

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *ESXG*, *ESXH*,
INFA, *GROES*, *RPMI*, *RPSA* Y *LIPF* COMO POSIBLES
MARCADORES DE FENOTIPO DE RESISTENCIA A FÁRMACOS
DE PRIMERA LÍNEA EN AISLADOS CLÍNICOS DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.**

POR

LAURA ADIENE GONZÁLEZ ESCALANTE

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

JULIO, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*,
rpmI, *rpsA* Y *lipF* COMO POSIBLES MARCADORES DE FENOTIPO DE
RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN AISLADOS
CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis*.**

Por:

M. en C. Laura Adiene González Escalante

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología

Julio de 2016

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*,
rpmI, *rpsA* Y *lipF* COMO POSIBLES MARCADORES DE FENOTIPO DE
RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN AISLADOS
CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis*.**

Comité de tesis

Dr. Mario A. Bermúdez de León
Presidente

Dra. Licet Villarreal Treviño
Secretario

Dra. Beatriz Silva Ramírez
Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

Dr. Salvador Luis Said y Fernández
Vocal

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*,
rpmI, *rpsA* Y *lipF* COMO POSIBLES MARCADORES DE FENOTIPO DE
RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN AISLADOS
CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis*.**

Lugar de Trabajo

**El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del
Departamento de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del
Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, ubicado en Monterrey, Nuevo
León.**

Dr. Mario A. Bermúdez de León

Director de tesis

AGRADECIMIENTOS

Reconozco el apoyo que he recibido para el desarrollo de este proyecto, mismo que me compromete con mi país a retribuir tanto personal y profesionalmente al servicio de la sociedad.

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Nuevo León como la sólida institución que me ha brindado toda la formación en educación superior en un marco de oportunidades y apertura, en especial a la Facultad de Ciencias Biológicas nicho de prominentes científicos y maestros a la que pertenezco orgullosamente desde agosto de 2003. Agradezco a la subdirección de posgrado, administrativos y profesores por mantener un alto estándar de calidad en los programas reconocidos a nivel nacional y por un incuestionable compromiso en la formación de recursos humanos.

Mi amplia gratitud al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por el apoyo económico del que disfruté como becario (No. 226992) durante el proceso de la obtención del grado de Maestría en Ciencias y durante el desarrollo de la tesis doctoral presente.

El Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS me permitió el desarrollo de los proyectos de investigación en los que he participado desde el 2007 en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste CIBIN, en especial a la Dra. Laura de la Garza Salinas directora de Investigación en Salud y al Dr. Javier Vargas Villarreal director del CIBIN; agradezco al Fondo de Investigación en Salud, por el financiamiento del proyecto (FIS/IMSS/PROT/G12/1108) que dio pie a este trabajo y al programa de Formación de Investigadores (2010-184) coordinado por la Dra. Silvia Palomo Piñón por el apoyo otorgado.

Mi gratitud y cariño al Departamento de Biología Molecular del CIBIN liderado por el Dr. Mario Bermúdez de León, conformado por excelentes profesionales quienes han

colaborado en cada etapa del desarrollo de este trabajo, especialmente la Dra. Katia Peñuelas Urquides querida amiga que ha estado presente y ha sido parte importante de este proyecto. Gracias a todos los becarios y estudiantes que han formado parte del grupo y que han reforzado el sentimiento de trabajo en equipo, solidaridad y en muchos casos de amistad, gracias a la Q.F.B Ana Leticia Arriaga, a la pL.B.G. Ana Laura Granados, a la L.B.G. Joyce Rigal, al L.B.G. René Robles y al Q.F.B. Moisés Nietro por su participación directa en este proyecto enriqueciéndolo y haciendo posible los avances presentados.

Gracias al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, en especial al Dr. Salvador Said y Fernández por brindarnos el uso de las instalaciones, el material y el apoyo para el desarrollo de este trabajo; y al técnico Jorge Ortega por su formidable disposición.

Agradezco también al Dr. Alberto Morales Loreda, por apoyarnos en la preparación de medios de cultivo para micobacterias, y al Dr. José Antonio Enciso Moreno por la determinación de la susceptibilidad a los fármacos de primera línea de los aislados clínicos de este estudio.

Gracias al comité tutorial conformado por los doctores: Dr. Mario A. Bermúdez de León, Dra. Licet Villarreal Treviño, Dra. Beatriz Silva Ramírez, Dr. Pablo Zapata Benavides y Dr. Salvador Luis Said y Fernández quienes mantuvieron siempre abiertas las líneas de comunicación, cuyo compromiso y apoyo ha sido siempre irreprochable.

Es meritorio hacer una mención especial para agradecer al Dr. Mario Bermúdez de León el director de la presente tesis, un sobresaliente investigador altamente comprometido con la ciencia al beneficio de la salud humana y quien a lo largo de casi 10 años de ser mi maestro y mentor ha resultado ser la piedra angular de mi desarrollo profesional.

Gracias a mis padres José Alfredo González Garza y Martha Eneida Escalante García, por el enorme esfuerzo que hicieron durante tantos años, por el apoyo incondicional y

por brindarme una estabilidad que solo una familia llena de amor puede lograr. Gracias al Dr. José Iván Escalante quien para mi es primero familia y después una gran inspiración, por tener siempre una palabra de aliento, el consejo presto y sobre todo el ejemplo de excelencia profesional y equilibrio personal - “acostúmbrate a hacer cosas importantes” ha sido un enorme consejo. Mi esposo, Fernando Bravo merece el reconocimiento final por ser un verdadero compañero que me ha sabido apoyar y motivar durante todos mis proyectos, especialmente durante la culminación de éste que siempre ha sido uno de mis más grandes sueños.

DEDICATORIA

“Si caminas solo llegarás más rápido...

Si caminas acompañado llegarás más lejos”.

-proverbio popular

Fernando Bravo, es un privilegio recorrer este camino junto a ti

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Generalidades de <i>M. tuberculosis</i>	3
Microbiología de <i>M. tuberculosis</i>	3
<i>M. tuberculosis</i> como causante de tuberculosis pulmonar.	3
Características de <i>M. tuberculosis</i>	4
La tuberculosis pulmonar: una epidemia global.....	8
Resistencia de <i>M. tuberculosis</i> a Fármacos.....	9
Mecanismos de Resistencia a Fármacos de Primera Línea.	9
Mecanismos moleculares relacionados con el fenómeno de farmacorresistencia en <i>M. tuberculosis</i>	10
La importancia de los biomarcadores para combatir la tuberculosis pulmonar	12
Relación de la Expresión Génica de <i>M. tuberculosis</i> con el Efecto Producido por Fármacos.	14
Expresión Génica Diferencial en <i>M. tuberculosis</i>	14
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS.....	18

OBJETIVOS	18
Objetivo general	18
Objetivos particulares	18
METODOLOGÍA	19
Selección de aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	19
Condiciones de cultivo	19
Cinéticas de crecimiento	20
Extracción de RNA total	20
Retrotranscripción y PCR cuantitativo en tiempo real	22
Extracción de proteínas totales	23
Separación electroforética de proteínas en geles desnaturalizantes	24
Ensayos de Western Blot.....	24
Caracterización de anticuerpos primarios	25
Subclonación en vector PET101/D-TOPO pET101	25
Subclonación de genes <i>esxG</i> , <i>esxH</i> y <i>lipF</i> en el plásmido pTriEx™-3 3.0	25
Caracterización de candidatos	27
Subclonación de los genes <i>esxG</i> y <i>esxH</i> en plásmido pMV261	27
Secuenciación capilar de las construcciones	27
Inducción de la expresión de los genes en <i>E. coli</i>	27
Evaluación de la expresión de mRNA en las bacterias transformadas	29
Análisis estadístico	30
RESULTADOS.....	31
Selección de aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	31
Cinéticas de crecimiento	32
Análisis de expresión génica de los aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	34

Extracción de proteínas totales de los aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	46
Expresión de los genes <i>esxG</i> , <i>esxH</i> y <i>lipF</i> en <i>E. coli</i>	48
Subclonación en vector PET101/D-TOPO pET101	48
Subclonación de genes <i>esxG</i> , <i>esxH</i> y <i>lipF</i> en plásmido pTriEx™-3 3.0	50
Expresión génica de los genes subclonados en <i>E. coli</i>	54
Evaluación de la expresión de mRNA en las bacterias transformadas	61
Análisis de codones raros para la expresión en <i>E. coli</i>	63
DISCUSIÓN	65
Fármacorresistencia y cinética de crecimiento	65
Variabilidad de la expresión génica	66
Regulación transcripcional	69
Caracterización de anticuerpos anti-EsxG, anti-EsxH y anti-LipF	71
Expresión de las proteínas EsxG, EsxH y LipF en un sistema de expresión heteróloga en <i>E. coli</i>	72
CONCLUSIONES	77
PERSPECTIVAS	78
REFERENCIAS	79
ANEXO A	86
ANEXO B	88
RESUMEN BIOGRÁFICO	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Pruebas rápidas para detección de tuberculosis farmacorresistente	13
2. Aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> agrupados de acuerdo a su perfil de susceptibilidad a los fármacos de primera línea	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Imagen de <i>M. tuberculosis</i> crecida en medio líquido Middlebrook 7H11.	4
2. Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	5
3. Mapa circular del cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	7
4. Mecanismos de acción de los fármacos antituberculosis de primera línea	10
5. Expresión diferencial relativa de los genes <i>esxG</i> , <i>esxH</i> , <i>rpsA</i> , <i>lipF</i> , <i>esxI</i> , <i>groES</i> , <i>rpmI</i> y <i>narG</i>	16
6. Curvas de crecimiento de los aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> agrupados por fenotipo de susceptibilidad a los fármacos de primera línea.	32
7. Imagen representativa de RNA total de cepas de <i>M. tuberculosis</i>	33
8. Amplificación del gen <i>rrs</i> por PCR	34
9. Gráfica representativa de la estimación cuantitativa de la expresión genética del gen <i>esxG</i> y el gen calibrador <i>rrs</i> .	35
10. Expresión relativa de los genes <i>esxG</i> , <i>esxH</i> , <i>infA</i> , <i>lipF</i> , <i>rpmI</i> , <i>groES</i> y <i>rpsA</i> en la cepa H37Rv bajo diferentes condiciones de cultivo	36
11. Expresión relativa del genes <i>esxG</i> en diferentes aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	38
12. Expresión relativa del genes <i>esxH</i> en diferentes aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	39
13. Expresión relativa del gen <i>infA</i> en diferentes aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	40
14. Expresión relativa del gen <i>lipF</i> en diferentes aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	41
15. Expresión relativa del gen <i>rpmI</i> en diferentes aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	42
16. Expresión relativa del gen <i>groES</i> en diferentes aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	43
17. Expresión relativa del gen <i>rpsA</i> en diferentes aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	44
18. Imágenes representativas del perfil de proteínas totales de <i>M. tuberculosis</i> separadas por SDS-PAGE	45

Figura	Página
19. Imagen de Western blot usando anticuerpos específicos para EsxG y EsxH en extractos de proteínas totales de la cepa H37Rv	46
20. Diagrama de vector de expresión pET101/D-TOPO	47
21. Caracterización por PCR punto final para gen <i>lipF</i> de <i>M. tuberculosis</i> a partir de DNA plasmídico extraído de los candidatos transformados de <i>E. coli</i> DH5α	48
22. SDS-PAGE extractos proteicos <i>E. coli</i> BL21 DE3 Star transformadas con plásmidos conteniendo al gen <i>lipF</i>	49
23. Caracterización de plásmido pTriEx-3	50
24. Construcción y caracterización de la construcción pTriEX/ <i>esxG</i>	51
25. Construcción y caracterización de la construcción pTriEX/ <i>esxH</i>	52
26. Construcción y caracterización de la construcción pTriEX/ <i>lipF</i>	52
27. Imagen representativa de un electroferograma resultado de la secuenciación capilar de las construcciones, pmv261/ <i>esxG</i> .	53
28. Imagen representativa de un electroferograma resultado de la secuenciación capilar de la construcción pMV261/ <i>esxG</i> .	54
29. Imagen del patrón de proteínas totales de <i>E. coli</i> separadas por SDS-PAGE	55
30. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .	56
31. Análisis de la expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> BL21 DE3 Star transformadas	57
32. Análisis de expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> BL21 DE3 Star transformadas con el vector pMV261/ <i>esxG</i> y pMV261/ <i>esxH</i>	57
33. Análisis de la expresión de proteínas recombinantes a partir de extractos proteicos de <i>E. coli</i> BL21 DE3 Star transformadas con el vector pMV261/ <i>lipF</i> .	58
34. Análisis de la expresión de proteínas recombinantes a partir de extractos proteicos de <i>E. coli</i> BL21 DE3 Star transformadas con el vector pMV261/ <i>lipF</i>	59
35. Imagen representativa de las subunidades ribosomales de RNA de <i>E. coli</i> BL21 transformada con vectores de expresión	60
36. Imagen de gel de agarosa al 1% con muestras de RNA total tratadas con DNAsa y RNAsa.	60

Figura	Página
37. Imagen representativa de la amplificación en tiempo real mostrando la expresión del gen <i>esxG</i> .	61
38. Análisis de codones raros en el gen <i>esxG</i> de <i>M. tuberculosis</i> .	35
39. Análisis de codones raros en el gen <i>esxH</i> de <i>M. tuberculosis</i>	63
40. Análisis de codones raros en el gen <i>lipF</i> de <i>M. tuberculosis</i> .	63
41. Diagrama con los mecanismos de expresión recombinante, el sistema pET y la configuración del plásmido	72

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	grado centígrado
μl	microlitro
BL3	Laboratorio de Bioseguridad nivel 3
bp	(<i>base pairs</i>) pares de bases
CO ₂	dióxido de carbono
CTAB	(<i>Cetyl trimethyl Ammonium Bromide</i>) Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	(<i>desoxyribonucleic acid</i>) ácido desoxirribunucleico
g	gramo
h	hora
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
<i>log-Fch</i>	logaritmo de veces de cambio o fold change
<i>log-odds</i>	logaritmo de momios o probabilidad
M	molar
MFR	multifármacorresistente
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
μl	microlitro
μm	micrómetro

mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanogramo
ORF	(<i>Open Reading Frame</i>) marco abierto de lectura
PCR	(<i>polimerase chain reaction</i>) reacción en cadena de la polimerasa
RNA	(<i>ribonucleic acid</i>) ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	(<i>ribosomal ribonucleic acid</i>) ácido ribonucleico ribosomal
s	segundo
SDS	(<i>sodium dodecyl sulphate</i>) dodecil sulfato de sodio
TB	tuberculosis
TE	Buffer de Tris y EDTA
WHO	(<i>World Health Organization</i>) Organización Mundial de la Salud
H ₂ O _{NF}	Agua libre de nucleasas
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilo Dalton
mA	Miliamperios

RESUMEN

Comprender la farmacorresistencia en *Mycobacterium tuberculosis* requiere un análisis integrado de relación filogenética, mutaciones y expresión génica. Previamente nuestro grupo reportó la expresión diferencial de los genes *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* y *lipF* en una cepa susceptible a los fármacos antituberculosis H37Rv y un aislado clínico multifarmacorresistente CIBIN:UMF:15:99. En este trabajo se ha evaluado la expresión de estos genes en 24 aislados clínicos que pertenecientes a diferentes linajes y con diferentes patrones fenotípicos de resistencia a fármacos. Las cinéticas de crecimiento *in vitro* no mostraron diferencias significativas en el crecimiento de los aislados clínicos, por lo tanto, asumimos que la resistencia de las cepas analizadas ocurre sin costo de *fitness* al ser asilados de pacientes con tuberculosis activa. Sin embargo, el análisis de PCR cuantitativa de retrotranscripción reveló una alta variabilidad entre los aislados clínicos incluyendo aquellos asilados con perfiles de farmacorresistencia similares entre sí. Debido a la complejidad de la regulación génica y la amplia diversidad de *M. tuberculosis*, concluimos que el análisis de la expresión génica para identificar marcadores moleculares debe llevarse a cabo individualmente y el nivel de expresión basal debe ser verificado de forma transversal entre diferentes asilados clínicos antes de proponer cualquier aplicación clínica de estos hallazgos.

ABSTRACT

Understanding drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* requires an integrated analysis of strain phylogenetic lineage, mutations and gene expression. Previously, our group reported the differential expression of *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* and *lipF* genes in a sensitive *M. tuberculosis* strain and in a multidrug-resistant clinical isolate. Here, we have evaluated the expression of these genes in 24 clinical isolates with different genetic backgrounds and that have different drug resistance profiles. *In vitro*, growth kinetics analysis showed no difference in the growth of the clinical isolates, thus we assume that drug resistance occurred without a fitness cost because they were isolated from patients with active tuberculosis. However, a quantitative reverse transcription PCR analysis of gene expression revealed high variability among the clinical isolates, including those with similar drug resistance profiles. Due to the complexity of gene regulation pathways and the wide diversity of *M. tuberculosis* lineages, we conclude that the use of gene expression analysis to identify molecular hallmarks for drug resistance must be performed individually, and baseline expression levels should be verified among several different clinical isolates, before proposing any further clinical applications of these findings.

1. INTRODUCCIÓN

Mycobacterium tuberculosis es el agente etiológico principal de la tuberculosis. El tratamiento estándar consiste en la combinación de fármacos denominados de primera línea: rifampicina, isoniazida y etambutol o pirazinamida (Coll 2003).

Recientemente han aparecido cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos de primera línea. Las más difíciles de combatir son las denominadas cepas multifármacorresistentes, las cuales son resistentes a cuando menos isoniazida y rifampicina, ambos medicamentos son los más potentes contra *M. tuberculosis* que se conocen actualmente (De La Iglesia y Morbidoni 2006). La resistencia a los fármacos de primera línea posiblemente se generó por la acumulación de mutaciones debido a una terapia inadecuada. En 2014, se estimó que en el mundo había 480,000 casos de tuberculosis multifármacorresistente (TB MFR) (World Health Organization 2015).

Por lo anterior, existe la necesidad de identificar nuevos marcadores moleculares para vincular las características fenotípicas de *M. tuberculosis* resistente a varios fármacos para su adecuada clasificación. Además, a partir de la identificación de dichos genes se pueden identificar nuevos blancos para el tratamiento de TB MFR.

La expresión diferencial de genes ha sido objeto de estudio para la comprensión de diferentes aspectos fisiológicos de los microorganismos. La tecnología de microarreglos para analizar la expresión génica ha permitido explorar el panorama del transcriptoma de las micobacterias, lo que ha sido de particular utilidad para el estudio de la fisiología y los mecanismos de resistencia a fármacos antituberculosis. De la misma manera, el análisis de la expresión del genoma completo de *M. tuberculosis* ha permitido la comparación del efecto que diferentes condiciones pueden ejercer en el mismo (Butcher 2004).

El análisis de las proteínas, se ha utilizado para complementar estas aproximaciones genómicas funcionales como los perfiles de expresión utilizando microarreglos de DNA, perfiles fenotípicos sistemáticos y genética sistemática (Jiménez 2010).

En este trabajo se evaluó la expresión de genes involucrados con la farmacorresistencia en *M. tuberculosis*, validando los resultados encontrados previamente por nuestro grupo mediante el análisis de expresión diferencial de genes con microarreglos y con la confirmación por PCR cuantitativo, y se pretendió realizar el análisis de la expresión de al menos dos proteínas codificantes por inmunodetección en fase sólida.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *M. tuberculosis*

2.1.1 Microbiología de *M. tuberculosis*

El bacilo *M. tuberculosis* fue descrito inicialmente en 1882 por Robert Koch (Dorrnsoro 2007). Esta bacteria pertenece a los Actinomycetales, familia *Mycobacteriaceae* y pertenece al único género de esta familia *Mycobacterium*. El género *Mycobacterium* engloba cerca de 120 especies que se caracterizan por ser bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)(Cook *et al.* 2009; Tortoli 2006).

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* es un grupo de micobacterias con alta homología en su DNA y está compuesto por *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* (Sakamoto 2012). El principal agente etiológico de la tuberculosis pulmonar en humanos es la especie *M. tuberculosis*. (Dorrnsoro 2007)

2.1.2 *M. tuberculosis* como causante de tuberculosis pulmonar.

M. tuberculosis es uno de los patógenos más antiguos de la raza humana, con evidencia de infección encontrada desde hace 5,000 años. El mecanismo de infección inicia usualmente con la inhalación de microgotas de aerosoles expectoradas por un individuo con tuberculosis pulmonar activa, los bacilos viajan al alveolo donde son fagocitados por macrófagos que desencadenan una reacción proinflamatoria reclutando más leucocitos al sitio de infección, lo que desencadena la formación de un granuloma que involucra neutrófilos, monocitos y macrófagos (Sakamoto 2012).

Sin embargo, el 10% de los infectados desarrollan una enfermedad severa y mortal si ésta no se trata adecuadamente. La gravedad de la enfermedad se relaciona con una alta carga bacilar, susceptibilidad genética o inmunosupresión (Comstock 1982). En ausencia de una enfermedad progresiva un individuo puede permanecer asintomático por años con el patógeno en un estado de latencia que puede reactivarse y transmitirse

posteriormente. En pacientes inmunocompetentes, la infección secundaria puede resultar en diseminación y muerte en el 50% de los casos, sin embargo, la recuperación es posible en el 20-25% de los casos (Bates 1980; Sakamoto 2012).

2.1.3 Características de *M. tuberculosis*

Las micobacterias son bacilos irregulares ligeramente curvados de 0.3-0.5 μm de diámetro con una longitud variable entre 1 a 4 μm , no móviles, no esporulados y ligeramente Gram-positivos (Fig. 1) (Cook *et al.* 2009; Sakamoto 2012).



Figura 1. Imagen de *M. tuberculosis* crecida en medio líquido Middlebrook 7H11. (Tomado de Dorronsoro 2007).

Una de las particularidades de *M. tuberculosis* es su envoltura celular, que está compuesta por una cápsula, una pared celular y una membrana plasmática. La cápsula es la capa externa de las micobacterias y sus características varían en las diferentes especies y cepas de micobacterias. Entre los principales componentes de la pared de *M. tuberculosis* se encuentran los ácidos micólicos y glicolípidos (Brennan 1989; Steck *et al.* 1978).

La pared micobacteriana se encuentra después de la cápsula y posee un alto contenido de lípidos como los ácidos micólicos arabinogalactano-peptidoglucano (mAGP), estas moléculas confieren a la micobacterias sus características hidrofóbicas y le proporcionan una barrera efectiva contra muchos agentes antimicrobianos (Brennan 1989).

La membrana celular contiene derivados de fosfolípidos que se caracterizan por ser altamente glicosilados, con moléculas como lipoarabinomanana (LAM) que tiene un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis (Figura 2) (Gorocica 2005).

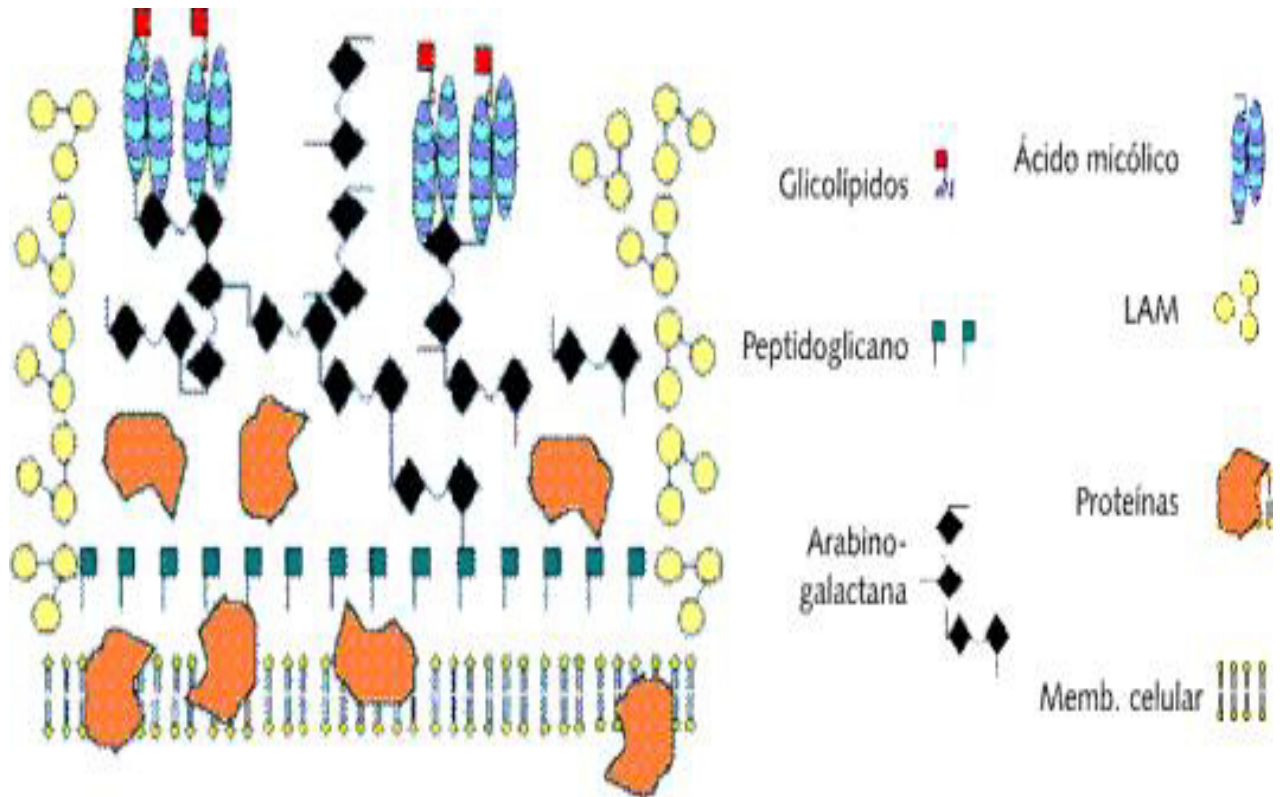


Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. Imagen tomada de (Gorocica 2005).

La compleja fisiología de *M. tuberculosis* se ve reflejada en su genoma. Se sabe que el genoma de la cepa H37Rv consiste en 4.4×10^6 pares de bases, conteniendo aproximadamente 4,000 genes.

La clasificación de los 4,000 genes conforme su función es la siguiente: 225 genes codifican para el metabolismo de lípidos, 207 genes están involucrados con rutas de información, 517 genes tienen funciones relacionadas a la pared celular y procesos celulares, 50 genes codifican para RNAs estables, 137 se han identificado como elementos de inserción y bacteriófagos, 167 codifican para proteínas PE y PPE, 877 son intermediarios en metabolismo y respiración celular, 188 genes codifican proteínas

regulatorias, 91 genes se relacionan a virulencia, detoxificación y adaptación, 911 genes tienen funciones hipotéticas conservadas y 607 codifican para proteínas de funciones desconocidas (Figura3) (Smith *et al.* 2013).

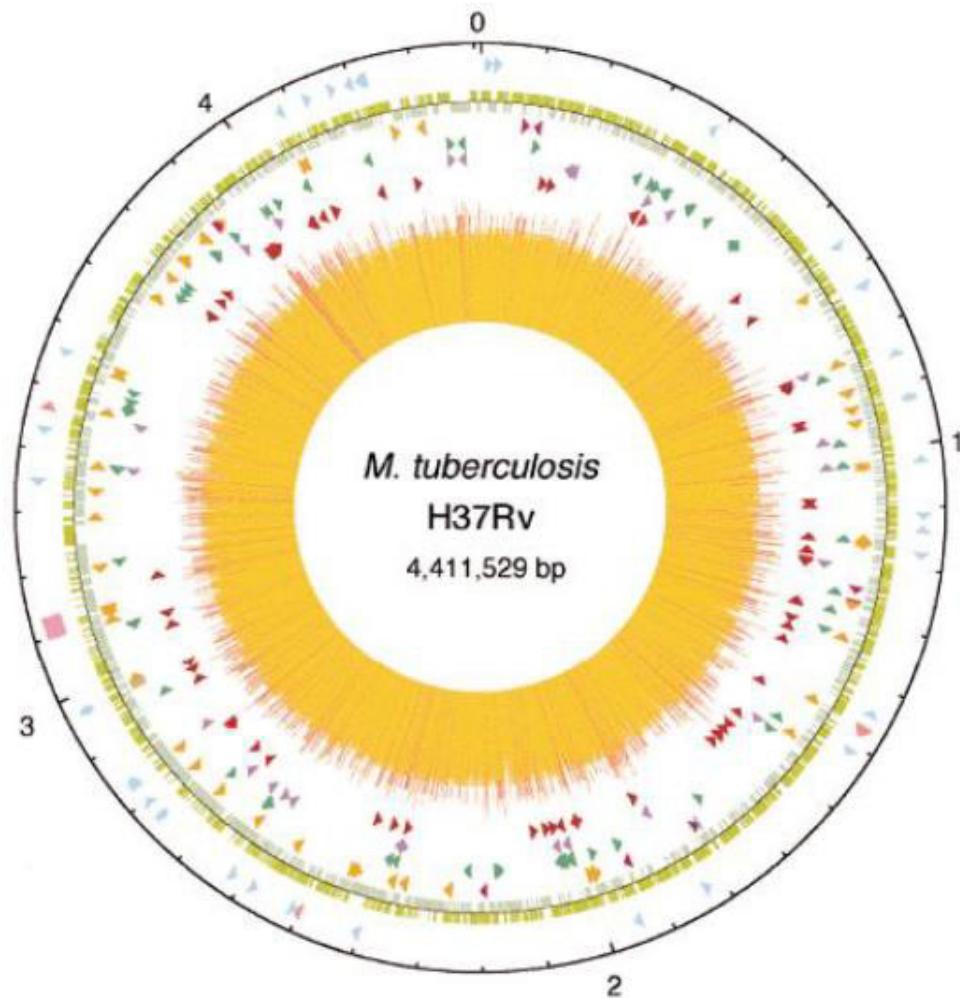


Figura 3. Mapa circular del cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv. El círculo exterior con un 0 representa el origen de replicación, el primer círculo desde el exterior denota la posición de genes de RNA estables (tRNA en azul) y las regiones de repetición directa (cubo rosa); el segundo anillo muestra las secuencias codificantes (en dirección sentido son de verde oscuro y en dirección antisentido son de verde claro); el tercer anillo muestra el DNA repetitivo (secuencias de inserción en naranja, familia 13E12 REP en rosa oscuro y los profagos en azul); el cuarto anillo muestra la posición de los miembros de la familia PPE (en verde); el quinto anillo muestra los miembros de la familia PE (en morado) y el sexto anillo muestra las posiciones de las secuencias PGRS (rojo oscuro). El histograma al centro muestra el contenido de GC. La figura fue generada con el software DNASTAR y publicada inicialmente por Cole en Nature (Cole *et al.* 1998) y posteriormente por Smith en 2003 (Smith *et al.* 2013).

