamente el 10% de prevalencia (2/20) siendo reportada comúnmente por diferentes estudios pero careciendo de relación con resistencia a la isoniazida (Flores-Treviño et al., 2014). Otra mutación encontrada fue Pro325Ser en una de las cepas (081) que representa el 1.17%, ésta no ha sido reportada en la literatura hasta el momento por lo que podría tratarse de una mutación que se presenta endémicamente en la región del estado de Michoacán. De ahí la importancia del seguimiento en la observación y control epidemiológico molecular en *M. tuberculosis* dentro del mismo estado y la interacción con los estados vecinos. En el estado de Querétaro la mutación con mayor prevalencia fue Arg463Leu con un 16% (3/19), y Ser315Thr con 11%. Presentándose en este estado 58% de cepas (11/19) sin alguna mutación.

Con respecto a los aislados de los estados de Michoacán y Querétaro, no se puede llegar a establecer una relación entre las mutaciones encontradas y los genotipos, debido a la gran variabilidad de genotipos reportados (Vázquez-Heredia, 2017). Estudios anteriores (Lukoye et al., 2014) no han podido establecer una relación significativa entre resistencia a medicamentos y genotipos dentro del CMTB en estudios realizados en diversas regiones del mundo, lo que podría respaldar lo encontrado en nuestro estudio.

Las mutaciones en INH están bien caracterizadas, por lo tanto, es posible predecir

sus efectos sobre una estructura proteica y la función, con la utilización de programas bioinformáticos. Esto ha permitido evaluar el potencial funcional de estas estructuras y su capacidad de predecir las mutaciones. El modelaje de la estructura proteica demuestra las posiciones de las diferentes mutaciones, presentando gran interés en Ser315Thr ya que como lo han mencionado estudios anteriores (Phelan et al., 2016) ésta no se encuentra dentro del interfaz del homodímero; sin embargo, se observa una fuerte asociación entre el ligando, dada por una distancia más corta entre 2.1 a 5.7Å según estudio realizado (Phelan et al., 2016), lo cual sugiere una desestabilización estructural y como resultado, la pérdida de la función enzimática como tal. Dicha desestabilización se encontró en cada una de las mutaciones repostadas en este estudio (Ser315Thr, Pro325Ser, Glu506Lys, Tyr413Cys, Arg463Leu) observándose no solamente la mutación Ser315Thr cerca del ligando, sino también a Pro325Ser y Tyr413Cys. Esto resulta importante ya que la predicción de la distancia del codón mutado a un ligando o su efecto sobre la estabilidad general, o las interacciones proteína–proteína pueden proporcionar un enfoque complementario para nuevas mutaciones que confieren resistencia (Phelan et al., 2016).



## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

- I. Las mutaciones más frecuentes en el gen *katG* incluyendo los datos de los periodos 2009 - 2011, 2012 - 2014 y 2015 fueron: Arg463Leu y Ser315Thr ambas con 12.9%.
- II. Las mutaciones más prevalentes en el estado de Michoacán fueron Ser315Thr (20%) y Arg463Leu (10%). Y en Querétaro fueron Arg463Leu (16%) y Ser315Thr (11%).
- III. Se encontró dentro del total de cepas que presentan alguna mutación, el genotipo S como el de mayor prevalencia con 38.8%, seguido por el genotipo LAM con 16.6%, Este de África I (11.1%), Bovis (11.1%), EAI (5.5%), no determinado (11.1%) y no aplica (5.5%).
- IV. En Michoacán, de los aislados de 2015 el 50% de prevalencia lo presentó el genotipo S, LAM (10%), Este África I (10%), no predeterminado (20%) y no aplica (10%).
- V. De los aislados de 2015 del Querétaro se observó al genotipo LAM y S con un 25%. Otros genotipos que se presentaron fueron Bovis (25%), Este de África I (13%) y EAI (12%).
- VI. En ambos estados se observó una proporción distinta en los genotipos compartidos. Pero la presencia del genotipo Bovis marca una diferencia entre estados.
- VII. El análisis de pronósticos con la herramienta SIFT, determinó que las mutaciones Ser315Thr, Pro325Ser y Tyr413Cys, no son tolerables por lo que afectan a la función de la proteína, mientras que Arg463Leu y GLu506Lys, son toleradas y no afectan la función.
- VIII. De acuerdo a la herramienta DUET las mutaciones Ser315Leu, Pro325Ser, Glu506Lys, Tyr413Cys y Arg463Leu, desestabilizan a la estructura proteica.
- IX. Los modelos proteicos de las mutaciones Ser315Thr, Pro325Ser, Glu506Lys, Tyr413Cys y Arg463Leu, indicaron su ubicación cercana al ligando, lo que puede dar como resultado la pérdida o desestabilización de la función enzimática.

