



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

TESIS:

**"IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES ASOCIADOS CON LA BAJA
PERMEABILIDAD CELULAR EN CEPAS DROGORRESISTENTES DE
Mycobacterium tuberculosis"**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

Químico Farmacobiólogo
Evaristo Galeana Aguilasocho

Directora de tesis:

Doctora en Ciencias (Biología)
Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

codirectora de tesis:

Doctora en Ciencias Biológicas
Andrea Monserrat Negrete Paz

Morelia, Michoacán, enero 2024

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la U.M.S.N.H., bajo la dirección de la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y la codirección de la D. en C. Andrea Monserrat Negrete Paz.

Se contó con el apoyo de la CIC-UMSNH, del Instituto de Ciencia Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán (PICIR-021) y del CONAHCYT CF-(2023-1-565) al proyecto “Identificación de polimorfismos en genes asociados con la drogo-resistencia constitutiva en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con discrepancias entre la susceptibilidad fenotípica y la genotípica a los antibióticos”.

La realización de este trabajo también fue posible gracias a la beca para estudios de maestría otorgada por el CONAHCYT con número de expediente (CVU/Becario): 1105124/793212

COMITÉ TUTORAL

Doctor en Ciencias
Sergio Gutiérrez Castellanos
(Presidente)

Doctora en Ciencias (Biología)
Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas
(Vocal 1)

Doctora en Ciencias Biológicas
Andrea Monserrat Negrete Paz
(Vocal 2)

Doctor en Ciencias (Biotecnología de plantas)
Gerardo Vázquez Marrufo
(Vocal 3)

Doctora en Ciencias Biológicas
Ana Laura Guillén Nepita
(Vocal 4)

CONTENIDO

Índice de TablasI

Índice de FigurasII

Índice GeneralIII

AbreviaturasV

ResumenVI

Abstract.....VII

ÍNDICE DE TABLAS

Núm	Descripción	Pág.
1	Clasificación de los fármacos antituberculosos por grupos	8
2	Factores genéticos implicados en la resistencia a fármacos de segunda línea en <i>M. tuberculosis</i> .	10
3	Factores genéticos implicados en la resistencia a fármacos de primera línea en <i>M. tuberculosis</i>	11
4	Características de las cepas de estudio	24
5	Resistencia genotípica-fenotípica a antibióticos en cepas de la colección MYC	24
6	Comparación de resistencia genotípica-fenotípica para cepas de Veracruz	26
7	Cepas que cumplen con el criterio de inconsistencia en su perfil de drogorresistencia	33
8	SNP's encontrados en las cepas seleccionadas	34
9	Predicciones SIFT	38
10	Predicciones DUET	38
11	Perfil de ácidos grasos en cepas de Mycobacterium tuberculosis (MYC) (nmol * g)	41
12	Proporción de ácidos grasos en las cepas estudiadas	42
13	Características de los genomas estudiados	60
14	Espoligotipos de las cepas de estudio	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm	Descripción	Pág.
1	Estructura de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	7
2	Mecanismos y genes relacionados con la resistencia a RIF en <i>M. tuberculosis</i>	12
3	Distribución geográfica de las cepas del banco de datos.	30
4	Distribución de espoligotipos	31
5	Familias predichas por el programa Spotyping	32
6	Porcentajes de los linajes predichos por TB-profile	32
7	Cromatogramas de la determinación de ácidos grasos en célula completa.	40

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
Tuberculosis.....	2
2.1. Incidencia de tuberculosis.....	2
2.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
2.2.1. Morfología microscópica y tinción	3
2.2.2. Morfología macroscópica	3
2.3. Patogénesis de <i>M. tuberculosis</i>	3
2.4. Técnicas de genotipado de <i>M. tuberculosis</i>	5
2.4.1 Espoligotipificación	5
2.4.2 Número Variable de Repeticiones en Tándem de Unidades Repetitivas de Micobacteria (MIRU-VNTR)	5
2.4.3 Linajes del complejo <i>M. tuberculosis</i>	5
2.5. Pared celular	6
2.6. Tratamiento de la tuberculosis	7
2.6.1 Fármacos de primera línea.	8
2.6.2 Fármacos segunda línea.....	9
2.7. Fármaco-resistencia en <i>M. tuberculosis</i>	10
2.7.1 Farmacorresistencia adquirida	10
2.7.2 Resistencia constitutiva a los antibióticos de <i>M. tuberculosis</i>	12
2.8. Uso de la secuenciación de genomas completos para la identificación de polimorfismos asociados con la resistencia a los antibióticos.	15
2.8.1 Secuenciación del genoma para la determinación de la drogorresistencia	16
2.9 Discrepancias entre la resistencia a los antibióticos fenotípica (antibiograma) y la genotípica (mutaciones en genes canónicos).....	17
3. ANTECEDENTES.....	19
4. JUSTIFICACIÓN.....	20
5. HIPÓTESIS.....	21
6. OBJETIVOS.....	21
6.1 Objetivo General	21

6.2. Objetivos específicos	21
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
8.1 Material biológico.....	24
8.1.1 Otras cepas a utilizar	25
8.1.2 Análisis de la calidad de los genomas descargados	25
8.1.3 Recorte y filtrado de genomas con mala calidad de lecturas	25
8.1.4 Determinación de resistencia genotípica	26
8.1.5 Identificación de los espoligotipos de las cepas seleccionadas.....	26
8.1.6 Identificación de SNP's en los genes de interés de las cepas seleccionadas.....	26
8.1.7 Determinación del efecto funcional en las proteínas presuntivas.....	27
8.1.8 Predicción de la estructura de las proteínas	27
8.2 Análisis del contenido de ácidos grasos en pared celular.....	28
8.2.1 Cultivo de las cepas bacterianas	28
8.2.2 Inactivación de las cepas bacterianas.....	28
8.2.3 Análisis de ácidos grasos	28
8.3 Análisis estadístico	29
9. RESULTADOS	30
9.1 Selección de cepas.....	30
9.2 Recorte de lecturas.....	30
9.3 Genotipificación <i>in silico</i>	30
9.4 Predicción de linajes mediante TB-profiler	32
9.5 Cepas seleccionadas	33
9.6 identificación de polimorfismos de un solo nucleótido	34
9.7 Predicción de la afectación de la función en las variaciones encontradas.....	37
9.8 Análisis de ácidos grasos	39
9.9 Análisis estadístico	42
10. DISCUSIÓN.....	43
11. CONCLUSIÓN	49
12. REFERENCIAS	50
13. ANEXOS	60

ABREVIATURAS

DHC: Descontaminación, homogenización y concentración.

EMB: etambutol

INH: isoniazida

IS: insertion sequence

MA: macrófago alveolar

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

MTC: complejo de micobacterias

PMN: células polimorfonucleares

PZA: pirazinamida

RIF: rifampicina

STR: estreptomicina

TB: tuberculosis

TBA: tuberculosis abdominal

RESUMEN

La tuberculosis es considerada una emergencia mundial por la OMS. Requiere de un tratamiento largo que redunde en el surgimiento de cepas resistentes a antibióticos. A la fecha se han reportado en *M. tuberculosis*, discrepancias entre la resistencia fenotípica y la resistencia genotípica adquirida. Para entender mejor este fenómeno, es necesaria la secuenciación genómica y posterior búsqueda de mutaciones en genes diferentes a los canónicos, por ejemplo, en aquellos relacionados con la resistencia constitutiva. Por ello el siguiente trabajo pretende identificar polimorfismos en la secuencia de genes involucrados en la permeabilidad celular de cepas de *M. tuberculosis* con discrepancias en la resistencia, mediante la secuenciación de cepas aisladas de México y obtenidas de bases de datos. Además de identificar diferencias en la proporción de ácidos grasos en la micomembrana que pudieran estar asociados con los fenotipos drogorresistentes. Para esto, se seleccionaron 6 cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Michoacán las cuales a partir de la secuenciación del genoma se realizó una búsqueda de SNPs con MTBseq. A partir de esta metodología se identificaron 121 SNP's en varios genes, en mayor proporción en el gen *Rv3087*. La resistencia genotípica se determinó con TB-PROFILER y la resistencia fenotípica mediante el método líquido BACTEC MGIT 960. El perfil de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gases. De las cepas analizadas, las cepas MYC036, MYC072, MYC075 y MYC087 presentaron resistencia a dos antibióticos, la cepa MYC078 presentó resistencia a estreptomicina y las cepas MYC061, MYC093 y MYC096 resultaron sensibles. El 55.5% de las cepas presentaron inconsistencias fenotípicas-genotípicas. Mediante la cromatografía de gases se observó que las cepas con inconsistencias se caracterizan por presentar altas concentraciones de los ésteres metílicos de ácidos grasos 16:0, 18:0, 19:0 y el ácido tuberculoestéarico y bajas concentraciones de los ésteres metílicos del ácido graso 14:0, lo que puede repercutir directamente en la permeabilidad de la micomembrana celular y en la drogorresistencia de las cepas.

Palabras clave: Tuberculosis, drogorresistencia, Mycobacterium, ácidos grasos, secuenciación.

ABSTRACT

Tuberculosis is considered a global emergency by WHO. It requires a lengthy treatment that leads to the emergence of antibiotic-resistant strains. Discrepancies between phenotypic and acquired genotypic resistance have been reported in *M. tuberculosis* to date. To better understand this phenomenon, genomic sequencing is necessary, followed by the search for mutations in genes other than canonical, such as those related to constitutive resistance. Therefore, the following study aims to identify polymorphisms in the gene sequence involved in the cellular permeability of *M. tuberculosis* strains with discrepancies in resistance, through the sequencing of strains isolated from Mexico and obtained from databases. In addition, it aims to identify differences in the proportion of fatty acids in the mycomembrane that may be associated with drug-resistant phenotypes. For this purpose, 6 *M. tuberculosis* strains isolated in Michoacán were selected. Through genome sequencing, a search for SNPs was conducted using MTBseq. This methodology identified 121 SNPs in various genes, with a higher proportion in the Rv3087 gene. Genotypic resistance was determined using TB-PROFILER, and phenotypic resistance was determined using the BACTEC MGIT 960 liquid method. Fatty acid profiles were determined through gas chromatography. Among the analyzed strains, MYC036, MYC072, MYC075, and MYC087 showed resistance to two antibiotics, MYC078 showed resistance to streptomycin, and MYC061, MYC093, and MYC096 were sensitive. 55.5% of the strains showed phenotypic-genotypic inconsistencies. Gas chromatography revealed that strains with inconsistencies are characterized by high concentrations of methyl esters of fatty acids 16:0, 18:0, 19:0, and tuberculostearic acid, and low concentrations of methyl esters of fatty acid 14:0. This can directly impact the permeability of the cellular mycomembrane and drug resistance in strains.

1. INTRODUCCIÓN

Durante varias décadas, los antibióticos han sido fundamentales en la lucha contra las enfermedades infecciosas causadas por bacterias y otros microorganismos. Sin embargo, los microorganismos causantes de enfermedades que se han vuelto resistentes a la terapia con antibióticos son un problema de salud pública cada vez mayor. Las infecciones de heridas, la gonorrea, la tuberculosis, la neumonía y la septicemia son sólo algunas de las enfermedades que se han vuelto difíciles de tratar con antibióticos. La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades más antiguas de la humanidad, cuyo tratamiento eficaz fue descubierto a mediados del siglo pasado. Sin embargo, aún dista mucho de ser erradicada como problema de salud pública a nivel mundial. La TB es una enfermedad transmisible que constituye una importante causa de morbilidad, una de las 10 primeras causas de mortalidad del mundo y la segunda debida a un solo agente infeccioso (por encima del VIH/sida). Está provocada por el bacilo *M. tuberculosis*, que se propaga cuando las personas infectadas expulsan bacterias al aire, por ejemplo, al toser. Generalmente afecta a los pulmones (TB pulmonar), pero también puede afectar a otros órganos (TB extrapulmonar) (Organización Mundial de la Salud, 2019)

La incidencia de TB multirresistente (es decir, resistencia al menos a isoniazida y rifampicina) ha aumentado significativamente durante la última década a nivel global, por lo que se han redoblado esfuerzos para buscar nuevas estrategias para combatir este problema. El presente trabajo se enfoca en el estudio de los mecanismos de resistencia atribuidos a polimorfismos en la secuencia de genes que codifican para la síntesis de elementos presentes en la pared celular micobacteriana, estas mutaciones podrían ocasionar una alteración en la permeabilidad de *M. tuberculosis* por lo que el fármaco no sería capaz de atravesar la micomembrana (McGrath y col., 2014). Los genes de estudio son los presentes en el operón *virS-mymA*, *fadD2*, *fbpA*, *fbpB*, *fbpC*, *lipx*, *pkS2*, *accD6*, *Rv0899* y *Rv1695*.

2. MARCO TEÓRICO

Tuberculosis

La TB es una enfermedad altamente transmisible de persona a persona, siendo una de las principales causas de muerte por enfermedad en todo el mundo. Hasta antes de la pandemia (COVID-19), solía ser la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso, superando incluso a el VIH/SIDA (OMS 2022).

2.1. Incidencia de tuberculosis

Según el Informe Mundial sobre la TB 2022 publicado por la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente 10.6 millones de personas se infectaron con TB en 2021, lo que significó un aumento del 4.5% con respecto a 2020. Así mismo, 1.6 millones de personas murieron por causa de la TB (187 000 de las cuales fueron seropositivas para VIH). Por otra parte, la carga de la TB resistente a los medicamentos aumentó cerca de un 3% entre 2020 y 2021, periodo donde se detectaron 450 000 casos nuevos de TB resistente a rifampicina. En 2021, la pandemia de COVID-19 provocó interrupciones en los servicios de control de la tuberculosis, lo que afectó en particular a las actividades de control de la enfermedad (OMS 2022).

En el continente americano, se estimaron 309 000 casos de tuberculosis en el 2021, de los cuales, solo se notificaron a las autoridades sanitarias 21 5116 (OMS 2022).

En México se notificaron 20 225 casos nuevos, de los cuales, 486 son casos de TB drogorresistente.

2.2. *Mycobacterium tuberculosis*

La TB es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) perteneciente al género *Mycobacterium*, familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetaceae*. Es una bacteria que forma parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en el que se incluyen además de *M. tuberculosis* a *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedi* y *Mycobacterium caprae*. De estas especies, *M. tuberculosis* ocasiona la mayoría de los cuadros clínicos en humanos y es la más importante desde el punto de vista patógeno y sanitario (Farga y Caminero , 2012).

2.2.1. Morfología microscópica y tinción

Son organismos de morfología variable, de aspecto bacilar, rectos o ligeramente curvos o cocoides, no forman esporas, flagelos, ni cápsula, aunque en diferentes especies del género *Mycobacterium* se ha descrito una capa de glucopeptidolípidos semejante a una cápsula (Lemassu y col., 1996). Miden de 0.2 a 0.6 μm de diámetro por 1.0 a 10.0 μm de longitud, algunas veces presentan un aspecto filamentosos que por agitación se fragmenta, dando el aspecto antes mencionado.

M. tuberculosis cuenta con la estructura de las bacterias Gram positivas, aun que rara vez se tiñen con la tinción de Gram, debido a que casi no retienen estos colorantes a temperatura ambiente. No obstante, pueden teñirse con carbol fucsina fenicada a temperatura elevada (coloración de Ziehl-Neelsen). Se consideran bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), debido a que resisten la decoloración con ácido en medio alcohólico. Dicha resistencia a la decoloración es debido a un alto contenido de ácidos grasos en su pared celular (Marks, 1974).

2.2.2. Morfología macroscópica

Las colonias de *M. tuberculosis* se describen como elevadas, en forma de verruga, de un color blanquecino, ligeramente amarillento o beige, son difíciles de emulsificar gracias a su alto contenido lipídico en su pared celular. Se consideran de crecimiento lento necesitando como mínimo de 15 a 25 días de cultivo a 37°C para que las colonias se hagan visibles, pudiendo incluso, requerir hasta 8 semanas para un correcto desarrollo colonial.

2.3. Patogénesis de *M. tuberculosis*

La bacteria se transmite de persona a persona a través de pequeñas gotas de saliva (aerosoles) expulsadas por personas con la enfermedad pulmonar activa (Turner y col., 2017). Las gotas de saliva infectadas deben depositarse en el alvéolo pulmonar para poder generar la infección. Es aquí donde el patógeno tiene su primer contacto con las células inmunitarias innatas, si bien estas células son importantes para la respuesta temprana

contra las micobacterias, también son nichos para la replicación de estas a largo plazo (Sia y col., 2019).

La infección también depende de otros factores que pueden reducir o anular la capacidad infectiva de MTB: 1) la calidad del aerosol: no todos los enfermos son capaces de generar una cantidad suficiente de partículas aerosólicas susceptibles de poder internarse en el alvéolo (Escombe y col., 2007) y 2) la calidad del surfactante que permite evitar el colapso de los alvéolos: el surfactante no deja de ser un agente tensoactivo, y como tal, tiene la capacidad de destruir la pared lipofílica de la micobacteria de manera que puede ser destruida por el macrófago alveolar al ser fagocitada (Sánchez y col., 2011).

Los macrófagos son las primeras células en encontrarse con *M. tuberculosis* y también son el primer nicho de replicación de este microorganismo en el fagosoma, inhibiendo su maduración, la generación del fagolisosoma y la inhibición de la apoptosis (Ehrt y col., 2009). Esto lo logra cuando secreta un péptido llamado Antígeno de 6 Kda (ESAT-6 por sus siglas en inglés) lo que facilita la entrada del bacilo al citoplasma para su replicación (Mitchell y col., 2016), terminando con la necrosis del macrófago. Posteriormente los bacilos vuelven a convertirse en extracelulares y son fagocitados por los macrófagos provenientes del espacio intersticial, y por los macrófagos de los alvéolos vecinos (Mitchell y col., 2016).

En el caso de las células dendríticas, éstas procesan a *M. tuberculosis* y presentan unos epítomos que mayoritariamente corresponden a los antígenos secretados más abundantes: el ESAT-6 y el complejo antigénico 85 (Ag85 A, B o C). Este último es responsable de la construcción de la pared celular, ya que permite el ensamblaje de 2 moléculas esenciales: el arabinogalactano micolato y el dimicolato de trehalosa (Kremer y col., 2002). La presentación antigénica estimulará esencialmente los linfocitos T CD4, cuyo subtipo dependerá del tipo de quimiocinas y citocinas que transporta el líquido linfático drenado, y que son esencialmente Th1, Th2, Th17 o Treg. También se pueden generar linfocitos T CD8, pero de manera minoritaria. Generalmente, el subtipo dominante es el Th1, responsable de generar interferón gamma que permite la activación de los macrófagos infectados.

