



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES NUEVAS EN KatG DE
Mycobacterium tuberculosis RESISTENTE A ISONIAZIDA ENCONTRADAS EN
AISLADOS CLÍNICOS DE PACIENTES MEXICANOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
ING. BRENDA GEORGINA URIBE VAZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. FRANCISCO XAVIER SOBERÓN MAINERO
[INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ADRIÁN OCHOA LEYVA
[INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA](#)

DRA. MIRELLE VANESSA GONZÁLEZ COVARRUBIAS
[INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA](#)

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del **Dr. Xavier Soberón** en el **Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis** del **Instituto de Biotecnología**, campus Morelos de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, y fue financiado con recursos aportados por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** al **Proyecto GACD-FUNCICYT No. 264693** y a través de la beca de estudio de posgrado con número **587124**, y de **DGAPA** proyecto **PAPIIT IN208816**.

AGRADECIMIENTOS.

Académicos.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Xavier Soberón Mainero por los conocimientos y experiencias que compartió conmigo, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por el apoyo y la confianza que me tenía y, sobre todo, por los martes de discusión que se convirtieron en reuniones amenas donde siempre podíamos reírnos de algo, todas esas sonrisas me sacaban del estrés, gracias.

Agradezco al Dr. Humberto Flores Soto por el tiempo, dedicación y apoyo técnico en la revisión del presente trabajo. Muchas gracias por su comprensión, por darme consejos personales a lo largo de mi crecimiento y por la libertad que me dio al elegir mi camino.

Al Dr. Adrián Ochoa Leyva y Dra. Vanessa González Covarrubias por formar parte de mi comité tutorial y enriquecer mi trabajo con sus críticas.

Al Dr. Joel Osuna Quintero y Dra. Gloria Saab Rincón por su gran disposición en el área de trabajo; por el tiempo que se tomaron escuchándome y haciendo correcciones al presente trabajo y por su apoyo técnico.

A los miembros del Jurado para el examen de Maestría:

Presidente: Dr. Lorenzo P. Segovia Forcella,

Secretario: Dr. Baltazar Becerril Luján,

Vocal: Dr. Ramón Garduño Juárez,

Vocal: Dra. Marcela Ayala Aceves, y

Vocal: Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara.

Al Dr. Edson Norberto Cárcamo Noriega por el apoyo técnico, por la ayuda proporcionada cuando lo requería y, particularmente, por su amistad incondicional.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para la asistencia a congresos.

Al IBT y la UNAM por abrirme las puertas de esta casa de estudios y por permitirme formar parte de esta comunidad.

Personales.

A mis padres por ser un ejemplo a seguir y hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos, apoyos, cuidados y cariño. Jamás existirá una forma de retribuirles todo lo que han hecho por mí, sacrificando gran parte de su vida para educarme y apoyarme en mi formación profesional.

A mis abuelos que han sido como unos segundos padres y que han estado presentes a lo largo de mi vida, celebrando mis triunfos y apoyándome en todo.

A mi novio Ricardo Emmanuel (Harry) por la paciencia y el amor que me tiene, por estar siempre a mi lado y creer en mí, por la motivación, el apoyo y porque juntos lo podemos todo. Te amo!

A Don Ricardo (mi suegris) que formo parte importante de nuestras vidas en estos 2 últimos años porque siempre estuvo dispuesto a apoyarnos en lo que fuese necesario y porque me brindo su amistad.

A mis tíos Rosa María y Joel por la motivación, el apoyo y los consejos que siempre obtengo de ellos.

A mis tíos Raymundo y Olivia porque desde lejos fueron un gran apoyo, alentándome a seguir adelante y a aventurarme a nuevas experiencias.

A mis primos que de alguna manera creen en mí y se acercan para un consejo, o bien de quienes obtengo uno.

A todos mis compañeros de laboratorio (Emma, Rodrigo, Mariana, etc.) y de maestría (Marco, Emmanuel, Víctor, Chuy, etc.) por compartir buenos momentos juntos a lo largo de este tiempo.

DEDICATORIA.

Este trabajo es dedicado con toda mi alma a:

A Don José Ricardo Ugalde Hernández que ya no pudo estar presente en mi examen de Maestría, pero sé que hubiese estado orgulloso de compartir este logro conmigo; estoy feliz de haberlo conocido y me queda la satisfacción de que ya no va a sufrir más. Haber compartido 2 años de una sincera amistad me ha dejado una marca muy grande ya que me enseñó que se puede renunciar a todo (los lujos y a lo material), por algo aún más importante, la vida y salud de los hijos, esos pequeñines que son parte y dependen completamente de ti. Compartimos pasiones juntos (el futbol) y aunque mi equipo siempre perdía cuando usted iba a apoyar los partidos, aun así regresaba a ver el siguiente. Y, finalmente, porque me queda el recuerdo de una persona alegre y fuerte, siempre tenía muchas bromas que decir que me hacían sentir en familia y porque fue capaz de vencer la enfermedad una vez.

A Ricardo Emmanuel Ugalde Cortés porque contigo he conocido la felicidad y el amor sincero que es capaz de dar todo por el otro y las ganas de compartir la vida contigo.

Te amo tanto.

A mi familia; mis papás, hermano y abuelos que sin su existencia yo no sería nada.

ÍNDICE GENERAL.

AGRADECIMIENTOS.....	II
Académicos.....	II
Personales.....	III
DEDICATORIA.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Tuberculosis.....	1
1.1.1. Generalidades.....	1
1.1.2. Situación en México.....	3
1.1.3. Fármaco-resistencia en TB.....	5
1.2. Aplicación de la Medicina Personalizada.....	8
1.2.1. Descripción.....	8
1.2.2. Aplicación de la medicina personalizada para la TB-DR.....	9
1.3. Propiedades de INH.....	11
1.3.1. Mecanismo de acción de INH.....	12
1.3.2. El papel de KatG en el mecanismo de acción.....	13
1.3.3. El papel de InhA en el mecanismo de acción.....	17
1.3.4. Papel de NAT en el mecanismo de acción.....	17
1.3.5. Papel de NAT2 en el mecanismo de acción.....	18
1.4. Mecanismos moleculares de resistencia a INH.....	19
1.4.1. Mutaciones de la proteína KatG.....	19
1.4.2. La mutante S315T.....	20
1.4.3. InhA.....	21
1.4.4. OxyR-AhpC.....	21
1.4.5. NADH-deshidrogenasa.....	22
1.4.6. Mecanismo de resistencia a INH asociada a genes humanos.....	22

2. ANTECEDENTES.....	22
2.1. Secuenciación de genes que generan resistencia a INH.....	22
2.2. Caracterización de la KatG.....	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	26
5.1. Objetivo general.....	26
5.2. Objetivos específicos.....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1. Variantes seleccionadas.....	26
6.2. Amplificación y secuenciación Sanger de <i>katG</i> de aislados clínicos.....	27
6.3. Construcción de los plásmidos de expresión.....	28
6.3.1. Mutagénesis sitio dirigida para la construcción de las variantes.....	29
6.4. Expresión de variantes de KatG en <i>E. coli</i>	29
6.5. Purificación de las proteínas.....	30
6.6. Análisis de las proteínas puras.....	30
6.6.1. Concentración de proteína.....	30
6.6.2. Ensayos enzimáticos.....	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7.1. Análisis estructural y de secuencia de las variantes.....	32
7.1.1. Secuenciación Sanger de los aislados.....	35
7.1.2. Alineamientos de la secuencia de las proteínas construidas.....	36
7.2. Purificación y cuantificación de las proteínas.....	36
7.2.1. Producción y purificación de las variantes.....	36
7.2.2. Concentración de las proteínas y grupo hemo.....	38
7.3. Ensayos de las actividades enzimáticas.....	39
7.3.1. Actividades específicas.....	39
7.3.2. Parámetros catalíticos.....	44
7.4. Análisis global de la resistencia de las variantes.....	48
7.4.1. Variantes con una mutación adicional.....	49
7.4.2. Variantes sin mutación adicional.....	50

7.4.3. Variantes en el dominio C-terminal.....	52
8. CONCLUSIÓN.....	52
9. PERSPECTIVAS.....	54
10. BIBLIOGRAFÍA.....	54
11. ANEXOS.....	59
Anexo 1. Procedimiento de purificación de proteínas por columna de afinidad.	59
Anexo 2. Espectro de absorción del cloruro de hemina.....	60
Anexo 3. Curvas de Michaelis-Menten.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS.

°C	Grado Celsius	M	Molar
ε	Coeficiente de extinción	mg	Miligramos
μg	Microgramos	MIC	Concentración mínima inhibitoria
μL	Microlitros	mL	Mililitros
μM	Micromolar	mM	Milimolar
Å	Angstrom	mU	Miliunidades
A	Alanina	N	Asparagina
ACP	Proteína acarreadora de acilos	NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
<i>ahpC</i>	Alquil hidropoxidasa, gen	<i>nat</i>	N-acetil tranferasa, gen
D	Ácido aspártico	nM	Nanomolar
DO	Densidad Óptica	nm	Nanómetros
DR	Fármaco-resistencia	OMS	Organización Mundial de la Salud
E	Ácido glutámico	oxyR	Regulador del estrés oxidativo
F	Fenilalanina	P	Prolina
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EUA	PAGE	Poliacrilamida Gel
<i>furA</i>	Regulador de absorción férrica	Q	Glutamina
G	Glicina	R	Arginina
H	Histidina	rpm	Revoluciones por minuto
I	Isoleucina	S	Serina
INH	Isoniazida	SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
<i>inhA</i>	Enoil-ACP reductasa, gen	SS	Secretaría de Salud
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido	T	Treonina
K	Lisina	TB	Tuberculosis
<i>kasA</i>	Cetoacetyl-ACP reductasa, gen	UV	Ultravioleta
KatG	Catalasa-Peroxidasa	V	Valina
L	Leucina	W	Triptófano
l	Litros	Y	Tirosina
LB	Lysogeny Broth		

RESUMEN.

La TB, causada por el agente patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, es una enfermedad infecciosa que se encuentra entre las diez principales causas de muerte en el mundo. La isoniazida (INH), el compuesto más utilizado para el tratamiento de la TB a nivel mundial, es un pro-fármaco de primera línea activado por la KatG de *M. tuberculosis*. La resistencia a INH es el resultado de la acumulación de mutaciones, entre ellas las que alteran la función de la proteína activadora KatG (~70% de los aislados resistentes tienen la mutación S315T). México es uno de los países que presenta más casos de TB-MDR en América Latina y se sabe poco sobre las características moleculares de estas cepas. Con el fin de proporcionar una mayor comprensión, el INMEGEN identificó la presencia de diversas mutaciones en cepas de *M. tuberculosis* asociadas a resistencia a INH utilizando secuenciación de nueva generación directamente de aislados clínicos de pacientes de diversas regiones de México. El objetivo de este estudio es la caracterización funcional de variantes de KatG, encontradas por el INMEGEN. Se construyeron 6 variantes de KatG: incluyendo 2 controles ya caracterizados anteriormente (WT y S315T), 2 mutaciones nuevas (E287K y A556S) y 2 mutaciones bioquímicamente no caracterizadas (A256T y L333V); seleccionadas a partir de la información sobre la ubicación de los residuos en la estructura. Se determinaron cuatro actividades enzimáticas (catalasa, peroxidasa, producción de radicales libres y formación del aducto INH-NAD) de todas las variantes. Para comprender mejor los orígenes de la resistencia de las variantes de KatG, se compararon las propiedades catalíticas (K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m) de las variantes. Cada variante mostraba diversos niveles de cada actividad, obteniéndose, en algunos casos, eficiencias catalíticas significativamente más bajas que la KatG-WT. Las variantes A256T, E287K y A556S tuvieron un comportamiento similar al control S315T. El comportamiento de la variante A556S demuestra que el residuo no requiere estar cerca del sitio activo para afectar los mecanismos de resistencia a INH. Por su parte, la variante L333V está cerca de una histidina que puede dar como resultado la interrupción de un enlace de coordinación con el grupo hemo, ya que se observó la disociación rápida del mismo; además tiene una eficacia catalítica similar a la KatG-WT y la resistencia se explica por el aumento de la K_m en la formación del aducto.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Tuberculosis.

1.1.1. Generalidades.

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una micobacteria bacilar, inmóvil que carece de cápsula o espora, su crecimiento es muy lento, tarda de 14 a 24 horas en duplicarse y no produce toxinas o sustancias químicas dañinas al organismo que infecta. Puede colonizar diversos órganos del hospedero desde las primeras fases de la infección, siendo más frecuente la localización pulmonar (la vía de entrada del bacilo), la cual representa 80-85% de los casos (OMS, 2016).

Aunque, la TB es curable y prevenible, representa uno de los principales problemas para la salud pública siendo una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. Afecta a grandes grupos de la población mundial, principalmente a los adultos en los años más productivos de su vida, y particularmente en áreas marginadas donde predomina la pobreza y desnutrición. Más del 95% de los casos y de las muertes se concentran en los países en vía de desarrollo (OMS, 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha informado que una tercera parte de la población mundial tiene TB latente; es decir, las personas están infectadas por el bacilo pero no se han enfermado ni pueden transmitir la infección, las cuales tienen un 10% de riesgo de enfermarse de TB a lo largo de su vida. Sin embargo, este riesgo es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmunitario está dañado, como ocurre con las personas con malnutrición, diabetes y las infectadas por el VIH, los cuales tienen entre 20 y 30 veces más probabilidades de desarrollar TB activa. Ese riesgo también es más elevado en las personas que consumen tabaco. Se calcula que a nivel mundial más del 20% de los casos de TB son atribuibles al tabaquismo (OMS, 2016).

La infección por *M. tuberculosis* suele ser asintomática en personas sanas, dado que su sistema inmunitario forma una barrera alrededor de la micobacteria inactivándola. Cuando alguien desarrolla TB activa los síntomas son tos, dolor torácico, debilidad,

pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna que pueden ser leves durante muchos meses. Como resultado de ello, en ocasiones la persona afectada tarda en buscar atención médica, con el consiguiente riesgo de infectar a otros sujetos (OMS, 2016).

La TB se transmite de persona a persona a través del aire; cuando un enfermo tose, estornuda o escupe, expulsa bacilos tuberculosos al aire y basta con que una persona los inhale para quedar infectada. A lo largo de un año, una persona con TB activa puede infectar entre 10 y 15 personas por contacto directo. El periodo de incubación (desde el momento de la infección hasta que aparecen las lesiones primarias) dura entre 4 y 12 semanas. Si no reciben el tratamiento adecuado, hasta dos terceras partes de los enfermos mueren (OMS, 2016).

La erradicación de la TB depende en gran parte de programas preventivos como la vacunación. Sin embargo, la vacuna BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) tiene una baja eficacia de prevención (50%). El desarrollo de medicamentos más efectivos y de acción rápida contra este agente infeccioso ha sido lento, en parte porque la erradicación química del patógeno implica eliminar tanto al microorganismo activo como al latente que no se está replicando.

La TB activa que es sensible a los antibióticos se trata administrando durante seis meses una combinación estándar de cuatro medicamentos antimicrobianos, isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB), junto con la entrega de información, supervisión y apoyo al paciente. La gran mayoría de los enfermos pueden curarse a condición de que los medicamentos se suministren y se tomen correctamente.

De acuerdo con el Informe Global de la Tuberculosis 2016 de la OMS, en el 2015 se estimaban alrededor de 10.4 millones de casos nuevos de TB en el mundo (**Figura 1**): 5.9 millones de hombres, 3.5 millones de mujeres y 1.0 millón de niños. En ese año, se registraron un total de 1.4 millones de muertes por TB, de los cuales aproximadamente 0.86 millones eran hombres, 0.35 millones mujeres y 0.17 millones niños, y 0.39 millones de VIH-positivos (OMS, 2016).

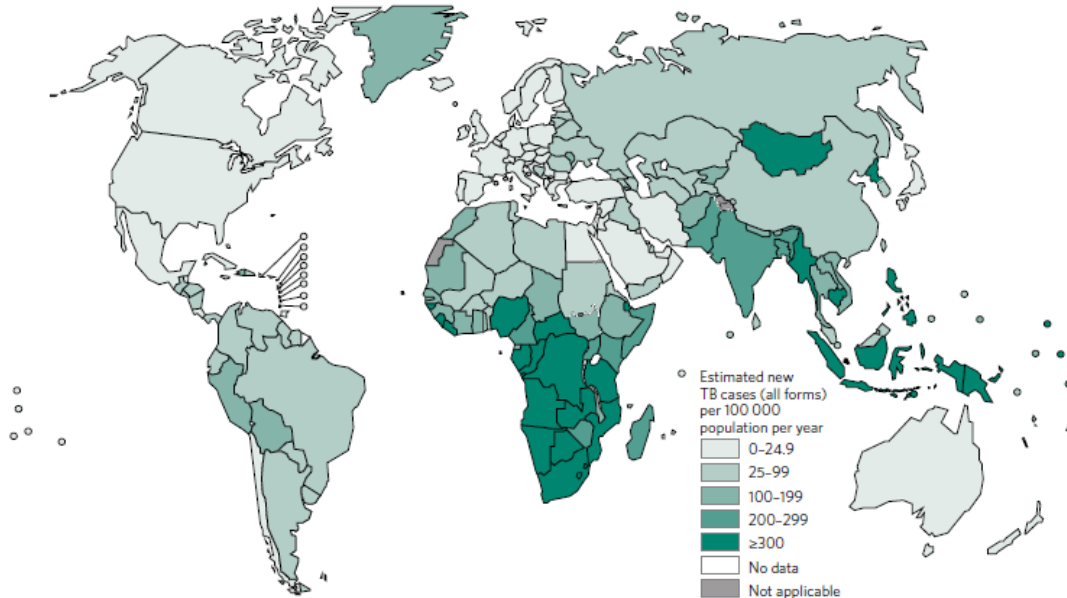
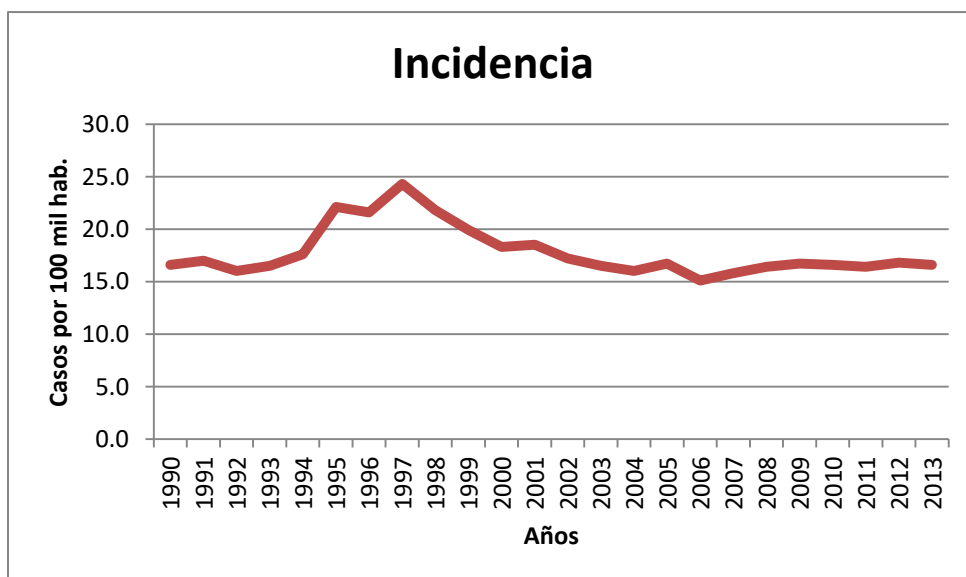


Figura 1. Incidencia de TB estimada. Fuente: OMS, 2016.

El número de muertes es alto, sin embargo; un diagnóstico oportuno y un tratamiento correcto podrían evitarlas según reporta la OMS (OMS, 2016).

1.1.2. Situación en México.

A pesar de la implementación de políticas para el control de la enfermedad, esta no ha disminuido de manera notable en los últimos años (**Gráfica 1**). La OMS reportó 27 mil casos nuevos de TB en México (10% de TB infantil) en el año 2015 (SS, 2013).



Gráfica 1. Tasa de incidencia en México. Fuente: Secretaría de Salud, cierre 2013.

La tasa más elevada de TB en México se ubica en Baja California, el resto de la tendencia por entidad federativa se muestra en la **Figura 2** (SS, 2013).

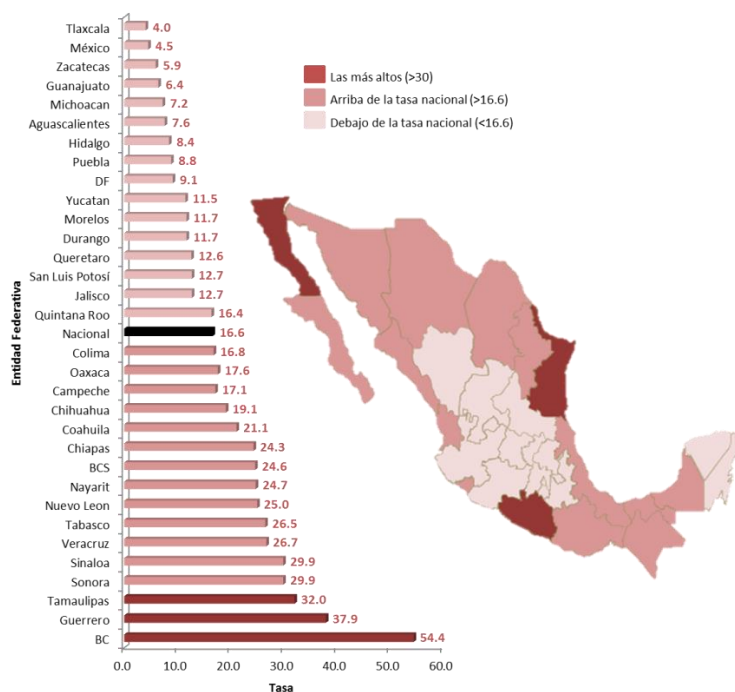
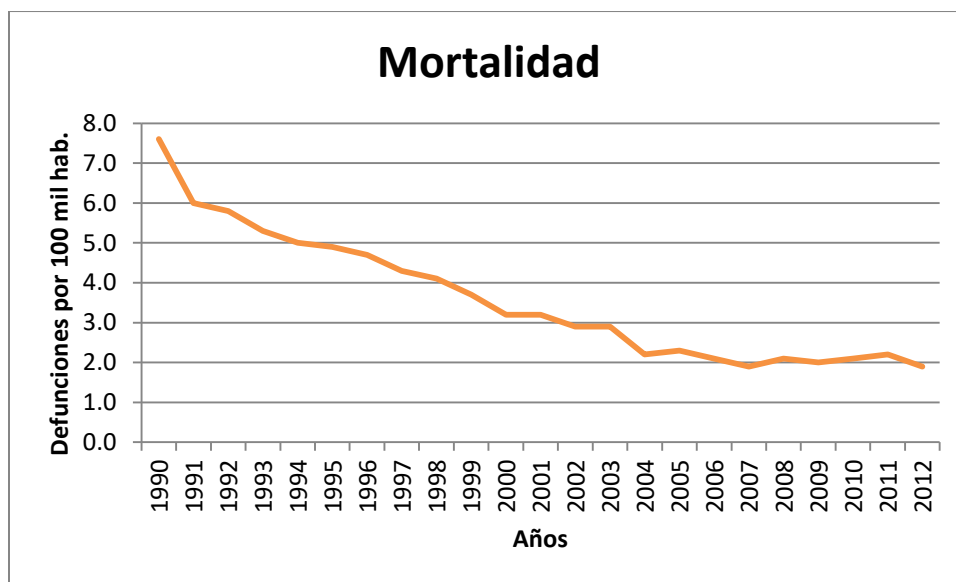


Figura 2. Casos nuevos por entidad federativa. Fuente: Secretaría de Salud, cierre 2013.

