



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tesis:

**"Análisis comparativo de genes de la ruta de síntesis de
ácidos micólicos entre cepas de *Mycobacterium
tuberculosis*"**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

Química Farmacobióloga

Andrea Monserrat Negrete Paz

Directora de tesis:

Doctora en Ciencias (Biología)

Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

Co-Directora de tesis:

Doctora en Ciencias Biológicas

Ana Laura Guillén Nepita



Morelia, Michoacán,
México
Junio, 2017

El comité tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Aprobó la tesis presentada por:

Química farmacobióloga
ANDREA MONSERRAT NEGRETE PAZ

Doctora en Ciencias Biológicas
Ana Edith Higareda Mendoza

Doctora en Ciencias Biológicas
Saila Viridiana Cázares García

Doctor en Biotecnología de Plantas
Gerardo Vázquez Marrufo

Doctora en Ciencias (Biología)
Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

Doctora en Ciencias Biológicas
Ana Laura Guillén Nepita

Esta tesis fue realizada en el programa de posgrado
Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,
acreditado en el programa Nacional de Posgrados de
Calidad-CONACYT como programa consolidado.

La autora de esta tesis, estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y
Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo agradece al CONACYT la beca que le fue otorgada para la realización de
la Maestría en Ciencias de la Salud.

Se agradece también el apoyo brindado por CONACYT para la realización de una
estancia de investigación en el Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay en el
periodo Octubre – Diciembre de 2016.

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
División de Estudios de Posgrado
Laboratorio de Genética Molecular Microbiana

“La ciencia nunca resuelve
un problema sin crear otros 10 más.”

George Bernard Shaw

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas, por permitirme ser parte de un gran equipo de trabajo, por todas las oportunidades brindadas y por contagiarme con su alegría y optimismo.

A mi co-asesora, la D. en C. Ana Laura Guillén Nepita, por enseñarme lo apasionante que puede ser la bioinformática y por compartirme su conocimiento en algo que era desconocido para mí y que en definitiva marco mi desarrollo profesional.

A todos los miembros de mi comité tutorial: la D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza, el D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo, y la D. en C. Saila Viridiana Cázares García por sus valiosas observaciones y por las discusiones generadas que me permitieron enriquecer este trabajo.

A los profesores que me compartieron de su conocimiento y experiencia a lo largo de mi estancia en este programa: la D. en C. Biol. Guadalupe Partida Hernández, D. en C. Bertha Fenton Navarro y al Maestro Humberto Ruiz Vega a quien siempre recordaré con gran cariño.

Al D. en C. Hugo Naya Monteverde por recibirme en su laboratorio para realizar una estancia de investigación y darme la oportunidad de vivir una experiencia tan enriquecedora en los ámbitos personal y profesional.

Al D. en C. Pablo Fresia y al D. en C. Martín Graña de la Unidad de Bioinformática del Institut Pasteur de Montevideo, por todo el apoyo y conocimiento brindado. Gracias infinitas por hacerme sentir como en casa.

DEDICATORIA

A mis padres, Raquel y Gustavo. Por sentar en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación, por impulsarme a volar más alto. Siempre estaré agradecida por todo lo que me han enseñado.

A mis hermanos, Gustavo, Elisa y Jorge. Por apoyarme siempre y en todo momento. La vida sería aburrida sin ustedes, y yo no sería la misma sin tenerlos conmigo.

A César, por ayudarme a cumplir mis metas y por llenar mi vida de alegrías y amor en las buenas y en las malas.

A Ale, Lucy y Dani por su apoyo incondicional desde el primer día, por los ratos de risas y por todo lo que aprendí de ustedes.

A todas las personas que aunque no han sido mencionadas que siempre me ofrecieron su ayuda y que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
	2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
	2.2 Patogenia	4
	2.3 Tuberculosis extrapulmonar	6
	2.4 Pared celular de las Micobacterias.	8
	2.4.1 Papel de los componentes de la pared celular en la patogenicidad de <i>M. tuberculosis</i>	11
	2.4.2 Síntesis de ácidos micólicos.....	13
	2.4.3 Efecto de las mutaciones en genes de la biosíntesis de ácidos micólicos sobre la virulencia de <i>M. tuberculosis</i>	14
	2.5 Estudios clínicos de tuberculosis meníngea en animales.....	20
III.	ANTECEDENTES	21
IV.	JUSTIFICACIÓN	23
V.	HIPÓTESIS	24
VI.	OBJETIVOS	24
VII.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
	8.1 Material biológico.....	26
	8.2 Análisis <i>in silico</i>	26
	8.2.1 Obtención de secuencias de los genes en cepas meníngeas	26
	8.2.2 Obtención de secuencias homólogas de los genes en cepas pulmonares	27
	8.2.3 Búsqueda de SNP's	27
	8.2.4 Predicción de los efectos de las variaciones encontradas	28
	8.2.5 Predicción de la estructura terciaria	28
	8.2.6 Análisis estructural	29
	8.3 Análisis <i>in vitro</i>	30
	8.3.1 Diseño de oligonucleótidos	30
	8.3.2 Amplificación por PCR.....	31

8.3.3	Secuenciación	32
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
9.1	Obtención de secuencias de los genes en cepas meníngeas.....	33
9.2	Obtención de secuencias homólogas de los genes en cepas pulmonares. .	33
9.3	Alineamiento múltiple de secuencias.....	33
9.4	Predicción de los efectos de las variaciones encontradas	41
9.5	Predicción de la estructura terciaria	44
9.6	Comparaciones globales de la estructura tridimensional	47
9.7	Comparaciones locales de la estructura tridimensional.....	48
9.8	Análisis de cavidades.....	52
9.9	Correlación entre el número de SNP's en genes PE y PPE/resistencia a antibióticos/ruta de síntesis de ácidos micólicos en cepas de origen meníngeo.	55
9.10	Confirmación de las variaciones encontradas en el gen <i>mmaA4</i>	56
X.	RESUMEN DE RESULTADOS	58
XI.	CONCLUSIÓN	59
XII.	PERSPECTIVAS	60
XIII.	REFERENCIAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2. Pared celular micobacteriana.....	9
3. Estructura química de los ácidos micólicos.....	11
4. Vía de síntesis de los tres tipos de ácidos micólicos en <i>M. tuberculosis</i>	13
5. Características estructurales de los meromicolatos en <i>M. tuberculosis</i> y genes que intervienen en la formación de los mismos.....	15
6. Frecuencia de SNP's en las cepas de la colección.....	34
7. Región de alta variabilidad presente en el gen <i>mmaA4</i> de la cepa MYC036. ...	34
8. SNP en la posición 696 del gen <i>mmaA2</i>	35
9. Estructura tridimensional de la hidroximicolato sintasa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	43
10. Superposición de las estructuras obtenidas por las distintas herramientas para la enzima codificada por <i>mmaA</i>	46
11. Gráfica de probabilidad de desorden de cada residuo a lo largo de la secuencia según prDOS para la hidroximicolato sintasa.....	46
12. Superposición del esqueleto de carbono de la hidroximicolato sintasa para las estructuras de referencia y MYC003.....	48
13. Superposición de los residuos en contacto con SAM.....	48
14. Puntos clave en el funcionamiento de la hidroximicolato sintasa.....	50
15. Superficie molecular del motivo $\alpha 3-\alpha 2$ en la hidroximicolato sintasa.....	51
16. Aminoácidos prolina (a) y leucina (b) y sus cadenas laterales.....	51
17. Estado cerrado del túnel hidrofóbico de la hidroximicolato sintasa.....	52
18. Cavity principal de la hidroximicolato sintasa (H37Rv).....	53
19. Cavity principal de la hidroximicolato sintasa de MYC003.....	54
20. Análisis de correlación lineal de Pearson entre el número de SNP's en los genes PE/PPE (Eje Y) y los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos (AM) en las 5 cepas de origen meníngeo.....	55

21. Análisis de correlación lineal de Pearson entre el número de SNP's en los genes de resistencia a antibióticos y los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos (AM) en las 5 cepas de origen meníngeo.	56
22. Depth read en la posición del codón de paro de la cepa MYC003.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

1. Datos del gen <i>pcaA</i>	26
2. Datos del gen <i>mmaA4</i>	27
3. Datos del gen <i>kasB</i>	30
4. Características clínicas de las cepas seleccionadas	38
5. Moldes utilizados para el modelado 3D de las enzimas de interés.	41
6. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo	43
7. Condiciones de PCR para la amplificación de los genes <i>kasB</i> y <i>pcaA</i>	44
8. Genomas seleccionados para la extracción de secuencias homólogas de los genes <i>kasB</i> , <i>pcaA</i> y <i>mmaA4</i>	49
9. SNP's en los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos exclusivos de cepas causantes de tuberculosis meníngea presentes cepas aisladas en el estado de Michoacán (Parte 1)	51
SNP's en los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos exclusivos de cepas causantes de tuberculosis meníngea presentes cepas aisladas en el estado de Michoacán (Parte 2)	52
SNP's en los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos exclusivos de cepas causantes de tuberculosis meníngea presentes cepas aisladas en el estado de Michoacán (Parte 3).	53
10. Predicciones SIFT.....	54
11. Características de los modelados obtenidos.....	57

RESUMEN

La tuberculosis (Tb) es una de las enfermedades transmisibles con mayor tasa de mortalidad a nivel mundial. Si bien el contagio de la tuberculosis se lleva a cabo por vía respiratoria, bajo condiciones específicas, el bacilo se disemina vía hemato-linfática hacia prácticamente cualquier otro órgano, generando la denominada tuberculosis extrapulmonar, esta capacidad de diseminación puede ser tomada en cuenta como un indicador de la virulencia de una cepa en particular. En diversas investigaciones referentes a la ruta de síntesis de ácidos micólicos, se ha reportado que los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* tienen un papel importante en la virulencia de *M. tuberculosis*. Nuestro grupo de trabajo cuenta con la secuencia consenso del genoma de 5 cepas causantes de Tb meníngea, pertenecientes a una colección de 100 cepas de micobacterias causantes de Tb en Michoacán. **Objetivo:** Determinar las variaciones genómicas en la secuencia de los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* que puedan ser utilizadas como marcadores de virulencia. **Materiales y métodos:** Se extrajeron de los genomas secuenciados de cepas meníngeas de la colección, las secuencias de los genes mediante la suite de análisis genómico Galaxy. Para determinar qué variaciones existen entre las secuencias de los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* de las cepas meníngeas de la colección y sus homólogas en cepas pulmonares depositadas en bases de datos públicas se utilizó Blast, y posteriormente se hizo un alineamiento múltiple utilizando MEGA7 y CLUSTALX v2.1. Se realizó la traducción *in silico* mediante GeneMarkS, seguido de predicciones utilizando los servidores *DUET*, *SIFT* y *mCSM* y el modelado de la estructura tridimensional utilizando *Swiss model*. Se realizó un análisis local y global de las estructuras obtenidas utilizando el software *UCSF Chimera* y *CASTp* para el análisis de cavidades. Las variaciones encontradas fueron confirmadas por PCR y re-secuenciación. **Resultados:** Se obtuvieron las secuencias de los genes de interés de las cepas causantes de TB meníngea y las secuencias de las cepas pulmonares, utilizándose un total de 24 secuencias para cada gen. El análisis de SNPs arrojó los siguientes resultados globales: 6 SNPs para *pcaA*, 87 para *mmaA4* y 2 para *kasB*. La mayoría de las predicciones funcionales de las alteraciones no sinónimas encontradas sugieren que la función de las enzimas codificadas por *pcaA* y *mmaA4* se ve alterada. Por otro lado el análisis estructural con los modelados obtenidos muestra que solo la cepa MYC003 presenta alteraciones importantes en la estructura codificada por *mmaA4*, por lo que posiblemente se vea modificada la función en su forma biológicamente activa. **Conclusión:** Las cepas causantes de tuberculosis meníngea presentan variaciones en las secuencias de los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* que no se encuentran presentes en cepas causantes de tuberculosis pulmonar, sin embargo dichas variaciones no pueden ser propuestas como marcadores de virulencia ya que no se observan de manera consistente entre las cepas causantes de TB meníngea aisladas de Michoacán, ni entre las cepas meníngeas de las bases de datos públicas. **Palabras clave:** tuberculosis, virulencia, enzimas, bioinformática, meningitis.

ABSTRACT

Tuberculosis is one of the contagious disease with the highest mortality rate worldwide. Although tuberculosis transmission occurs by respiratory route, the bacillus is able to disseminate to any other organ by hemato lymphatic route under certain conditions, producing the extrapulmonary forms of the disease. Such an ability to disseminate may be considered as an indicator of higher virulence for any particular strain. Previous research on mycolic acids biosynthesis route has shown that *pcaA*, *kasB* and *mmaA4* genes have an important role in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. Our work group has the consensus genome sequence of 5 strains responsible for meningeal Tb, this strains belongs to a collection of 100 strains of mycobacteria causing Tb in Michoacán. **Objective:** Our aim is to assess the genomic variations in the sequence of *kasB*, *pcaA* and *mmaA4* genes that may be used as virulence markers. **Materials and methods:** Genomic sequences were handled using Galaxy suite for genomic analysis. To determine which variations exist between the sequences of the *kasB*, *pcaA* and *mmaA4* genes of the meningeal strains of the collection and their homologues in pulmonary strains deposited in public databases *Blast* was used, and then a multiple alignment was done using MEGA7 and CLUSTALX V2.1. *In silico* translation was performed using *GeneMarkS*, followed by predictions using the *DUET*, *SIFT* and *mCSM* servers and three-dimensional structures were obtained using *Swiss model*. A local and global analysis of the structures obtained using the UCSF Chimera and CASTp software for cavity analysis was performed. The variations found were confirmed by PCR and re-sequencing. **Results:** The sequences of the genes of interest of the strains causing meningeal TB and the sequences of the pulmonary strains were obtained, using a total of 24 sequences for each gene. Analysis of SNPs yielded the following overall results: 6 SNPs for *pcaA*, 87 for *mmaA4* and 2 for *kasB*. Most functional predictions of the non-synonymous alterations found suggest that the function of the enzymes encoded by *pcaA* and *mmaA4* is altered. On the other hand, the structural analysis with the obtained model shows that only the strain MYC003 presents important alterations in the structure coded by *mmaA4*, reason why the function in its biologically active form possibly is modified. **Conclusion:** The strains that cause meningeal tuberculosis present variations in the sequences of the *kasB*, *pcaA* and *mmaA4* genes that are not present in strains that cause pulmonary tuberculosis, however, these variations can not be proposed as virulence markers because they are not observed consistently between strains causing meningeal TB isolated from Michoacán, nor among the meningeal strains of the public databases.

ABREVIATURAS

Tb	Tuberculosis
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
MTBC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TMM	Monomicolatos de trehalosa
TDM	Dimicolatos de trehalosa
FAS	Ácido graso sintasa
PKS	Policétido sintasa
CDS	Secuencia codificante
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
RMSD	Desviación media de la raíz cuadrada
RMS	Raíz media cuadrática por posición
DMSO	Dimetil sulfóxido
PDB	Base de datos de proteínas
AM	Ácidos micólicos
AcPM	Proteína acarreadora de acilos

ABREVIATURAS AMINOÁCIDOS

A	Alanina
R	Arginina
N	Asparagina
D	Aspartato
C	Cisteína
Q	Glutamina
E	Ácido glutámico
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
L	Leucina
K	Lisina
M	Metionina
F	Fenilalanina
P	Prolina
S	Serina
T	Treonina

W	Triptófano
Y	Tirosina
V	Valina

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es uno de los padecimientos más antiguos de la humanidad sin embargo sigue siendo una de las enfermedades transmisibles con mayor tasa de mortalidad. Esta enfermedad afecta a grandes grupos de población, particularmente de áreas marginadas y grupos vulnerables donde predomina la pobreza, desnutrición y el hacinamiento. Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente, término aplicado a las personas infectadas por el bacilo pero que aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección. En 2015, 10.4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.8 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos, 0.4 millones de personas con VIH). Más del 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países de ingresos bajos y medianos (World Health Organization, 2016). La rapidez con que se está propagando la epidemia de VIH en otras regiones del mundo podría provocar un aumento del número de casos de tuberculosis. A pesar de que actualmente la tuberculosis es curable, se necesita de cuatro antibióticos administrados por seis a nueve meses, lo que redundaría en una alta tasa de abandono. Esta situación ha promovido recaídas y el surgimiento de cepas resistentes a varios antibióticos, lo cual complica aún más el tratamiento al incrementar su costo y toxicidad (Hernández Pando *et al.* 2013). Gracias a las estrategias globales de control, los casos de tuberculosis van decayendo lentamente cada año y se calcula que entre 2000 y 2015 se salvaron 49 millones de vidas gracias a la dispensación de servicios de diagnóstico y tratamiento contra la TB (World Health Organization, 2016). Sin embargo, dado que la mayoría de las muertes por TB son evitables, la mortalidad de esta enfermedad sigue siendo inaceptablemente alta. De acuerdo con la información disponible en el componente de TB del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE, 2016), en nuestro país se registraron en 2015, 22 294 mil casos nuevos de tuberculosis pulmonar de los cuales, 284 casos pertenecen a TB meníngea, una de las formas más severas de la enfermedad (Hernandez Pando *et al.* 2013). Esto representa una importante pérdida de años potenciales de vida saludable y por consiguiente, un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de México, ya que el

promedio de edad de muerte por este padecimiento es de 54 años. La mortalidad nacional reportada por el SINAVE para 2014, fue de 1 733 defunciones por TB en todas las formas y 44 defunciones particularmente en el estado de Michoacán (CENAPRECE, 2016).