2.2 La tuberculosis pulmonar: una epidemia global

La tuberculosis pulmonar sigue siendo uno de las principales amenazas a la salud pública. En 2014, 1.2 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad y se estimaron 9.6 millones de nuevos casos en todo el mundo. Se estiman también cerca de 480,000 casos de tuberculosis multifármacorresistente (mencionado en adelante como TB-MFR) ocurridos en el 2014 y sólo una cuarta parte de estos fueron detectados y reportados.

En el año 2015 se cumplió el plazo de la estrategia Stop TB, llevada a cabo en 205 países y regiones, cuyos avances han sido importantes. La mortalidad por tuberculosis pulmonar ha disminuido 47% desde 1990 (principalmente desde el inicio de la estrategia global en el 2000) el diagnóstico oportuno y tratamiento efectivo han salvado un estimado de 43 millones de vidas entre el 2000 y el 2014, y la incidencia ha ido disminuyendo en 16 de los 22 países con alta carga de tuberculosis.

A partir del 2016, la nueva meta es erradicar la epidemia global de tuberculosis implementando la estrategia *End TB*, la cual fue adoptada por la asamblea de salud mundial en mayo de 2014, y está enfocada principalmente a reducir el número de muertes por TB en un 90% para el 2030, además de reducir los altos costos del tratamiento de la enfermedad (World Health Organization 2015).

La importancia de los avances en el control de la tuberculosis pulmonar radica principalmente en mejorar el diagnóstico de la enfermedad así como la detección de la farmacorresistencia.

2.3 Resistencia de *M. tuberculosis* a fármacos.

El tratamiento para tuberculosis pulmonar, recomendado por la Organización Mundial de la Salud, consiste en un régimen basado en cuatro antibióticos de primera línea: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) o pirazinamida (PZA) (WHO 2007). Sin embargo, probablemente debido a factores evolutivos y de tratamientos farmacológicos no adecuados o incompletos se han desarrollado cepas resistentes a estos fármacos (Jain y Dixit 2008). La resistencia a por lo menos dos principales fármacos antituberculosis (RIF e INH) se denomina multifármacorresistencia (CDC 2006).

También, la condición de resistencia se ha relacionado con las características estructurales de la pared celular de *M. tuberculosis*, lo cual dificulta la acción de los fármacos anti-TB (Coll 2003), así como las bombas de flujo que intervienen en reducir la sensibilidad a fármacos antituberculosis (Escribano *et al.* 2007).

2.4 Mecanismos de resistencia a fármacos de primera línea.

M. tuberculosis ha desarrollado su resistencia desde la introducción de los fármacos para el tratamiento de la enfermedad. Esta resistencia se debe parcialmente a una acumulación de mutaciones en regiones codificantes o a la activación de enzimas que metabolizan a los fármacos, como se ha propuesto en diferentes estudios (Chaoui *et al.* 2009; Ramaswamy y Musser 1998).

Se han reportado los mecanismos de acción de los fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis. Por ejemplo, el etambutol (etilen-diamino-dibutanol) inhibe la biosíntesis de la pared micobacteriana (Belanger *et al.* 1996). De manera similar, la pirazinamida inhibe la síntesis de los precursores de ácidos grasos de cadena corta que conforman la pared celular. La isoniazida impide la síntesis de ácidos micólicos, mientras que la rifampicina inhibe la transcripción al unirse a la subunidad β de la RNA polimerasa (Figura 4) (Parsons *et al.* 1997; Coll 2003).

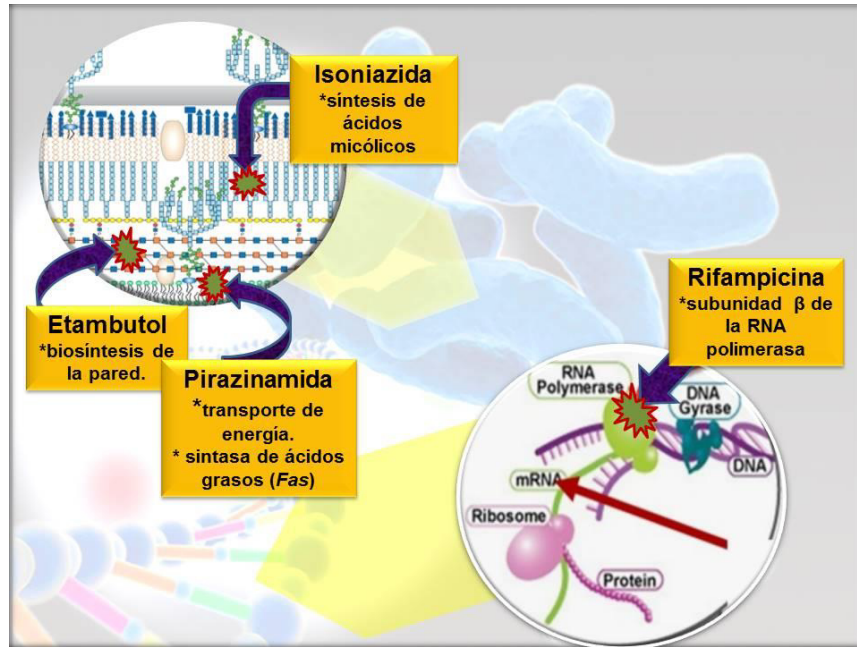


Figura 4. Mecanismos de acción de los fármacos antituberculosis de primera línea. Imagen editada por González-Escalante (2016).

2.5 Mecanismos moleculares relacionados con el fenómeno de farmacorresistencia en *M. tuberculosis*.

El análisis del genoma de *M. tuberculosis* ha sido foco de atención en la búsqueda del origen de diversos fenómenos fenotípicos manifestados en las cepas, que va desde la asociación filogenética basada en la organización del genoma de las cepas de *M. tuberculosis* de importancia epidemiológica (Augustynowicz-Kopec *et al.* 2008), el análisis de polimorfismos en los genes asociando la capacidad de virulencia de las cepas infecciosas de *M. tuberculosis* (Camacho *et al.* 1999) y la identificación de mutaciones en los genes involucrados con los mecanismos de acción de los fármacos de primera línea que confiere resistencia fenotípica a los fármacos antituberculosis (Chaoui *et al.* 2009).

El desarrollo de técnicas moleculares para la caracterización de las cepas, así como la propuesta de algunas pruebas rápidas en el mercado, han tenido auge en los últimos años

(Brossier *et al.* 2010; Cheng *et al.* 2005). Se ha hecho hincapié en aquellas mutaciones en los genes estructurales asociados a la farmacorresistencia de *M. tuberculosis*, principalmente a los fármacos antituberculosis de primera línea (INH, RIF, EMB y PZA); los genes *rpoB* (relacionado a la resistencia a rifampicina), *katG* (relacionado a la resistencia a isoniazida), *inhA* (relacionado a la resistencia a isoniazida y etionamida), *pncA* (relacionado con la resistencia a pirazinamida), *embB* (relacionado a la resistencia a etambutol), *rpoB* (relacionado con la resistencia a rifampicina) *rrs* (relacionado con la resistencia a estreptomina), *rpsL* (relacionado con la resistencia a estreptomina) y *gyrA* (relacionado con la resistencia a fluoroquinolonas) han sido evaluados con técnicas moleculares como secuenciación, análisis heterodúplex, *spoligotyping* y microarreglos para detectar resistencia a fármacos (Cheng *et al.* 2005). Estos estudios han mostrado variabilidad en los índices de asociación con farmacorresistencia conferidos a las mutaciones específicas de los genes mencionados.

La resistencia a isoniazida se ha relacionado con mutaciones en el gen *katG* y en la región promotora del gen *inhA* (Banerjee *et al.* 1994; Chaoui *et al.* 2009; Hillemann *et al.* 2005). Rifampicina es uno de los principales fármacos antituberculosis cuya resistencia está principalmente vinculada con mutaciones en el gen *rpoB* (Ruiz *et al.* 2004; Telenti *et al.* 1993; Zaczek *et al.* 2009).

Las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a etambutol se han caracterizado por presentar mutaciones en el gen *embB*. Sin embargo existen diferentes posturas acerca de la vinculación de algunos polimorfismos y su posible asociación con farmacorresistencia (Brossier *et al.* 2010; Hazbon *et al.* 2008; Jain y Dixit 2008; Mokrousov *et al.* 2002; Post *et al.* 2004).

La efectividad de la pirazinamida puede verse comprometida ante una deficiencia en la enzima pirazinamidasa codificada por el gen *pncA*. El gen *pncA* puede presentar mutaciones que alteren la estructura de la proteína y por ende su función (Cheng *et al.* 2005; Jonmalung *et al.* 2010; Jureen *et al.* 2008; McCammon *et al.* 2005; Mphahlele *et al.* 2008).

2.6 La importancia de los biomarcadores para combatir la tuberculosis pulmonar

Un biomarcador puede definirse como una característica que es objetivamente medida y establecida como un indicador de un proceso biológico normal, patogénico o como parte de una respuesta farmacológica. Los biomarcadores pueden ser específicos del hospedero o del patógeno, y puede implicar una ventaja en el conocimiento del proceso patogénico, incluyendo el estado actual o futuro que comprometa al paciente (McNerney *et al.* 2012).

Aunque actualmente se cuenta con plataformas moleculares nuevas y sensibles para la detección de tuberculosis y su resistencia a fármacos, aún no existe en el mercado una prueba completamente confiable, simple, económica y que se pueda utilizar en los centros de atención a los pacientes. El paso de los avances científicos hacia los biomarcadores y herramientas diagnósticas es posible mediante más estudios, compromiso social y más apoyo para la investigación (Wallis *et al.* 2010).

La importancia de la identificación de genes o rutas metabólicas involucradas en farmacorresistencia radica no solamente en la oportuna clasificación de una cepa micobacteriana como resistente a fármacos, sino que también permite identificar rutas metabólicas como posibles blancos de acción para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos efectivos contra tuberculosis (Cloete *et al.* 2016).

Los retrasos en el diagnóstico, errores metodológicos y la implementación inadecuada de las pruebas rápidas existentes resultan en una mayor morbilidad y mortalidad de los pacientes. Además, la falta de atención a estos casos permitiría un incremento en la transmisión de la tuberculosis en regiones con alta incidencia de VIH o tuberculosis multifármacorresistente (McNerney *et al.* 2012; Wallis *et al.* 2010).

El reto sigue siendo asegurar que cualquier avance hecho hacia el descubrimiento de un biomarcador de farmacorresistencia de *M. tuberculosis* sea considerando su futura aplicación como herramienta diagnóstica en los centros de atención al paciente (McNerney *et al.* 2012). Son urgentes los avances en la identificación y caracterización

de biomarcadores para tuberculosis fármacorresistente, pero el proceso para su identificación y utilización en la clínica sigue siendo lento.

Las pruebas rápidas más utilizadas en la identificación de farmacorresistencia de tuberculosis se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Pruebas rápidas para detección de tuberculosis farmacorresistente

Prueba	Ventajas	Desventajas
Ensayos de amplificación de fagos para detección rápida de resistencia a rifampicina	Producen resultados variables cuando son usados directamente en esputo	Riesgo de contaminación, falsos positivos y fallas técnicas en el ensayo
Ensayos de sondas en línea (e.g. INNO-LiPA Rif y <i>GenoType</i> MTbDR, Xpert MTB/RIF) para detección rápida de resistencia a rifampicina	<ul style="list-style-type: none"> • INNO-LiPA Rif es altamente sensible y específico en cultivos de aislados • <i>GenoType</i> MTbDR tiene excelente sensibilidad y especificidad directamente en especímenes clínicos • Xpert MTB/RIF es muy eficaz para detectar resistencia a Rifampicina^a 	<ul style="list-style-type: none"> • INNO-LiPA Rif tiene menos sensibilidad cuando se usa directamente en especímenes • Xpert MTB/RIF menos confiable para etambutol, estreptomina y pirazinamida^a
Métodos CRI (colorimetric redox indicator) y NRA (nitrate reductase assays) para detección rápida de rifampicina e isoniazida	Métodos colorimétricos son sensibles y usan suministros económicos y equipamiento no comerciales	La información para su aplicación en especímenes clínicos es escasa.
MODS (microscopically observed drug susceptibility) para detección rápida de rifampicina e isoniazida	Alta precisión para detectar resistencia a rifampicina Funciona para cultivos y para uso directo en pacientes Requiere suministros y equipo no comerciales	Menor sensibilidad para resistencia a isoniazida
TLA (thin-layer agar) para detección rápida de rifampicina e isoniazida	Usa equipo y suministros no comerciales.	Información escasa en la evaluación de la efectividad

*Esta tabla se realizó tomando como base el artículo publicado por Wallis, *et al.*, 2010 (Wallis *et al.* 2010)

^a(McNerney *et al.* 2012)

2.7 Relación de la expresión génica de *M. tuberculosis* con el efecto producido por fármacos

El conocimiento del genoma completo de *M. tuberculosis*, en conjunto con otras herramientas moleculares como la tecnología de microarreglos de DNA, ha permitido la comprensión del mecanismo de acción de algunos fármacos antituberculosis mediante el estudio de la expresión diferencial (Betts *et al.* 2003; Boshoff *et al.* 2004; Butcher 2004). También se ha hecho una aproximación utilizando microarreglos de DNA para comprender mejor la relación entre la expresión génica de *M. tuberculosis* con la resistencia de algunas cepas hacia fármacos tuberculosis como la isoniazida (Fu 2006).

2.8 Expresión génica diferencial entre cepas de *M. tuberculosis*

Tomando en cuenta lo anterior, en un estudio previo a este trabajo (Peñuelas-Urquides 2013), donde usamos la tecnología de microarreglos de DNA para evaluar la expresión genética de *M. tuberculosis* como una estrategia para comprender mejor el mecanismo de farmacorresistencia en *M. tuberculosis*, se encontró que la cepa H37Rv que es susceptible a los fármacos de primera línea y la cepa multifarmacorresistente, denominada CIBIN:UMF:15:99, no presentan una diferencia significativa en la expresión génica basal. Sin embargo, cuando se compararon los datos obtenidos de los microarreglos de DNA comparando la expresión génica de las cepas H37Rv y CIBIN:UMF:15:99 expuestas a dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.1% durante 4 h se encontraron diferencias significativas en la expresión de genes entre ambas cepas. Este hecho sugirió que la respuesta diferencial entre las cepas era provocada por el xenobiótico (González-Escalante 2011). A partir de estos resultados, utilizamos la clasificación de genes publicada por (Cole *et al.* 1998), y concluimos que la cepa CIBIN:UMF:15:99 tuvo un incremento equivalente a dos veces la expresión de 6 genes del sistema de metabolismo de moléculas pequeñas, de 7 genes involucrados con el metabolismo de macromoléculas y de 2 genes del sistema de procesos celulares. De manera consistente, estos sistemas se han reportado como modificados en su expresión ante la respuesta de *M. tuberculosis* a otros xenobióticos (Fisher *et al.* 2002).

Los genes vinculados con transportadores tienen especial relevancia ya que se asocian a la resistencia intrínseca de *M. tuberculosis* ante los antimicrobianos (Waddell *et al.* 2004). De manera particular, se ha reportado la sobreexpresión de genes que codifican para probables transportadores en una cepa de *M. tuberculosis* multifármacorresistente, la cual fue expuesta previamente a rifampicina e isoniazida (Jiang *et al.* 2008). Entre los genes modificados en nuestro estudio previo, se encontró al gen *groES*, clasificado dentro de proteínas de transporte, con una sobreexpresión significativa en la cepa CIBIN:UMF:15:99 con respecto a la cepa de referencia H37Rv. El análisis de microarreglos también arrojó datos de expresión diferencial de regiones intergénicas (González-Escalante 2011), las cuales no están caracterizadas, y podrían tratarse de genes no identificados con funciones específicas involucradas en el fenotipo de resistencia a fármacos de primera línea (Fu y Shinnick 2007).

A partir del análisis de genes que se encontraron diferencialmente expresados entre las cepas H37Rv y CIBIN:UMF:15:99, y aplicando los criterios de logaritmo de cambio mayor a uno (*log fold change*) y un valor del estadístico B mayor a cero (*log odds*), se procedió a seleccionar un grupo de genes que fueron evaluados por la técnica de RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR) por la Dra. Katia Peñuelas Urquides (Peñuelas-Urquides, 2013)

Los resultados de este análisis de expresión cuantitativo mostraron que los genes *esxG*, *esxH*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* y *lipF* tuvieron una expresión diferencial entre las cepas H37Rv y CIBIN:UMF:15:99 con y sin exposición a DMSO.

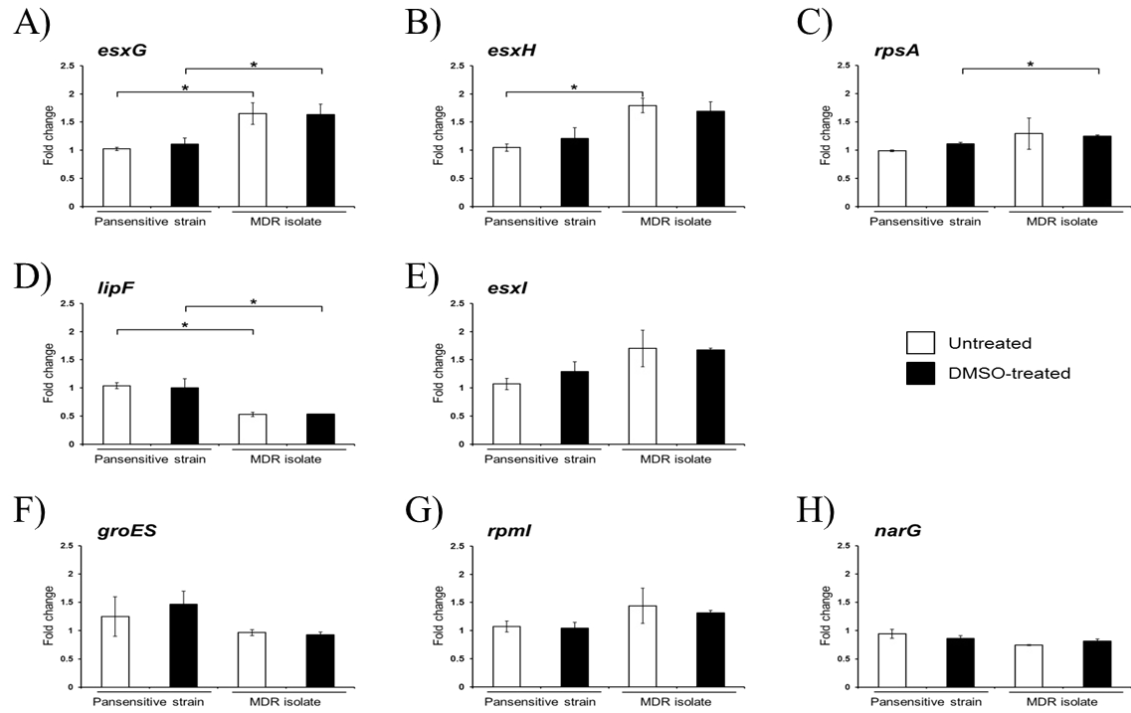


Figura 5. Expresión diferencial relativa de los genes *esxG*, *esxH*, *rpsA*, *lipF*, *esxI*, *groES*, *rpmI* y *narG*. El análisis cuantitativo se realizó comparando la expresión entre la cepa susceptible H37Rv y el aislado clínico multifármacorresistente CIBIN:UMF:15:99 (Penuelas-Urquides *et al.* 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

M. tuberculosis es el principal agente etiológico de tuberculosis pulmonar, y su resurgimiento como un problema de salud mundial es debido a la farmacorresistencia que este microorganismo ha desarrollado en los últimos años. Para el tratamiento de esta enfermedad se cuenta con una batería de fármacos; elegir el esquema adecuado dependerá de la condición de sensibilidad o resistencia de la cepa. Entonces, es prioritario el desarrollo de marcadores moleculares que permitan caracterizar las cepas con base a su sensibilidad o resistencia a los fármacos de primera línea.

4. HIPÓTESIS

La expresión de los genes *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* y *lipF* está vinculada con la condición de farmacorresistencia en aislados clínicos con diferentes perfiles fenotípicos de resistencia a fármacos de primera línea en *M. tuberculosis*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de los genes *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* y *lipF* como posibles marcadores de resistencia a fármacos de primera línea en aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión transcripcional de los genes *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* y *lipF* mediante PCR cuantitativa en 24 aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferente resistencia fenotípica a los fármacos antituberculosis de primera línea.
2. Evaluar la expresión proteica de al menos dos genes asociados a fenotipo de farmacorresistencia en los aislados de *M. tuberculosis* utilizando anticuerpos policlonales específicos.
3. Relacionar la expresión de los genes evaluados con los diferentes fenotipos de farmacorresistencia.

6. METODOLOGÍA

6.1 Selección de aislados clínicos de *M. tuberculosis*

A partir de un cepario de aislados clínicos perteneciente al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), se seleccionaron 24 aislados de *M. tuberculosis*. Dichos aislados habían sido previamente caracterizados genotípicamente y fenotípicamente: se caracterizaron genéticamente mediante las pruebas de polimorfismos por la longitud de los fragmentos digeridos (RFLP, por sus siglas en inglés), por el número de repetidos variables y aleatorios micobacterianos (MIRU-VNTR, por sus siglas en inglés) y por espoligotipos (Penuelas-Urquides *et al.* 2013); y la caracterización fenotípica se realizó mediante el perfil de susceptibilidad a los fármacos de primera línea isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA) utilizando el sistema MGIT BACTEC 960. Por último, se identificaron las mutaciones presentes en los aislados que con mayor frecuencia se relacionan con la farmacorresistencia (González-Escalante 2011). Los aislados clínicos se clasificaron en ocho grupos, cada uno conformado por tres aislados clínicos con el mismo perfil fenotípico de resistencia a los fármacos de primera línea. Además, se tomaron como referencias las cepas H37Rv susceptible a todos los fármacos de primera línea y la cepa CIBIN:UMF:15:99 resistente a los mismos.

6.2 Condiciones de cultivo

Los aislados clínicos se inocularon en medio de cultivo Lowenstein-Jensen y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 2 o 3 semanas. Cuando se obtuvo el crecimiento típico de micobacterias, se tomó una porción de las colonias típicas y se suspendieron, por separado en un tubo de ensayo conteniendo 3.0 mL de agua estéril y 5-7 perlas de vidrio. Esta suspensión se agitó con un vortex durante 1 min, a máxima velocidad y se dejó reposar para permitir el asentamiento de aerosoles generados por este procedimiento. A partir de la suspensión de colonias en agua, se inocularon 150 µL

en medio líquido Middlebrook 7H9 (BD Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA) enriquecido con OADC (Oleic Albumin Dextrose Catalase) (BD Becton Dickinson and Company), al 10%. Los cultivos bacterianos se incubaron a 37° en atmósfera de CO₂ al 5%, agitándolos con un vortex cada tercer día, para evitar la formación de grumos. El crecimiento de las micobacterias se monitoreó, midiendo la turbidez de los tubos de cultivos. Los tubos incubados por ~15 días (que tenían una turbidez equivalente al estándar 1 de McFarland) se usaron como inóculo inicial para los procedimientos subsecuentes.

6.3 Cinéticas de crecimiento

Debido a que la fase de crecimiento de un cultivo bacteriano tiene repercusiones en la expresión génica del microorganismo, se determinaron las cinéticas de crecimiento de los aislados micobacterianos, bajo condiciones de cultivo controladas. Se inocularon los aislados por triplicado en tubos de 13 × 100 mm, conteniendo 3.0 mL de medio de cultivo Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC con 150 µL de inóculo con una turbidez equivalente al estándar 1 McFarland. Los tubos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, y durante 30 días, cada segundo día se agitaron los cultivos y se les midió la turbidez con un nefelómetro PhoenixSpec™ (BD Beckton Dickinson and Company), registrando el crecimiento de los aislados.

6.4 Extracción de RNA total

El RNA total de *M. tuberculosis* se obtuvo a partir de cultivos líquidos en la fase logarítmica de crecimiento utilizando el método reportado por Peñuelas-Urquides (Peñuelas-Urquides *et al.* 2013). Los aislados clínicos se inocularon por triplicado a partir del inóculo inicial en tubos con 3 mL de medio líquido 7H9. Estos cultivos se mantuvieron en las condiciones de incubación previamente descritas, se agitaron cada tercer día y se permitió el intercambio de gases abriendo los tapones de rosca dentro de la campana de bioseguridad. Cuando los cultivos alcanzaron la turbidez >1.0 estándar de McFarland, lo cual significa que se encuentran dentro de la fase logarítmica de

crecimiento, se llevó a cabo la extracción de RNA total de cada aislado clínico. El volumen total de los tres tubos de cultivo por aislado clínico (aproximadamente 10 mL) se transfirió a un tubo cónico de 50 mL, para posteriormente centrifugarlos. La centrifugación se llevó a cabo a 2,570 g durante 20 min a una temperatura de 4°C en una centrífuga de contención de aerosoles para obtener un paquete celular con la biomasa suficiente para la obtención de RNA. Las bacterias fueron resuspendidas en 800 µL del reactivo TRIzol (ThermoFisher scientific, Waltham MA USA) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. La pastilla celular se homogenizó por pipeteo a los 10 min para asegurar que todas las células tuvieran contacto con el reactivo. La suspensión con TRIzol (aprox. 1 mL) se transfirió a un tubo de lisis FastPrep Lysing matrix B (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) con microesferas de sílice para el rompimiento de las paredes micobacterianas. Los tubos fueron agitados en el equipo Fast Prep-24 (MP Biomedicals) por tres intervalos de 20 s y permitiendo reposar las muestras en hielo durante 5 min entre las agitaciones. Los tubos se centrifugaron y el sobrenadante fue transferido a un microtubo de 1.7 mL donde se añadieron 200 µL de cloroformo. Las muestras se mezclaron por inversión 10 veces y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 3 min, posteriormente se centrifugaron a 10,000 g a 4°C durante 15 minutos. Después de la centrifugación se observó una separación de fases en las muestras, y se recuperó la fase acuosa superior cuidadosamente y se transfirió a un tubo nuevo de 1.7 mL donde se añadieron 500 µL de isopropanol para la precipitación de RNA total. Las muestras se centrifugaron a 12,000 g en una microcentrífuga refrigerada (modelo 5430R, Eppendorf) a 4 °C durante 15 min. Posteriormente, se realizó un lavado con etanol frío al 70% y se volvió a centrifugar a 12,000 g por 10 min. El RNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas y su pureza y concentración fueron medidas por espectrometría con el equipo Nanodrop 2000 (ThermoFisher) y se visualizó en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

6.5 Retrotranscripción y PCR cuantitativo en tiempo real

Las muestras de RNA total se trataron con la enzima DNasa I [1 U/ μ L] (Invitrogen, Carlsbad CA USA) a 37°C durante 10 min, y posteriormente la enzima se inactivó a 95°C por 5 min. A partir de 1 μ g de RNA total se sintetizó cDNA utilizando el kit superscript (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron *random primers* (1 μ L) con una mezcla de oligonucleótidos (dNTP's) [2mM c/u] y se incubaron a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente se agregó la segunda mezcla que consistió de buffer First Strand 1 \times , DTT al 0.1M y RNaseOUT (1 μ L). La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 2 min, y finalmente se agregó la enzima M-MLV RT [0.2 U/ μ L] para incubarla a 25°C por 10 min, 37°C por 50 min y finalmente a 70°C por 15 min. Para observar la funcionalidad del cDNA sintetizado se llevó a cabo una reacción de PCR punto final para amplificar el gen constitutivo *rrs*, en un volumen de 25 μ L se agregó 2.5 μ L de buffer de PCR al 10 \times , dNTP's mix [2mM c/u], MgCl₂ [1.5 mM], *primers* para gen *rrs* de *M. tuberculosis forward* (5'-GTCAGGATATTTCTAAATACCTTTGG-3') y *reverse* (5'-CACCTCAGCGTCAGTTACTG-3') a una concentración final de 5ng/ μ L, y 0.125 μ L de la enzima TaqDNA polimerasa [5U/ μ L]. Cuando se observó la integridad del DNA se procedió al análisis cuantitativo de expresión génica.