La relación hombre-mujer es de 1.6:1 en incidencia, y aunque varía de un estado a otro, es más frecuente en hombres principalmente en edad productiva (SS, 2013).



Gráfica 2. Tasa de mortalidad. Fuente: Secretaría de Salud, cierre 2013.

La mortalidad por TB ha mostrado un decremento en los últimos años. La **Gráfica 2** muestra la distribución de defunciones desde el año 1990 al 2013. En este último año, la tasa de mortalidad por TB fue de 1.9 por cada 100 mil habitantes, esto es debido principalmente a la falta de diagnóstico, diagnóstico tardío, progresión de la enfermedad y fármaco-resistencia (SS, 2013). La detección oportuna y precisa del agente infeccioso es de vital importancia para el control, tratamiento y prevención de la enfermedad (Luo *et al.*, 2010).

1.1.3. Fármaco-resistencia en TB.

La TB fármaco-resistente (TB-DR, por sus siglas en inglés) es la evidencia microbiológica de que un aislado de *M. tuberculosis* no muestra sensibilidad *in vitro* a uno o varios fármacos (Salud, 2012). La vigilancia reciente en todo el mundo ha comprobado la existencia de cepas de *M. tuberculosis* que presentan resistencia a al menos un medicamento. Este fenómeno ha alcanzado niveles alarmantes en algunos países provocando que se extienda con gran velocidad en el mundo. Según la OMS, la TB-DR constituye un problema de salud pública de primera magnitud, que amenaza el éxito de la lucha contra la TB en todo el mundo (OMS, 2016), y su clasificación se describe en la **Tabla 1**

La TB-DR surge principalmente en zonas donde los programas de lucha contra la TB son deficientes; debido a la mala utilización de los medicamentos, ya sea a través de su prescripción incorrecta por el personal de atención de salud o al hecho de que no se aseguren de que el paciente siga el tratamiento hasta el final. Por otra parte, los fármacos deben alcanzar concentraciones *in situ* por encima de la concentración mínima inhibitoria (MIC) para *M. tuberculosis*. Sin embargo, se ha observado variaciones sustanciales en los niveles sanguíneos circulantes de fármacos contra TB en los pacientes a pesar de consumir la misma dosis. Además de que concentraciones subóptimas de fármacos están relacionadas con la adquisición de resistencia lo que da resultados desfavorables al tratamiento; por lo que los clínicos deben adaptar las concentraciones de los fármacos individualmente (Olaru *et al.*, 2016).

Otro factor que afecta es que en algunos países siguen dependiendo de la baciloscopía de esputo para diagnosticar la TB. Este método consiste en el examen

microscópico para detectar la presencia de la micobacteria. Sin embargo, la microscopía solo detecta la mitad de los casos de TB y es incapaz de determinar si hay fármaco-resistencia.

La aparición de cepas resistentes ha despertado un interés para entender las bases moleculares de la TB-DR (Cade *et al.*, 2010). Hasta hoy, se han identificado 84 genes y 19 regiones intergénicas asociadas a la TB-DR en este organismo. Sólo una docena de estos genes y su asociación a fármaco-resistencia han sido confirmadas en diversos estudios, el resto está en bibliotecas virtuales y representa una lista incompleta de posibles biomarcadores o de blancos específicos para el desarrollo de nuevos medicamentos (Zhang *et al.*, 2013).

La disponibilidad de métodos fiables y oportunos para la detección de cepas resistentes a los medicamentos ha sido insuficiente. Las pruebas basadas en cultivo, con duración de 6-8 semanas, son actualmente el estándar para identificar pacientes con resistencia a fármacos y requieren una infraestructura de laboratorio que no está disponible de manera general en todas las regiones de los países con una alta carga de TB (Torres *et al.*, 2015). Por ello la detección ha evolucionado hacia las pruebas moleculares sencillas que confirman la presencia del patógeno y su resistencia a al menos un medicamento en pocas horas. Estos avances se dan gracias al conocimiento de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* que alberga casi 4 mil genes (Cole *et al.*, 1998; Soberón, 2014).

El uso de la prueba rápida Xpert MTB/RIF® se ha ampliado considerablemente desde el 2010, cuando la OMS recomendó su empleo por primera vez como prueba de diagnóstico inicial en todas las personas con síntomas de TB. La prueba detecta de forma simultánea la TB y la resistencia a la RIF, que constituye uno de los fármacos más importantes contra esta enfermedad. Este método permite obtener un diagnóstico en el plazo de dos horas y por ahora es el único método disponible para el diagnóstico de la TB pediátrica. La OMS recomendó en el 2016, además de Xpert MTB/RIF, tres nuevas pruebas para detectar la resistencia a fármacos de primera y segunda línea. Así, en un futuro cercano será posible diagnosticar al paciente en unas cuantas horas y al mismo tiempo determinar para cuáles fármacos podría presentar

resistencia, con el fin de proporcionar un tratamiento con altas probabilidades de éxito (Olaru *et al.*, 2016; OMS, 2016).

Tipo de TB-DR	Resistencia confirmada a los aislados de <i>M. tuberculosis</i> .	Diagnóstico recomendado
Monorresistencia	Resistencia a un medicamento de primera línea.	Xpert MTB/RIF®
Polifármacoresistencia (TB-PDR)	Resistencia a más de un medicamento de primera línea pero no a INH o RIF.	Xpert MTB/RIF® y cultivo líquido
Multifármacorresistencia (TB-MDR)	Resistencia a más de uno de los antibióticos de primera línea utilizados o bien a INH y RIF simultáneamente.	Xpert MTB/RIF® y cultivo líquido
Resistencia extensiva o extrema (TB-XDR)	Resistencia a INH, RIF, a cualquier quinolona y por lo menos a uno de los inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina, amikacina)	Xpert MTB/RIF® y cultivo líquido

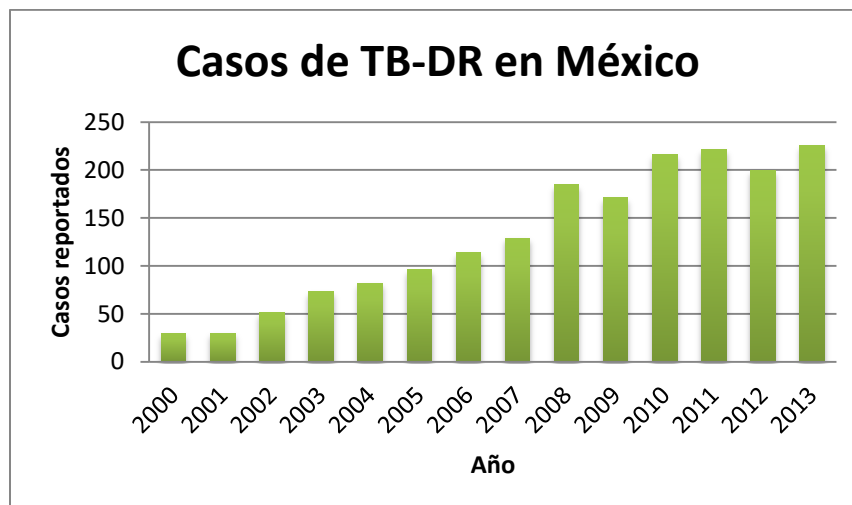
Tabla 1. Clasificación de la TB-DR, su resistencia y el diagnóstico recomendado.

La aparición de la TB-MDR, ha agravado la situación, dificultado el tratamiento ya que estas cepas no responden a INH y RIF, los dos medicamentos de primera línea más utilizados y eficaces; siendo una enfermedad difícil de tratar y potencialmente transmisible con una tasa de mortalidad del 50-80%; requiere una terapia de larga duración (hasta dos años de tratamiento) con fármacos de segunda línea; sin embargo, estas opciones de tratamiento son más costosas, menos efectivas y presentan más reacciones adversas (Pym *et al.*, 2002).

En algunos casos, se pueden alcanzar grados aún más preocupantes de fármacorresistencia. La TB-XDR es una de las formas más graves que no responde a los medicamentos de segunda línea más eficaces, lo que deja a muchos pacientes sin opciones de tratamiento. Cabe señalar que no se han desarrollado fármacos de tercera generación desde hace 40 años y los pacientes con TB-XDR tienen un promedio de sobrevivencia de 16 días (OMS, 2016).

A nivel mundial, en el 2015 se estimó que 480 000 personas desarrollaron TB-MDR. El 7.5% de estos casos son TB-XDR (aprox. 34 mil casos anuales en el mundo). Apenas el 52% de los enfermos con TB-MDR y el 28% de los enfermos con TB-XDR reciben actualmente un tratamiento eficaz (OMS, 2016).

En México, entre el 18-27% de los casos anuales son resistentes a un fármaco. Y entre 1.6-3.0% de ellos son resistentes a más de uno (CENAPRECE, 2014). Desde el año 2000 ha habido un crecimiento constante de casos de TB-MDR (**Gráfica 3**).



Gráfica 3. Número de casos de TB-DR notificados por año. Fuente: CENAPRECE, 2014.

Aproximadamente el 7% de todos los casos resistentes a múltiples fármacos son prácticamente no tratables; la prevalencia y la gravedad de la TB resistente a los fármacos están en ascenso (CENAPRECE, 2014).

1.2. Aplicación de la Medicina Personalizada.

1.2.1. Descripción.

La observación de que los pacientes no son igualmente sensibles a los efectos benéficos de los fármacos ni igualmente susceptibles a eventos adversos motiva un paradigma a nivel de la medicina específica del paciente. La medicina personalizada se puede describir como: proporcionar "al paciente adecuado el medicamento adecuado, la dosis adecuada, en el momento adecuado" (Browne *et al.*, 2017).

El comportamiento farmacológico individual deriva, en buena medida en la individualidad de la secuencia genética que, aunque es idéntica entre humanos en un 99.9%, el 0.1% restante, responsable de las diferencias, corresponde mayoritariamente a polimorfismos llamados SNPs (polimorfismos de un sólo nucleótido). Existen también pequeñas inserciones/deleciones y secuencias repetitivas (variaciones en el número de copias conocidas como CNV). Tales variaciones genéticas

contribuyen, frecuentemente de manera definitiva, a explicar la falta de eficacia o las reacciones secundarias de los medicamentos, y su conocimiento permitirá, de manera creciente, evitar cambios innecesarios en la terapia, tales como detener el fármaco, cambiar a otro, aumentar las dosis y su posible toxicidad (FDA, 2013).

La medicina personalizada se centra, mayoritariamente, en torno al cáncer debido a su mayor prevalencia en los países ricos. Sin embargo, el principio fundamental de la medicina de precisión, es aplicable a otras áreas como el caso de las enfermedades infecciosas (Mahon & Hafner, 2017); donde es necesario coleccionar información molecular basada en la secuencia genómica del paciente, comparando grupos de orígenes étnicos similares para evitar sesgos, y la del patógeno, para la implementación efectiva de biomarcadores personalizados.

Es indudable que aún existen muchos retos y obstáculos para poder reemplazar la medicina tradicional por una medicina más precisa (Ginsburg & McCarthy, 2001). Sin embargo, los desarrollos recientes en genómica y bioinformática tienen el potencial de dar lugar a un efecto sinérgico que conduce al desarrollo de un protocolo rápido basándose en la genética, factores ambientales, sociales, culturales, mecanismos biológicos, anatómicos y fisiológicos característicos de cada paciente, para su estratificación en grupos de predisposición genética antes de iniciar la terapia (Betsou *et al.*, 2011; FDA, 2013).

Actualmente, el cuello de botella es el análisis de una gran cantidad de datos de secuencia de ADN generados, por lo cual las nuevas herramientas bioinformáticas se han desarrollado casi exclusivamente para el análisis de estos datos, identificando rápidamente las mutaciones en genes asociados a padecimientos (Swaminathan *et al.*, 2016), y trasladar los resultados a la clínica para proporcionar un diagnóstico oportuno y así administrar los medicamentos adecuados en dosis óptimas (Bryant *et al.*, 2016).

1.2.2. Aplicación de la medicina personalizada para la TB-DR.

La situación actual crea la necesidad de contar con un método para detectar rápidamente la resistencia e iniciar un tratamiento personalizado inmediato y efectivo

para cada paciente, con el fin de prevenir la transmisión de la TB-DR (Swaminathan et al., 2016). Esto ayudaría a disminuir costos relacionados con la estancia prolongada en el hospital, el aislamiento del paciente y la cantidad de fármacos, siendo imposibles de soportar para los países de bajos ingresos.

En este contexto, el uso de la medicina personalizada conducirá a regímenes terapéuticos individualizados más cortos, más tolerables y más eficientes en los casos difíciles de tratar, como los causados por TB-MDR y TB-XDR. Con ello se tendrán mejores resultados que los observados actualmente y mejorarán la calidad de vida de los afectados por esta enfermedad (Olaru et al., 2016).

En los últimos años, las pruebas moleculares mediante sistemas de amplificación/hibridación han permitido la detección rápida de mutaciones de *M. tuberculosis* que están asociadas con la resistencia a fármacos específicos (Olaru et al., 2016). Sin embargo, la predicción molecular de la resistencia a todos los fármacos contra TB es difícil. Además de que la utilización de estos avances técnicos se ve cuestionada por el hecho de que el patógeno tiene que ser cultivado durante varias semanas con el fin de obtener cantidades suficientes de ADN para la secuenciación (Swaminathan et al., 2016).

El Proyecto “Predicción de Resistencia Integral para la Tuberculosis: un Consorcio Internacional” (CRyPTIC, por sus siglas en inglés) pretende la secuenciación de todo el genoma de *M. tuberculosis* a partir de expectoraciones para generar datos a gran escala de todo el mundo, explorar la genómica de *M. tuberculosis*, comprender varios mecanismos subyacentes y determinar el perfil de resistencia a los fármacos para elegir la combinación correcta de fármacos para un tratamiento eficaz. Tales esfuerzos ayudarán a desarrollar una biblioteca refinada de mutaciones para explicar la resistencia a los medicamentos con mayor precisión (Swaminathan et al., 2016). Por lo tanto, las muestras de los donantes infectados (expectoraciones) son elementos clave para la caracterización precisa del ADN del microorganismo para su secuenciación y consecuente desarrollo de biomarcadores (Betsou et al., 2011).

Los expertos consideran que los resultados del análisis de las secuencias de *M. tuberculosis* son comparables a las pruebas fenotípicas de resistencia a fármacos; por

ello el interés mundial en utilizar la fuerza de la secuenciación. Estos resultados junto con un equipo multidisciplinario incluyendo inmunólogos, especialistas en enfermedades infecciosas, microbiólogos, biólogos moleculares, terapeutas ocupacionales, farmacéuticos, farmacólogos, fisioterapeutas, psicólogos, trabajadores sociales y cirujanos, tendrá un impacto significativo en la clínica de la TB en un futuro próximo (Swaminathan *et al.*, 2016).

1.2.2.1. Importancia clínica de la resistencia a INH.

Aunque *M. tuberculosis* ha desarrollado resistencia a varios medicamentos utilizados para su tratamiento, la resistencia a INH mostró un aumento mayor en comparación con los otros fármacos (Nachegea & Chaisson, 2003). La tasa de casos de TB resistente a INH está aumentando globalmente y plantea un reto para el tratamiento de la TB a nivel mundial (Cattamanchi *et al.*, 2009).

Recientes revisiones han demostrado que la mono-resistencia a INH está asociada con una menor probabilidad de éxito en el tratamiento estándar y un mayor riesgo de generar fármaco-resistencia adicional (Menzies *et al.*, 2009). Por lo tanto, es importante conocer qué tipo de resistencia se presenta para aumentar la probabilidad de éxito del tratamiento y evitar la aparición de TB-MDR (Jenkins *et al.*, 2011).

La elucidación del mecanismo de resistencia a cada medicamento es crucial para el desarrollo de estrategias para combatir a *M. tuberculosis* y evitar la fármaco-resistencia (Vilcheze & Jacobs, 2007).

1.3. Propiedades de INH.

En 1945, investigadores europeos descubrieron que la vitamina B3 (nicotinamida) mostraba actividad contra TB. Para aprovechar esta información, los químicos comenzaron a crear nuevas moléculas sintéticas basadas en la estructura de la nicotinamida. Sorprendentemente, uno de los intermediarios, la hidrazida del ácido isonicotínico (INH), tenía una actividad extraordinariamente alta contra la TB, muy superior a cualquier otro compuesto (Vilcheze & Jacobs, 2007). Con su introducción por primera vez a principios de 1950, el tratamiento contra la TB fue considerado factible (Jena *et al.*, 2014).

El INH es, actualmente, un antibiótico de primera línea activo exclusivamente contra micobacterias de crecimiento lento (con un MIC contra *M. tuberculosis* de 0.05 µg/mL). Es el compuesto sintético más utilizado para tratar la TB, por lo que tiene una importancia mundial. Desde su introducción, sigue siendo uno de los principales fármacos ya que es eficiente y económico. Sin embargo, la aparición de *M. tuberculosis* resistente a INH está poniendo en peligro su utilidad (Ando *et al.*, 2010).

El INH es, en realidad, un pro-fármaco de estructura simple (**Figura 3**). Consiste de dos componentes: un anillo de piridina y un grupo hidrazida. A pesar de su sencillez, el mecanismo de acción de INH es muy complejo e implica varios aspectos diferentes (Jena *et al.*, 2014).

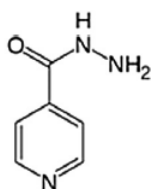


Figura 3. Estructura química de INH (Formula: C₆H₇N₃O, Peso molecular: 137.139 g/mol). Fuente: Jena *et al.*, 2014.

1.3.1. Mecanismo de acción de INH.

El INH mata únicamente a las bacterias en fase de replicación activa; no se observa efecto cuando las micobacterias están en fase estacionaria o en crecimiento anaeróbico. La acción del INH es bacteriostática durante las primeras 24 h de tratamiento, después la acción es bactericida. INH también induce cambios morfológicos en la micobacteria, tales como la pérdida de la estructura interna (Vilcheze & Jacobs, 2007). Uno de los efectos más importantes de INH en la micobacteria es la pérdida de solidez ácida, resultante de la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos, α-alkil β-hidroxi ácidos grasos ramificados de cadena larga (70 a 90 carbonos de longitud), componente esencial de la pared celular micobacteriana, que contribuyen a la impermeabilidad de la envoltura celular (Unissa *et al.*, 2016).

Antes del desarrollo de herramientas genéticas, los estudios sobre el mecanismo de acción de INH fueron escasos; tomó más de 50 años en descubrirlo (Vilcheze & Jacobs, 2007). Y a pesar de numerosos e intensivos estudios, nuestro conocimiento sigue siendo aún limitado (**Figura 4**).

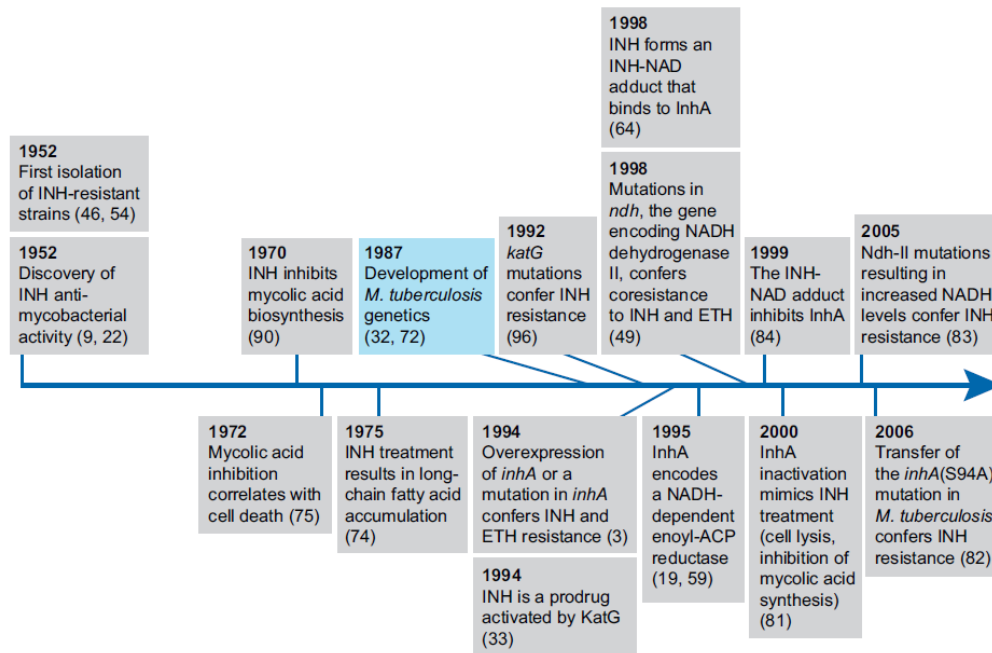


Figura 4. Línea del tiempo del INH. El análisis del mecanismo de acción de INH se vio fuertemente obstaculizado por la falta de conocimiento del genoma de *M. tuberculosis*. Una vez que el genoma estuviera disponible, el mecanismo de acción pudo ser descrito en términos de genes y enzimas específicas. Fuente: Vilcheze & Jacobs, 2007.

Actualmente aún se investigan detalles del mecanismo de acción, pero se tiene un consenso de cómo trabaja. Se propone que el INH se difunde pasivamente a través de la membrana de la micobacteria, dentro del citoplasma es activado por la catalasa-peroxidasa (KatG) de *M. tuberculosis* que lo oxida, transformándolo en el radical isonicotínico, que a su vez se une covalentemente al NAD⁺. El aducto resultante, INH-NAD, inhibe la síntesis de ácidos micólicos al unirse a la enzima InhA, lo que provoca la muerte de la bacteria (Figura 5).