El agente etiológico de la enfermedad es la actinobacteria *Mycobacterium tuberculosis*, y si bien el contagio de la TB se lleva a cabo por vía respiratoria, bajo condiciones específicas, la bacteria se disemina vía hemato-linfática hacia prácticamente cualquier otro órgano, generando la denominada tuberculosis extrapulmonar, esta capacidad de diseminación puede ser tomada en cuenta como un indicador de la virulencia de una cepa en particular. En diversas investigaciones referentes a la ruta de síntesis de ácidos micólicos se ha reportado que los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* tienen un papel importante en la virulencia de *M. tuberculosis* (Forrellad *et al.* 2013). Es por ésto que el presente estudio, pretende determinar mediante un análisis bioinformático, las variaciones genómicas en la secuencia de los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* que puedan ser utilizadas como marcadores de virulencia.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

El agente causal de la TB humana es la actinobacteria *M. tuberculosis*, la cual forma junto con *M. bovis*, *M. canettii*, *M. pinepedii*, entre otras, un grupo genéticamente muy cercano denominado Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC, por sus siglas en inglés). Si bien *M. tuberculosis* es el principal agente de TB en humanos, el resto de los miembros del MTBC se han aislado ocasionalmente de muestras clínicas humanas (Palomino *et al.* 2007). *Mycobacterium* está filogenéticamente relacionado con diversas bacterias de alto contenido en G+C, entre las que destacan *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Gordonia*. *M. tuberculosis* es un bacilo patógeno intracelular facultativo, no esporulado, que reside principalmente en el fagolisosoma de los macrófagos alveolares, es inmóvil, 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 el nombre de ácido alcohol resistente. Tiene una pared celular rica en lípidos y con una estructuración muy particular. Al teñirse con fluorocromos como la mezcla de uramina-rodamina aparece con fluorescencia de color amarillo intenso, crece lentamente y forma colonias no pigmentadas, produce niacina, reduce nitratos, produce catalasa, es sensible al calor, es inactivada por calentamiento a 68°C a pH 7 (Martínez *et al.* 2001). Estas bacterias presentan también comportamientos diferentes dependiendo de su localización. Las que se encuentran en cavidades pulmonares (ambiente aerobio) se multiplican de forma activa, las encontradas dentro de macrófagos (ambiente microaerofílico) inician la adaptación a latencia y las confinadas en granulomas, dentro de un ambiente anaerobio, se replican solo ocasionalmente (Coll, 2009).

2.2 Patogenia.

M. tuberculosis es un patógeno intracelular capaz de producir infecciones de por vida. El contagio se produce habitualmente por vía aerógena a partir de pacientes bacilíferos con lesiones pulmonares “abiertas”, es decir, conectadas con el exterior por un bronquio de drenaje. Al toser se generan aerosoles de pequeñas partículas líquidas (*gotas de Flügge*), en cuyo interior se encierran uno o dos bacilos. Al evaporarse queda tan solo el núcleo de bacilos que permanece flotando en el medio ambiente y se desplaza con las corrientes de aire pudiendo ser aspirado por otras personas. Las partículas de tamaño superior a $10 \mu\text{m}$ quedan retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar, pero las de menor tamaño (entre 1 y $5 \mu\text{m}$) tienen la capacidad de llegar hasta los alvéolos y desencadenan la primoinfección (Lozano, 2002).

A diferencia de la mayor parte de las bacterias que sufren fagocitosis, *M. tuberculosis* impide la fusión del fagosoma con los lisosomas al inhibir la molécula de unión específica, el antígeno endosomal específico 1 (EEA1). El fagosoma es capaz de fusionarse a otras vesículas intracelulares para facilitar el acceso del patógeno a nutrientes y su proceso de replicación intravacuolar. Las bacterias fagocitadas también pueden eludir la destrucción mediada por los macrófagos con la formación de intermediarios reactivos del nitrógeno creados entre el óxido nítrico y los aniones superóxido al catabolizar catalíticamente los oxidantes generados (Chávez-Galán *et al.*, 2009).

Los macrófagos secretan interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*. Estas citocinas aumentan la inflamación localizada al reclutar linfocitos T y células natural killer (NK) hacia las zonas de los macrófagos infectados, incluida la diferenciación de los linfocitos TH1 con la consiguiente secreción de interferón gama (IFN- γ). Cuando existe IFN- γ , los macrófagos infectados se activan, lo que aumenta la fusión entre los fagosomas y los lisosomas y la destrucción intracelular. El TNF- α estimula la producción de óxido nítrico y los intermediarios reactivos del nitrógeno relacionados, lo que potencia la destrucción intracelular. La eficacia de la

eliminación bacteriana depende en parte del tamaño del foco de infección. Los macrófagos alveolares, las células epiteloideas y las células gigantes de Langhans con las micobacterias intracelulares forman el núcleo central de una masa necrótica que se rodea de una pared densa de células T CD4, CD8, NK y macrófagos (Figuroa, 2001). Esta estructura, que se llama granuloma, impide la diseminación posterior de las bacterias (Fig. 1).

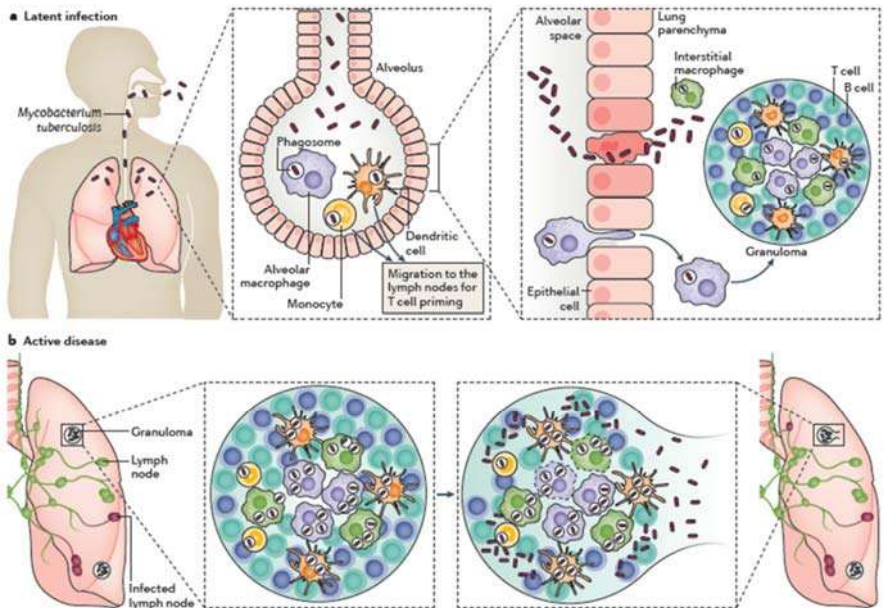


Figura 1. Infección por *Mycobacterium tuberculosis*. (Pai et al. 2016)

Los bacilos se replican dentro del granuloma, si la carga bacteriana se vuelve demasiado grande, el granuloma no podrá contener la infección y en esta fase, las bacterias pueden entrar en el torrente sanguíneo y diseminarse a otros órganos o volver a entrar en el tracto respiratorio y provocar TB activa (Pai et al. 2016).

Una persona presenta infección tuberculosa latente cuando ésta no progresa a enfermedad; no presenta signos o síntomas de enfermedad, pero tiene en su organismo bacilos tuberculosos vivos. La enfermedad que se desarrolla dentro de los primeros cinco años tras la infección primaria se denomina TB primaria.

Cuando la enfermedad se produce mucho tiempo después de la primoinfección se denomina TB posprimaria, secundaria o de tipo adulto. El declive del sistema inmunitario permite el desarrollo de los bacilos procedentes de la primoinfección (TB por reactivación endógena). También puede ocurrir que la persona reciba nuevas exposiciones abundantes, repetidas o de cepas de especial virulencia del bacilo (TB por reinfección exógena) (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis, 2009).

2.3 Tuberculosis extrapulmonar

Aunque la TB es fundamentalmente una enfermedad pulmonar, otros órganos y tejidos también pueden afectarse, incluyendo a los sistemas nervioso central, linfático, circulatorio, y genitourinario, así como huesos y articulaciones. Las formas extrapulmonares de la TB parecen ser la expresión clínica de un defecto inmune del huésped, pueden conllevar morbilidad y riesgo de mortalidad elevado, sobre todo en las formas meníngeas y miliares, presentan dificultades para realizar su diagnóstico y la duración mínima eficaz de su tratamiento no está bien determinada (García, 2008). La forma extrapulmonar más severa de TB es la que compromete al Sistema Nervioso Central, y afecta predominantemente a niños, ésta constituye del 5 al 15% de los casos de TB extrapulmonar en los países en desarrollo, predominando en la población infantil (Hernandez Pando *et al.* 2013). La mortalidad es mayor al 16%, aún con tratamientos rigurosos. Los conceptos actuales de cómo se desarrolla la TB en el SNC están basados en estudios publicados en 1933, éstos estudios sugieren que *M. tuberculosis* se deposita en el parénquima cerebral y en las meninges durante la diseminación hematógena. Regularmente es adquirida después de la infección pulmonar, y la meningitis tuberculosa o TB meníngea es la forma más común dentro del SNC. El desarrollo de la TB meníngea es un proceso que comprende dos pasos principales:

1. La mayoría de las lesiones tuberculosas inician como consecuencia de una bacilemia en la que la bacteria puede llegar a las meninges o al parénquima

cerebral, formando pequeños focos subpiales o subependimarios denominados focos de Rich.

2. El segundo paso, es la ruptura de un foco de Rich en el espacio subaracnoideo. Esto marcará el inicio de la meningitis, que si no se trata, dará como resultado una patología neurológica grave e irreversible (Hérrandez Pando *et al.* 2013).

Varios estudios epidemiológicos han identificado factores de riesgo para la TB meníngea, entre ellos una edad menor de 40 años, la infección por VIH y ciertas poblaciones étnicas (Ogawa *et al.* 1987). Este último factor sugiere la participación del fondo genético del huésped (Kent *et al.* 1993). En resumen, la localización de la TB parece estar determinada por la virulencia de la micobacteria, la vía de transmisión y la inmunidad innata del huésped. En los últimos años se han identificado algunos polimorfismos en los genes que determinan la virulencia de la micobacteria. Los genotipos de las cepas más virulentas podrían determinar la producción de componentes de la pared celular que eluden los mecanismos defensivos del macrófago (al retrasar o inhibir la fusión de los fagosomas-lisosomas y al disminuir la respuesta de citocinas de tipo I) y, por otra parte, disminuyen la apoptosis de las células infectadas. Todo ello facilitaría la persistencia de la micobacteria dentro del macrófago y su diseminación fuera del pulmón (García, 2008). Así, estudios epidemiológicos han encontrado que algunas cepas de *M. tuberculosis* pueden estar asociadas con TB extrapulmonar. Esta forma de la enfermedad ha sido asociada con polimorfismos en el gen micobacteriano *plcD* (Chackerian *et al.* 2002) y con la familia W-Beijing, sin embargo, estas asociaciones parecen mantenerse en algunas poblaciones de pacientes, pero en otras no. Nicol y colaboradores (2005) estudiaron la asociación entre familias de *M. tuberculosis* y su diseminación extrapulmonar en 285 niños que acudieron a un hospital pediátrico en Sudáfrica, encontrando la predominancia de las LAM3 / F11 y W-Beijing, pero no se pudo demostrar la asociación buscada. En otro estudio, Thwaites y colaboradores (2008) sugieren que el linaje de la micobacteria, en este caso Este de Asia/Beijing, influye en la progresión de la enfermedad y en el desarrollo de la respuesta inflamatoria intracerebral en

pacientes con tuberculosis meníngea. Finalmente, Caws y colaboradores (2008) proponen que algunas cepas de *M. tuberculosis* presentan mayor capacidad para diseminarse extrapulmonarmente que otras y que probablemente están asociadas a polimorfismos en genes responsables de la respuesta inmune innata en el hospedero. Dichos autores demostraron que cepas comúnmente encontradas en Europa y América (linaje Euro-Americano) son menos propensas a causar TB meníngea en adultos vietnamitas que las cepas predominantemente encontradas en Asia (W-Beijing), confirmando lo dicho por Kong y col. (2007) en un estudio que describe la asociación entre la cepa W-Beijing y la tuberculosis extratorácica. Las revisiones de trabajos que han tratado de encontrar la correlación entre las cepas infectantes y el resultado clínico de la infección han dejado claro que ésta no surgirá tomando en cuenta solamente datos de tipificación a nivel de cepa para describir su linaje, sino que debe considerarse la búsqueda de elementos genéticos que, una vez caracterizados, puedan ser detectados mediante técnicas moleculares y que sean de utilidad para el seguimiento epidemiológico de las cepas que los poseen. Estos elementos pueden ser genes que codifiquen para componentes de la pared celular o proteínas secretoras, enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos, factores de transcripción reguladores del metabolismo primario o reguladores de respuestas a diferentes estímulos. En particular, en la ruta de síntesis de ácidos micólicos se han reportado que los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* tienen un papel importante en la virulencia de *M. tuberculosis* (Forrellad *et al.* 2013).

2.4 Pared celular de las Micobacterias.

Una de las estructuras más características de las micobacterias es su pared celular, la cual se localiza por debajo de la cápsula o micomembrana, separada por un espacio periplásmico; ésta posee un elevado contenido en lípidos (50-60%), propiedad que le confiere a estos microorganismos un carácter hidrofóbico y los hace refractarios al ataque por hidrólisis enzimática. La pared celular es una barrera efectiva frente a muchos agentes antimicrobianos convencionales y está

constituida por el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos, arabinogalactana y peptidoglicano (Crick *et al.* 2001).

La estructura de la pared celular en las micobacterias está constituida por un centro o núcleo, el cual está formado por tres componentes principales (Fig. 2):

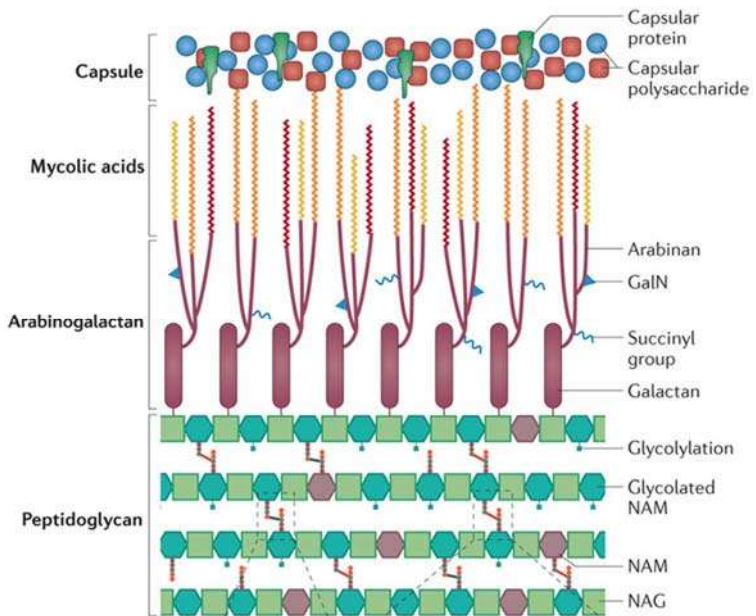


Figura 2. Pared celular micobacteriana. (Kieser y Rubin, 2014).

- 1) El peptidoglicano, compuesto principalmente de unidades repetitivas de N-acetil glucosamina y N-glucosilmurámico; a este último se le unen alanina (tres moléculas), ácido isoglutámico y ácido m-diaminopimélico;
- 2) La arabinogalactana, compuesta de arabinosa y galactana; esta última se une al ácido N-glicolilmurámico del peptidoglicano;
- 3) Los ácidos micólicos, los cuales pueden contener residuos de manosa o trehalosa, a través de los cuales se unen a la arabinogalactana.

Cuando los ácidos micólicos están unidos a trehalosa, pueden formar monomicolatos de trehalosa (TMM) o dimicolatos de trehalosa (TDM), también conocido como “cord factor” o “factor cuerda”. Además de estos componentes, la pared celular puede contener en menor proporción algunos manósidos de fosfatidil inositol, lipoarabinomananas y lipomananas, que se encuentran unidos a la membrana plasmática; así como diferentes proteínas, incluidas las porinas que sirven como canales de transporte de moléculas de bajo peso molecular. La disposición real de los ácidos micólicos de micobacterias en la pared celular es desconocida, aunque de acuerdo con estudios biofísicos y estructurales, se maneja la hipótesis de que están plegados en forma de W (Bhamidi *et al.* 2011). Los ácidos micólicos son el componente principal de la pared celular de las micobacterias y a estas estructuras se les atribuye el carácter hidrofóbico de la misma, ya que son ácidos grasos de cadena larga, α -ramificados, β -hidroxilados, que además son específicos de gran parte de los miembros del suborden *Corynebacterineae* (Marrakchi *et al.* 2014). En *M. tuberculosis*, estas estructuras se caracterizan por ser ácidos grasos de cadena larga C₅₄-C₆₃, con α -ramificaciones de C₂₂-C₂₄ que poseen insaturaciones en forma de anillos de ciclopropano. Se pueden diferenciar tres distintas clases (Fig. 3), los ácidos α -micólicos o no oxigenados (>70% del total), metoxi y ceto ácidos micólicos u oxigenados (de 10 a 15%). En los ácidos α -micólicos ambos anillos de ciclopropano tienen configuración *cis*. Los ácidos metoxi- y ceto-micólicos pueden tener o bien la configuración *cis*, o *trans* en el anillo de ciclopropano proximal (el más cercano al grupo – COOH) (Takayama *et al.* 2005).

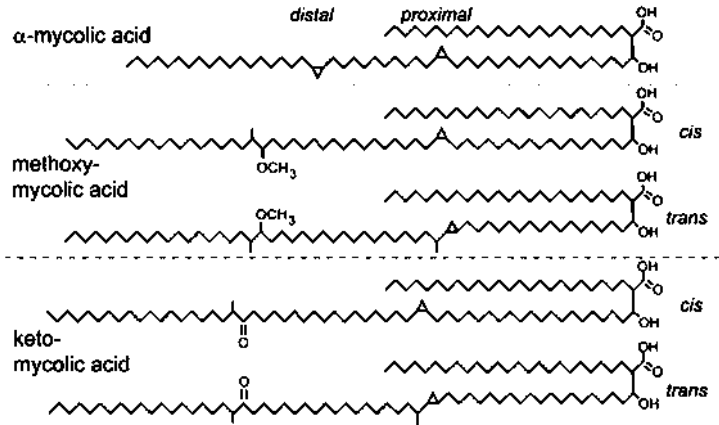


Figura 3. Estructura química de los ácidos micólicos. (Takayama et al. 2005).

2.4.1 Papel de los componentes de la pared celular en la patogenicidad de *M. tuberculosis*.

La exclusiva pared lipídica micobacteriana juega un papel importante en la patogénesis del microorganismo, en consecuencia, los genes responsables de la biosíntesis, degradación y transporte de sus componentes, son potenciales factores de virulencia que pueden ofrecer nuevos blancos terapéuticos en el diseño de fármacos (Forrellad *et al.* 2013).