2.4. Técnicas de genotipado de *M. tuberculosis*

2.4.1 Espoligotipificación

El espoligotipado o espoligotipificación, es una técnica basada en la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de espaciadores (fragmentos de ADN no codificante) presentes en la región “DR” (repeticiones directas) en el cromosoma de *M. tuberculosis*. La región DR se compone de una secuencia repetida de 36 pb conservada y de una secuencia espaciadora variable de 35 a 41 pb; el blanco de la tipificación es esta región variable. La combinación de “ausencia o presencia” permite la construcción de los patrones específicos entre cepas similares o diferentes. A cada patrón se le asigna un código numérico, mismo que representa su tipo internacional de espoligotipo, a partir del cual es reconocido a nivel mundial, y con ello determinar si se trata de una familia con distribución global o local (Ramazanzadeh y col., 2020)

2.4.2 Número Variable de Repeticiones en Tándem de Unidades Repetitivas de Micobacteria (MIRU-VNTR)

Esta técnica se basa en la amplificación por PCR de 43 regiones polimórficas empleando iniciadores específicos para cada región o locus, la cuantificación del peso molecular de las Unidades Repetitivas Inter espaciadoras en micobacterias (MIRU-VNTR). La identificación suele hacerse por electroforesis en geles de poliacrilamida, generando un código numérico representativo del número de copias presentes en cada locus el cual puede variar de aislado en aislado. Al igual que con los espoligotipos, cada patrón específico se le asigna un código numérico, es decir, su tipo internacional de MIRU, a partir del cual es reconocido como un genotipo local o global (Viveros y col., 2021).

2.4.3 Linajes del complejo *M. tuberculosis*

Los métodos de epidemiología molecular han sido de ayuda para determinar los diversos linajes existentes a nivel mundial con el objetivo de determinar el origen de las cepas circulantes (Benítez y col., 2020). Las inferencias filogenéticas más recientes, revelan que

los linajes del complejo *M. tuberculosis* adaptados a los humanos tienen una fuerte estructura filogeográfica, que comprende 9 linajes principales que divergen desde un ancestro común y se diversifican en diferentes regiones del mundo (Kanabalan y col., 2021). El linaje L1 está asociado con las regiones del Océano Índico y Filipinas, el linaje L2 se encuentra en Asia oriental, el linaje L3 en África oriental y la India, el linaje L4 es propio de América y Europa. Por otro lado, los linajes L5 y L6 (linajes *M. africanum*) son restringidos a las regiones de África Occidental, mientras que el linaje L7, L8 y L9 se asocian con la región oriental de África (Kanabalan y col., 2021).

2.5. Pared celular

La pared de las micobacterias funciona como una barrera para la penetración de antibióticos como es el caso de las β -lactamasas cuya penetración es 100 veces más lenta en *M. tuberculosis* que en *E. coli*. El género *Mycobacterium* presenta una pared celular única (Fig. 1), cerca del 60% está constituida por lípidos y además de peptidoglicanos, presenta ácidos micólicos. Los ácidos micólicos son lípidos que presentan una alta hidrofobicidad dado que se encuentran α -ramificados, representan el 50% del peso seco de la micobacteria y le brindan a la micobacteria una baja permeabilidad. Esta característica contribuye a la virulencia (Kaufmann, 2001). El modelo más reciente de la estructura de la pared de las micobacterias la divide en tres secciones: una membrana externa que en el caso de las especies patógenas está formada principalmente de glucano y en las especies no patógenas principalmente de proteínas; además, de una pared celular compuesta por la micomembrana, arabinogalactano y peptidoglucano. La micomembrana tiene un grosor aproximado de 7-8 nm, presenta una organización no convencional, la capa interior está formada por ácidos micólicos unidos a arabinogalactano que a su vez se encuentra unido covalentemente al peptidoglicano y una capa externa formada por lípidos libres. Después se encuentra un espacio periplásmico que separa la pared celular de la membrana plasmática, la cual sería el último componente de esta pared micobacteriana. Esta membrana muestra una composición convencional, formada principalmente de fosfolípidos y proteínas (Chiaradia y col., 2017).

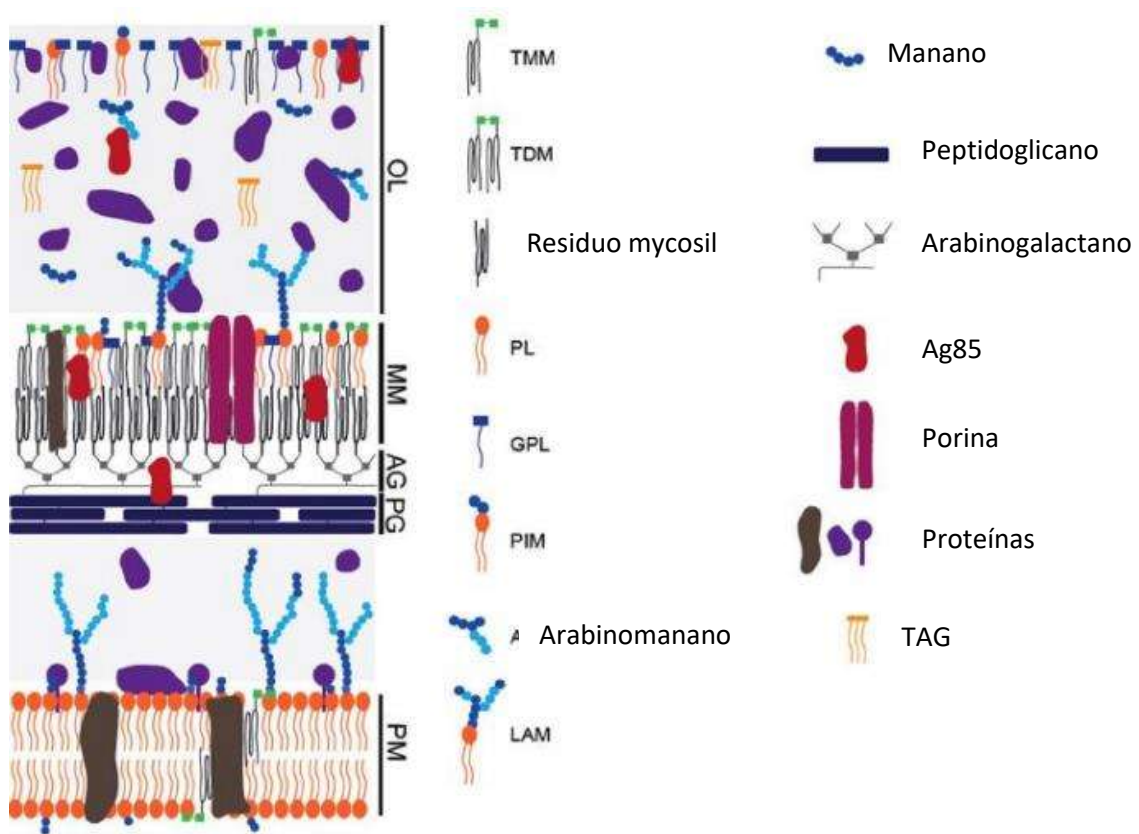


Figura 1. Estructura de la pared celular de *M. tuberculosis*. La membrana externa (OL) está compuesta principalmente de proteínas, carbohidratos y lípidos libres, la micomembrana (MM) compuesta por ácidos micólicos unidos a arabinogalactano (AG) y estos a su vez a peptidoglicano (PG), membrana plasmática (PM) compuesta principalmente por fosfolípidos. TMM (trealosa monomicolatos), TDM (trealosa dimicolatos), PL (fosfolípidos), GPL (glucofosfolípidos), PIM (fosfatidil inositol manosidos), LAM (lipidoarabinomananos), TAG (triacilglicerolos) (Chiaradia y col, 2017).

2.6. Tratamiento de la tuberculosis

El tratamiento de la TB es largo, incluye varios fármacos potencialmente tóxicos y para que sea eficaz, debe hacerse de forma regular y sin interrupciones. Para ello, hay que tener en cuenta 2 principios básicos en el tratamiento antituberculoso: el uso simultáneo de varios fármacos y la duración suficiente del tratamiento (OMS, 2020).

Como ya se mencionó *M. tuberculosis* presenta una pared compleja, lo que se traduce a una permeabilidad reducida para una gran variedad de compuestos (Caminero y col., 2017). Los fármacos deben ser capaces de reducir la población bacteriana rápidamente y prevenir

la selección natural de las cepas (Rabahi y col., 2017). Estos generalmente se dividen en dos grandes grupos: fármacos de primera y segunda línea.

2.6.1 Fármacos de primera línea.

Durante el tratamiento de la TB se usan un conjunto de fármacos para los cuales el microorganismo es susceptible, al usarse dos o más fármacos se previene la generación de resistencia por parte del microorganismo. En general la TB es tratada con 4 fármacos, conocidos como fármacos de primera línea (Tabla 1), que son rifampicina (RIF), isoniazida (INH) pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB) (Coll P., 2009).

Tabla 1. Clasificación de los fármacos antituberculosos por grupos.

Grupo 1: antituberculosos de primera línea orales	Isoniazida, rifampicina, etambutol, pirazinamida
Grupo 2: antituberculosos inyectables	Estreptomicina, kanamicina, amikacina, capreomicina, viomicina
Grupo 3: fluoroquinolonas	Ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino
Grupo 4: bacteriostáticos orales de segunda línea	Etionamida, protionamida, cicloserina, ácido paraaminosalicílico, tioacetazona
Grupo 5: fármacos de eficacia no demostrada (no recomendados por la OMS para su uso habitual en el tratamiento de la tuberculosis MDR)	Clofazimina, amoxicilina/ácido clavulánico, claritromicina, linezolid
Grupo 6: fármacos en desarrollo	Diaril quinoleínas, nitroimidazoles

(Coll, 2009)

La OMS recomienda la administración de estos cuatro fármacos durante 2 meses y un posterior periodo de 4 meses usando solamente los fármacos INH y RIF (OMS, 2020). La INH es el fármaco más comúnmente usado para el tratamiento de la TB. La INH entra al bacilo por medio de difusión pasiva, al ser un profármaco necesita ser activado, este proceso es llevado a cabo mediante la enzima catalasa peroxidasa codificada por el gen *katG* (Urrego, 2020). Esta activación produce una amplia gama de especies reactivas de oxígeno y radicales isotónicos, los cuales son capaces de oxidar o acilar los grupos proteicos, provocando daño en el DNA, peroxidación de lípidos e interfiriendo en el metabolismo

bacteriano (Caminero y col., 2017). La RIF actúa al inicio de la fase de transcripción: bloquea la síntesis del ARN bacteriano fijándose en la ARN-polimerasa bacteriana al nivel de la subunidad codificada por el gen *rpoB*. Al fijarse directamente a esta enzima, ya es eficaz a bajas concentraciones y, al contrario que la mayoría de los antibióticos no interfiere con la ARN-polimerasa de los mamíferos (Dutertre y col., 2017). La PZA es un profármaco que la enzima micobacteriana pirazinamidasa convierte a su forma activa, el ácido pirazinoico. La PZA se difunde pasivamente al interior de los macrófagos, donde se convierte en ácido pirazinoico que se acumula intracelularmente por un sistema ineficiente de bombeo. El ácido pirazinoico actúa sobre su diana, una enzima implicada en la síntesis de los ácidos micólicos, directamente y disminuyendo el pH intracelular por debajo de los límites tolerados por esta enzima (Coll, 2009). El EMB inhibe la arabinosil transferasa III, con lo que se interrumpe la transferencia de arabinosa en la biosíntesis de arabinogalactano, que a su vez interrumpe el ensamblado de la pared celular de la micobacteria (Damtie y col., 2014). Las transferasas de arabinosil están codificadas por los genes *embAB*.

2.6.2 Fármacos segunda línea.

Los fármacos de segunda línea como la protionamida, cicloserina, capreomicina, clofazimina y rifamicinas (Tabla 1) constituyen alternativas terapéuticas para cepas con resistencia farmacológica a los medicamentos de primera línea, sin embargo, estos fármacos son más tóxicos y el tratamiento es más costoso (Becerril y col., 2013). Generalmente son utilizados para el tratamiento de TB resistente a fármacos de primera línea (OMS, 2020). A pesar de su eficacia, ya existen cepas de TB resistentes a algunos fármacos de segunda línea por lo que es de vital importancia descubrir nuevos métodos para combatir la resistencia, comprender a nivel genético el porqué de su resistencia o bien, el empleo de nuevos esquemas de tratamiento (Gómez y col., 2018). Hoy en día existen varios elementos genéticos (Tabla 2) responsables de la resistencia a los fármacos de segunda línea (Swain y col., 2020).

Tabla 2. Factores genéticos implicados en la resistencia a fármacos de segunda línea en *M. tuberculosis*.

Droga(año)	Clasificación química	Objetivo de inhibición	Elemento genético	Función asociada
Moxifloxacina (1996) Gatifloxacina (1999)	Quinolonas/ metoxifluoroquinolona (bactericida)	ADN girasa y ADN topoisomerasa (inhibe la síntesis de ADN)	<i>gyrA, gyrB</i>	Superenrollamientos negativos de ADN bicatenario cerrado circular.
Kanamicina* (1957) Amikacina* (1972)	Amino-glucósidos (bactericidas)	Inhibición de la síntesis dependiente de ARN al unirse a la subunidad 30S (inhibición de la síntesis de proteínas)	<i>rrs</i> <i>eis</i> <i>whiB7</i>	Síntesis de ARN estables Acetilación, supervivencia intracelular asociado con la transcripción de 16S y 23S metilados.
Capreomicina*(1963)	Polipéptido álcico (bactericida)	Inhibición de la subunidad 50S (inhibición de la síntesis de proteínas)	<i>tlyA</i> <i>rrs</i> <i>tlyA</i>	Síntesis de ARN metilados estables, Acetilación de rRNA 16S y 23S, supervivencia intracelular.
Etionamina (1956)	Derivado del ácido isoconítico (bacteriostático)	Inhibición de la síntesis del ácido micólico al unirse a la ACP reductasa inhA (altera la biosíntesis de la pared celular)	<i>eis</i> <i>ethA</i> <i>ethR</i> <i>kasA</i> <i>inhA</i>	Activa el profármaco etionamida la proteína represora EthR transcrional, involucrado en la biosíntesis de ácidos grasos, biosíntesis, Biosíntesis de ácido micólico de la expresión de inhA.

2.7. Fármaco-resistencia en *M. tuberculosis*

2.7.1 Farmacorresistencia adquirida

En bacterias, la resistencia genética generalmente es mediada a través de la adquisición de genes exógenos a través de plásmidos, transposones, integrones y bacteriófagos (Giedraitiene y col., 2011). Sin embargo, en *M. tuberculosis* no se han reportado mecanismos de adquisición de genes de resistencia por dichos elementos. Por lo tanto, la resistencia a fármacos anti-TB se debe principalmente a alteraciones en genes que codifican blancos de antibióticos, en productos genéticos involucrados en la activación de pro-fármacos o regiones reguladoras (Malik y col., 2012). No obstante, no se conoce una alteración genética que por sí misma, dé lugar al fenotipo de tuberculosis MDR (multirresistente) y XDR (de resistencia extendida). Sin embargo, numerosos estudios se han realizado para describir los mecanismos genéticos de resistencia en *M. tuberculosis*, en los cuales se ha observado que la acumulación de mutaciones en diferentes loci de genes específicos da origen a los fenotipos resistentes MDR y XDR (Müller y col., 2013). Esta resistencia se da debido al incumplimiento del esquema de tratamiento generando

mutaciones de resistencia a antibióticos entre aquellas bacterias que logren sobrevivir, demostrando así, su enorme capacidad de adaptación (Gómez y col., 2018).

Existen muchos genes afectados (Tabla 3) responsables de la fármaco-resistencia de *M. tuberculosis* entre los que se encuentran *katG* e *inhA* los cuales provocan resistencia a isoniazida, *rpoB* resistencia a Rifampicina, *pncA* resistencia a Pirazinamida, *rpsL* y *rrs* resistencia a Estreptomicina y *embCAB* resistencia a Etambutol (Swain y col., 2020).

Debido a la existencia de estas mutaciones es necesaria la utilización de más de un fármaco ya que en poblaciones sensibles puede quedar un remanente de bacterias resistentes por generación, estas bacterias, varían según la droga a la cual presenten resistencia; por esto al formular una sola droga para el tratamiento de enfermedades conferidas a micobacterias, se favorece la selección de mutantes resistentes al tipo de medicamento aplicado (Rojas, 2017).

Tabla 3. Factores genéticos implicados en la resistencia a fármacos de primera línea en *M. tuberculosis*.

Droga(año)	Categoría	Objetivo de inhibición	Elemento genético	Función asociada
Isoniazida (1952)	Ácido isótonico (bactericida)	Enoil-(acil-proteína transpotadora) reductasa que incluye catalasa peroxidasa enoil ACP dependiente de NADH, 3-Oxoacyl ACP, βcetoacyl ACP) (inhibición de la síntesis de la pared celular)	<i>katG, inhA, kasA, ahpC, niA, fadE24, ndh</i>	Supervivencia intracelular, biosíntesis de ácidos micólicos, biosíntesis de ácidos grasos, defensa frente al estrés oxidativo asociado con bomba de salida, degradación de lípidos y ácidos grasos, transferencia de electrones del NADH a la cadena respiratoria.
Rifampicina (1961)	Rifamicina (bactericida)	ARN polimerasa, subunidad β (inhibición de la síntesis de ARN)	<i>fadG1, rpoB, rpoA, rpoC</i>	Vía de síntesis de ácidos grasos Transcripción del ADN a síntesis de ARN
Etambutol (1961)	Etilendiamina (bacteriostático)	Atabinosil transferasa (inhibición de la síntesis de rabinogalactano)	<i>embA, embB, embC, embR</i>	Asociado a la biosíntesis de la pared celular micobacteriana Regulador de síntesis del operón embCAB
Pirazinamida (1952)	Pirazina (bacteriostático/bactericida)	Pirazinamidasa; proteína ribosómica1 subunidad ribosómica 30S, citoplasma	<i>rmLD, iniA,, pncA, rpsA, panD, dpC1</i>	Biosíntesis de dTDP-L-ramnosa, asociada con bombas de flujo, biosíntesis de pantotenato, degradación de proteínas, hidroliza prote en presencia de ATP
Estreptomicina (1944)	Aminoglucósido (bacteriostático)	Proteína ribosómica 30S, 16S y 7-metil guanosina metiltransferasa (inhibición de arabinoga-lactano y síntesis de proteínas)	<i>gpsL, rpsL, rrs, gidB</i>	Involucrado en la degradación del ARNm, probable división de proteína B inhibida por glucosa

(Swain y col., 2020).

2.7.2 Resistencia constitutiva a los antibióticos de *M. tuberculosis*.

La resistencia constitutiva o intrínseca, se define como la fármaco-resistencia de cualquier especie bacteriana que no ha sido adquirida como resultado de la exposición a antibióticos la cual puede estar dada por diferentes mecanismos como mutaciones genéticas, permeabilidad de la pared celular y bombas de e-flujo (Fig. 2) (Fajardo y col., 2008).