Para los ensayos de PCR cuantitativo en tiempo real se utilizó el reactivo Universal TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) y sondas TaqMan para los genes *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* y *lipF* previamente reportados (Penuelas-Urquides et al. 2013) y el cálculo de la expresión de estos genes se realizó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak y Schmittgen en 2001 (Livak y Schmittgen 2001). Para la normalización de la expresión, para cada gen evaluado se utilizó como calibrador la expresión del gen constitutivo *rrs*. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos por triplicado técnico. Los ensayos de expresión fueron realizados por lo menos dos veces reproduciendo las condiciones en ambos experimentos.

6.6 Extracción de proteínas totales

A partir del cultivo de los aislados clínicos en medio Lowenstein-Jensen, se realizó una suspensión de crecimiento micobacteriano en agua con perlas de vidrio y éste se utilizó para inocular en medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC al 10%. Cuando se alcanzó la fase logarítmica de crecimiento, se inocularon 150 µL de en tres tubos con 3 mL de medio Middlebrook 7H9, reproduciendo las condiciones utilizadas para la extracción de RNA.

Cuando los cultivos se encontraron en la fase Mid-log (11-14 días), se colectó el volumen de los tres tubos de cultivo en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 2570 g durante 20 min a 4°C para obtener la pastilla celular. Una vez descartado el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 800 µL de buffer PBS frío con inhibidor de proteasas (Pierce, ThermoFisher scientific). La suspensión se transfirió a un tubo FastPrep con matriz de lisis B y se procedió a agitar los tubos en el equipo FastPrep a máxima velocidad 3 veces por lapsos de 20 s, reposando en hielo durante 5 min entre periodos de agitación. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 10,000 g durante 5 min a 4°C para recuperar el sobrenadante.

Para poder manejar los lisados de forma segura fuera del laboratorio de contención, se realizó un doble filtrado de los sobrenadantes recuperados después del proceso de lisis. El lisado se aforó a un volumen final de 5 mL con el inhibidor de proteasas y se filtró con una membrana de baja unión a proteínas de 0.45 µm de Millex-GV (Merck Millipore, Billerica MA USA) y posteriormente con una membrana de 0.22 µm Millex-GV (Merck Millipore). Para ambos casos, se colocaron 150 µL de los filtrados en tubos con medio Lowenstein-Jensen y se mantuvieron en incubación durante 8 semanas; mientras tanto, el lisado se conservó a -80 °C hasta que se confirmó que los lisados no contenían microorganismos viables. La concentración de proteínas se midió utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher) a 280 nm.

6.7 Separación electroforética de proteínas en geles desnaturalizantes

El lisado proteico de las micobacterias se desnaturalizó con buffer de electroforesis (Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX USA) y se calentó a 98 °C durante 5 min. Posteriormente se realizó una separación electroforética vertical en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% con SDS al 10% en un sistema el *Enduro Modular Vertical PAGE* (Labnet, Edison NJ USA) a 30 mA constantes, hasta observar la separación de las proteínas del marcador de peso molecular. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

6.8 Ensayos de Western Blot

Las proteínas se separaron mediante una electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, como se describió previamente, después se realizó una transferencia en frío a una membrana de PVDF a 60V durante toda la noche. Para observar la transferencia de proteínas, la membrana se tiñó con el colorante Rojo de Ponceau.

La membrana se incubó con los anticuerpos específicos, previo bloqueo con una solución al 5% de leche descremada (Svelty Nestlé, Vevey, Suiza) disuelta en buffer TBS-T. Los anticuerpos primarios anti-EsxG, anti-EsxH, y anti-LipF fueron sintetizados por la compañía Genemed Synthesis (Wood Lake Center, TX, USA) para reconocer sitios con potencial antigénico de las proteínas EsxG, EsxH y LipF, respectivamente. Los anticuerpos primarios se utilizaron de forma individual en diferentes concentraciones 1:100, 1:500, 1:1,000, 1:2,000 y 1:5,000 en una solución de TBS-T a 4 °C durante toda la noche y en constante agitación para favorecer la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Se lavó la membrana con buffer TBS-T vigorosamente durante tres períodos de agitación de 5, 10 y 15 min y se puso en contacto con el anticuerpo secundario anti *rabbit* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), diluido 1:10,000 en incubación a 4 °C durante 1 h.

Para el revelado se usó la membrana del kit Clarity™ Western ECL Blotting Substrate ECL *Enhanced Chemiluminescence* (BioRad, Hercules CA USA) y se colocó una placa

fotográfica (Kodak, Rochester NY USA), se sumergió durante 2 min en la solución reveladora GBX (Kodak), se realizó un breve lavado con agua de grifo y después se colocó durante 2 min en la solución fijadora GBX (Kodak). Después de este procedimiento, la placa fue secada para ser analizada.

6.9 Caracterización de anticuerpos primarios

Para la caracterización de la especificidad de los anticuerpos anti-EsxG, anti-EsxH Y anti-LipF, se buscó la expresión de las proteínas recombinantes en un sistema de expresión en *E. coli*. Con la colaboración de los L.B.G. Joyce Rigal Leal y René Javier Robles González se logró amplificar y subclonar los genes *esxG*, *esxH*, y *lipF* con una secuencia CACC direccional para insertar en un vector de clonación PET101/D-TOPO/101 D. Este vector permite la expresión en la cepa BL21 STAR™(DE3) de *E. coli*, incluida en el kit de expresión Champion™pET101 Directional PET101/D-TOPO® Expression Kit with BL21 STAR™(DE3) Star™(DE3) One Shot® (Rigal-Leal 2015).

6.9.1 Subclonación en vector PET101/D-TOPO pET101

El producto amplificado por PCR, obtenido a partir del genoma de *M. tuberculosis* se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor utilizando el kit Champion™pET101 Directional PET101/D-TOPO® Expression Kit with BL21 STAR™(DE3) Star™(DE3) One Shot® Chemically Competent *E. coli*. Brevemente, los productos de PCR con la secuencia de direccionalidad PET101/D-TOPO fueron agregados a la reacción de clonación en una relación molar de 2:1 (inserto: vector) con el vector PET101/D-TOPO pET101, y la solución salina incluida en el kit. Se llevó a cabo la transformación por choque térmico de las bacterias *E. coli* competentes y 100 µL de las bacterias transformadas se inocularon en placas LB agar con ampicilina (1 mg/mL) para la selección de candidatos.

Los candidatos fueron cultivados individualmente en medio líquido LB con ampicilina e incubados a 37 °C para su crecimiento. Una vez que se obtuvo la biomasa suficiente (aproximadamente 24 h después) se realizó la extracción de DNA plasmídico mediante

el método de lisis alcalina. Las construcciones fueron caracterizadas mediante PCR y/o restricción enzimática.

6.9.2 Subclonación de genes *esxG*, *esxH* y *lipF* en el plásmido pTriEx™-3 3.0

El vector PTriEx™-3 se transformó en una cepa de *E. coli* DH5 α , se seleccionaron los candidatos en medio LB agar con ampicilina y se llevó a cabo la extracción de DNA plasmídico como se describió previamente. Se realizó la caracterización del plásmido por restricción enzimática utilizando las enzimas *Bgl*I y *Hae*II (Promega, Madison WI USA). Brevemente, se añadieron 2 μ g de DNA plasmídico y 1 μ L de cada enzima (1 U/ μ L), y la reacción se incubó durante toda la noche a 37°C en agitación constante.

Una vez caracterizado, el plásmido fue purificado en columna usando el kit PureYield Plasmid Midiprep System (Promega).

Para linearizar el plásmido PTriEx™-3, se realizó una digestión con la enzima *Bam*HI; de manera simultánea, se extrajeron los insertos correspondiente a los genes *esxG*, *esxH* y *lipF* a partir de las construcciones previamente caracterizadas en PET101/D-TOPO101 utilizando también la enzima *Bam*HI. Las digestiones se incubaron a 37°C durante toda la noche en agitación. Las reacciones de digestión enzimática se observaron en un gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (Biotium, Hayward CA USA).

El plásmido PTriEx™-3 linearizado se desfosforiló utilizando 1 unidad de la enzima fosfatasa CIAP (Invitrogen), se incubó a 37 °C durante 1 h y posteriormente la actividad fosfatasa se inactivó a 65 °C durante 15 min con 1 μ L de EDTA [0.125 M].

Para eliminar las sales de las reacciones previas, los fragmentos se purificaron utilizando el kit GENE CLEAN (MP Biomedicals). El fragmento y el vector linearizado se purificaron a partir de un gel de agarosa al 2% teñido con Gel Red y el DNA fue cuantificado por espectrometría.

La ligación se llevó a cabo con 2 U de enzima T4 DNA ligasa (Promega) [1-3 U/ μ L], con una relación molar de 1:3 (plásmido: inserto) y buffer de ligación (1 \times). La reacción se incubó durante 4 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se transformó en

una cepa de *E. coli* DH5 α y se sembró en LB agar con ampicilina [1 μ g/ μ L] y se incubó a 37°C hasta observar el crecimiento de colonias candidatas.

6.9.3 Caracterización de candidatos

Después de realizar la extracción de DNA plasmídico, el inserto de interés se amplificó por PCR utilizando los cebadores específicos para *esxG*, *esxH* y *lipF*, bajo las siguientes condiciones: en un volumen de 25 μ L se agregó 2.5 μ L de buffer de PCR al 10 \times , dNTP's mix [2mM c/u], MgCl₂ [3.5 mM], cebadores *forward* y *reverse* una concentración final de 5ng/ μ L, y 0.125 μ L de la enzima TaqDNA polimerasa [5U/ μ L]. Para caracterizar el inserto de *lipF* fue necesario realizar una digestión enzimática con la enzima *Bam*HI para visualizar la liberación del fragmento correspondiente al tamaño molecular de *lipF* (834 pdb). Los candidatos con inserto se secuenciaron para confirmar la fidelidad de la secuencia, así como para confirmar la orientación del inserto en el vector.

6.9.4 Subclonación de los genes *esxG* y *esxH* en plásmido pMV261

El plásmido purificado pMV261 se linearizó con la enzima *Bam*HI y se insertaron los genes *esxG* y *esxH* con las mismas condiciones de ligación mencionadas previamente. Referente a la construcción pMV261/*lipF*, dos candidatos fueron realizados por el Q.F.B. Moisés Nietro y la Q.F.B. Ana Leticia Arriaga. Se seleccionaron los candidatos en medio LB con kanamicina [50mg/mL], se realizó la extracción de DNA plasmídico, y las construcciones se caracterizaron por PCR y secuenciación automatizada.

6.9.5 Secuenciación capilar de las construcciones

La secuenciación automatizada se llevó a cabo utilizando el kit Big Dye V3.1 (Applied Biosystems) en conjunto con el iniciador reverso de cada gen *esxG*, *esxH* o *lipF*. La reacción de marcaje se llevó a cabo con DNA plasmídico purificado (aproximadamente 800 ng), 4 μ L de buffer de secuenciación, 4 μ L del mix de secuenciación, 100 ng de primer y el volumen se llevó a 20 μ L. Los 34 ciclos de marcaje se llevaron a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) como sigue: 94 °C 30 s, 50 °C 15 s, 60 °C por 4 min. Una vez concluido el marcaje, se procedió a purificar el producto marcado por precipitación etanólica. El DNA marcado se desnaturalizó con formamida a 98 °C

por 5 min y se colocó en una placa de 96 pozos. La placa fue introducida en el secuenciador capilar 3130xl (Hitachi/Applied Biosystems). La secuencia fue analizada utilizando el software SeqScape v2.7 (Applied Biosystems) utilizando la secuencia del vector con el gen insertado y comparándola con la secuencia reportada para la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

6.9.6 Inducción de la expresión de los genes en *E. coli*

Las construcciones caracterizadas se transformaron en la cepa de expresión *E. coli* BL21 STAR™ (DE3) mediante choque térmico. Brevemente, los viales con las células competentes se descongelaron en hielo y se añadió el DNA plasmídico de cada construcción (aproximadamente 1µg de DNA en un volumen de 10µL). Paralelamente, se utilizó el vector sin inserto como control negativo y el vector PET101/D-TOPO101/*lacZ* se utilizó como control de inducción. Las mezclas con los plásmidos se incubaron en hielo por 30 min, y después colocaron en un termobloque a 42°C durante 30 s para nuevamente volverlos a transferir al hielo. Se añadió 1mL de medio de cultivo LB y se incubó con agitación constante por 1 h a 37 °C. Después, 200 µL de cada la mezcla de bacterias transformadas se transfirieron a un tubo con 3mL de medio LB con el antibiótico ampicilina (1mg/mL) y se incubó durante 12 horas a 37°C. Posteriormente, 1 mL del cultivo fue inoculado en un tubo cónico con 20mL de medio LB con ampicilina, y se incubó en agitación constante por 2 h. Cuando se alcanzó la fase logarítmica de crecimiento bacteriano (D.O. 0.4 – 0.8), el cultivo se dividió en dos tubos cónicos con 10mL cada uno, y a uno de los tubos se le añadió isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en una concentración final de 1mM. Todos los tubos se incubaron en agitación constante durante 4 h a 37°C. Para el caso de las construcciones con el vector pMV261, se realizó el mismo procedimiento con excepción de la adición de IPTG, pues este vector posee un promotor constitutivo.

Una vez concluida la inducción/expresión, las muestras fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS 1× con inhibidor de proteasas (Complete®, Promega). Los cultivos fueron sometidos a choque térmico, el cual consistió de 5 ciclos de 3 min alternando entre temperaturas de -60 °C (hielo seco) y 37°C (termobloque). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas y los sobrenadantes fueron colectados

para el análisis de proteínas por SDS-PAGE y Western Blot como se describió anteriormente.

6.9.7 Evaluación de la expresión de mRNA en las bacterias transformadas

A partir de los cultivos de *E. coli* BL21 transformados y cultivados para la expresión del gen recombinante, se realizó la extracción de RNA total. Los cultivos de 10 mL se centrifugaron durante 5 min a 10,000 *g* a 4 °C. La pastilla celular se resuspendió en 2 mL del reactivo TRIzol y se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 min. La suspensión fue transferida a microtubos de 1.5 mL, donde se añadieron 200 μ L de cloroformo. La mezcla se centrifugó durante 10 min a 4°C y 12,000 *g* para permitir la separación de fases; la fase superior translúcida se transvasó a un tubo nuevo donde se añadieron 500 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min. Los tubos se centrifugaron a 7,500 *g* por 10 min a 4°C para precipitar el RNA. La pastilla de RNA se lavó con etanol frío al 70%, y el RNA se resuspendió con TE 1 % filtrado. La integridad del RNA se verificó en un gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed y fue cuantificado por espectrofotometría con luz UV.

El RNA total se trató con 1 μ L [1 U/ μ L] de DNase I (Invitrogen), durante 5 min a 60°C, y posteriormente la enzima se inactivó a 95°C. A partir de 1 μ g de RNA total se sintetizó el cDNA utilizando el kit superscript (Invitrogen) como se describió anteriormente. Se evaluó la expresión de *esxG* mediante PCR tiempo real utilizando la sonda específica TaqMan para *esxG* (Penuelas-Urquides *et al.* 2013).

6.10 Análisis estadístico

Para comprar las cinéticas de crecimiento se utilizó la prueba estadística H de Kruskall-Wallis. Para comparar la expresión diferencial de los genes analizados se compararon las medias mediante un análisis ANOVA, donde se consideró una diferencia significativa cuando $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Selección de aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

A partir del reservorio de aislados clínicos del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, se seleccionaron aislados clínicos de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes del Noreste de México. Los aislados fueron previamente caracterizados fenotípicamente por BACTEC 960 y por REMA (análisis de micro dilución en placa) (ver Anexo B) y genotipificados por las técnicas MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats), RFLP-IS6110 (*Restriction Fragment length Polymorphism*) y Spoligotyping (Penuelas-Urquides *et al.* 2013; Penuelas-Urquides *et al.* 2014) (ver Anexo A).

Para formar grupos representativos, se tomó en consideración que los aislados tuvieran susceptibilidad o resistencia a fármacos de primera línea. Las referencias para este estudio fueron la cepa susceptible H37Rv (ATCC 25618), y el aislado clínico farmacorresistente CIBIN:UMF:15:99. Además se analizaron ocho grupos con tres aislados clínicos que tuvieron el mismo perfil de susceptibilidad o resistencia a los fármacos de primera línea, incluyendo un grupo susceptible a todos los fármacos de primera línea como la cepa de referencia H37Rv (grupo 8) y un grupo resistente a los mismos (grupo 1) (Tabla 2).

Tabla 2. Aislados clínicos de *M. tuberculosis* agrupados de acuerdo a su perfil de susceptibilidad a los fármacos de primera línea

Grupo	Aislado	Familia	INH	RIF	EMB	PZA
1*	1025	N/A				
	1007	LAM3	R	R	R	R
	986	T1				
2*	918	T2-T3				
	852	T2-T3	R	R	S	R
	813	EAI2-Manilla				
3*	1068	X1				
	929	H3	R	R	S	S
	840	H1				
4*	1003	H3				
	998	X1	R	S	S	S
	804	LAM3				
5*	1044	X1				
	903	X1	S	S	S	S
	814	X2				
6	983	H3				
	822	S	R	R	S	R
	803	T1				
7	943	LAM9				
	939	X1	R	S	S	S
	867	T2				
8	801	LAM3				
	806	T1	S	S	S	S
	810	X3				
Referencia	H37Rv	H37Rv	S	S	S	S
	CIBIN:UMF:15:99	X1	R	R	R	R

N/A, No asignado; INH, isoniazida; RIF, rifampicina; EMB, etambutol; PZA pirazinamida; R, resistente; S, susceptible; * estos grupos además tienen resistencia a estreptomina

7.2 Cinéticas de crecimiento

Se evaluó el crecimiento en medio líquido de los aislados clínicos por 30 días. Cada aislado clínico se cultivó por triplicado bajo las mismas condiciones, y se obtuvo el promedio de las lecturas realizadas cada dos días, donde se observó una baja

variabilidad de las cinéticas de crecimiento entre las réplicas (desviación estándar < 0.1) (Figura 6).

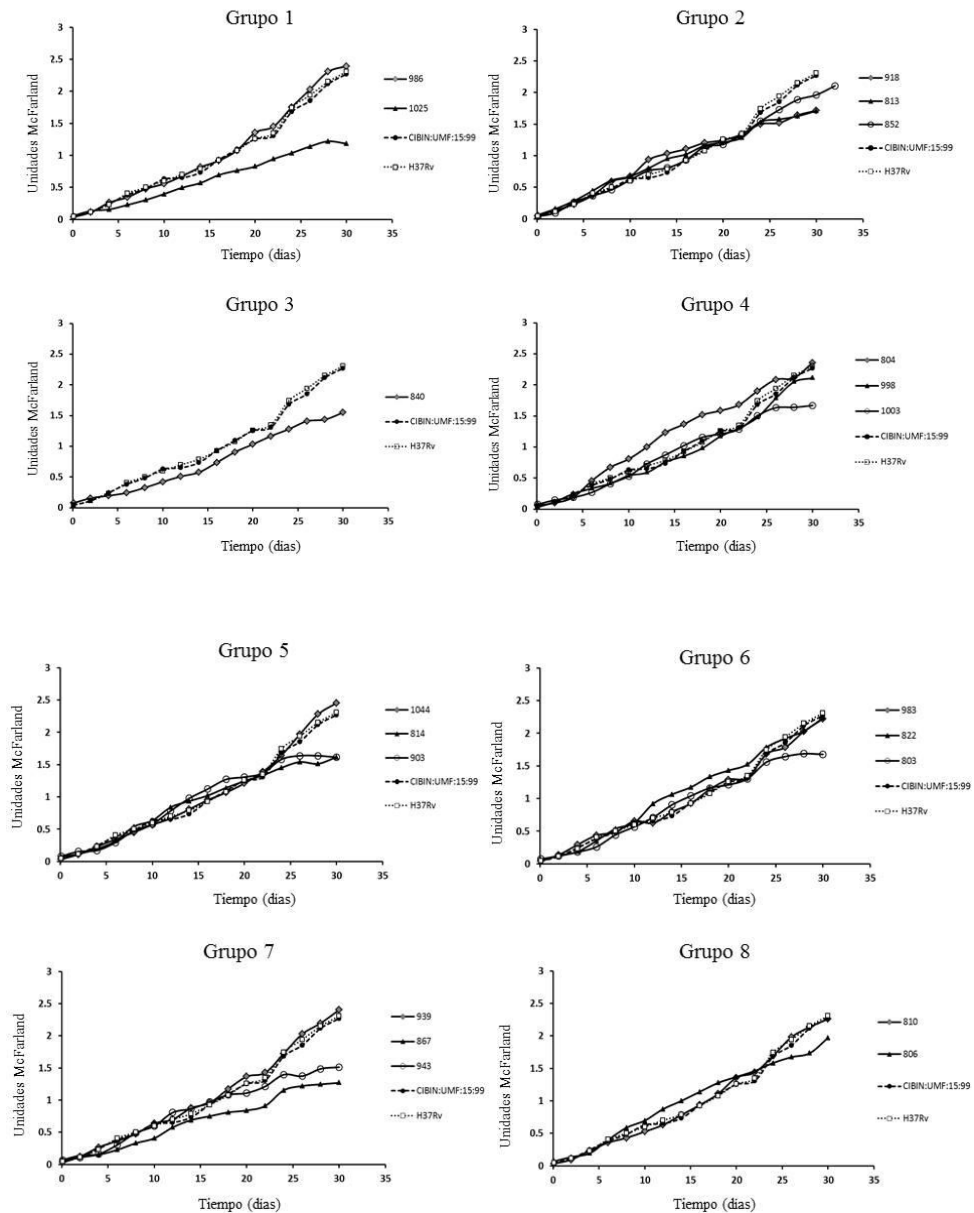


Figura 6 Curvas de crecimiento de los aislados clínicos de *M. tuberculosis* agrupados por fenotipo de susceptibilidad a los fármacos de primera línea. En cada gráfica se incluyen las cepas de referencia H37Rv y CIBIN:UMF:15:99.

En el análisis de las cinéticas de crecimiento se observó que los aislados clínicos crecen con una dinámica muy similar (Figura 6). Al comparar las cepas de referencia se observó que la susceptibilidad o resistencia a los fármacos de primera línea no tienen un

efecto significativo sobre la cinética de crecimiento de los cultivos. El análisis estadístico H de Kruskal-Wallis reveló que no existe diferencia significativa entre los valores de las curvas de crecimiento ($P>0.05$). El crecimiento de los cultivos se mantuvo por 30 días, y con base en este monitoreo se estableció que la media de la fase logarítmica de crecimiento fue entre los días 10 y 15 de cultivo.

7.3 Análisis de expresión génica de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*

Para evaluar la expresión de los genes por efecto de las condiciones del cultivo, se realizó el análisis bajo dos condiciones distintas: con volumen y tiempo de cultivo. Se observó que el tiempo de cultivo tiene mayor influencia en la expresión génica que el volumen de cultivo, por lo que se determinó que la extracción de RNA total se llevaría a cabo entre los días 11 y 13 de cultivo.

Una vez realizada la extracción del RNA total de los aislados clínicos por duplicado (Figura 7), se sintetizó el cDNA y se evaluó la funcionalidad mediante la amplificación del gen *rrs* (Figura 8)

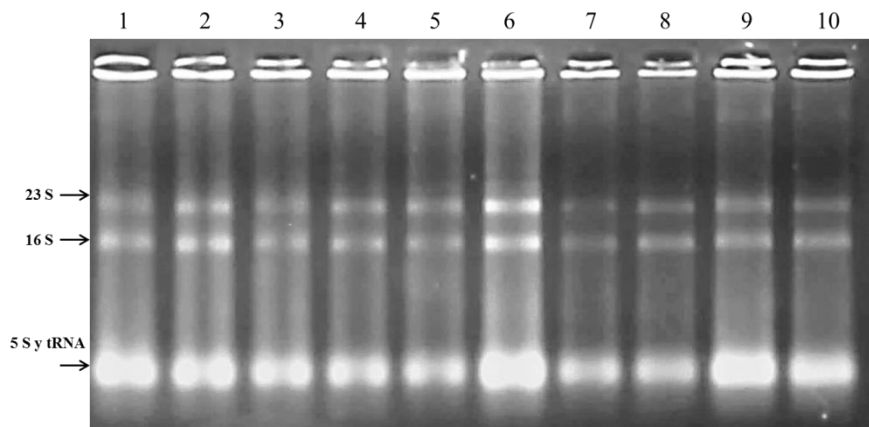


Figura 7 Imagen representativa de RNA total obtenido de cepas de *M. tuberculosis*. Los carriles 1 a 10 representan diferentes muestras de los aislados clínicos. Las flechas del lado izquierdo de la imagen muestran las subunidades ribosomales 5S, 16S y 23S, así como el RNA de transferencia (tRNA).

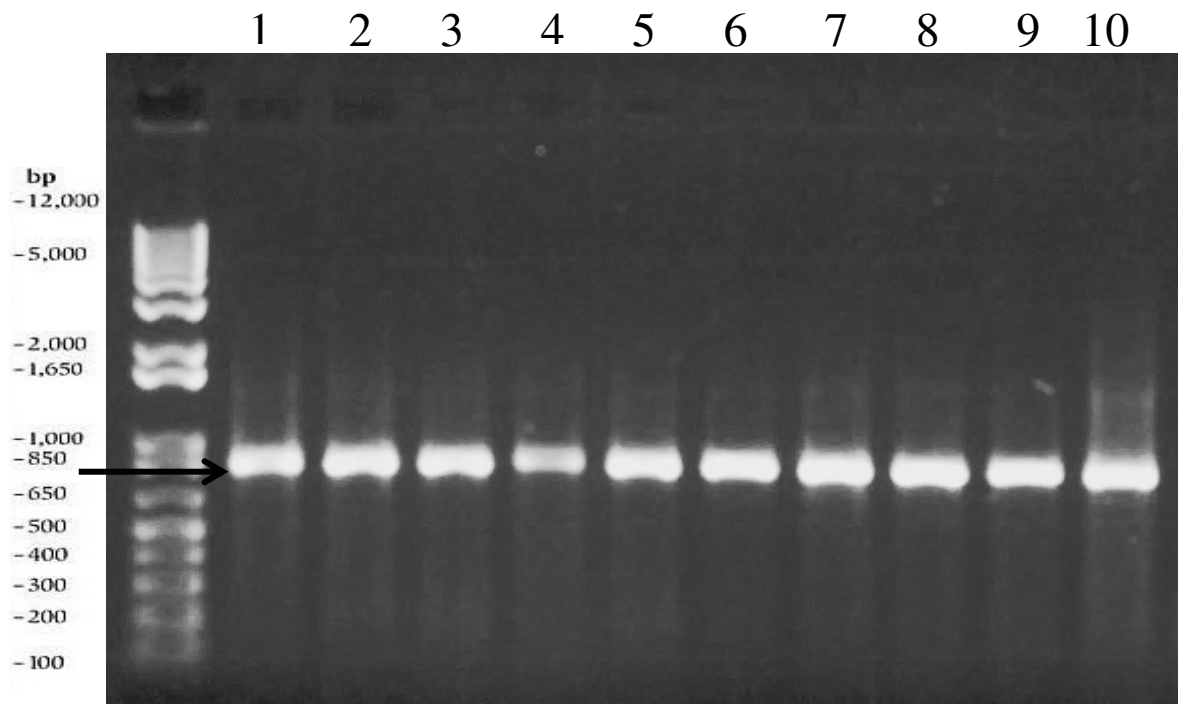


Figura 8. Amplificación del gen *rrs* por PCR. A partir del cDNA sintetizado se realizó la amplificación por PCR de un fragmento de 834 pdb del gen *rrs* (flecha). Los carriles 1 a 10 representan distintas muestras provenientes de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

Posteriormente, se llevaron a cabo los ensayos de PCR en Tiempo real para evaluar la expresión relativa de los genes seleccionados. Se utilizó como gen calibrador los niveles de expresión del gen *rrs* (Figura 9).