Entre las moléculas de *M. tuberculosis* que están asociadas a la patogenia, se pueden encontrar:

- Peptidoglicano, el cual protege a la micobacteria mediante lisis por cambios osmóticos y por lisozima; tiene un efecto antigénico frente a la respuesta inmune del hospedero y tiene patrones de reconocimiento para receptores fagocíticos.
- Ácidos micólicos, que forman una barrera impermeable que impide el acceso de sustancias hidrofílicas y fármacos.
- “Cord factor” (derivado de ácidos micólicos), que induce la producción de factor de necrosis tumoral y formación de granulomas.

- d) Sulfolípidos de trehalosa, (derivado de ácidos micólicos) que se sabe que bloquean el efecto del interferón gamma, interleucina-1 y factor de necrosis tumoral alfa en macrófagos e inhiben a la proteína cinasa C y la fusión del fagosoma con el lisosoma en macrófagos.
- e) Lipooligosacáridos, participan en la unión de la micobacteria con los receptores del macrófago.
- f) Glicopeptidolípidos, inhiben respuesta linfoproliferativa.
- g) Fenilglicolípidos, inhiben respuesta linfoproliferativa y estallido respiratorio en macrófagos. También inhiben a la proteína cinasa C.
- h) Derivados de fosfatidil-inositol y fosfatidilinositolmanósidos, intervienen activamente en la interacción de la micobacteria con el macrófago y son precursores del lipoarabinomanano.
- i) Lipoarabinomanano, activa linfocitos T por medio de los receptores tipo toll y CD1.
- j) Lipoarabinomanano sin residuos terminales de manosa, inhibe a la proteína cinasa C, e induce la producción de citocinas proinflamatorias.
- k) Lipoarabinomanano con residuos terminales de manosa, induce factor de necrosis tumoral alfa y formación del granuloma. Inhibición de la proteína cinasa C y la producción de citocinas proinflamatorias (Gorocica *et al.* 2005).

Debido a que los lípidos son unas de las moléculas complejas más abundantes de la envoltura celular de las micobacterias (Takayama *et al.* 2005) y a que aproximadamente el 8% del genoma está dedicado al metabolismo lipídico, ya que se describen más de 200 genes involucrados en el metabolismo de los lípidos y ácidos grasos, diferentes áreas de la investigación sobre la TB han centrado su interés en la síntesis y exportación de estos componentes, en especial los ácidos micólicos. Esto debido a que en primer lugar, varios medicamentos antimicobacterias tales como isoniazida, etionamida, isoxyl y tiacetazona, afectan las enzimas FASII (ácido graso sintetas) que intervienen en la síntesis de ácidos micólicos (Vilchézé *et al.* 2000) en segundo lugar, debido a que diferentes estrategias, basadas principalmente en la supresión de genes específicos, han

demostrado que afectan a la síntesis de ácidos micólicos o su estructura provocando alteraciones en la virulencia (Forrellad *et al.* 2013).

2.4.2 Síntesis de ácidos micólicos.

La biosíntesis de los ácidos micólicos y su transferencia a la envoltura celular es un proceso complejo en el que intervienen dos ácido graso sintasas (FAS-I y FAS-II), una policétido sintasa (Pks-13) y varias metil y micoliltransferasas (Fig. 4).

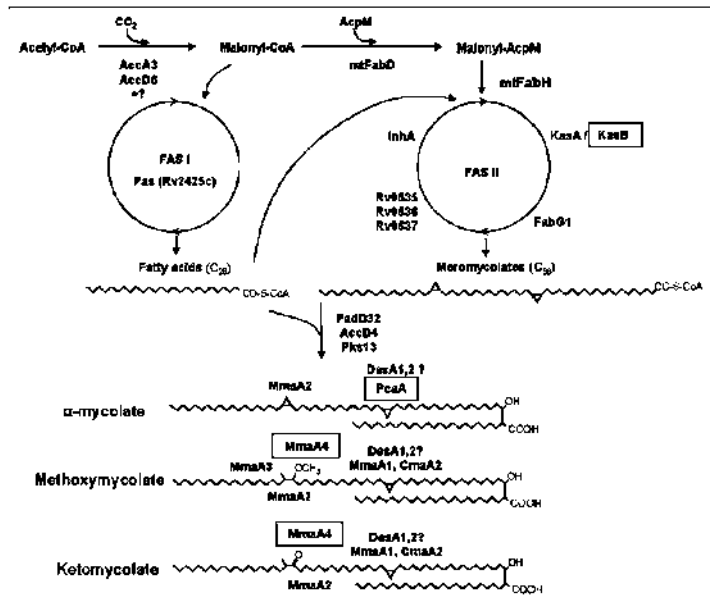


Figura 4. Vía de síntesis de los tres tipos de ácidos micólicos en *M. tuberculosis*. (Forrellad *et al.* 2013)

FAS-I es un complejo multienzimático de procariontes y eucariotes implicado en síntesis de ácidos grasos de una longitud C₁₆-C₂₆ que, a la postre, formarán parte de la α-ramificación del ácido micólico o serán alargados por FAS-II, hasta formar una cadena de C₅₀-C₆₀ (meromicolato o meroácido). En el meromicolato se introducen distintos grupos estructurales que incluyen insaturaciones –dobles

enlaces y/o ciclopropanos- y grupos oxigenados. Posteriormente, Pks-13 forma la molécula completa del ácido micólico mediante una condensación tipo Claisen entre un ácido graso de C₅₀-C₆₀ (FAS-II) y un ácido graso de C₂₀- C₂₆ (FAS-I). Los distintos ácidos micólicos (oxigenados y no oxigenados), se transfieren al arabinonagalactano y otros compuestos de la envoltura celular, mediante un proceso en donde intervienen, entre otras moléculas, diversas micoliltransferasas (Takayama *et al.* 2005). La formación del ácido micólico por parte de FAS-I y FAS-II se produce por varios ciclos de reacciones, integradas por condensaciones, ceto reducciones, deshidrataciones y enoil reducciones, en donde actúan, respectiva y secuencialmente, las enzimas β-cetoacil-ACP sintetasa, β-cetoacil-ACP reductasa, β-hidroxiacil-ACP deshidrasa y enoil-ACP reductasa (de Souza *et al.*, 2008).

2.4.3 Efecto de las mutaciones en genes de la biosíntesis de ácidos micólicos sobre la virulencia de *M. tuberculosis*.

El producto final de la acción de FAS-II en la vía es un meromicolato con dos dobles enlaces y diferentes longitudes de cadena; aquellos que son más cortos dan lugar a α-meromicolatos y los de longitud mayor (aproximadamente +6C) a meromicolatos oxigenados. Las insaturaciones provienen de las actividades de las dehidrasas y de algunas isomerasas, que reorganizan la cadena para colocar el doble enlace en su lugar (Takayama *et al.* 2005). Posteriormente, estos precursores insaturados son procesados para la introducción de los dobles enlaces y/o ciclopropanos *cis* y/o *trans* que aparecen en los ácidos micólicos maduros. En los α-meromicolatos, el cis-ciclopropano proximal es introducido por *pcaA* (Tabla 1), mientras que el distal es función de *mmaA2*; en ambos casos, el donador del grupo -CH₃ es la S-adenosil metionina (Fig. 5).

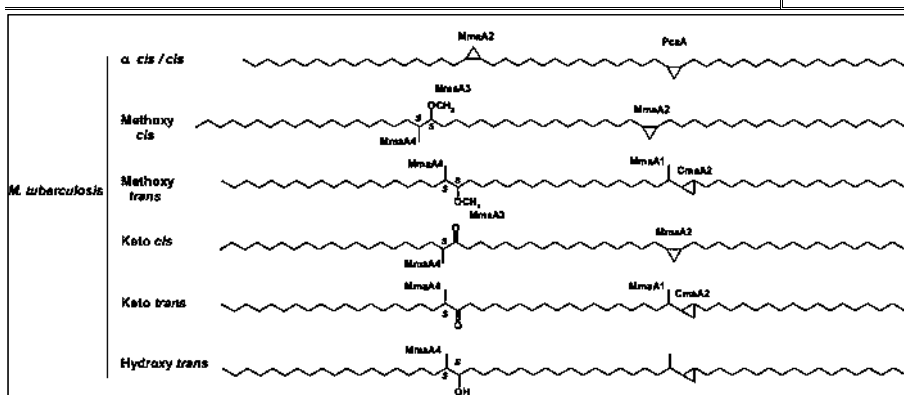


Figura 5. Características estructurales de los meromicolatos en *M. tuberculosis* y genes que intervienen en la formación de los mismos. (Marrakchi et al. 2014).

Tabla 1. Datos del gen *pcaA* (Tuberculist <http://tuberculist.epfl.ch>)

Nombre del gen	<i>pcaA</i>
Locus tag	Rv0470c
Sinónimos	<i>umaA2</i>
Tipo	Codificante
Función	Participa en la modificación o síntesis de ácidos micólicos, esencial en la función de ciclopropanación. Necesario para la síntesis del anillo de ciclopropano en los ácidos micólicos de la pared celular.
Producto	Ácido micólico sintetasa PcaA (ciclopropano sintasa).
Masa molecular	33027.7
Punto isoelectrico	6.4464
Longitud del gen (bp)	864
Ubicación	Hebra complementaria(560,848...561,711)
Categoría funcional	Metabolismo de lípidos
Coordenadas	Inicio CDS: 560, 848; Final CDS: 561,711

Los meromicolatos oxigenados provienen de un precursor común, un hidroximeromicolato, derivado de la acción de *mmaA4* (Fig. 5 y Tabla 2). Esta enzima produce un intermediario cis-monoin saturado que, por acción de *mmaA3* y *mmaA2*, se transforma en un metoxi-meromicolato con un cis-ciclopropano.

Tabla 2. Datos del gen *mmaA4* (Tuberculist <http://tuberculist.epfl.ch>).

Nombre del gen	<i>mmaA4</i>
Locus tag	Rv0642c
Sinónimos	<i>hma, cmaA</i>
Tipo	Codificante
Función	Participa en la modificación de ácidos micólicos. Cataliza transformación dependiente de S- adenosil –metionina, de un ácido micólico cis -olefina en un alcohol secundario. Cataliza introducción de un grupo hidroxilo en la posición distal en cadenas de ácidos micólicos para producir el hidroximeromicolato. La transferencia de un grupo metilo resulta en la formación de un grupo –hidroxil, secundario con un grupo metilo adyacente.
Producto	Hidroximicolato sintasa
Masa molecular	34870.4
Punto isoeléctrico	5.444
Longitud del gen (bp)	906
Ubicación	complement(736,298..737,203)
Categoría funcional	Metabolismo de lípidos
Coordenadas	Inicio CDS: 736,298; Final CDS: 737, 203

La reducción del grupo -OH y la acción de *mmaA2* lleva a la formación de un ceto-meromicolato con un cis-ciclopropano. La actividad de *mmaA1* sobre el hidroximeromicolato introduce una insaturación *trans* en la estructura; esta enzima se asocia a la *cmaA2*, encargada de la ciclopropanación *trans* en los meromicolatos oxigenados (Takayama *et al.* 2005). Para demostrar el efecto de la delección del gen *mmaA4* en *M. tuberculosis*, Dubnau y colaboradores (2000) inactivaron dicho gen en la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*; la comparación de la composición de los lípidos de la cepa original y de la mutante *mmaA4* reveló que esta última es incapaz de sintetizar metoximicolatos o cetomicolatos. Estos cambios parecen estar acompañados de modificaciones en la permeabilidad de la pared celular en la cepa mutante, así como un fenotipo atenuado en un modelo de infección en ratón, sugiriendo que los ácidos micólicos oxigenados son importantes en el proceso de infección. En otro estudio realizado por Dao y colaboradores (2008), en el que el mismo gen fue inactivado en una cepa de referencia, se demostró que la cepa mutante estimula a los macrófagos para producir significativamente más IL-12p40 y TNF- α que la cepa “salvaje” de *M. tuberculosis*, esto tiene como consecuencia un bloqueo en la producción de IL-12 por los macrófagos infectados.

La interleucina-12(IL-12) es una importante citosinas que regula la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Se ha demostrado que es requerida para la producción del interferón gamma (IFN- γ) por los linfocitos T cooperadores o linfocitos CD4+ de la sub población células T colaboradoras de tipo 1 (Th1) y, por consiguiente, para el control del crecimiento del bacilo y la prevención del daño al tejido pulmonar (Prezzemolo *et al.* 2014).

En un estudio realizado por Glickman y colaboradores (2000) el gen *pcaA* que codifica para una ciclopropano sintasa, fue inactivado por recombinación homóloga en la cepa Erdman de *M. tuberculosis*. Los autores sugieren que la modificación del sitio específico de ciclopropanación de los ácidos micólicos podría ser un determinante importante de la interacción entre el microorganismo y el anfitrión, dado que esta alteración de los ácidos micólicos está ausente en micobacterias no patógenas. Los fenotipos de la cepa mutante *pcaA* indican que el sistema de modificación de ciclopropanos evolucionó para mediar funciones de virulencia tales como la interacción con los receptores del sistema inmune innato del hospedero. Las mutantes *pcaA* exhibieron una morfología alterada del “cord factor” y un perfil de ácidos micólicos igualmente alterado (Glickman *et al.*, 2000). Rao y colaboradores estudiaron en 2005 los efectos de la delección del gen *pcaA* en los eventos tempranos de la infección. Esto condujo a la identificación de los ácidos micólicos incorporados en el dimicolato de trehalosa (TDM), como una modificación crítica que regula el reconocimiento por la respuesta inmune innata del huésped durante la primera semana de la infección murina *in vivo* y la primeras 24 h de la infección de macrófagos *in vitro*. Sus resultados demostraron que la modificación de ciclopropilo micolatos en el dimicolato de trehalosa no sólo modifica el reconocimiento por parte de la respuesta inmune innata, sino que también tienen un profundo efecto sobre la función de estos lípidos como importantes factores de virulencia de las bacterias. Más tarde, en 2001 y 2003 Glickman y colaboradores generaron por recombinación homóloga, cepas Erdman de *M. tuberculosis* con mutaciones en los genes *cmaA2* y *mmaA2*. Estos genes codifican para una sintasa de ácidos micólicos transciclopropano y una ciclopropano sintasa distal, respectivamente. Los análisis de la mutante *cmaA2*

indican que este gen se requiere para la síntesis de los anillos transciclopropano de los ácidos micólicos oxigenados. Posteriormente, en 2006, el mismo grupo de trabajo utilizó una cepa mutante *cmaA2* para demostrar que la transciclopropanación actúa como una regulación negativa de la virulencia de *M. tuberculosis* través de la supresión de la actividad inflamatoria de dimicolato de trehalosa (Rao *et al.*, 2006). En el caso de la mutante *mmaA2*, se detectaron defectos en la cis-ciclopropanación de los α micolatos (Glickman *et al.* 2003). Por último, Bhatt y colaboradores (2007) utilizaron dos cepas (H37Rv y CDC1551) en las que se produjo la delección del gen *kasB* (Tabla 3) que codifica para una de las dos β -cetoacil sintetasas del sistema FASII. Aunque este gen se considera no esencial (en contraste con *kasA*), se observó que dicha mutación conduce a una pérdida de la característica de ácido alcohol resistencia, pérdida del “cording” y cambios en la morfología colonial que distingue a las cepas virulentas.

Tabla 3. Datos del gen *kasB* (Tuberculist <http://tuberculist.epfl.ch>).

Nombre del gen	<i>kasB</i>
Locus tag	Rv2246
Tipo	Codificante
Función	Participa en la biosíntesis de ácidos grasos (síntesis de ácidos micólicos), interviene en la extensión de los meromicolatos. Cataliza la reacción de condensación de síntesis de ácidos grasos por la adición a un aceptor de acilo de dos carbonos de malonil.
Producto	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] sintasa 2kasB (beta-cetoacil-ACP sintasa) (KAS I)
Masa molecular	46388.7
Punto isoeléctrico	5.1567
Longitud del gen (bp)	1317
Ubicación (kb)	2,519,396..2,520,712
Categoría funcional	Metabolismo de lípidos
Coordenadas	Inicio CDS: 2,519,396; Final CDS: 2,520,712 Inicio RBS: 2,519,386; Final RBS: 2, 519,389

Los análisis bioquímicos revelaron que la cepa mutante *kasB* produjo meromicolatos con longitudes de cadena ligeramente más cortos, en comparación con la cepa parental. Además de los distintos fenotipos de esta cepa mutante, el efecto más notable fue su capacidad para persistir en ratones inmunocompetentes infectados (C57BL/6) durante un máximo de 600 días sin causar enfermedad o mortalidad. Los resultados obtenidos por este grupo de trabajo implican que el gen *kasB* participa en la patogénesis de *M. tuberculosis* y que la cepa con mutación en el gen *kasB* podría ser utilizada como un modelo para estudiar infecciones latentes (Bhatt *et al.*, 2007). Por otra parte, la amplia similitud entre *kasA* y *kasB* conduce a preguntar por qué ambos genes se han conservado a través de la evolución y por qué la actividad de *kasB* se regula con el fin de dar un significado biológico y relevancia a la síntesis de ácidos micólicos que son solo 2-4 carbonos más cortos de lo habitual (Forrellad *et al.* 2013). Como ya se mencionó, en los estudios donde se utilizaron cepas con mutaciones en los genes *mmaA4* y *pcaA* en un modelo de infección en ratón se observó un fenotipo atenuado, en los que aunque existía una menor replicación en órganos, podían encontrarse un número moderadamente alto de bacterias en pulmón, bazo e hígado, incluso después de 20-30 semanas de infección (Rao *et al.* 2006). En ninguna de estas mutantes ha sido reportada una ácido-alcohol resistencia negativa, como en el caso de la cepa

mutante *kasB*, y sólo en la mutante *pcaA* se reportó un efecto en el “cord factor” al igual que en la mutante *kasB* reportada por Bhatt y colaboradores (2007).