1.3.2. El papel de KatG en el mecanismo de acción.

En 1953, Middlebrook cultivó aislados resistentes a INH de *M. tuberculosis* a partir de esputos de pacientes con TB que no eran virulentos en cerdos y encontró que la mayoría de ellos eran deficientes en catalasa; demostrando la relación entre la función de la catalasa y la virulencia. En 1973, Saroja y Gopinathan demostraron que podían restaurar la sensibilidad a INH en cepas resistentes cuando transferían un locus genético de *katG* de una cepa de *M. smegmatis*. Análisis posteriores de aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH revelaron la presencia de mutaciones

puntuales y en menor medida deleciones en el gen *katG*. Estudios bioquímicos subsecuentes han demostrado que la proteína KatG activa el pro-fármaco INH, dando como resultado la formación de radicales libres; ésta fue la primera hipótesis, propuesta por Winder (1960) (Vilcheze & Jacobs, 2007).

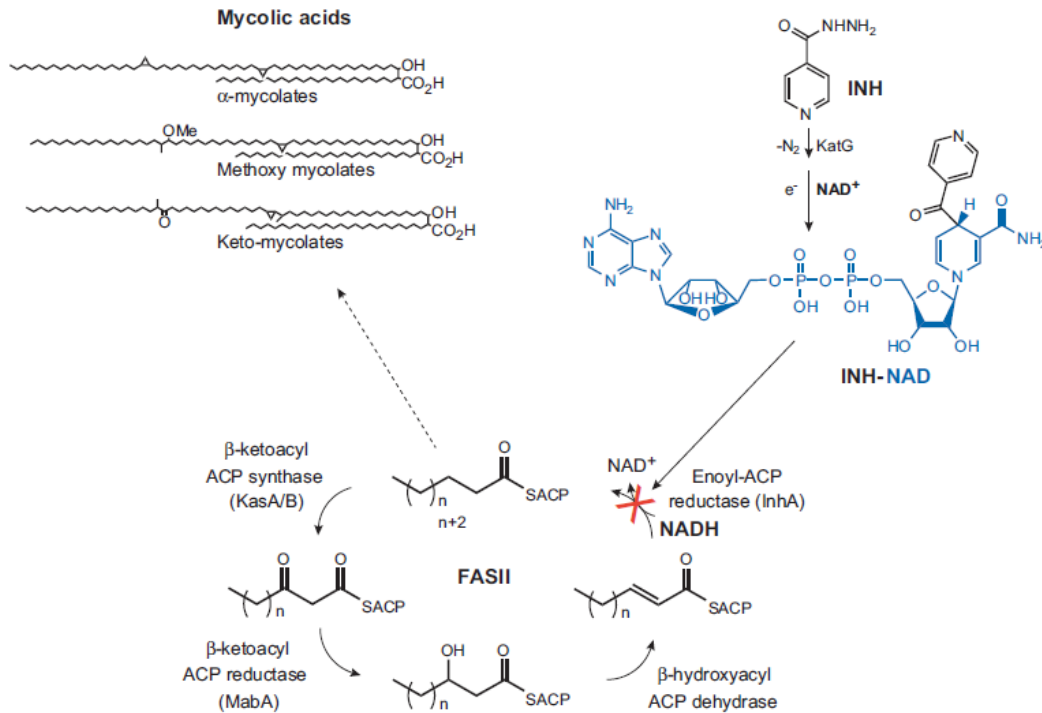


Figura 5. Mecanismo de acción de INH en *M. tuberculosis*. INH es activada por KatG a su forma del aducto INH-NAD. El aducto inhibe a la InhA, una enoil-ACP reductasa, que sintetiza los ácidos micólicos (representación de 3 clases de ácidos micólicos), resultando la inhibición de la biosíntesis de ácidos micólicos que finalmente conduce a la muerte celular. Fuente: Vilcheze & Jacobs, 2007.

1.3.2.1. Función fisiológica de KatG.

El gen *katG* codifica una enzima hemo bifuncional de 744 residuos de aminoácidos, que exhibe tanto actividad de catalasa ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$) como actividad de peroxidasa ($2\text{AH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{A} + 2\text{H}_2\text{O}$) (Johnsson *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1997). Pertenece a la clase I de la superfamilia de peroxidasas (plantas, hongos, y bacterias) y tiene una alta identidad de secuencia con peroxidasas procariontas, incluyendo el citocromo c peroxidasa (CCP) de levadura y la ascorbato peroxidasa de plantas, aunque KatG es dos veces mayor, lo cual se debe a la duplicación del gen (Chouchane *et al.*, 2000). Sin embargo, también presenta actividad de catalasa equivalente a la de una catalasa monofuncional a pesar de tener baja identidad de secuencia con estas últimas (Ghiladi *et al.*, 2005).

En *M. tuberculosis*, que reside dentro de los macrófagos, la función propuesta de la enzima KatG es proteger a la micobacteria de moléculas tóxicas (radicales libres) (Bertrand *et al.*, 2004); por tanto, KatG es un factor de virulencia importante responsable de la supervivencia de la micobacteria. Se ha demostrado por estudios genéticos que KatG es la única catalasa que puede desintoxicar especies reactivas de oxígeno (O_2) convertidas en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un oxidante abundante de los macrófagos (Johnsson *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2006).

1.3.2.2. El cofactor hemo y los residuos catalíticos de KatG.

La estructura cristalina de la proteína KatG de *M. tuberculosis* (Figura 6) muestra que es un homodímero y que cada subunidad consta de 2 dominios (Bertrand *et al.*, 2004). El dominio N-terminal contiene un sitio de unión al grupo hemo que está rodeado por la cavidad proximal (compuesto por H270 y W321) y la cavidad distal (W107 y H108), mientras que el dominio C-terminal carece de esta función (Brossier *et al.*, 2016), pero contribuye significativamente a la función enzimática por su alto contenido de tirosinas y triptófanos ya que permiten la formación de radicales (Saint-Joanis *et al.*, 1999).

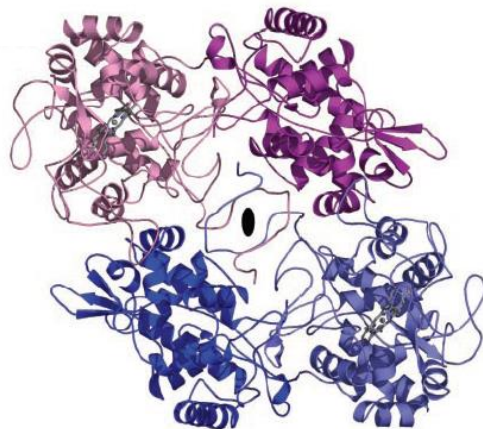


Figura 6. Representación de la estructura global del homodímero de KatG de *M. tuberculosis*. La subunidad 1 está en color rosa (el N-terminal en rosa claro y el C-terminal en rosa fuerte). La subunidad 2 está en color azul (el N-terminal en azul claro y el C-terminal en azul oscuro). El grupo hemo está de color gris. Fuente: Bertrand *et al.*, 2004.

El grupo hemo es accesible al solvente a través de un estrecho canal que conecta hacia el exterior. Una característica estructural única de enzimas KatG es la presencia de dos enlaces covalentes de las cadenas laterales de los aminoácidos W107, Y229 y M255 en la cavidad distal, que se requiere para la actividad de catalasa, pero no para la de peroxidasa (Brossier *et al.*, 2016).

A nivel cinético, se han propuesto varios mecanismos para la activación del INH. Como KatG es capaz de utilizar el H_2O_2 para catalizar la oxidación de diversos compuestos, se ha propuesto que oxida a INH de una manera similar. Dos electrones oxidan a la KatG en un intermediario denominado Compuesto I (radical porfirina ferrilo) y un electrón en una forma oxidada llamado Compuesto II. Los Compuestos I y II, son especies intermediarias en el ciclo de las peroxidasa, mientras que el Compuesto I es el intermediario clave en el ciclo tradicional de catalasa. El Compuesto III, también se ha propuesto como un compuesto intermediario crítico en KatG vinculado a la activación INH y la susceptibilidad. Las especies del grupo hemo, puede formarse *in vivo* sobre la unión del superóxido en el hemo del sitio activo de KatG, por la adición de dióxigeno a la forma ferrosa de la enzima, o por la adición de un gran exceso de peróxido de hidrógeno al centro férrico hemo (**Figura 7**) (Cade *et al.*, 2010).

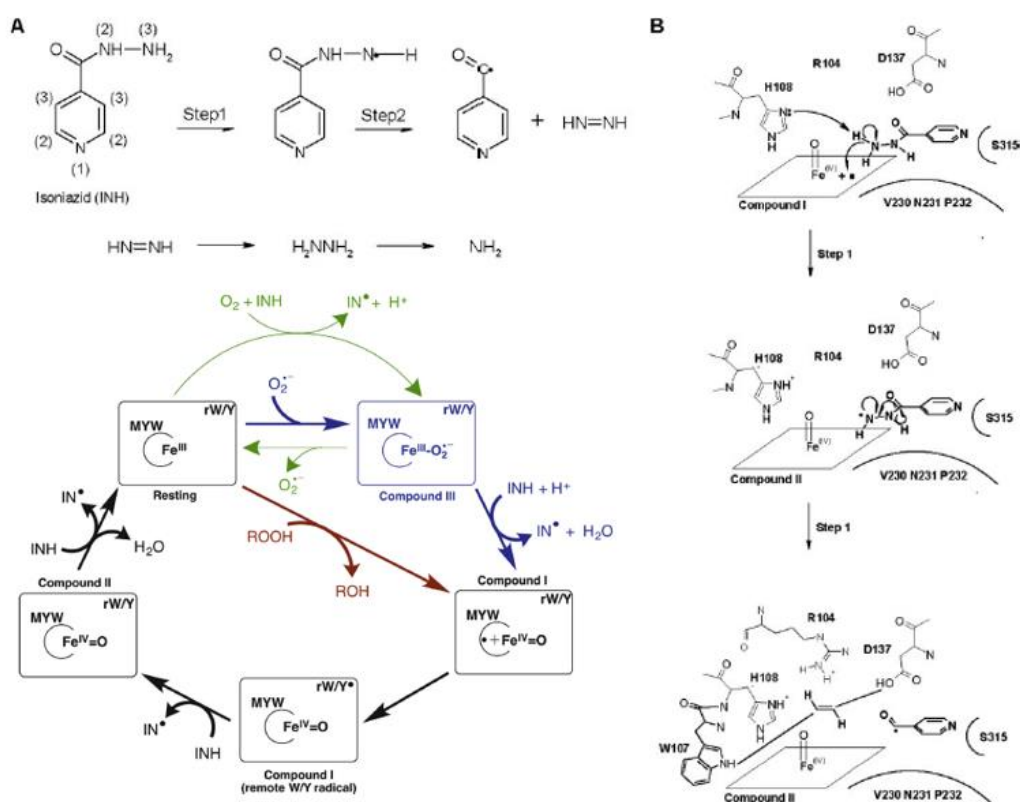


Figura 7. A) Propuesta del mecanismo catalítico de la oxidación del INH por KatG. En la primera etapa (etapas 1 y 2) se forma el radical isonicotinico, que se piensa reacciona con la hidrazina liberada para formar el producto primario isonicotinamida. B) Se proponen los residuos del sitio activo de KatG que están implicados en el mecanismo catalítico de la oxidación de INH. Las posibles interacciones estabilizadoras se muestran como líneas punteadas, y el hemo se representa como un rombo. Se cree que Asp-137 de KatG desempeña un papel principal en la estabilización del intermedio catalítico de la oxidación de INH. Adaptación de: Njuma *et al.*, 2014 y Metcalfe *et al.*, 2008.

1.3.2.3. La expresión de KatG y su regulación.

La expresión de KatG en *M. tuberculosis* es inducible con H₂O₂, regulación similar a la observada en la catalasa-peroxidasa de *E. coli*. Pero a diferencia de ésta, en donde el elemento regulador es OxyR, en *M. tuberculosis* OxyR está inactivo porque presenta múltiples deleciones (Unissa *et al.*, 2016). Por lo tanto, la expresión KatG es independiente de OxyR. También se sabe que *furA* regula negativamente la expresión de KatG, y la expresión es dada por elementos promotores situados arriba de *furA*, que inhiben su transcripción y la de KatG (Pym *et al.*, 2002).

1.3.3. El papel de InhA en el mecanismo de acción.

El gen *inhA* codifica a la enzima InhA, una enoil-ACP (proteína acarreadora de grupos acilo) reductasa dependiente de NADH perteneciente al sistema de la sintasa de ácidos grasos de tipo II (FASII), que participa en la biosíntesis de los ácidos micólicos de la pared celular de *M. tuberculosis* (Vilcheze & Jacobs, 2007).

La cristalización de InhA permitió descubrir que el INH no se une directamente a ésta, sino que es la unión del aducto INH-NAD el que la inhibe. Se han caracterizado varias mutantes que tienen afectado el sitio de unión al NADH (Vilcheze & Jacobs, 2007). Recientemente, se ha demostrado la existencia de un complejo enzima-inhibidor 1:1 estable (Jena *et al.*, 2014). La afinidad es alta (K_d , 0.4 nM) y consistente con la susceptibilidad mostrada por *M. tuberculosis* a INH (Lei *et al.*, 2000).

La inhibición de InhA con el aducto INH-NAD da como resultado una pared celular micobacteriana debilitada, lo cual permite que el microorganismo sea susceptible a la acción de radicales de oxígeno reactivos y a otros elementos externos de respuesta del huésped; que generan la muerte del patógeno (Ghiladi *et al.*, 2005).

1.3.4. Papel de NAT en el mecanismo de acción.

La enzima N-acetil transferasa de arilamina (NAT), codificada por el gen *nat* de *M. tuberculosis*, inactiva a INH al acetilarla (**Figura 8**). Se ha demostrado que es capaz de conferir niveles bajos de resistencia a INH en *M. smegmatis* cuando se sobre-expresa. Algunos estudios han correlacionado el aumento de la actividad de NAT con una mayor supervivencia de *M. smegmatis* expuesto a INH (Unissa *et al.*, 2016).

Si la afinidad de NAT es mayor que la de KatG, daría como resultado la inactivación del INH mediante la formación de acetil-INH (**Figura 8**), produciendo resistencia a INH. Por otra parte, si la afinidad de KatG es mayor que la de NAT, en principio provocaría la activación del INH y por lo tanto susceptibilidad a INH (Unissa *et al.*, 2016).

1.3.5. Papel de NAT2 en el mecanismo de acción.

En humanos, la enzima N-acetil transferasa de arilamina tipo 2 (NAT2) localizada en el hígado y la mucosa intestinal reduce las concentraciones terapéuticas de INH por N-acetilación, usando acetil Coenzima A (CoA) como donador del grupo acetilo (Unissa *et al.*, 2016).

No todos los pacientes tienen la misma capacidad para eliminar INH por esta vía, muchos estudios indican que su eficacia y toxicidad se relacionan con la actividad de esta enzima. INH causa daño al hígado, sobretodo en combinación con RIF, mezcla típica en el tratamiento contra la TB. Existen reportes que asocian polimorfismos genéticos funcionales de NAT2 con lesiones hepáticas (Olaru *et al.*, 2016). Treinta y ocho polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) se han identificado en la región codificante del gen (Unissa *et al.*, 2016).

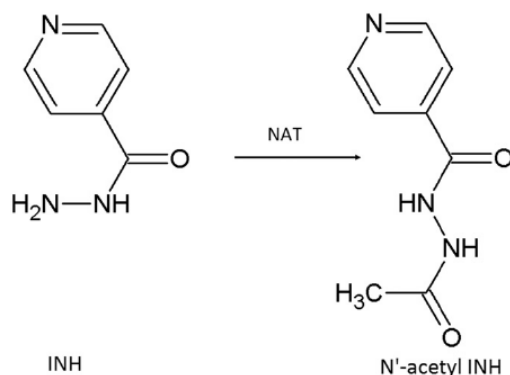


Figura 8. Acetilación del INH catalizada por la enzima NAT. Fuente: Unissa *et al.*, 2016.

En los acetiladores rápidos, >90% del fármaco se excreta como N-acetil INH, mientras que en los acetiladores lentos solo el 67% del fármaco se excreta. Los acetiladores lentos tienen mayor riesgo de desarrollar hepatotoxicidad en comparación con acetiladores rápidos. La hepatotoxicidad, es el efecto adverso más relevante del INH, y

se genera en aproximadamente 10% de los pacientes que recibieron la dosis estándar del fármaco (Unissa *et al.*, 2016).

Por lo tanto, la identificación de pacientes con polimorfismos genéticos en NAT2 podría ser útil para predecir reacciones adversas en pacientes con TB que reciben un régimen basado en INH.

1.4. Mecanismos moleculares de resistencia a INH.

Cuando se utilizó INH en monoterapia, poco después de su introducción, la resistencia se hizo evidente (Middlebrook, 1952). La aparición creciente de infecciones de TB resistentes a INH en todo el mundo ha conducido a un mayor interés en explorar los orígenes de la resistencia (Zhao *et al.*, 2006).

No fue hasta hace cuarenta años que las bases moleculares de esta observación empezaron a ser entendidas. Sin embargo, todavía hay más por descubrir acerca de este fenómeno (Vilcheze & Jacobs, 2007). Ahora se sabe que el mecanismo de resistencia a INH es complejo e implica mutaciones en varios genes. Informes de diferentes regiones del mundo ha detectado mutaciones principalmente en *katG* e *inhA*, aunque para algunas cepas también se encuentran mutaciones en *kasA*, *ndh*, la región intergénica *oxyR-ahpC*, y varios otros genes. Sin embargo, entre todos los genes implicados en la resistencia a INH, las mutaciones en *katG* parecen ser las más comunes, relacionadas con el 60% de las cepas resistentes (Unissa *et al.*, 2016).

Estudios de los mecanismos de resistencia a INH ha proporcionado las pistas necesarias para dilucidar el mecanismo de acción de INH (Vilcheze & Jacobs, 2007).

1.4.1. Mutaciones de la proteína KatG.

El gen *katG* está situado en una región altamente variable del genoma de *M. tuberculosis* que contiene secuencias de ADN repetitivas; esta puede ser la razón de la inestabilidad de la región y la alta frecuencia de mutaciones (Unissa *et al.*, 2016). La presencia de mutaciones o deleciones en este gen juegan un papel prominente en la resistencia y se ha relacionado con el 60% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH.

Varios investigadores de todo el mundo han caracterizado numerosas variantes de la proteína KatG. El descubrimiento de la estructura cristalina de la proteína KatG (Bertrand *et al.*, 2004) proporcionó un gran avance en la comprensión del mecanismo molecular de resistencia. Con la disponibilidad de la estructura, el efecto de una serie de mutaciones puntuales que ocurren en el sitio de unión a INH (bolsillo distal) podría entenderse. Se ha reportado que el residuo H108 es importante para generar una mayor resistencia a INH. Se propone que este residuo está implicado en la unión y activación de INH a través de interacciones con el grupo hidrazida del fármaco. Su sustitución con ácido glutámico/glutamina reduce la afinidad de la enzima por INH debido a que éste tiene grupos donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno que permiten que INH se una en el bolsillo distal (Unissa *et al.*, 2016).

La sustitución de A110V asociada con resistencia a INH puede ejercer su efecto alterando la conformación local de H108, que a su vez alteraría la capacidad para unir y/o activar a INH (Bertrand *et al.*, 2004)

El residuo D137 parece ser un donador de protones específico de la enzima para catalizar la activación. Las mutaciones en la posición 137 alteran drásticamente la capacidad de la enzima para funcionar como catalasa.

Recientemente, un informe confirmó 23 mutaciones nuevas en KatG asociadas con resistencia a INH. De éstas, 14 eran mutaciones individuales (Y64S, Y95C, P131T, A139P, D142G, A162V, G269D, T306P, R385W, D387G, T394M, Q439P, F483L y A541D), y adicionalmente 9 mutaciones (G32D, V47Q, D194G, A256T, N596S, Y597H, M624V, T667P) en combinación con el cambio S315T (Torres *et al.*, 2015).

1.4.2. La mutante S315T.

La variante más común en aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH es la sustitución de Serina con Treonina en el codón 315, representado como S315T (AGC a ACC), que resulta en un aumento de 200 veces el MIC. El predominio de esta sustitución en el gen *katG* en aislados clínicos ha sido apoyada por varios informes a nivel mundial, y la estimación de su presencia oscila entre el 25% y el >90% de los casos de resistencia registrados (Unissa *et al.*, 2016).

Existe un interés considerable en la comprensión de los efectos de este cambio en la estructura y la función de KatG (Wengenack *et al.*, 1997), porque se sabe que disminuye la capacidad para producir radicales de INH, afectando la formación de INH-NAD y que conserva la actividad de catalasa, que es un factor de virulencia. Estudios estructurales (código PDB-2CCD) sugieren que la adición de un grupo metilo a la serina estrecha el canal de acceso del INH al grupo hemo (de 6 a 4.7 Å) lo que podría afectar la unión (Unissa *et al.*, 2016).

1.4.3. InhA.

Además del importante papel de KatG en la resistencia a INH, mutaciones en *inhA* confieren baja resistencia a INH (>10%) en *M. tuberculosis*.

Los datos moleculares de aislados clínicos sugieren que la estrategia genética más común en *M. tuberculosis*, además de las mutaciones en el sitio de unión al aducto, es la sobreproducción de InhA que se da por la adquisición de mutaciones puntuales en su región promotora, especialmente C(-15)T, T(-8)G/A, A(-16)G, que conducen a la sobre-expresión de la proteína, generando resistencia a niveles bajos de INH comúnmente (Unissa *et al.*, 2016).

1.4.4. OxyR-AhpC.

En *M. tuberculosis*, el gen *oxyR*, que codifica a una proteína reguladora positivamente de la expresión de genes asociados con estrés oxidativo, es inactivo porque presenta múltiples mutaciones, inserciones y deleciones. Al estar inactivo no permite la expresión del gen *ahpC*, cuyo producto, la enzima AhpC (alquil hidroperoxidasa) que lleva a cabo la reducción de peróxidos, pero no la activación de INH (Unissa *et al.*, 2016).

Por esto se ha propuesto que mutaciones en la región de *oxyR* que activen la expresión de la AhpC podrían compensar la pérdida de la KatG y por lo tanto generar resistencia. Esto a pesar de ser posible no se ha aceptado ampliamente (Unissa *et al.*, 2016).

1.4.5. NADH-deshidrogenasa.

El gen *ndh*, que codifica la NADH-deshidrogenasa de la cadena respiratoria juega un papel importante en la resistencia a INH en *M. smegmatis*. Esto se debe a que las mutaciones en *ndh* que disminuyen la velocidad de oxidación de NADH e incrementan el radio intracelular de NADH/NAD⁺, generando una mayor cantidad de NADH. Esto puede prevenir la formación del aducto INH-NAD o evitar la unión del aducto a InhA. Se ha encontrado que la sustitución R268H es la más común, está presente en siete de cada ocho aislados resistentes (87.5%) que tienen mutaciones en este gen (Unissa *et al.*, 2016).