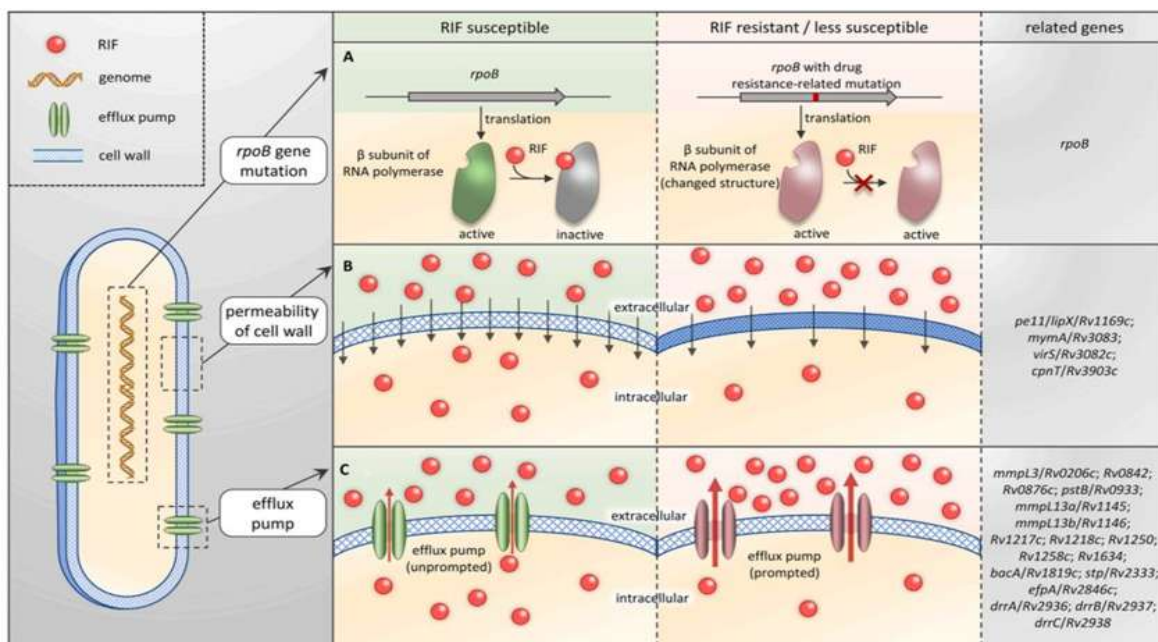


Figura 2. Mecanismos y genes relacionados con la resistencia a RIF en *M. tuberculosis* (Ge Xu y col., 2021)

a) Permeabilidad reducida de la pared celular micobacteriana

La resistencia intrínseca en MTBM. *tuberculosis* se ha atribuido al hecho de poseer una pared celular compleja constituida por una gran cantidad de lípidos, proteínas y polisacáridos que le confieren una característica hidrófoba con permeabilidad celular restringida para un gran número de compuestos antibacterianos (Gómez y col., 2018). Las capas de peptidoglucano y arabinogalactano limitan la entrada de moléculas hidrófobas, mientras que la capa de ácidos micólicos limita el acceso de ambas moléculas. Antibióticos hidrofóbicos pueden ingresar a la célula por difusión a través de la bicapa lipídica hidrofóbica, mientras que los antibióticos hidrofílicos que no se pueden difundir a través de la pared celular utilizan canales como las porinas. Hasta la fecha, las porinas MspA y

OmpATb han sido identificadas y caracterizadas en *M. smegmatis* y MTB, respectivamente, aunque no es claro cuál es el papel que desempeñan estas proteínas en la fármaco-resistencia de micobacterias, específicamente en MTB (Gómez y col., 2018).

a.1. Genes de interés de estudio relacionados con la permeabilidad de la pared celular.

virs: participa en la remodelación de la arquitectura de la envoltura celular bacteriana, una mutación en el gen *virs* de MTBM. *tuberculosis* provoca estructuras alteradas de la pared celular y contenido alterado de ácidos micólicos, media su respuesta bajo estrés ácido, lo que significa que puede detener la acidificación fagosómica (Singh, 2019).

mymA: es un operón (Rv3083 hasta Rv3089) el cual es inducido en macrófagos, tras la exposición a pH ácido. Necesario para mantener la composición adecuada de ácido micólico y la permeabilidad de la pared celular de *M. tuberculosis* en pH ácido (Farhat y col., 2019)

pks2: está involucrado en la síntesis de ácidos ftioceránicos, el cual es uno de los componentes de acilo graso ramificado con metilo en el sulfolípido-I (SL-I). *pks2* proporciona ácido hidroxftioceránico para la síntesis de SL-I (Bellerose y col., 2020).

accD6: El papel de *accD6* (Rv2247) es en la biosíntesis del ácido micólico de *M. tuberculosis*. Debido a su papel central en el metabolismo de los ácidos grasos, la identificación de la carboxiltransferasa micobacteriana que cataliza la síntesis de malonil-CoA ha sido el tema más importante desde los inicios. *accD6* codifica una acetil-CoA carboxiltransferasa funcional que suministra a *M. tuberculosis* malonil-CoA₁₄ (Pawelczyk y col., 2017).

fadD2: participa en el metabolismo de ácidos grasos, confiere resistencia a PZA debido a que mantiene niveles intracelulares de Acyl-CoA para procesos metabólicos posteriores, la PZA reduce la síntesis de ácidos grasos en el bacilo (Rosen y col., 2017).

fbpA*, *fbpB* y *fbpC: genes que codifican a las proteínas FbpA, FbpB y FbpC las cuales combinan ácidos micólicos en arabinogalactano, liberando ésteres metílicos

corrosivos micólicos (MAME, por sus siglas en inglés) o trehalosa, produciendo dimicolato de trehalosa (TDM; también conocido como factor cuerda), lo cual tiene un efecto de impermeabilidad en la pared celular (Ranjitha y col., 2020)

Rv0899: expresa una proteína denominada ArfA, la cual, es una proteína de membrana codificada por un operón que se requiere para apoyar el crecimiento bacteriano en ambientes ácidos. ArfA es la primera proteína de unión a peptidoglicano que se identifica en *M. tuberculosis*. Sus funciones en la protección del estrés ácido y la unión de peptidoglicanos sugieren un vínculo entre la respuesta al estrés ácido y las propiedades fisicoquímicas de la pared celular micobacteriana (Yao y col., 2012).

b) Modificación y degradación enzimática de medicamentos

La producción de enzimas es quizá un mecanismo de respuesta bacteriana a los antibióticos, ya que estas utilizan una serie de estrategias para superar las propiedades tóxicas de los antibióticos. Un ejemplo de esto es la modificación de medicamentos a través de kinasas, acetiltransferasas, adeniltransferasas, glicosiltransferasas y ADP-ribosiltransferasas (Gómez y col., 2018). En MTB, la modificación enzimática de medicamentos se debe principalmente a la metilación del ARNr. Por ejemplo, la resistencia intrínseca de MTB a los macrólidos y lincosamidas, se debe al gen *erm37*, el cual codifica una metiltransferasa ARNr (Buriánková y col., 2004). Esta enzima altera las estructuras de los ribosomas de MTB a través de la metilación del 23S ARNr reduciendo la afinidad de los macrólidos y lincosamidas a los ribosomas e impidiendo su actividad inhibitoria en la síntesis de proteínas (Akbergenov y col., 2011). Otro ejemplo es la metilación del ARNr que genera resistencia a capreomicina (CAP) y viomicina, dos medicamentos utilizados para tratar la TB-MDR. La CAP interactúa con las hélices 69 y 44 de las proteínas ribosomales 16S y 23S RNAr respectivamente, resultando en la inhibición de la síntesis de proteínas (Buriánková y col., 2004). Estudios genéticos, han sugerido que la resistencia a estos dos medicamentos se debe a mutaciones en el gen *tlyA*, el cual codifica para una metiltransferasa (2'-O-metiltransferasa).

c) Bombas de e-flujo como mecanismo de resistencia a medicamentos anti-TB

Las bombas de e-flujo, son proteínas transportadoras localizadas en la membrana citoplasmática de todos los tipos de células y actúan como transportadores activos, ya que requieren una fuente de energía para realizar su función. En sistemas de eflujo bacterianos, probablemente su papel fisiológico, es proteger a la célula contra moléculas tóxicas, incluyendo antibióticos clínicamente importantes, al transportarlos una vez que ingresan a la célula bacteriana hacia el ambiente extracelular (Gómez y col., 2018). Esta característica reduce la concentración intracelular de los antibióticos a niveles sub-inhibitorios (fig. 3) y de esta manera se piensa que promueven la emergencia de fármaco-resistencia (Kumar y col., 2005). Genes que codifican bombas de eflujo están constitutivamente expresados en células wild-type; por lo que se ha sugerido que dichos sistemas confieren resistencia de bajo nivel a múltiples medicamentos, sus actividades brindan una mejor tolerancia a los medicamentos y potencian la adquisición y acumulación de mutaciones cromosomales que confieren altos niveles de resistencia (Kumar y col., 2005).

2.8. Uso de la secuenciación de genomas completos para la identificación de polimorfismos asociados con la resistencia a los antibióticos.

Los genomas bacterianos de la misma especie contienen un conjunto común de genes denominado genoma central. A pesar de ello, la variabilidad entre los genomas bacterianos de la misma especie ocurre por una variedad de razones, que incluyen mutaciones puntuales, recombinación homóloga y diferencias en el contenido del genoma (Schürchy col., 2018). Las causas de la variabilidad en el contenido del genoma son grandes inserciones, deleciones, reordenamientos del genoma y transferencia de ADN exógeno y elementos extracromosómicos como plásmidos y fagos. Esto da como resultado un conjunto de genes que está presente de forma variable en los miembros secuenciados de una especie y se denomina contenido de genes o genomas accesorios (Tettelin y col., 2005).

Hay una variedad de enfoques para analizar estos datos genómicos con fines epidemiológicos y de control de infecciones. En un alto nivel, el filotipado (interrelaciones de cepas basadas en la historia evolutiva asociada a la secuencia) puede respaldar las investigaciones epidemiológicas para determinar la fuente y las rutas de las infecciones, rastrear la transmisión cruzada de patógenos

asociados con la atención médica e identificar subpoblaciones o linajes virulentos resistentes a los antibióticos (Schürchy col., 2018). La tipificación de cepas por secuenciación del genoma completo (WGS) basada en SNP se puede realizar a través del mapeo basado en referencias de lecturas o contigs ensamblados. Múltiples estudios han realizado la comparación de las lecturas de secuenciación contra un genoma de referencia (Kwong y col., 2016).

En caso de sospecha de TB, lo primero a realizar una vez que se sospeche de un caso de tuberculosis, es la confirmación del confirmar el diagnostico microbiológicamente. Se utilizan técnicas para la identificación de la bacteria como la baciloscopia, debido a que es el método más rápido, barato y por lo tanto más accesible, aunque dicha técnica no nos brinda información sobre resistencia hacia los antibióticos. Por otra parte, el cultivo de *M. tuberculosis* en medio sólido tarda más de 2 semanas en crecer, por lo que la obtención de resistencias fenotípicas puede demorar hasta seis semanas en dar resultados (Viñuelas y col., 2017). Debido a lo anterior mencionado, fue necesario buscar alternativas que determinaran en menor tiempo las resistencias hacia los antibióticos.

En años recientes se realizaron múltiples estudios y se determinó que la resistencia a los antibióticos en las bacterias incluyendo *M. tuberculosis*, es causada a la presencia de proporcionada por polimorfismos de un solo nucleótido en el genoma de la bacteria (Macedo y col., 2018), por lo que se desarrollaron diferentes técnicas para la determinación de resistencia hacia los antibióticos como la secuenciación del genoma completo (WGS).

2.8.1 Secuenciación del genoma para la determinación de la drogorresistencia

La secuenciación del genoma completo de *M. tuberculosis* inició en 1998, donde se secuenció una cepa aislada en Estados Unidos denominada H37Rv. Se identificó que dicho genoma contiene un aproximado de 4.4 millones de pares de bases (Cole y col., 1999). La secuenciación del genoma completo (NGS - Next Generation Sequencing) es la técnica más discriminativa para la determinación de la drogorresistencia, porque permite la identificación de todas las mutaciones individuales en el genoma completo y no solo las canónicas (Macedo y col., 2018). La secuenciación del genoma completo de *M. tuberculosis* demostró ser clínicamente útil para la predicción de resistencias hacia los medicamentos incluso más rápido que las pruebas de susceptibilidad fenotípica y pruebas comerciales (Yang y col., 2022), además, esta técnica nos brinda un perfil completo y preciso de susceptibilidad o resistencia a un determinado fármaco, lo cual es muy importante para el triunfo del tratamiento y el control de la propagación de la enfermedad (Jajou y

col., 2019). A pesar de ser una técnica muy buena y debido a las limitaciones experimentadas en países con recursos limitados, se prefiere el uso de otras herramientas. Dentro de las limitantes se encuentran: la falta de experiencia para configurar bibliotecas y analizar datos de secuenciación, el costo del equipo y el costo general de funcionamiento (Chisompola y col., 2020).

2.9 Discrepancias entre la resistencia a los antibióticos fenotípica (antibiograma) y la genotípica (mutaciones en genes canónicos).

Además de la secuenciación del genoma completo se desarrolló el uso de pruebas moleculares de susceptibilidad (DST), que pueden detectar mutaciones que confieren farmacoresistencia a medicamentos antituberculosos específicos. Los ensayos moleculares de uso común avalados por la OMS (también denominadas pruebas comerciales) son las pruebas GenoType[®] MTBDR *plus* (Hain Lifescience, Nehren, Alemania) y Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Las ventajas de estas DST son el tiempo de respuesta para el resultado y un menor riesgo biológico en comparación con la prueba de susceptibilidad fenotípica (Kang y col., 2019). La prueba MTBDR *plus* es un ensayo que puede detectar la resistencia tanto a INH como a RIF. Este ensayo utiliza sondas para mutaciones en regiones específicas de *katG* e *inhA* para MTB resistente a INH y de *rpoB* para MTB resistente a RIF. Mientras que la prueba Xpert MTB/RIF detecta solo *M. tuberculosis* resistente a RIF (Ling y col., 2008).

Cuando las pruebas fenotípicas y moleculares de susceptibilidad a fármacos (pDST) se realizan secuencialmente o en paralelo, invariablemente se producen resultados discordantes. Las razones de los resultados contradictorios van desde errores técnicos hasta mutaciones silenciosas (Mathys y col., 2014), mutaciones fuera de la región determinante de resistencia al antibiótico, mutaciones en disputa con concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) por debajo de la concentración crítica en los sistemas DST (Miotto y col., 2018) y heterorresistencia.

La mayor limitante de las pruebas comerciales es que van enfocadas solo a mutaciones en los genes canónicos (Ling y col., 2008), pero en recientes investigaciones, se ha encontrado que diferentes cepas presentan resistencia fenotípica y utilizando pruebas comerciales se

demuestra que genotípicamente no es resistente (Kang y col., 2019), ante esta discrepancia, se han corroborado los resultados genotípicos utilizando la secuenciación del genoma completo, confirmando que no existen mutaciones en los genes típicos o canónicos, pero sí pudieron determinar que la farmacorresistencia estaba dada por otras mutaciones en otros genes que no son los típicos o canónicos (Feliciano y col., 2019).

3. ANTECEDENTES

La tuberculosis es una enfermedad global, por lo que muchos países hacen un esfuerzo por comprender y mitigar los efectos generados por mutaciones en *M. tuberculosis*. México es un país que colabora en la investigación de este patógeno para su erradicación a nivel mundial. El laboratorio de genética molecular microbiana cuenta con una colección de más de 100 cepas de *M. tuberculosis* donadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública en Michoacán. Dentro de nuestro grupo de trabajo se han realizado investigaciones previas sobre mutaciones en genes de *M. tuberculosis* asociados a resistencia a los antibióticos, en la vía de síntesis de ácidos micólicos y en genes de la familia PE/PPE. En 2017 se realizó un análisis comparativo de los polimorfismos en la secuencia de genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos entre 5 cepas meníngeas (MYC003, MYC004, MYC036, MYC037, MYC055) de *M. tuberculosis* y sus homologas en cepas pulmonares depositadas en base de datos públicas, donde se determinaron variaciones genómicas exclusivas en la secuencia de los genes *pcaA* y *mmaA4*, cuyas proteínas codificadas están involucradas en la síntesis de elementos lipídicos de la pared celular micobacteriana. Dichas variaciones podrían modificar el perfil de ácidos micólicos de la envoltura externa de *M. tuberculosis* y por tanto modificar la permeabilidad de esta (Negrete-Paz, 2017).

Por otro lado, en 2018 se realizó un análisis *in silico* del efecto de las variaciones en la secuencia del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* utilizando 37 aislados, 21 pertenecientes al estado de Michoacán y 16 del estado de Querétaro. Donde un 81.09% de las cepas no presentaron ninguna mutación puntual y solo un 18.91% sí presentaron mutaciones. Las cepas que presentaron mutaciones fueron MYC082, MYC091, MYC094, MYC098, MYC101, MYC116 y MYC118, de las cuales solo la cepa MYC118 presentó la mutación Thr589Asp que se encuentra fuera de la zona RRDR, lo que sugiere que dichas cepas pueden presentar resistencia a rifampicina (Soto-Armas, 2018).

En el año 2020 se secuenciaron 10 cepas MYC de las cuales 7 son fenotípicamente resistentes al menos a un antibiótico de primera línea. Sin embargo, al realizar una búsqueda de polimorfismos en genes diana, se identificaron diferencias fenotipo-genotipo

en el perfil de resistencia. En 6 de las cepas secuenciadas no se encontraron mutaciones que pudieran explicar la resistencia fenotípica a isoniazida, rifampicina, estreptomicina y pirazinamida. Por lo que este estudio sugiere la realización de una búsqueda de polimorfismos en genes asociados a permeabilidad celular con el objetivo de identificar asociaciones con los perfiles de resistencia a antibióticos (Negrete-Paz, 2020. Comunicación personal)

4. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es un problema de salud pública, considerada una emergencia mundial por la OMS. Si bien la mayoría de los casos de tuberculosis son sensibles a medicamentos, la tuberculosis resistente representa una amenaza emergente para el control mundial de la enfermedad.

Dicha resistencia es comúnmente explicada por la presencia de mutaciones en genes específicos ya reportados. Sin embargo, existen cepas en donde se observan inconsistencias en la fármaco resistencia fenotípica-genotípica.

Estas inconsistencias podrían estar dadas por mutaciones en genes involucrados en mecanismos de resistencia intrínsecos, como la permeabilidad celular. Por lo que este trabajo pretende identificar las mutaciones en los genes *virS*, *mymA*, *fadD2*, *fbpA*, *fbpB*, *fbpC*, *lipx*, *pks2*, *accD6*, *Rv0899*, *Rv1695* que pudieran estar asociados con los fenotipos resistentes.

5. HIPÓTESIS

Los genes involucrados en la permeabilidad de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* *virS*, *mymA*, *fadD2*, *fbpA*, *fbpB*, *fbpC*, *lipx*, *pkS2*, *accD6*, *Rv0899* y *Rv1695* sufren mutaciones que generan una alteración en la composición de la pared celular ocasionando fenotipos de drogoresistencia.