2.5 Estudios clínicos de tuberculosis meníngea en animales.

Además de la evidencia genético molecular proporcionada por el estudio del efecto de las mutaciones de los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos, también se cuenta con información relevante sobre cepas clínicas y el cuadro clínico que causan en animales. En 2010, Pando y colaboradores realizaron un estudio clínico en Colombia, en donde se aislaron 3 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a partir líquido cerebro espinal. Estas cepas causantes de tuberculosis meníngea, previamente genotipificadas por espoligotipo, fueron inoculadas en ratones por vía intratraqueal al igual que la cepa de referencia H37Rv y 5 cepas clínicas causantes de tuberculosis pulmonar. Observaron que todas las cepas obtenidas de pacientes con tuberculosis meníngea, se diseminaron extrapulmonarmente por vía hematógena hasta llegar al sistema nervioso central, produciendo inflamación del parénquima cerebral y de las meninges en los animales infectados mientras que la cepa H37Rv y las cepas de origen pulmonar mostraron una capacidad muy limitada de infectar los mismos tejidos. Finalmente, concluyen que las cepas micobacterianas con un determinado genotipo, tienen una gran capacidad para diseminarse después de la infección pulmonar y atravesar la barrera hematoencefálica para causar tuberculosis meníngea. Es por esto que se hace evidente la necesidad de estudiar las secuencias de aquellos genes en los que se ha reportado que su alteración tiene como consecuencia una variación en la virulencia de *M. tuberculosis* en cepas de origen clínico con conocida capacidad de diseminación extrapulmonar, en este caso los genes involucrados en la vía de síntesis de ácidos micólicos.

III. ANTECEDENTES

Para el 2010 Michoacán se encontraba en el séptimo lugar nacional con menos casos de tuberculosis (SS, 2011). Sin embargo, la tasa de incidencia se ha mantenido estable desde el 2000 (Guillen-Nepita, 2014). Un estudio de las características epidemiológicas de la población afectada mostró que la población económicamente activa es la más afectada en la mayoría de los municipios del estado. También se observó que del año 2000 a 2012 hubo un aumento en el porcentaje estatal de casos extrapulmonares de 9.6 a 22.5%, sin que la incidencia se haya reducido significativamente en el mismo periodo (Guillén-Nepita, 2014). Desde el 2009 se han conservado aislados clínicos de pacientes captados por diversas instituciones de la Secretaría de Salud de Michoacán y, en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública, se ha generado una colección de 100 cepas de micobacterias causantes de tuberculosis provenientes del estado de Michoacán (Colección MYC), con la finalidad de evaluar las características genéticas y genotípicas de los aislados circulantes en la región. De éstas, 36 se encuentran tipificadas por espoligotipo y por variaciones en el número de repetidos en tándem de secuencias específicas de micobacterias (MIRU-VNTR; Guillén-Nepita, 2014); otras 25 cuentan con tipificación sólo por MIRU-VNTR (Vázquez-Heredia, 2014). La tipificación del resto de las muestras está en proceso. Dentro de las cepas del estado de Michoacán, un 85% provienen de casos pulmonares y 15% de casos extrapulmonares. De éstas últimas se eligieron 5 cepas causantes de tuberculosis meníngea para secuenciar su genoma completo. Tres de las cepas secuenciadas corresponden a la familia T1, la cual forma parte del linaje Euro-Americano y es una de las familias más abundantes en la colección. Dos de estas cepas provocaron la muerte de los pacientes que las portaban, a pesar de ser pacientes menores de 30 años y con ninguna otra morbilidad conocida. Otra de las cepas corresponde a la familia Beijing, de origen asiático y de la cual se ha reportado su capacidad para diseminarse fuera de los pulmones. La última cepa es de la familia LAM que es parte del linaje Euro-Americano, esta familia representa cerca del 50% de los casos de TB en América del Sur (Marín *et al.* 2006).

Actualmente se cuenta con la secuencia consenso del genoma de las 5 cepas mencionadas. Un análisis comparativo preliminar ha arrojado que estas cepas presentan entre 396 y 1211 polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP), los cuales entre 84 y 89% se encuentran en regiones codificantes (Guillén-Nepita et al., datos no publicados). De éstos, alrededor del 8% se encuentra en genes involucrados directamente en el metabolismo de lípidos, y 20% en procesos relacionados con la síntesis de pared celular y otras funciones celulares. La detección de inserciones y eliminaciones está en proceso.

Las características clínicas asociadas a estas cepas y sus particularidades genotípicas, permiten que sean consideradas como un modelo biológico apropiado para evaluar si existen cambios genómicos en los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos que podrían influir en su virulencia.

De encontrarse variaciones genómicas asociadas a cepas causantes de tuberculosis meníngea se podrían sugerir marcadores moleculares universales de virulencia, independientes del linaje micobacteriano, que podrían ser ensayados en aislados clínicos circulantes. Esto haría posible la inversión de recursos en la contención y eliminación de cepas particularmente virulentas a nivel global.

IV. JUSTIFICACIÓN

El hecho de que la tuberculosis se encuentre como la segunda enfermedad infecciosa con mayores tasas de mortalidad a nivel mundial, resalta su importancia y la necesidad de no disminuir los esfuerzos para reducir su incidencia. En los últimos años, se ha reportado una alta diversidad genética dentro de esta especie asociada a variación en la virulencia. En particular, en la ruta de síntesis de ácidos micólicos se ha reportado que los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* juegan un papel importante en la virulencia de *M. tuberculosis*. Aunque la genómica comparativa ha permitido la comparación entre cepas de referencia, no existe evidencia científica de trabajos de investigación en donde se halla llevado a cabo el análisis comparativo entre las secuencias de genes involucrados en la síntesis de ácidos micólicos de aislados clínicos y las secuencias depositadas en las bases de datos públicas, para demostrar el efecto potencial en la virulencia de las cepas regionales. Este trabajo pretende aportar información sobre las variaciones que las cepas clínicas extrapulmonares presentan en estos elementos genéticos. Para ello se hará uso de la información contenida en las secuencias genómicas de 5 cepas causantes de tuberculosis meníngea con las que cuenta nuestro grupo de trabajo. La estrategia a seguir hará uso de herramientas bioinformáticas para la búsqueda de los elementos genéticos involucrados en la síntesis de ácidos micólicos, su comparación entre ellos y los provenientes de cepas pulmonares, previamente depositados en bases de datos públicas, y el análisis de las diferencias encontradas, con la finalidad de detectar mutaciones con potencial efecto en la virulencia de *M. tuberculosis*.

V. HIPÓTESIS

Las cepas causantes de tuberculosis meníngea presentan polimorfismos en las secuencias de los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* que no se presentan en cepas causantes de tuberculosis pulmonar.

VI. OBJETIVOS

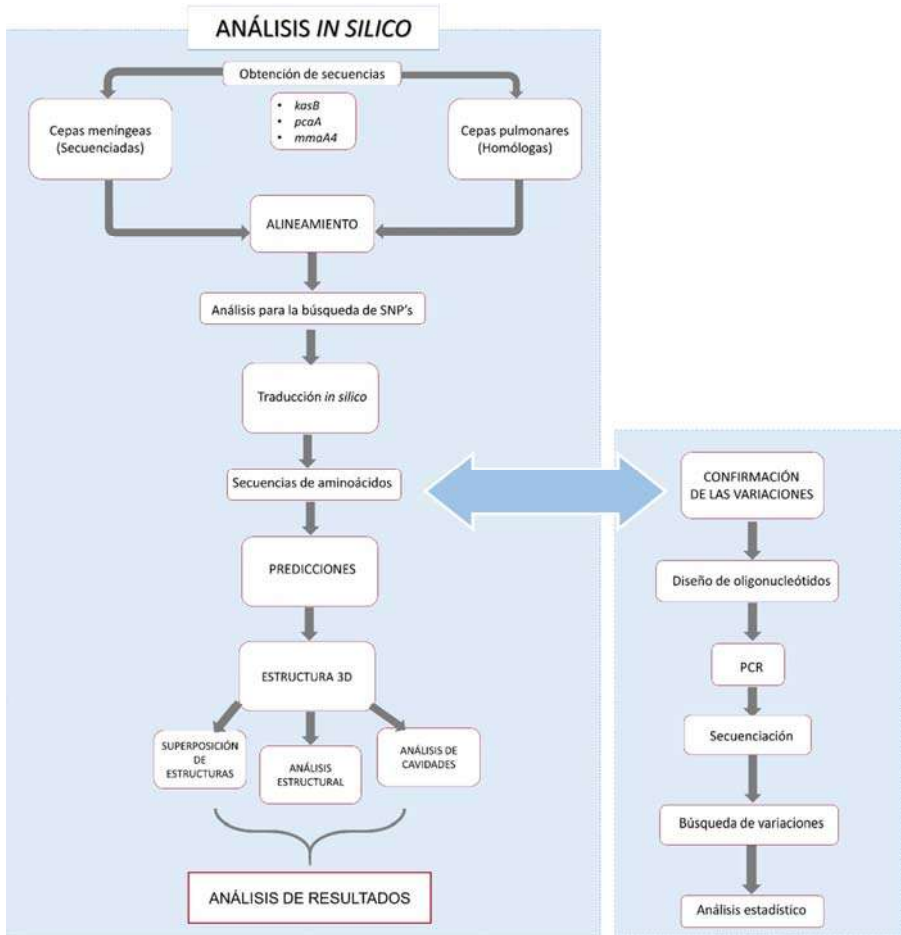
Objetivo general

Realizar un análisis comparativo de los polimorfismos en la secuencia de genes de la ruta de síntesis ácidos micólicos entre cepas meníngeas y pulmonares de *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos específicos

- Seleccionar polimorfismos en la secuencia de los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* específicos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* causantes de tuberculosis meníngea.
- Determinar si los polimorfismos encontrados tienen un efecto a nivel de las proteínas presuntivas codificadas por los genes evaluados.
- Establecer cuáles de los polimorfismos encontrados pueden ser utilizados como marcadores de virulencia.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material biológico

Se utilizó ADN de la cepa de referencia H37Rv y de 5 cepas de origen meníngeo causantes de tuberculosis (Tabla 4) pertenecientes a la colección MYC del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Tabla 4. Características clínicas de las cepas seleccionadas.

Clave	Familia	Sexo	Edad	Municipio	Tipo TB	Enfermedades asociadas	AB
MYC003	T1	M	60	Parácuaro	Meníngea	Ignorado	S
MYC004	Beijing	M	NR	NR	Meníngea	Ignorado	S
MYC036	T1	F	21	Lázaro C.	Meníngea	Ninguna	NR
MYC037	T1	M	24	Morelia	Meníngea	Ninguna	R-ESTR
MYC055	LAM	F	NR	NR	Meníngea	Ignorado	R-ESTR

Abreviaturas: AB, antibiograma; NR, no reportado; S, susceptible; R, resistente; ESTR, estreptomina.

8.2 Análisis *in silico*

Las secuencias consenso de los genomas de las cepas mencionadas en la Tabla 4, fueron obtenidas previamente mediante la plataforma de secuenciación masiva en paralelo SOLiD (Breu, 2010) y ensambladas por Bioscope® (Applied Biosystems, 2010).

8.2.1 Obtención de secuencias de los genes en cepas meníngeas

Para obtener las secuencias de los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* se utilizó la suite de análisis genómicos *Galaxy* (Giardine *et al.* 2005). El software ejecutable

está disponible desde un servidor al que se accede a través de la web:
<https://usegalaxy.org/>.

8.2.2 Obtención de secuencias homólogas de los genes en cepas pulmonares

Para determinar qué variaciones existen entre las secuencias de los genes de interés de las cepas meníngeas de la colección y sus homólogas en cepas pulmonares depositadas en bases de datos públicas, se utilizó la herramienta *BLASTn* (Altschul *et al.* 1990). Como parámetros para la selección de secuencias homólogas se tomó en cuenta que fueran secuencias provenientes de cepas causantes de tuberculosis pulmonar, la cuantificación de la similitud entre pares de secuencias y la determinación de la significancia estadística de dicho parecido (Curso Biología Evolutiva UNAM, 2016), reportadas por los estadísticos de BLAST. Además se buscaron aquellas que correspondieran a la misma familia a la que pertenecen las cepas de origen meníngeo de la colección MYC. Hasta el momento del análisis se encontraron 9 genomas causantes de tuberculosis meníngea depositados en la base de datos del NCBI; las secuencias de los genes correspondientes a *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* de estas cepas también se incluyeron en el análisis. Posteriormente se crearon 3 archivos multifasta de 24 secuencias cada uno, correspondientes a cada gen de estudio.

8.2.3 Búsqueda de SNP's

Cada archivo multifasta se sometió a un alineamiento múltiple por traducción inversa, específico para secuencias codificantes, usando las herramientas MEGA7 (Kumar *et al.* 2016) y CLUSTALX v2.1 (Larkin *et al.* 2007) con el objetivo de determinar las correspondencias de homología a nivel de las bases nitrogenadas. Los alineamientos se llevaron a cabo con las opciones "default" de CLUSTALX y MEGA y posteriormente fueron editados con *Bioedit*. Una vez obtenidos los alineamientos se realizó la búsqueda de SNP's para cada grupo de secuencias y se determinó si éstos eran sinónimos o no sinónimos.

8.2.4 Predicción de los efectos de las variaciones encontradas

Se realizó la traducción *in silico* de las secuencias por medio del algoritmo *GeneMarkS* (Besemer *et al.* 2001). A partir de estas secuencias de aminoácidos y las variantes encontradas se utilizaron los algoritmos SIFT (Ng y Henikoff, 2003), DUET (Pires *et al.* 2014) y mCSM (Pires *et al.* 2014). SIFT predice si la sustitución de un aminoácido afecta la función de la proteína basado en el grado de conservación de residuos de aminoácidos en el alineamiento de secuencias estrechamente relacionadas. Se utilizó la herramienta *SIFT protein single tools* con la opción *SIFT sequence* seleccionando la base de datos *NCBI non redundant*, una media de conservación de secuencias de 3.0 y removiendo secuencias que sean alrededor del 95% idénticas al *query* como parámetros del análisis. Para la interpretación de resultados de este algoritmo, una variación con un puntaje mayor a 0.05 será una sustitución TOLERADA, es decir no afectará la función de la proteína, por otro lado una variación con un puntaje menor a 0.05 será NO TOLERADA y afectará la función de la proteína (Ng y Henikoff, 2013). DUET y mCSM son algoritmos que basan sus predicciones en los cambios de energía libre de gibbs, que describe la estabilidad conformacional de las proteínas. Los resultados se reportan como variaciones en la energía libre de gibbs ($\Delta\Delta G$), en donde valores negativos denotan sustituciones desestabilizadoras (Pires *et al.* 2014).

8.2.5 Predicción de la estructura terciaria

Se modelaron las estructuras 3D usando el servidor *Swiss model* en su modo automático (Guex y Peitsch, 1997). Las estructuras terciarias de las enzimas codificadas por los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* se encuentran disponibles en el *Protein Data Bank* (PDB) ya que fueron determinadas experimentalmente de manera previa por cristalografía de rayos X. Los moldes utilizados en el modelado de las enzimas se muestran en la tabla 5, para la elección de los mismos se evaluaron los siguientes aspectos:

1. Puntuación en el alineamiento (identidad <30%).
2. Presencia de ligandos de interés o cambios de conformación relevantes.

3. Calidad de la estructura (resolución > 3 Å).

Las estructuras terciarias modeladas se validaron usando herramientas del paquete *Whatif* (Vriend, 1990), disponible en <http://swift.cmbi.ru.nl/whatif/>.

Tabla 5. Moldes utilizados para el modelado 3D de las enzimas de interés.

Gen	Proteína	Especie	PDB ID	Resolución
<i>kasB</i>	3-cetoacil-ACP-sintasa	<i>M. Tuberculosis</i>	2GP6	2.4 Å
<i>pcaA</i>	Ciclopropano sintasa	<i>M. Tuberculosis</i>	1L1E	2.0 Å
<i>mmaA4</i>	Hidroximicolato sintasa	<i>M. tuberculosis</i>	2FK8	2.0 Å

8.2.6 Análisis estructural

a) Comparaciones globales de la estructura tridimensional

Los métodos más utilizados para la comparación global de estructuras de proteínas emplean el cálculo de *RMSD* (*Root mean square deviation*) ésta es la desviación media de la raíz cuadrada, la cual se obtiene de la superposición de los conjuntos de coordenadas atómicas de la cadena principal (N, C, O) pertenecientes a parejas de residuos que quedan juntos en un alineamiento estructural de las dos proteínas, siendo este valor una distancia en Armstrong (Å). El RMSD en la comparación de una proteína consigo misma es de 0 Å y entre más se incrementa el valor del RMSD al comparar dos proteínas, significa que estas tienen mayor diferencia conformacional (Maiti *et al.* 2004). Se calcularon los valores de RMSD utilizando el programa *UCSF Chimera v.1.11.2*, este programa permite la visualización interactiva y análisis de estructuras moleculares, generación de mapas de densidad, ensamblados supramoleculares, alineamientos estructurales, docking, etc (Pettersen *et al.* 2004).

b) Comparaciones locales de la estructura tridimensional

RMS posicional (Raíz media cuadrática por posición). Son las distancias entre cada par de los aminoácidos que se encuentran alineados en la superposición de las dos estructuras que se desean comparar y se expresan en función de la posición de las parejas de residuos que se comparan, con respecto al alineamiento estructural de las dos proteínas (Maiti *et al.* 2004).

Los valores de RMS de los residuos en contacto con el ligando se calcularon utilizando *UCSF Chimera*. Adicionalmente se evaluaron los cambios en residuos catalíticos, residuos de unión a sustrato y residuos que contribuyan a la estabilidad de la proteína.

c) Análisis de cavidades

Con la finalidad de observar si alguna de las variaciones encontradas tiene un efecto sobre la geometría del sitio de unión de la enzima, se llevó a cabo un análisis de cavidades utilizando la herramienta CASTp (Dundas *et al.* 2006). De las cavidades encontradas se seleccionó aquella que está en contacto con el ligando, tiene un tamaño adecuado y presenta alta hidrofobicidad para calcular cambios en el volumen, área y número de aberturas respecto a la referencia (Piedra *et al.* 2008).