## **10. CONCLUSIÓN**

Las mutaciones encontradas en las cepas de *M. tuberculosis* obtenidas de casos clínicos de los estados de Michoacán y Querétaro, afectaron *in silico* la función de la enzima catalasa/peroxidasa, codificada por el gen *katG*. Por lo tanto, se acepta la hipótesis planteada.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Alcázar-Contreras. (2014). Mutaciones en los genes asociados a la resistencia a antibióticos de primera línea en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Michoacán en 2012 - 2014. 1-57.
- Barrios-Payán et al., 2010. (2010). Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente. *Salud Publica de Mexico*, 52(1), 70–78. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70602-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70602-8)
- Brandenburg y Reiling., 2016. (2016). The Wnt Blows: On the Functional Role of Wnt Signaling in Mycobacterium tuberculosis Infection and Beyond. *Frontiers in Immunology*, 7(December), 635. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00635>
- Chacón, O. (2004). Inactivación de genes de Mycobacterium tuberculosis y su potencial utilidad en la prevención y el control de la tuberculosis. *Tuberculosis*, 24(2), 165–187.
- Chen, J., Iglesias, M., Chafloque, R., Herrera, L., Ismael Aguilar, Anaya, V. T., ... Vélez, C. D. (2013). Factores asociados a multidrogorresistencia en pacientes con tuberculosis en el departamento de Lambayeque. *Rev. Cuerpo Méd. HNAAA*, 6(2), 16–19.
- Chia, B. S., Lanzas, F., Rifat, D., Herrera, A., Kim, E. Y., Sailer, C., ... Karakousis, P. C. (2012). Use of multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) to detect multidrug-resistant tuberculosis in Panama. *PLoS ONE*, 7(7), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040456>
- Coll, P. (2009). Fármacos con actividad frente a Mycobacterium tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(8), 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.010>
- Contreras-Moreira. (2011). Modelado comparativo de proteínas. *Laboratorio de Biología Computacional*, 8(40), 1–30.
- Cossio, M. L. T., Giesen, L. F., Araya, G., Pérez-Cotapos, M. L. S., Vergara, R. L., Manca, M., ... Héritier, F. (2007). *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Una ética para quantos?* (Vol. XXXIII). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas., 2010. (2010). Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y mtodos diagnsticos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28(9), 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.12.005>
- da Silva y Palomino., 2011. (2011). Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: Classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(7), 1417–1430. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr173>
- Dávila G. (2012). Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México. *Secretaría De Salud*, 1–159.
- De La Iglesia y Morbidoni., 2006. (2006). Mecanismos de acción y de resistencia