6. OBJETIVOS

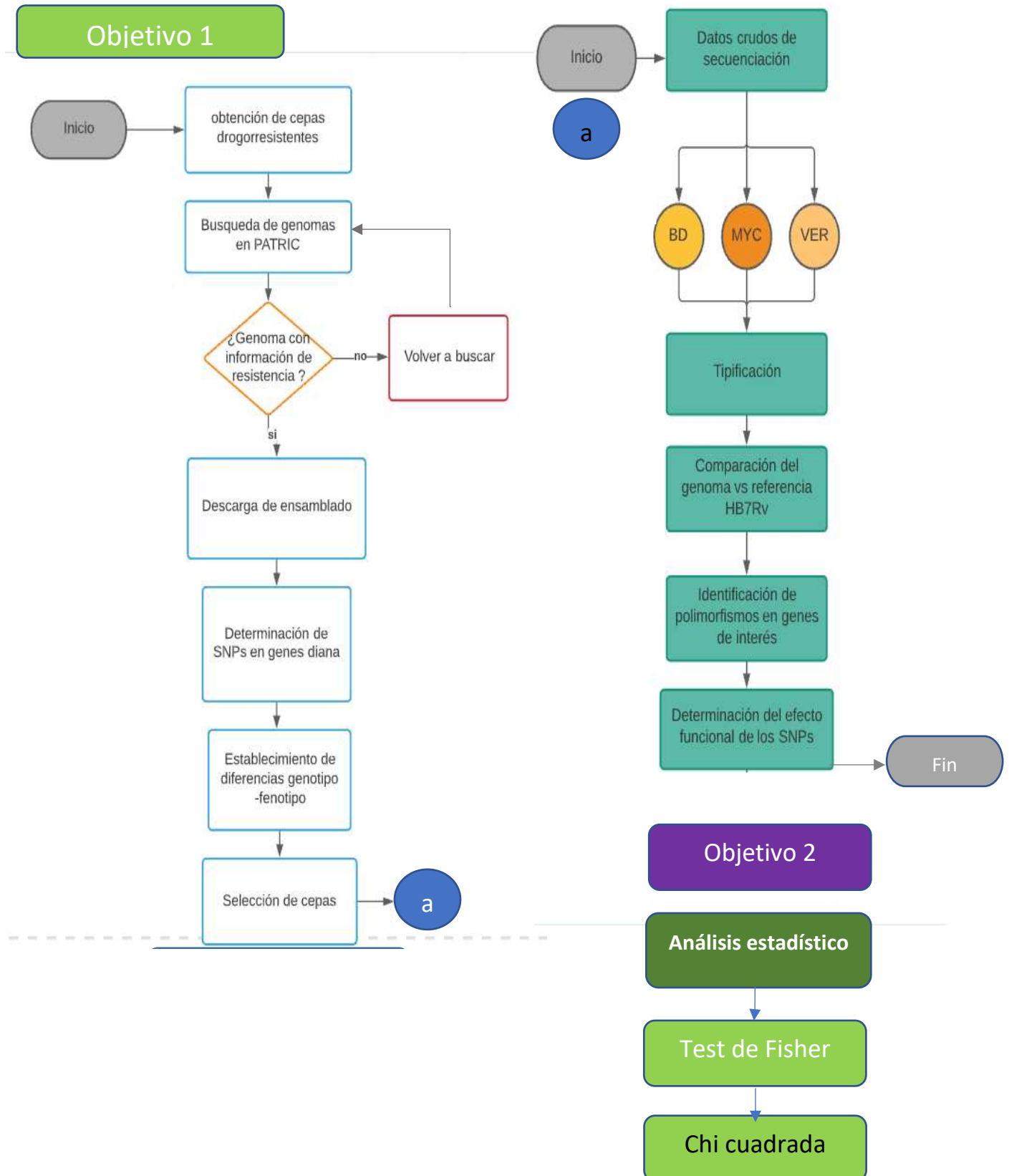
6.1 Objetivo General

Identificar polimorfismos en la secuencia de genes involucrados en la permeabilidad de pared celular de cepas de *M. tuberculosis* con fenotipo drogoresistente.

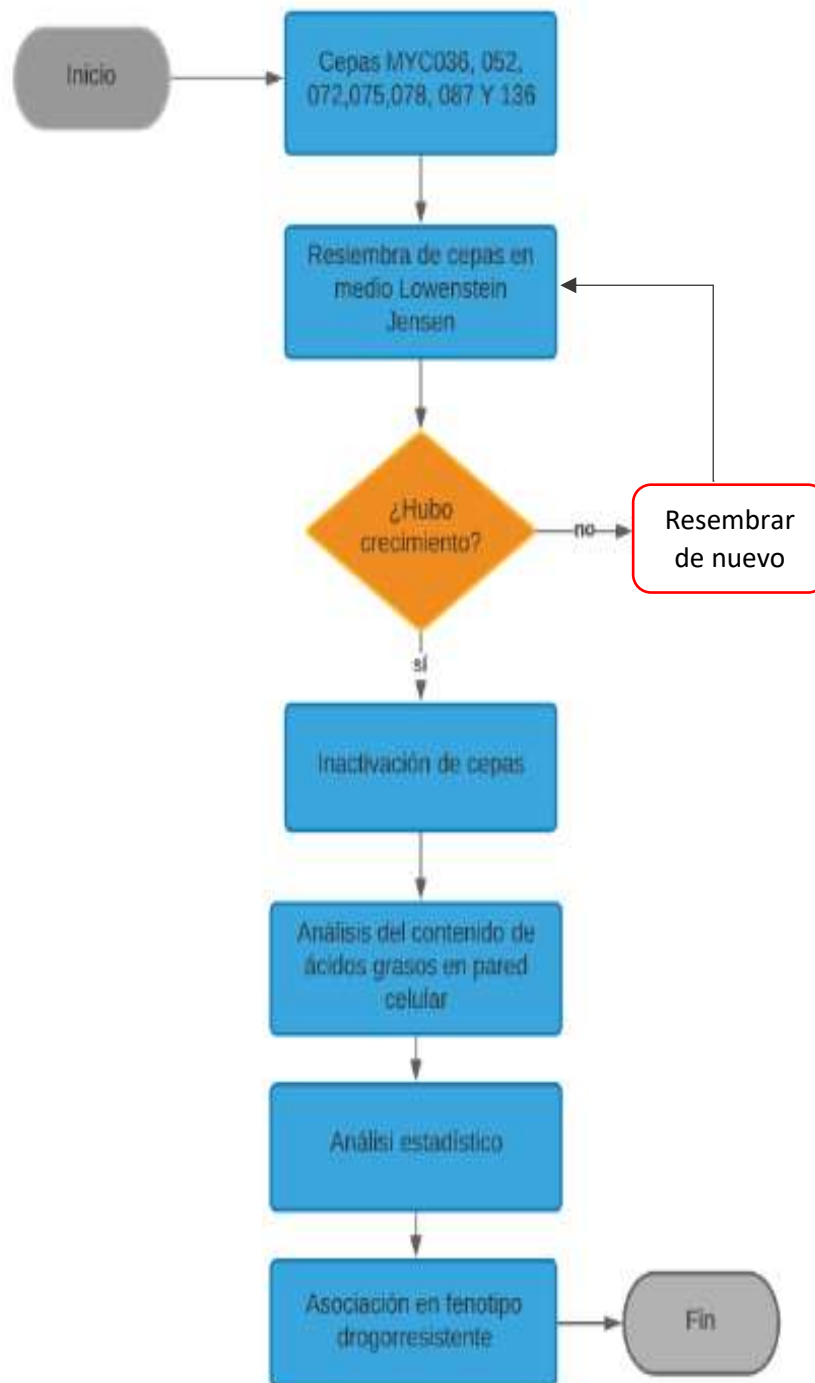
6.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de los polimorfismos encontrados a nivel de las proteínas presuntivas codificadas por los genes evaluados.
2. Establecer asociaciones entre los polimorfismos encontrados con el perfil de resistencia fenotípico.
3. Precisar la relación entre los polimorfismos encontrados y la composición de ácidos grasos presentes en la pared celular micobacteriana de las cepas seleccionadas.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Objetivo 3



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material biológico

En este trabajo se utilizaron 7 cepas de la colección MYC del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Tabla 4). Las cuales fueron previamente secuenciadas mediante tecnología Illumina y en las cuales se identificaron diferencias en el perfil de resistencia fenotípico-genotípico (Tabla 5).

Tabla 4. Características de las cepas de estudio

CLAVE	SEXO	EDAD	MUNICIPIO
MYC036	Mujer	21	Lázaro Cárdenas
MYC072	Hombre	63	Morelia
MYC075	Hombre	NR	NR
MYC078	Hombre	1	Lázaro Cárdenas
MYC087	Hombre	74	Chilchota
MYC136	Hombre	24	NR

NR: No reportado

Tabla 5. Resistencia genotípica-fenotípica a antibióticos en cepas de la colección MYC

Cepa	Resistencia fenotípica 1ra línea					Resistencia genotípica 1ra línea tb-profiler				
	RIF	INH	PZA	EMB	STR	RIF	INH	PZA	EMB	STR
36	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
52	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
61	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
72	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
75	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
78	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
87	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
93	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
96	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
136	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S

RIF: rifampicina; INH: isoniazida; PZA: pirazinamida; EMB: etambutol; STR: estreptomina; S: Susceptible; R: resistente

8.1.1 Otras cepas a utilizar

Además de las cepas MYC se utilizaron 4 cepas causantes de TB pulmonar, aisladas en el estado de Veracruz (Zenteno-Cuevas y col., 2020) que presentan diferencias en el perfil de resistencia fenotípico-genotípico (Tabla 6). Los archivos crudos de secuenciación de estas cepas se encuentran disponibles en *Genbank*.

Por otra parte, se tomó en cuenta un estudio de epidemiología genómica en *Mycobacterium tuberculosis* realizado en el estado de Nuevo León (Mejia y col., 2022) donde se seleccionaron aquellas cepas con discrepancias en sus resistencias fenotípicas y genotípicas. Los genomas de las cepas utilizadas en dicho estudio están disponibles en *GenBank*.

Adicionalmente se llevó a cabo la búsqueda de genomas de cepas de *M. tuberculosis* que cuenten con información fenotípica de resistencia a isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomicina cuya resistencia haya sido determinada mediante MGIT960. La búsqueda se realizó en la base de datos *PATRIC* (patricbrc.org). Se realizó la selección de 100 cepas, 20 para cada antibiótico y se descargaron sus respectivos archivos de secuenciación en formato fastq (archivos crudos).

8.1.2 Análisis de la calidad de los genomas descargados

Se analizaron los archivos de secuenciación de cada genoma para conocer su calidad mediante el programa FastQC, el cual es una herramienta de control de calidad para datos de secuencia de alto rendimiento. Se estableció que las lecturas tuvieran un nivel en la escala de calidad de Phred mayor a 20, siendo 40 el nivel de calidad muy buena y menor de 20 mala calidad.

8.1.3 Recorte y filtrado de genomas con mala calidad de lecturas

Se realizó el recorte de calidad de secuencias mediante la suite de análisis genómico Galaxy (usegalaxy.org), con la herramienta Trim Galore. Este programa filtra o recorta las lecturas de mala calidad para el mejoramiento de lecturas de los archivos de secuenciación. Se utilizó en su modo automático con los valores por defecto.

8.1.4 Determinación de resistencia genotípica

Para la determinación de la resistencia genotípica se utilizó el servidor *TB-Profiler* (Faksri y col., 2019), dicho servidor analiza los datos de secuenciación del genoma completo de *M. tuberculosis* para predecir el linaje y la resistencia a los medicamentos. TB-Profiler busca polimorfismos de un solo nucleótido y deleciones, y su relación con la farmacoresistencia a los antibióticos. Además, predice linajes, familias y espoligotipos. Los datos de la resistencia genotípica se compararon con los del banco de datos PATRIC y aquellas que verdaderamente tuvieran inconsistencias fenotípicas-genotípicas en su drogorresistencia fueron seleccionadas para continuar con este trabajo.

Tabla 6. Comparación de resistencia genotípica-fenotípica para cepas de Veracruz

Cepa	Resistencia fenotípica 1ra línea				Resistencia genotípica 1ra línea tb-profiler			
	Rifampicina	Isoniacida	Pirazinamida	Etambutol	Rifampicina	Isoniacida	Pirazinamida	Etambutol
882-16	R	R	S	R	R	S	S	R
906-16	R	R	S	S	S	S	S	S
480-14	R	R	R	R	R	S	S	S
226-15	R	R	R	S	R	R	S	S

8.1.5 Identificación de los espoligotipos de las cepas seleccionadas.

A partir de los datos crudos de secuenciación de las cepas seleccionadas se llevó a cabo la espoligotipificación *in silico* mediante *SPOTyping*, el cual predice el espoligotipo, linaje y sublinaje de las cepas. El programa permite obtener un código binario y un código octal permitiendo identificar familias y claves SIT (Xia y col., 2016).

8.1.6 Identificación de SNP's en los genes de interés de las cepas seleccionadas

Para la determinación de polimorfismos de un solo nucleótido se utilizó el programa *MTBseq* (Kohl y col., 2018), una herramienta automatizada para el mapeo, la llamada de variantes y la detección de variantes filogenéticas y mediadoras de resistencia a partir de datos de secuencias del genoma completo aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta herramienta realiza un alineamiento de nuestras cepas contra el genoma de referencia *H37Rv* para identificar polimorfismos en las cepas drogorresistentes.

8.1.7 Determinación del efecto funcional en las proteínas presuntivas.

Cada variante encontrada fue evaluada a nivel de la secuencia de aminoácidos, mediante *SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)*, la cual es una herramienta basada en la homología de secuencias que clasifica las sustituciones de aminoácidos no toleradas de las toleradas y predice si una sustitución de aminoácidos en una proteína tendrá un efecto fenotípico (Ngak y col., 2012). La idea es que las regiones conservadas evolutivamente tienden a ser menos toleradas y, por lo tanto, es más probable que las sustituciones o inserciones/deleciones de aminoácidos en estas regiones afecten la función. Para la interpretación de los resultados se analiza la puntuación SIFT, la cual es una probabilidad normalizada de observar el nuevo aminoácido en esa posición y varía de 0 a 1. Se predice que un valor mayor a 0.05 será una sustitución tolerada y por lo tanto no afectará a la función de la proteína, así mismo, valores entre 0 y 0,05 será una sustitución no tolerada y afectará la función de la proteína (Ngak y col., 2012).

También se realizó una evaluación de la afectación en la función de las proteínas con *DUET*, un servidor para predecir los efectos de las mutaciones en la estabilidad de las proteínas utilizando un enfoque computacional integrado. DUET consolida dos enfoques complementarios (mCSM y SDM) en una predicción de consenso. El efecto de las mutaciones sobre la estabilidad de la proteína se denota por la diferencia en la energía libre de Gibbs ($\Delta\Delta G$), la cual está dada en Kcal/mol, en donde valores negativos indican sustituciones desestabilizadoras en la proteína (Pires y col., 2014).

8.1.8 Predicción de la estructura de las proteínas

Se modelaron las estructuras terciarias de las proteínas usando el servidor *Swiss model* (Guex y col., 2009) en su modo automático y fueron validadas usando herramientas del paquete Whatif (Vriend, 1990), disponible en <http://swift.cmbi.ru.nl/whatif/>.

Finalmente se realizaron comparaciones locales y globales de las estructuras obtenidas con las referencias disponibles en *PDB* (Protein Data Bank) utilizando *UCSF Chimera*.

8.2 Análisis del contenido de ácidos grasos en pared celular.

8.2.1 Cultivo de las cepas bacterianas

Las cepas MYC se resembraron en medio Lowenstein Jensen y medio sangre, se incubaron a 37°C durante 6 a 8 semanas. Las resiembras se llevaron a cabo en una campana de bioseguridad tipo II A, con prácticas Nivel III (en un área aislada y con uso de mascarilla N98 y vestimenta de protección adecuada).

8.2.2 Inactivación de las cepas bacterianas

La inactivación de las colonias se llevó a cabo en una suspensión acuosa con 600µL de agua a 80°C por 60 min en luz UV.

8.2.3 Análisis de ácidos grasos

Los análisis de ácidos grasos se realizaron a partir de las suspensiones inactivadas como se describió anteriormente. Los cultivos se centrifugaron a 1360 g durante 4 min, y el sedimento se resuspendió en 1 ml de agua destilada.

Los perfiles de ácidos grasos se obtuvieron utilizando el método de extracción de ácidos grasos en célula completa. El método de célula completa se fundamenta en la extracción y metilación del contenido celular microbiano de ácidos grasos presentes en una muestra para su posterior separación y detección por cromatografía de gases (MIDI Technical Note 101. Sasser, 1990). Esto a su vez, permite la identificación y cuantificación de los compuestos a través del Sistema de Identificación Microbiana “The Sherlock TM MIS”. El sistema Sherlock MIS utiliza un estándar de calibración externo desarrollado y manufacturado por Microbial ID, Inc., El estándar es una mezcla de ácidos grasos de cadena saturada que van desde 9 hasta 20 carbonos (C9 a C20) de longitud, incluyendo cinco ácidos grasos hidroxilados sensibles a la presencia de contaminación y a los cambios de presión y temperatura en el sistema. Se lleva a cabo en cuatro pasos: i) saponificación: se agrego un ml de disolución hidróxido de sodio/ metanol, se llevó al vortex por 10 segundos,

posteriormente se calentó a baño maría hasta los 100°C por 5 minutos, de nuevo se llevó al vortex por 10 segundos y después a baño maría a 100°C por 25 minutos.

ii) metilación: se agregaron dos mililitros de una disolución con ácido clorhídrico concentrado 6N y metanol, se llevó al vortex por 10 segundos, luego a baño maría a 80°C por 10 minutos y por último se dejó enfriar en agua con hielo.

iii) extracción: Se agregaron 1.25 ml de una solución con hexano y Metil-butil-éster, posteriormente, 50 µl de estándar 19:0 y rotación por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó por 3 minutos a 2000 rpm y se recuperó la fase superior.

iv) Lavado: Se adicionaron 3 ml de reactivo 4 y se deja rotar por 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 200 rpm por 3 minutos y de nuevo se recuperó la fase superior, (Jensen y col., 2013).

Este procedimiento logra que los ácidos grasos se transformen en ésteres metílicos de ácidos grasos, para favorecer su volatilización en el HPLC.

8.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de asociación entre variables cualitativas mediante Test de Fisher y chi cuadrada para el establecimiento de asociaciones entre los polimorfismos encontrados y la resistencia a isoniácida, rifampicina, estreptomicina, etambutol o pirazinamida.

Se realizó un análisis de asociación entre variables cualitativas mediante Test de Fisher y chi cuadrada para el establecimiento de asociaciones entre los polimorfismos encontrados con el perfil lipídico de la pared celular de las cepas seleccionadas y el perfil de drogorresistencia.