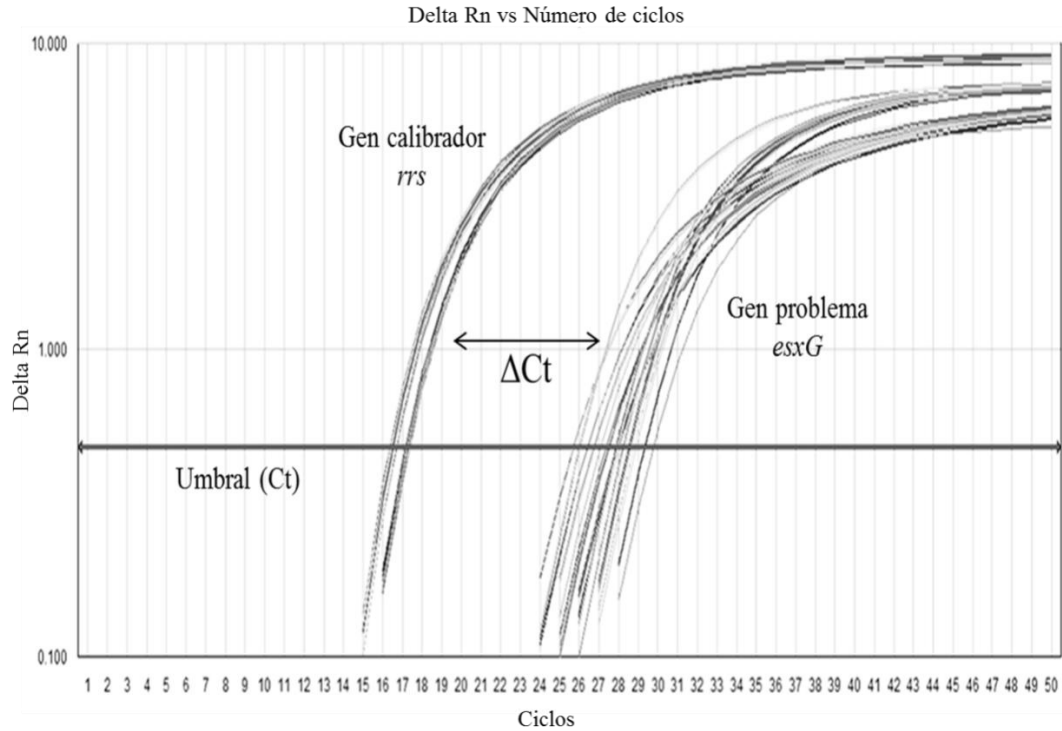


Figura 9. Gráfica representativa de la estimación cuantitativa de la expresión genética del gen *esxG* y el gen calibrador *rrs*. Delta Rn = (Rn+) – (Rn-), donde Rn+ es la intensidad de emisión de la PCR con molde/ intensidad de emisión de fluorescencia de la referencia pasiva y Rn- es la intensidad de emisión de fluorescencia de la PCR sin molde (NTC)/intensidad de emisión de fluorescencia de la referencia pasiva; Ct es el número de ciclo en el cual la detección de la intensidad de la emisión del reportero marcado se separa del ruido de fondo; ΔCt , es la diferencia de la intensidad de emisión de fluorescencia entre un marcador (*rrs*) y otro (*esxG*) y se relaciona con el número de copias de DNA templado para cada gen.

Para evaluar la expresión genética por efecto de condiciones en el cultivo (días de cultivo y volumen de medio de crecimiento), la cepa H37Rv fue crecida en medio líquido de 8 a 13 días en volumen de 3 y 10 mL. Los resultados mostraron una alta variabilidad en la expresión de cada gen evaluado independiente del tiempo de crecimiento y volumen de crecimiento (Figura 10).

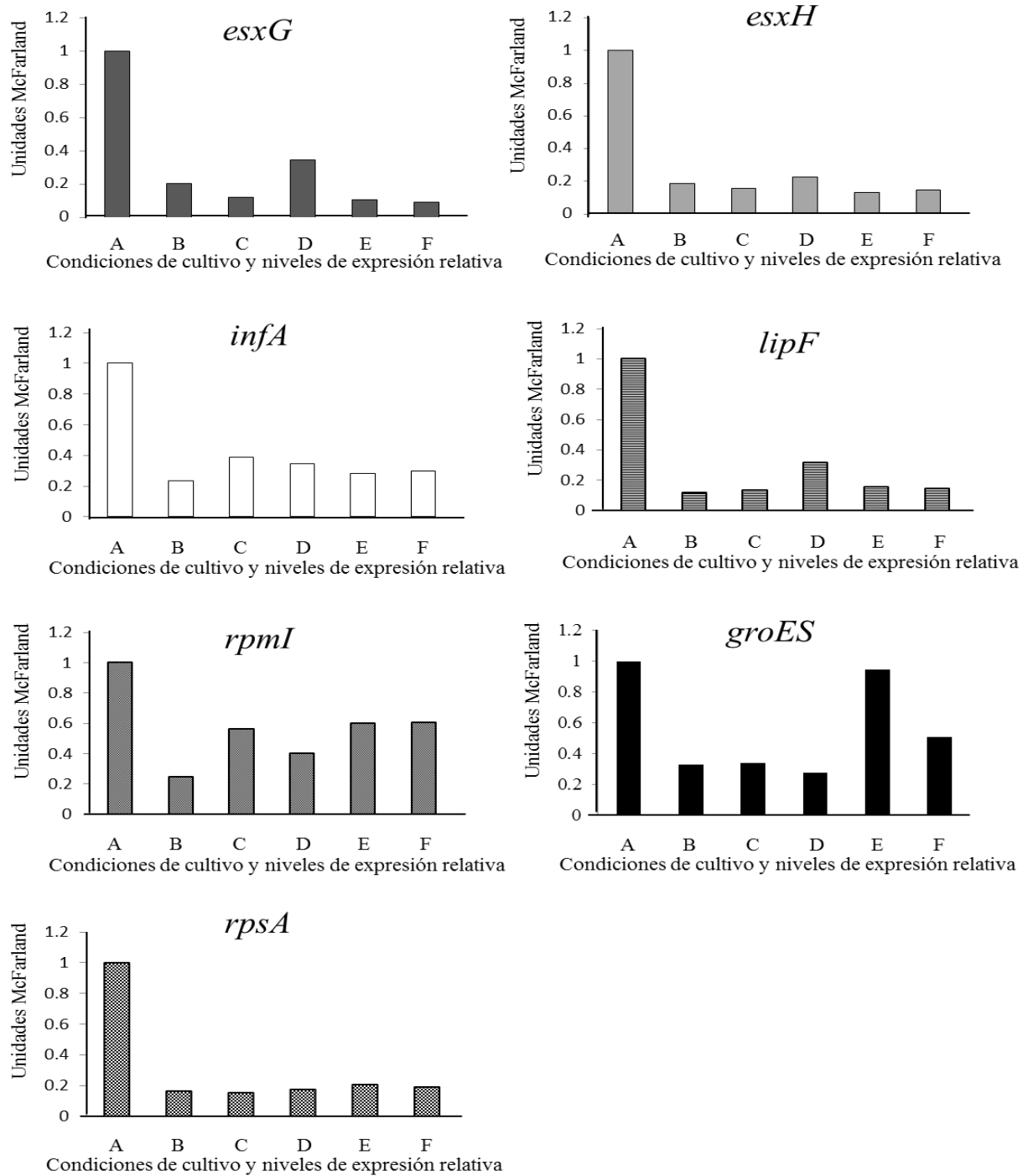


Figura 10. Expresión relativa de los genes *esxG*, *esxH*, *infA*, *lipF*, *rpmI*, *groES* y *rpsA* en la cepa H37Rv bajo diferentes condiciones de cultivo. A) Cultivo 3 mL día 8, B) cultivo 3 mL día 13, C) cultivo 10 mL día 13, D) Cultivo 3 mL día 8, (segundo experimento), E) Cultivo 10 mL día 11, F) Cultivo 10 mL día 13.

Con base en lo anterior, se decidió utilizar las condiciones de crecimiento previamente reportadas pero en un volumen de 3 mL (Penuelas-Urquides *et al.* 2013) y se midió la expresión de los genes *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* y *lipF* en distintos aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

Los patrones de expresión para los genes *esxG* y *esxH* fueron similares (Figuras 11 y 12). Los aislados 986 (grupo 1, resistente a los 5 fármacos) y 929 (grupo 3, resistente a rifampicina e isoniazida) mostraron los niveles más altos de expresión. En el aislado 1007 (también perteneciente al grupo 1) se observa una expresión por debajo del 50% respecto a la cepa de referencia para el gen *esxG*; de la misma manera encontramos expresión disminuida en los aislados 852, 813, 803, 806, 810 (grupo 8, susceptible a todos los fármacos). En el caso de los niveles de expresión del gen *esxH*, solo se observó una expresión disminuida en el aislado 943 (grupo 7, resistente a isoniazida).

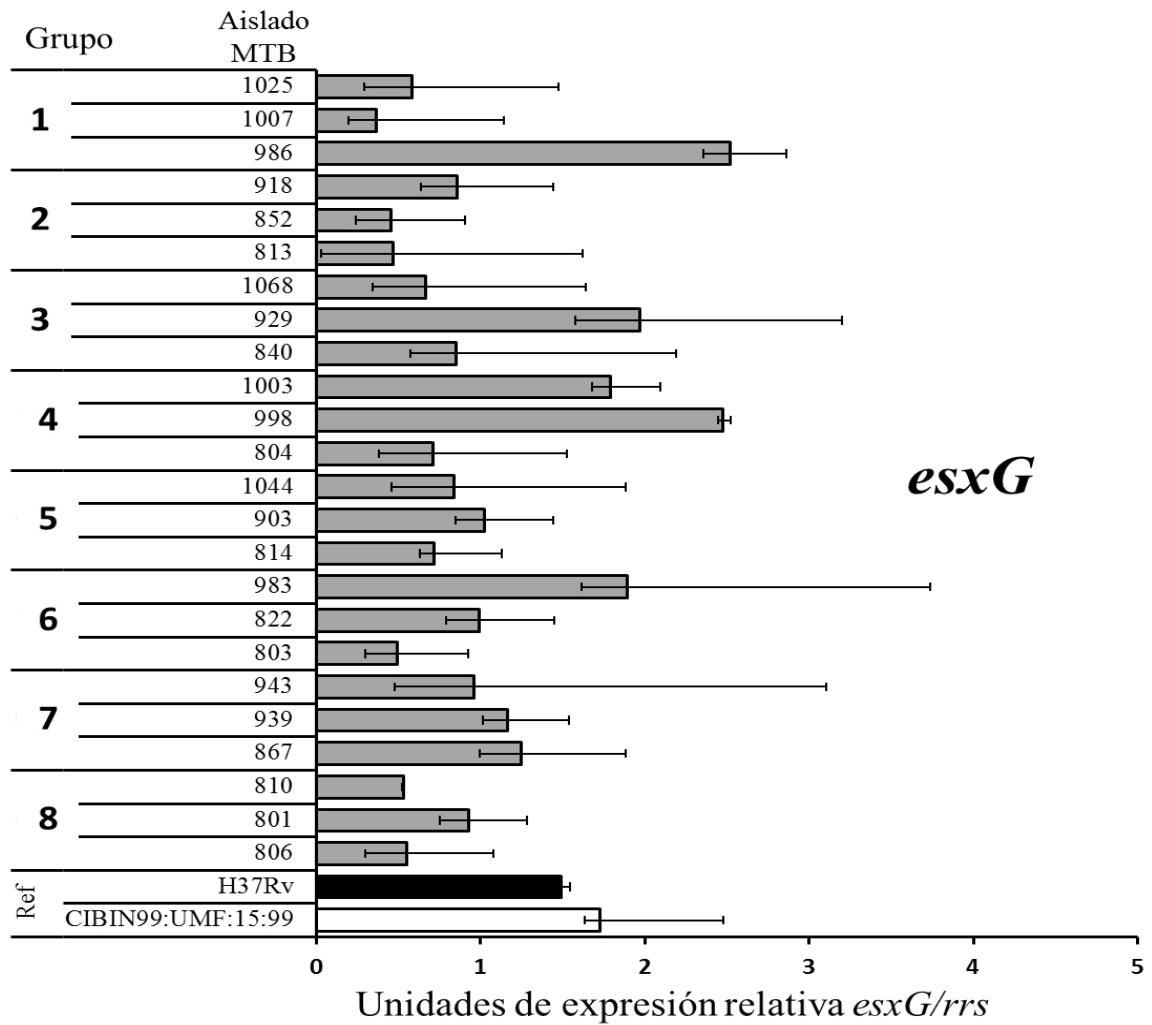


Figura 11. Expresión relativa del gen *esxG* en diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis*. El promedio de las réplicas de H37Rv fue establecido arbitrariamente como 1 y se comparó con la expresión de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

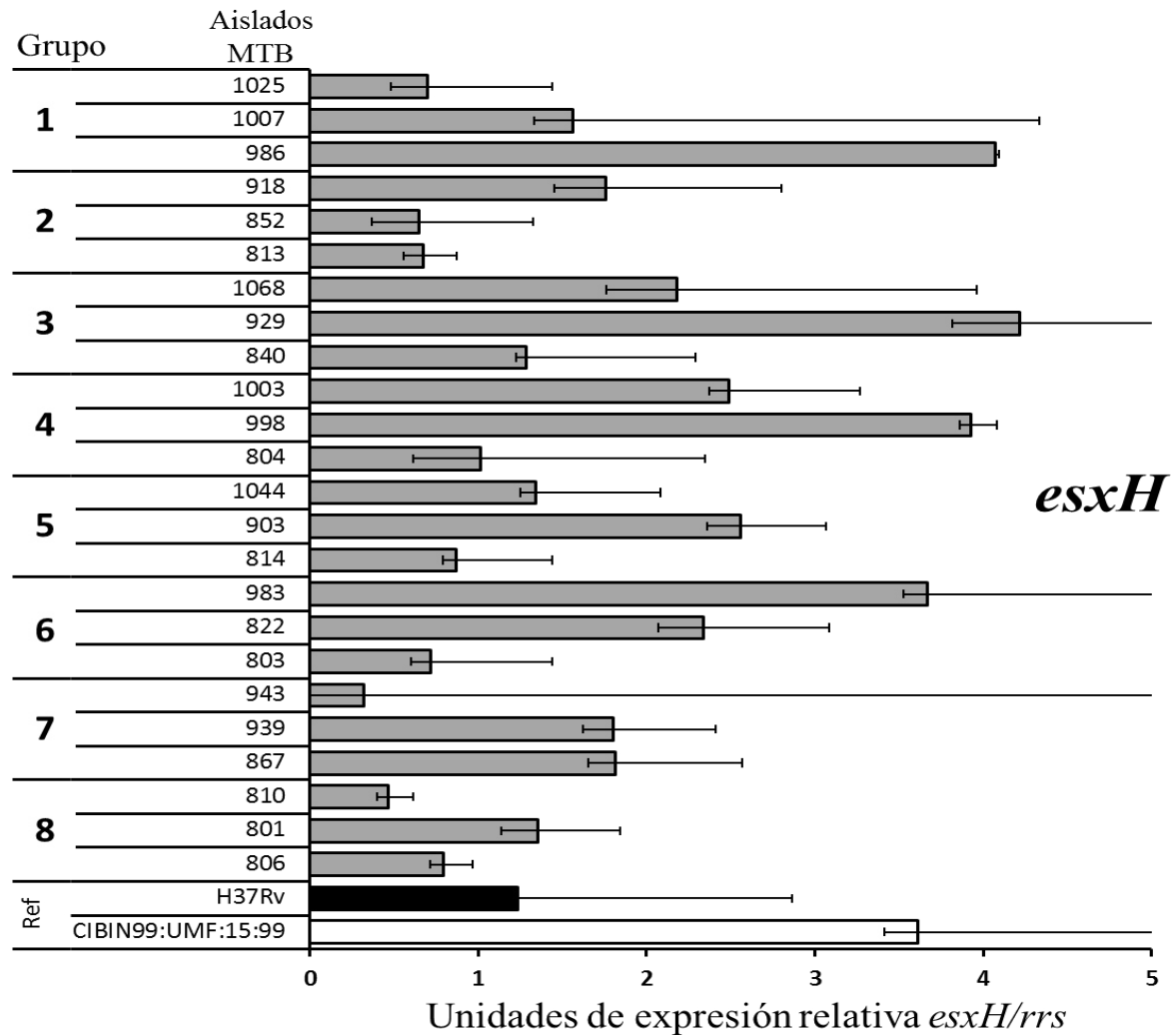


Figura 12. Expresión relativa del gen *esxH* en diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis*. El promedio de las réplicas de H37Rv fue establecido arbitrariamente como 1 y se comparó con la expresión de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

En la mayoría de los aislados clínicos, la expresión del gen *infA* estuvo por debajo de la expresión de la cepa H37Rv (Figura 13). Sin embargo, el aislado 929 (resistente a RIF e INH) tiene un incremento en su expresión de alrededor de 50% respecto a la cepa de referencia.

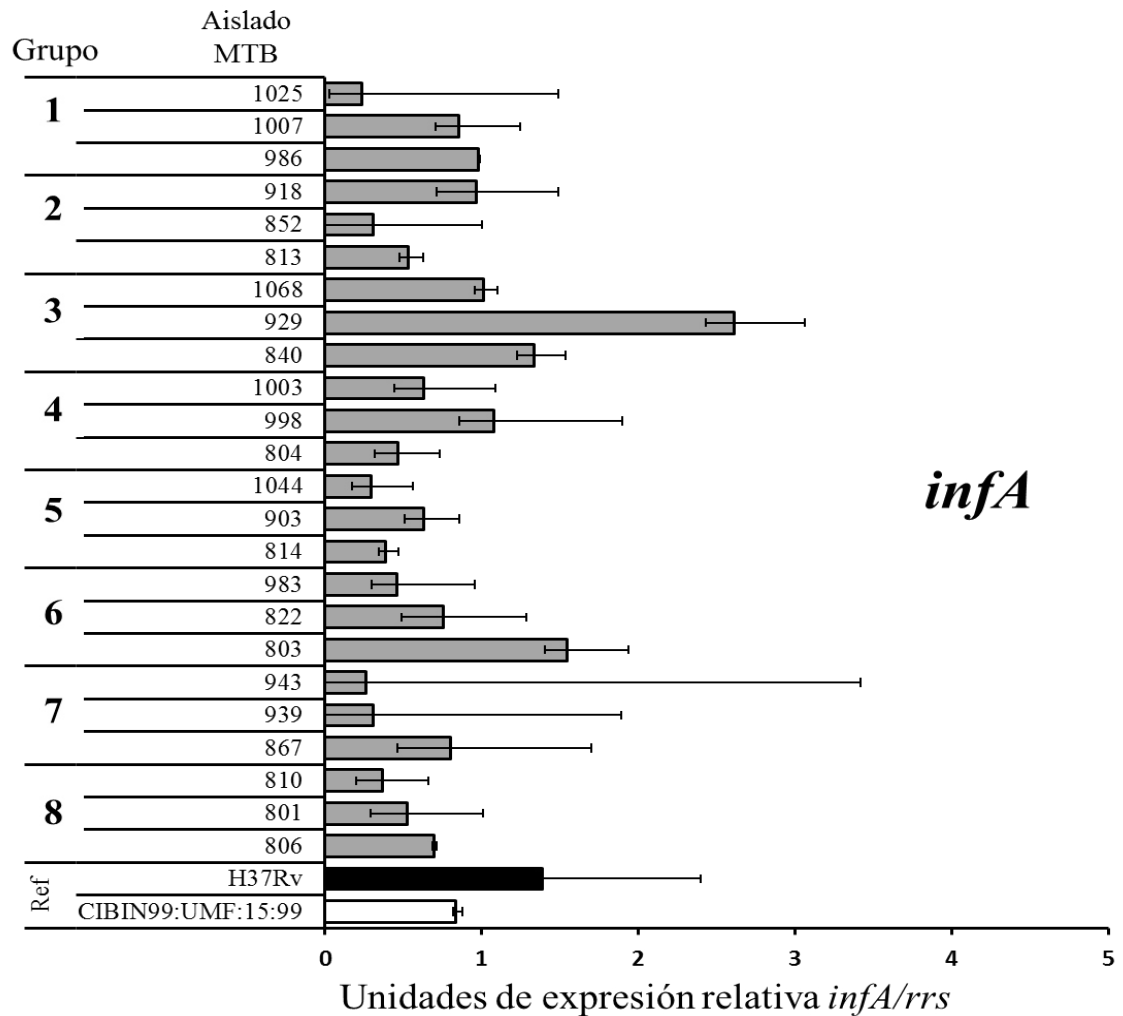


Figura 13. Expresión relativa del gen *infA* en diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis*. El promedio de las réplicas de H37Rv fue establecido arbitrariamente como 1 y se comparó con la expresión de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

La expresión del gen *lipF* se mostró notablemente disminuida en la mayoría de los aislados clínicos (18 de los 24), los aislados 929 (resistente a rifampicina e isoniazida) y 998 (resistente a rifampicina) presentaron una mayor expresión respecto a la referencia (Figura 14).

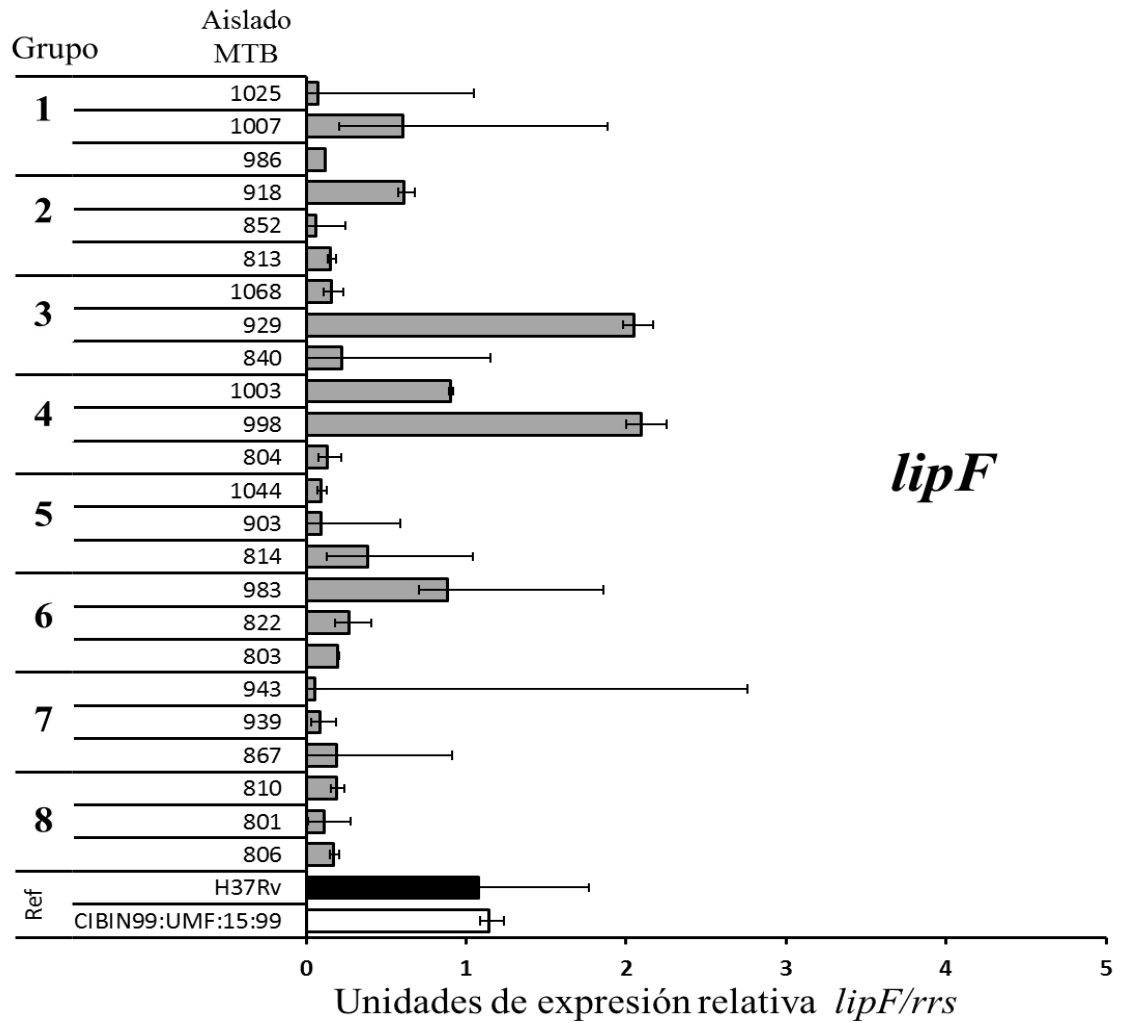


Figura 14. Expresión relativa del gen *lipF* en diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis*. El promedio de las réplicas de H37Rv fue establecido arbitrariamente como 1 y se comparó con la expresión de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

La expresión del gen *rpml* parece estar disminuido respecto a la referencia en la mayoría de los casos (Figura 15) En los aislados 1025, 852, 813, 943, 939 y 810 la expresión del gen *rpml* es menor al 50%.

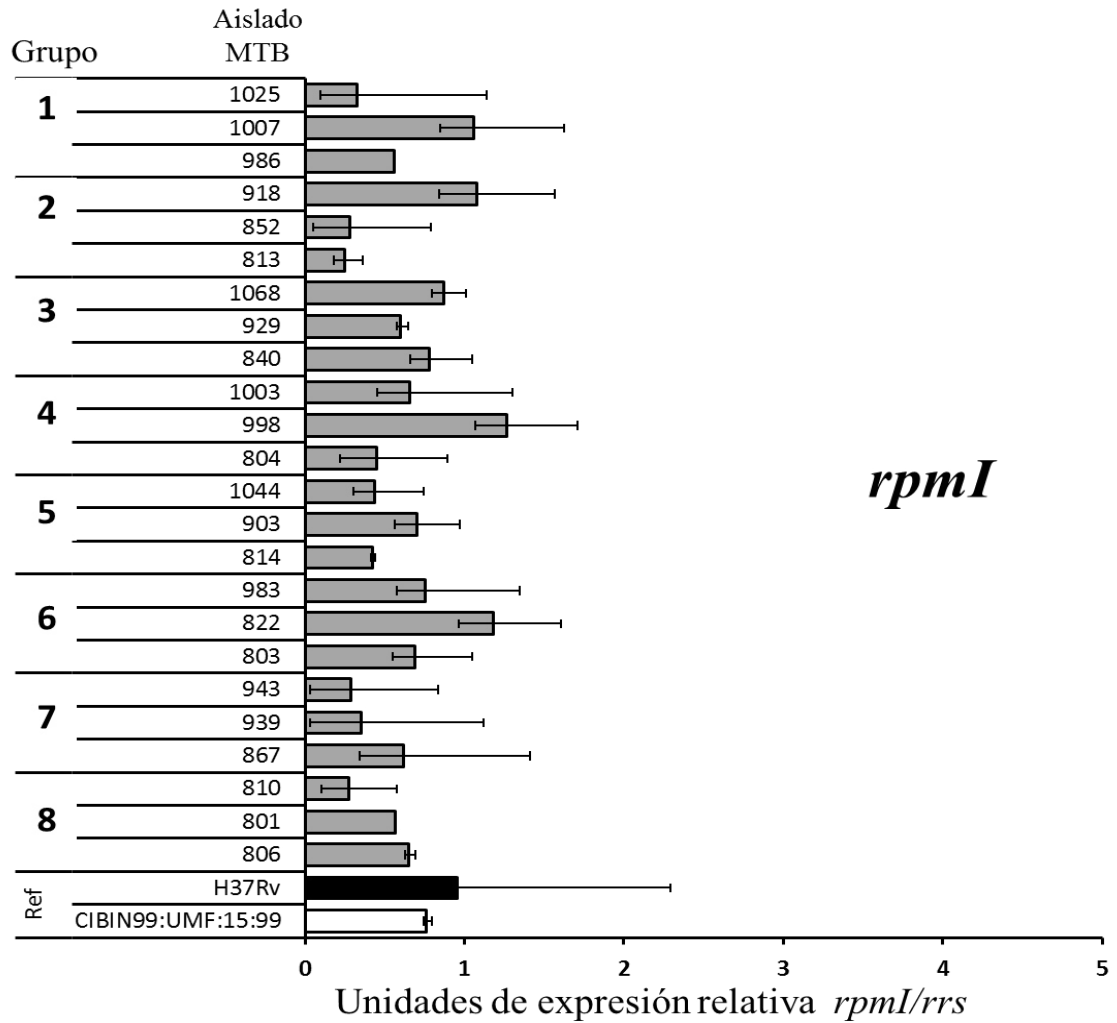


Figura15. Expresión relativa del gen *rpmI* en diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis*. El promedio de las réplicas de H37Rv fue establecido arbitrariamente como 1 y se comparó con la expresión de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

La expresión del gen *groES* es de las más variables entre aislados clínicos analizados (Figura 16). Se observó una mayor expresión en los aislados 929, 903, 983 y 939. Los aislados 1025, 1068, 1044, 943 y 810 tuvieron 50% menos de expresión con respecto a la referencia H37Rv.