8.3 Análisis in vitro

8.3.1 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes de interés usando el programa *Oligo explorer v.1.2* (Kuulasmaa *et al.* 2004) con base en la secuencia genómica de *M. tuberculosis* H37Rv y en general cumpliendo como mínimo con las siguientes características: longitud entre 18 y 29 nucleótidos, %GC entre 50 y 60%, T_m entre 55°C y 71°C con una diferencia máxima de 2°C entre los T_m's del iniciador directo y reverso, evitando las auto-complementariedades y la formación de dímeros de oligos. Adicionalmente, deben tener en su extremo (3') una G o C, o GC, CC, CG, GG, ⁶⁷. Las secuencias

obtenidas fueron probadas utilizando *PCR in silico* (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) (Bikandi *et al.* 2004) para asegurar un solo producto de PCR.

Una lista completa de los iniciadores usados se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Oligonúcleotidos utilizados en el presente trabajo

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA (5' – 3')	PRODUCTO
kasBF	AACAACCTCGTTCGGGTTCGG	3-oxoacyl-ACP-synthase 2 gene
kasBR	TCATCGCAGGTCTCCTGTGCG	3-oxoacyl-ACP-synthase 2 gene
kasBF2	CGCATCGTGATGTCCACCAA	3-oxoacyl-ACP-synthase 2 gene
pcaAF	CGGTACTTTTCCAGTGTGA	Cyclopropane mycolic acid synthase gene
pcaAR	AAGGCTCAATCGGTATGTCC	Cyclopropane mycolic acid synthase gene
mmaA4F	AGACGCATAAGCCCCCGCAC	Hydroxymycolate synthase gene

8.3.2 Amplificación por PCR

Para la estandarización de las condiciones de amplificación se llevaron a cabo ensayos de PCR de los genes *kasB* y *pcaA* utilizando ADN de las cepas MYC003, MYC004, MYC036, MYC037, MYC055. Inicialmente la reacción de PCR se desarrolló con Tris-HCl 20 mM pH 8.2, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 μM, 0.4 μM de cada oligonucleótido, 1U de *Taq* DNA Polimerasa Recombinante (Invitrogen®, para el gen *pcaA* s, y para el gen *kasB* se utilizó *Taq* HIFI Platinum Polimerasa (Invitrogen®, USA). Se utilizaron coadyuvantes de PCR, DMSO al 4% para *pcaA* y solución Q para *kasB*. En todos los casos se incluyó un control positivo de la reacción utilizando DNA molde de *M. tuberculosis* H37Rv. Las condiciones iniciales se fueron modificando para optimizar el ensayo de PCR para cada uno de los 2 genes en todos los aislados de estudio. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Corbett Research Palm-Cycler™ (Corbett Life Science®), utilizando diferentes programas para cada gen: gen *pcaA*, 30 ciclos de 90 seg a 95°C, 90 seg a 57°C y 60 seg a 72°C ; para el gen *kasB*, 35 ciclos de 60 seg a 95°C, 90 seg a 67°C y 30 seg a 72°C ; en ambos casos hubo un paso inicial a 95°C durante 7 min y un paso final de extensión a 72°C por 5 min.

Tabla 7. Condiciones de PCR para la amplificación de los genes *kasB* y *pcaA*

PRODUCTO	MOLDE	INICIADORES	CICLOS		
<i>pcaA</i>	MYC003 MYC004 MYC036 MYC037 MYC055	<i>pcaAF</i> <i>pcaAR</i>	95°C x 90s	57°C x 90s	72°C x 60s
<i>kasB</i>	MYC003 MYC004 MYC036 MYC037 MYC055	<i>kasBF</i> <i>kasBF2</i> <i>kasBR</i>	95°C x 60s	67°C x 90s	72°C x 30s

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) teñidos con bromuro de etidio (BrEt) y las imágenes de los geles se capturaron en el fotodocumentador ChemiDoc (BioRad, USA).

8.3.3 Secuenciación

Para determinar la secuencia de los genes, se contrató un servicio de secuenciación externo (ELIM BIOPHARM, USA). Las muestras se prepararon según las especificaciones particulares del servicio de secuenciación. Los oligonucleótidos específicos para cada gen fueron eluidos con agua y la concentración se ajustó a 3µM. Los electroferogramas fueron visualizados y editados mediante el software *ChromasPro* v 2.0 (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>) y las secuencias resultantes fueron comparadas con la base de datos del NCBI mediante BLAST para finalmente someterlas a un alineamiento múltiple con la finalidad de comprobar la presencia de las variaciones genómicas encontradas, utilizando las herramientas antes mencionadas.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Obtención de secuencias de los genes en cepas meníngeas.

Mediante la suite de análisis genómico *Galaxy* fue posible obtener las secuencias de los genes *pcaA* y *mmaA4*, sin embargo no se pudo obtener la correspondiente para *kasB*, debido a una mala calidad en la secuenciación, es decir en algunas posiciones no se pudieron asignar nucleótidos por lo que no se pudo completar la secuencia de DNA. Para resolver esta situación, se amplificó el gen por PCR y posteriormente se secuenció.

9.2 Obtención de secuencias homólogas de los genes en cepas pulmonares.

A partir de los genomas seleccionados (Tabla 8), se extrajeron las secuencias de interés en formato fasta y se crearon 3 archivos multifasta de 24 secuencias cada uno, correspondientes a cada gen de estudio.

9.3 Alineamiento múltiple de secuencias.

El alineamiento múltiple de las secuencias permitió evidenciar la existencia de regiones muy conservadas a lo largo de toda la secuencia, sin embargo también fue posible encontrar variaciones exclusivas de cepas meníngeas, de las cuales la gran mayoría están presentes en el gen *mmaA4* (Fig. 6), en este gen se encontró una región de alta variabilidad en la cepa MYC036 que va de la posición 323 a la posición 360 (Fig. 7).

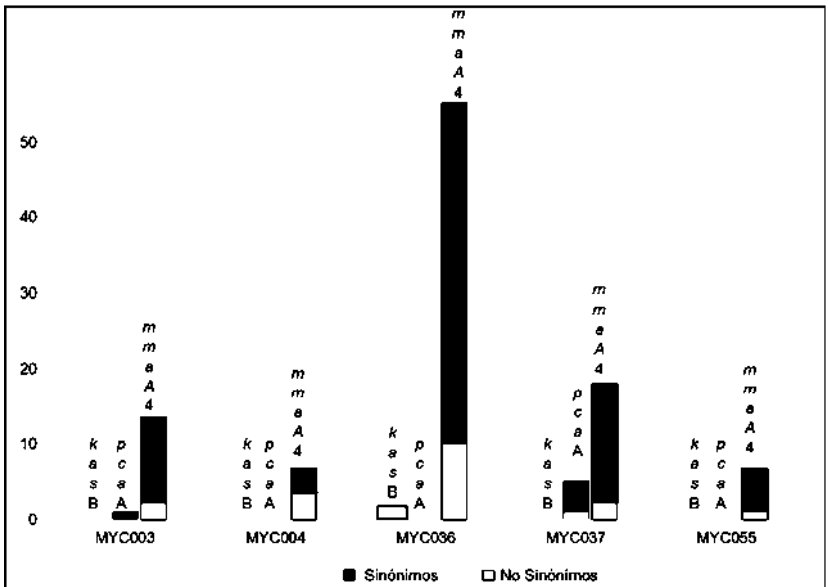


Figura 6. Frecuencia de SNP's en las cepas de la colección. En la cepa MYC003 se encontraron 15 SNP's, en MYC004 9 SNP's, en MYC036 57 SNP's, en MYC037 22, y en MYC055 7 SNP's.

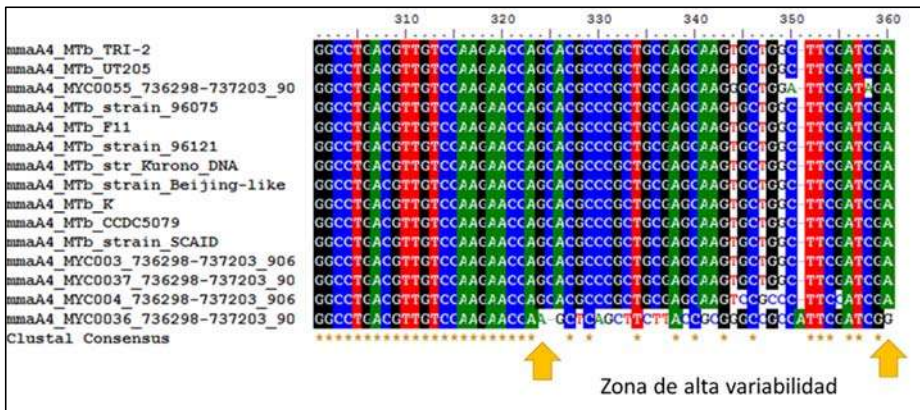


Figura 7. Región de alta variabilidad presente en el gen *mmaA4* de la cepa MYC036. Se observa la inserción de una adenina en la posición 351 y la deleción de una citosina en la posición 326.

Adicionalmente se revisaron los alineamientos entre cepas meníngeas y pulmonares del resto de los genes participantes en la síntesis de ácidos micólicos: *cmaA1*, *cmaA2*, *mmaA1*, *mmaA2*, *mmaA3*, *umaA1* y *umaA2*. Las variaciones exclusivas de cepas de origen meníngeo que fueron encontradas son:

mmaA1: 6 SNP's y 2 inserciones; *cmaA2*: 16 SNP's; *mmaA2*: 2 SNP's

Como puede observarse el gen *cmaA2* acumula una mayor cantidad de variaciones. Las modificaciones en este gen se han asociado a un fenotipo hipervirulento (Rao *et al.* 2006), de manera que una alteración en la función de la enzima codificada por el mismo, alteraría el fenotipo observado en la cepa correspondiente.

Un hallazgo importante en el gen *mmaA2* fue la presencia del SNP: A696C el cual aparece en todas las cepas pertenecientes a la familia Beijing (Fig. 8).

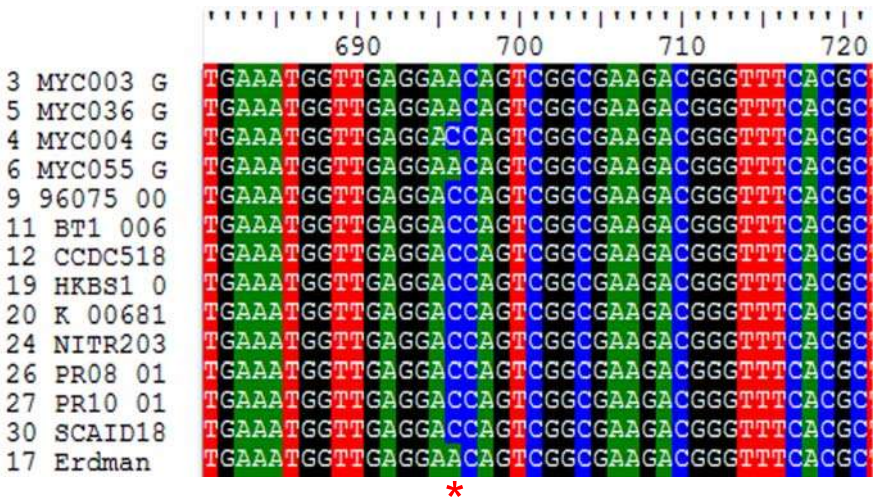


Figura 8. SNP en la posición 696 del gen *mmaA2*. Esta variación aparece en las cepas pertenecientes a la familia Beijing, tanto pulmonares como extrapulmonares: MYC004, 96075, BT1, CCDC518, HKBS, K, NITR203, PR08, PR10 y SCAID.

Tabla 8. Genomas seleccionados para la extracción de secuencias homólogas de los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4*

Tipo TB	Cepa	Origen	SPOL	Resistencia	Referencia
PULMONAR	323 Beijing-like	Colombia	Beijing-like (SIT 190)	H, E, R, Z, S, Am, Km, Cm	doi: 10.1128/genomeA.00371-15
PULMONAR	Kurono	Japón	LAM04 (SIT 60)	Sin resistencia	doi: 10.1016/j.tube.2014.10.007
PULMONAR	F11	Sudafrica	LAM03 (SIT 33)	Sin resistencia	doi:10.1371/journal.pone.0056577
PULMONAR	CCDC5079	China	Beijing (SIT 1)	Sin resistencia	doi: 10.1128/JB.05452-11
PULMONAR	CTRI-2	Rusia	LAM09 (SIT 42)	Sin resistencia	doi: 10.1371/journal.pone.0056577
PULMONAR	K	Corea del Sur	Beijing (SIT 1)	Clr	doi: 10.1186/s40793-015-0071-4
PULMONAR	96121	Filipinas	EAI2-Manila (SIT19)	Sin resistencia	doi: 10.1128/genomeA.01135-14
PULMONAR	SCAID 187.0	Kasakhstan	Beijing (SIT 1)	Mfx, Gfx, Lfx, S, E, R	doi:10.1128/ genomeA.01272-15
PULMONAR	UT205	Colombia	LAM09 (SIT 42)	Sin resistencia	doi: 10.1186/1471-2164-12-493
MENÍNGEA	46-5069	Bangkok	NR	Sin resistencia	doi: 10.7717/peerj.1905
MENÍNGEA	CSF3053	Bangkok	NR	Sin resistencia	doi: 10.7717/peerj.1905
MENÍNGEA	43-13838	Bangkok	NR	Sin resistencia	doi: 10.7717/peerj.1905
MENÍNGEA	43-16836	Tailandia	NR	NR	doi: 10.1128/genomeA.00801-13
MENÍNGEA	C2	India	NR	NR	doi: 10.1128/genomeA.00842-14
MENÍNGEA	MTB221-11	Malaysia	T2-Uganda (SIT 135)	NR	doi: 10.1128/genomeA.00376-16
MENÍNGEA	PR05	Malaysia	NR	NR	doi: 10.1128/genomeA.00397-13
MENÍNGEA	PR08	Malaysia	NR	NR	doi: 10.1016/j.gdata.2015.12.030
MENÍNGEA	PR10	Malaysia	NR	R, H	doi: 10.1016/j.gdata.2016.01.002

Abreviaturas: Isoniazida (H), etambutol (E), rifampicina (R), pirazinamida (Z), estreptomycin (S), amicacina (Am), kanamicina (Km), capreomicina (Cm), claritromicina (Clr), moxifloxacino (Mfx), gatifloxacino (Gfx), levofloxacino (Lfx).

El total de las variaciones encontradas se muestran en la tabla 9. Una vez terminada la búsqueda de SNP's, se realizó la traducción *in silico* para determinar si estos cambios ocasionaban un cambio de aminoácido en esa posición (sustitución no sinónima) o no (sustitución sinónima). Del análisis de los datos obtenidos, para el gen *pcaA* se encontraron 6 SNP's repartidos en 2 de las 5 cepas meníngeas de los cuales, 5 provocan un cambio en la secuencia de aminoácidos; para el gen *mmaA4* se encontraron 87 SNP's repartidos en las 5 cepas meníngeas analizadas, de estos, 72 provocan un cambio de aminoácido y uno de ellos codifica un codón de paro y para el gen *kasB* se encontraron 2 SNP's sinónimos en una de las cepas meníngeas analizadas (Fig.6).

Tabla 9. SNP's en los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos exclusivos de cepas causantes de tuberculosis meníngea presentes cepas aisladas en el estado de Michoacán (Parte 1).

GEN	CEPA	SNP/POSICIÓN	SINÓNIMO/NO SINÓNIMO
<i>pcaA</i>	MYC003	C 628 A	No sinónimo
<i>pcaA</i>	MYC037	C 24 T	Sinónimo
<i>pcaA</i>	MYC037	G 167 C	No sinónimo
<i>pcaA</i>	MYC037	A 242 G	No sinónimo
<i>pcaA</i>	MYC037	C 647 A	No sinónimo
<i>pcaA</i>	MYC037	C 724 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC003	T 135 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC003	G 136 T	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC003	A 632 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC003	G 637 C	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC003	C 641 T	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC003	T 642 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC003	A 644 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC003	T 645 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC003	G 646 T	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC003	A 834 C	No sinónimo/codón de paro
<i>mmaA4</i>	MYC003	T 897 C	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC003	T 898 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC004	A 296 T	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC004	T 297 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC004	C 345 G	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC004	G 347 T	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC004	C 348 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC004	C 349 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC004	C 354 G	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 275 T	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	A 280 C	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 325 C	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 326 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 327 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 328 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	A 329 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 330 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 332 G	No sinónimo

~~Tabla 9. SNP's en los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos exclusivos de cepas causantes de tuberculosis meníngea presentes cepas aisladas en el estado de Michoacán (Parte 2).~~

Tabla 9. SNP's en los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos exclusivos de cepas causantes de tuberculosis meníngea presentes cepas aisladas en el estado de Michoacán (Parte 2).

GEN	CEPA	SNP/POSICIÓN	SINÓNIMO/NO SINÓNIMO
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 333 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 334 T	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 335 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 336 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	A 337 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 338 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 339 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	G 340 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 341 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	G 342 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	G 344 T	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 345 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	G 347 T	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 348 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 349 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	G 359 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	A 350 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	G 363 C	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	G 364 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	G 365 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 368 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 369 C	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 372 A	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	G 373 C	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 374 G	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	A 383 T	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 384 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 398 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 399 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 587 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 886 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 887 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 888 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 895 G	No sinónimo

<i>mmaA4</i>	MYC036	A 896 C	No sinónimo
--------------	--------	---------	-------------

~~Tabla 9. SNP's en los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos exclusivos de cepas causantes de tuberculosis meníngea presentes cepas aisladas en el estado de Michoacán (Parte 3).~~

Tabla 9. SNP's en los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos exclusivos de cepas causantes de tuberculosis meníngea presentes cepas aisladas en el estado de Michoacán (Parte 3).

GEN	CEPA	SNP/POSICIÓN	SINÓNIMO/NO SINÓNIMO
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 897 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	T 898 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	C 901 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC036	G 902 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	G 155 T	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	T 156 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	C 175 T	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	G 176 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	C 262 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	A 300 C	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	G 361 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	T 362 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	G 363 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	G 364 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	T 365 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	A 366 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	T 444 C	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	C 568 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC037	T 569 G	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC055	G 344 T	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC055	A 350 C	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC055	A 357 C	Sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC055	G 493 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC055	G 494 A	No sinónimo
<i>mmaA4</i>	MYC055	G 495 C	No sinónimo
<i>kasB</i>	MYC036	C 335 G	Sinónimo
<i>kasB</i>	MYC036	C 502 G	Sinónimo

9.4 Predicción de los efectos de las variaciones encontradas

- *Predicciones SIFT*. Los resultados obtenidos muestran que para el gen *pcaA* todas las sustituciones son toleradas a excepción de la dada por el cambio de una alanina por una glicina en la posición 56 (80% TOLERADAS), mientras que para el gen *mmaA4* de las 40 sustituciones encontradas, 21 son NO TOLERADAS, lo que corresponde al 52.5% del total, es decir más de la mitad de las sustituciones aminoacídicas afectarán la función de la proteína (Tabla 10).