9. RESULTADOS

9.1 Selección de cepas

La distribución geográfica de las 100 cepas seleccionadas (Fig. 3) corresponden a un 12% a Canadá, 11% a Sudáfrica, 10% a Serbia, 10% a Perú, 9% a Países bajos, 9% a China, 8% a Bélgica, 8% a Italia, 8% a Suazilandia, 8% a Reino Unido, 4% Australia, 2% Rusia y 1% Noruega.

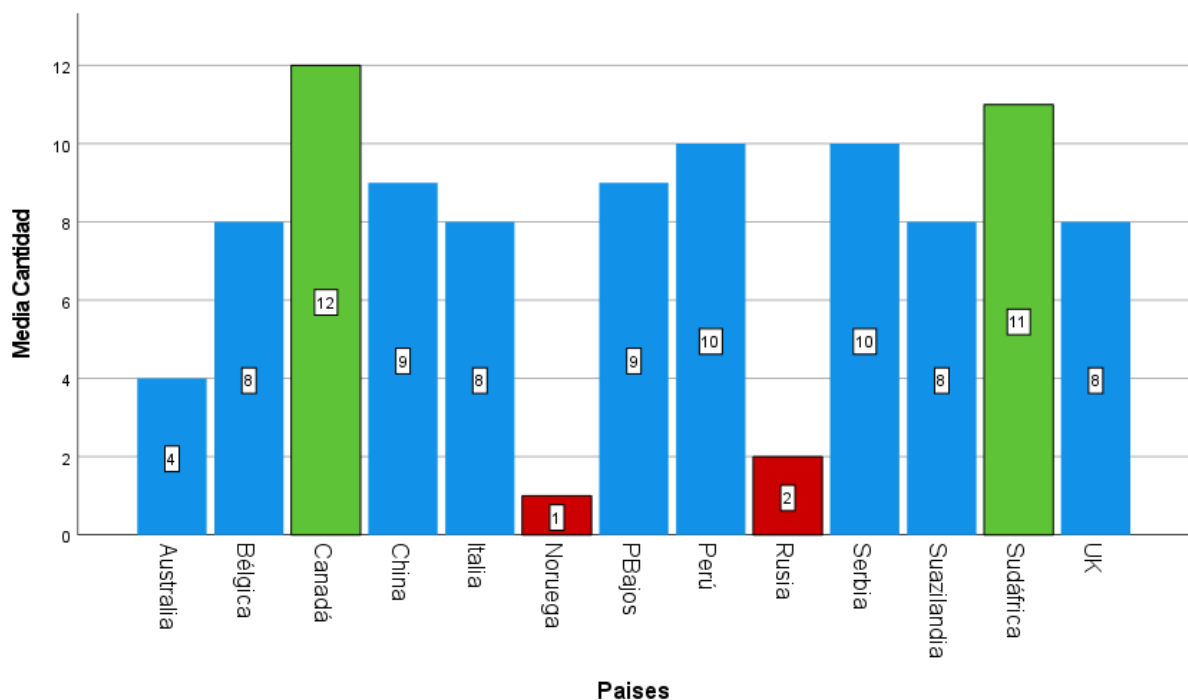


Figura 3: Distribución geográfica de las cepas del banco de datos.

9.2 Recorte de lecturas

De las 100 cepas seleccionadas, 87 necesitaron tratamiento de recorte con el programa Trim Galore para el mejoramiento de la calidad de lectura.

9.3 Genotipificación *in silico*

Se corroboró el espoligotipo, utilizando el servidor TBinsight ingresando el código binario y el código octal. De las 100 cepas se observó que el espoligotipo Beijing 29% es el que predomina, seguido por un 16% espoligotipo T1, 12% espoligotipo LAM9, 8% espoligotipo

CAS, 3% espoligotipo EAI5, 3% espoligotipo 3. 14 cepas arrojaron códigos octales no determinados.

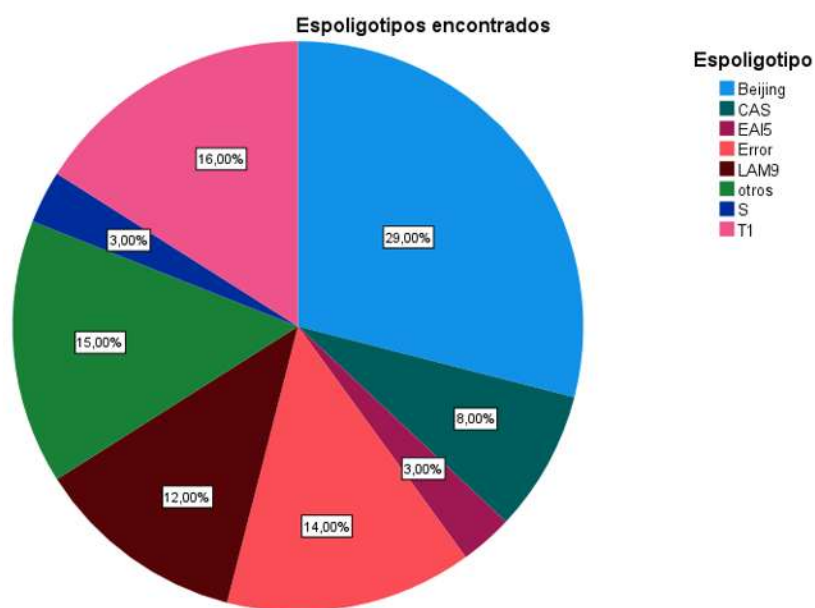


Figura 4: Distribución de espoligotipos

Las familias determinadas en mayor frecuencia fueron: Euro-Americana en un 49% de las y Este de Asia en un 37% (Figuras 4 y 5).

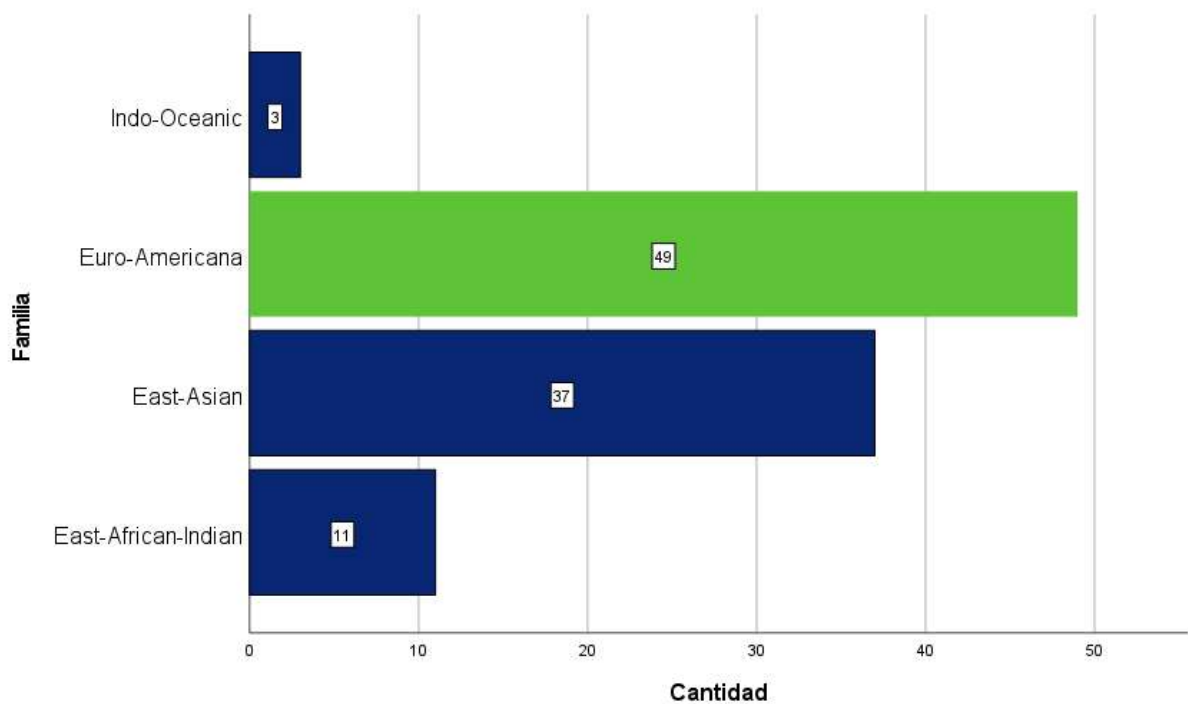


Figura 5: Familias predichas por el programa SpoTyping

9.4 Predicción de linajes mediante TB-profiler

Otros datos que nos proporciona TB-profiler a parte del perfil de resistencia genotípico es la predicción de linajes. Se muestra el porcentaje de los linajes obtenidos (Fig.6) siendo el 32% para el linaje 2.2.1, 24% otros, 10% linaje 4.1.2.1, 8% linaje 4.3.3, 7% linaje 3, 6% linaje 4.8, 5% linaje 4.2.2.1, 3% linaje 1.2.2.2, 3% linaje 2.2.1.1, y 2% linaje 4.

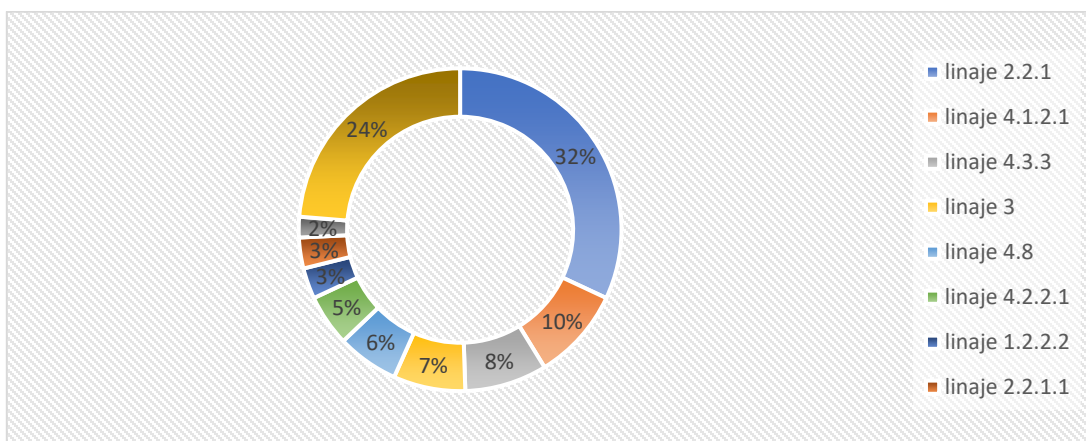


Figura 6: Porcentajes de los linajes predichos por TB-profile

9.5 Cepas seleccionadas

De las 100 cepas analizadas de la base de datos, 7 cumplen el criterio de diferencia entre la farmacorresistencia fenotípica-genotípica (Tabla 7). Así mismo del estudio realizado en Nuevo León 13 presentan inconsistencias, de las cuales 12 pertenecen al linaje 4.

En cuanto a las cepas de Veracruz las cepas 226-15 y 882-16 fueron descartada debido a que mediante TB-profiler se identificaron mutaciones asociadas con resistencia.

El antibiótico que presenta mayor inconsistencia en su perfil de resistencia genotípico-fenotípico es la pirazinamida.

Tabla 7: Cepas que cumplen con el criterio de inconsistencia en su perfil de drogorresistencia

Clave	Linaje	Familia	Espoligotipo	Resistencia fenotípica
SRR22248477	linaje 2	East-Asian	Beijing	Estreptomicina
SRR22248480	linaje 4	Euro-American	LAM	Estreptomicina
SRR22248481	linaje 1	Indo-Oceanic	EAI	Isoniazida
SRR22248488	linaje 4	Euro-American	LAM3	Pirazinamida
SRR22248491	linaje 4	Euro-American	X	Isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol
SRR22248465	linaje 4	Euro-American	T	Pirazinamida
SRR22248466	linaje 4	Euro-American	T	Estreptomicina
SRR22248468	linaje 4	Euro-American	H	Pirazinamida
SRR22248471	linaje 4	Euro-American	T	Pirazinamida
SRR18665441	linaje 4	Euro-American	LAM	Isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol
SRR18665443	linaje 4	Euro-American	X	Etambutol, rifampicina
SRR18665454	linaje 4	Euro-American	X	Isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol
SRR18665465	linaje 4	Euro-American	LAM	Estreptomicina
MYC36	linaje 4	Euro-American	LAM	Pirazinamida, estreptomicina
MYC72	linaje 4	Euro-American	LAM	estreptomicina
MYC75	linaje 4	Euro-American	LAM	Rifampicina
MYC78	linaje 4	Euro-American	X	Isoniazida
MYC87	linaje 4	Euro-American	X	Estreptomicina
MYC136	linaje 4	Euro-American	X	Isoniazida, pirazinamida
ERR3148193	linaje 4	Euro-American	LAM	Estreptomicina
ERR3148213	linaje 4	Euro-American	LAM	Rifampicina, isoniazida
				Isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol

ERR067716	linaje 4	Euro-American	LAM	Isoniazida
SRR6397735	linaje 4	Euro-American	X	Rifampicina, isoniazida
ERR2510827	linaje 4	Euro-American	T1	Pirazinamida
ERR2041775	linaje 4	Euro-American	S	Isoniazida
SRR6367400	linaje2	East-Asian	Beijing	Etambutol
ERR2516418	linaje 2	East-Asian	Beijing	Pirazinamida
ERR551545	linaje 2	East-Asian	Beijing	Pirazinamida

9.6 identificación de polimorfismos de un solo nucleótido

Se identificaron un total de 121 SNP's en los genes *fbpC*, *fadD2*, *fbpB*, *accD6*, *virS*, *Rv3083*, *lipR*, *Rv3085*, *adhD*, *Rv3087*, *tgs4*, *fadD13*, *fbpA* y *pks2* (Tabla 8), de las cuales 30, son sustituciones no sinónimas, de estas, el gen más polimórfico fue *Rv3087*. De los genomas secuenciados en Michoacán solo la cepa MYC072 posee 2 SNP's no sinónimos en el gen *tgs4*. En cuanto a las cepas que presentan resistencia a pirazinamida, el 54.5% de las mismas posee una mutación en la posición 1339 del gen *Rv3087*. Además, se encontraron mutaciones en los genes *pks2*, *Rv3085*, *lipR* y *tgs4*.

Tabla 8: SNP's encontrados en las cepas seleccionadas

Cepa	Tipo	Ref.	Sust.	Pos.	Sinónimo/no sinónimo	Gen
MYC36	SNP	C	T	309/1023	Sinónima	<i>fbpC</i>
MYC36	SNP	T	C	600/1422	Sinónima	<i>accD6</i>
MYC36	SNP	A	G	906/1512	Sinónima	<i>fadD13</i>
MYC72	SNP	C	T	309/1023	Sinónima	<i>fbpC</i>
MYC72	SNP	G	A	126/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
MYC72	SNP	T	C	600/1422	Sinónima	<i>accD6</i>
MYC72	SNP	G	A	567/1488	Sinónima	<i>Rv3083</i>
MYC72	SNP	G	C	549/1425	No sinónima	<i>tgs4</i>
MYC72	SNP	C	A	647/1425	No sinónima	<i>tgs4</i>
MYC72	SNP	A	G	906/1512	Sinónima	<i>fadD13</i>
MYC75	SNP	G	A	768/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
MYC75	SNP	G	A	3591/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
MYC75	SNP	C	A	969/6381	Sinónima	<i>pks2</i>

MYC75	SNP	T	C	600/1422	Sinónima	<i>accD6</i>
MYC75	SNP	T	C	729/927	Sinónima	<i>lipR</i>
MYC75	SNP	G	C	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
MYC75	SNP	A	G	906/1512	Sinónima	<i>fadD13</i>
MYC78	SNP	G	A	3591/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
MYC78	SNP	T	C	600/1422	Sinónima	<i>accD6</i>
MYC78	SNP	T	C	729/927	Sinónima	<i>lipR</i>
MYC78	SNP	G	C	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
MYC78	SNP	A	G	906/1512	Sinónima	<i>fadD13</i>
MYC87	SNP	G	C	933/1017	Sinónima	<i>fbpAc</i>
MYC87	SNP	G	A	3591/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
MYC87	SNP	T	C	600/1422	Sinónima	<i>accD6</i>
MYC87	SNP	T	C	729/927	Sinónima	<i>lipR</i>
MYC87	SNP	G	C	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
MYC136	SNP	G	A	3591/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
MYC136	SNP	T	C	600/1422	Sinónima	<i>accD6</i>
MYC136	SNP	T	C	729/927	Sinónima	<i>lipR</i>
MYC136	SNP	G	C	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
MYC136	SNP	A	G	906/1512	Sinónima	<i>fadD13</i>
SRR6367400	SNP	T	C	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR6367400	SNP	G	A	3591/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
SRR6367400	SNP	G	T	714/978	Sinónima	<i>fbpB</i>
SRR6367400	SNP	T	C	600/1422	Sinónima	<i>accD6</i>
SRR6367400	SNP	A	G	686/1422	No sinónima	<i>accD6</i>
SRR6367400	SNP	T	C	729/927	Sinónima	<i>lipR</i>
SRR6367400	SNP	C	G	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR6367400	SNP	G	C	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
SRR6367400	SNP	A	G	906/1512	Sinónima	<i>fadD13</i>
ERR2516418	SNP	T	C	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
ERR2516418	SNP	G	A	3591/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
ERR2516418	SNP	G	T	714/978	Sinónima	<i>Rv1886c</i>
ERR2516418	SNP	T	C	600/1422	Sinónima	<i>accD6</i>
ERR2516418	SNP	A	G	686/1422	No sinónima	<i>accD6</i>
ERR2516418	SNP	T	C	729/927	Sinónima	<i>lipR</i>
ERR2516418	SNP	C	G	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
ERR2516418	SNP	G	C	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
ERR2516418	SNP	A	G	906/1512	Sinónima	<i>fadD13</i>
ERR067716	SNP	C	T	309/1023	Sinónima	<i>fbpC</i>

ERR067716	SNP	G	A	126/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
ERR067716	SNP	T	C	600/1422	Sinónima	<i>accD6</i>
ERR067716	SNP	G	A	732/1422	Sinónima	<i>accD6</i>
ERR067716	SNP	T	C	725/831	No sinónima	<i>Rv3085</i>
ERR067716	SNP	C	A	647/1425	No sinónima	<i>tgs4</i>
ERR067716	SNP	A	G	906/1512	Sinónima	<i>fadD13</i>
SRR22248477	SNP	G	T	714/978	Sinónima	<i>Rv1886c</i>
SRR22248477	SNP	C	T	669/978	Sinónima	<i>Rv1886c</i>
SRR22248477	SNP	A	G	686/1422	No sinónima	<i>accD6</i>
SRR22248480	SNP	C	T	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR22248480	SNP	A	G	3591/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
SRR22248480	SNP	G	A	105/1488	Sinónima	<i>Rv3083</i>
SRR22248480	SNP	C	T	729/927	Sinónima	<i>lipR</i>
SRR22248480	SNP	G	C	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR22248480	SNP	C	G	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
SRR22248481	SNP	A	G	1436/1683	No sinónima	<i>fadD2</i>
SRR22248481	SNP	G	T	3225/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
SRR22248481	SNP	A	C	947/1023	No sinónima	<i>virS</i>
SRR22248481	SNP	G	C	211/1488	No sinónima	<i>Rv3083</i>
SRR22248481	SNP	C	T	458/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR22248488	SNP	C	T	309/1023	Sinónima	<i>fbpC</i>
SRR22248488	SNP	C	T	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR22248488	SNP	C	T	1473/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR22248488	SNP	A	G	3591/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
SRR22248488	SNP	T	C	1813/6381	No sinónima	<i>pks2</i>
SRR22248488	SNP	C	T	729/927	Sinónima	<i>lipR</i>
SRR22248488	SNP	G	C	751/831	No sinónima	<i>Rv3085</i>
SRR22248488	SNP	G	C	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR22248488	SNP	C	G	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
SRR22248491	SNP	C	T	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR22248491	SNP	G	C	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR22248465	SNP	C	T	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR22248465	SNP	A	G	3591/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
SRR22248465	SNP	G	C	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR22248465	SNP	C	G	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
SRR22248466	SNP	C	T	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR22248466	SNP	C	T	417/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
SRR22248466	SNP	G	A	88/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>