1.4.6. Mecanismo de resistencia a INH asociada a genes humanos.

A diferencia de los mecanismos complejos de resistencia a INH en *M. tuberculosis*, la resistencia a INH asociada a genes del huésped parece ser más simple. Los que poseen el alelo NAT2*4 son acetiladores rápidos, estos puede generar resistencia ya que bajan la concentración de INH disponible en los pulmones y otros tejidos afectados. Esto genera baja exposición de *M. tuberculosis* al fármaco lo que puede dar como resultado la resistencia. Por lo anterior los acetiladores rápidos pueden no responder a un tratamiento con INH eficazmente (Unissa *et al.*, 2016).

2. ANTECEDENTES.

2.1. Secuenciación de genes que generan resistencia a INH.

En México, el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) tiene como objetivo la investigación de aplicaciones genómicas para mejorar la atención de la salud en el país, estudiando los genes que intervienen en el metabolismo de fármacos mediante métodos bioinformáticos. La emergencia mundial de TB-DR, es un ejemplo para demostrar cómo las herramientas de la medicina personalizada podrían incrementar el control, prevención, individualización y diagnóstico oportuno de las enfermedades infecciosas, según las características genéticas del paciente y del agente infeccioso.

Es por ello que el INMEGEN busca, por un lado, identificar la presencia de mutaciones en el genoma de pacientes mexicanos que informen sobre la posible susceptibilidad, sensibilidad o toxicidad a medicamentos contra la TB; y por el otro lado, investigar las características genéticas de *M. tuberculosis* que le confieren fármaco-resistencia (Soberón, 2014).

Recientemente, se identificó la presencia de mutaciones en muestras clínicas provenientes de pacientes mexicanos con TB-DR (muestras de expectoración); y en cepas de *M. tuberculosis* cultivadas en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), haciendo uso de Secuenciación de Nueva Generación. En este análisis, además de identificar mutaciones ya conocidas, se encontraron nuevas, que no han sido reportadas y que podrían estar contribuyendo al desarrollo de resistencia a fármacos en México.

Dentro de este estudio se obtuvieron algunas mutaciones en el gen *katG*, no caracterizadas, las cuales serán objeto de estudio (**Tabla 2**) para determinar una correlación entre la respuesta a INH en los pacientes y el cambio en la secuencia de la proteína. El efecto de los cambios fueron predichos como deletéreos por métodos bioinformáticos. Para corroborar estas predicciones es necesario la caracterización de las proteínas codificadas por el gen *katG* mutado. El estudio de estas proteínas permitirá saber cómo estos cambios afectan su estructura, sitio activo, y actividad (Lahti *et al.*, 2012; Soberón, 2014).

Identificador	Sexo	Ocupación	Tipo de Resistencia	Mutaciones que confieren resistencia a INH		Otra Enfermedad
				KatG	Adicional	
282/12	M	Cocina	PDR (INH y PZA)	S315T	No	Diabetes
16	H	Campeño	MDR (INH, RIF)	A256T	<i>inhA</i> (-15 C>T)	No
28	H	Vendedor en mercado	MDR (INH, RIF, PZA)	E287K	<i>furA</i> (444 C>A)	Diabetes
5763/10	H	Estilista	MDR (INH, RIF)	L333V	No	Diabetes y VIH
42	-	-	Resistente a INH	A556S	-	-

Tabla 2. Mutaciones encontradas en muestras analizadas por INMEGEN e INER (datos no publicados).

2.2. Caracterización de la KatG.

Los intentos por purificar KatG para estudios detallados se vieron obstaculizadas por el lento crecimiento de *M. tuberculosis* y su naturaleza patógena. La expresión heteróloga de proteínas en *E. coli* ofrece varias ventajas. En el caso de KatG, se expresa en cantidades adecuadas para su estudio y elimina la necesidad de utilizar preparaciones virulentas. Existen muchos estudios de la expresión de KatG de *M. tuberculosis* en *E. coli*; y reportes de algunas de las propiedades catalíticas de la enzima. Por ejemplo se ha demostrado que es una catalasa eficiente, con una k_{cat}/K_m de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Sin embargo, es importante mencionar que KatG no tiene un comportamiento típico Michaelis-Menten (falta de un complejo enzima-sustrato detectable), por lo que las constantes cinéticas reportadas son valores aparentes (Ghiladi *et al.*, 2005; Johnsson *et al.*, 1997).

Sólo unos pocos reportes han estudiado la relación entre la resistencia a INH con la actividad de catalasa y peroxidasa. Estos han concluido que no existe una correlación directa de una pérdida o ganancia de actividad de catalasa o peroxidasa (las dos funciones enzimáticas inherentes de KatG) con la resistencia a INH (Brossier *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2003).

Recientemente, se reportó que la generación del aducto INH-NAD se puede monitorear espectrofotométricamente, ya que tiene una absorbancia característica a una longitud de onda de 326 nm, en mezclas de reacción que contengan KatG, el fármaco y el cofactor. En este estudio se midieron las tasas de generación del aducto INH-NAD con altas y bajas concentraciones de INH para KatG-WT y S315T. La tasa de formación del aducto INH-NAD es aproximadamente 20 veces mayor en KatG-WT que la de la variante. La baja actividad de la variante S315T se debe a una baja afinidad, la actividad se recupera al aumentar la concentración de INH. Se requiere concentraciones de INH cientos de veces más altas que las que la WT para producir el aducto INH-NAD a tasas apreciables (Zhao *et al.*, 2006).

En un estudio más reciente, se identificaron 16 variantes nuevas además de la S315T a partir de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Las actividades enzimáticas de KatG (catalasa, peroxidasa, producción de radicales libres y formación de INH-NAD) se

determinaron para todas las variantes y se correlacionaron con su ubicación espacial en la estructura. Las variantes asociadas generalmente con un nivel más alto de resistencia a INH fueron caracterizadas por una reducción drástica de la actividad catalasa y una disminución marcada de las actividades de activación INH. Además se observó que la actividad de las proteínas KatG-WT y la variante S315T no ve afectada al agregarles una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino, lo cual es importante ya que así es posible purificarlas rápidamente (Brossier *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN.

En este trabajo se plantea caracterizar variantes nuevas de la enzima KatG encontradas por el INMEGEN en aislados clínicos de pacientes mexicanos resistentes a INH. Hasta ahora, y a pesar de que se conoce la estructura tridimensional de la enzima KatG, no es aún posible predecir con certeza el efecto que ocasiona un cambio de aminoácido sobre la resistencia a INH. Una mayor comprensión de la interacción entre el cambio y las consecuencias sobre el mecanismo de la activación del INH ayudará a poder hacer estas predicciones exactas, con el consecuente impacto en la toma de decisiones clínicas. Además, la información que se obtenga ayudará a entender el mecanismo de activación de INH por KatG y ayudará a comprender cómo opera esta enzima.

4. HIPÓTESIS.

Las variantes de KatG seleccionadas tendrán diferentes parámetros catalíticos a los de la WT, los cuales se asociarán con la resistencia a INH que presentan.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

Validar experimentalmente la alteración en la función de variantes de la proteína KatG asociadas a resistencia a INH en pacientes mexicanos.

5.2. Objetivos específicos.

- ✚ Seleccionar algunas mutaciones en *katG* que generen resistencia a INH, para su caracterización experimental.
- ✚ Construir por mutagénesis sitio dirigida las variantes seleccionadas de KatG resistentes a INH.
- ✚ Sobre-expresar en *E. coli* y purificar por columna de afinidad las proteínas silvestre y variantes seleccionadas.
- ✚ Caracterizar la actividad de catalasa, peroxidasa, la producción de radicales libres y la formación del aducto INH-NAD de las variantes seleccionadas.
- ✚ Analizar *in silico* la estructura de KatG para tratar de explicar, a nivel molecular, cómo afectan la función los cambios.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Variantes seleccionadas.

Para este estudio, se utilizaron 4 polimorfismos de nucleótido simple (SNP), es decir cambios de un solo nucleótido que generan un cambio de aminoácido en KatG. Estas fueron identificadas por el INMEGEN utilizando Secuenciación de Nueva Generación a partir de aislados clínicos fármaco-resistentes. Los cambios seleccionados son nuevos y específicos de la población mexicana. Estos mostraron ser deletéreos a la función o estructura de la proteína de acuerdo a predicciones bioinformáticas. Se incluyeron 2 controles, KatG-WT como control sensible y la variante S315T, la cual ya ha sido reportada, como control resistente. Algunas de las muestras presentaron otras mutaciones que pudieran estar involucradas en la resistencia a INH (**Tabla 3**).

Identificador	Mutación a estudiar		Mutación adicional	Resistencia a INH
	Gen <i>katG</i>	Codón de KatG		
-	WT	WT	-	Sensible
282/12	994 G>C	S315T	No	Resistente
16	776 G>A	A256T	<i>inhA</i> (-15 C>T)	Resistente
28	1221 G>T	E287K	<i>furA</i> (444 C>A)	Resistente
5763/10	997 C>G	L333V	No	Resistente
42	1666 G>T	A556S	-	Resistente

Tabla 3. Variantes usadas para este estudio, reportadas por el INMEGEN.

6.2. Amplificación y secuenciación Sanger de *katG* de aislados clínicos.

El INMEGEN proporcionó muestras de ADN de *M. tuberculosis* purificado de esputo o de cultivo. Este material se usó para comprobar que la mutación detectada por Secuenciación de Nueva Generación en el gen *katG* estaba presente, dado que la certeza de la presencia de las mutaciones es crítica para este estudio.

Para amplificar el gen *katG* se utilizaron los oligonucleótidos KatG-5' y KatG-3' de la **Tabla 4**, diseñados en base a la secuencia del gen reportado en la literatura; estos se mandaron a sintetizar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología/UNAM. Cuando no fue posible amplificar todo el gen, se utilizaron los oligonucleótidos KatG-5 y KatG-6 en combinación con los anteriores para amplificar solo una parte del gen (aproximadamente el 50% del gen *katG* donde la mutación se encuentra al centro del producto amplificado).

Oligonucleótido	Secuencia
KatG-5'	5' GAAACAGAATTCATATGCCCGAGCAACACCCA 3'
KatG-3'	5' AACAGAAGCTTCAGCGCACGTCTGAACC 3'
KatG-5	5' AACGACGTCTGAAACAGCGG 3'
KatG-6	5' GCGAACTCGTCGGCCAATTC 3'

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para amplificar el gen *katG*.

La Secuenciación Sanger se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología/UNAM.

6.3. Construcción de los plásmidos de expresión.

La muestra 282/12 se utilizó como molde para amplificar por PCR la región codificante del gen *katG* que corresponde a la variante KatG-S315T; con los oligonucleótidos KatG-5', que incorpora un sitio de restricción EcoRI y cambia el codón de inicio GTG (traducido como Val) de la micobacteria a ATG (Met), y KatG-3' que introduce un sitio de restricción HindIII después del codón de terminación TGA. Se utilizó la polimerasa PFU, para generar un fragmento de 2223 pb que codifica la variante KatG-S315T. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII (Tabla 5). La digestión se ligó en los sitios EcoRI y HindIII del vector de expresión pKK223-3 para producir el plásmido pKK-KatG-S315T (Figura 9).

ENZIMA	SITIO DE CORTE
HindIII	5'...A↓AGCTT...3' 3'...TTCGA↓A...5'
EcoRI	5'...G↓AATC...3' 3'...CTTAA↓G...5'

Tabla 5. Enzimas de restricción utilizadas para digerir el plásmido pKK-KatG y los productos de PCR.

La cepa MC1061 $\Delta bioH/pREP4$ de *E. coli* se transformó con el producto de la ligación. Las células transformadas fueron crecidas en placas de agar Lysogenic Broth (LB) con 200 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Se purificó el plásmido (kit Roche) de algunas colonias transformadas para corroborar por patrón de restricción la presencia del gen *katG*.

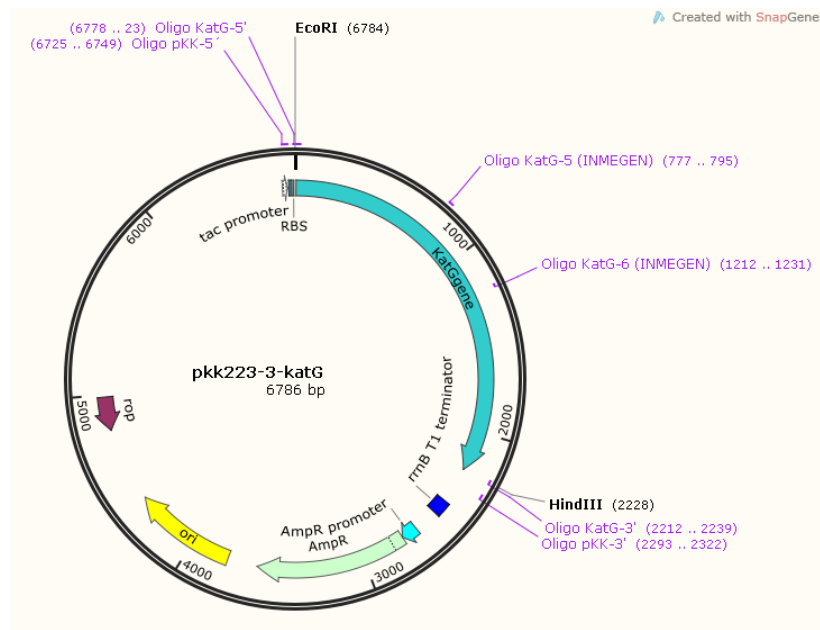


Figura 9. Plásmido pKK223-3-KatG usado para la expresión del gen *katG* de *M. tuberculosis* en *E. coli*.

El ADN se mandó a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN para corroborar que la secuencia era la correcta. Para secuenciar se utilizaron los oligonucleótidos universales PKK-5' y PKK-3' (Tabla 6).

El plásmido PKK-KatG-S315T se usó como molde en la amplificación del gen *katG*-WT en una PCR usando un megaprimer que incorpora en la posición 944 el nucleótido silvestre (Tabla 6).

Oligonucleótido	Secuencia
PKK-5'	5' ATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGA 3'
PKK-3'	5' CGCCAGGCAAATTCTGTTTTATCAGACCGC 3'
Mut-S315TaWT	5' TAAGGACGCGATCACCAG <u>C</u> GGCATCGAGGTCGTAT 3'

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para secuenciar la variante y para la construcción del gen silvestre.

6.3.1. Mutagénesis sitio dirigida para la construcción de las variantes.

Las 4 variantes restantes: A256T, E287K, L333V y A556S se obtuvieron por mutagénesis sitio dirigida usando el plásmido PKK-KatG-WT como molde para incorporar las mutaciones por el método de megaprimer, usando los oligonucleótidos listados en la Tabla 7; el cambio está remarcado en negritas y subrayado.

Oligonucleótido	Secuencia
Mut-A256T	5' TTCGGCGCATG <u>A</u> CCATGAACGACGTCGAA 3'
Mut-G287S	5' GGAGCAGCCTCGGGTT <u>T</u> GGGGCCGACCAGATCG 3'
Mut-L333V	5' AGCCGTACAGGATCTCGAC <u>G</u> AAACTGTTGTCCCATTTTC 3'
Mut-A556S	5' GCCGCCATAGAGAAAGCA <u>T</u> CAAAGGCGGCTGGCCA 3'
KatG-5'H6	5' GAAACAGAATTCATATG <u>CACCATCACCATCACCAT</u> CCCGAGCAACACCCA 3'

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para construir el gen *katG* con las mutaciones seleccionadas previamente, los nucleótidos cambiados se encuentran resaltados en negritas.

Con el fin de facilitar la purificación, se produjeron derivados de las variantes construidas con una etiqueta de 6 histidinas en el N-terminal de la proteína. A todas las variantes se les incorporó la secuencia resaltada con el oligonucleótido KatG-5'H6 de la Tabla 7 la cual introduce los 6 codones de las histidinas.

6.4. Expresión de variantes de KatG en *E. coli*.

Los plásmidos etiquetados con 6 histidinas fueron introducidos por electroporación en células de *E. coli* MC1061 Δ bioH/pREP4, las células transformadas fueron cultivadas

en placas de LB con 200 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de kanamicina y crecidas durante toda la noche a 30 °C. Se prepararon pre-inóculos (3 mL de LB con 200 µg/mL ampicilina y 50 µg/mL kanamicina) con una única colonia y se incubaron toda la noche a 30 °C. Cada pre-inóculo se utilizó para inocular 100 mL (1:100) de medio mínimo M9 que contenía 200 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de kanamicina. La adición al medio de 30 mg/L de cloruro de hemina (de sangre bovina), disuelta en 0.2N NaOH, asegura la incorporación estequiométrica del cofactor hemo durante la sobre-expresión en *E. coli* (Cade *et al.*, 2010). La expresión se indujo con isopropil β-D-1- tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM, cuando los cultivos tenían una DO_{600nm} de 0.6 y se dejaron creciendo 3 horas adicionales. Las células se colectaron por centrifugación, se resuspendieron en buffer 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7.5) y se lisan por sonicación. Los restos celulares se sedimentaron a 10,000 rpm durante 20 min, resultando en un extracto crudo de color marrón cuando se adiciona cloruro de hemina e incoloro cuando no se agregó.

6.5. Purificación de las proteínas.

Los extractos crudos se utilizaron para purificar cada una de las 6 variantes, haciendo pasar el extracto por una columna con resina Ni-NTA (una para cada variante para evitar contaminación) y siguiendo las instrucciones de purificación del fabricante.

6.6. Análisis de las proteínas puras.

6.6.1. Concentración de proteína.

La concentración de las proteínas se determinó mediante el método de Bradford y la concentración del grupo hemo por absorbancia a 407 nm utilizando el siguiente coeficiente de extinción $\epsilon_{407nm} = 100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.6.2. Ensayos enzimáticos.

La caracterización catalítica se realizó por medición espectrofotométrica de las actividades enzimáticas en un espectrofotómetro UV-visible Beckman Coulter DU 730. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.6.2.1. Actividad de catalasa.

La actividad de catalasa se determinó espectrofotométricamente mediante la disminución en la concentración de H₂O₂ a 240 nm ($\epsilon_{240\text{nm}} = 0.0435 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía buffer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7.5) 50 mM, H₂O₂ (25 mM) y KatG 30 nM. La actividad específica de catalasa correspondió al consumo de 1 mmol de H₂O₂/min/mg de proteína. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de KatG a la mezcla de reacción (Brossier *et al.*, 2016). Para calcular los parámetros catalíticos se varió la concentración del H₂O₂ de 0.5 mM hasta 25 mM.

6.6.2.2. Actividad de peroxidasa.

La actividad de peroxidasa se determinó espectrofotométricamente mediante la medición de la velocidad de oxidación de 0.1 mM de O-dianisidina a 460 nm ($\epsilon_{460\text{nm}} = 11.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en presencia de hidroperóxido de terbutilo (tBHP) 23 mM, buffer de acetato de sodio 50mM (pH 5.5) y KatG 100 nM. La actividad específica de la peroxidasa se definió como la oxidación de 1 mmol O-dianisidina/min/mg de proteína (Brossier *et al.*, 2016). Para calcular los parámetros catalíticos se varió la concentración de O-dianisidina de 12 μM a 100 μM .

6.6.2.3. Producción de radicales libres.

La producción de radicales libres se detectó espectrofotométricamente siguiendo la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT), dependiente de INH, a 560 nm a la forma mono- y di-formazan ($\epsilon_{560\text{nm}} = 15,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para monoformazan). La mezcla de reacción consistió en NBT 0.2 mM, buffer Tris HCl 50 mM (pH 8.5), que contiene INH (7.5 mM) y la enzima (70 nM y hasta 200 nM para las proteínas con baja actividad). La reacción se inició por la adición de H₂O₂ (500 μM). La actividad específica de producción de radicales libres se definió como 1 nmol de NBT reducido a monoformazan/min/nmol de hemo (Brossier *et al.*, 2016). Para calcular los parámetros catalíticos se varió la concentración de INH de 0.5 mM a 7.5 mM.

6.6.2.4. Formación del aducto INH-NAD.

La tasa de formación del aducto INH-NAD se determinó espectrofotométricamente a 326 nm utilizando el coeficiente de extinción ($\epsilon_{326\text{nm}} = 6,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La reacción se

llevó a cabo en buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM (pH 7.5), utilizando KatG (1 μM), NAD^+ (240 μM), INH (200 μM) en presencia de un flujo constante de H_2O_2 generado por un sistema de glucosa/glucosa oxidasa (G/Gox), con concentraciones de 16.7 mM y 66.6 mU/mL respectivamente (Wei *et al.*, 2003). La celda de referencia contenía todos los componentes excepto NAD^+ para corregir la actividad de fondo, tal como se describió anteriormente (Brossier *et al.*, 2016). La generación del aducto fue iniciada por la adición de INH. La actividad específica de formación de INH-NAD se definió como la producción de 1 nmol de INH-NAD/min/nmol de hemo. Para calcular los parámetros catalíticos se varió la concentración de INH de 6 μM a 200 μM .

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Análisis estructural y de secuencia de las variantes.

Se pueden distinguir tres dominios en KatG (**Figura 10**): el primer dominio es pequeño (1-54 aminoácidos), contiene una cisteína conservada (Cys 20 en *M. tuberculosis*). Los primeros 23 residuos del dominio no se observan en la estructura dada su alta flexibilidad conformacional (Bertrand *et al.*, 2004). Esta fue una de las razones por lo que la etiqueta de histidinas se puso en el N-terminal. Enseguida se encuentra el dominio catalítico (residuos 55 - 423) que lleva la región de unión al grupo hemo y, finalmente, el dominio C-terminal (residuos 424-740), cuya función no está bien definida.

Muchas cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH presentan cambios puntuales en el dominio catalítico de KatG. Varios cambios asociados con niveles de resistencia altas mapean en esta región. Esto podría deberse a que pueden afectar el sitio activo y así a los procesos de activación del INH por el grupo hemo (es decir, la oxidación a los compuestos I, II, o III). Los cambios que mapean en el dominio C-terminal están asociados con una baja resistencia o no tienen efecto (Saint-Joanis *et al.*, 1999). Sin embargo, para entender los mecanismos moleculares de la resistencia a INH de manera más profunda es necesario más estudios que describan mutaciones puntuales en todos los dominios de KatG (Cade *et al.*, 2010).