Tabla 10. Predicciones SIFT.

Gen	Sustitución	Cepa	Predicción SIFT	Score	Secuencias representadas
<i>pcaA</i>	T210P	003	TOLERADO	0.27	83
<i>pcaA</i>	A56G	037	NO TOLERADO	0.03	83
<i>pcaA</i>	R81H	037	TOLERADO	0.11	82
<i>pcaA</i>	E216A	037	TOLERADO	0.99	83
<i>pcaA</i>	A242P	037	TOLERADO	0.07	83
<i>mmaA4</i>	Y46D	003	NO TOLERADO	0	57
<i>mmaA4</i>	L52R	037	NO TOLERADO	0.02	57
<i>mmaA4</i>	Y59R	037	TOLERADO	0.12	57
<i>mmaA4</i>	M88R	037	NO TOLERADO	0	57
<i>mmaA4</i>	V99D	004	NO TOLERADO	0	57
<i>mmaA4</i>	H109A	036	TOLERADO	0.69	57
<i>mmaA4</i>	A110Q	036	TOLERADO	0.21	57
<i>mmaA4</i>	R111C	036	TOLERADO	0.33	57
<i>mmaA4</i>	C112L	036	NO TOLERADO	0.04	57
<i>mmaA4</i>	E113T	036	NO TOLERADO	0.03	57
<i>mmaA4</i>	Q114A	036	NO TOLERADO	0.02	57
<i>mmaA4</i>	V115G	036, 055	TOLERADO	0.36	57
<i>mmaA4</i>	L116R	036,004	NO TOLERADO	0.01	57
<i>mmaA4</i>	A117P	004	TOLERADO	0.85	57
<i>mmaA4</i>	A117D	055	TOLERADO	0.68	57
<i>mmaA4</i>	A117H	036	NO TOLERADO	0.05	57

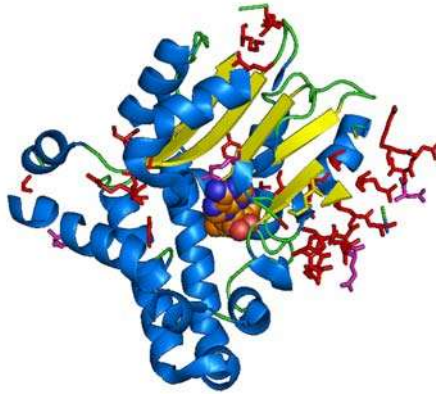
<i>mmaA4</i>	D120G	036	TOLERADO	0.58	57
<i>mmaA4</i>	T121V	037	TOLERADO	0.09	57
<i>mmaA4</i>	N122V	037	TOLERADO	0.3	57
<i>mmaA4</i>	N122G	036	TOLERADO	0.3	57
<i>mmaA4</i>	R123P	036	NO TOLERADO	0.04	57
<i>mmaA4</i>	R125A	036	TOLERADO	0.62	57
<i>mmaA4</i>	L128H	036	TOLERADO	0.24	57
<i>mmaA4</i>	E133V	036	NO TOLERADO	0.01	57
<i>mmaA4</i>	N165G	055	TOLERADO	0.53	57
<i>mmaA4</i>	G190L	037	NO TOLERADO	0	57
<i>mmaA4</i>	E196V	036	TOLERADO	0.1	51
<i>mmaA4</i>	G211D	003	NO TOLERADO	0	57
<i>mmaA4</i>	R213G	003	TOLERADO	0.25	57
<i>mmaA4</i>	L214P	003	TOLERADO	0.09	57
<i>mmaA4</i>	P215H	003	NO TOLERADO	0	57
<i>mmaA4</i>	S216A	003	TOLERADO	0.55	57
<i>mmaA4</i>	K296F	036	NO TOLERADO	0	56
<i>mmaA4</i>	A299H	036	NO TOLERADO	0	15
<i>mmaA4</i>	A300S	036,003	TOLERADO	0.57	14
<i>mmaA4</i>	A301R	036	NO TOLERADO	0.01	10

Una sustitución se considera no tolerada cuando la probabilidad de encontrar un determinado aminoácido en esa posición en el lineamiento es < 0.05 .

- *Predicciones DUET.* Para realizar las predicciones con este servidor se utilizaron estructuras “molde” las cuales fueron resueltas experimentalmente y depositadas en la base de datos *Protein Data Bank* en formato PDB de manera previa por otros autores. Los moldes fueron 1L1E para la ciclopropano sintasa codificada por *pcaA* y 2FK8 para la hidroximicolato sintasa codificada por *mmaA4*, además se utilizó la lista de sustituciones encontradas para cada gen.

Los resultados muestran que el 80% de las sustituciones desestabilizará la estructura proteica de la ciclopropano sintasa en ambas cadenas del homodímero codificado por *pcaA*, afectando la función de la misma y en el caso del gen *mmaA4* el 90% de las sustituciones desestabilizarán a la enzima, afectando su función.

Una gran cantidad de sustituciones de aminoácidos se localizan alrededor de las posiciones 109 a 122 ubicadas en una alfa hélice y en una lámina beta que forman



parte del dominio metiltransferasa de la enzima (Fig. 9).

Figura 9. Estructura tridimensional de la hidroximicolato sintasa de *M. tuberculosis* H37Rv. Las α -hélices se muestran en azul, las láminas β en amarillo y los loops en verde. Los residuos cuyo cambio en las cepas meníngeas estabilizan la enzima están coloreados en fucsia, y aquellos que la desestabilizan están coloreados en rojo.

Como puede observarse se encuentra una disparidad en los resultados obtenidos por los servidores SIFT y DUET, esto se debe a que ambos se basan en diferentes aspectos para realizar sus predicciones, SIFT calcula tomando en cuenta el grado de conservación de los residuos y DUET los cambios en la energía libre de Gibbs de un residuo específico en relación a la estructura tridimensional. Cabe resaltar que cada una de las predicciones es individual y no nos proporciona información acerca de la afectación al funcionamiento de la enzima, si será benéfica o deletérea para la misma.

- *Predicciones mCSM.* Se utilizó el servidor mCSM para determinar si los cambios de aminoácidos en la ciclopropano sintasa de las cepas MYC003 y MYC037 afectaban la afinidad proteína-proteína, en este caso la afinidad por cada uno de los monómeros presentes en la estructura terciaria. Se observaron cambios en la ΔG de cada residuo por lo que las 6 sustituciones desestabilizarán la afinidad de ambas cadenas.

9.5 Predicción de la estructura terciaria

Es importante evaluar las variaciones en estudios estructurales porque esto conduce a explicar cómo las modificaciones producen a cambios en la estructura y presumible en su función (Lema y Echave, 2005). Debido a que los algoritmos SIFT y DUET solo toman en cuenta la estructura primaria y secundaria proteica, es necesario realizar predicciones de la alteración de la función por la presencia de variaciones que puedan alterar su estructura terciaria. A partir de la secuencia de aminoácidos se construyeron modelos tridimensionales para cada una de las enzimas que poseen variaciones respecto a la referencia (H37Rv) mediante modelado por homología con *Swiss model*. Se seleccionaron los moldes según los criterios mencionados en Materiales y Métodos. En la tabla 11 se muestran los valores de cobertura e identidad así como un parámetro de calidad (Q-mean) para cada uno de los modelos obtenidos.

Tabla 11. Características de los modelados obtenidos.

Proteína	Cepa	Molde	Ligando	% ID	Cobertura	Q-MEAN
Mycolic acid synthase	MYC003	1L1E	S-adenosyl-l-homosisteína	99.65	16 -287	-1.27
Mycolic acid synthase	MYC037	1L1E	S-adenosyl-l-homosisteína	98.61	16-287	-1.56
Methoxy micolic acid synthase 4	MYC003	2FK8	S-adenosyl-metionina	97.96	21 -227	0.06
Methoxy micolic acid synthase 4	MYC004	2FK8	S-adenosyl-metionina	98.03	21-227	-0.14
Methoxy micolic acid synthase 4	MYC036	2FK8	S-adenosyl-metionina	93.53	21-227	-0.71
Methoxy micolic acid synthase 4	MYC037	2FK8	S-adenosyl-metionina	97.66	21-277	-0.31
Methoxy micolic acid synthase 4	MYC055	2FK8	S-adenosyl-metionina	98.93	21-227	0.07

El % de identidad es de la secuencia a modelar con el molde utilizado. El valor Q-mean es una medida de la calidad del modelo (valores cercanos a cero corresponden a modelos de alta calidad).

Como se puede observar la cobertura de la estructura obtenida respecto a la secuencia no es completa, por esta razón se llevaron a cabo modelados utilizando la herramienta *Modeller* (Webb y Sali, 2014) dentro del paquete *UCSF Chimera* para tratar de obtener una cobertura del 100%. Para esto se eligieron 5 moldes para cada una de las enzimas (5 para la codificada por *pcaA* y 5 para la codificada para *mmaA4*), se hicieron los modelados y se evaluó su calidad, en un proceso similar al que hace *Swiss model*. Las estructuras obtenidas si presentaban las regiones faltantes, obteniéndose una cobertura del 100%, sin embargo se observó que estas regiones (al inicio de la secuencia) eran modeladas como loops muy largos (Fig. 10), se probó utilizando diferentes moldes y haciendo un refinamiento en el modelado de los loops, no obstante el resultado fue siempre el mismo. Por esta razón se hipotetizó que estos aminoácidos pudieran ser “desordenados” es decir, que no pertenezcan a ninguna clase de estructura secundaria, en la forma biológicamente activa de la proteína.

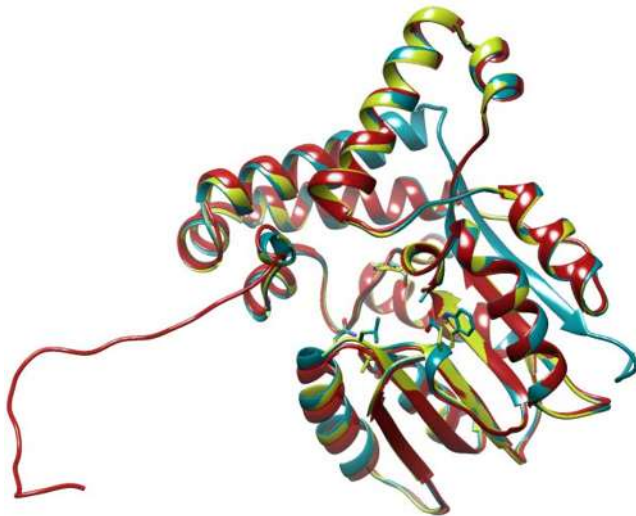


Figura 10. Superposición de las estructuras obtenidas por las distintas herramientas para la enzima codificada por *mmaA* (amarillo-Swiss model, azul-PDB, rojo-Modeller). En el caso del modelo obtenido por Modeller se observa el loop correspondiente a los aminoácidos “faltantes”.

Para comprobar si se trata de aminoácidos desordenados se utilizó el servidor web prDOS (Ishida y Kinoshita, 2007) (<http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>) éste calcula la probabilidad empírica de que cada aminoácido este desordenado a partir de su secuencia primaria. Para ambas enzimas se obtuvieron resultados similares, alrededor de los primeros 20 aminoácidos presentan una probabilidad mayor al 0.5 (punto de corte) de no pertenecer a ninguna clase de estructura secundaria en la forma biológicamente activa de la proteína (Fig. 11).

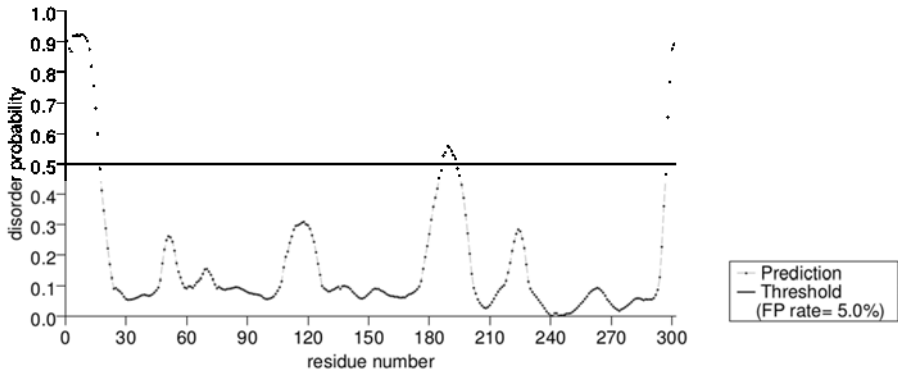


Figura 11. Gráfica de probabilidad de desorden de cada residuo a lo largo de la secuencia según prDOS para la hidroximicolato sintasa. Se predicen como desordenados los residuos cuya probabilidad va más allá de la línea de umbral (0.5).

La presencia de regiones desordenadas confiere flexibilidad a la proteína, lo que es una ventaja para el reconocimiento de múltiples moléculas (ARN, ADN, otras proteínas, pequeños ligandos o moléculas), sin embargo no se ha asociado una función específica a las mismas (Obradovic *et al.* 2003) es por esto que se optó por utilizar los modelos obtenidos con *Swiss model* que no contienen dichas regiones.

9.6 Comparaciones globales de la estructura tridimensional

Una vez validados los modelos se realizaron análisis comparativos globales y locales entre las estructuras obtenidas y las estructuras de referencia con el objetivo observar los cambios dados por las variaciones genómicas encontradas. Estos modelos fueron sometidos a un análisis estructural utilizando *UCSF Chimera*, con las opciones *MatchMaker* y *Match -> Align* para crear un alineamiento estructural. Se crearon las superposiciones para la estructura de referencia H37Rv y los modelos obtenidos, en las estadísticas resultantes se reportan los valores de RMSD y Qmean para las superposiciones. Para la enzima ciclopropano sintasa (codificada por *pcaA*) se encontró que no existe una variación importante en los valores de RMSD (muy cercanos a cero), es decir las estructuras (MYC003 y MYC037) son prácticamente iguales a la referencia; por otro lado los valores de RMSD para la superposición de las estructuras obtenidas para la hidroximicolato sintasa (codificada por *mmaA4*) son muy similares para las comparaciones MYC004 – referencia, MYC036 – referencia, MYC037 – referencia y MYC055 – referencia (valores cercanos a 0) a excepción de MYC003 – referencia donde el valor de RMSD (257 átomos) es de 0.078 y el valor de Q-mean es de 0.914 (Fig.12).

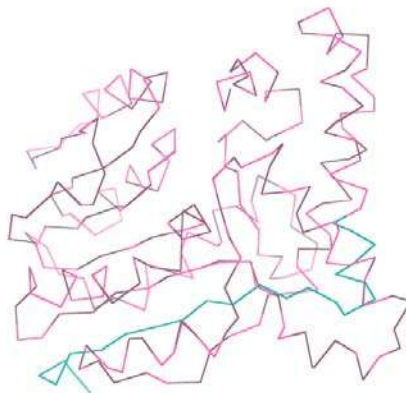


Figura 12. Superposición del esqueleto de carbono de la hidroximicolato sintasa para las estructuras de referencia y MYC003. La estructura de referencia se encuentra coloreada en gris y MYC003 en rosa. En azul se muestran los aminoácidos faltantes en la cepa MYC003.

La ausencia de los últimos aminoácidos en la cadena parece ser el cambio que determina la diferencia entre la estructura de referencia y la estructura de MYC003.

9.7 Comparaciones locales de la estructura tridimensional

RMS. Se calculó el RMS posicional para cada uno de los residuos en contacto con el ligando (S-adenosyl-menitonina para *mmaA4* o S-adenosyl-l-homosisteína para *pcaA*) sin encontrar variaciones en las distancias entre cada par de los aminoácidos que se encuentran alineados, además se realizó la superposición de los mismos residuos con la estructura de referencia y se calculó el RMSD para el número de átomos específicos pero no fue posible encontrar diferencias significativas (Fig. 13).

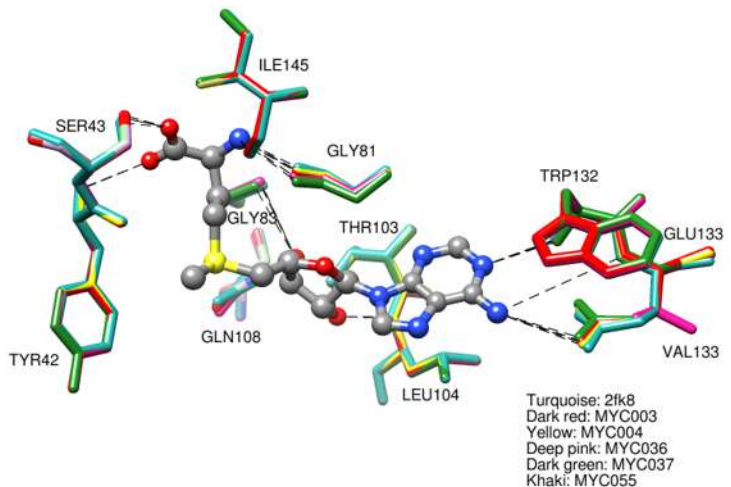


Figura 13. Superposición de los residuos en contacto con SAM. Las distancias entre los residuos alineados son mínimas (RMS). Las líneas punteadas representan los puentes de hidrógeno formados entre el ligando y la enzima. En la posición 133 se observa el cambio de un

glutamato por una valina en la cepa MYC036, sin que esto modifique significativamente la estructura 3D.

- Evaluación de los cambios en residuos catalíticos, sitio activo, residuos de unión a sustrato, motivos de reconocimiento a AcpM (proteína acarreadora de acilos) y residuos que contribuyan a la estabilidad de la proteína.