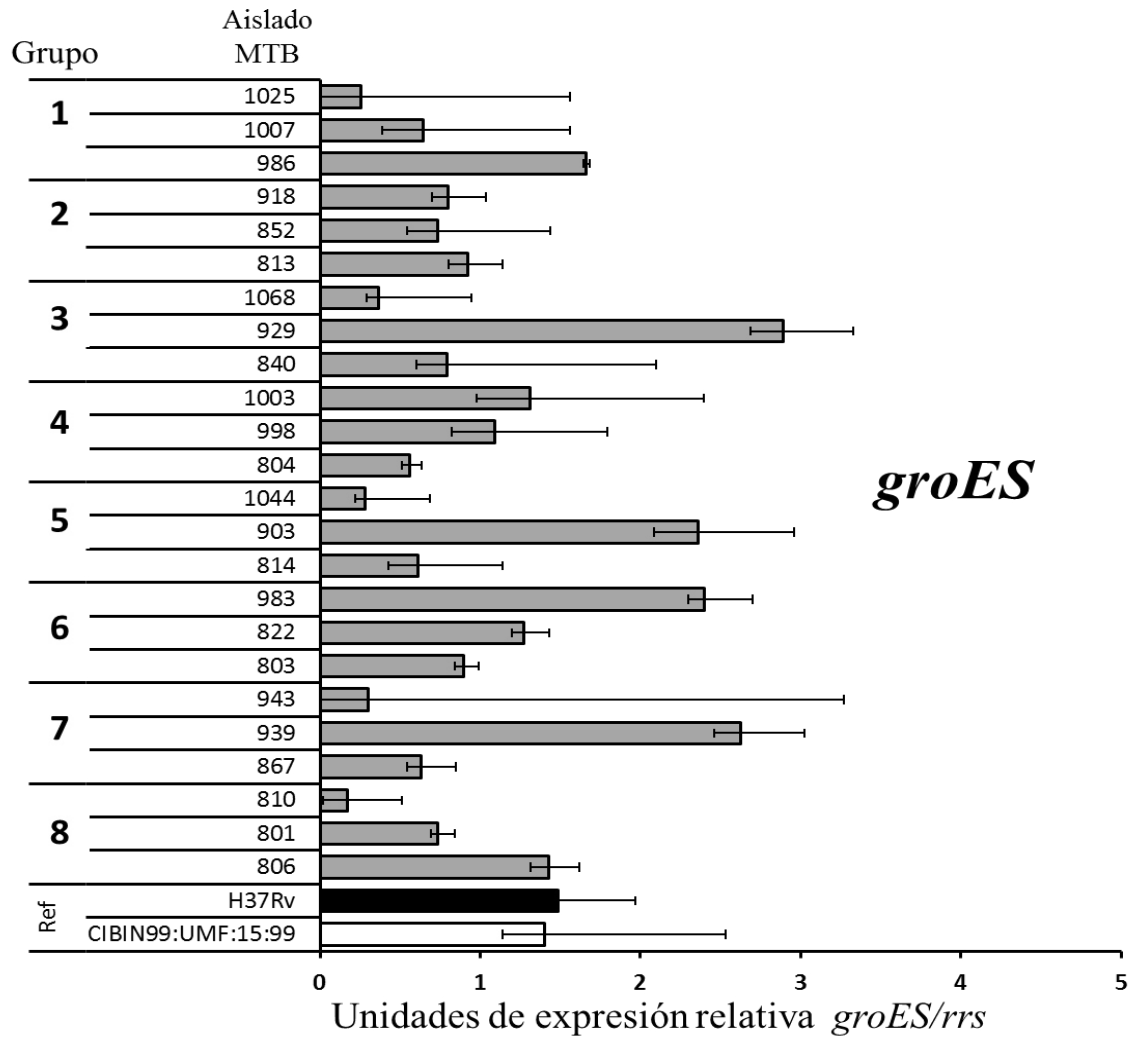


Figura 16. Expresión relativa del gen *groES* en diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis*. El promedio de las réplicas de H37Rv fue establecido arbitrariamente como 1 y se comparó con la expresión de los aislados clínicos de *M. tuberculosis* (MTB).

Para el caso del gen *rpsA*, en los aislados clínicos 1025, 1044, 943, 867 y 810 se observaron niveles similares de expresión por debajo del 50% con respecto a la cepa H37Rv (Figura 17).

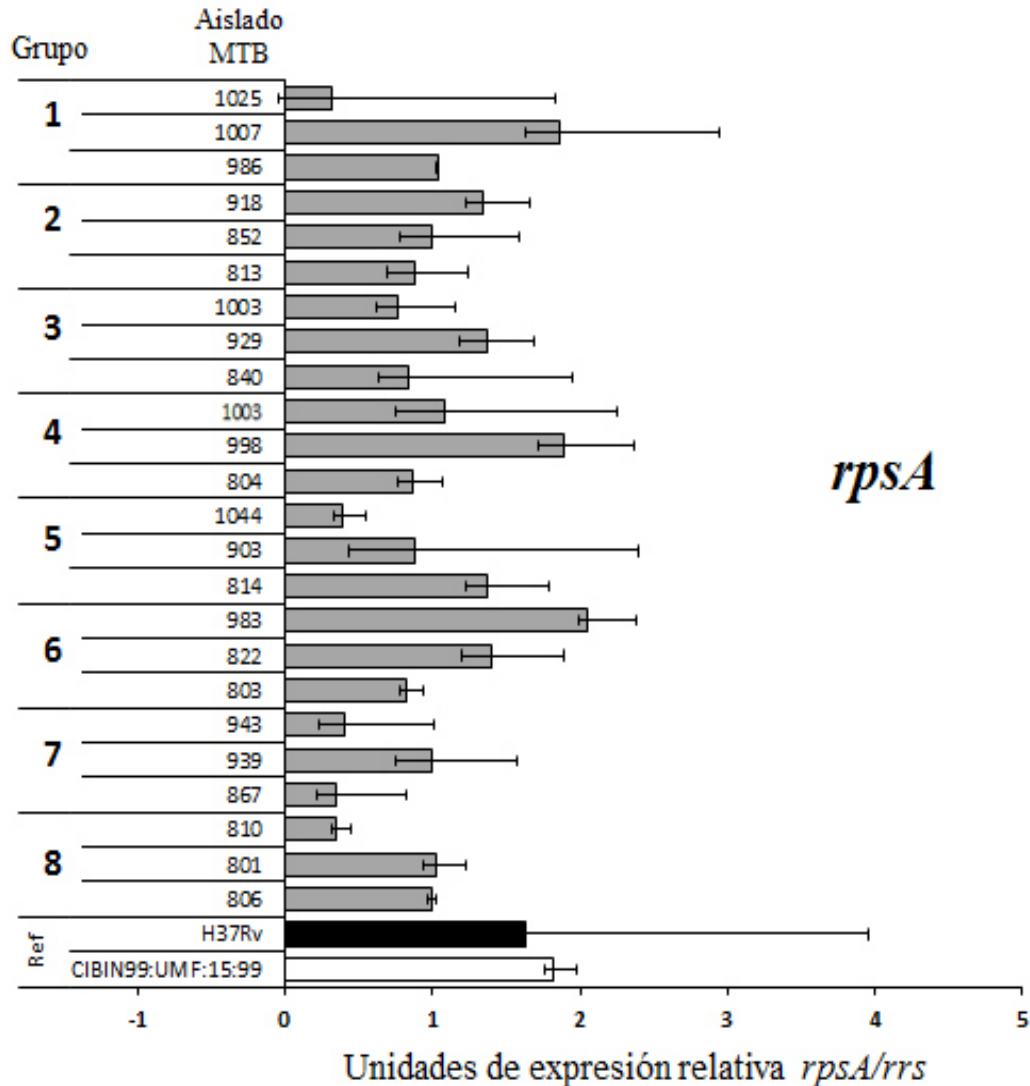


Figura 17. Expresión relativa del gen *rpsA* en diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis*. El promedio de las réplicas de H37Rv fue establecido arbitrariamente como 1 y se comparó con la expresión de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

Se observó que en la mayoría de los genes existe una expresión muy variable entre los aislados clínicos. Incluso, la variabilidad se observó también entre las réplicas biológicas, lo que no permitió observar diferencias significativas ($P > 0.05$). Tampoco se encontró una relación entre los niveles de expresión de los genes evaluados con respecto a la resistencia individual a los fármacos de primera línea.

7.4 Extracción de proteínas totales de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*

Los aislados clínicos se cultivaron hasta la fase logarítmica de crecimiento bajo las mismas condiciones para la extracción de RNA total y se obtuvieron lisados celulares para el análisis de proteínas. A pesar de obtener una baja concentración de proteínas debido a la biomasa que alcanza el cultivo de los aislados en las condiciones establecidas, se pudo observar la integridad de las diferentes fracciones, las cuales corresponden al patrón de proteínas reportado previamente para *M. tuberculosis* (Figura 18).

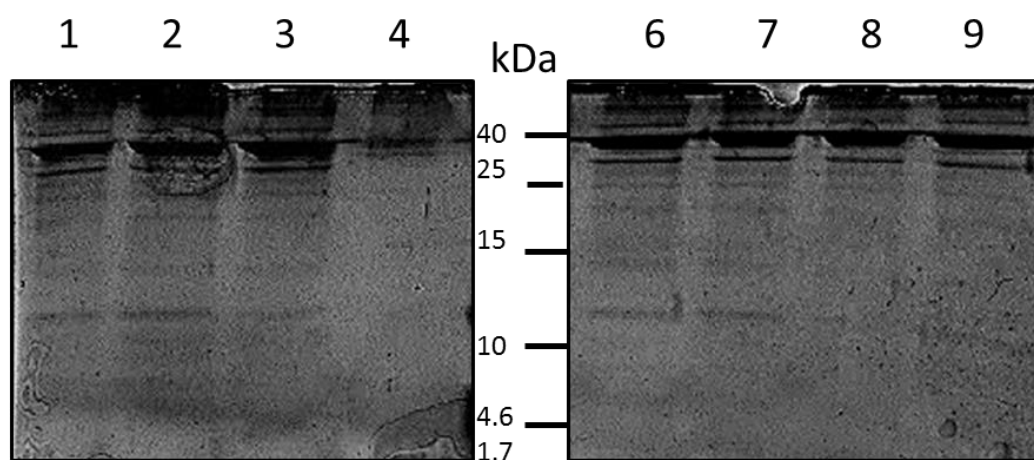


Figura 18. Imágenes representativas del perfil de proteínas totales de *M. tuberculosis* separadas por SDS-PAGE. Carril 1) H37Rv, 2) CIBIN:UMF:15:99, 3) aislado 801, 4) aislado 803, 6) aislado 806, 7) aislado 810, 8) aislado 813, 9) aislado 814. En medio de las imágenes se muestra el marcador de peso molecular. kDa, kilodaltones.

Con la finalidad de evaluar los niveles de expresión de las proteínas EsxG, EsxH y LipF, se sintetizaron anticuerpos específicos por la empresa *Genemed Synthesis, Inc.* A partir de un análisis de secuencia de las proteínas, se identificaron 4 regiones peptídicas con potencial antigénico para LipF y dos para cada una de las proteínas EsxG y EsxH.

Para validar los anticuerpos, se realizó un ensayo de tipo Western blot con diferentes concentraciones de los anticuerpos primarios específicos. Se encontró que ninguno de los anticuerpos primarios reconocieron proteínas de *M. tuberculosis* del tamaño esperado (Figura 19).

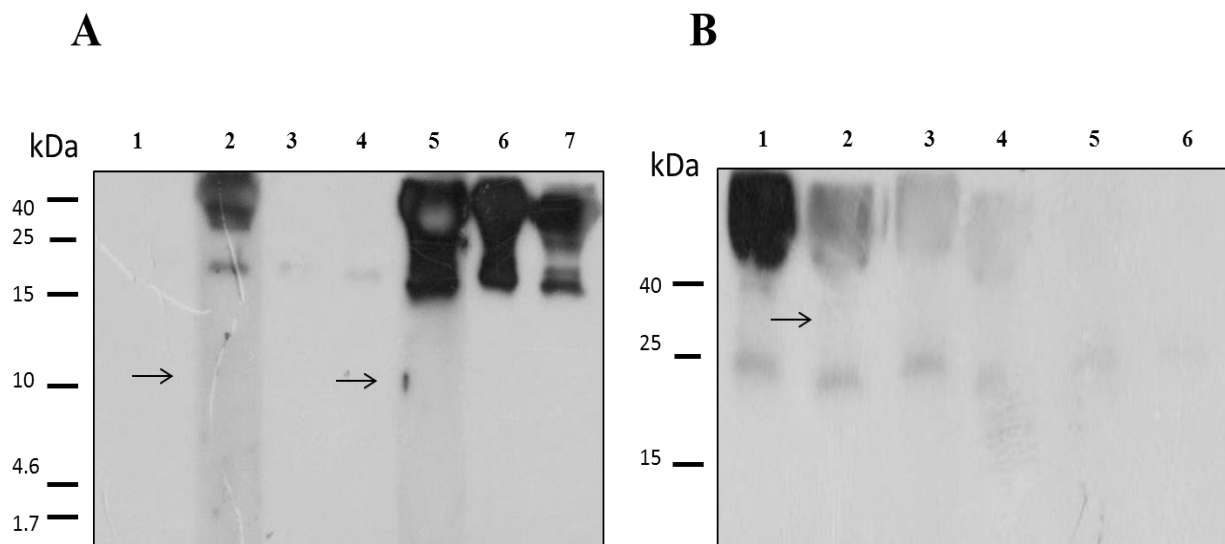


Figura 19. Imagen de Western blot usando anticuerpos específicos para EsxG y EsxH en extractos de proteínas totales de la cepa H37Rv. Panel **A**, 1) incubación con anticuerpo secundario, 2) anticuerpo anti-EsxG dilución 1:100, 3) anticuerpo anti-EsxG dilución 1:500, 4) anticuerpo anti-EsxG dilución 1:1,000, 5) anticuerpo anti-EsxH dilución 1:100, 6) anticuerpo anti-EsxG dilución 1:500, 7) anticuerpo anti-EsxG dilución 1:1,000. Panel **B** 1) anticuerpo anti-LipF dilución 1:100, 2) anticuerpo anti-LipF dilución 1:500, 3) anticuerpo anti-LipF dilución 1:1000, 4) anticuerpo anti-LipF dilución 1:2,000, 5) anticuerpo anti-LipF dilución 1:5,000, 6) incubación con anticuerpo secundario. Las flechas indican el tamaño esperado de inmunodetección. En medio de las imágenes se muestra el marcador de peso molecular. kDa, kilodaltones.

Considerando que la concentración de proteínas obtenidas de los aislados clínicos *de M. tuberculosis* es relativamente baja para permitir la caracterización de anticuerpos específicos, se procedió a la producción de proteínas recombinantes en un sistema de expresión heterólogo con la finalidad de poder caracterizar los anticuerpos policlonales.

7.5 Expresión de los genes *esxG*, *esxH* y *lipF* en *E. coli*

7.5.1 Subclonación en vector PET101/D-TOPO pET101

Los genes *esxG*, *esxH* y *lipF* se subclonaron en un vector unidireccional pET101/D-TOPO (Figura 20) con la participación de la L.B.G. Joyce Rigal. Sin embargo no se logró la expresión de las proteínas recombinantes debido a un problema de manufactura del vector. Una vez reabastecido el kit, el gen *lipF* se subclonó en el nuevo lote del plásmido pET101/D-TOPO.

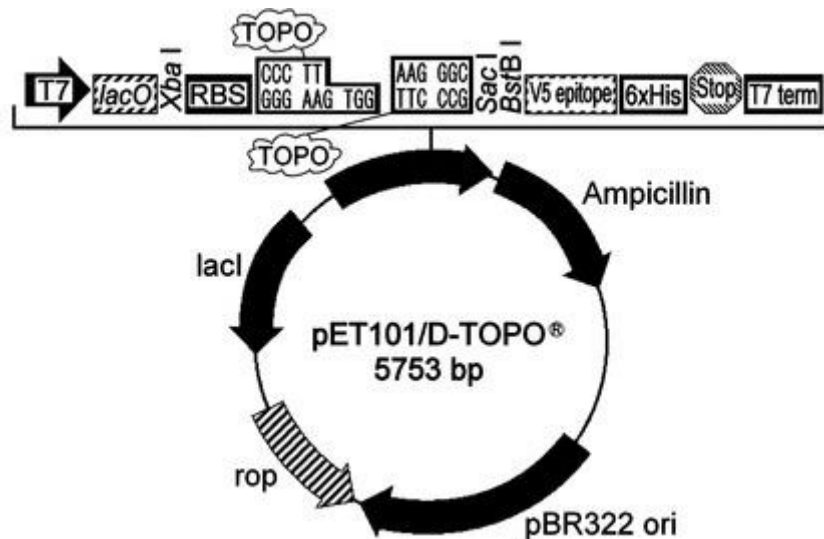


Figura 20. Diagrama de vector de expresión pET101/D-TOPO. En la parte superior se señalan los elementos del vector: promotor T7; elemento *lacO* de inducción por IPTG; RBS, sitio de unión a ribosomas; epítipo V5, 6xHis, seis residuos de histidinas; STOP, terminador de la transcripción T7; sitios de corte para las enzimas *XbaI*, *SacI* y *BstBI*. STOP, codón de paro. En la parte inferior, gen de resistencia a ampicilina (Ampicillin); el gen inhibidor de lactosa (*lacI*); el origen de replicación pBR322.

Una vez subclonado al gen *lipF*, los candidatos obtenidos se caracterizaron por PCR punto final para amplificar al gen *lipF*. Para todos los candidatos, se observó la amplificación del fragmento del tamaño correspondiente a 829 pares de bases (Figura 21).

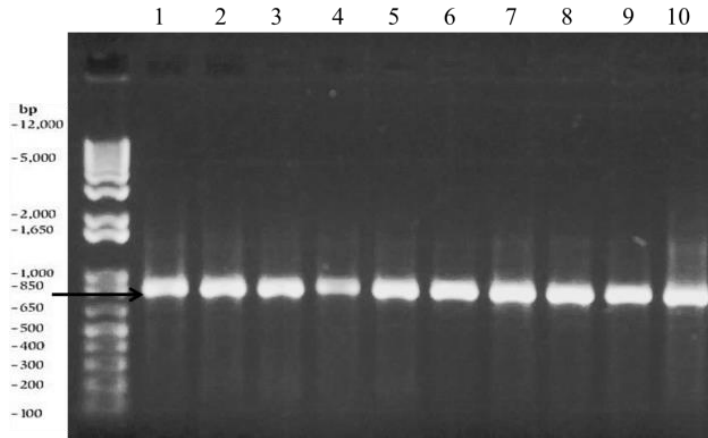


Figura 21. Caracterización por PCR punto final para gen *lipF* de *M. tuberculosis* a partir de DNA plasmídico extraído de los candidatos transformados de *E. coli* DH5 α . Carriles 1 al 9 corresponden a cada uno de los candidatos caracterizados, el carril 10 corresponde al control positivo de amplificación. La flecha señala el producto de amplificación esperado.

Las construcciones con caracterización positiva por PCR para *lipF* se secuenciaron y se no se observaron alteraciones. La secuencia se encontró orientada en la dirección esperada del vector unidireccional. Posteriormente, se transformó en bacterias *E. coli* cepa BL21 y se permitió la expresión del gen recombinante con inducción por IPTG. Simultáneamente, se indujo la expresión del gen *lacZ* contenido en el plásmido pET/*lacZ*, como control de inducción. Los resultados revelaron que la proteína LacZ se encuentra claramente inducida (Figura 21, carril 2) mientras que en ninguno de los candidatos se observó la inducción en la expresión de una proteína del tamaño correspondiente a LipF (29 kDa) (Figura 22).

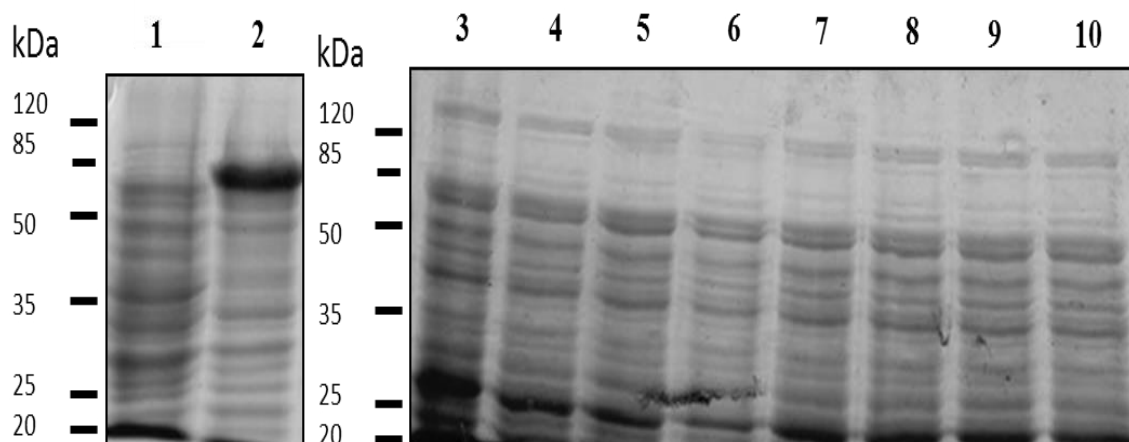


Figura 22. SDS-PAGE extractos proteicos *E. coli* BL21 DE3 Star transformadas con plásmidos conteniendo al gen *lipF*. Carril 1, pET/101/D/LacZ; 2) pET/101/D/LacZ +IPTG; 3) pET/101/D/*lipF* candidato_1; 4) pET/101/D/*lipF* candidato_1 + IPTG; 5) pET/101/D/*lipF* candidato_2; 6) pET/101/D/*lipF* candidato_2 + IPTG; 7) pET/101/D/*lipF* candidato_3; 8) pET/101/D/*lipF* candidato_3 + IPTG; 9) pET/101/D/*lipF* candidato_4; 10) pET/101/D/*lipF* candidato_4+ IPTG. En medio de las imágenes se muestra el marcador de peso molecular. kDa, kilodaltones.

7.5.2 Subclonación de genes *esxG*, *esxH* y *lipF* en plásmido pTriEx™-3 3.0

Con la intención de evaluar la expresión de las proteínas recombinantes en un vector distinto a pET101/D-TOPO, se utilizó al plásmido pTriEX. Una vez que se corroboraron las características del vector (Figura 23), se linearizó con la enzima *Bam*HI y se desfosforiló para permitir la ligación de las secuencias codificantes de *M. tuberculosis*.

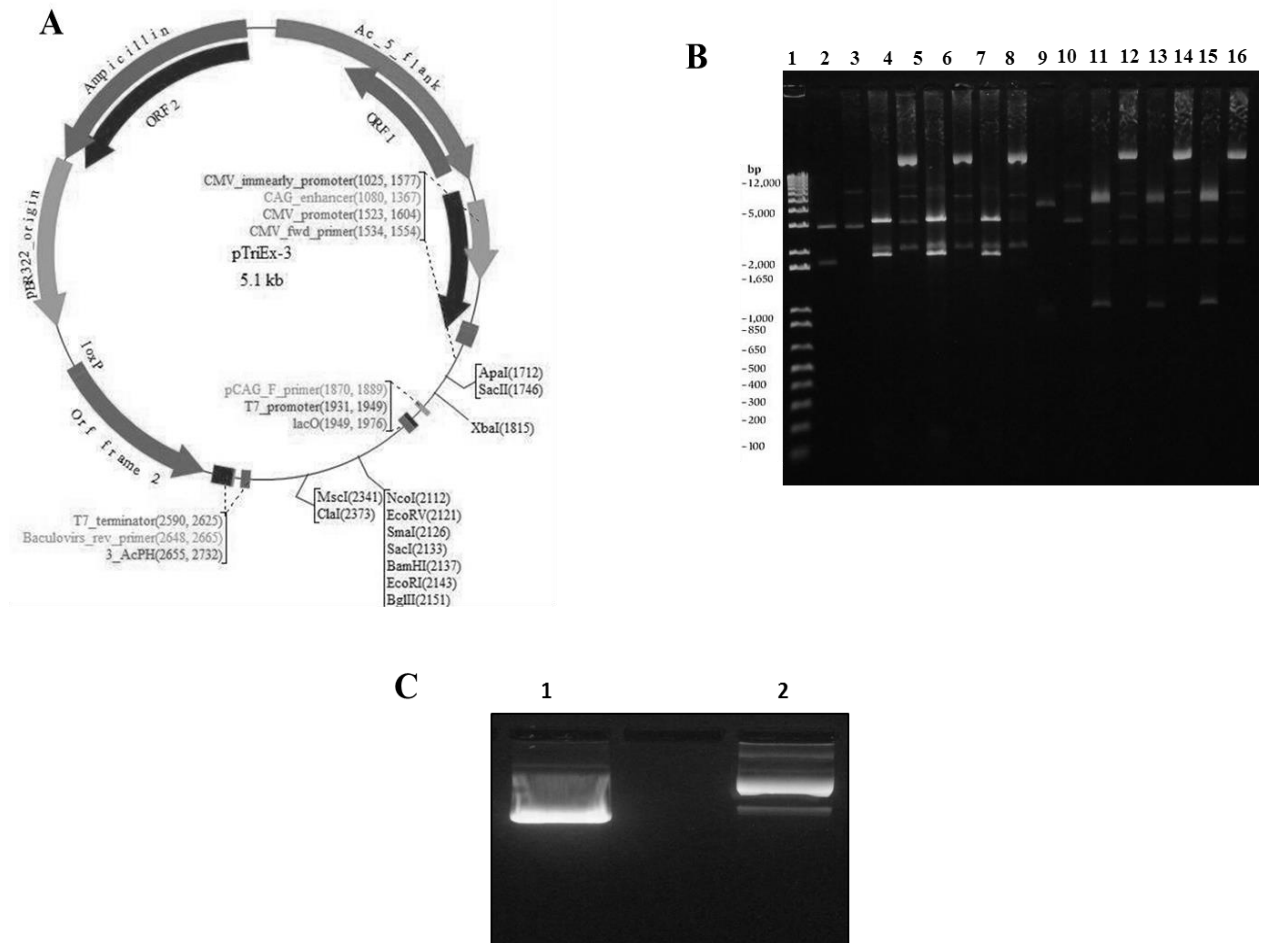


Figura 23. Caracterización de plásmido pTriEx-3.Panel A, diagrama de estructura del plásmido de pTriEx-3.Panel B, caracterización del plásmido por restricción enzimática. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2, 4, 6 y 8 plásmido digerido con la enzima *BglI* (bandas esperadas 1,700 y 3,000 pdb); carriles 3, 5, 7 y 9 plásmido no digerido; carriles 10, 12, 14 y 16 plásmido digerido con la enzima *HaeII* (bandas esperadas 800 y 4,000 pdb); carriles 11, 13 y 15 plásmido no digerido. Panel C, carril 1 plásmido linearizado con *BamHI*, carril 2 plásmido no digerido.

Los genes *esxG*, *esxH* y *lipF* se subclonaron de manera independiente en el vector pTriEX. Las construcciones pTriEX/*esxG* (Figura 24) y pTriEX/*esxH* (Figura 25) se caracterizaron por PCR punto final mientras que la construcción pTriEX/*lipF* (Figura 26) se caracterizó por digestión enzimática con la enzima *BamHI*.

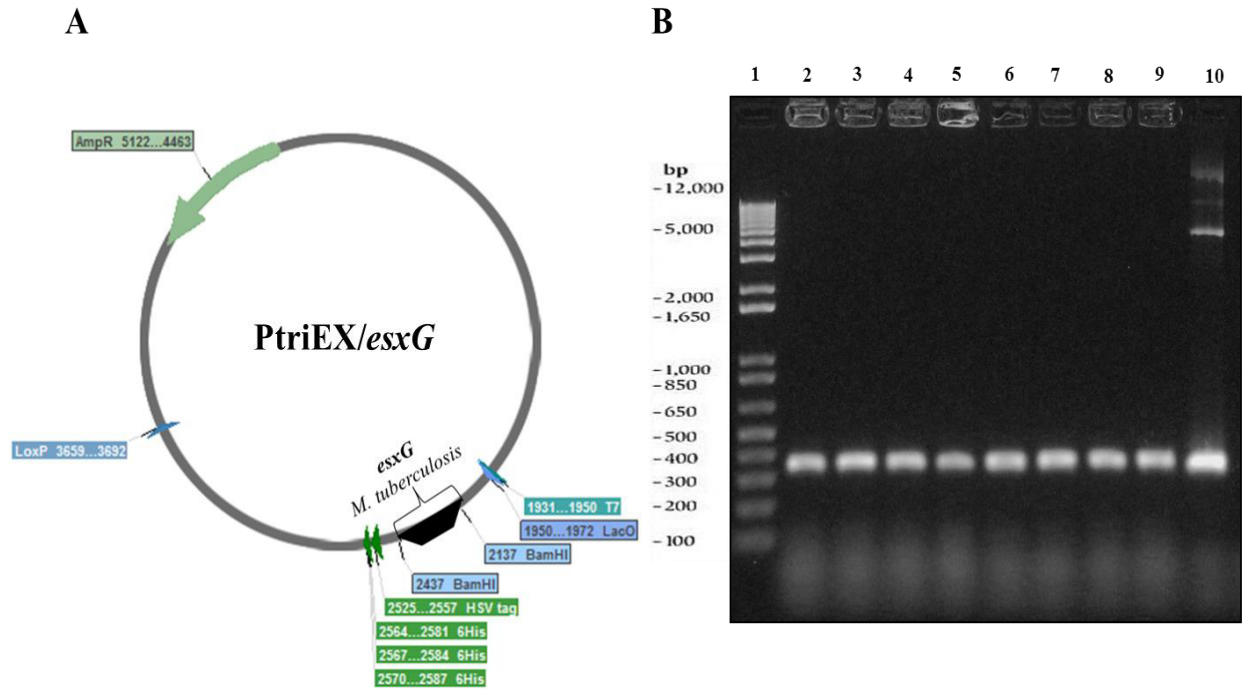


Figura 24. Caracterización de la construcción pTriEX/*esxG*. Panel A, diagrama de plásmido pTriEX con inserto del gen *esxG* (310 pdb) de *M. tuberculosis*. Panel B, carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2 a 9, caracterización de candidatos por PCR punto final para *esxG*; carril 10, control positivo de amplificación.