- a rifampicina e isoniacida en Mycobacterium tuberculosis: Nueva informaci??n sobre viejos conocidos. *Revista Argentina de Microbiologia*, 38(2), 97–109.
- Espinoza, A. y. (2004). Identificaci??n r??pida de mutaciones puntuales en el gen katG (Catalasa-Peroxidasa) en cepas de Mycobacterium tuberculosis resistentes a isoniacida. *Sociedad Peurana de Neumolog??a*, 48–N??2, 131.
- Flores-Trevi??o et al., 2014. (2014). Drug resistance and molecular epidemiology of mycobacterium tuberculosis in Mexico: A systematic review. *Salud Publica de Mexico*, 56(1), 63–77.
- Fl??res y Armijo., 2014. (2014). *Farmacolog??a Humana* (6a ed.). Barcelona, Espa??a.
- Garc??a, Z. B. (2009). TIPIFICACI??N MOLECULAR DE Mycobacterium tuberculosis EXTRAPULMONAR Molecular Typification of Extrapulmonary Mycobacterium tuberculosis in Cochabamba, 32(2), 1–5.
- Ghiladi et al., 2005. (2005). The Met-Tyr-Trp cross-link in Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (KatG): Autocatalytic formation and effect on enzyme catalysis and spectroscopic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22651–22663. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502486200>
- Gonz??lez-Martin, J. (2014). Microbiolog??a de la tuberculosis. *Seminarios de La Fundacion Espanola de Reumatologia*, 15(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.semreu.2014.01.001>
- Gori, A., Bandera, A., Marchetti, G., Esposti, A. D., Catozzi, L., Nardi, G. P., ... Franzetti, F. (2005). Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1242–1248. <https://doi.org/10.3201/eid1108.040982>
- Jafarian, M., Aghali-Merza, M., Farnia, P., Ahmadi, M., Masjedi, M. R., & Velayati, A. A. (2010). Synchronous comparison of Mycobacterium tuberculosis epidemiology strains by “MIRU-VNTR” and “MIRU-VNTR and spoligotyping” technique. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2(3), 145–152.
- Jagielski, T., Grzeszczuk, M., Kami??ski, M., Roeske, K., Napi??rkowska, A., Stachowiak, R., ... Bielecki, J. (2013). Identification and analysis of mutations in the katG gene in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *Pneumonologia I Alergologia Polska*, 81(4), 298–307. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744165>
- Johnsson et al., 1997. (1997). Overexpression, purification, and characterization of the catalase-peroxidase KatG from Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 2834–2840. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.5.2834>
- Kellogg, E. H., Leaver-Fay, A., & Baker, D. (2011). Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 79(3), 830–838. <https://doi.org/10.1002/prot.22921>
- Kozak et al., 2012. (2012). Acces chanel residues Ser315 and Asp137 in Mycobacterium tuberculosis Catalase-peroxidase (KatG) control peroxidatic activation of the pro-drug isoniazida. *Chem Commun*, 47(34), 9687–9689.

- <https://doi.org/10.1039/b000000x/Chem>
- Krieger et al., 2003. (2003). Homology Modeling. *Structural Bioinformatics*, 857, 507–508. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6>
- Lukoye, D., Katabazi, F. A., Musisi, K., Kateete, D. P., Asiimwe, B. B., Okee, M., ... Cobelens, F. G. J. (2014). The T2 Mycobacterium tuberculosis genotype, predominant in Kampala, Uganda, shows negative correlation with antituberculosis drug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3853–3859. <https://doi.org/10.1128/AAC.02338-13>
- Mendoza Ticona., 2008. (2008). Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR), historia y situación actual. *Acta Med Per*, 25(4), 236–246.
- Meng, et al., 2006. (2006). Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics*, 7, 339. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-339>
- Montoro, E., Lemus, D., Echemendia, M., Diaz, R., Mederos, L., Martinez Rosarys, M., ... Llanes Josefa, M. (2011). Vigilancia de la resistencia a los fármacos antituberculosos en Cuba, 2000-2009. *Revista Panamericana de Salud Publica*, 30(6), 615–618. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011001200020>
- Morse y Carroll., 2010. (n.d.). *Microbiología médica , 25va Ed.*
- Mortaz, E., Masjedi, M. R., Abedini, A., Matroodi, S., Kiani, A., Soroush, D., & Adcock, I. M. (2016). Common features of tuberculosis and sarcoidosis. *International Journal of Mycobacteriology*, 5, S240–S241. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.09.031>
- Nailet Arráiz R., Z. R. B. y N. F. M. (2007). Evaluación de un ensayo de RPC múltiple para diferenciar micobacterias del complejo Mycobacterium tuberculosis en un laboratorio de referencia. *Rev Chil Infect*, 24(2), 99–105. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182007000200002>
- Nikolayevskyy, V., Trovato, A., Broda, A., Borroni, E., Cirillo, D., & Drobniewski, F. (2016). MIRU-VNTR genotyping of mycobacterium tuberculosis strains using qiaxcel technology: A multicentre evaluation study. *PLoS ONE*, 11(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149435>
- NOM-017-SSA2-2012. (2013). Secretaria de Salud. *Diario Oficial de La Federación*, 28. Retrieved from [https://www.youtube.com/watch?v=SiAytrqnm\\_4](https://www.youtube.com/watch?v=SiAytrqnm_4)
- OMS. (2016). Informe mundial sobre la tuberculosis 2016. *Organización Mundial de La Salud*, 1–5. [https://doi.org/ISBN 978 92 4 156539 4](https://doi.org/ISBN%20978%2092%204%20156539%204)
- Phelan, J., Coll, F., McNerney, R., Ascher, D. B., Pires, D. E. V., Furnham, N., ... Clark, T. G. (2016). Mycobacterium tuberculosis whole genome sequencing and protein structure modelling provides insights into anti-tuberculosis drug resistance. *BMC Medicine*, 14(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0575-9>
- Pires et al., 2014. (2014). DUET: A server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), 314–319. <https://doi.org/10.1093/nar/gku411>