1. Ciclopropano sintasa (*pcaA*). Ninguna de las sustituciones se encuentra en alguno de los sitios clave mencionados anteriormente.
2. Hidroximicolato sintasa (*mmaA4*). En la figura 14 se muestran los residuos de aminoácido que son considerados puntos clave para el funcionamiento de la enzima.

a. Sitio activo, posición 278. La cepa MYC003 no contiene este residuo debido a la codificación de un codón de paro que ocasiona que la secuencia de aminoácidos sea más corta.

b. Residuos catalíticos. Sin cambios

c. Residuos de unión a ligando. Sustitución de E por V en la posición 133 en la cepa MYC036.

d. Residuos que contribuyen a la estabilidad de la proteína. Esta enzima contiene 6 residuos de cisteína que participan en interacciones hidrofóbicas que ayudan a estabilizar la proteína, la cepa MYC003 no contiene los residuos en las posiciones 279 y 289. En la cepa MYC036 aparece una L en lugar de la cisteína en la posición 112. Los residuos de C además de jugar un papel importante en la estabilidad también participan en el plegamiento, en la unión de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad proteica (González Segura y Muñoz Clares, 2003), es por esto que la ausencia de los residuos podría afectar la función de la hidroximicolato sintasa.

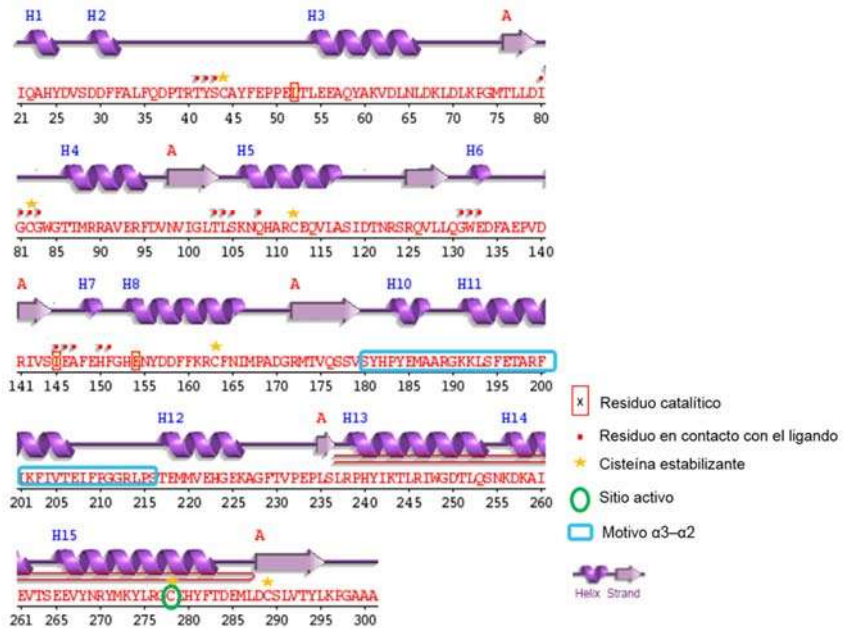


Figura 14. Puntos clave en el funcionamiento de la hidroximicolato sintasa.

e) Interacción con AcpM y unión a sustrato. Los residuos de las posiciones 180 a 216 forman un motivo de reconocimiento para la proteína acarreadora de acilos (AcpM) conocido como $\alpha 3\text{-}\alpha 2$, éste abarca las hélices $\alpha 3$, $\alpha 2$ y el péptido que une $\alpha 3$ y αE (Fig. 15) (Glickman *et al.* 2000).

El motivo es la entrada a un túnel hidrofóbico profundo que contiene 7 residuos básicos, 5 de los cuales definen cargas positivas expuestas al solvente a lo largo de $\alpha 3$ y al fondo del motivo. Los residuos V-205, I-201 y L-214 mantienen la entrada al túnel cerrada por impedimento estérico. En la cepa MYC003 se observa el cambio de una L en la posición 214 por una P, se evaluó si este cambio ocasiona la apertura del túnel y por tanto el acceso del solvente al interior de la enzima comparando las superficies formadas por las cadenas laterales de los residuos (205, 201 y 214).

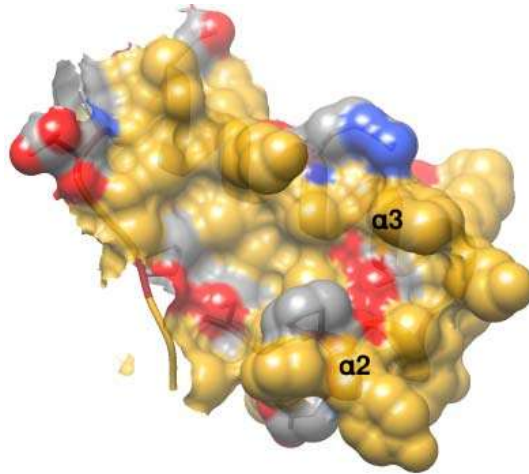


Figura 15. Superficie molecular del motivo $\alpha 3$ - $\alpha 2$ en la hidroximicolato sintasa. Las regiones amarillas representan los residuos hidrofóbicos y sus cadenas laterales.

Las comparaciones revelan que la entrada al túnel se mantiene cerrada ya que ambos residuos poseen cadenas laterales alifáticas (Fig. 16 y 17), sin embargo al encontrarse esta sustitución en un residuo perteneciente a un motivo de reconocimiento de la proteína que provee el sustrato para la reacción enzimática, sería interesante evaluar si la afinidad por ambas proteínas se ve modificada.

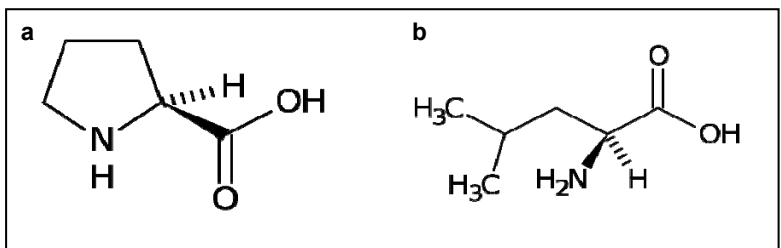


Figura 16. Aminoácidos prolina (a) y leucina (b) y sus cadenas laterales

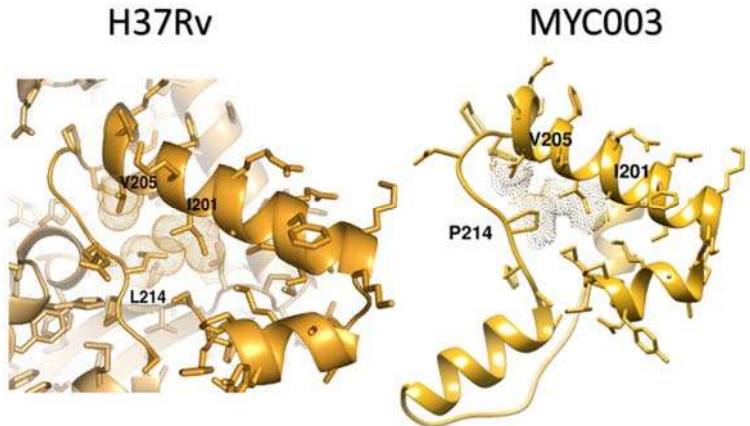


Figura 17. Estado cerrado del túnel hidrofóbico de la hidroximetilato sintasa. Se muestra una vista cercana del motivo α 2- α 3 de la estructura de referencia (izquierda) y de la cepa MYC003 (derecha). Los puntos representan las superficies de van der Waals. La sustitución L214P no altera la abertura del túnel.

9.8 Análisis de cavidades

La superficie de una proteína es irregular, con una serie de protuberancias y cavidades que forman un relieve complejo. Generalmente, es en estas cavidades donde las moléculas orgánicas pueden unirse. Si la proteína es una enzima o un receptor, la elección directa es analizar el sitio activo o de reconocimiento; ya que cualquier molécula que pueda unirse a este lugar impedirá que la proteína realice adecuadamente su función biológica (Piedra *et al*, 2008). Con la finalidad de observar si alguna de las variaciones encontradas tiene un efecto sobre la geometría del sitio de unión de la enzima, se llevó a cabo un análisis de cavidades utilizando la herramienta *CASTp* y *UCSF Chimera*.

1. Ciclopropano sintasa (*pcaA*). Se reportan 10 cavidades, se seleccionó una en base a los criterios mencionados en Materiales y Métodos para la cual se calculó área, volumen y número de aberturas para comparar con las cavidades correspondientes a las cepas MYC003 y MYC037. La comparación muestra que no existen variaciones en ninguno de los parámetros calculados.

2. Hidroximicolato sintasa (*mmaA4*). Se reportan 10 cavidades, se seleccionó una en base a los criterios mencionados en Materiales y Métodos para la cual se hizo un cálculo de área, volumen y número de aberturas (Fig. 18) para comparar con las correspondientes a las cepas MYC003, MYC004, MYC036, MYC037 y MYC055.

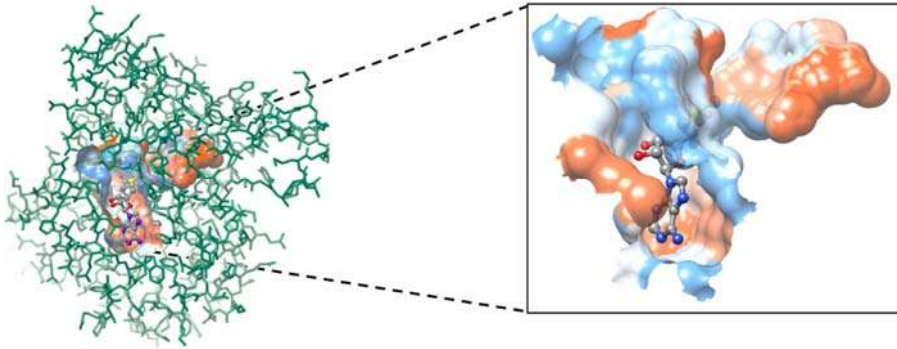


Figura 18. Cavity principal de la hidroximicolato sintasa (H37Rv). El área calculada es de 1207.5, el volumen 1722.5 y contiene 2 aberturas. Las regiones en rojo de la superficie de la cavidad representan a los residuos hidrofóbicos. En barras y esferas se muestra el ligando.

Las comparaciones con MYC004, MYC036, MYC037 Y MYC055 revelan cambios mínimos en los parámetros evaluados, por otro lado la comparación con MYC003 muestra un cambio importante en el área (2382.2), volumen (3803.8) y número de aberturas (4)(Fig. 19). La pérdida de aminoácidos debido a la aparición del codón de paro en esta cepa provoca cambios en la cavidad principal que pueden conducir a una alteración de la función de la proteína, ya que el acceso del solvente al interior de la enzima se ve modificado, además de la superficie en contacto con el sustrato. Los SNPs no sinónimos en secuencias codificantes tienen más probabilidades de producir cambios severos en la estructura y función de la proteína. Mutaciones que se encuentran en o cerca del sitio activo de una proteína muy probablemente conducirán a la falta de función; las mutaciones en áreas menos cruciales de una proteína tendrán muy probablemente un efecto menos deletéreo y a menudo dando lugar a mutantes "permeables" o parcialmente inactivadas (Griffiths *et al*, 2000). Aunque la aparición de SNP's en

las secuencias de DNA pueden resultar en la alteración de la función de la proteína de múltiples maneras, la forma más común es la pérdida de función (Remington, 2006). La introducción de estas variaciones incluyendo codones de paro pueden alterar el fenotipo resultante al disminuir la actividad funcional de una proteína en calidad o cantidad; esto ha sido demostrado mediante diversos estudios como el realizado por Del Re y colaboradores en 2015 donde demuestran que modificaciones en el gen *DPYD* que codifica para una dihidropirimidina deshidrogenasa que es la enzima inicial y limitante de la velocidad en la ruta metabólica del 5-fluorouracilo (5-FU) y tras fluoropirimidinas a un compuesto inactivo, comprometen su actividad y causan toxicidad severa en pacientes a los que se administran dosis estándar de fluoropirimidinas.

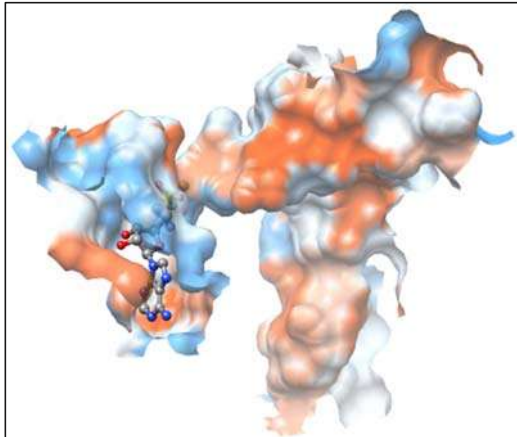


Figura 19. Cavity principal de la hidroximicolato sintasa de MYC003. Se observa el aumento del área y volumen respecto a la referencia. Las regiones en rojo de la superficie de la cavity representan a los residuos hidrofóbicos. En barras y esferas se muestra el ligando.

Todas estas modificaciones en la estructura terciaria de la hidroximicolato sintasa podrían afectar adicionalmente la interacción con la proteína acarreadora de acilos que proporciona el sustrato para la reacción, de esta manera se vería alterada la cantidad de ácidos micólicos oxigenados que son producidos modificando a su vez el perfil de ácidos micólicos para esta cepa. Por otro lado se pueden afectar también las interacciones con otras enzimas participantes en la síntesis de ácidos micólicos como las codificadas por los genes *mmaA2* y *mmaA3*.

Todas las variaciones encontradas en el gen *pcaA* fueron confirmadas mediante resecuenciación en las cepas de origen meníngeo.

9.9 Correlación entre el número de SNP's en genes PE y PPE/resistencia a antibióticos/ruta de síntesis de ácidos micólicos en cepas de origen meníngeo.

Nuestro grupo de trabajo ha realizado estudios previos utilizando las cepas causantes de tuberculosis meníngea de la colección, en donde se ha realizado la búsqueda de SNP's en diversos genes de la familia PE/PPE (*pe_pgrs18*, *pe3*, *ppe44*) y en genes de resistencia a antibióticos (*embB*, *katG*, *rpsL*, *prom* *mabA*, *rpoB*, *pncA* y *rrs*). Al encontrarse una gran cantidad de variaciones en uno de los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos (*mmaA4*), se realizó un análisis de correlación lineal de Pearson de entre el número de SNP's presentes en cada cepa (MYC003, MYC004, MYC036, MYC037 y MYC055) para cada una de las categorías: Ácidos micólicos (AM) – PE/PPE, AM – Resistencia, AM – PE/PPE – Resistencia para observar si se trata de cepas altamente polimórficas es decir si son cepas que se encuentran acumulando una gran cantidad de polimorfismos. Los resultados obtenidos muestran que si bien se observa una línea de tendencia hacia una correlación negativa, la dispersión de los datos es muy alta (Figuras 23 y 24) por lo que no puede establecerse, ningún tipo de relación.

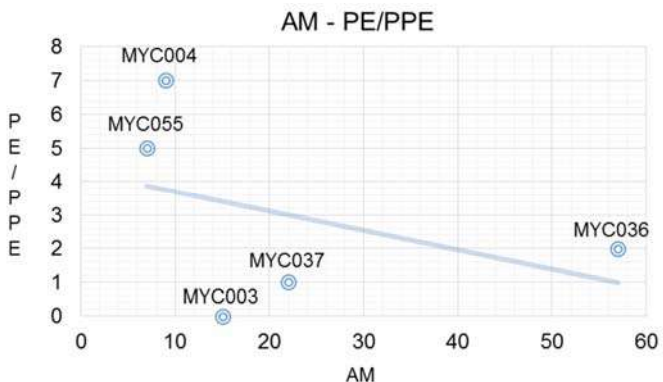


Figura 20. Análisis de correlación lineal de Pearson entre el número de SNP's en los genes PE/PPE (Eje Y) y los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos (AM) en las 5 cepas de origen meníngeo. Coeficiente de correlación de Pearson: -0.403

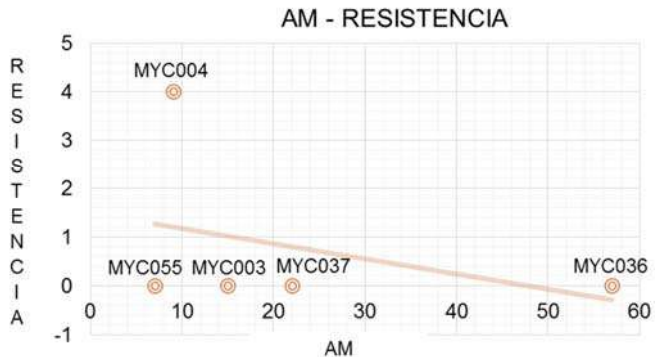


Figura 21. Análisis de correlación lineal de Pearson entre el número de SNP's en los genes de resistencia a antibióticos y los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos (AM) en las 5 cepas de origen meningeo. Coeficiente de correlación de Pearson: -0.3558

9.10 Confirmación de las variaciones encontradas en el gen *mmaA4*

Como se mencionó anteriormente, pese a que se encontró una gran cantidad de SNP's en el gen *mmaA4* de la cepa MYC036 no se observan cambios importantes en la estructura tridimensional de la enzima, esto podría deberse a un efecto de compensación entre las variaciones encontradas. La función enzimática está directamente ligada a la estabilidad de la misma, cuando una secuencia de aminoácidos acumula una gran cantidad de sustituciones y éstas incluyen sustituciones estabilizadoras se permite la acumulación de sustituciones desestabilizadoras mientras se mantiene la actividad funcional de la proteína debido a las mutaciones compensatorias (Tokuriki y Tawfik, 2009). Por ejemplo, en un estudio realizado por Bloom y colaboradores en 2005 se demostró la presencia de una sustitución estabilizadora (M182T) en la enzima TEM-1-lactamasa que mostró mayor tolerancia a las mutaciones que la enzima de tipo salvaje.