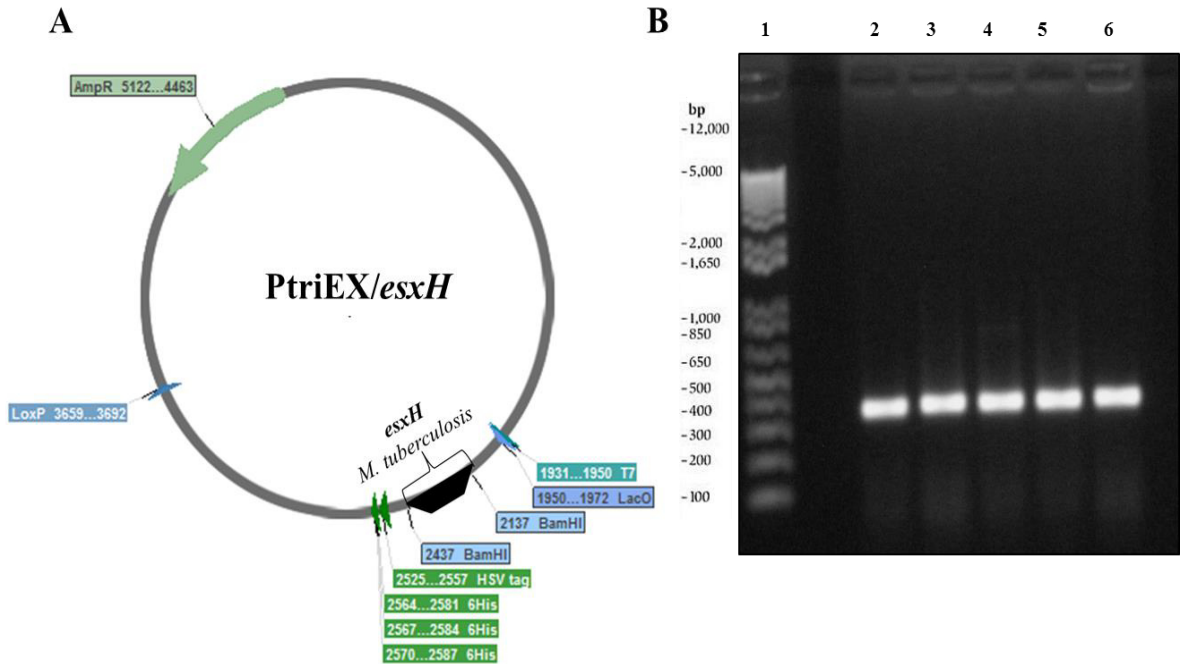


Figura 25. Caracterización de la construcción pTriEX/*esxH*. Panel A, diagrama de plásmido pTriEX con inserto del gen *esxH* de *M. tuberculosis*. Panel B, carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2 a 6, caracterización de candidatos por PCR punto final para *esxH*.

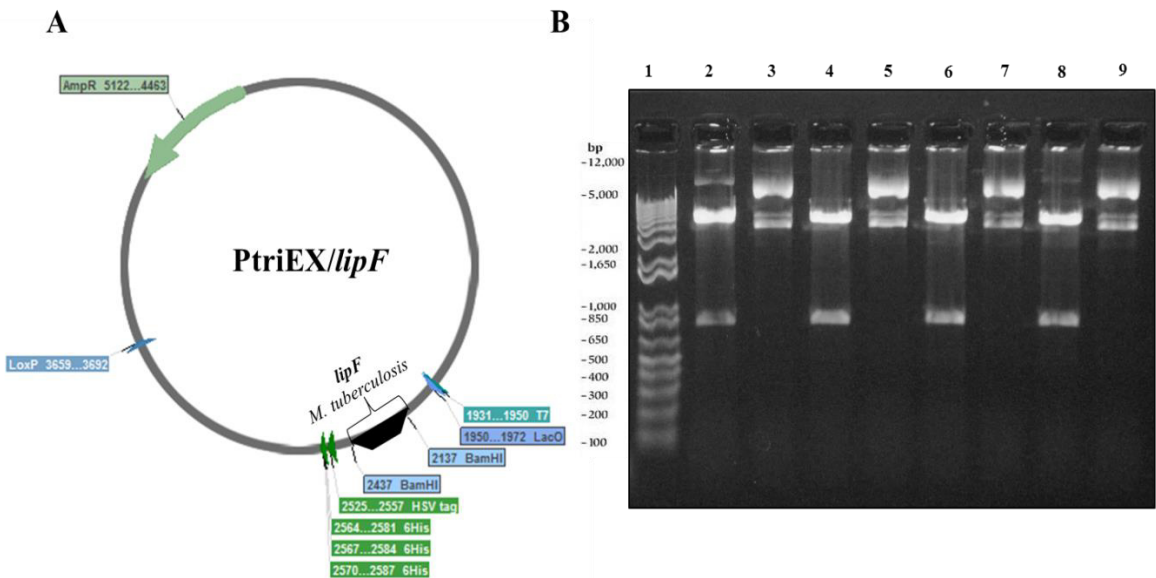


Figura 26. Caracterización de la construcción pTriEX/*lipF*. Panel A, diagrama de plásmido pTriEX con inserto del gen *lipF* de *M. tuberculosis*. Panel B, carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2, 4, 6 y 8 candidatos caracterizados por restricción enzimática con la enzima *Bam*H1 (banda esperada 829 pdb); carriles 3, 5, 7 y 9 controles sin digerir.

Para determinar la orientación de los fragmentos subclonados y confirmar la fidelidad de la secuencia, las construcciones fueron secuenciadas con los iniciadores para los genes *esxG*, *esxH* y *lipF*, respectivamente

Con la finalidad de contar con los genes *esxG*, *esxH* y *lipF* en un vector que pudiera expresarse en *M. tuberculosis*, se realizaron construcciones de dichos genes en el plásmido pMV261, el cual permite la expresión tanto en el sistema de *E. coli* y micobacterias. Las construcciones obtenidas fueron caracterizadas (Figura 27) y secuenciadas (Figura 28).

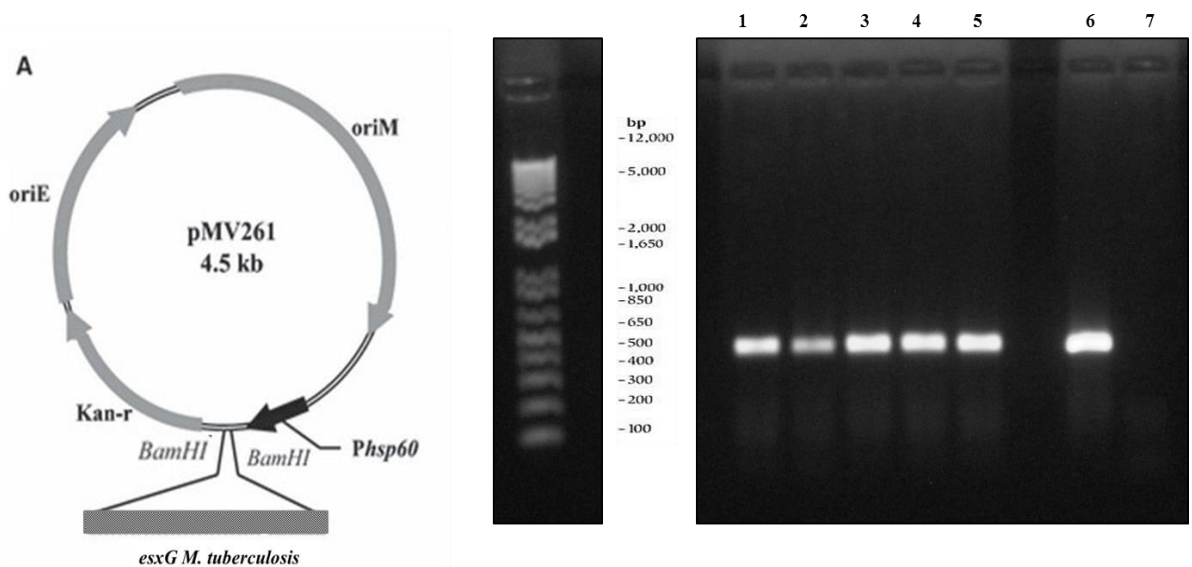


Figura 27. Caracterización de la construcción pMV261/*esxG*. Panel A, diagrama de plásmido pMV261 con inserto del gen *esxG* de *M. tuberculosis*. Panel B, carriles 1 al 5, caracterización de los candidatos transformados por PCR punto final para *esxG*; carril 6, control positivo de amplificación; carril 7, control negativo de amplificación.

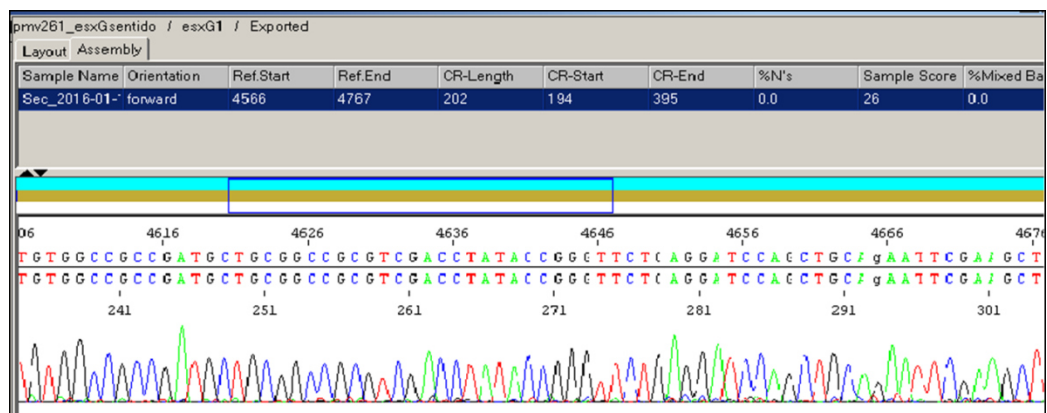


Figura 28. Imagen representativa de un electroferograma resultado de la secuenciación capilar de la construcción pMV261/*esxG*.

7.6 Expresión génica de los genes subclonados en *E. coli*

Las construcciones con los genes *esxG*, *esxH* y *lipF* fueron transformadas en la cepa de *E. coli* BL21 DE3 Star para permitir la expresión de las proteínas de interés. Los pesos calculados para las proteínas fueron de ~10kDa para *esxG* y *esxH* y de ~29kDa para *lipF*.

Para la recuperación de proteínas totales en *E. coli* se probaron dos métodos de extracción. El primero consistió en realizar choque térmico de -60 a 37 °C, y el segundo mediante el uso del equipo FastPrep con perlas de sílice. El padrón definido y sin degradación de proteínas en el gel de poliacrilamida permitió elegir el uso del choque térmico para la obtención de proteínas (Figura 29).

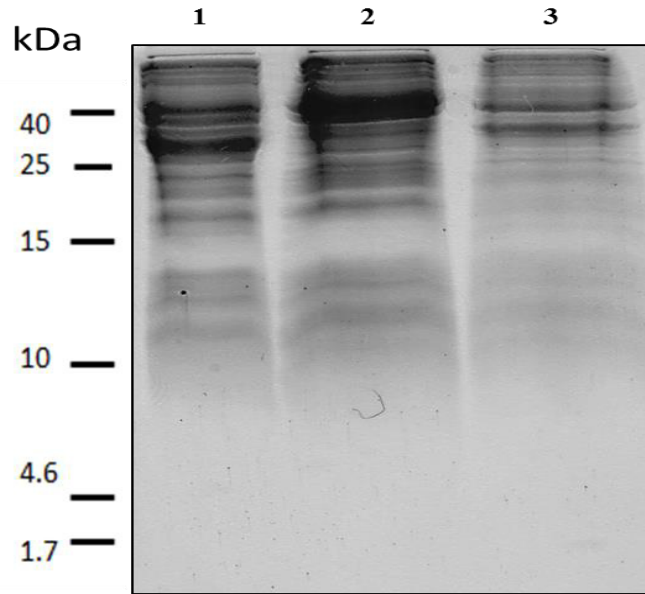


Figura 29. Imagen del patrón de proteínas totales de *E. coli* separadas por SDS-PAGE. Carril 1, proteínas extraídas por choque térmico; carril 2, proteínas extraídas con el sistema FastPrep; carril 3, proteínas extraídas con sistema FastPrep y filtrado con la membrana de baja retención de proteínas. Al lado izquierdo de la imagen se muestra el indicador de peso molecular. kDa, kilodaltones.

Para las cepas *E. coli* BL21 transformadas con las construcciones pTriEX/*esxG* y pTriEX/*esxH* tratadas con IPTG, no se observó la inducción de bandas alrededor de los 10 kDa (Figuras 30 y 31). El mismo resultado se observó con las construcciones con el vector pET-TOPO/*esxG* y pET-TOPO/*esxH*, realizadas por la L.B.G Joyce Rigal. La transformación con el vector pMV261 tampoco mostró la presencia de proteína recombinantes (Figura 32), lo que sugiere que el problema de la falta de expresión de las proteínas se debe al inserto más que al vector de expresión.

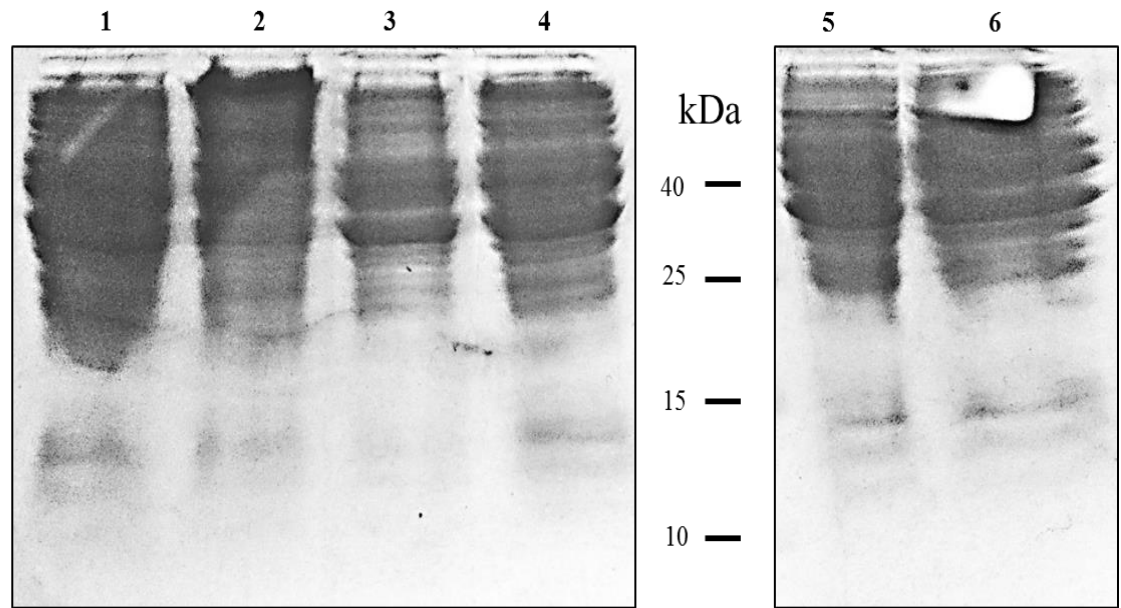
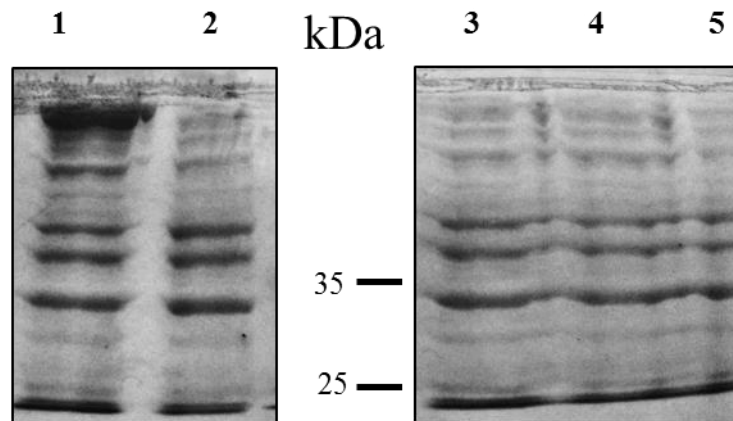
A**B**

Figura 30. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Panel A, se utilizaron altas concentraciones de extractos proteicos de *E. coli* BL21 DE3 Star transformadas, carril 1, pET/101/D/LacZ; carril 2, pET/101/D/LacZ + IPTG; carril 3, pTriEX vacio; carril 4, pTriEX vacio + IPTG; carril 5, pTriEX/esxG; carril 6, pTriEX/esxG + IPTG. Panel B, extractos proteicos a baja concentración (10% de la concentración del panel A), carril 1, pET/101/D/LacZ + IPTG; carril 2, pET/101/D/LacZ; carril 3, pTriEX vacio + IPTG; carril 4, pTriEX/esxG + IPTG; carril 5, pTriEX/esxG. kDa, kilodaltones.

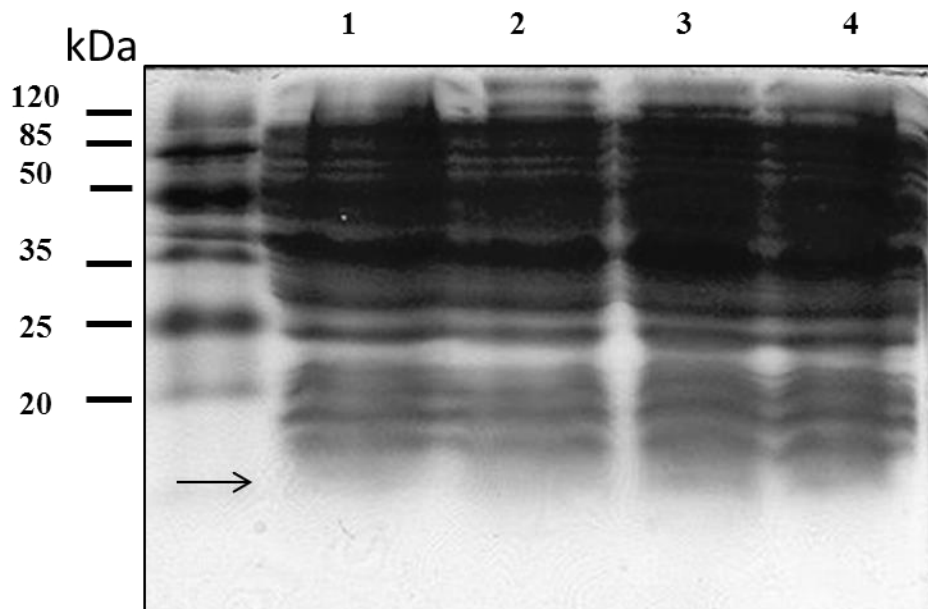


Figura 31. Análisis de la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 DE3 Star transformadas. Se utilizaron altas concentraciones del extracto de proteínas totales. Carril 1, pTriEX/*esxH* + IPTG; carril 2, pTriEX/*esxH*; carril 3, pTriEX/*esxG* +IPTG; carril 4, pTriEX/*esxG*. La flecha señala el tamaño esperado de la proteína recombinante. kDa, kilodaltones.

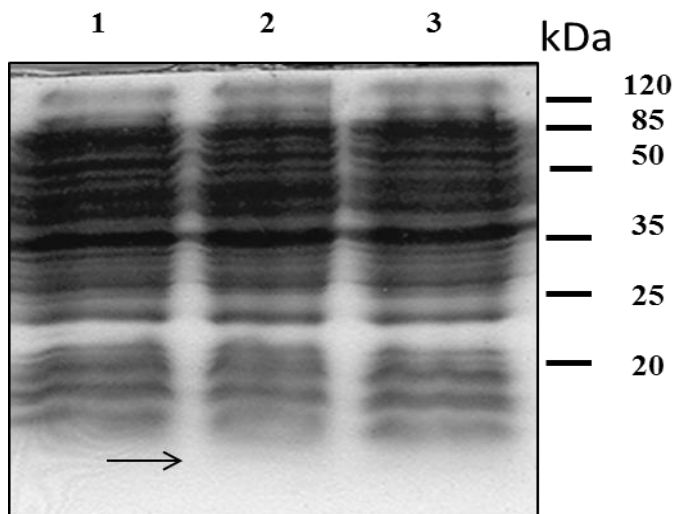


Figura 32. Análisis de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* BL21 DE3 Star transformadas con el vector pMV261/*esxG* y pMV261/*esxH*. Se usaron altas concentraciones de proteínas. Carril 1, pMV261/*esxH*; carril 2, pMV261/*esxG* candidato_1; carril 3, pMV261/*esxG*_candidato 2.kDa, kilodaltones.

De la misma manera que los ensayos para las proteínas EsxG y EsxH, para obtener la expresión de la proteína LipF recombinante, se transformaron las cepas *E. coli* BL21 con

construcciones pTriEX/*lipF* y con dos construcciones adicionales en el vector pMV261 realizadas por la Q.F.B. Ana Leticia Arriaga y el Q.F.B. Moisés Nietro. Se realizó la extracción de proteínas totales y se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 10% (Figuras 33 y 34).

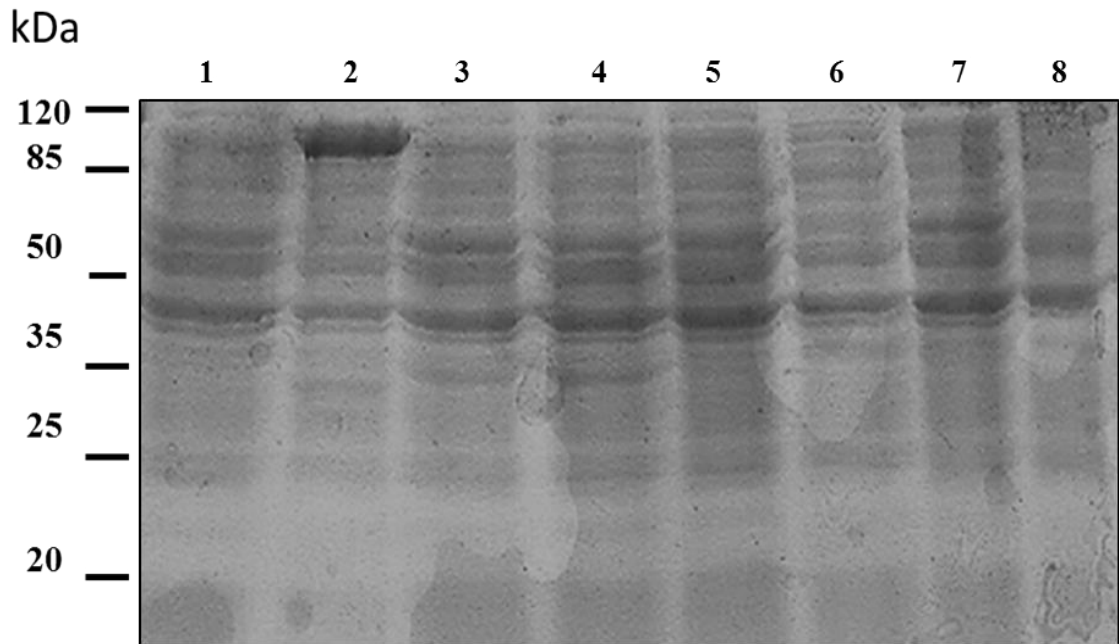


Figura 33. Análisis de la expresión de proteínas recombinantes a partir de extractos proteicos de *E. coli* BL21 DE3 Star transformadas con el vector pMV261/*lipF*. Carril 1, pET/101/D/LacZ; carril 2, pET/101/D/LacZ +IPTG; carril 3, pMV261/*lipF* candidato 1 (construcción Q.F.B. Ana Arriaga); carril 4, pMV261/*lipF* candidato 2 construcción Q.F.B. Ana Arriaga; carril 5, pTriEX/*lipF* candidato 1; carril 6, pTriEX/*lipF* candidato 1 + IPTG; carril 7, pTriEX/*lipF* candidato 2; carril 8, pTriEX/*lipF* candidato 2 +IPTG. kDa, kilodaltones.

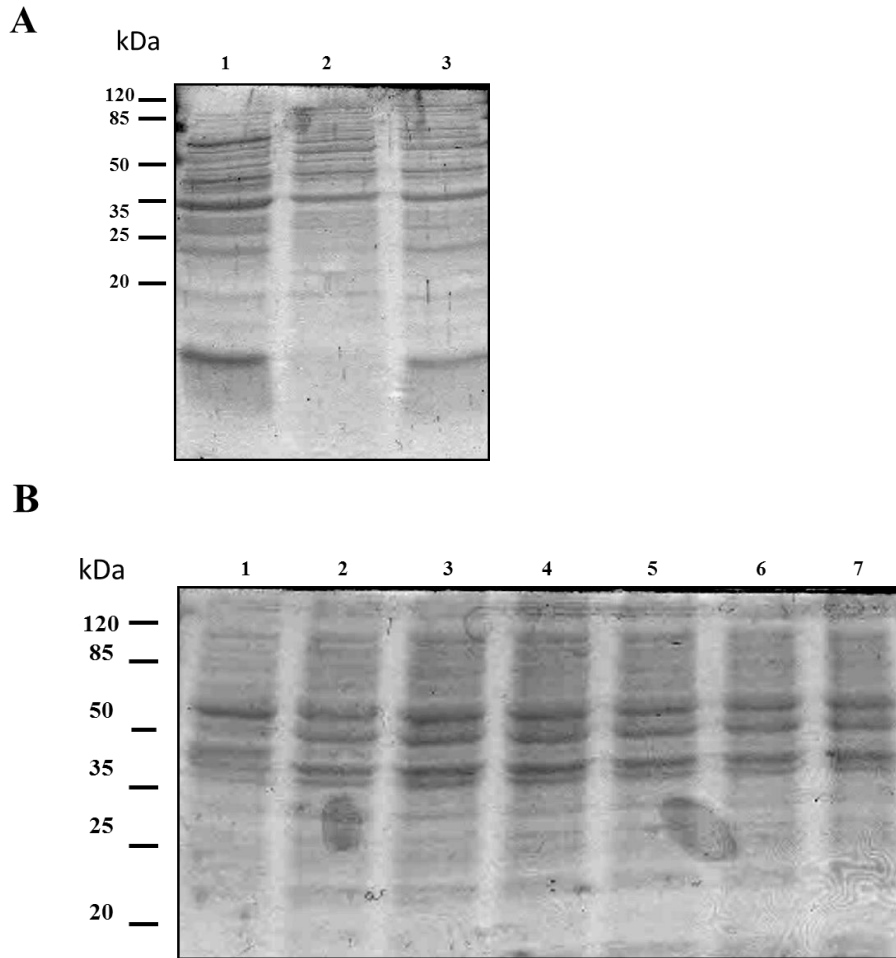


Figura 34. Análisis de la expresión de proteínas recombinantes a partir de extractos proteicos de *E. coli* BL21 DE3 Star transformadas con el vector pMV261/*lipF*. Panel A, carril 1, pMV261 ; carril 2, *E. coli* DH5α sin transformar; carril 3, pMV261/*lipF* construcción Q.F.B. Moisés Nietro. Panel B , carril 1, *E. coli* DH5α sin transformar; carriles 2, 3 y 4, repeticiones de candidato 2 pMV261/*lipF*; carriles 5, 6 y 7 repeticiones de candidato 6 pMV261/*lipF*. kDa, kilodaltones.

No se observó la inducción o expresión de alguna proteína equivalente a 29 kDa que pudiera corresponder a la proteína recombinante *LipF* en ninguna de las construcciones utilizadas

7.6.1 Evaluación de la expresión de mRNA en las bacterias transformadas

Con el objetivo de evaluar la expresión del gen recombinante, la cepa de *E. coli* BL21, después de la inducción de la expresión, fue utilizada para extraer el RNA total (Figura 35).

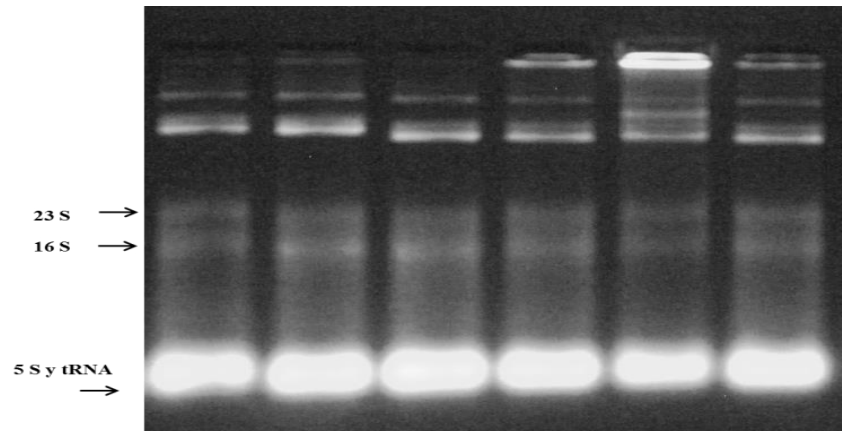


Figura 35. Imagen representativa de las subunidades ribosomales de RNA de *E. coli* BL21 transformada con vectores de expresión. Las flechas muestran la integridad de las subunidades 23S, 16S y 5S, además del RNA de transferencia (tRNA). Los 6 carriles representan diferentes candidatos.

Para evaluar si las bandas superiores observadas en el gel de agarosa al 1% correspondían al RNA total o al DNA genómico de las bacterias transformadas, se realizó un tratamiento con DNAsas y RNAsas. Como se muestra en la Figura 35, el DNA residual fue eliminado y la muestra visualizada correspondió a las subunidades ribosomal de RNA.