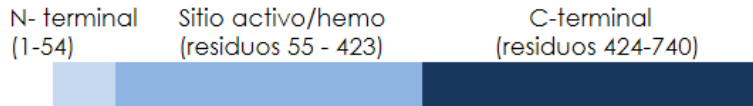


Figura 10. Representación esquemática de la estructura de KatG de *M. tuberculosis*, se muestran los 3 dominios que la componen.

Por lo anterior, nosotros seleccionamos variantes en diversas zonas de la proteína, buscando identificar zonas importantes dentro de la estructura que estén involucradas en la resistencia a INH (**Figura 11**). Además usamos un criterio de conservación basado en un alineamiento múltiple de KatGs. La variante S315T fue incluida como un control resistente en este estudio. En el dominio catalítico se seleccionaron 3 variantes: A256T, que corresponde a una alanina conservada (83%) y en ningún caso se encuentra una treonina en esa posición; E287K, que es una posición que no tiene un aminoácido conservado, pero donde el residuo de lisina no está presente en ningún miembro del alineamiento; y L333V, que tampoco es una posición conservada, pero el residuo de valina no está presente en ningún miembro del alineamiento. Para el dominio C-terminal solo seleccionamos el cambio A556S, por ser una posición altamente conservada en la familia (93%).

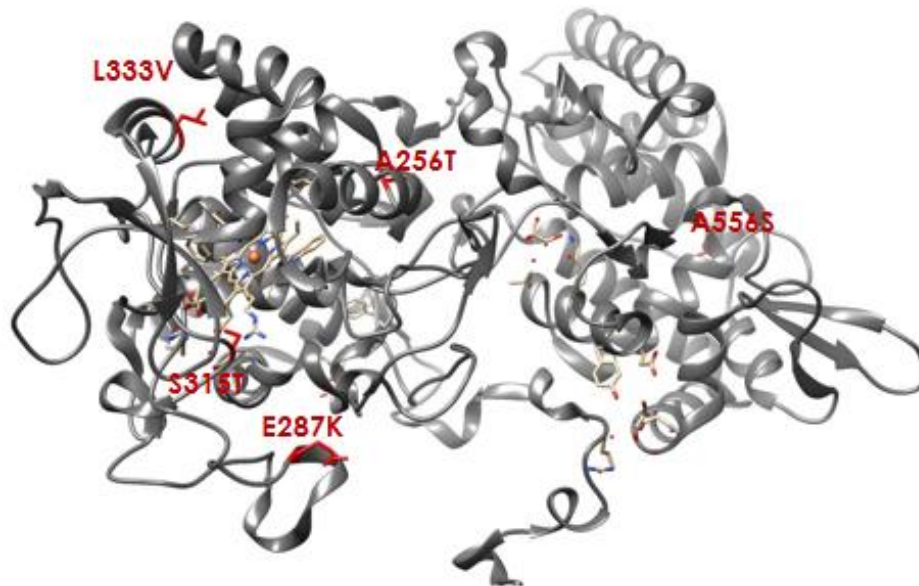


Figura 11. Localización de las variantes caracterizadas en este estudio en la estructura de KatG.

Se calcularon las distancias de cada mutación con respecto al grupo hemo para determinar si podría verse afectado por el cambio, el resultado presentado es el promedio de 3 mediciones para 3 carbonos de cada variante (**Tabla 8**). El cambio

S315T es el más cercano al grupo hemo, como ya se ha reportado, y afecta el canal de acceso del sustrato al grupo hemo. Las demás variantes utilizadas no estaban tan cerca del grupo hemo en comparación con la S315T. Sin embargo, la variante L333V podría afectar el enlace de la H270 con el grupo hemo porque aunque no están relativamente cerca (alrededor de 9 Å) y el cambio de leucina a valina no representa un cambio drástico en términos de las propiedades fisicoquímicas de la cadena lateral hay interacciones hidrofóbicas cercanas de las hélices que podría afectar la unión, estabilidad o bien cambiar el ambiente del grupo hemo (**Figura 12**).

Mutación	Conservada	Localización	Status
WT	-	-	Control sensible
S315T	98%	Sitio activo Canal de acceso al sustrato: 9.474 Å del hemo	Control resistente (Caracterizada)
A256T	83%	Sitio activo (Cavidad proximal) 17.738 Å del hemo	Reportada (Torres <i>et al.</i> 2015)
G287L	No (no se encontró L en la posición)	Cavidad proximal 20.568 Å del hemo	Nueva
L333V	No (No se encontró V en la posición)	Sitio activo (Cavidad distal) 14.745 Å del hemo	Reportada (Juárez <i>et al.</i> 2016)
A556S	93%	Dominio C-terminal (56.732 Å del hemo)	Nueva

Tabla 8. Características de las variantes seleccionadas para este estudio.

Las secuencias de las variantes A256T y L333V se reportaron por otro grupo durante el curso de este estudio, pero no fueron caracterizadas enzimáticamente, por lo que siguieron siendo de nuestro interés.

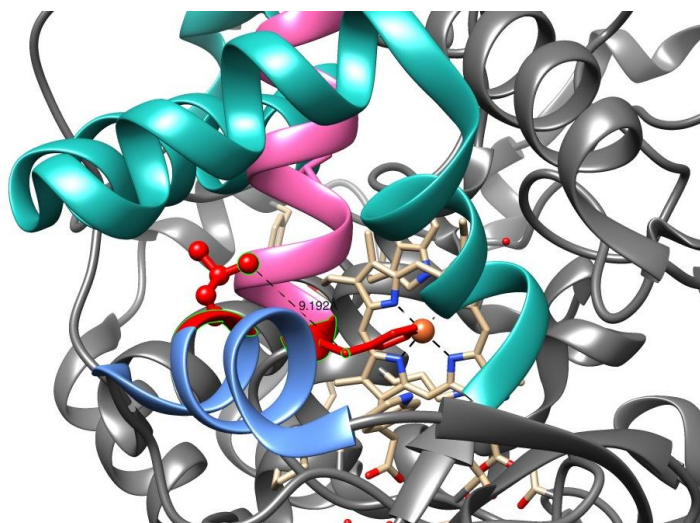


Figura 12. Distancia del cambio L333V con respecto a la H270, resaltados en rojo.

La variante L333V fue recientemente reportada en un estudio realizado en México (Juarez-Eusebio *et al.*, 2016), lo que le da una mayor importancia porque la mutación podría ser exclusiva de la población mexicana, ya que no se ha reportado en otro lugar. Sin embargo, se reportó una frecuencia baja en aislados de cepas resistentes a INH.

Aunque las mutaciones fueron seleccionadas para proporcionar una correlación directa entre el cambio y el fenotipo de resistencia a INH, es importante tener en cuenta que en algunas muestras existían otras mutaciones en el organismo que han sido relacionadas con resistencia y por lo tanto afectar el resultado.

7.1.1. Secuenciación Sanger de los aislados.

El análisis de la secuencia por el método Sanger de las variantes confirmó la sustitución del nucleótido reportado por el INMEGEN, así como la ausencia de otras mutaciones en el gen, usando como molde la secuencia reportada en el GenBank (GBM21516). Es importante mencionar que no en todos los casos fue posible secuenciar la variante de las muestras de ADN de los aislados clínicos (Tabla 9).

Mutación	Cambio de nucleótido	Secuencia
S315T	G994C	<pre> 930 940 950 960 970 KatG-WT KatG-5' GGCACCCGGAACCGGTAAGGACCGCATCACCGCCGCATCGAGTTCGTATG KatG-3' </pre>
A256T	G776A	<pre> 760 770 780 790 800 KatG-WT KatG-5' ACGTTTCGGCGCATGGCCATGAACGACGTCGAAACAGCGCGCTGATCGT KatG-6 </pre>
E287K	-	Muestra no proporcionada
L333V	C997G	<pre> 970 980 990 1000 1010 1020 KatG-WT TGGACGAACACCCCGACGAAATGGGACACAGTTCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAG KatG-5' KatG-6 </pre>
A556S	-	*

Tabla 9. Secuenciación Sanger de un fragmento del gen *katG* resaltando el cambio reportado por Secuenciación de Nueva Generación. *El ADN del aislado clínico no pudo ser amplificado.

Las muestras de las variantes A556S y E287K no pudieron ser comprobadas, ya que en la primera no se pudo amplificar la región del gen y en la segunda el ADN estaba degradado. Sin embargo, estas variantes se construyeron por mutagénesis sitio dirigida.

7.1.2. Alineamientos de la secuencia de las proteínas construidas.

A continuación se muestra el alineamiento de la secuencia de ADN y aminoácidos obtenidas de las 6 variantes construidas por mutagénesis sitio dirigida, solo se muestra las zonas donde está el cambio y la adición de los 6 codones que codifican las histidinas (Tabla 10).

Variante	Codones de histidinas	Codón 256 /nucleótido 784	Codón 287 /nucleótido 877	Codón 315 /nucleótido 962	Codón 333 /nucleótido 1015	Codón 556 /nucleótido 1684
WT	CACCATCACCATCACCAT H H H H H H	GCC A	GAA E	AGC S	CTC L	GCA A
S315T	CACCATCACCATCACCAT H H H H H H	-	-	ACC T	-	-
A256T	CACCATCACCATCACCAT H H H H H H	ACC T	-	-	-	-
E287K	CACCATCACCATCACCAT H H H H H H	-	AAA K	-	-	-
L333V	CACCATCACCATCACCAT H H H H H H	-	-	-	GTC V	-
A556S	CACCATCACCATCACCAT H H H H H H	-	-	-	-	TCA S

Tabla 10. Secuencias de las variantes caracterizadas. Solo se muestran los codones cambiados y la secuencia que introduce la etiqueta de 6 histidinas en el extremo 5'.

7.2. Purificación y cuantificación de las proteínas.

7.2.1. Producción y purificación de las variantes.

Los plásmidos construidos (pKK-KatG) permitieron expresar las proteínas recombinantes en una cepa de *E. coli* obteniéndose niveles elevados de expresión, incluso sin la inducción con IPTG (datos no mostrados). Se purificaron las 6 proteínas con etiqueta His6 (KatG WT y las variantes S315T, A256T, E287L, L333V, A556S).

Inicialmente las variantes de la proteína KatG se purificaron a partir de los extractos crudos de cultivos crecidos en medio M9 sin la adición de cloruro de hemina; las soluciones con las proteínas purificadas eran incoloras y su análisis en SDS-PAGE mostraban una banda ~80 KDa (Figura 13).

El análisis de estas proteínas purificadas mostró que una fracción importante de ellas eran deficientes de grupo hemo (ver más adelante cómo se calcula este valor). Aparentemente la sobre-expresión de las proteínas recombinantes excede la capacidad de biosíntesis del grupo hemo de las bacterias que expresan las variantes, como ha sido observado en otros trabajos (Chouchane *et al.*, 2000).

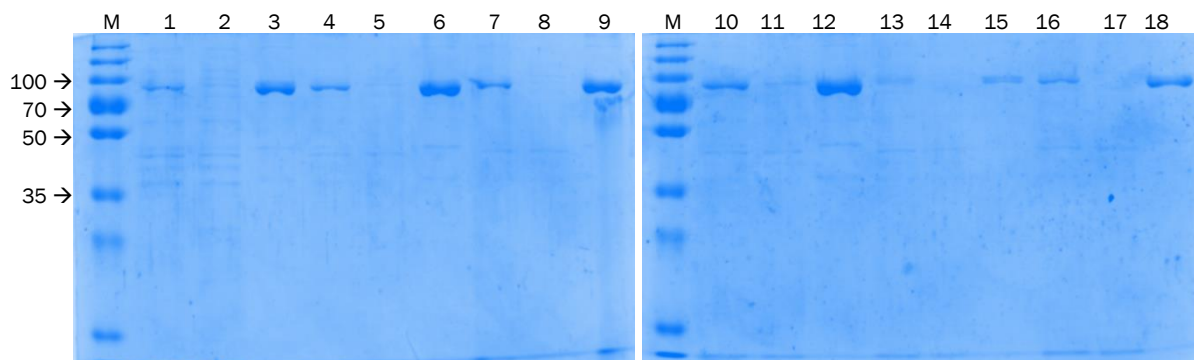


Figura 13. Purificación de proteínas KatG en columna de afinidad sin la adición de cloruro de hemina. Carril M: marcador de peso molecular; el carril 1: KatG WT fracción soluble; carril 2: KatG WT lavado de columna; carril 3: KatG WT elución, proteína pura; carril 4: KatG S315T parte soluble; carril 5: KatG S315T lavado de columna; carril 6: KatG S315T elución, proteína pura; carril 7: KatG A256T parte soluble; carril 8: KatG A256T lavado de columna; carril 9: KatG A256T elución, proteína pura; el carril 10: KatG E287K fracción soluble; carril 11: KatG E287K lavado de columna; carril 12: KatG E287K elución, proteína pura; el carril 13: KatG L333V fracción soluble; carril 14: KatG L333V lavado de columna; carril 15: KatG L333V elución, proteína pura; el carril 16: KatG A556S fracción soluble; carril 17: KatG A556S lavado de columna; carril 18: KatG A556S elución, proteína pura. SDS-PAGE al 10%.

Por lo anterior se adicionó cloruro de hemina para asegura la incorporación del grupo hemo durante la sobre-expresión en *E. coli*. Esto generó mejores rendimientos de proteína con grupo hemo de acuerdo a la relación de pureza óptica (**Tabla 11**). Además también se observó una mayor cantidad de proteína pura en comparación a cuando no se agregó el cloruro de hemina (resultados observados en SDS-PAGE y Bradford). Lo anterior podría indicar que la proteína es más estable cuando presenta el grupo hemo (**Figura 14**). La pureza de las proteínas purificadas fue mayor al 90 %.

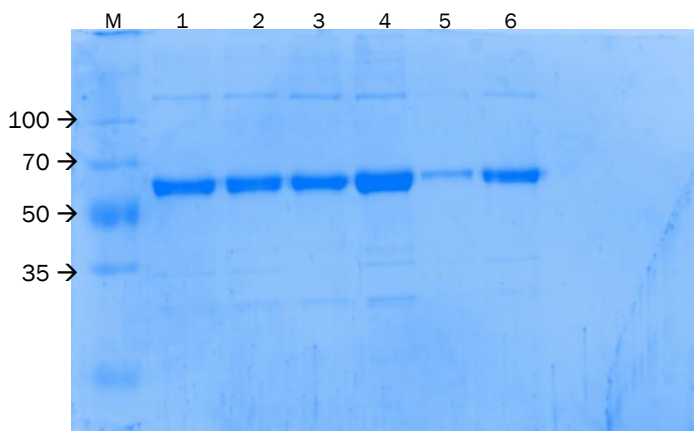


Figura 14. Purificación de las variantes de KatG por columna de afinidad de cultivos con cloruro de hemina. Carril M: marcador de peso molecular; el carril 1: KatG WT; carril 2: KatG S315T; carril 3: KatG A256T; carril 4: KatG E287K; carril 5: KatG L333V; el carril 6: KatG A556S. SDS-PAGE al 8%.

7.2.2. Concentración de las proteínas y grupo hemo.

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford y la concentración de grupos hemo fue determinada por la absorbancia del pico Soret a 407 nm. Para determinar la cantidad de grupos hemo por proteína se tomó en cuenta que KatG es un dímero que contiene un equivalente de 2 grupos hemo por dímero (en la forma de holoenzima). La división de la concentración de grupos hemo entre la concentración de proteína nos dice cuántos grupos hemo hay por mol de proteína.

Las enzimas purificadas en ausencia de cloruro de hemina mostraron menores relaciones A_{407}/A_{280} y un menor rendimiento de proteína en comparación con las enzimas purificadas de cultivos con cloruro de hemina (**Tabla 10**).

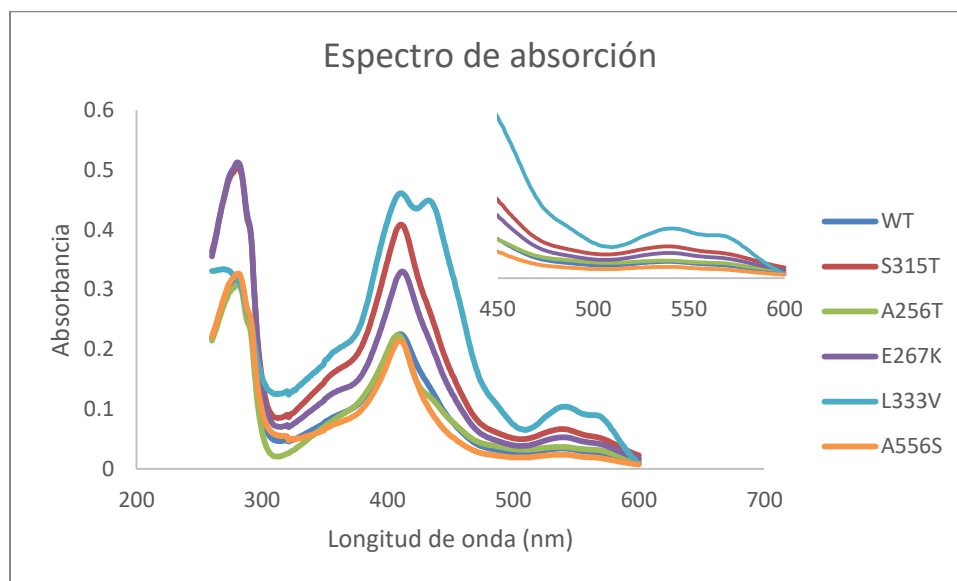
Variante	Sin hemina			Con hemina		
	A_{407}/A_{280}	Relación hemo/dímero	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	A_{407}/A_{280}	Relación hemo/dímero	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
WT	0.137	0.4	0.116	0.862	2	0.227
S315T	0.052	0.2	0.145	0.880	2	0.203
A256T	0.069	0.2	0.133	0.841	2	0.210
E287K	0.076	0.2	0.173	0.769	1.9	0.223
L333V	0.056	0.2	0.030	1.255	3	0.054
A556S	0.105	0.3	0.066	1.013	2	0.180

Tabla 11. Concentración de proteínas puras y relación de pureza óptica.

La relación molar hemo/dímero muestra que las proteínas puras tenían dos grupos hemo por dímero; excepto para la variante L333V donde se observan tres. Se optó por utilizar las proteínas purificadas de cultivos con cloruro de hemina, para los experimentos, los espectros de absorción de las proteínas se muestra en la **Gráfica 4**.

Podemos observar que la variante L333V fue la única que mostró un comportamiento diferente, la absorción en la región Soret (407 nm) es mayor que la absorbancia a 280 nm. Esto indica que tiene 3 grupos hemo por dímero, mayor al teórico que es de 2. También mostró un pico de absorción adicional cercano a 430 nm. El espectro de absorción del cloruro de hemina libre en el buffer de purificación muestra que absorbe a esta longitud de onda (**Anexo 2**). Lo anterior indicaría que la variante L333V libera el grupo hemo o bien que el grupo hemo tiene un ambiente diferente; sin embargo, no

existen reportes de variantes con este pico. Se observó que este pico comienza a aparecer en las otras variantes, incluida la WT, pasado un mes desde la purificación, por eso se piensa que la variante L333V está liberando el grupo hemo, inclusive más rápido que las demás (**Anexo 2**).



Gráfica 4. Espectro de absorción de las variantes purificadas de cultivos con cloruro de hemina.

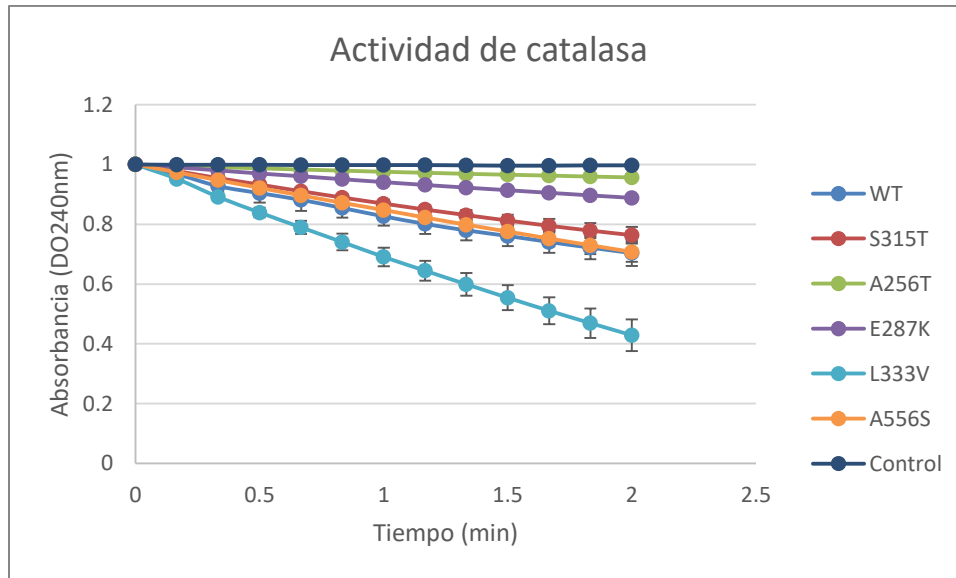
7.3. Ensayos de las actividades enzimáticas.

Se realizaron ensayos bioquímicos para determinar la actividad de catalasa, peroxidasa, la formación de radicales libres y, finalmente, la formación del aducto INH-NAD con un flujo de peróxido de hidrógeno, para cada variante de KatG, y de esta manera poder correlacionar qué actividad se modifica al generarse resistencia.

Antes de estudiar las actividades enzimáticas de las variantes, se normalizó la concentración de la proteína de acuerdo a la cantidad de proteína con grupos hemo (activa) que se utilizaría en los experimentos. Esto es para que la proteína sin grupo hemo (no activa) no afecte los resultados. La caracterización cinética fue medida espectrofotométricamente y todos los ensayos se realizaron por triplicado.

7.3.1. Actividades específicas.

La actividad de catalasa se midió siguiendo la disminución en la concentración de H_2O_2 a pH 7 (**Gráfica 5**), en condiciones de saturación. Para las variantes más activas se observó la formación de burbujas en la celda de reacción.