Por otro lado en la cepa MYC003 la aparición de un codón de paro en el mismo gen parece determinar el mayor cambio en la estructura proteica. El cambio de nucleótido ocurre en la posición 737,132 del genoma, para dar certeza a la aparición de esta variación se revisó el *depth read* (profundidad de la lectura) que describe el número de veces que un determinado nucleótido en el genoma ha sido

leído después de la secuenciación (Medical Laboratory Observer, 2014) en una posición específica. Este valor está dado por el número de *reads* alineados (en formato BAM) contra la secuencia de referencia y la secuencia en formato .fasta de la cepa MYC003 utilizando el software *Artemis* (Carver *et al.* 2008). La posición 737, 132 tiene un *depth read* de 66X que equivale a 66 *reads*, en los cuales en 1 aparece una adenina y en el resto una citosina (Fig. 25). Según las recomendaciones para la cobertura y *depth read* para aplicaciones de Next Generation Sequencing del GENOHUB y el trabajo publicado por Yun Li y colaboradores en 2011 un valor de *depth read* de 40X resultará en una precisión >99%, de esta manera aunque no confirmamos la presencia de la variación mediante resecuenciación podemos tener bastante certeza de la aparición del codón de paro en esta cepa, y de todos los cambios estructurales que conlleva para la enzima hidroximicolato sintasa.

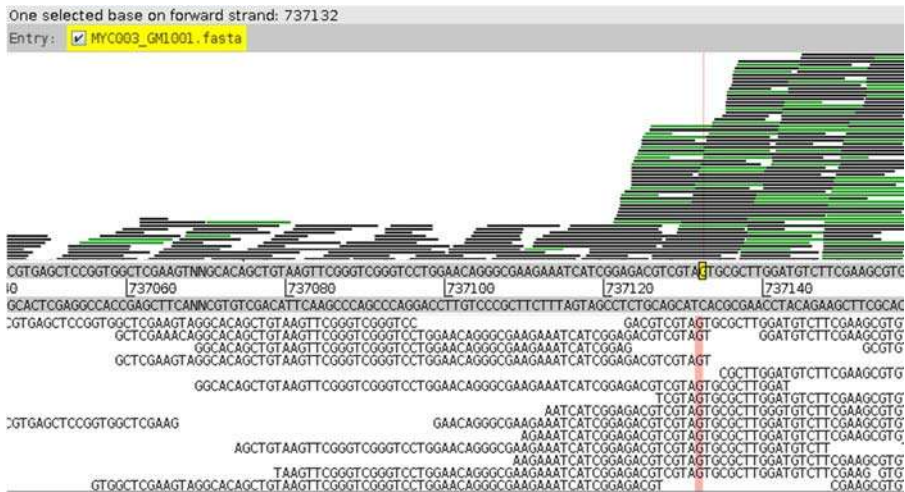


Figura 22. Depth read en la posición del codón de paro de la cepa MYC003. Visualización con *Artemis*. La línea roja indica la posición del cambio de una adenina por una citosina. La primera línea gris representa la hebra sentido y la segunda la antisentido, en donde se localiza el gen *mmaA4*.

X. RESUMEN DE RESULTADOS

- ✓ *kasB*: Se encontraron 2 SNP's sinónimos al realizar el alineamiento entre las secuencias de las cepas pulmonares y meníngeas, estas variaciones no ocasionan un cambio de aminoácido.
- ✓ *pcaA*: Se encontraron 6 SNP's en 2 de las cepas (MYC003 y MYC037) de estos el 20% alterará la función de la enzima según SIFT y el 80% desestabilizará la estructura proteica según DUET.
 - Análisis estructural: Aunque existen variaciones en la secuencia de nucleótidos que ocasionan un cambio en la secuencia de aminoácidos, al valorar el efecto que estos tienen en la estructura 3D de la proteína, se observa que no se dan modificaciones importantes en su estructura por lo que tampoco se ve afectada su función en las cepas MYC003 y MYC037.
- ✓ *mmaA4*: Se encontraron 87 SNP's repartidos en las 5 cepas meníngeas. El 52.5% de las variaciones afectará la función de la proteína según SIFT y el 90% de las mismas desestabilizará la estructura de la proteína según DUET.
 - Análisis estructural: La cepa MYC003 es la que difiere en mayor grado de la estructura de referencia: es una proteína más corta carente de algunas cisteínas que contribuyen a su estabilidad y que además presenta una cavidad principal con un área, volumen y número de aberturas más elevado, lo que representa una mayor superficie de contacto con el solvente. Probablemente su función se encuentra alterada. Esta cepa pertenece a la familia T1 y fue aislada de un paciente masculino de 60 años del municipio de Parácuaro Michoacán y se trata de una cepa con susceptibilidad a todos los antibióticos empleados en el tratamiento de la tuberculosis.

XI. CONCLUSIÓN

Las cepas causantes de tuberculosis meníngea presentan polimorfismos en las secuencias de los genes *kasB*, *pcaA* y *mmaA4* que no se encuentran presentes en cepas causantes de tuberculosis pulmonar, sin embargo dichos polimorfismos no pueden ser propuestos como marcadores de virulencia ya que no se observan de manera consistente entre las cepas causantes de TB meníngea aisladas de Michoacán, ni entre las cepas meníngeas de las bases de datos públicas.

A pesar de no haber encontrado una variación que cumpliera con los requisitos para ser utilizada como un marcador de virulencia se evidenció que las cepas meníngeas aisladas de Michoacán poseen una gran cantidad de SNP's en los genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos a pesar de que en las secuencias con las que se realizaron las comparaciones aparecen como altamente conservados.

XII. PERSPECTIVAS

- Estudio del perfil de ácidos micólicos de las cepas meníngeas, principalmente de MYC003.
- Existen reportes de que una inactivación del gen *mmaA4* de *M. tuberculosis* modula la producción de IL-2p40 en macrófagos disminuyendo la respuesta inmune y provocando un fenotipo con virulencia atenuada, por lo que sería interesante un estudio de interacción con macrófagos utilizando la cepa MYC003.
- Obtención del pan-genoma de cepas causantes de tuberculosis pulmonar y meníngea para identificar los genes exclusivos de éstas últimas y caracterizarlos.

XIII. REFERENCIAS

1. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
2. Applied Biosystems. (2010) BioScope® Software for scientist guide. En http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_074971.pdf Consultado el 2 de septiembre de 2015.
3. Besemer, J., Lomsadze, A., & Borodovsky, M. (2001). GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic acids research*, 29(12), 2607-2618.
4. BGE-IV. (2016). LCG-UNAM. CDMX, México. Recuperado de: ; <http://cursos.lcg.unam.mx>
5. Bhamidi, S., Scherman, M. S., Jones, V., Crick, D. C., Belisle, J. T., Brennan, P. J., & McNeil, M. R. (2011). Detailed structural and quantitative analysis reveals the spatial organization of the cell walls of in vivo grown *Mycobacterium leprae* and in vitro grown *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 23168-23177.
6. Bhatt, A., Fujiwara, N., Bhatt, K., Gurucha, S. S., Kremer, L., Chen, B., & Jacobs, W. R. (2007). Deletion of kasB in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12), 5157-5162
7. Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A., & Garaizar, J. (2004). In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics*, 20(5), 798-799.
8. Bloom, J. D., Silberg, J. J., Wilke, C. O., Drummond, D. A., Adami, C., & Arnold, F. H. (2005). Thermodynamic prediction of protein neutrality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(3), 606-611.
9. Boissier, F., Bardou, F., Guillet, V., Uttenweiler-Joseph, S., Daffé, M., Quémar, A., & Mourey, L. (2006). Further insight into S-adenosylmethionine-

dependent methyltransferases structural characterization of Hma, an enzyme essential for the biosynthesis of oxygenated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4434-4445.

10. Breu H. (2010) A Theoretical Understanding of 2 Base Color Codes and Its Application to Annotation, Error Detection, and Error Correction. *Applied Biosystems*. En

http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_058265.pdf Consultado el 28 de mayo 2015.

11. Carver, T., Berriman, M., Tivey, A., Patel, C., Böhme, U., Barrell, B. G., & Rajandream, M. A. (2008). Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics*, 24(23), 2672-2676.

12. Caws, M., Thwaites, G., Dunstan, S., Hawn, T. R., Lan, N. T., Thuong, N. T., & Farrar, J. (2008). The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, 4(3), e1000034.

13. CENAPRECE. (2012-2016). Secretaría de Salud. CDMX, México. Cifras oficiales tuberculosis. Recuperado de: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/tuberculosis/cifras_oficiales.html

14. Chackerian, A. A., Alt, J.M., Perera, T. V., Dascher, C. C., Behar, S.M. (2002) Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infection and Immunity* (70)8, 4501–4509

15. Chávez-Galán, L., del Carmen Arenas-Del Ángel, M., Sada-Ovalle, I., & Lascurain, R. (2009). Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *Mycobacterium tuberculosis*. *Gac Méd Méx*, 145(4).

16. Coll, P. (2009). Active drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(8), 474-480.

17. Crick, D. C., Mahapatra, S., & Brennan, P. J. (2001). Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology*, 11(9), 107-118.

18. Dao, D. N., Sweeney, K., Hsu, T., Gurcha, S. S., Nascimento, I. P., Roshevsky, D., Jacobs Jr, W. R. (2008). Mycolic acid modification by the mmaA4 gene of *M. tuberculosis* modulates IL-12 production. *PLoS Pathog*, 4(6), e1000081.
19. de Souza, M. V. N., Ferreira, M. D. L., Pinheiro, A. C., Saraiva, M. F., de Almeida, M. V., & Valle, M. S. (2008). Synthesis and biological aspects of mycolic acids: an important target against *Mycobacterium tuberculosis*. *The Scientific World Journal*, 8, 720-751.
20. Del Re, M., Michelucci, A., Di Leo, A., Cantore, M., Bordonaro, R., Simi, P., & Danesi, R. (2015). Discovery of novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene associated with toxicity of fluoropyrimidines and viewpoint on preemptive pharmacogenetic screening in patients. *EPMA J*, 6(1), 17.
21. Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl*, 3(3), S30-S37.
22. Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V. P., Lanéelle, M. A., Yu, K., Quémard, A., Smith, I. & Daffé, M. (2000). Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Molecular microbiology*, 36(3), 630-637.
23. Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y., & Liang, J. (2006). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic acids research*, 34(suppl 2), W116-W118.
24. Figueroa, M. S. (2001). Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*: una revisión de la literatura. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 14(2), 114-128.
25. Flynn, J.L., & Chan, J. (2001). Immunology of tuberculosis. *Annual review of immunology*, 19(1), 93-129.
26. Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., Sabio y Garcia, J., Morbidoni, H. R., Santangelo, M. D. L. P., & Bigi, F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4(1), 3-66.

27. García, J. F. (2008). Formas extrapulmonares de la tuberculosis: situación en un nuevo siglo. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(9), 537-539
28. Giardine, B., Riemer, C., Hardison, R. C., Burhans, R., Elnitski, L., Shah, P., Miller, W. (2005). Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome research*, 15(10), 1451-1455.
29. Glickman, M. S. (2003). The *mmaA2* gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes the distal cyclopropane synthase of the α -mycolic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 7844-7849.
30. Glickman, M. S., Cahill, S. M., & Jacobs, W. R. (2001). The *Mycobacterium tuberculosis* *cmaA2* gene encodes a mycolic acid trans-cyclopropane synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 2228-2233.
31. Glickman, M. S., Cox, J. S., & Jacobs, W. R. (2000). A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular cell*, 5(4), 717-727.
32. González-segura, L. & Muñoz-Clares. (2003) El papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de las proteínas. *Revista Digital Universitaria*. 22(1), 1-10
33. Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M. D. C., Garfias, Y., Sada, I., & Lascurain, R. (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(2), 142-153.
34. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. How DNA changes affect phenotype. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21955/>
35. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis. Centro Cochrane Iberoamericano, coordinador. Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Agència d'Informació,

- Avaluació i Qualitat en Salut (AIAQS) de Catalunya; 2009. Guías de Práctica Clínica en el SNS: AATRM N° 2007/26
36. Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714-2723.
 37. Guillén Nepita, A.L. (2014). Epidemiología de la tuberculosis humana y tipificación genético molecular del agente causal en el estado de Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
 38. Guillén Nepita, A. L. (2016) No publicado
 39. Guillén Nepita A. L. (2017) No publicado
 40. Hernández-Pando, R., Soto-Hernández, J. L., & Salinas-Lara, C. (2013). Aspectos inmunopatológicos de la tuberculosis meníngea. *Rev Invest Clin*, 65(4), 349-356.
 41. Huang, C. C., Smith, C. V., Glickman, M. S., Jacobs, W. R., & Sacchettini, J. C. (2002). Crystal structures of mycolic acid cyclopropane synthases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 11559-11569.
 42. Ishida, T., & Kinoshita, K. (2007). PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic acids research*, 35(suppl 2), W460-W464.
 43. Kent, S. J., Crowe, S. M., Yung, A., Lucas, C. R., & Mijch, A. M. (1993). Tuberculous meningitis: a 30-year review. *Clinical infectious diseases*, 17(6), 987-994.
 44. Kieser, K. J., & Rubin, E. J. (2014). How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nature Reviews Microbiology*, 12(8), 550-562.
 45. Kong, Y., Cave, M. D., Zhang, L., Foxman, B., Marrs, C. F., Bates, J. H., & Yang, Z. H. (2007). Association between *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: insights from epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of *M. tuberculosis* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*, 45(2), 409-414.

46. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, msw054.
47. Kuulasmaa, T., Javed, A. A., & Muthusamy, A. (2004). Oligo Explorer 1.2. *Genelink, Hawthorne, New York*.
48. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Thompson, J. D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
49. Lema, M. A., & Echave, J. (2005). Assessing local structural perturbations in proteins. *BMC bioinformatics*, 6(1), 226.
50. Li, Y., Sidore, C., Kang, H. M., Boehnke, M., & Abecasis, G. R. (2011). Low-coverage sequencing: implications for design of complex trait association studies. *Genome research*.
51. Maiti, R., Van Domselaar, G. H., Zhang, H., & Wishart, D. S. (2004). SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic acids research*, 32(suppl 2), W590-W594.
52. Marín, L. M. L., Otero, F. D., Maza, A. J. V., Solís, H. E., & Pabello, J. Á. G. (2006). Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2), 173-178.
53. Marrakchi, H., Lanéelle, M. A., & Daffé, M. (2014). Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & biology*, 21(1), 67-85
54. Martínez, M. D. C. J., Saldaña, R. B., Cañas, M. L., Sánchez, R. C., Ledesma, R. L., & Galindo, E. Z. (2001). Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 14(1), 39-48.
55. MLO-staff. (2014). Medical Laboratory Observer. Sarasota, Florida. USA. Recuperado de: <https://www.mlo-online.com/in-depth-coverage-some-useful-ngs-terms.php>
56. Ng, P. C., & Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research*, 31(13), 3812-3814.

57. Nicol, M. P., Sola, C., February, B., Rastogi, N., Steyn, L., & Wilkinson, R. J. (2005). Distribution of strain families of *Mycobacterium tuberculosis* causing pulmonary and extrapulmonary disease in hospitalized children in Cape Town, South Africa. *Journal of clinical microbiology*, 43(11), 5779-5781.
58. Obradovic, Z., Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., Brown, C. J., & Dunker, A. K. (2003). Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(S6), 566-572.
59. Ogawa, S. K., Smith, M. A., Brennessel, D. J., & Lowy, F. D. (1987). Tuberculous meningitis in an urban medical center. *Medicine*, 66(4), 317-326.
60. Pai, M., Berh, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers* 2 1076 (2), 1-23.
61. Palomino, J. C., Cardoso, L. S., Ritacco V. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. Disponible en: <http://www.tuberculosisistextbook.com/tuberculosis2007.pdf>
62. Pando, R. H., Aguilar, D., Cohen, I., Guerrero, M., Ribon, W., Acosta, P., Espitia, C. (2010). Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model. *Tuberculosis*, 90(4), 268-277.
63. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.
64. Piedra, D., Lois, S., & De La Cruz, X. (2008). Preservation of protein clefts in comparative models. *BMC structural biology*, 8(1), 2.
65. Pires, D. E., Ascher, D. B., & Blundell, T. L. (2014). DUET: a server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. *Nucleic acids research*, gku411.

66. Pires, D. E., Ascher, D. B., & Blundell, T. L. (2014). mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinformatics*, 30(3), 335-342.
67. Prezzemolo, T., Guggino, G., La Manna, M. P., Di Liberto, D., Dieli, F., & Caccamo, N. (2014). Functional signatures of human CD4 and CD8T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Significance of antigen and epitope specificity in tuberculosis*, 33.
68. Rao, V., Fujiwara, N., Porcelli, S. A., & Glickman, M. S. (2005). *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *The Journal of experimental medicine*, 201(4), 535-543.
69. Rao, V., Gao, F., Chen, B., Jacobs, W. R., & Glickman, M. S. (2006). Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium tuberculosis*-induced inflammation and virulence. *The Journal of clinical investigation*, 116(6), 1660-1667.
70. Remington, J. P. (2006). *Remington: The science and practice of pharmacy* (Vol. 1). D. B. Troy, & P. Beringer (Eds.). Lippincott Williams & Wilkins.
71. Schaeffer, M. L., Agnihotri, G., Volker, C., Kallender, H., Brennan, P. J., & Lonsdale, J. T. (2001). Purification and Biochemical Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl-acyl Carrier Protein Synthases KasA and KasB. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47029-47037.
72. Takayama, K., Wang, C., & Besra, G. S. (2005). Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*, 18(1), 81-101.
73. Thuong, N. T., Hawn, T. R., Thwaites, G. E., Chau, T. T., Lan, N. T., Quy, H. T. A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes Immun* 2007;8:422e8
74. Thwaites, G., Caws, M., Chau, T. T. H., D'Sa, A., Lan, N. T. N., Huyen, M. N. T., & Farrar, J. (2008). Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1363-1368.

75. Tokuriki, N., & Tawfik, D. S. (2009). Stability effects of mutations and protein evolvability. *Current opinion in structural biology*, 19(5), 596-604.
76. Vázquez-Heredia, M. R. (2014). Tipificación molecular de micobacterias obtenidas de pacientes con tuberculosis en el periodo 2011-2014. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
77. Vilchèze, C., Morbidoni, H. R., Weisbrod, T. R., Iwamoto, H., Kuo, M., Sacchettini, J. C., & Jacobs, W. R. (2000). Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASII end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 182(14), 4059-4067.
78. Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *Journal of molecular graphics*, 8(1), 52-56.
79. Webb, B., & Sali, A. (2014). Protein structure modeling with MODELLER. *Protein Structure Prediction*, 1-15.
80. World Health Organization. (2016). Global tuberculosis report 2016.