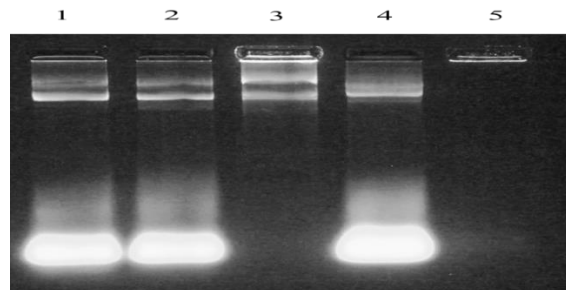


Figura 36. Imagen de gel de agarosa al 1% con muestras de RNA total tratadas con DNAsas y RNAsas. Carril 1, RNA sin tratamiento; carril 2, RNA expuesto durante 10 minutos a 37 °C y 5 minutos a 95 °C; carril 3, RNA tratado con DNasa I incubado 10 minutos a 37 °C e inactivada 5 minutos a 95°C; carril 4, RNA expuesto por 20 minutos a 37 °C y después por 15 minutos a 70 °C; carril 5, RNA tratado con RNasa e incubado por 20 minutos a 37 °C e inactivada por 15 minutos a 70°C.

A partir del RNA total tratado con DNasas se sintetizó cDNA, y se verificó la expresión del transcrito de *esxG*. Los niveles de expresión de *esxG* se evaluaron por PCR en tiempo real utilizando la sonda TaqMan específica para dicho gen. Se observó que la cantidad de transcrito en las cepas transformadas con el gen recombinante era muy elevada, independientemente de la inducción con IPTG. En el caso de las bacterias transformadas con el plásmido sin el gen *esxG* no se detectó ninguna señal (Figura 36).

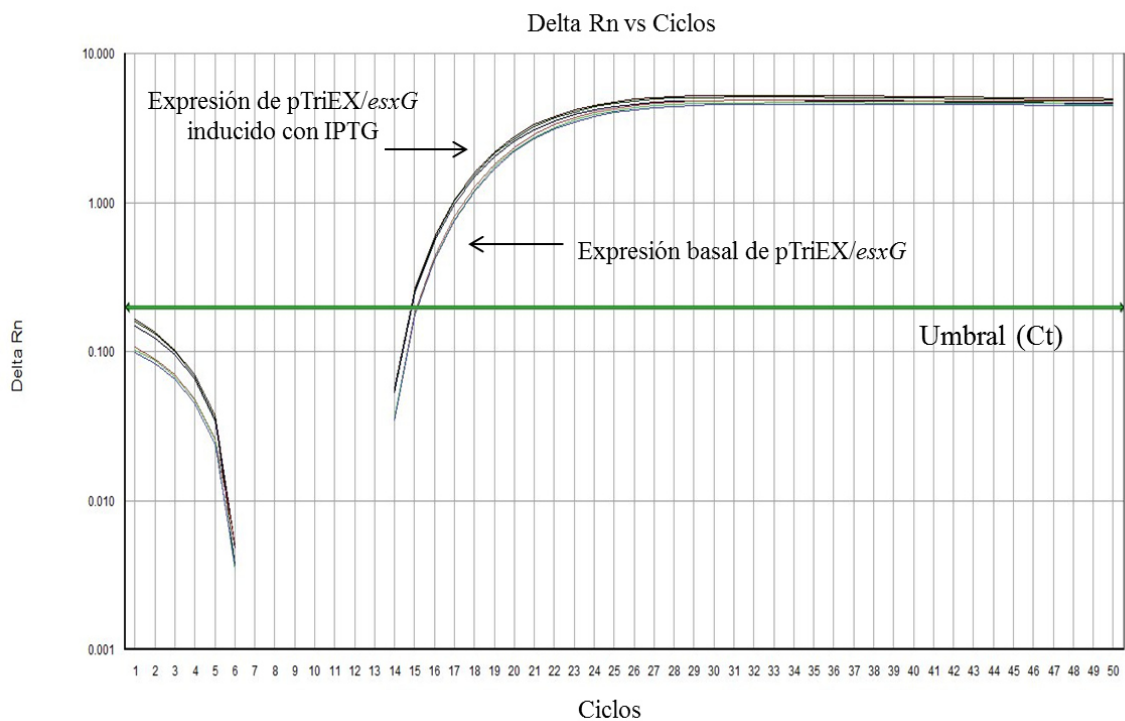


Figura 37. Imagen representativa de la amplificación en tiempo real mostrando la expresión del gen *esxG*. $\Delta Rn = (Rn+) - (Rn-)$, donde $Rn+$ es la intensidad de emisión de la PCR con molde/ intensidad de emisión de fluorescencia de la referencia pasiva y $Rn-$ es la intensidad de emisión de fluorescencia de la PCR sin molde (NTC)/intensidad de emisión de fluorescencia de la referencia pasiva; Ct es el número de ciclo en el cual la detección de la intensidad de la emisión del reportero marcado se distancia del ruido de fondo.

7.7 Análisis de codones raros para la expresión en *E. coli*

Considerando la posibilidad de que las secuencias de genes heterólogos en las construcciones se transcriban con codones poco comunes para el sistema de expresión de *E. coli*, se analizaron las secuencias en la herramienta RaCC <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC>

En la secuencia del gen *esxG* (294 nucleótidos) no se identificó ninguno de los codones raros más comúnmente reportados (Figura 38).

RaCC results:

Red = rare Arg codons **AGG, AGA, CGA**

Green = rare Leu codon **CTA**

Blue = rare Ile codon **ATA**

Orange = rare Pro codon **CCC**

for the following input sequence:

```
atg agc ctt ttg gat gct cat atc cca cag ttg gtg gcc tcc cag tgg gcg ttt gcc gcc aag gcg
ggg ctg atg cgg cac acg atc ggt cag gcc gag cag gcg gcg atg tgg gct cag gcg ttt cac cag
ggg gag tgg tgg gcg gcg ttt cag gcc gcc cat gcc cgg ttt gtg gcg gcg gcc gcc aaa gtc aac
acc ttg ttg gat gtc gcg cag gcg aat ctg ggt gag gcc gcc ggt acc tat gtg gcc gcc gat gct
gcg gcc gcg tgg acc tat acc ggg ttc tga
```

The length is: 294 nucleotides

Number of total single rare Arg codons: 0

Number of tandem rare Arg codon double repeats: 0

Number of tandem rare Arg codon triple repeats: 0

Figura 38. Análisis de codones raros en el gen *esxG* de *M. tuberculosis*.

En el caso de la secuencia del gen *esxH* (291 nucleótidos) se localizó un codón raro para el aminoácido prolina (CCC) (Figura 39).

RaCC results:

Red = rare Arg codons **AGG, AGA, CGA**

Green = rare Leu codon **CTA**

Blue = rare Ile codon **ATA**

Orange = rare Pro codon **CCC**

for the following input sequence:

```
atg tgc caa atc atg tac aac tac CCC ggc atg ttg ggt cac gcc ggg gat atg gcc gga tat gcc
ggc acg ctg cag agc ttg ggt gcc gag atc gcc gtg gag cag gcc gcg ttg cag agt gcg tgg cag
ggc gat acc ggg atc acg tat cag gcg tgg cag gca cag tgg aac cag gcc atg gaa gat ttg gtg
cgg gcc tat cat gcg atg tcc agc acc cat gaa gcc aac acc atg gcg atg atg gcc cgc gac acg
gcc gaa gcc gcc aaa tgg ggc ggc tag
```

The length is: 291 nucleotides

Number of total single rare Arg codons: 0

Number of tandem rare Arg codon double repeats: 0

Number of tandem rare Arg codon triple repeats: 0

Figura 39 Análisis de codones raros en el gen *esxH* de *M. tuberculosis*.

La secuencia del gen *lipF* (834nucleótidos) contiene tres codones raros para los aminoácidos arginina, dos para isoleucina y 6 para prolina (Figura 40).

RaCC results:

Red = rare Arg codons **AGG, AGA, CGA**

Green = rare Leu codon **CTA**

Blue = rare Ile codon **ATA**

Orange = rare Pro codon **CCC**

for the following input sequence:

```
gtg cgt gcg cct ggg gtg cgg gcg gcc gac ggc gct ggg cgg gtg gtg ctc tat ttg cac gcc gcc
gcg ttt gtc atg tgc ggg ccg aat tgc cac agc AGG atc gtc aac gcg ctg tca gga ttt gcc gaa
tca CCC gtg ttg ATA gtc gac tat cgg ctg atc cct aag cat tgc ctg ggg atg gcg ctc gac gac
tgc cac gat gca tac caa tgg ttg cgg gcg cgc gga tac cgg ccg gaa cag atc gtg ttg gcc ggt
gat tcc gcg ggt ggt tac ctt gcg ctc gcg ctt gcg cag cgg ctg cag tgc gac gac gag aaa ccg
gcg gca ATA gtg gcc atc tct ccg ttg ctg cag ctg gcc aag ggg CCC aag cag gac cat CCC aac
atc ggg acc gac gcg atg ttt ccg gcg cgg gca ttc gat gcc ttg gcg gca tgg gtc AGG gcg gcc
gct gcc aag aac atg gtc gac ggc AGG CCC gaa gac ctc tat gag ccg ctc gac cat atc gaa tcc
agc ttg ccg ccg aca ctt att cac gtt tcc ggc tcc gaa gtg ctg ctg cac gac gcg cag ctg gcc
gcc ggc aag ctg gcg gcg gca ggc gtc tgt gcc gag gta cgg gtt tgg CCC ggt cag gct cat ctt
ttc caa ctc gcc aca ccg ctg gtg CCC gaa gcg acc cgt tgc ttg cgt cag atc ggg cag ttc att
cgc gac gcc acc gct gac tgc tgc ttg agt ccg gtg cat cgg tgc cgc tac gtc gcg ggt tca cct
cgc gcc gca agc cgt ggc gcg ttt gga cag tgc cct atc tag
```

The length is: 834 nucleotides

Figura 40 Análisis de codones raros en el gen *lipF* de *M. tuberculosis*.

8. DISCUSIÓN

Parte del éxito de *M. tuberculosis* como patógeno es la habilidad de activar programas transcripcionales complejos en respuesta a condiciones ambientales como infección intracelular de macrófagos, deficiencia de nutrientes, estrés metabólico y exposición a fármacos (Kendall *et al.* 2004). Estos mecanismos incluyen la modificación de la expresión génica que permite la supervivencia de la bacteria, pues puede ajustarse a los requerimientos metabólicos. Este fenómeno ha sido ampliamente descrito mediante el análisis del transcriptoma en *M. tuberculosis* (Butcher 2004; Fontan *et al.* 2008; Fu y Shinnick 2007; Waddell *et al.* 2004; Wei *et al.* 2013).

8.1 Fármacorresistencia y cinética de crecimiento

La tasa de replicación y el ritmo metabólico se han considerado como factores en la resistencia de *M. tuberculosis* hacia los antibióticos. Cuando el bacilo se expone al ambiente hostil del hospedero, la regulación dispara una respuesta de redirección de los flujos de carbono que tiene como consecuencia una disminución en el crecimiento bacteriano (Baek *et al.* 2011), y esto podría ser un fenómeno clave en la supervivencia intracelular del patógeno (Helguera-Repetto *et al.* 2014).

Cuando se observa la fase estacionaria en cultivos *in vitro*, la tolerancia a fármacos se incrementa (Tudo *et al.* 2010); esto es causado por mecanismos regulatorios como el incremento en la expresión de proteínas similares a las histonas que pueden afectar el perfil genético en *M. tuberculosis* (Niki *et al.* 2012).

La resistencia a fármacos ha sido comúnmente asociada a un costo de *fitness*, en parte por la presencia de mutaciones que confieren resistencia, como sería el caso del gen *rpoB* cuyas mutaciones se han reportado como causantes de una menor tasa de crecimiento en las cepas resistentes a rifampicina respecto a las cepas sin resistencia (Gagneux *et al.* 2006; Mariam *et al.* 2004). Sin embargo, también se ha sugerido que la evolución de las cepas farmacorresistentes podría resultar en resistencia a la rifampicina sin el costo de *fitness* (Gagneux *et al.* 2006), y esto concuerda con los resultados encontrados en este estudio. En este trabajo se analizaron las cinéticas de crecimiento de

aislados clínicos resistentes al fármaco, todos portadores de alguna mutación en el gen *rpoB* (Anexo A), y encontramos que las tasas de crecimiento no son diferentes a los aislados susceptibles a los fármacos. Esto es evidencia de mecanismos compensatorios que le permiten a las cepas resistentes adaptarse al ambiente después de la presión selectiva de los fármacos anti-tuberculosis (Brites y Gagneux 2012).

En general, bajo las mismas condiciones de cultivo, se observó que los aislados farmacorresistentes no tenían desventaja en las tasas de crecimiento cuando se compararon con cepas sensibles como la cepa H37Rv. Esto contrasta con estudios previos donde encontraron que las cepas susceptibles como H37Rv tiene una tasa crecimiento significativamente mayor que los aislados clínicos resistentes a fármacos provenientes de diferentes fondos filogenéticos (Bhatter *et al.* 2012).

Considerando que la expresión de *M. tuberculosis* es altamente sensible a condiciones de crecimiento (Gao *et al.* 2005), se estableció que la extracción de RNA total de los aislados clínicos fuese realizada en la fase logarítmica de crecimiento. El monitoreo de la cinética de crecimiento es importante porque permitió determinar que la expresión genética observada no es un resultado de la adaptación metabólica de los aislados en la fase no replicativa.

8.2 Variabilidad de la expresión génica

Como resultado de las comparaciones entre bacilos de *M. tuberculosis*, se ha reportado un transcriptoma central con una regulación conservada de los mecanismos de supervivencia intracelular. Entre la expresión de genes que regulan los mecanismos de supervivencia se encuentran *lipF*, *groES* y genes ribosomales (Homolka *et al.* 2010). Nuestros resultados mostraron una alta variabilidad en la expresión tanto de *lipF* como de *groES*, lo que significa que es muy importante estudiar la variabilidad en la expresión de cada gen particular entre cepas individuales (Gao *et al.* 2005).

En este trabajo encontramos que los genes *esxG* y *esxH* tienen patrones similares de expresión, como evidencia de que están co-regulados. Como se ha mencionado

anteriormente, estos genes forman parte del cluster ESAT-6 3, un sistema de secreción tipo VII (T7SS) (Das *et al.* 2011). Diferentes mecanismos de regulación para estos genes han sido propuestos. Los mecanismos más ampliamente estudiados han sido bajo condiciones adversas. Por ejemplo, se ha encontrado que ambos genes *esxG* y *esxH* son regulados por el factor de transcripción WhiB5, un regulador transcripcional global que se activa durante la inanición y después de la activación de la infección crónica (Casonato *et al.* 2012). También, WhiB5 se induce por deficiencias de hierro y zinc. Entonces, se ha sugerido que bajo condiciones adversas se incrementarían los niveles de expresión de este cluster (Maciag *et al.* 2009).

En nuestro estudio, al observar diferencias en la expresión de los aislados clínicos, suponemos que probablemente es debido en parte a la diversidad del fondo genético, como las mutaciones puntuales de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) reportadas previamente en las proteínas Esx. La elevada variabilidad genética puede contribuir a una amplia variación en los epítopes de las proteínas, y lo anterior tiene importantes implicaciones para los campos de diagnóstico y la generación de vacunas (Uplekar *et al.* 2011).

El gen *lipF* de *M. tuberculosis* se ha relacionado con la patogénesis, y su promotor se reportado que se induce bajo condiciones de estrés ácido (Richter y Saviola 2009). Por tal razón, suponemos que los aislados clínicos con una alta expresión de este gen podrían ser más aptos para sobrevivir en condiciones de pH ácido. A partir de los resultados obtenidos en este estudio, observamos que algunos aislados clínicos con una baja expresión relativa de *lipF* no presentaban alteraciones en la cinética de crecimiento, lo que concuerda con trabajos anteriores donde se establece que este gen no es vital bajo condiciones de crecimiento estándar (Sasseti *et al.* 2003). Por otro lado, si consideramos las implicaciones de LipF en la composición de la pared celular, la expresión de *lipF* podría permitir a las micobacterias ser más resistentes al estrés ambiental (exposición a fármacos) y por lo tanto mejor adaptadas a las condiciones adversas *in vivo* (Richter y Saviola 2009).

El gen *rpsA* codifica para la proteína ribosomal S1 (RpsA), y la evidencia experimental sugiere que su regulación no está relacionada con la sobreexpresión de factores de transcripción (Rustad *et al.* 2013). Sin embargo, su regulación estaría ligada a la expresión de otros genes involucrados en la interacción con proteínas que se unen al mRNA en la secuencia Shine-Dalgarno (SD), clave para el inicio de la traducción. RpsA también está involucrado en el mecanismo de rescate de la traducción en el ribosoma denominado trans-traducción mediante una unión específica a RNA de transferencia que pudiera resultar esencial para la supervivencia del microorganismo bajo condiciones de estrés y para la recuperación tras un período de escasez de nutrientes, en estas condiciones, la expresión de *rpsA* se ve disminuida (Betts *et al.* 2003; Smith *et al.* 2013). La proteína RpsA se ha reportado como uno de los blancos del ácido pirazinoico, la forma activa del fármaco pirazinamida de primera línea. La resistencia a este fármaco se ha relacionado a mutaciones en el gen *pncA* (Jureen *et al.* 2008). Los aislados clínicos analizados en este trabajo mostraron previamente una baja correlación entre la resistencia fenotípica a la pirazinamida y las mutaciones puntuales en el gen *pncA*, por lo que se consideró que posiblemente la resistencia a este fármaco estuviera relacionado con la sobreexpresión del gen *rpsA* como se ha descrito anteriormente (Shi *et al.* 2011). Sin embargo, no se encontró una relación entre los niveles de expresión de este gen con la resistencia fenotípica a los fármacos de primera línea.

El gen *rpmI* codifica para la proteína ribosomal L35p, la cual ha sido previamente descrita como una proteína con expresión disminuida en el proceso de infección a macrófagos (Fontan *et al.* 2008). Sin embargo, en condiciones de cultivo estándar se encontró que la expresión de este gen es relativamente estable entre los diferentes aislados clínicos, independiente de su perfil de farmacorresistencia, por lo que concluimos que su expresión basal no tiene relación con la farmacorresistencia en *M. tuberculosis* en condiciones óptimas de crecimiento.

El factor de inicio de la traducción *infA* se ha propuesto como un factor esencial para el crecimiento *in vitro* de la cepa H37Rv (Griffin *et al.* 2011), y aparentemente la disminución de su expresión está a cargo de WhiB5 (Rustad *et al.* 2014), un regulador transcripcional asociado a la virulencia (Casonato *et al.* 2012). Los resultados de los

aislados clínicos muestran que la expresión de *infA* es similar a H37Rv, excepto por el aislado multifarmacorresistente 929 que presentó una expresión más de 3 veces mayor a H37Rv.

GroES es una proteína chaperona de choque térmico codificada por el gen *groES*. La expresión del RNA mensajero de este gen se ha encontrado sobre expresado en condiciones de altas temperaturas, y posiblemente la inhibición de su expresión está relacionada con los represores *hsoR* y *hrcA* (Stewart *et al.* 2002). En este estudio, los aislados fueron cultivados a 37°C evitando el estrés por incremento de temperatura; sin embargo, los resultados mostraron una alta variabilidad en la expresión de *groES*, probablemente debido a la temperatura de 25 °C a la que se llevaron a cabo el resto de los procedimientos (como agitación y monitoreo por turbidimetría).

El método de Livak-Schmittgen para el análisis comparativo de la expresión genética requiere de la utilización de un gen calibrador. En este estudio optamos por utilizar al gen *rrs* para normalizar la expresión de los genes estudiados, aunque se sabe que también este gen está sujeto a regulación. Sin embargo, la utilización del gen *rrs* ha sido referenciada previamente, en razón de su expresión relativamente estable entre cepas de *M. tuberculosis* (Penuelas-Urquides *et al.* 2013). Algunas mutaciones en el gen *rrs* pueden conferir farmacorresistencia a estreptomycin y fluoroquinolonas (Lee *et al.* 2012; Smith *et al.* 2013), pero todavía no se ha encontrado evidencia que vincule la expresión de este gen con los mecanismos de farmacorresistencia.

8.3 Regulación transcripcional

Los resultados de este estudio revelan una alta variabilidad en la expresión de los genes *esxG*, *esxH*, *infA*, *rpml*, *rpsA* y *groES* entre aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Las réplicas biológicas de este ensayo bajo condiciones controladas también apuntan a evidentes variaciones en los niveles de expresión, llevando a la conclusión que su expresión génica es altamente sensible a cambios mínimos en las condiciones de cultivo, y que la expresión basal de estos genes podía estar más relacionada con el fondo genético de cada aislado clínico y con sus mecanismos de regulación particulares.

La conocida habilidad del microorganismo *M. tuberculosis* para adaptarse a una amplia variedad de condiciones es en gran parte debido a programas regulatorios a nivel transcripcional. Este proceso es principalmente controlado por un grupo de aproximadamente 200 factores de transcripción (TFs) (Peterson *et al.* 2014). Además, se han reportado otros mecanismos como la interacción de proteínas de unión al DNA, factores sigma y el mecanismo de degradación de RNA *M. tuberculosis* (Rustad *et al.* 2014).

El genoma de *M. tuberculosis* tiene más de 100 genes codificantes para proteínas regulatorias de la expresión génica, incluyendo 13 factores sigma (Gaudion *et al.* 2013). Los factores sigma son componentes de la RNA polimerasa que contienen dominios de reconocimiento para promotores, algunos de ellos son conservados y otros son factores sigma alternativos que activan la transcripción de genes especializados. Estos genes están posiblemente implicados en la respuesta al estrés, la virulencia y en la capacidad de cambiar de la fase exponencial de crecimiento a la fase estacionaria o de persistencia (Mustyala *et al.* 2014).

Otro mecanismos de regulación en *M. tuberculosis* tiene que ver con que la RNA polimerasa está regulada por factores de unión (*non-DNA binding factors*) que interactúan con las subunidades sigma y tienen la capacidad de activar o reprimir la transcripción. Estos mecanismos todavía no han sido estudiados a profundidad (Hu *et al.* 2014).

La metilación de DNA en *M. tuberculosis* también juega un papel importante en la expresión de determinado número de genes. Diferentes patrones de la actividad de la DNA metiltransferasa se han reportado en diferentes linajes de *M. tuberculosis* y parece tener un importante efecto de manera específica para cada cepa (Shell *et al.* 2013).

La degradación de RNA mensajero en respuesta al estrés puede tener una función importante en la expresión de las proteínas a nivel post-transcripcional. Se sabe que la estabilidad del RNA en *M. tuberculosis* es casi el doble comparado con otros procariontas (aproximadamente de 9.5 minutos). Además, una menor tasa de degradación del RNA mensajero puede significar que *M. tuberculosis* no puede reprimir la expresión génica

tan rápido como otros organismos, pero al mismo tiempo este fenómeno le permite ahorrar energía por que le facilita mantener los niveles intracelulares de transcritos esenciales (Rustad *et al.* 2013).

8.4 Caracterización de anticuerpos anti-EsxG, anti-EsxH y anti-LipF

En este trabajo se buscó la caracterización de las proteínas expresadas por los genes *esxG*, *esxH* y *lipF* en aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferentes perfiles fenotípicos de resistencia a fármacos de primera línea. La intención era estudiar si existía una correlación entre los niveles de expresión de estas proteínas con la susceptibilidad a fármacos antituberculosis. Para estos fines se generaron los anticuerpos anti-EsxG, anti-EsxH y anti-LipF en conejos por parte de la compañía Genemed Synthesis, la cual tomó como base el análisis de las regiones peptídicas con potencial antigénico. Fue necesario caracterizar los anticuerpos, primero en lisados de proteínas totales extraídas de diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis*, donde se observó que los anticuerpos se unían de forma inespecífica a las proteínas observadas en el gel de poliacrilamida, y después mediante expresión heteróloga de las proteínas en un sistema de expresión en *E. coli*.

Un protocolo de validación de anticuerpos ideal debe asegurar que el anticuerpo es específico, sensible, confiable y debe ser diseñado para la aplicación a la que ha sido destinada (Bordeaux *et al.* 2010). En el proceso de generación de los anticuerpos utilizados en este estudio, se inmunizaron a los conejos de ensayo con una mezcla de los péptidos sintéticos antigénicos para cada proteína, lo que tiene como ventaja el conocimiento de la secuencia. Aunque particularmente los anticuerpos generados no puedan ser utilizados para ensayos de inmunohistoquímica (Bordeaux *et al.* 2010; Saper 2009), debido a que en dichos ensayos se reconocen las proteínas no desnaturalizadas (Grimsey *et al.* 2008). Los resultados de este trabajo revelaron un patrón de bandeo inespecífico cuando se incubó con los anticuerpos específicos, lo que indica que se están reconociendo epítopes distintos, y que es necesario tomar precauciones adicionales (Saper 2009).

Es importante establecer los controles antes de determinar si un anticuerpo es funcional. Incubar a los anticuerpos con lisados de otros organismos que no expresan la proteína de interés podría ser un buen control negativo para probar la especificidad del anticuerpo. De manera similar, la sobreexpresión de la proteína de interés podría considerarse un control positivo de reconocimiento (Bordeaux *et al.* 2010). Sin embargo, en este proyecto no se pudieron establecer las condiciones óptimas de reconocimiento de las proteínas debido a que no se ha logrado obtener grandes cantidades de las proteínas de interés.

8.5 Expresión de las proteínas EsxG, EsxH y LipF en un sistema de expresión heteróloga en *E. coli*

Cuando es necesario expresar una proteína heteróloga, *i.e.*, la generación de una proteína de un organismo utilizando la maquinaria de expresión de otro, es importante tomar en consideración diversos aspectos como la cepa de expresión, las características de la proteína heteróloga, el tipo de plásmido y la forma de inducir dicha expresión, entre otros. En este estudio se buscó la expresión de las proteínas EsxG, EsxH y LipF de *M. tuberculosis* en la cepa BL21 DE3 Star de *E. coli*, utilizando los plásmidos pET/101 TOPO, pTriEX 3.0, que contienen el sistema de expresión T7, y finalmente pMV261, que también permite la expresión constitutiva en micobacterias.

El sistema de expresión T7 es por mucho el más utilizado en la preparación de proteínas recombinantes (Sorensen y Mortensen 2005). Existen más de 40 plásmidos pET, en el caso de este estudio se utilizaron pET/101 direccional TOPO y el plásmido pTriEX 3.0, ambos cuentan con el sistema T7 que requiere la expresión en una cepa hospedadora lisogenizada por el fragmento del fago DE3. El fragmento del fago codifica para la T7 RNA polimerasa bajo el control de un promotor inducible por IPTG *lacUV5*, LacI (el gen *lacI* está presente en el genoma de *E. coli*) y reprime al promotor *lacUV5* y al promotor T7/*lac*, T7 RNA polimerasa es transcrito cuando el IPTG se une y desencadena la liberación del tetrámero LacI del operón *lac*, entonces se inicia la transcripción del gen blanco mediante la T7 RNA polimerasa 5 veces más rápido que la *E. coli* RNA polimerasa (Sorensen y Mortensen 2005) lo que puede resultar en la

producción de la proteína recombinante hasta producir un 30% del total de proteínas del hospedero (García J 2013) (Figura 41).

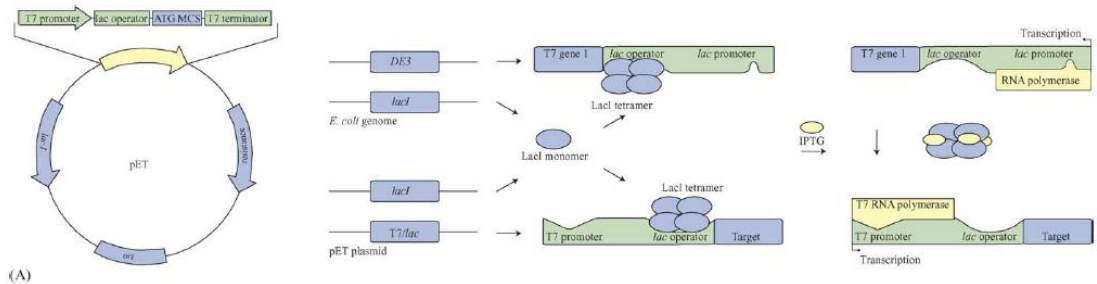


Figura 41. Diagrama con los mecanismos de expresión recombinante, el sistema pET y la configuración del plásmido. Los procesos macromoleculares se muestran a la derecha de la ilustración (Dubendorff and Studier, 1991; Studier et al., 1990 en Sorensen y Mortensen 2005).

La cepa para la expresión recombinante es de alta importancia pues deben ser deficientes en la mayoría de las proteasas naturales y mantener la estabilidad de la expresión del plásmido. Además, la cepa debe conferir los elementos relevantes para el sistema de expresión. Una de las cepas más comunes y eficientes es *E. coli* BL21 (Sorensen y Mortensen 2005), por esta razón se seleccionó para producir la expresión de las proteínas de *M. tuberculosis*.