- Ramos, R. G., Lado, F. L. L., Bastida, V. T., Del, M. L. P., Bernal, M., & Barrón, A. C. O. D. E. (2003). Tratamiento actual de la tuberculosis. *Anales de Medicina Interna*, 20(2), 91–100. <https://doi.org/10.4321/S0212-71992003000200011>
- Rivera y Camargo., 2015. (2015). Genes del Mycobacterium tuberculosis involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Méd. UIS*, 28(1), 39–51.
- Rosero y Corral., 2008. (2008). Contribución del análisis RFLP del IS6110 de Mycobacterium tuberculosis al diseño y refinamiento de estrategias para el control de la tuberculosis en Colombia. *Infectio*, 12(3):175-.
- Schito et al., 2016. (2016). Tuberculosis Eradication versus Control. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.007>
- Secretaria de Salud. (2011). Tuberculosis. Panorama Epidemiológico 2000 - 2010. *Epidemiología En Breve*, 1(10), 1–8.
- Sekiguchi, J. -i., Miyoshi-Akiyama, T., Augustynowicz-Kopec, E., Zwolska, Z., Kirikae, F., Toyota, E., ... Kirikae, T. (2007). Detection of Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 179–192. <https://doi.org/10.1128/JCM.00750-06>
- Sequera C, M., Delgado S, V., Araque M, W., Torrealba O, M., Núñez M, R., Da Mata J, O., ... De Waard, J. (2008). Mycobacterium tuberculosis: spoligotypes in the Carabobo state, Venezuela. *Revista Chilena de Infectología : Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 25(5), 362–367. <https://doi.org/S0716-10182008000500009> [pii]\r/S0716-10182008000500009
- Shah, N. S., Auld, S. C., Brust, J. C. M., Mathema, B., Ismail, N., Moodley, P., ... Gandhi, N. R. (2017). Transmission of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in South Africa. *New England Journal of Medicine*, 376(3), 243–253. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1604544>
- Singh, M. K., & Dominy, B. N. (2010). Thermodynamic resolution: How do errors in modeled protein structures affect binding affinity predictions? *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 78(7), 1613–1617. <https://doi.org/10.1002/prot.22691>
- Soolingen et al., 2001. (2001). The Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to Isoniazid and the Arg → Leu Mutation at Codon 463 of katG Are Not Associated The Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to Isoniazid and the Arg 3 Leu Mutation at Codon 463 of katG Are Not Associat, 39(4), 1591–1594. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1591>
- Sulis, G., Roggi, A., Matteelli, A., & Raviglione, M. C. (2014). Tuberculosis: Epidemiology and control. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 6(1). <https://doi.org/10.4084/mjhid.2014.070>
- Tessema, B., Nabeta, P., Valli, E., Albertini, A., Collantes, J., Lan, N. H., ... Dolinger, D. L. (2017). FIND Tuberculosis Strain Bank: a resource for researchers and developers working on tests to detect Mycobacterium tuberculosis and related drug resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(January), JCM.01662-16. <https://doi.org/10.1128/JCM.01662-16>

- Velankar, S., Dana, J. M., Jacobsen, J., Van Ginkel, G., Gane, P. J., Luo, J., ... Kleywegt, G. J. (2013). SIFTS: Structure Integration with Function, Taxonomy and Sequences resource. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 483–489. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1258>
- Wiederstein y Sippl., 2007. (2007). ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), 407–410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>
- World Health Organization. (2014). Informe mundial sobre la tuberculosis, [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/g](http://www.who.int/tb/publications/global_report/g).
- Zémocký, M. (2004). Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. *European Journal of Biochemistry*, 271(16), 3297–3309. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04262.x>
- Zhao, X., Yu, H., Yu, S., Wang, F., Sacchettini, J. C., & Magliozzo, R. S. (2006). Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant. *Biochemistry*, 45(13), 4131–4140. <https://doi.org/10.1021/bi051967o>
- Zumla et al., 2013. (2013). Tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 368(8), 745–755. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1200894>