SRR22248466	SNP	G	C	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR22248468	SNP	C	T	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR22248468	SNP	C	T	467/927	No sinónima	<i>lipR</i>
SRR22248468	SNP	G	C	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR22248471	SNP	C	T	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR22248471	SNP	C	G	702/978	Sinónima	<i>Rv1886c</i>
SRR22248471	SNP	G	T	123/1419	Sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR22248471	SNP	G	C	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR18665441	SNP	C	T	309/1023	Sinónima	<i>fbpC</i>
SRR18665441	SNP	C	T	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR18665441	SNP	C	T	309/1023	Sinónima	<i>fbpC</i>
SRR18665441	SNP	C	T	729/927	Sinónima	<i>lipR</i>
SRR18665441	SNP	G	C	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR18665441	SNP	C	G	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
SRR18665443	SNP	C	T	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR18665443	SNP	G	C	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR18665465	SNP	C	T	309/1023	Sinónima	<i>fbpC</i>
SRR18665465	SNP	C	T	939/1683	Sinónima	<i>fadD2</i>
SRR18665465	SNP	A	G	3591/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
SRR18665465	SNP	G	A	126/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
SRR18665465	SNP	C	T	729/927	Sinónima	<i>lipR</i>
SRR18665465	SNP	G	C	1339/1419	No sinónima	<i>Rv3087</i>
SRR18665465	SNP	C	A	647/1425	No sinónima	<i>tgs4</i>
SRR18665465	SNP	C	G	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
SRR18665454	SNP	G	A	3591/6381	Sinónima	<i>pks2</i>
SRR18665454	SNP	A	G	338/1422	No sinónima	<i>accD6</i>
SRR18665454	SNP	T	C	600/1422	Sinónima	<i>accD6</i>
SRR18665454	SNP	T	C	729/927	Sinónima	<i>lipR</i>
SRR18665454	SNP	G	A	749/1107	No sinónima	<i>adhD</i>
SRR18665454	SNP	G	C	1347/1425	Sinónima	<i>tgs4</i>
SRR18665454	SNP	A	G	906/1512	Sinónima	<i>fadD13</i>

9.7 Predicción de la afectación de la función en las variaciones encontradas

Predicciones SIFT: Los resultados muestran que el 33.33% de las sustituciones no sinónimas son no toleradas, por lo que la función de las proteínas codificadas por los genes *mymA*, *accD6*, *fadD2*, *pks2* y *virS* podría verse afectada (Tabla 9).

Tabla 9. Predicciones SIFT

Gen	Sustitución aminoacídica	Predicción SIFT
<i>accD6</i>	D229G	Tolerada
<i>accD6</i>	Q113R	Tolerada
<i>fadD2</i>	D479G	No tolerada
<i>mymA</i>	R183S	Tolerada
<i>mymA</i>	A216E	Tolerada
<i>mymA</i>	L447V	Tolerada
<i>mymA</i>	D30N	Tolerada
<i>mymA</i>	A153V	Tolerada
<i>mymA</i>	V242A	No tolerada
<i>mymA</i>	V251L	Tolerada
<i>mymA</i>	D71H	Tolerada
<i>mymA</i>	A156V	No tolerada
<i>mymA</i>	G250E	No tolerada
<i>pks2</i>	T605A	Tolerada
<i>virS</i>	L316R	No tolerada

Duet: Este servidor utiliza moldes de proteínas para cada gen, las cuales están en formato Protein Data Bank (.pdb). Los resultados se pueden ver en la tabla 10 y muestran que el 73.33% desestabilizará la estructura de las proteínas, esto no quiere decir que las proteínas no se plieguen si no que se vuelven vulnerables a procesos de agregación y degradación.

Tabla 10. Predicciones DUET

Gen	Sustitución	Predicción DUET
<i>accD6</i>	D229G	-0.159 kcal/mol (Destabilizing)
<i>accD6</i>	Q113R	0.12 kcal/mol (Stabilizing)
<i>fadD2</i>	D479G	0.226 kcal/mol (Stabilizing)
<i>mymA</i>	R183S	-0.233 kcal/mol (Destabilizing)
<i>mymA</i>	A216E	-1.312 kcal/mol (Destabilizing)
<i>mymA</i>	L447V	-1.459 kcal/mol (Destabilizing)
<i>mymA</i>	D30N	-0.611 kcal/mol (Destabilizing)
<i>mymA</i>	A153V	0.0 kcal/mol (Destabilizing)
<i>mymA</i>	V242A	-2.659 kcal/mol (Destabilizing)
<i>mymA</i>	V251L	-0.136 kcal/mol (Destabilizing)
<i>mymA</i>	D71H	0.57 kcal/mol (Stabilizing)
<i>mymA</i>	A156V	-0.002 kcal/mol (Destabilizing)
<i>mymA</i>	G250E	-1.04 kcal/mol (Destabilizing)
<i>virS</i>	L316R	-2.18 kcal/mol (Destabilizing)

Comparando los resultados de los servidores SIFT y DUET se logra observar a una variación entre los resultados de ambos, donde solo el 40% concuerda en que los cambios realizados pueden alterar a la proteína. Las predicciones de ambos servidores evalúan los cambios a nivel individual y no nos brindan información sobre posibles alteraciones estructurales en la proteína global y si esto tendrá un efecto negativo o positivo en su funcionamiento.

9.8 Análisis de ácidos grasos

Para el análisis de la proporción de ácidos grasos se utilizaron las cepas MYC092 y MYC096 que cuentan con un perfil de resistencia fenotípica sensible, con la finalidad de realizar comparaciones. Mediante la cromatografía de gases se observó que las cepas con inconsistencias se caracterizan por presentar altas concentraciones de los ésteres metílicos de ácidos grasos 16:0, 18:0, 19:0 y el ácido tuberculoestéarico y bajas concentraciones de los ésteres metílicos del ácido graso 14:0 (Tabla 11).

Cuando se comparó la proporción de ácidos grasos comúnmente encontrados en *M. tuberculosis* de las cepas de estudio se observó que las cepas cuya resistencia fenotípica no se explica por la presencia de mutaciones en genes canónicos poseen una mayor cantidad de ácidos grasos en comparación con las cepas sensibles (Tabla 12). La relación de ácidos grasos insaturados/saturados (UFA/SFA ratio) puede ser un parámetro útil para evaluar la fluidez de la micomembrana, al realizar el cálculo se encontró que las cepas sensibles poseen un valor considerablemente menor a las cepas resistentes que presentan inconsistencias.

Tabla 12. Proporción de ácidos grasos en las cepas estudiadas

	TOTAL	Saturados	Insaturados	UFA/SFA ratio
MYC036	462.27	316.23	146.04	0.46
MYC072	503.50	297.30	206.20	0.69
MYC075	322.83	216.18	106.65	0.49
MYC078	1593.16	967.78	625.38	0.65
MYC087	360.63	300.10	60.53	0.20
MYC093*	330.43	266.15	64.28	0.24
MYC096*	316.32	248.17	68.15	0.27

*Cepas fenotípicamente sensibles. UFA/SFA ratio: relación de ácidos grasos insaturados/saturados.

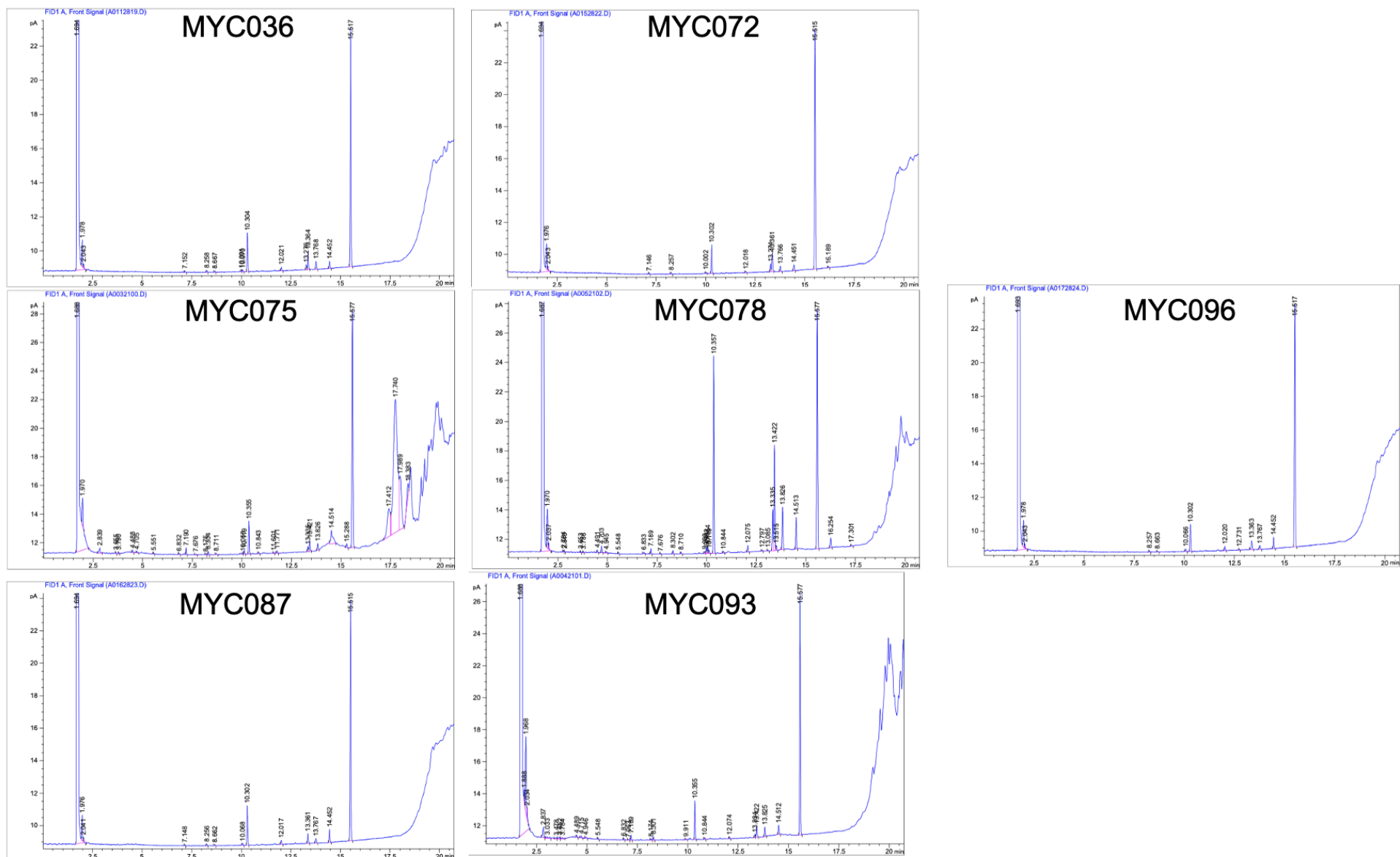


Figura 7. Cromatogramas de la determinación de ácidos grasos en célula completa.
Cada pico en los distintos tiempos de retención indica la presencia de un ácido graso

Tabla 11. Perfil de ácidos grasos en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MYC) (nmol * g)

Id Muestra	12:0 dodecanoico láurico	14:1 w5c miristoleico	14:0 tetradecanoico mirístico	16:0 N alcohol palmitico	16:0 anteiso palmitico	16:1 w5c palmitoleico	16:1 w9c palmitoleico	16:0 hexadecanoico Palmitico	17:0 anteiso heptadecanoico margárico	17:1 w7c margaroleico	17:0 heptadecanoico margárico
MYC036	0.00	0.00	8.71	0.00	0.00	0.00	0.00	201.63	0.00	0.00	19.27
MYC072	0.00	0.00	7.65	0.00	0.00	0.00	0.00	193.62	0.00	0.00	10.44
MYC075	0.00	0.00	26.87	0.00	0.00	0.00	0.00	147.18	4.82	11.60	0.00
MYC078	0.00	0.00	16.07	0.00	7.65	0.00	20.18	643.40	0.00	0.00	23.87
MYC087	0.00	0.00	5.64	0.00	0.00	0.00	0.00	180.81	0.00	0.00	20.92
MYC093*	9.97	2.55	17.61	0.00	0.00	0.00	0.00	150.31	0.00	0.00	6.66
MYC096*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	136.78	0.00	0.00	21.71
ID Muestra	17:0 10-methyl	18:3 w6c (6,9,12) omega6	18:1 w9c Octadecenoico	18:0 octadecanoico estéarico	18:0 10-methyl, TBSA	20:4 w6,9,12,15c araquidonico	20:0 araquidico eicosanoico	Sum Feature 2 (12:0 aldehyde)	Sum Feature 3 (16:1 w7c/16:1 w6c)	Sum Feature 5 (18:2 w6,9c/18:0 ante)	Sum Feature 8 (18:1 w7c)
MYC036	0.00	0.00	102.15	44.73	41.89	0.00	0.00	0.00	16.38	27.50	0.00
MYC072	0.00	0.00	130.76	40.94	44.65	11.46	0.00	0.00	8.08	55.90	0.00
MYC075	0.00	0.00	51.00	31.45	0.00	0.00	0.00	5.86	21.82	22.23	0.00
MYC078	4.17	3.82	373.78	148.33	114.10	34.10	6.48	3.71	32.91	143.44	17.15
MYC087	0.00	0.00	50.59	25.10	67.62	0.00	0.00	0.00	9.94	0.00	0.00
MYC093*	0.00	0.00	48.45	38.46	40.44	0.00	0.00	2.70	0.00	13.28	0.00
MYC096*	6.56	0.00	54.07	19.66	63.46	0.00	0.00	0.00	14.08	0.00	0.00

*Cepas con perfil de resistencia sensible; Sum feature: grupos de 2 o más ácidos grasos que no pudieron ser separados.

Tabla 12. Proporción de ácidos grasos en las cepas estudiadas

	TOTAL	Saturados	Insaturados	UFA/SFA ratio
MYC036	462.27	316.23	146.04	0.46
MYC072	503.50	297.30	206.20	0.69
MYC075	322.83	216.18	106.65	0.49
MYC078	1593.16	967.78	625.38	0.65
MYC087	360.63	300.10	60.53	0.20
MYC093*	330.43	266.15	64.28	0.24
MYC096*	316.32	248.17	68.15	0.27

*Cepas fenotípicamente sensibles. UFA/SFA ratio: relación de ácidos grasos insaturados/saturados.

9.9 Análisis estadístico

No fue posible realizar los análisis de asociación debido a la baja proporción de los SNPs en las cepas estudiadas aisladas en el estado.

10. DISCUSIÓN

La discrepancia entre la resistencia genotípica y fenotípica a antibióticos en *M. tuberculosis* puede ser multifactorial y reflejar la complejidad de los mecanismos de resistencia bacteriana. La comprensión de estas diferencias es crucial para mejorar los métodos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, como la tuberculosis. Algunos fenómenos que pueden ayudar a explicar esta diferencia son:

1. Complejidad del fenotipo: La resistencia fenotípica a los antibióticos está determinada por una variedad de factores, incluidos los mecanismos de transporte de la célula, la expresión génica, la eficiencia de los sistemas de detoxificación, entre otros. A veces, la resistencia fenotípica puede no correlacionarse completamente con las mutaciones genéticas identificadas, ya que otros factores pueden influir en la capacidad de la bacteria para resistir a los antibióticos.
2. Mecanismos desconocidos de resistencia: En algunos casos, puede haber mecanismos de resistencia que aún no se han identificado completamente o no se comprenden completamente. Estos mecanismos podrían influir en la resistencia fenotípica sin tener un correlato genético obvio.
3. Mutaciones en regiones no codificantes: Las mutaciones en regiones no codificantes del genoma, como promotores o regiones regulatorias, pueden afectar la expresión génica sin cambiar directamente la secuencia de aminoácidos de la proteína. Estos cambios pueden influir en la resistencia fenotípica sin ser detectados por métodos genotípicos convencionales.
4. Interacciones genéticas y adaptación evolutiva: La resistencia fenotípica también puede estar influenciada por interacciones genéticas y adaptaciones evolutivas que no se capturan completamente al analizar solo las mutaciones genéticas individuales. La evolución de la resistencia a lo largo del tiempo puede dar como resultado cambios fenotípicos que no se explican por mutaciones aisladas.
5. Heterogeneidad genética en la población bacteriana: Las poblaciones de bacterias pueden ser genéticamente diversas, y algunas cepas dentro de una población

pueden tener mutaciones que confieren resistencia mientras que otras no. La heterogeneidad genética puede influir en la resistencia fenotípica observada.

6. Limitaciones de las técnicas: Las técnicas utilizadas para evaluar la resistencia fenotípica y genotípica pueden tener limitaciones. Las pruebas fenotípicas pueden depender de condiciones específicas de laboratorio, y las técnicas genotípicas pueden no detectar todas las posibles mutaciones o mecanismos de resistencia.

Dentro de éstos fenómeno los mecanismos de resistencia desconocidos, la resistencia constitutiva en *M. tuberculosis* juega un papel fundamental, ya que dentro de está la presencia de una gran cantidad de lípidos en la pared celular misma puede ayudar a explicar la discrepancia observada. De las cepas seleccionadas para este trabajo, un porcentaje mayoritario pertenece a la familia Beijing, el cual se ha reportado previamente como el de mayor distribución e incidencia a nivel global, seguido de las familias pertenecientes al linaje 4. Los resultados mostrados revelaron que las cepas secuenciadas en el estado pertenecen al linaje 4. Estudios previos realizados mediante espoligotipificación y MIRU-VNTR en nuestro país han demostrado una gran diversidad de linajes circulantes; sin embargo, el linaje 4 es el reportado con mayor frecuencia (Juaréz-Eusebio y col., 2017). La presencia mayoritaria de cepas del L4 se debe posiblemente a los movimientos migratorios que ocurrieron de Europa hacia América durante el proceso de colonización. Además, una de las principales características de este linaje es que posee una amplia distribución geográfica, lo cual refleja el gran éxito evolutivo en adaptación y dispersión a diferentes poblaciones humanas, a diferencia de otros linajes (Stucky y col, 2016). El 40% de las cepas MYC fueron agrupadas dentro de la familia LAM. En un estudio en el que se analizaron aislados pertenecientes a esta familia, se observó una diferencia significativa en la velocidad de crecimiento en medio de cultivo, característica relacionada con la capacidad de reproducción bacteriana, lo que genera una mayor carga bacilar pudiendo promover una mayor dispersión de la familia LAM (Von Groll y col., 2010). Dentro de las cepas con inconsistencias no se encontró una relación estadísticamente significativa entre la familia o linaje con las diferencias en la relación fenotípica-genotípica.