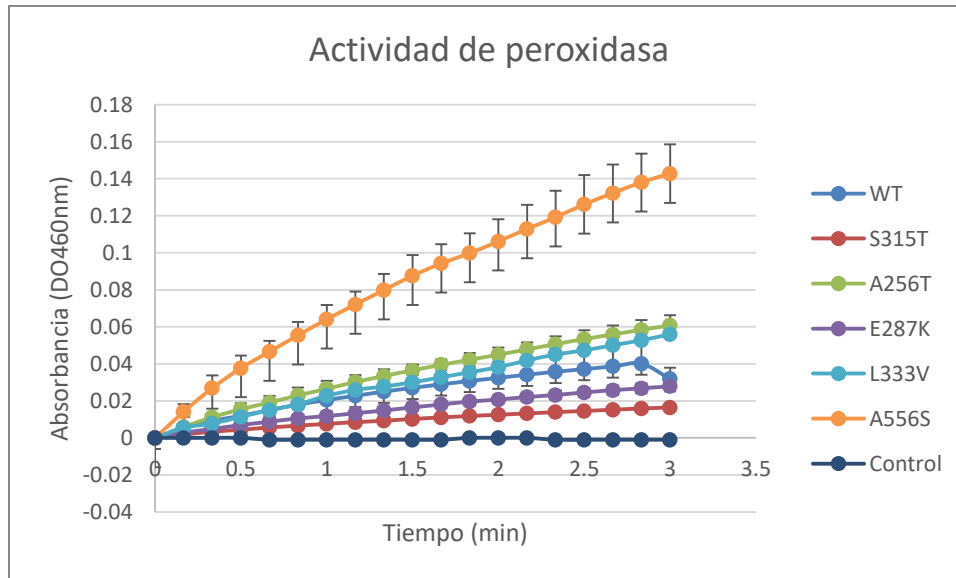


Gráfica 5. Actividad específica de catalasa de las variantes. Solo se muestra la reducción de la absorbancia.

La actividad de catalasa de KatG contribuye a la protección contra el estrés oxidativo ocasionado por H_2O_2 cuando la micobacteria reside en los macrófagos durante la infección. Es por ello que esta actividad es importante ya que tiene una función fisiológica y su disminución puede afectar su sobrevivencia (Zhao *et al.*, 2006).

La actividad específica de catalasa para la variante S315T fue similar a la de la KatG-WT, esto ya se ha reportado; sin embargo, las variantes A256T y E287K muestran actividades menores y la A556S mantiene una actividad parecida a la WT. Solamente la variante L333V aumenta la actividad cerca de un 200%, por lo que quizás para esta variante este aumento en actividad podría estar relacionado con la resistencia.

La actividad de peroxidasa se determinó siguiendo el cambio de absorbancia para el sustrato O-dianisidina (**Gráfica 6**), se observó la aparición de un color anaranjado en las variantes más activas. Los valores de actividad específica de peroxidasa de las variantes se parecían a los de la KatG-WT, solo la variante A556S presenta un aumento en la actividad.

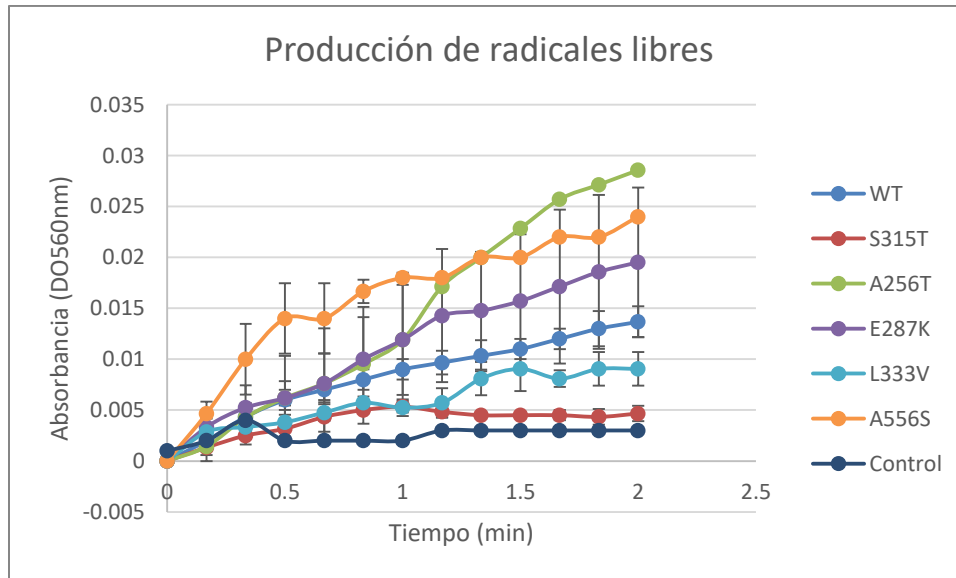


Gráfica 6. Actividad específica de peroxidasa de las variantes. Se muestra el cambio de la absorbancia con respecto al tiempo.

La actividad específica de producción de radicales libres se determinó por la reducción del sustrato NBT (**Gráfica 7**) que genera un cambio de color amarillo a azul en el buffer de reacción, el cual se hace evidente en las variantes más activas.

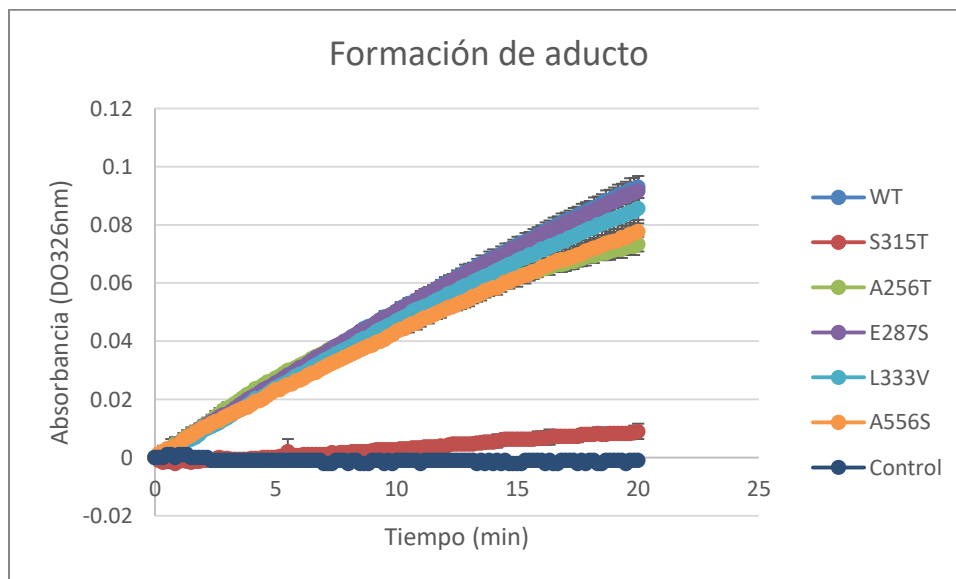
En esta medición se determina la activación de INH por la enzima, indirectamente por la reducción del NBT a formazan (Wei *et al.*, 2003). Sin embargo estudios anteriores (Brossier *et al.*, 2016), reportaron la existencia de absorbancia residual en la celda control, ya que existen diversas formas reducidas del NBT y cuya absorción podría alterar la medición.

Tres variantes tienen aumentada esta actividad: A256T, E287K y A556S. La variante L333V no presenta un aumento notorio de la actividad. La medición de esta actividad está acoplada con la formación de radicales libres de INH, por lo que indica que las variantes producen más fármaco activo, algo difícil de explicar porque no correlaciona con la resistencia fenotípica que presentan las cepas resistentes. Esto podría deberse a que las propiedades catalíticas de las variantes (K_m y k_{cat}) están modificadas y al ser una medición indirecta se genere ruido de fondo alto.



Gráfica 7. Actividad específica de formación de radicales libres de las variantes. Se muestra el cambio de absorbancia con respecto al tiempo.

Finalmente, se comprobó la oxidación de INH mediante un ensayo espectrofotométrico que mide directamente la formación del aducto INH-NAD en presencia de un flujo constante de H_2O_2 (**Gráfica 8**). La formación del aducto en ausencia de KatG fue indetectable con el sistema generador de H_2O_2 (G/Gox).

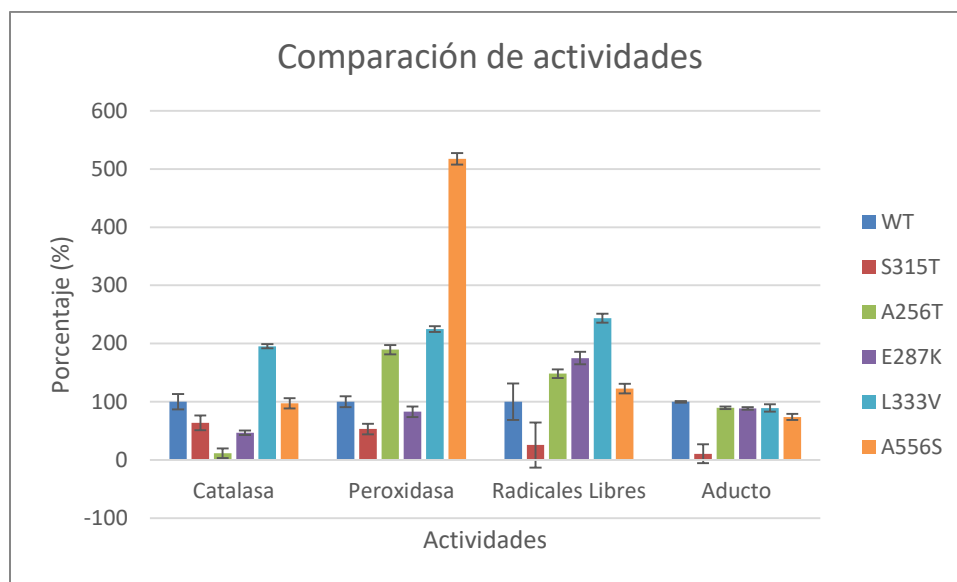


Gráfica 8. Actividad específica de formación del aducto de las variantes. Se muestra el cambio de absorbancia con respecto al tiempo.

La actividad específica de formación del aducto de la KatG WT es siete veces más alta que la de la variante S315T. Estos valores concuerdan con los valores reportados anteriormente (Brossier *et al.*, 2016). Las demás variantes solo disminuyen entre un

10%-30% la formación del aducto. Ninguna de las variantes obtuvo valores semejantes a los de la variante S315T. Las cinco variantes tienen habilidad de producir el aducto a niveles cercanos a los de la KatG-WT (Wei *et al.*, 2003). La resistencia observada en las variantes no se puede explicar con estos resultados. Por ello determinamos los parámetros catalíticos aparentes de las variantes, en un intento por profundizar si existe un efecto o no de las variantes en la resistencia observada.

La **Gráfica 9** muestra una comparación de las cuatro actividades específicas medidas en este estudio, convertidas en porcentaje, asumiendo la actividad de la KatG-WT como 100%. Todos los valores de estas actividades específicas se muestran en la **Tabla 12**, en donde podemos observar que los controles WT y S315T correlacionan con los valores reportados en la literatura (Brossier *et al.*, 2016; Saint-Joanis *et al.*, 1999).



Gráfica 9. Comparación de las cuatro actividades específica de las variantes en porcentaje asumiendo que la WT es el 100% para cada actividad.

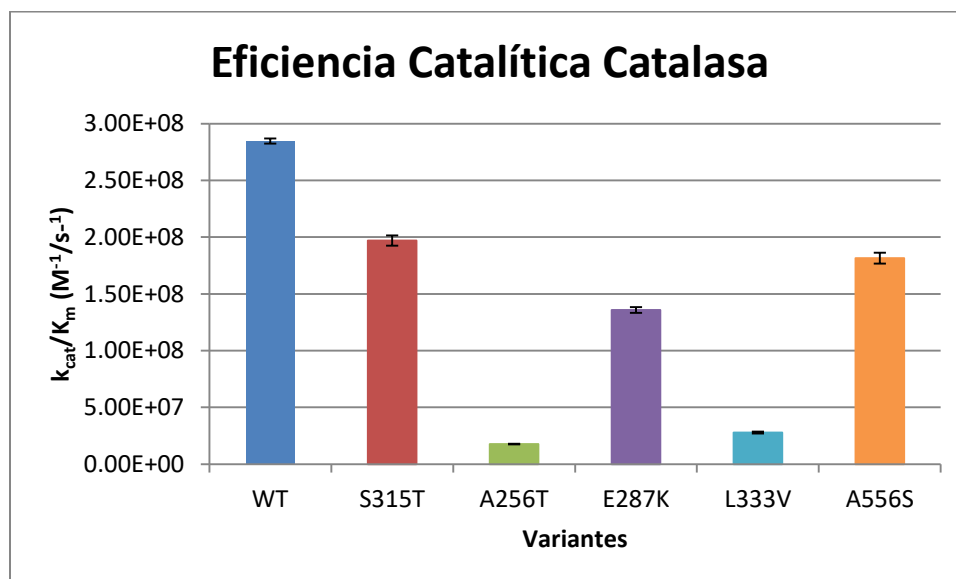
Casi todas las variantes tienen afectada la capacidad para formar el aducto INH-NAD a la vez que retienen actividades significativas de las otras actividades que van desde 50% hasta 500% en el caso de la actividad de la peroxidasa, y del 10 al 200% para la actividad de catalasa (Brossier *et al.*, 2016). La reducción del 10% en la formación del aducto de varias variantes no puede explicar la resistencia.

Variante	Actividad específica			
	Actividad de catalasa ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ /min/mg proteína)	Actividad de peroxidasa (mmol O-dianisidina/min/mg prot)	Producción de radicales libres (nmol monoformazan/min/nmol hemo)	Formación del aducto (nmol INH-NAD/min/nmol hemo)
WT	2326 \pm 306	0.943 \pm 0.089	4.90 \pm 1.52	0.713 \pm 0.01
S315T	1477 \pm 187	0.500 \pm 0.046	1.25 \pm 0.49	0.0801 \pm 0.013
A256T	264 \pm 22	1.79 \pm 0.14	7.26 \pm 0.55	0.679 \pm 0.016
E287K	1089 \pm 42	0.781 \pm 0.072	8.58 \pm 0.90	0.671 \pm 0.014
L333V	4542 \pm 167	2.12 \pm 0.11	11.9 \pm 0.9	0.678 \pm 0.041
A556S	2264 \pm 201	4.88 \pm 0.48	6.01 \pm 0.50	0.560 \pm 0.029

Tabla 12. Actividades específicas de las variantes determinadas en este estudio.

7.3.2. Parámetros catalíticos.

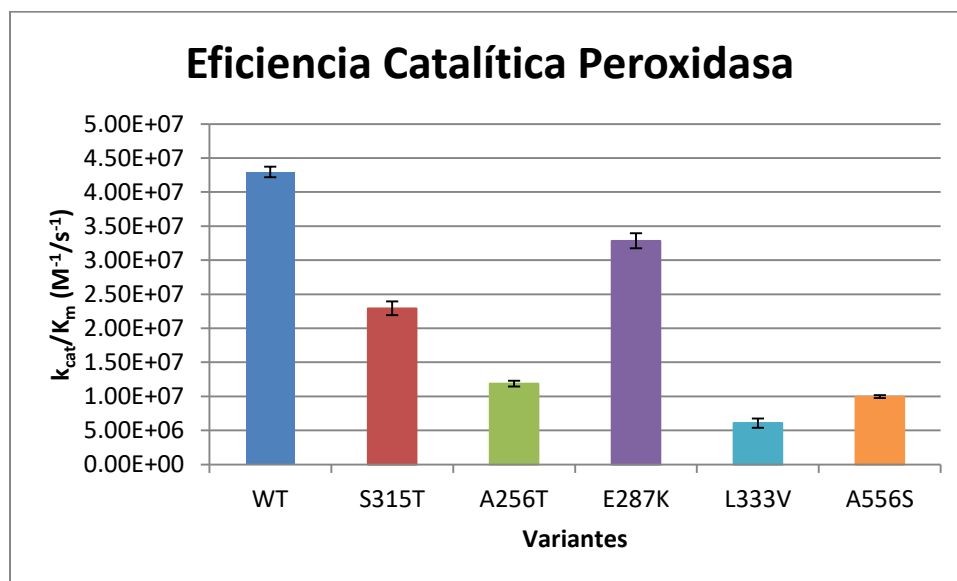
Los parámetros catalíticos (K_m , V_{max} , k_{cat} y la eficiencia catalítica, k_{cat}/K_m) para la actividad de catalasa de las variantes de KatG se determinaron variando la concentración de H_2O_2 (Tabla 13). Las constantes cinéticas son “valores aparentes” ya que el mecanismo de reacción de la KatG no es el típico de Michaelis-Menten.



Gráfica 10. Eficiencia catalítica de la actividad de catalasa de las variantes.

Todas las variantes de KatG exhibieron actividad de catalasa bajo condiciones saturables (**Anexo 3**). Ninguna de las variantes exhibió una eficiencia catalítica de catalasa mayor que la de KatG-WT (**Gráfica 10**), debido principalmente a que tuvieron una menor k_{cat} en comparación con KatG-WT, esto elimina cualquier mejora en la K_m (Cade *et al.*, 2010). Los parámetros catalíticos obtenidos para la KatG-WT son parecidos a los reportados en la literatura (Wengenack *et al.*, 1997).

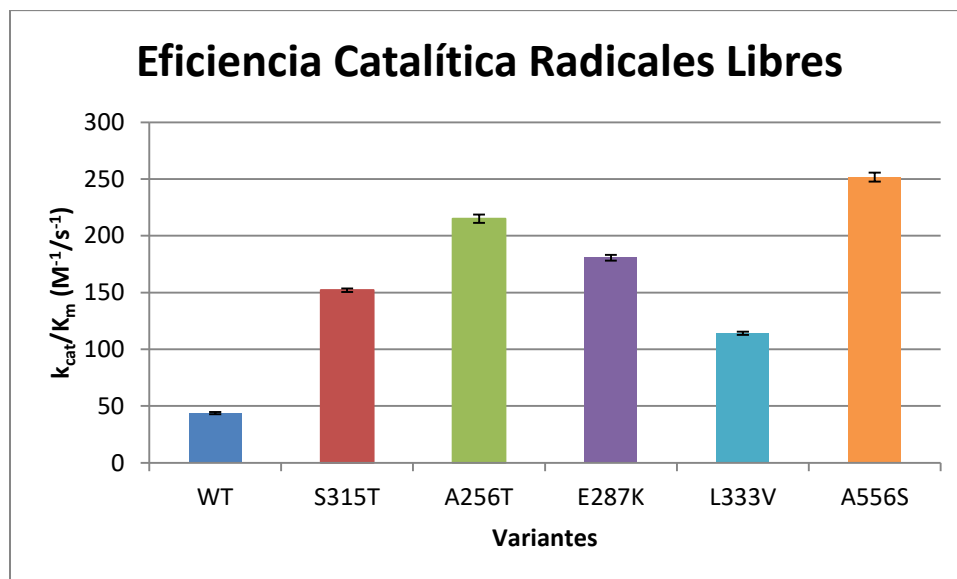
La actividad de peroxidasa se determinó variando la concentración del sustrato O-dianisidina (**Anexo 3**). Ninguna de las variantes exhibió una eficiencia catalítica mayor que la KatG-WT, lo que indica que tanto las variantes del dominio catalítico como las del dominio C-terminal tienen alterada la función de peroxidasa (**Gráfica 11**). Los parámetros catalíticos obtenidos para la KatG-WT correlacionan con los reportados en la literatura.



Gráfica 11. Eficiencia catalítica de la actividad de peroxidasa de las variantes.

Los parámetros catalíticos para la actividad de producción de radicales libres se determinó variando la concentración del INH (**Anexo 3**) y se presentan en la **Tabla 13**. Todas las variantes exhibieron una eficiencia catalítica mayor que la de KatG-WT (**Gráfica 12**). La evaluación del radical INH puede proporcionar información útil sobre la resistencia a INH, pero esta medición es de manera indirecta, la reducción esta acoplada con otro reactivo. Esto puede generar variaciones; por esto las variantes no mostraron una correlación de la actividad con la resistencia a INH (Ando *et al.*, 2010).

La alta actividad de las variantes con INH sugiere que las variantes no deberían generar resistencia y, probablemente, que esta no estaría asociada a KatG. Sin embargo, al ser el ensayo acoplado a otra actividad, se pueden generar datos incorrectos. Esto queda evidenciado ya que la variante S315T presenta la actividad aumentada, a pesar de que ya se ha reportado que si da resistencia. Indicando que este método para medir la formación de radicales de INH no es el adecuado.



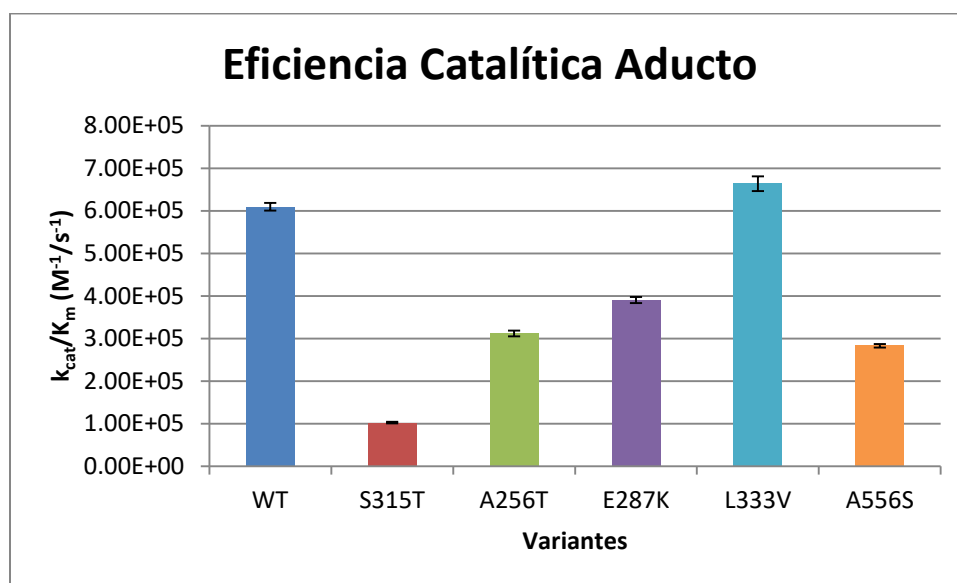
Gráfica 12. Eficiencia catalítica de la producción de radicales libres de las variantes.

La actividad de formación del aducto se determinó variando la concentración del INH (**Anexo 3**) y midiendo la formación del compuesto INH-NAD, es decir la formación del fármaco activo. Los valores de los parámetros catalíticos se presentan en la **Tabla 13**.

Todas las variantes exhibieron una eficiencia catalítica menor que la de KatG-WT, excepto la variante L333V que tiene una eficiencia catalítica idéntica (**Gráfica 13**); sin embargo, esta variante tiene incrementada la K_m un 20 %. Esto indica que requiere concentraciones altas de INH para realizar su función. Esta concentración probablemente no se logre con la dosis que se toma normalmente de INH para tratar la infección. Esto generaría que el organismo fuera resistente.

Sin embargo, se ha reportado que altas concentraciones de INH inhiben la función de la proteína (Wengenack *et al.*, 1997); existe la evidencia de que la activación del INH

podría conducir a la formación de aductos proteína-INH que interfieren con la función de la proteína (Cade *et al.*, 2010).



Gráfica 13. Eficiencia catalítica de la formación del aducto INH-NAD de las variantes.