La importancia de los ácidos grasos en la resistencia constitutiva de *M. tuberculosis* radica en la composición de la denominada micomembrana, formada por la membrana plasmática que posee una gran cantidad de fosfolípidos, el complejo de arabinogalactano, y la esterificación de ácidos micólicos, lipoglicanos, sulfolípidos, dimicolato de trehalosa, glicolípidos fenólicos, lipoarabinomanano y dimicocerosatos. Para la síntesis de moléculas clave de la micomembrana como los fosfolípidos y los ácidos micólicos se requiere la presencia de ácidos grasos de cadena corta (10-20 carbonos). En la ruta de síntesis de los ácidos grasos, el primer paso incluye la transformación de acetil-coA hacia malonil-coA, por medio de un ciclo de adición de carbonos por subunidades de acc. La subunidad alfa está formada por accA1, accA2 y accA3, por su parte la subunidad beta está formada por accD1, accD2, accD3, accD4, accD5 y accD6. En este trabajo fue posible identificar la presencia de mutaciones en el gen *accD6* predichas por SIFT y DUET como posibles causantes de una alteración en la función de la proteína codificada, dicha alteración por ende podría llevar a un perfil modificado de ácidos grasos en la micomembrana.

Una vez que se sintetiza malonil coA, *fasI* realiza la biosíntesis de ácidos grasos de cadena corta, a partir de ácido palmítico (16:0), el cual también es requerido para la síntesis de sulfolípidos L1 por la enzima *fadD23* (M Yan y col., 2023). En la determinación de ácidos grasos de las cepas MYC, se determinó la presencia de este ácido graso en MYC078, y la ausencia de este en el resto de las cepas. MYC078 es una cepa extrapulmonar aislada de líquido cefalorraquídeo de un paciente en edad infantil y que presenta una resistencia fenotípica a estreptomicina, su perfil de resistencia genotípica no mostró mutaciones en genes canónicos de resistencia a este antibiótico. Se ha sugerido que la presencia de ácido palmítico puede tener un efecto en la fisiología de la bacteria, sin embargo, su relación con la resistencia a estreptomicina no ha sido estudiada (Gouzy y col., 2021). El ácido palmítico es un ácido graso saturado que abunda en el cuerpo humano y puede consumirse como parte de una dieta regular. Anteriormente, se consideraba que era una molécula perjudicial, pero conocimientos científicos posteriores contradijeron estos hechos. Este ácido también abunda en productos alimenticios naturales como la leche, el aceite de coco y el aceite de palma. Estudios previos han demostrado que por sí

solamente las moléculas de ácido palmítico inhiben a *Mycobacterium tuberculosis*, e intervienen en los mecanismos de resistencia a rifampicina mediante bombas de flujo (Nirmal, y col., 2023).

De los genes estudiados en este trabajo, no se logró identificar ninguna mutación en MYC078 que pueda ayudar a explicar la presencia elevada de C (16:0) en esta cepa.

La pared micobacteriana se localiza por debajo de la cápsula separada por un espacio periplásmico, posee un elevado contenido en lípidos (50-60%) que le confieren un carácter hidrofóbico y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática. Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos de gran importancia taxonómica para micobacterias y bacterias de géneros relacionados. En el caso de las micobacterias, los ácidos micólicos tienen de 70 a 80 carbonos y se les atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura. Los ácidos micólicos son ácidos grasos alfa-alkila-beta-hidroxilados ramificados de cadena larga (70-90 C). Se clasifican en dos familias, la primera de ellas los alfa-micolatos, no contiene grupos oxigenados. Por su parte los micolatos oxigenados pueden ser cetomicolatos o metoximicolatos, encontrándose el sustituyente adyacente a una ramificación de metilo. En las micobacterias patógenas como *M. tuberculosis* se observan además sustituyentes de ciclopropano que le confieren resistencia in vitro al peróxido de hidrógeno. La determinación de ácidos grasos en las micobacterias ha sido utilizada previamente para distinguir a cada una de las especies mediante su perfil de lípidos. La dificultad para diferenciar las especies de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium xenopi*, así como la identidad de *Mycobacterium avium* fueron resueltas por Ozbek y Aktas (2003) mediante los análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos utilizando el programa informático Sherlock Microbial Identification System (MIS). El estudio utilizó 61 aislados clínicos y seis cepas de referencia que fueron identificados de manera correcta con base en la concentración y composición de 12 ácidos grasos de 14 a 20 carbonos de longitud. MTB se caracterizó por altas concentraciones de los ésteres metílicos de ácidos grasos 16:0, 18:0, 19:0 y el ácido tuberculoestearico y bajas concentraciones de los ésteres metílicos de ácidos grasos 14:0. Por su parte los ésteres de ácidos grasos 15:0 y 17:0 fueron detectados de manera exclusiva en MTB.

Mycobacterium tuberculosis especie típica de ese género, presenta sólo trazas de ácidos grasos de cadena C11 y no más largas que C20. Es característico un bajo contenido en mirístico (C14:0) y una cantidad relativamente escasa de palmitoleico (C16:1) siendo mayor el contenido en esteárico (C18:0), tuberculoesteárico (C19:0) y oleico (C18:1), que dan un aspecto tricúspide al cromatograma en esta zona, con predominio del tuberculoesteárico (Casal y col., 1990). Por tanto, se ha definido el perfil cromatográfico de la cepa de referencia H37Rv como sigue: (14:0, 15:0, 16:1 ω 7c, 16:1 ω 6c, 16:0, 17:0, 18:2 ω 6,9c, 18:1 ω 9c, 18:0, 10 Me-18:0 (TBSA). El ácido tuberculoesteárico (10 Me-18:0) es un ácido graso un componente estructural de la pared micobacteriana. Como su nombre común lo indica es un ácido graso de cadena ramificada abundante y específico de género en las membranas de las micobacterias que corresponde del 10 al 20% de los ácidos grasos. Fue descubierto en 1934 y ha sido un foco de investigación, particularmente como marcador de diagnóstico de la tuberculosis. En las cepas estudiadas, MYC093, MYC096 y MYC087 presentan porcentajes de TBSA en el rango de lo reportado (12-20%). MYC093 y MYC096 son cepas sensibles y MYC087 presenta resistencia fenotípica a isoniazida y pirazinamida. Las cepas MYC036, MYC078, MYC075 y MYC072 presentan porcentajes de TBSA por debajo de lo reportado, estas presentan inconsistencias en su resistencia fenotípica- genotípica. En relación con la resistencia, un estudio referente a *M. smegmatis* mostró que una menor cantidad de TBSA se encuentra en cepas resistentes a etambutol, en su pared celular poseen una acumulación de fosfolípidos y una disminución en el grado de insaturación de los ácidos grasos (Sareen y Khuller, 1990). La cepa MYC72, presenta resistencia a etambutol y posee 8.8% de TBSA en la micomembrana, un valor por debajo de lo reportado para cepas sensibles y una mayor cantidad de ácidos grasos saturados en su micomembrana. El aumento de la insaturación puede deberse a un aumento de actividad en la enzima deshidratasa/desaturasa en la vía de síntesis del ácido graso.

Otro parámetro evaluado en este trabajo, fue la relación de ácidos grasos insaturados sobre ácidos grasos saturados (UFA/SFA). Las composiciones de ácidos grasos totales se dividieron en dos grupos: ácidos grasos saturados (SFA) y ácidos grasos insaturados (UFA) y se calculó dicha relación. Los UFA (presentes como ácidos palmitoleico y principalmente

oleico) no sólo son constituyentes de moléculas estructurales como los fosfolípidos, glicolípidos y glicanos de la membrana celular, sino también de importantes moléculas de almacenamiento de energía, como los triglicéridos (TAG) (Torrelles y col., 2012). Para la cepa de referencia H37Rv se ha determinado un valor de UFA/SFA de 0.17 a 0.20. Las cepas sensibles MYC093 y MYC96 poseen valores cercanos a la referencia, 0.24 y 0.27 respectivamente, mientras que las cepas resistentes poseen valores por encima de la referencia. Se sabe que en bacterias un aumento en el valor de UFA/SFA es directamente proporcional a la fluidez de la membrana ya que poseen una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados.

11. CONCLUSIÓN

Si bien la presencia de mutaciones en los genes evaluados no permitió explicar las inconsistencias en la resistencia fenotípica-genotípica de las cepas de estudio, este trabajo permitió identificar diferencias en la composición de ácidos grasos presentes en la pared celular micobacteriana diferencias que podría explicar parcialmente la resistencia a antibióticos como la isoniazida, estreptomycin y pirazinamida.

12. REFERENCIAS

- Akbergenov, R., Shcherbakov, D., Matt, T., Duscha, S., Meyer, M., Wilson, D. N., Böttger, E. C. (2011). Molecular basis for the selectivity of antituberculosis compounds capreomycin and viomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 55(10): 4712-4717. <https://doi.org/10.1128/AAC.00628-11>.
- Arcos, J., Sasindran, S. J., Fujiwara, N., Turner, J., Schlesinger, L. S., & Torrelles, J. B. (2011). Human lung hydrolases delineate Mycobacterium tuberculosis–macrophage interactions and the capacity to control infection. *The Journal of Immunology*. 187(1): 372-381. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100823>.
- Nasiri, M. J., Haeili, M., Ghazi, M., Goudarzi, H., Pormohammad, A., Imani Fooladi, A. A., & Feizabadi, M. M. (2017). New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria. *Frontiers in microbiology*, 8, 681. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00681>
- Chauhan, A., Kumar, M., Kumar, A., & Kanchan, K. (2021). Comprehensive review on mechanism of action, resistance and evolution of antimycobacterial drugs. *Life sciences*, 274, 119301. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119301>
- Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A., & Gagneux, S. (2017). Antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 354-373.
- Torrelles, J. B., Sieling, P. A., Zhang, N., Keen, M. A., McNeil, M. R., Belisle, J. T., ... & Chatterjee, D. (2012). Isolation of a distinct Mycobacterium tuberculosis mannose-capped lipoarabinomannan isoform responsible for recognition by CD1b-restricted T cells. *Glycobiology*, 22(8), 1118-1127.
- von Groll, A., Martin, A., Stehr, M., Singh, M., Portaels, F., da Silva, P. E. A., & Palomino, J. C. 2010. Fitness of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. *PloS one*, 5(4): e10191.
- Gouzy, A., Healy, C., Black, K. A., Rhee, K. Y., & Ehrh, S. (2021). Growth of Mycobacterium tuberculosis at acidic pH depends on lipid assimilation and is accompanied by reduced GAPDH activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(32), e2024571118.
- Nirmal, C. R., Rajadas, S. E., Balasubramanian, M., Mohanvel, S. K., Aathi, M. S., Munishankar, S., ... & Dusthacker, A. (2023). Myoinositol and methyl stearate increases rifampicin susceptibility among drug-resistant Mycobacterium tuberculosis expressing Rv1819c. *Chemical Biology & Drug Design*, 101(4), 883-895.

- Ozbek, A., & Aktas, O. (2003). Identification of three strains of Mycobacterium species isolated from clinical samples using fatty acid methyl ester profiling. *Journal of international medical research*, 31(2), 133-140.
- Sareen, M. O. N. I. C. A., & Khuller, G. K. (1990). Cell wall and membrane changes associated with ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis H37Ra. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(9), 1773-1776.
- Bellerose, M. M., Proulx, M. K., Smith, C. M., Baker, R. E., Ioerger, T. R., & Sassetti, C. M. (2020). Distinct bacterial pathways influence the efficacy of antibiotics against Mycobacterium tuberculosis. *mSystems*, 5(4), e00396-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00396-20>
- Benítez, A., Núñez, O., Águila, V. (2020). Tuberculosis. *Epidemiología molecular. Investigación médico-quirúrgica*. 12 (2): 1-17.
- Boccia, S., Pasquarella, C., Colotto, M., Barchitta, M., Quattrocchi, A., Agodi, A. (2015). Molecular epidemiology tools in the management of healthcare-associated infections: towards the definition of recommendations. *Epidemiol Prev*. 39(4 Supplement 1): 21-6.
- Buriánková, K., Doucet-Populaire, F., Dorson, O., Gondran, A., Ghnassia, J. C., Weiser, J., Pernodet, J. L. (2004). Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the Mycobacterium tuberculosis complex. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 48(1): 143-150. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.143-150.2004>.
- Caminero, J. A., Cayla, J. A., García-García, J. M., García-Pérez, F. J., Palacios, J. J., Ruiz-Manzano, J. (2017). Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis con resistencia a fármacos. *Archivos de Bronconeumología*. 53(9): 501-509. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.02.006>.
- Cardona, P. J. (2016). The progress of therapeutic vaccination with regard to tuberculosis. *Frontiers in microbiology*. 7: 1536. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01536>.
- Casal M. Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias. Córdoba: Facultad de Medicina, Ed. Universidad de Cordoba, 1990**
- Chaves, W., Buitrago, J. F., Dueñas, A., & Bejarano, J. C. (2017). Acerca de la tuberculosis extrapulmonar. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 26(2), 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.reper.2017.04.004>
- Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Burlet-Schiltz, O., Etienne, G., ... & Daffé, M. (2017). Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.

- Coll, P. (2009). Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 27(8): 474-480. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.06.010>
- Damtie, D., Woldeyohannes, D., Mathewos, B. (2014). Review on molecular mechanism of first line antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobact Dis*. 4(174): 2161-1068. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1068.1000174>
- Dheda, K., Gumbo, T., Gandhi, N. R., Murray, M., Theron, G., Udwadia, Z., Migliori, G. B., Warren, R. (2014). Global control of tuberculosis: from extensively drug-resistant to untreatable tuberculosis. *The lancet Respiratory medicine*. 2(4): 321-338. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70031-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70031-1).
- Dutertre, M., Martin-Blondel, G., & Marchou, B. (2017). Rifampicina. *EMC-Tratado de Medicina*. 21(2): 1-5. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(17\)84249-5](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(17)84249-5).
- educated uptake. *Advanced drug delivery reviews*. 57(10): 1486-1513. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>.
- Escombe, A. R., Oeser, C., Gilman, R. H., Navincopa, M., Ticona, E., Martínez, C., Evans, C. A. (2007). The detection of airborne transmission of tuberculosis from HIV-infected patients, using an in vivo air sampling model. *Clinical Infectious Diseases*. 44(10): 1349-1357. <https://doi.org/10.1086/515397>.
- Fajardo, A., Martinez-Martin, N., Mercadillo, M., Galán, J. C., Ghysels, B., Matthijs, S., Martínez, J. L. (2008). The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PloS one*. 3(2): e1619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001619>.
- Faksri, K., Kaewprasert, O., Ong, R. T. H., Suriyaphol, P., Prammananan, T., Teo, Y. Y., Chaiprasert, A. (2019). Comparisons of whole-genome sequencing and phenotypic drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* causing MDR-TB and XDR-TB in Thailand. *International journal of antimicrobial agents*, 54(2), 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.04.004>
- Farga, V., Caminero, J. A. (2012). Tuberculosis. 3a ed. Santiago de Chile: Publicaciones Mediterráneo.
- Farhat, M. R., Freschi, L., Calderon, R., Ioerger, T., Snyder, M., Meehan, C. J., Jong B., Rigouts L., Sloutsky Al., Kaur D., Sunyaev S., Soolingen D., Shendure J., Sacchettini J., Murray, M. (2019). GWAS for quantitative resistance phenotypes in *Mycobacterium tuberculosis* reveals resistance genes and regulatory regions. *Nat Commun* 10 (1): 2128. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10110-6>
- Geneva: World Health Organization. (2020). Global tuberculosis report 2020.

- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina*. 47(3): 19. <https://doi.org/10.3390/medicina47030019>.
- Gómez, T. V., Gómez, A. J., Robledo, J. A., Hernández, J. M. (2018). Resistencia a Medicamentos en Mycobacterium tuberculosis: contribución de mecanismos constitutivos y adquiridos. *Revista de Salud Pública*. 20(4): 491-497. <https://doi.org/10.15446/rsap.V20n4.50575>.
- Guex, N., Peitsch, M. C., & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 30(S1), S162-S173. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn750>
- Informe mundial sobre la tuberculosis 2020 : sinopsis [Global tuberculosis report 2020: executive summary]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Informe mundial sobre la tuberculosis. (2019). Sinopsis [Global tuberculosis report 2020: executive summary]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Kanabalan, R. D., Lee, L. J., Lee, T. Y., Chong, P. P., Hassan, L., Ismail, R., & Chin, V. K. (2021). Human tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. *Microbiological research*, 126674. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126674>
- Kohl, T. A., Utpatel, C., Schleusener, V., De Filippo, M. R., Beckert, P., Cirillo, D. M., & Niemann, S. (2018). MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *PeerJ*, 6, e5895. <https://doi.org/10.7717/peerj.5895>
- Kremer, L., Maughan, W. N., Wilson, R. A., Dover, L. G., Besra, G. S. (2002). The M. tuberculosis antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. *Letters in applied microbiology*. 34(4): 233-237. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01091.x>.
- Kulchavenya, E. (2014). Extrapulmonary tuberculosis: are statistical reports accurate?. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. 2(2): 61-70.
- Kumar, A., & Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1486-1513.
- Malik, S., Willby, M., Sikes, D., Tsodikov, O. V., & Posey, J. E. (2012). New insights into fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis: functional genetic analysis of

- gyrA and gyrB mutations. *PloS one*. 7(6): e39754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039754>.
- McGrath, M., Gey van Pittius, N. C., Van Helden, P. D., Warren, R. M., Warner, D. F. (2014). Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69(2): 292-302. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt364>.
- M<https://doi.org/10.1177%2F2049936114528173>.
- Mitchell, G., Chen, C., Portnoy, D. A. (2016). Strategies used by bacteria to grow in macrophages. *Microbiology spectrum*. 4(3): 4-3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0012-2015>.
- Moopanar, K., & Mvubu, N. E. (2020). Lineage-specific differences in lipid metabolism and its impact on clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbial pathogenesis*, 146, 104250. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104250>
- Müller, B., Borrell, S., Rose, G., Gagneux, S. (2013). The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Genetics*. 29(3): 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.11.005>.
- Mutsaers, S. E., Prele, C. M., Brody, A. R., Idell, S. (2004). Pathogenesis of pleural fibrosis. *Respirology*. 9(4): 428-440. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2004.00633.x>.
- Negrete Paz, A. M. (2017). Análisis comparativo de genes de la ruta de síntesis de ácidos micólicos entre cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.
- O'Garra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., Berry, M. P. (2013). The immune response in tuberculosis. *Annual review of immunology*. 31: 475-527. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>.
- Oshero, N., Ben-Ami, R. (2016). Modulation of host angiogenesis as a microbial survival strategy and therapeutic target. *PLoS pathogens*. 12(4): e1005479. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005479>.
- Pawelczyk, J., Brzostek, A., Kremer, L., Dziadek, B., Rumijowska-Galewicz, A., Fiolka, M., & Dziadek, J. (2011). AccD6, a key carboxyltransferase essential for mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, is dispensable in a nonpathogenic strain. *Journal of bacteriology*, 193(24), 6960-6972. <https://doi.org/10.1128/JB.05638-11>
- Pawelczyk, J., Viljoen, A., Kremer, L., & Dziadek, J. (2017). The influence of AccD5 on AccD6 carboxyltransferase essentiality in pathogenic and non-pathogenic *Mycobacterium*. *Scientific reports*, 7(1), 1-13. DOI: 10.1038/srep42692