El dominio C-terminal ha sido considerado inactivo, debido que no une el cofactor hemo, sin embargo nuestro estudio demuestra que un cambio en su secuencia (A556S) sí afecta las actividades de la proteína. Este dominio puede desempeñar un papel en la estabilidad, en la formación de redes de enlaces de hidrógeno o en la transferencia de electrones que afectan la actividad de la proteína cuando se modifican (Cade *et al.*, 2010).

Cabe señalar, que los resultados obtenidos deben ser interpretados con precaución porque las condiciones *in vivo* dentro de la micobacteria son diferentes a las condiciones típicas de un ensayo *in vitro* lo que podría afectar lo que observamos (Johnsson *et al.*, 1997).

Variante	Actividad de Catalasa				Actividad de Peroxidasa			
	Sustrato: Peróxido				Sustrato: O-Dianisidina			
	K_m (mM)	V_{max} (mM/min)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ /s ⁻¹)	K_m (μM)	V_{max} (μmol/min)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ /s ⁻¹)
WT	1.28 ± 0.04	1.21 ± 0.01	2.2 × 10 ⁷ ± 1.0 × 10 ⁵	2.8 × 10 ⁸ ± 2.2 × 10 ⁷	2.76 ± 0.87	0.980 ± 0.067	7110 ± 1	4.3 × 10 ⁷ ± 7.7 × 10 ⁵
S315T	1.44 ± 0.12	2.62 ± 0.05	1.7 × 10 ⁷ ± 5.4 × 10 ⁵	2 × 10 ⁸ ± 4.4 × 10 ⁷	6.25 ± 2.11	2.64 ± 0.21	8597 ± 2	2.3 × 10 ⁷ ± 1 × 10 ⁶
A256T	3.71 ± 0.54	0.23 ± 0.01	3.9 × 10 ⁶ ± 1.1 × 10 ⁴	1.8 × 10 ⁷ ± 2 × 10 ⁵	2.43 ± 0.86	0.515 ± 0.038	1732 ± 4	1.2 × 10 ⁷ ± 4.4 × 10 ⁵
E287K	1.21 ± 0.07	1.38 ± 0.02	9.9 × 10 ⁶ ± 1.9 × 10 ⁴	1.4 × 10 ⁸ ± 2.7 × 10 ⁷	2.99 ± 0.65	1.65 ± 0.07	5893 ± 72	3.3 × 10 ⁷ ± 1.1 × 10 ⁶
L333V	1.32 ± 0.21	0.50 ± 0.02	2.2 × 10 ⁶ ± 1.9 × 10 ⁴	2.8 × 10 ⁷ ± 9.1 × 10 ⁵	1.60 ± 0.47	0.665 ± 0.032	585.1 ± 0.3	6.1 × 10 ⁶ ± 6.8 × 10 ⁴
A556S	1.17 ± 0.09	3.05 ± 0.04	1.8 × 10 ⁷ ± 4.2 × 10 ⁵	1.8 × 10 ⁸ ± 4.8 × 10 ⁷	3.85 ± 1.17	0.399 ± 0.026	2301 ± 26	9.9 × 10 ⁶ ± 2.2 × 10 ⁴

Variante	Producción de radicales libres				Formación de aducto			
	Sustrato: INH				Sustrato: INH			
	K_m (mM)	V_{max} (μmol/min)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ /s ⁻¹)	K_m (μM)	V_{max} (mM/min)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ /s ⁻¹)
WT	2.36 ± 0.56	6.20 ± 0.58	6.2 ± 0.6	43.7 ± 1.1	5.70 ± 1.85	0.208 ± 0.017	208.4 ± 0.1	6.1 × 10 ⁵ ± 9 × 10 ²
S315T	0.37 ± 0.07	3.34 ± 0.12	3.3 ± 0.1	152.1 ± 1.6	21.9 ± 3.9	0.135 ± 0.008	134.6 ± 0.1	1.0 × 10 ⁵ ± 2 × 10 ²
A256T	1.05 ± 0.15	13.5 ± 0.6	13.5 ± 0.6	215.1 ± 3.6	23.6 ± 5.7	0.441 ± 0.039	441.2 ± 0.1	3.1 × 10 ⁵ ± 7 × 10 ²
E287K	0.732 ± 0.029	7.93 ± 0.08	7.9 ± 0.1	180.6 ± 2.6	12.9 ± 2.9	0.302 ± 0.02	302.4 ± 0.1	3.9 × 10 ⁵ ± 7 × 10 ²
L333V	0.519 ± 0.026	3.56 ± 0.04	3.5 ± 0.1	114.1 ± 1.4	38.6 ± 10.5	1.54 ± 0.18	1539 ± 18	6.6 × 10 ⁵ ± 1.7 × 10 ³
A556S	0.938 ± 0.132	14.2 ± 0.5	14.2 ± 0.5	251.7 ± 4.1	6.93 ± 1.88	0.118 ± 0.008	117.7 ± 0.8	2.8 × 10 ⁵ ± 4 × 10 ²

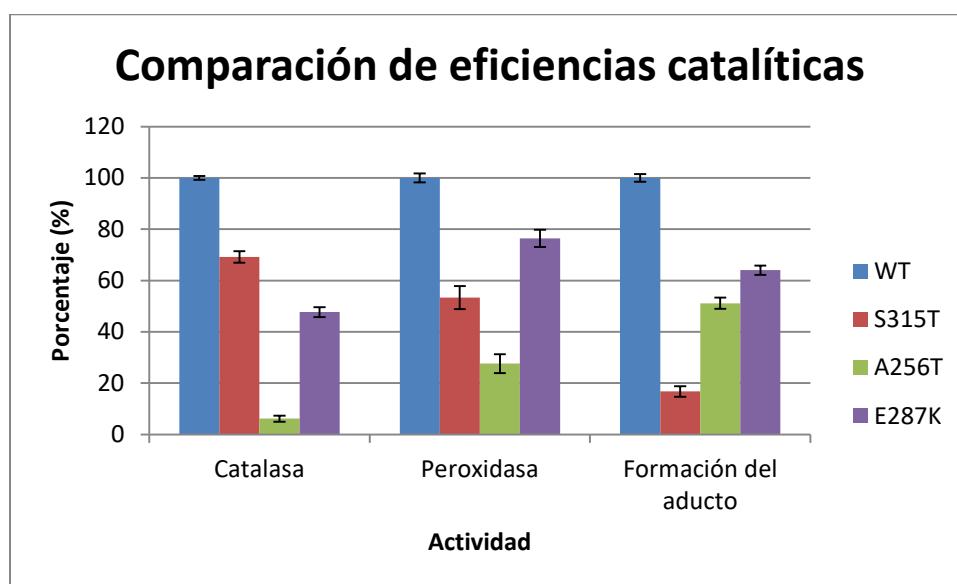
Tabla 13. Parámetros catalíticos aparentes calculados para cada una de las actividades.

7.4. Análisis global de la resistencia de las variantes.

Con el reciente descubrimiento de múltiples mutaciones en *katG* que confieren resistencia a INH, se ha generado una preocupación sobre el uso de los diagnósticos moleculares existentes que son basados en la secuencia de las variantes, ya que a estos les faltan los datos de mutaciones nuevas. Es necesario estudios que caractericen nuevos cambios e incorporen estos datos para poder detectar los casos de resistencia (Torres et al., 2015).

7.4.1. Variantes con una mutación adicional.

La variante A256T tiene reducida la capacidad de formación del aducto, pero también sus otras actividades lo que puede afectar la supervivencia de la micobacteria durante la infección (**Gráfica 14**); aunque también es posible que baja actividad de catalasa sea suficiente para la supervivencia. La mutación adicional en esta variante, se encuentra en la región promotora de la enzima *InhA*, lo que le permite sobre-exresar la proteína y al existir más *InhA*, no se disminuye la síntesis de los ácidos micólicos. Estas 2 mutaciones asociadas podrían estar contribuyendo a la resistencia observada.

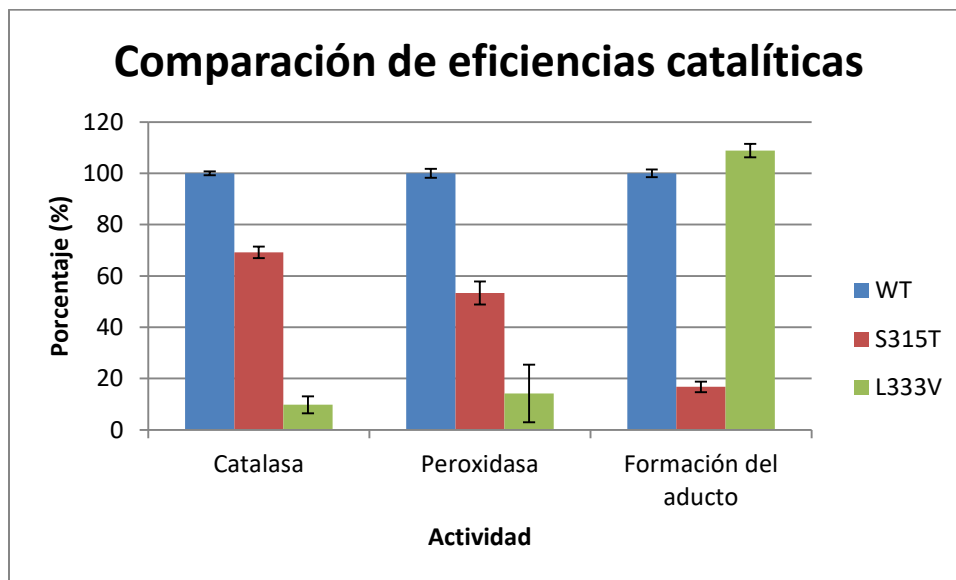


Gráfica 14. Comparación de las eficiencias catalíticas de las variantes con una mutación adicional en genes asociados con resistencia y los 2 controles, asumiendo a la *KatG*-WT como 100%.

La variante E287K, que cambia el ácido glutámico por lisina se ha propuesto que reduce la afinidad de la enzima por *INH* (Bertrand *et al.*, 2004). Además este cambio no compromete la supervivencia porque mantiene sus actividades de catalasa y peroxidasa con una reducción del 50% y 20%, respectivamente, en comparación con la *KatG*-WT (**Gráfica 14**). El cambio adicional que presenta la micobacteria es en *furA*, un regulador negativo de la expresión de *KatG*, lo que promueve una expresión débil de *KatG* y posiblemente una menor formación del aducto.

7.4.2. Variantes sin mutación adicional.

Un ejemplo bien estudiado de la resistencia a INH en KatG es la variante S315T que posee actividades significativas de catalasa y peroxidasa, y reduce drásticamente la función de activación de INH (**Gráfica 15**) (Cade *et al.*, 2010). Es probable que las cepas con este cambio en KatG tengan una ventaja selectiva, porque generan resistencia y sus actividades de catalasa y peroxidasa no están afectadas significativamente por lo que deberían ser capaces de soportar las especies de oxígeno reactivo producidas por los macrófagos (Saint-Joanis *et al.*, 1999). Lo anterior explica porque es la más común en los aislados de cepas resistentes.

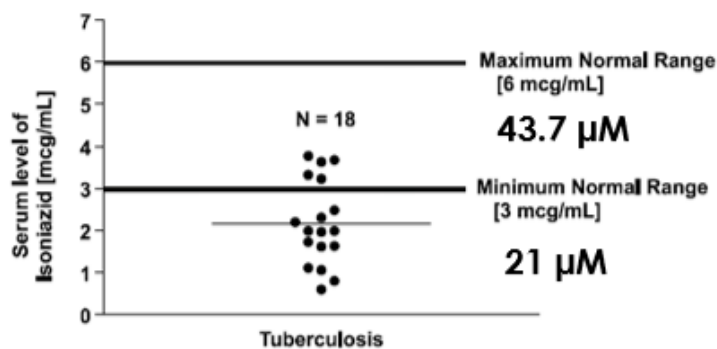


Gráfica 15. Comparación de las eficiencias catalíticas de las actividades en las variantes sin mutación adicional, asumiendo a la KatG-WT como 100%.

La variante L333V tiene un espectro de absorción diferente a las demás variantes, que se podría explicar por una pérdida del grupo hemo a una mayor velocidad, es decir una menor afinidad. Esta inestabilidad de una proteína importante para sobrevivir ante el estrés oxidativo podría explicar la resistencia observada en las cepas. Por otro lado, disminuye las actividades fisiológicas de KatG mientras que mantiene la formación del aducto, contrario a lo esperado (**Gráfica 15**).

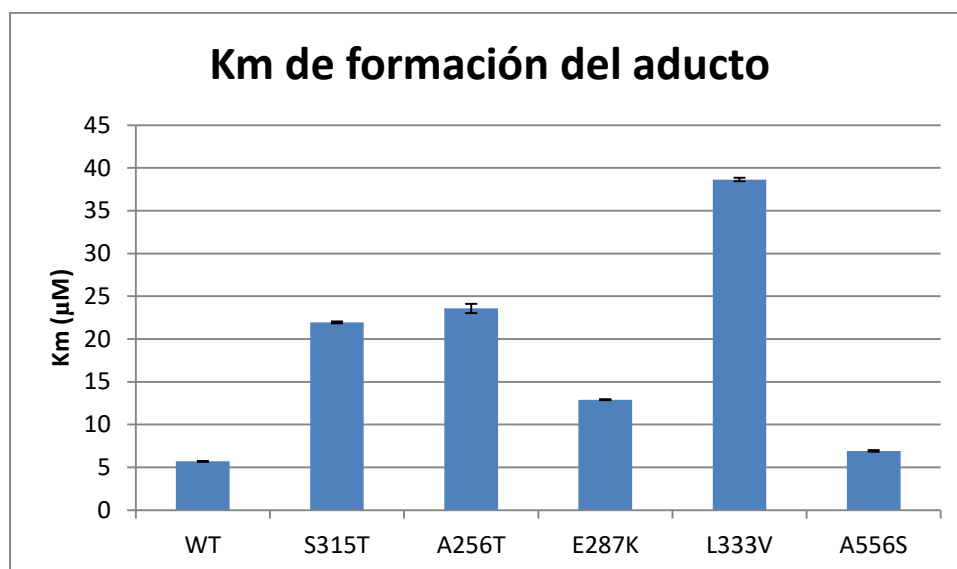
Se ha reportado que el rango normal mínimo y máximo de INH en la sangre debe de ser entre 3 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (21 y 43.7 μM), respectivamente, para que el fármaco tenga una buena efectividad. Pinheiro *et al.* observaron que la concentración de INH en la sangre

de los pacientes que recibieron una dosis estándar del fármaco, variaba entre cada uno y, que además, la mayoría de ellos no alcanza el rango mínimo, sin embargo la concentración se encontraba en el rango del MIC necesario para matar a la micobacteria (**Gráfica 16**).



Gráfica 16. Distribución de los niveles séricos de INH, después de 2 horas de ingestión de 400 mg de INH en 18 pacientes con TB. Fuente: Pinheiro *et al.*, 2006.

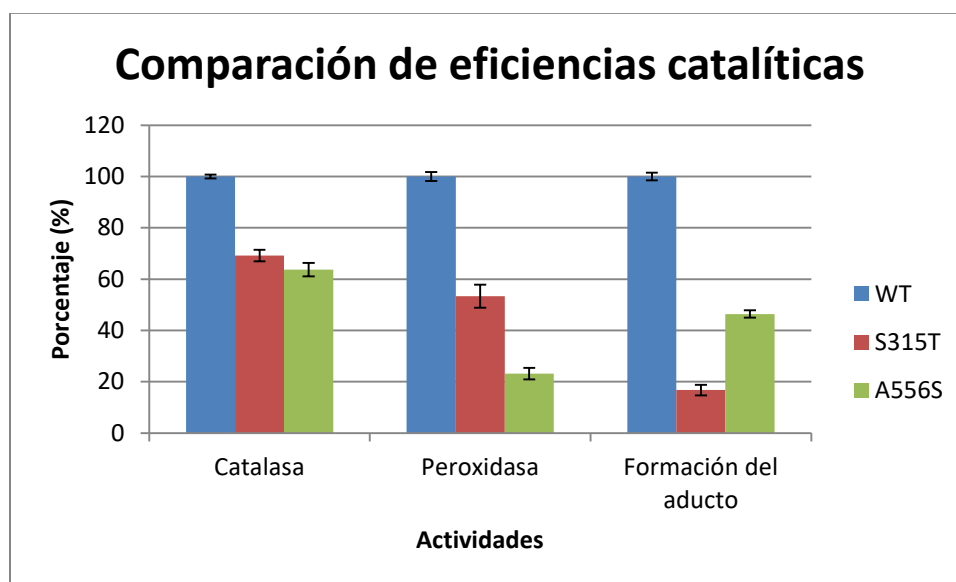
La variante L333V al aumentar la K_m para INH en la formación del aducto, pierde la afinidad de tomar la INH si el paciente no tiene una concentración mayor que la K_m sería resistente (**Gráfica 17**). Otro factor que contribuiría a la resistencia de esta variante es que podría estar asociada a pacientes que son metabolizadores rápidos, es decir, que tienen concentraciones menores de INH en la sangre. Sin embargo es necesario hacer otros estudios para poder valorar esta propuesta.



Gráfica 17. Comparación de las K_m para la formación del aducto de todas las variantes.

7.4.3. Variantes en el dominio C-terminal.

La variante A556S demuestra que el dominio C-terminal está involucrado en la función de la proteína a pesar de no unir el grupo hemo. Este cambio no compromete gravemente las actividades fisiológicas de KatG, por lo que no afectaría la supervivencia de la micobacteria. En la **Gráfica 18** se puede observar como el cambio A556S tiene un efecto parecido a la variante S315T por la disminución de la eficiencia en la formación del principio activo (Cade *et al.*, 2010).



Gráfica 18. Comparación de las eficiencias catalíticas de las actividades en las variantes del dominio C-terminal y 2 controles, asumiendo a la KatG-WT como 100%.

8. CONCLUSIÓN.

Se validó por secuenciación de Sanger la presencia de las mutaciones detectadas por secuenciación de nueva generación en el gen *katG* de *M. tuberculosis* presente en cepas resistentes a INH de pacientes mexicanos.

Se construyeron 6 plásmidos (pKK-KatG) para expresar las variantes en *E. coli*, 5 de los cuales son mutantes del gen *katG* que generan sustituciones de aminoácidos

sencillas las cuales fueron encontradas en aislados clínicos resistentes a INH. Estas se produjeron por mutagénesis sitio dirigida.

La producción de las variantes fue adecuada cuando se agregó cloruro de hemina al medio de cultivo donde se crecieron las bacterias.

La variante L333V muestra una absorbancia relativa Soret diferente a las otras variantes, esto posiblemente debido a una baja afinidad al grupo hemo que genera la liberación del grupo.

Se observó que las variantes S315T, E287K y A556S mantienen gran parte de la actividad de catalasa y peroxidasa, pero disminuyen la actividad de formación del aducto INH-NAD (principio activo).

La variante A256T reduce la eficiencia catalítica de la actividad de catalasa lo que podría comprometer la supervivencia de la micobacteria en ambientes aeróbicos, a la vez que disminuye la eficiencia catalítica para la formación del aducto, perdiendo la capacidad de activar el principio activo.

La variante L333V es la única que no reduce la eficiencia catalítica de la formación del aducto, sin embargo, sí muestra reducción de las otras actividades. La resistencia se podría explicar por un aumento en la K_m hacia INH. Si los valores determinados *in vitro* son similares a los que se encontrarían *in vivo*, la concentración en sangre del fármaco está por debajo de la K_m , por lo que en un principio perdería su capacidad de activar INH para formar el principio activo, lo que daría como resultado la resistencia.

Los resultados de este estudio representan un primer paso hacia un trabajo interdisciplinario. De este modo, conociendo cualquier variable, los tratamientos específicos pueden ser adaptados al paciente que presenta un aislado clínico de *M. tuberculosis* definido, con el objetivo final de una comprensión de las causas de la resistencia de cada persona o cada mutante, así se pueden diseñar nuevas terapias con medicamentos específicos para fortalecer el control de la TB-DR. El conocimiento y comprensión sobre las bases moleculares asociadas con la resistencia a la INH ayudarán a la utilización de métodos simples, rápidos y de bajo costo.

9. PERSPECTIVAS.

- ✚ Demostrar si la introducción del gen *katG* de las variantes caracterizadas confieren un fenotipo de resistencia a INH *in vivo* en cepas de *M. smegmatis* que no porten el gen cromosomal de *katG*, ya que tiene una mayor tasa de crecimiento y es de naturaleza no infecciosa. Se podría usar la cepa *M. tuberculosis H37ra*, que es avirulenta y de esta manera tener un modelo más aproximado a la realidad. La elección de la cepa dependerá de cuál sea más fácil de obtener.
- ✚ Cristalizar la variante L333V y obtener su estructura tridimensional para determinar si existe un cambio conformacional local. Esto nos ayudaría a explicar cómo el cambio altera la unión del grupo hemo.
- ✚ Hacer una caracterización de la estabilidad (temperatura, sensibilidad a proteasas, vida media, etc.) de las variantes para determinar si la resistencia también se debe a que existe una menor cantidad de proteína en la célula.
- ✚ Caracterizar más variantes resistentes de pacientes mexicanos para poder encontrar un elemento que nos permita poder predecir la resistencia.
- ✚ Estudiar si en un modelo animal (ratón, conejo o cobayo) el aumento de la dosis de INH cura la infección causada una cepa de *M. tuberculosis* que porte el gen de *katG* de la variante L333V.

10. BIBLIOGRAFÍA.

Ando, H., Kondo, Y., Suetake, T., Toyota, E., Kato, S., Mori, T., *et al.* (2010). Identification of *katG* mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(5), 1793-1799. doi: 10.1128/AAC.01691-09

Bertrand, T., Eady, N. A., Jones, J. N., Jesmin, Nagy, J. M., Jamart-Gregoire, B., *et al.* (2004). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase.

[Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biol Chem*, 279(37), 38991-38999. doi: 10.1074/jbc.M402382200

Betsou, F., Parida, S. K., & Guillermin, M. (2011). Infectious diseases biobanking as a catalyst towards personalized medicine: *Mycobacterium tuberculosis* paradigm. [Review]. *Tuberculosis (Edinb)*, 91(6), 524-532. doi: 10.1016/j.tube.2011.07.006

Brossier, F., Boudinet, M., Jarlier, V., Petrella, S., & Sougakoff, W. (2016). Comparative study of enzymatic activities of new KatG mutants from low- and high-level isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 100, 15-24. doi: 10.1016/j.tube.2016.06.002

Browne, S. H., Peloquin, C., Santillo, F., Haubrich, R., Muttera, L., Moser, K., et al. (2017). Digitizing Medicines for remote capture of oral medication adherence using Co-encapsulation. *Clin Pharmacol Ther*. doi: 10.1002/cpt.760

Bryant, J. M., Lipman, M., & Breuer, J. (2016). Personalizing therapy for multidrug resistant TB: the potential of Rapid Whole Genome Sequencing. [Editorial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 14(1), 1-3. doi: 10.1586/14787210.2016.1116385

Cade, C. E., Dlouhy, A. C., Medzihradzky, K. F., Salas-Castillo, S. P., & Ghiladi, R. A. (2010). Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Protein Sci*, 19(3), 458-474. doi: 10.1002/pro.324

Cattamanchi, A., Dowdy, D. W., Davis, J. L., Worodria, W., Yoo, S., Joloba, M., et al. (2009). Sensitivity of direct versus concentrated sputum smear microscopy in HIV-infected patients suspected of having pulmonary tuberculosis. [Evaluation Studies Research Support, N.I.H., Extramural]. *BMC Infect Dis*, 9, 53. doi: 10.1186/1471-2334-9-53

CENAPRECE. (2014). Prevención y control de la Tuberculosis. In G. Federal (Ed.). México.

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., et al. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature*, 393(6685), 537-544. doi: 10.1038/31159

Chouchane, S., Lippai, I., & Magliozzo, R. S. (2000). Catalase-peroxidase (*Mycobacterium tuberculosis* KatG) catalysis and isoniazid activation. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Biochemistry*, 39(32), 9975-9983.

FDA. (2013). Paving the Way for Personalized Medicine U. S. D. O. H. A. H. SERVICES (Ed.) Retrieved from <http://www.fda.gov/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocument/s/ucm262292.htm>

Ghiladi, R. A., Medzihradzky, K. F., Rusnak, F. M., & de Montellano, P. R. (2005). Correlation between isoniazid resistance and superoxide reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* KatG. *J Am Chem Soc*, *127*(38), 13428-13442. doi: 10.1021/ja054366t

Ginsburg, G. S., & McCarthy, J. J. (2001). Personalized medicine: revolutionizing drug discovery and patient care. *Trends Biotechnol*, *19*(12), 491-496.

Jena, L., Waghmare, P., Kashikar, S., Kumar, S., & Harinath, B. C. (2014). Computational approach to understanding the mechanism of action of isoniazid, an anti-TB drug. *Int J Mycobacteriol*, *3*(4), 276-282. doi: 10.1016/j.ijmyco.2014.08.003

Jenkins, M., Flynn, A., Smart, T., Harbron, C., Sabin, T., Ratnayake, J., et al. (2011). A statistician's perspective on biomarkers in drug development. [Review]. *Pharm Stat*, *10*(6), 494-507. doi: 10.1002/pst.532

Johnsson, K., Froland, W. A., & Schultz, P. G. (1997). Overexpression, purification, and characterization of the catalase-peroxidase KatG from *Mycobacterium tuberculosis*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biol Chem*, *272*(5), 2834-2840.

Juarez-Eusebio, D. M., Munro-Rojas, D., Muniz-Salazar, R., Laniado-Laborin, R., Martinez-Guarneros, J. A., Flores-Lopez, C. A., et al. (2016). Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from high prevalence tuberculosis states in Mexico. *Infection Genetics and Evolution*. doi: 10.1016/j.meegid.2016.09.012

Lahti, J. L., Tang, G. W., Capriotti, E., Liu, T., & Altman, R. B. (2012). Bioinformatics and variability in drug response: a protein structural perspective. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *J R Soc Interface*, *9*(72), 1409-1437. doi: 10.1098/rsif.2011.0843

Lei, B., Wei, C. J., & Tu, S. C. (2000). Action mechanism of antitubercular isoniazid. Activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, isolation, and characterization of inha inhibitor. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Biol Chem*, *275*(4), 2520-2526.

Luo, T., Zhao, M., Li, X., Xu, P., Gui, X., Pickerill, S., et al. (2010). Selection of mutations to detect multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Shanghai, China. [Evaluation Studies Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*(3), 1075-1081. doi: 10.1128/AAC.00964-09

Mahon, R. N., & Hafner, R. (2017). Applying Precision Medicine and Immunotherapy Advances from Oncology to Host-Directed Therapies for Infectious Diseases. *Front Immunol*, 8, 688. doi: 10.3389/fimmu.2017.00688

Menzies, N. A., Homsy, J., Chang Pitter, J. Y., Pitter, C., Mermin, J., Downing, R., et al. (2009). Cost-effectiveness of routine rapid human immunodeficiency virus antibody testing before DNA-PCR testing for early diagnosis of infants in resource-limited settings. [Comparative Study Evaluation Studies]. *Pediatr Infect Dis J*, 28(9), 819-825.

Middlebrook, G. (1952). Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug in vitro. *Am Rev Tuberc*, 65(6), 765-767.

Nachega, J. B., & Chaisson, R. E. (2003). Tuberculosis drug resistance: a global threat. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Clin Infect Dis*, 36(Suppl 1), S24-30. doi: 10.1086/344657

Nagy, J. M., Cass, A. E., & Brown, K. A. (1997). Purification and characterization of recombinant catalase-peroxidase, which confers isoniazid sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biol Chem*, 272(50), 31265-31271.

Olaru, I. D., Lange, C., & Heyckendorf, J. (2016). Personalized medicine for patients with MDR-TB. [Review]. *J Antimicrob Chemother*, 71(4), 852-855. doi: 10.1093/jac/dkv354

OMS. (2016). Global Tuberculosis Report 2016 *Global tuberculosis report* (pp. 201).

Pym, A. S., Saint-Joanis, B., & Cole, S. T. (2002). Effect of katG mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Infect Immun*, 70(9), 4955-4960.

Saint-Joanis, B., Souchon, H., Wilming, M., Johnsson, K., Alzari, P. M., & Cole, S. T. (1999). Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical Journal*, 338, 753-760. doi: Doi 10.1042/0264-6021:3380753

Salud, S. d. (2012). *Estándares para la atención de la tuberculosis en México*. México: Gobierno Federal.

Soberón, X. G., V. (2014). Enfermedades infecciosas, hacia una medicina personalizada. *Revista digital universitaria*, 15. Retrieved from

SS. (2013). Anuarios de morbilidad. In S. d. Salud (Ed.).

Swaminathan, S., Sundaramurthi, J. C., Palaniappan, A. N., & Narayanan, S. (2016). Recent developments in genomics, bioinformatics and drug discovery to combat

emerging drug-resistant tuberculosis. [Review]. *Tuberculosis (Edinb)*, 101, 31-40. doi: 10.1016/j.tube.2016.08.002

Torres, J. N., Paul, L. V., Rodwell, T. C., Victor, T. C., Amallraja, A. M., Elghraoui, A., et al. (2015). Novel katG mutations causing isoniazid resistance in clinical *M. tuberculosis* isolates. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Emerg Microbes Infect*, 4(7), e42. doi: 10.1038/emi.2015.42

Unissa, A. N., Subbian, S., Hanna, L. E., & Selvakumar, N. (2016). Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection Genetics and Evolution*, 45, 474-492. doi: 10.1016/j.meegid.2016.09.004

Vilcheze, C., & Jacobs, W. R., Jr. (2007). The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Annu Rev Microbiol*, 61, 35-50. doi: 10.1146/annurev.micro.61.111606.122346

Wei, C. J., Lei, B., Musser, J. M., & Tu, S. C. (2003). Isoniazid activation defects in recombinant *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) mutants evident in InhA inhibitor production. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(2), 670-675.

Wengenack, N. L., Uhl, J. R., St Amand, A. L., Tomlinson, A. J., Benson, L. M., Naylor, S., et al. (1997). Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* KatG(S315T) is a competent catalase-peroxidase with reduced activity toward isoniazid. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Infect Dis*, 176(3), 722-727.

Zhang, H., Li, D., Zhao, L., Fleming, J., Lin, N., Wang, T., et al. (2013). Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nat Genet*, 45(10), 1255-1260. doi: 10.1038/ng.2735

Zhao, X., Yu, H., Yu, S., Wang, F., Sacchettini, J. C., & Magliozzo, R. S. (2006). Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Biochemistry*, 45(13), 4131-4140. doi: 10.1021/bi051967o

11. ANEXOS.

Anexo 1. Procedimiento de purificación de proteínas por columna de afinidad.

Materiales.

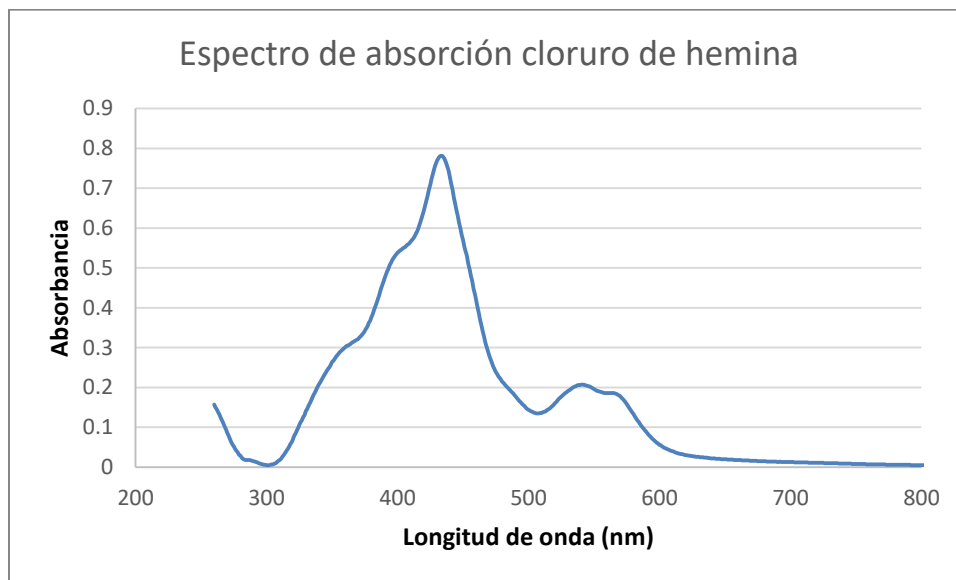
1. Se preparan las siguientes soluciones madre:
 - Fosfatos de sodio 1 M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) pH 7.5.
 - Imidazol 1 M.
 - Cloruro de Sodio 5 M.
2. Se preparan los siguientes buffers:
 - Buffer de carga: 50 mM de NiSO_4 .
 - Buffer de unión: 5 mM imidazol, 0.5 M NaCl, 50 mM fosfatos de sodio.
 - Buffer de lavado: 35 mM imidazol, 0.5 M NaCl, 50 mM fosfatos de sodio.
 - Buffer de elución: 300 mM imidazol, 0.5 M NaCl, 50 mM fosfatos de sodio.

Procedimiento.

1. Se deja un creciendo un cultivo de 2 mL de LB-amp/km toda la noche de una colonia de la clona a 30°C con agitación.
2. Se inocula con 300 μL del cultivo anterior, un matraz con 30 mL de medio mínimo M9-amp/km y se deja creciendo a 30°C en agitación.
3. Cuando el cultivo está a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.6 se le agrega IPTG (concentración final de 0.5 mM) y se deja creciendo bajo las mismas condiciones 3:30 horas.
4. Se colectan las células a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C.
5. Resuspender las células en 2 mL de buffer de unión y sonicarlas.
6. Centrifugar a la máxima velocidad durante 20 minutos (se pueden pasar a tubos de 1.5 mL). El sobrenadante se guarda en hielo.
7. Cargar 1 mL de la resina Ni-NTA en la columna, lavar con 3 mL de agua y 3 mL de buffer de carga.
8. Lavar la columna con 3 mL de buffer de unión.
9. Tomar el sobrenadante y cargarlo en la columna.
10. Lavar con 10 mL de buffer de unión.
11. Lavar con 6 mL de buffer de lavado.
12. Eluir con 1 mL de 300 mM imidazol (Buffer de elución).

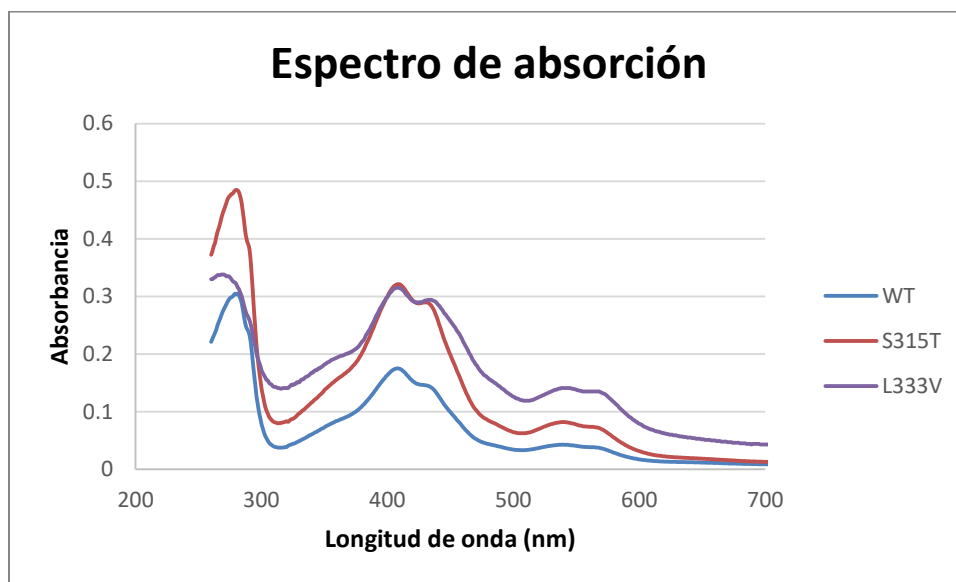
Anexo 2. Espectro de absorción del cloruro de hemina.

El espectro de absorción del cloruro de hemina en buffer de fosfatos de sodio se muestra a continuación, teniendo un máximo de absorción a 430 nm.



Gráfica 19. Espectro de absorción del cloruro de hemina.

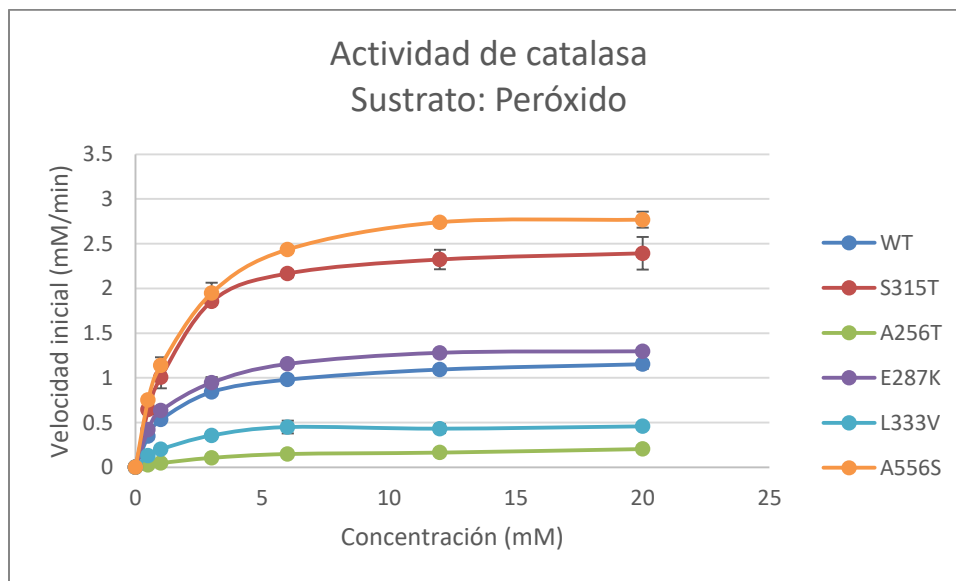
Además se muestra el espectro de absorción de las variantes control (WT y S315T) y la variante L333V, pasado 2 meses después de la purificación. Se nota que aparece un segundo pico a 430 nm, por lo que podría explicar la liberar del grupo hemo a una menor velocidad con respecto a la variante L333V.



Gráfica 20. Espectro de absorción de las variantes control (WT y S315T) y la L333V, donde se muestra la aparición del segundo pico a 430 nm.

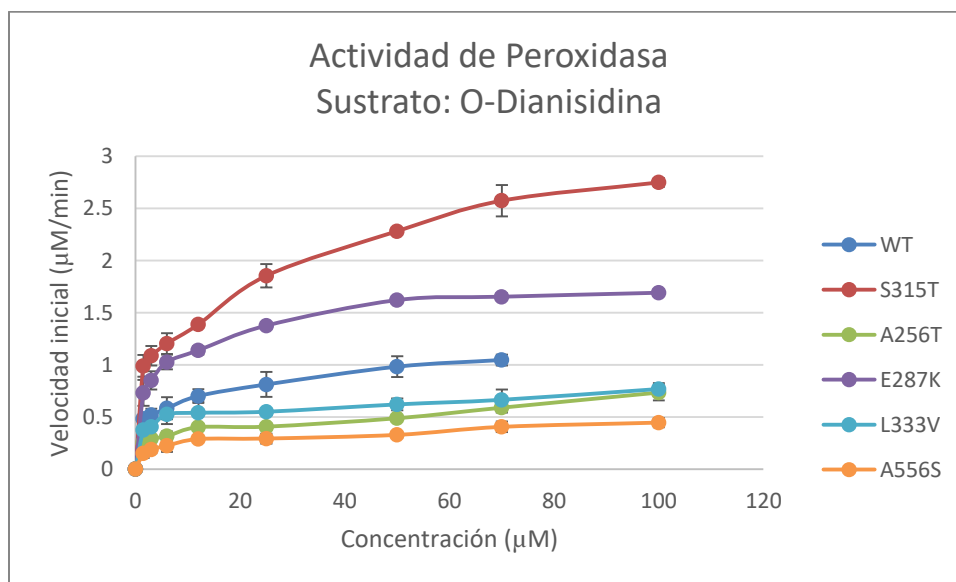
Anexo 3. Curvas de Michaelis-Menten.

Para calcular los parámetros catalíticos de la actividad de catalasa se determinaron las velocidades iniciales a diversas concentraciones de H_2O_2 , y todas las variantes de KatG exhibieron actividad de catalasa bajo condiciones saturables (**Gráfica 21**).



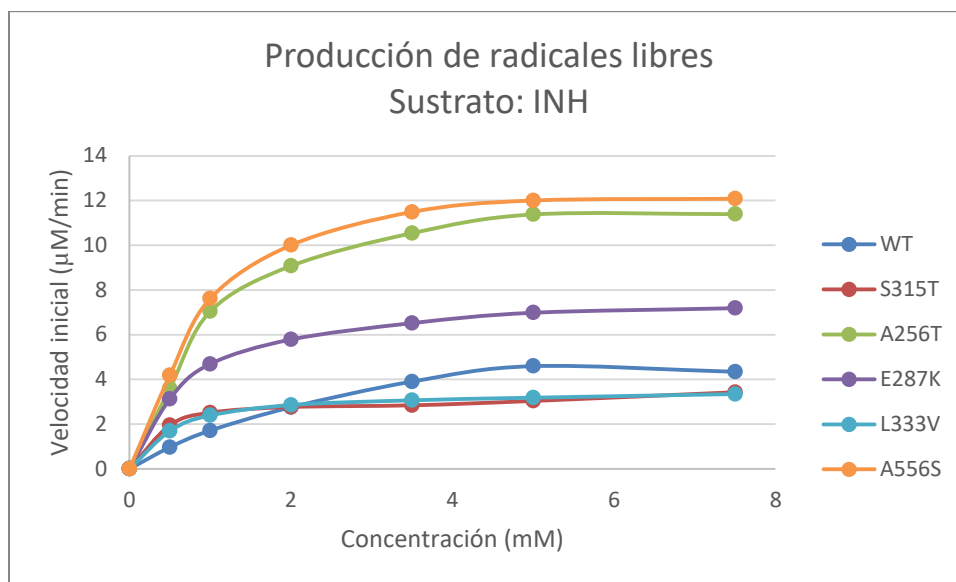
Gráfica 21. Curvas de Michaelis-Menten para la actividad de catalasa.

De igual manera para calcular los parámetros catalíticos de la actividad de peroxidasa se determinaron las velocidades iniciales a diversas concentraciones del sustrato O-dianisidina, y todas las variantes tienen un hombro en la curva formada (**Gráfica 22**).



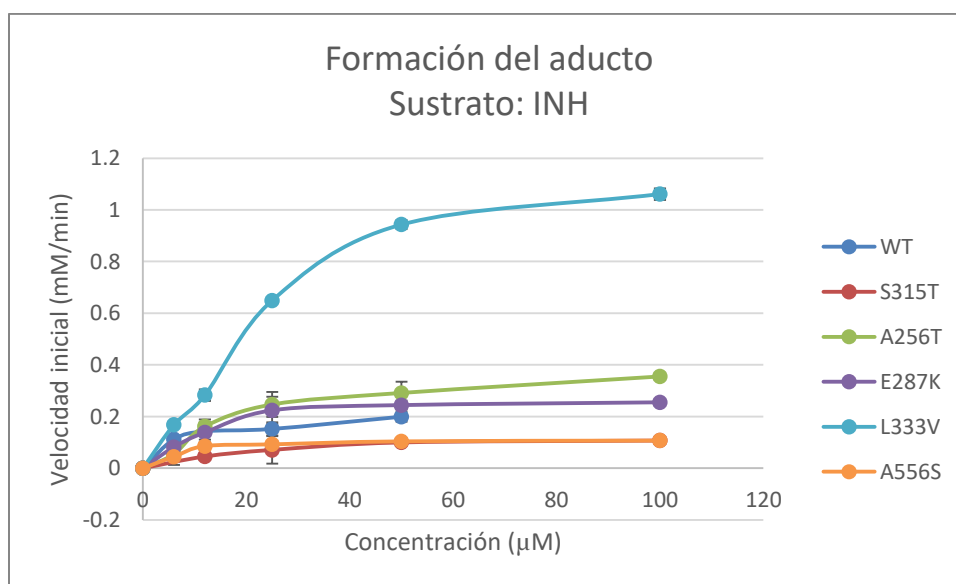
Gráfica 22. Curvas de Michaelis-Menten para la actividad de peroxidasa a diferentes concentraciones del sustrato O-dianisidina.

Los parámetros catalíticos de la actividad de producción de radicales libres se determinaron con las velocidades iniciales a diversas concentraciones del INH (**Gráfica 23**).



Gráfica 23. Curvas de Michaelis-Menten para la actividad de producción de radicales libres a diferentes concentraciones de INH como sustrato.

Y finalmente, los parámetros cinéticos de la actividad de formación del aducto se determinaron con las velocidades iniciales a diversas concentraciones del INH. En la **Gráfica 24** se observan los datos de la curva de Michaelis-Menten.



Gráfica 24. Curvas de Michaelis-Menten para la formación del aducto a diferentes concentraciones de INH como sustrato.