- Radkov, A. D., Hsu, Y. P., Booher, G., & VanNieuwenhze, M. S. (2018). Imaging bacterial cell wall biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, 87: 991-1014. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012921>.
- Ramazanzadeh, R., Shakib, P., Rouhi, S., Mohammadi, B., Mohajeri, P., & Borji, S. (2020). Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis isolates in Iran using spoligotyping. *New Microbes and New Infections*, 38, 100767. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100767>
- Ranjitha, J., Rajan, A., & Shankar, V. (2020). Features of the biochemistry of Mycobacterium smegmatis, as a possible model for Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Infection and Public Health*. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.023>
- Rosen, B. C., Dillon, N. A., Peterson, N. D., Minato, Y., & Baughn, A. D. (2017). Long-chain fatty acyl coenzyme A ligase FadD2 mediates intrinsic pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(2), e02130-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02130-16>
- Sambrook, J., Russell, D. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. 3 ed. Vol.II, Chap. 8, protocol 1.
- Singh, A., Gupta, R., Vishwakarma, R. A., Narayanan, P. R., Paramasivan, C. N., Ramanathan, V. D., & Tyagi, A. K. (2005). Requirement of the mymA operon for appropriate cell wall ultrastructure and persistence of Mycobacterium tuberculosis in the spleens of guinea pigs. *Journal of bacteriology*, 187(12), 4173-4186. <https://doi.org/10.1128/JB.187.12.4173-4186.2005>
- Singh, S., Goswami, N., Tyagi, A. K., & Khare, G. (2019). Unraveling the role of the transcriptional regulator VirS in low pH-induced responses of Mycobacterium tuberculosis and identification of VirS inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 294(26), 10055-10075. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005312>
- Soto Armas J. R. (2018). Análisis in silico del efecto de las variaciones en la secuencia del gen rpoB de Mycobacterium tuberculosis
- Swain, S. S., Sharma, D., Hussain, T., Pati, S. (2020). Molecular mechanisms of underlying genetic factors and associated mutations for drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Emerging microbes & infections*. 9(1): 1651-1663. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1785334>.
- Vázquez Heredia, M. D. R. (2017). Epidemiología genético molecular de cepas de M. tuberculosis de los estados de Michoacán y Querétaro.
- Viveros-Luna, D., Lefort, B., Rendón-Bautizta, L., Zenteno-Cuevas, R. (2021). Genotipificación y epidemiología molecular de tuberculosis; su utilidad para la salud. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. 20(2): 27-34.

- Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *Journal of molecular graphics*, 8(1), 52-56. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(90\)80070-V](https://doi.org/10.1016/0263-7855(90)80070-V)
- Xia, E., Teo, Y. Y., & Ong, R. T. H. (2016). SpoTyping: fast and accurate in silico Mycobacterium spoligotyping from sequence reads. *Genome medicine*, 8(1), 1-9.
- Xu, G., Liu, H., Jia, X., Wang, X., Xu, P. (2021). Mechanisms and detection methods of Mycobacterium tuberculosis rifampicin resistance: The phenomenon of drug resistance is complex. *Tuberculosis*. 128: 102083. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102083>.
- Yao, Y., Barghava, N., Kim, J., Niederweis, M., & Marassi, F. M. (2012). Molecular structure and peptidoglycan recognition of Mycobacterium tuberculosis ArfA (Rv0899). *Journal of molecular biology*, 416(2), 208-220. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.12.030>
- Lemassu, A., Ortalo-Magne, A., Bardou, F., Silve, G., Lanéelle, M. A., & Daffé, M. (1996). Extracellular and surface-exposed polysaccharides of non-tuberculous mycobacteria. *Microbiology*, 142(6), 1513-1520. <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-142-6-1513>
- Marks, J. (1974). The culture and identification of mycobacteria. *Publ Hlth Lab. Serv., Monogr. Ser.*, (5), 14-23.
- Sánchez, F., Colomésa, J. L. L., Villarinob, E., & Grossetb, J. (2011). Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(Supl 1), 47-56.
- Benítez, A. C., Núñez, N. O., & Águila, R. V. (2020). Tuberculosis. Epidemiología Molecular. *Investigaciones Medicoquirúrgicas*, 12(2), 1-17.
- Kaufmann, S. H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis?. *Nature Reviews Immunology*, 1(1), 20-30.
- Urrego-Díaz, J. A. (2020). Tuberculosis multidrogorresistente. *Revista Salud Bosque*, 10(1). <https://doi.org/10.18270/rsb.v10i1.2834>
- Becerril-Montes, P., Said-Fernández, S., Luna-Herrera, J., Caballero-Olín, G., Enciso-Moreno, J. A., Martínez-Rodríguez, H. G., ... & Molina-Salinas, G. M. (2013). A population-based study of first and second-line drug-resistant tuberculosis in a high-burden area of the Mexico/United States border. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 160-166. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108022013006>
- Müller, B., Borrell, S., Rose, G., & Gagneux, S. (2013). The heterogeneous evolution of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Trends in Genetics*, 29(3), 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.11.005>
- Rojas, G. C., & Ulate, L. A. (2017). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista médica de costa rica y Centroamérica*, 73(621), 757-763.

- Viñuelas-Bayón, J., Vitoria, M. A., & Samper, S. (2017). Diagnóstico rápido de la tuberculosis. Detección de mecanismos de resistencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(8), 520-528. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.01.015>
- Yang, T., Gan, M., Liu, Q., Liang, W., Tang, Q., Luo, G., ... & Gao, Q. (2022). SAM-TB: a whole genome sequencing data analysis website for detection of Mycobacterium tuberculosis drug resistance and transmission. *Briefings in bioinformatics*, 23(2), bbac030. <https://doi.org/10.1093/bib/bbac030>
- Macedo, R., Nunes, A., Portugal, I., Duarte, S., Vieira, L., & Gomes, J. P. (2018). Dissecting whole-genome sequencing-based online tools for predicting resistance in Mycobacterium tuberculosis: can we use them for clinical decision guidance?. *Tuberculosis*, 110, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.03.009>
- Jajou, R., van der Laan, T., de Zwaan, R., Kamst, M., Mulder, A., de Neeling, A., ... & van Soolingen, D. (2019). WGS predice con mayor precisión la susceptibilidad de Mycobacterium tuberculosis a los medicamentos de primera línea que las pruebas fenotípicas. *Revista de quimioterapia antimicrobiana*, 74 (9), 2605-2616. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz215>
- Cole, S. T. (1999). Learning from the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *FEBS letters*, 452(1-2), 7-10. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00536-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00536-0)
- Chisompola, N. K., Streicher, E. M., Muchemwa, C. M. K., Warren, R. M., & Sampson, S. L. (2020). Molecular epidemiology of drug resistant Mycobacterium tuberculosis in Africa: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 1-16.
- Kang, J. Y., Hur, J., Kim, S., Jeon, S., Lee, J., Kim, Y. J., ... & Moon, H. S. (2019). Clinical implications of discrepant results between genotypic MTBDRplus and phenotypic Löwenstein-Jensen method for isoniazid or rifampicin drug susceptibility tests in tuberculosis patients. *Journal of Thoracic Disease*, 11(2), 400. <https://doi.org/10.21037%2Fjtd.2019.01.58>
- Mathys, V., Van de Vyvere, M., De Droogh, E., Soetaert, K., & Groenen, G. (2014). False-positive rifampicin resistance on Xpert® MTB/RIF caused by a silent mutation in the rpoB gene. *The International journal of tuberculosis and lung disease*, 18(10), 1255-1257. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0297>
- Miotto, P., Cabibbe, A. M., Borroni, E., Degano, M., & Cirillo, D. M. (2018). Role of disputed mutations in the rpoB gene in interpretation of automated liquid MGIT culture results for rifampin susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 56(5), e01599-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01599-17>

- Ling, D. I., Zwerling, A. A., & Pai, M. (2008). GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *European Respiratory Journal*, 32(5), 1165-1174.
- Feliciano, C. S., Namburete, E. I., Praça, J. R., Peronni, K., Dippenaar, A., Warren, R. M., ... & Bollela, V. R. (2018). Accuracy of whole genome sequencing versus phenotypic (MGIT) and commercial molecular tests for detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in Brazil and Mozambique. *Tuberculosis*, 110, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.04.003>
- Rabahi, M. F., Silva, J. L. R. D., Ferreira, A. C. G., Tannus-Silva, D. G. S., & Conde, M. B. (2017). Tuberculosis treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 43, 472-486. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562016000000388>
- Mejia-Ponce, P. M., Ramos-González, E. J., Ramos-García, A. A., Lara-Ramírez, E. E., Soriano-Herrera, A. R., Medellín-Luna, M. F., ... & Licona-Cassani, C. (2022). Genomics epidemiology analysis reveals hidden signatures of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. bioRxiv. : <https://doi.org/10.1101/2022.03.15.484552>
- Ng, P. C., & Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research*, 31(13), 3812-3814.
- Ngak-Leng Sim, Prateek Kumar, Jing Hu, Steven Henikoff, Georg Schneider, Pauline C. Ng. (2012) SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins, *Nucleic Acids Research*, <https://doi.org/10.1093/nar/gks539>
- Pires, D. E., Ascher, D. B., & Blundell, T. L. (2014). DUET: a server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. *Nucleic acids research*, 42(W1), W314-W319.
- Vriend, G., J. Mol. Graph. (1990) *WHAT IF: A molecular modeling and drug design program*. 8, 52-56.
- Schürch, A. C., Arredondo-Alonso, S., Willems, R. J. L., & Goering, R. V. (2018). Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(4), 350-354.
- Tettelin, H., Maignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., ... & Fraser, C. M. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13950-13955.
- Kwong, J. C., Mercoullia, K., Tomita, T., Easton, M., Li, H. Y., Bulach, D. M., ... & Howden, B. P. (2016). Prospective whole-genome sequencing enhances national surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of clinical microbiology*, 54(2), 333-342.

- Sia, J. K., & Rengarajan, J. (2019). Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbiology spectrum*, 7(4), 7-4.
- Turner, R. D., Chiu, C., Churchyard, G. J., Esmail, H., Lewinsohn, D. M., Gandhi, N. R., & Fennelly, K. P. (2017). Tuberculosis infectiousness and host susceptibility. *The Journal of infectious diseases*, 216(suppl_6), S636-S643.
- Ehrt, S., & Schnappinger, D. (2009). Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cellular microbiology*, 11(8), 1170-1178.
- Karchin, R., Diekhans, M., Kelly, L., Thomas, D. J., Pieper, U., Eswar, N., ... & Sali, A. (2005). LS-SNP: large-scale annotation of coding non-synonymous SNPs based on multiple information sources. *Bioinformatics*, 21(12), 2814-2820.

13. ANEXOS

Tabla 13. Características de los genomas estudiados

SRA Código	País	Lecturas	R. fenotípica					R. genotípica				
			INH	RIF	PZA	ETB	EST	INH	RIF	PZA	ETB	EST
ERR067716	Rusia	1492265	x						x			x
SRR2024947	China	6420489	x	x		x			x			
SRR2024975	China	9132078	x	x								x
SRR6397382	Canadá	2935807	x						x			x
ERR2515482	Sudáfrica	326366	x	x					x			x
SRR6397735	Canadá	2462860	x						x			
ERR2516453	Países bajos	1774030	x	x		x			x			
SRR6152744	Canadá	2630888	x									x
SRR6152640	Canadá	2241782	x									x
SRR6045934	UK	1132892	x									x
ERR2516617	Países bajos	985687	x	x					x			
SRR6153076	Canadá	3204207	x				x		x		x	x
ERR2516430	Perú	853402	x	x	x				x			x
ERR2515852	Sudáfrica	372498	x						x			x
ERR2041775	Serbia	1344952	x	x	x	x			x			x
ERR553321	Suazilandia	1130653	x	x	x	x			x			
ERR2515449	Sudáfrica	647621	x						x			x
SRR6398106	Canadá	3017719	x									x
ERR2516274	Bélgica	3060387	x	x					x			x
ERR2516492	Perú	1567978	x	x	x	x			x			x
ERR2516538	Perú	1684230	x		x			x	x			x
ERR2516658	Perú	1491168	x	x	x	x		x	x		x	x
ERR2516527	Perú	752180	x	x	x	x		x	x			
ERR2512975	UK	1415658	x	x	x	x		x	x			x

ERR552415	Suazilandia	564766	x	x	x	x	x	x	x	x	x
SRR6397730	Canadá	3714983	x	x	x	x		x	x	x	x
ERR2515506	Sudáfrica	545732	x	x	x			x	x		x
ERR2516027	Sudáfrica	377599	x		x			x	x		x
SRR6339666	Australia	1697223	x	x	x			x	x		x
ERR2516361	Bélgica	2253429	x	x	x			x	x		x
ERR2516256	Bélgica	3011127	x	x	x	x		x	x	x	x
ERR2510669	Italia	1997799	x	x	x	x		x	x	x	x
ERR2041791	Serbia	377497	x	x	x	x		x	x		x
SRR6397748	Canadá	3079739	x	x	x	x		x	x		x
ERR2510827	Italia	1838171	x	x	x			x	x	x	x
ERR2041728	Serbia	841980	x	x	x			x	x	x	x
ERR108453	Rusia	3057931	x	x	x	x		x	x	x	x
ERR2516911	UK	906932	x	x	x	x		x	x	x	x
ERR2510673	Italia	1939019	x	x	x	x		x	x	x	x
ERR2512882	UK	813338	x	x	x	x		x	x	x	x
ERR550869	Suazilandia	1700487	x	x	x	x		x			
ERR2515917	Sudáfrica	677176	x	x		x		x	x		x
ERR2516559	Perú	1413385	x	x		x		x	x		x
ERR2041759	Serbia	1518761	x	x	x	x		x	x		x
ERR552075	Suazilandia	453050	x	x		x		x	x		x
ERR2516432	Países bajos	2967344	x	x		x		x	x		x
ERR2516630	Perú	1536227	x	x	x	x		x	x		
ERR2516271	Bélgica	1813662	x	x		x		x			x
ERR2041738	Serbia	446205	x	x	x	x		x	x		x
ERR2515995	Sudáfrica	417519	x	x	x	x		x	x		x
ERR2516167	Bélgica	4659027	x	x	x	x		x	x		x
ERR2516712	Países bajos	900627	x	x		x		x	x		x

SRR2024890	China	9028493	x	x		x	x	x	x
ERR2515768	Sudáfrica	910307		x		x	x		
ERR552000	Suazilandia	1241869	x	x	x	x			
ERR2516579	Países bajos	2600337	x	x		x			x
ERR2515667	Sudáfrica	954814		x		x	x		x
SRR6367400	Australia	2491162	x	x		x			x
ERR2510719	Italia	1512435	x	x	x	x	x		x
SRR2024941	China	7794170	x	x		x	x		x
ERR2516920	UK	1060361	x	x		x		x	x
ERR2516410	Países bajos	3327553	x	x					x
ERR2041757	Serbia	3432994	x	x	x	x			x
SRR6397630	Canadá	3383364	x	x	x				x
SRR2024994	China	6659729	x	x		x		x	x
ERR2516730	Países bajos	3481226	x	x	x	x		x	x
SRR2024957	China	7031511	x	x		x		x	x
SRR2024961	China	10541595	x	x		x			x
ERR2510659	Italia	1715418	x	x					x
SRR6045984	UK	1439003	x	x					x
ERR553216	Suazilandia	901466	x	x	x	x			x
SRR6397731	Canadá	2690844		x					x
ERR2512930	UK	1202133	x	x				x	x
SRR2024999	China	7568542	x	x		x		x	x
ERR553350	Suazilandia	1069169	x	x		x			x
ERR2516593	Países bajos	3475475	x	x	x	x			x
ERR2041727	Serbia	875033	x	x	x	x			x
ERR2515530	Sudáfrica	791414	x	x					x
ERR2510868	Italia	1199281	x	x				x	x
ERR2515224	Sudáfrica	1281680	x	x				x	x

Tabla 14. Espoligotipos de las cepas de estudio

SRA Código	País	Código octal	Código binario	Espoligotipo	Linaje
ERR067716	Rusia	777760007760771	1111111111111100000000001111111100001111111	T4	Euro-American
SRR2024947	China	0000000000003000	000000000000000000000000000000110000000	Beijing	East Asian (Beijing)
SRR2024975	China	0000000000000000	000000000000000000000000000000000000000		
SRR6397382	Canadá	777777606360731	1111111111111111100001100111100001110111	LAM9	Euro-American
ERR2515482	Sudáfrica	77777777760700	111111111111111111111111111100001110000	T2	Euro-American
SRR6397735	Canadá	777776777760601	11111111111111101111111111111100001100001	X2	Euro-American
ERR2516453	Países bajos	616773677777600	1100011101111110111101111111111111100000		bovis
SRR6152744	Canadá	703777740003071	11100001111111111111100000000000110001111	CAS	East-African-Indian
SRR6152640	Canadá	703777740003171	1110000111111111111111000000000000110011111	CAS	East-African-Indian
SRR6045934	UK	0000000000000000	000000000000000000000000000000000000000		
ERR2516617	Países bajos	703777740003171	1110000111111111111111000000000000110011111	CAS	East-African-Indian
SRR6153076	Canadá	100016246543771	0010000000000011100101001101011000111111111	Family33	indo-oceanic
ERR2516430	Perú	777700077760771	1111111111110000000001111111111100001111111	H37Rv	Euro-American
ERR2515852	Sudáfrica	77777777760771	1111111111111111111111111111100001111111	T1	Euro-American
ERR2041775	Serbia	77637777760771	1111111100111111111111111111111100001111111	S	Euro-American
ERR553321	Suazilandia	777777777413731	11111111111111111111111111000010111110111	EAI5	indo-oceanic
ERR2515449	Sudáfrica	77777777760771	1111111111111111111111111111100001111111	T1	Euro-American
SRR6398106	Canadá	000000000003771	0000000000000000000000000000000111111111	Beijing	East Asian (Beijing)
ERR2516274	Bélgica	777777404760771	11111111111111111100001001111100001111111	LAM9	Euro-American