La optimización de la expresión de recombinantes recae en parte en el análisis del gen heterólogo, es importante tomar en consideración aspectos como la estabilidad del mRNA, el uso preferencial de codones, la formación de cuerpos de inclusión y la saturación de la maquinaria de plegamiento (García J 2013; Saccardo *et al.* 2016). Los niveles de expresión de un gen son principalmente determinados por la eficiencia de la transcripción, la estabilidad del mRNA y la frecuencia de la traducción; estos dos últimos aspectos han sido objeto de intensa optimización (Sorensen y Mortensen 2005). Este aspecto se tomó en consideración ya que, como se mencionó anteriormente, la vida media de los transcritos de *M. tuberculosis* es de 9.5 minutos (Rustad *et al.* 2013), lo cual representa casi el doble en comparación con la estabilidad del RNA en otros procariontes. Además, la cepa hospedera que se seleccionó (BL21 star de Invitrogen) es

deficiente para la endonucleasa RNAasa E, por lo que suponemos que la transcripción de los genes heterólogos es eficiente. Por otro lado, la formación de estructuras secundarias en el mRNA puede afectar el inicio de la transcripción provocando problemas en la unión de la RNA polimerasa o a nivel de traducción. Las estructuras secundarias podrían impedir la unión de las unidades ribosomales (García J 2013).

El inicio de la traducción desde la región de iniciación requiere un sitio de unión a ribosomas, el cual es el sitio óptimo de inicio de la traducción que incluye la secuencia Shine-Dalgarno y un codón de inicio (*e.g.* el básico AUG). Además, es necesario un alto contenido de adeninas y timinas para mejorar la eficiencia de la traducción de una proteína (Sorensen y Mortensen 2005). En los genes heterólogos para el sistema de expresión el codón de inicio es ATG para *esxG* y *esxH*, y en el caso del gen *lipF* se sustituyó el codón GTG por ATG en el inserto para facilitar el inicio de la traducción de la proteína. También es importante considerar un terminador de transcripción ubicado después de la secuencia codificante para incrementar la estabilidad del transcrito. Lo anterior previene la transcripción de otros elementos en el plásmido de expresión y estabiliza al RNA mensajero creando una estructura de tallo en extremo 3' del transcrito. En el caso de *E. coli*, el codón de paro de preferencia es UAA y se puede incrementar la eficiencia de la traducción insertando codones de paro consecutivos (Sorensen y Mortensen 2005). En este trabajo se comprobó la producción del transcrito del gen *esxG* en el vector de expresión pTriEX mediante PCR en tiempo real, donde se observó la producción abundante de mRNA para este gen, sin embargo, no se observa la producción de una proteína del tamaño correspondiente a las proteínas recombinantes EsxG, EsxH y LipF, por lo que consideramos que el problema de expresión se encuentra a nivel de la traducción de los transcritos.

Entre las características que influyen en los niveles de expresión de una proteína recombinante se menciona el uso de codones poco usados por *E. coli* denominados “codones raros”, particularmente los codones que codifican para los aminoácidos prolina y arginina, los cuales afectan considerablemente los niveles de síntesis de la proteína recombinante. Dichos codones, se ha reportado, pueden favorecer el corrimiento del marco de lectura hasta en un 50% (García J 2013). Como consecuencia de una baja

disponibilidad de moléculas de tRNA, los codones “raros” son traducidos lentamente por lo que la producción de la proteína puede verse afectada por la preferencia de codones del sistema de expresión al producir un estancamiento en los ribosomas que requiere la incorporación de aminoácidos acoplados a tRNA (Saccardo *et al.* 2016). Por esta razón, el ajuste de la disponibilidad de tRNA en el hospedero es una de las consideraciones en la optimización de los procesos de expresión. El uso preferencial de codones se vuelve un problema recurrente en los sistemas de expresión, los errores en la traducción provocados por la presencia de codones raros pueden incluir sustituciones aminoacídicas, cambios de marcos de lectura o terminación prematura de la traducción, por lo que la expresión de una proteína recombinante de tamaño esperado no implica en todos los casos la integridad de la traducción. Los codones más problemáticos codifican para argU (AGA y AGG), argX (CGG), argW (CGA y CGG) ileX (AUA), glyT (GGA), leuW (CUA), proL (CCC) y lys (GGA) (Saccardo 2016; Terpe, 2006). Se le ha dado mayor enfoque a los codones AGG y AGA, ya que ocurren con muy baja frecuencia en *E. coli* (Kane, 1995 en Saccardo *et al.* 2016). El análisis de secuencias de los genes de *M. tuberculosis* expresados en nuestro sistema de expresión reveló la presencia de codones raros en la secuencia codificante de *esxH* (uno para prolina) y de *lipF* (tres codones raros para arginina, dos para isoleucina y 6 para prolina), por lo que suponemos que este puede ser un factor determinante en la baja o nula producción de las proteínas recombinantes.

Algunas estrategias se han utilizado para remediar la presencia de codones raros en un transcrito, entre ellas, la mutagénesis dirigida de la secuencia codificante para adaptarse mejor a la disponibilidad de tRNA en el sistema hospedero (Saccardo *et al.* 2016). Sin embargo, al modificar la secuencia se corre el riesgo de perder estabilidad del mensajero. Otro método propuesto ha sido la co-transformación del hospedero con un plásmido que codifique para tRNA para codones problemáticos, como es el caso de los plásmidos complementarios pR.A.R.E (Novagen) y el incluido en el sistema CodonPlus de Stratagene (Saccardo *et al.* 2016). También existen algunas variantes de las cepas de expresión que permiten sopesar la carencia de tRNA para codones raros, por ejemplo, las cepas Rosetta BL21, Rossetta-gami BL21 (Terpe 2006) y BL21-CodonPlus (DE3) (Carsten-Peter. 1999).

Si una proteína heteróloga no requiere modificaciones post-traduccionales complejas y son expresadas de forma soluble, generalmente se pueden producir con suficiente biomasa en *E. coli*. Sin embargo, no es poco común que las proteínas recombinantes sobreexpresadas no puedan alcanzar su correcta conformación y son blanco de degradación proteolítica o bien que formen cuerpos de inclusión. El uso de un promotor fuerte o altas concentraciones del inductor pueden acarrear un mal plegamiento de las proteínas. Los principales blancos para ser degradadas incluye polipéptidos prematuramente terminados e intermediarios del plegamiento (Baneyx y Mujacic 2004). Considerando que en este estudio se utilizaron promotores fuertes bajo la acción de altas concentraciones de IPTG (1mM) y que los genes contienen codones raros que pudieran resultar en polipéptidos prematuros, no descartamos que las proteínas recombinantes pudieran ser blanco de proteólisis por parte del hospedero. Una estrategia que se podría probar es el uso de bajas temperaturas que permitirían bajar el ritmo de la transcripción y traducción reduciendo el riesgo de un mal plegamiento de las proteínas (Baneyx y Mujacic 2004).

A pesar de que en este estudio no se logró la producción de las proteínas recombinantes en nuestros sistemas de expresión, las proteínas EsxG, EsxH y LipF han sido producidas anteriormente en la cepa BL21 de *E. coli* (Callahan *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2005). Existen marcadas diferencias con nuestro sistema, *i.e.* el plásmido utilizado fue el pET-32a y la secuencia de *lipF* fue acoplada después de una proteína de fusión thioredoxina (Zhang *et al.* 2005). Para el caso de las proteínas EsxG y EsxH, se utilizó el plásmido pET22b para expresar las proteínas como heterodímero utilizando un linker de 27 pares de base para la formación del casete, y se permitió la expresión de seis residuos de histidina en el extremo C-terminal (Callahan *et al.* 2010). En este trabajo se introdujo un codón de paro después de la secuencia codificante de los genes heterólogos, ya que no se pretendía utilizar un método de purificación, sino por el contrario, con la intención de mantener la estructura de la proteína en el caso de que los anticuerpos pudieran reconocer la conformación nativa de la proteína recombinante para futuras aplicaciones. Se sabe que en algunos casos los tags de péptidos pequeños podrían tener efectos negativos en la estructura terciaria de la proteína, así como en su actividad biológica (Rosano y Ceccarelli 2014).

9. CONCLUSIONES

Las cinéticas de crecimiento entre aislados clínicos con diferentes perfiles fenotípicos de susceptibilidad o resistencia a fármacos de primera línea, incluso algunos de ellos con mutaciones asociadas a farmacorresistencia, fueron similares.

El análisis de expresión de los genes evaluados demostró una enorme variabilidad en los niveles de los transcritos, independiente del perfil de sensibilidad o resistencia a fármacos de primera línea o del fondo filogenético del aislado clínico.

La variabilidad en la expresión entre las réplicas biológicas demostró que los aislados clínicos tienen una alta sensibilidad a cambios en el microambiente de crecimiento.

Los genes *esxG* y *esxH* se expresaron en patrones similares aun cuando fueron analizados individualmente, y esta consistencia fue observable en los diferentes aislados clínicos independientemente de su fondo genético.

La expresión del gen *rpsA* no siempre está relacionada con la resistencia a pirazinamida basándonos en nuestros resultados.

El gen *lipF* se encuentra drásticamente disminuido en algunos aislados clínicos en condiciones estándar de cultivo.

10. PERSPECTIVAS

1. Se propone la evaluación de los perfiles de expresión del gen *lipF* en un mayor número de aislados clínicos y su caracterización como marcador molecular de farmacorresistencia mediante análisis de inducción y represión de la expresión.
2. Para la caracterización de los anticuerpos anti-EsxG, anti-EsxH y anti-LipF, se pueden abordar varias estrategias:
 - a) Producir la proteína de interés con un vector que compense la disponibilidad de tRNA para codones raros en *E. coli* (e.g., pR.A.R.E) o bien utilizar una de las cepas diseñadas para este propósito como Rosetta BL21, Rossetta-gami BL21 y BL21-CodonPlus.
 - b) Expresar los genes *esxG*, *esxH* y *lipF* en construcciones similares a las reportadas (e.g. en el plásmido pET-32a para *lipF*), con la adición de Histidinas en el extremo C-terminal para purificar las proteínas recombinantes y tener un control para la caracterización de anticuerpos.
 - c) Transformar una cepa del género *Mycobacteriaceae* no patogénica con las construcciones contenidas en el plásmido pMV261 para aprovechar la maquinaria de traducción similar a *M. tuberculosis*, y producir la proteína recombinante con un tag que permita la purificación de la proteína recombinante.
3. Una vez caracterizados los anticuerpos, evaluar de manera cuantitativa la expresión de las proteínas EsxG, EsxH y LipF a partir de los extractos de proteínas totales que se obtuvieron de los aislados clínicos.
4. Evaluar los anticuerpos en lisados proteicos en su forma nativa para observar si se podrían utilizar en otras técnicas en las que las proteínas conserven su conformación estructural.
5. Diseñar un sistema de sobreexpresión e inhibición de la expresión de las proteínas EsxG, EsxH y LipF para evaluar el efecto en la susceptibilidad a los fármacos antituberculosis.

11. REFERENCIAS

1. Augustynowicz-Kopec E, Jagielski T, Kozinska M, Zabost A, Klatt M, Zwolska Z. 2008. Molecular analysis of drug-resistant *M. tuberculosis* isolates collected in central Poland. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14:605-607.
2. Baek SH, Li AH, Sasseti CM. 2011. Metabolic regulation of mycobacterial growth and antibiotic sensitivity. *PLoS biology* 9:e1001065.
3. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR, Jr. 1994. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *M. tuberculosis*. *Science* 263:227-230.
4. Baneyx F, Mujacic M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology* 22:1399-1408.
5. Bates JH. 1980. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. *Clinics in chest medicine* 1:167-174.
6. Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusova K, Belisle JT, Brennan PJ, Inamine JM. 1996. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11919-11924.
7. Betts JC, McLaren A, Lennon MG, Kelly FM, Lukey PT, Blakemore SJ, Duncan K. 2003. Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thiolactomycin-, and triclosan-treated *M. tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47:2903-2913.
8. Bhattar P, Chatterjee A, D'Souza D, Tolani M, Mistry N. 2012. Estimating fitness by competition assays between drug susceptible and resistant *M. tuberculosis* of predominant lineages in Mumbai, India. *PloS one* 7:e33507.
9. Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, Killiam E, Baquero M, Hanna J, Anagnostou V, Rimm D. 2010. Antibody validation. *BioTechniques* 48:197-209.
10. Boshoff HI, Myers TG, Copp BR, McNeil MR, Wilson MA, Barry CE, 3rd. 2004. The transcriptional responses of *M. tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *The Journal of biological chemistry* 279:40174-40184.
11. Brennan PJ. 1989. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Reviews of infectious diseases* 11 Suppl 2:S420-430.
12. Brites D, Gagneux S. 2012. Old and new selective pressures on *M. tuberculosis*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12:678-685.
13. Brossier F, Veziris N, Aubry A, Jarlier V, Sougakoff W. 2010. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *M. tuberculosis* complex isolates. *Journal of clinical microbiology* 48:1683-1689.
14. Butcher PD. 2004. Microarrays for *M. tuberculosis*. *Tuberculosis* 84:131-137.

15. Callahan B, Nguyen K, Collins A, Valdes K, Caplow M, Crossman DK, Steyn AJ, Eisele L, Derbyshire KM. 2010. Conservation of structure and protein-protein interactions mediated by the secreted mycobacterial proteins EsxA, EsxB, and EspA. *Journal of bacteriology* 192:326-335.
16. Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C. 1999. Identification of a virulence gene cluster of *M. tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular microbiology* 34:257-267.
17. Carsten-Peter. C. 1999. BL21-CodonPlus™ Cells Correct Expression Problems Caused by Codon Bias. Stratagene product update. .
18. Casonato S, Cervantes Sanchez A, Haruki H, Rengifo Gonzalez M, Provvedi R, Dainese E, Jaouen T, Gola S, Bini E, Vicente M, Johnsson K, Ghisotti D, Palu G, Hernandez-Pando R, Manganelli R. 2012. WhiB5, a transcriptional regulator that contributes to *M. tuberculosis* virulence and reactivation. *Infection and immunity* 80:3132-3144.
19. CDC. 2006. Revised definition of extensively drug-resistance tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep* 11:1176.
20. Cloete R, Oppon E, Murungi E, Schubert WD, Christoffels A. 2016. Resistance related metabolic pathways for drug target identification in *M. tuberculosis*. *BMC bioinformatics* 17:75.
21. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *M. tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537-544.
22. Coll P. 2003. [Drugs with activity against *M. tuberculosis*]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* 21:299-307; quiz 308, 326.
24. Comstock GW. 1982. Epidemiology of tuberculosis. *The American review of respiratory disease* 125:8-15.
25. Cook GM, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox RA, Danilchanka O, Niederweis M. 2009. Physiology of mycobacteria. *Advances in microbial physiology* 55:81-182, 318-189.
26. Chaoui I, Sabouni R, Kourout M, Jordaan AM, Lahlou O, Elouad R, Akrim M, Victor TC, El Mzibri M. 2009. Analysis of isoniazid, streptomycin and ethambutol resistance in *M. tuberculosis* isolates from Morocco. *Journal of infection in developing countries* 3:278-284.
29. Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. 2005. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:711-720.
30. Das C, Ghosh TS, Mande SS. 2011. Computational analysis of the ESX-1 region of *M. tuberculosis*: insights into the mechanism of type VII secretion system. *PloS one* 6:e27980.
31. De La Iglesia AI, Morbidoni HR. 2006. [Mechanisms of action of and resistance to rifampicin and isoniazid in *M. tuberculosis*: new information on old friends]. *Rev Argent Microbiol* 38:97-109.

32. Dorronsoro I, & Torroba, L. 2007. Microbiología de la tuberculosis. Anales del sistema sanitario de Navarra 30:67-85.
33. Escribano I, Rodriguez JC, Llorca B, Garcia-Pachon E, Ruiz M, Royo G. 2007. Importance of the efflux pump systems in the resistance of *M. tuberculosis* to fluoroquinolones and linezolid. *Chemotherapy* 53:397-401.
34. Fisher MA, Plikaytis BB, Shinnick TM. 2002. Microarray analysis of the *M. tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol* 184:4025-4032.
35. Fontan P, Aris V, Ghanny S, Soteropoulos P, Smith I. 2008. Global transcriptional profile of *M. tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection. *Infection and immunity* 76:717-725.
36. Fu LM. 2006. Exploring drug action on *M. tuberculosis* using affymetrix oligonucleotide genechips. *Tuberculosis* 86:134-143.
38. Fu LM, Shinnick TM. 2007. Genome-wide analysis of intergenic regions of *M. tuberculosis* H37Rv using Affymetrix GeneChips. *EURASIP J Bioinform Syst Biol*:23054.
39. Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannan BJ. 2006. The competitive cost of antibiotic resistance in *M. tuberculosis*. *Science* 312:1944-1946.
40. Gao Q, Kripke KE, Saldanha AJ, Yan W, Holmes S, Small PM. 2005. Gene expression diversity among *M. tuberculosis* clinical isolates. *Microbiology* 151:5-14.
41. García J SZ, Zumalacárregui L, Quintana M. 2013. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en Escherichia coli VacciMonitor 22:30-39.
42. Gaudion A, Dawson L, Davis E, Smollett K. 2013. Characterisation of the *M. tuberculosis* alternative sigma factor SigG: its operon and regulon. *Tuberculosis* 93:482-491.
43. González-Escalante L. 2011. Identificación de Genes vinculados con la condición de resistencia a fármacos de primera línea en *M. tuberculosis* Universidad Autónoma de Nuevo León México
44. Gorocica P, Jiménez-Martínez, M. D. C., Garfias, Y., Sada, I., & Lascurain, R. 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *M. tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 18:142-153.
45. Griffin JE, Gawronski JD, Dejesus MA, Ioerger TR, Akerley BJ, Sasseti CM. 2011. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS pathogens* 7:e1002251.
46. Grimsey NL, Goodfellow CE, Scotter EL, Dowie MJ, Glass M, Graham ES. 2008. Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal! *Journal of neuroscience methods* 171:78-86.
47. Hazbon MH, Motiwala AS, Cavatore M, Brimacombe M, Whittam TS, Alland D. 2008. Convergent evolutionary analysis identifies significant mutations in drug resistance targets of *M. tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52:3369-3376.
48. Helguera-Repetto AC, Chacon-Salinas R, Cerna-Cortes JF, Rivera-Gutierrez S, Ortiz-Navarrete V, Estrada-Garcia I, Gonzalez-y-Merchand JA. 2014.

- Differential macrophage response to slow- and fast-growing pathogenic mycobacteria. *BioMed research international* 2014:916521.
49. Hillemann D, Kubica T, Rusch-Gerdes S, Niemann S. 2005. Disequilibrium in distribution of resistance mutations among *M. tuberculosis* Beijing and non-Beijing strains isolated from patients in Germany. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49:1229-1231.
 50. Homolka S, Niemann S, Russell DG, Rohde KH. 2010. Functional genetic diversity among *M. tuberculosis* complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. *PLoS pathogens* 6:e1000988.
 51. Hu Y, Morichaud Z, Perumal AS, Roquet-Baneres F, Brodolin K. 2014. Mycobacterium RbpA cooperates with the stress-response sigmaB subunit of RNA polymerase in promoter DNA unwinding. *Nucleic acids research* 42:10399-10408.
 52. Jain A, Dixit P. 2008. Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? *J Biosci* 33:605-616.
 54. Jiang X, Zhang W, Zhang Y, Gao F, Lu C, Zhang X, Wang H. 2008. Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *M. tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. *Microb Drug Resist* 14:7-11.
 55. Jiménez DA. 2010. Análisis proteómico de *M. tuberculosis* durante su adaptación a la latencia en presencia de ácidos grasos de cadena corta. Instituto Politécnico Nacional México.
 56. Jonmalung J, Prammananan T, Leechawengwongs M, Chaiprasert A. 2010. Surveillance of pyrazinamide susceptibility among multidrug-resistant *M. tuberculosis* isolates from Siriraj Hospital, Thailand. *BMC microbiology* 10:223.
 57. Jureen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. 2008. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *M. tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52:1852-1854.
 58. Kendall SL, Rison SC, Movahedzadeh F, Frita R, Stoker NG. 2004. What do microarrays really tell us about *M. tuberculosis*? *Trends in microbiology* 12:537-544.
 59. Lee JH, Ammerman NC, Nolan S, Geiman DE, Lun S, Guo H, Bishai WR. 2012. Isoniazid resistance without a loss of fitness in *M. tuberculosis*. *Nature communications* 3:753.
 60. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
 61. Maciag A, Piazza A, Riccardi G, Milano A. 2009. Transcriptional analysis of ESAT-6 cluster 3 in *Mycobacterium smegmatis*. *BMC microbiology* 9:48.
 62. Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, Andersson DI. 2004. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *M. tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48:1289-1294.
 63. McCammon MT, Gillette JS, Thomas DP, Ramaswamy SV, Rosas, II, Graviss EA, Vijg J, Quitugua TN. 2005. Detection by denaturing gradient gel electrophoresis of *pncA* mutations associated with pyrazinamide resistance in *M. tuberculosis* isolates from the United States-Mexico border region. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49:2210-2217.

64. McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, Marais B, McHugh TD, Ford N, Weyer K, Lawn S, Grobusch MP, Memish Z, Squire SB, Pantaleo G, Chakaya J, Casenghi M, Migliori GB, Mwaba P, Zijenah L, Hoelscher M, Cox H, Swaminathan S, Kim PS, Schito M, Harari A, Bates M, Schwank S, O'Grady J, Pletschette M, Ditui L, Atun R, Zumla A. 2012. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. *The Journal of infectious diseases* 205 Suppl 2:S147-158.
65. Mokrousov I, Narvskaya O, Limeschenko E, Otten T, Vyshnevskiy B. 2002. Detection of ethambutol-resistant *M. tuberculosis* strains by multiplex allele-specific PCR assay targeting embB306 mutations. *Journal of clinical microbiology* 40:1617-1620.
66. Mphahlele M, Syre H, Valvatne H, Stavrum R, Mannsaker T, Muthivhi T, Weyer K, Fourie PB, Grewal HM. 2008. Pyrazinamide resistance among South African multidrug-resistant *M. tuberculosis* isolates. *Journal of clinical microbiology* 46:3459-3464.
67. Mustyala KK, Malkhed V, Potlapally SR, Chittireddy VR, Vuruputuri U. 2014. Macromolecular structure and interaction studies of SigF and Usfx in *M. tuberculosis*. *Journal of receptor and signal transduction research* 34:162-173.
68. Niki M, Tateishi Y, Ozeki Y, Kirikae T, Lewin A, Inoue Y, Matsumoto M, Dahl JL, Ogura H, Kobayashi K, Matsumoto S. 2012. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. *The Journal of biological chemistry* 287:27743-27752.
69. Parsons LM, Driscoll JR, Taber HW, Salfinger M. 1997. Drug resistance in tuberculosis. *Infect Dis Clin North Am* 11:905-928.
70. Penuelas-Urquides K, Gonzalez-Escalante L, Villarreal-Trevino L, Silva-Ramirez B, Gutierrez-Fuentes DJ, Mojica-Espinosa R, Rangel-Escareno C, Uribe-Figueroa L, Molina-Salinas GM, Davila-Velderrain J, Castorena-Torres F, Bermudez de Leon M, Said-Fernandez S. 2013. Comparison of gene expression profiles between pansensitive and multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis*. *Current microbiology* 67:362-371.
71. Penuelas-Urquides K, Martinez-Rodriguez HG, Enciso-Moreno JA, Molina-Salinas GM, Silva-Ramirez B, Padilla-Rivas GR, Vera-Cabrera L, Torres-de-la-Cruz VM, Martinez-Martinez YB, Ortega-Garcia JL, Garza-Trevino EN, Enciso-Moreno L, Saucedo-Cardenas O, Becerril-Montes P, Said-Fernandez S. 2014. Correlations between major risk factors and closely related *M. tuberculosis* isolates grouped by three current genotyping procedures: a population-based study in northeast Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 109:814-819.
72. Peterson EJ, Reiss DJ, Turkarslan S, Minch KJ, Rustad T, Plaisier CL, Longabaugh WJ, Sherman DR, Baliga NS. 2014. A high-resolution network model for global gene regulation in *M. tuberculosis*. *Nucleic acids research* 42:11291-11303.
73. Post FA, Willcox PA, Mathema B, Steyn LM, Shean K, Ramaswamy SV, Graviss EA, Shashkina E, Kreiswirth BN, Kaplan G. 2004. Genetic polymorphism in *M. tuberculosis* isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* 190:99-106.
74. Ramaswamy S, Musser JM. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *M. tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and lung disease* : the

- official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease 79:3-29.
75. Richter L, Saviola B. 2009. The *lipF* promoter of *M. tuberculosis* is upregulated specifically by acidic pH but not by other stress conditions. *Microbiological research* 164:228-232.
 76. Rigal-Leal J. 2015. Amplificación, subclonación y expresión de genes potencialmente involucrados en la farmacorresistencia de *M. tuberculosis* en el sistema bacteriano de *Escherichia coli*. Universidad Autónoma de Nuevo León México.
 77. Rosano GL, Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology* 5:172.
 78. Ruiz M, Torres MJ, Llanos AC, Arroyo A, Palomares JC, Aznar J. 2004. Direct detection of rifampin- and isoniazid-resistant *M. tuberculosis* in auramine-rhodamine-positive sputum specimens by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* 42:1585-1589.
 79. Rustad TR, Minch KJ, Brabant W, Winkler JK, Reiss DJ, Baliga NS, Sherman DR. 2013. Global analysis of mRNA stability in *M. tuberculosis*. *Nucleic acids research* 41:509-517.
 80. Rustad TR, Minch KJ, Ma S, Winkler JK, Hobbs S, Hickey M, Brabant W, Turkarslan S, Price ND, Baliga NS, Sherman DR. 2014. Mapping and manipulating the *M. tuberculosis* transcriptome using a transcription factor overexpression-derived regulatory network. *Genome biology* 15:502.
 81. Saccardo P, Corchero JL, Ferrer-Miralles N. 2016. Tools to cope with difficult-to-express proteins. *Applied microbiology and biotechnology* 100:4347-4355.
 82. Sakamoto K. 2012. The pathology of *M. tuberculosis* infection. *Veterinary pathology* 49:423-439.
 83. Saper CB. 2009. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 57:1-5.
 84. Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Molecular microbiology* 48:77-84.
 85. Shell SS, Prestwich EG, Baek SH, Shah RR, Sasseti CM, Dedon PC, Fortune SM. 2013. DNA methylation impacts gene expression and ensures hypoxic survival of *M. tuberculosis*. *PLoS pathogens* 9:e1003419.
 86. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE, 3rd, Wang H, Zhang W, Zhang Y. 2011. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *M. tuberculosis*. *Science* 333:1630-1632.
 87. Smith T, Wolff KA, Nguyen L. 2013. Molecular biology of drug resistance in *M. tuberculosis*. *Current topics in microbiology and immunology* 374:53-80.
 88. Sorensen HP, Mortensen KK. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* 115:113-128.
 89. Steck PA, Schwartz BA, Rosendahl MS, Gray GR. 1978. Mycolic acids. A reinvestigation. *The Journal of biological chemistry* 253:5625-5629.
 90. Stewart GR, Wernisch L, Stabler R, Mangan JA, Hinds J, Laing KG, Young DB, Butcher PD. 2002. Dissection of the heat-shock response in *M. tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology* 148:3129-3138.

91. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *M. tuberculosis*. *Lancet* 341:647-650.
92. Terpe K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* 72:211-222.
93. Tortoli E. 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS immunology and medical microbiology* 48:159-178.
94. Tudo G, Laing K, Mitchison DA, Butcher PD, Waddell SJ. 2010. Examining the basis of isoniazid tolerance in nonreplicating *M. tuberculosis* using transcriptional profiling. *Future medicinal chemistry* 2:1371-1383.
95. Uplekar S, Heym B, Friocourt V, Rougemont J, Cole ST. 2011. Comparative genomics of Esx genes from clinical isolates of *M. tuberculosis* provides evidence for gene conversion and epitope variation. *Infection and immunity* 79:4042-4049.
96. Waddell SJ, Stabler RA, Laing K, Kremer L, Reynolds RC, Besra GS. 2004. The use of microarray analysis to determine the gene expression profiles of *M. tuberculosis* in response to anti-bacterial compounds. *Tuberculosis* 84:263-274.
98. Wallis RS, Jakubiec WM, Kumar V, Silvia AM, Paige D, Dimitrova D, Li X, Ladutko L, Campbell S, Friedland G, Mitton-Fry M, Miller PF. 2010. Pharmacokinetics and whole-blood bactericidal activity against *M. tuberculosis* of single doses of PNU-100480 in healthy volunteers. *The Journal of infectious diseases* 202:745-751.
99. Wei J, Guo N, Liang J, Yuan P, Shi Q, Tang X, Yu L. 2013. DNA microarray gene expression profile of *M. tuberculosis* when exposed to osthole. *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists* 62:23-30.
100. WHO. 2007. Tuberculosis, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/print.html>.
101. World Health Organization W. 2015. Global tuberculosis report 2015
102. Zaczek A, Brzostek A, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Dziadek J. 2009. Genetic evaluation of relationship between mutations in rpoB and resistance of *M. tuberculosis* to rifampin. *BMC microbiology* 9:10.
103. Zhang M, Wang JD, Li ZF, Xie J, Yang YP, Zhong Y, Wang HH. 2005. Expression and characterization of the carboxyl esterase Rv3487c from *M. tuberculosis*. *Protein expression and purification* 42:59-66.

ANEXO A

Tabla A1. Relación entre farmacoresistencia y presencia de mutaciones en los aislados clínicos de *M. tuberculosis*

Grupo	Aislado	A	B	C	D	Genes				
						<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>rpoB</i>	<i>embB</i>	<i>pncA</i>
1	1025							x		
	1007	R	R	R	R	x		x	x	x
	986							x	x	
2	918						x	x		
	852	R	R	S	R	x		x		x
	813					x		x		
3	1068						x	x		
	929	R	R	S	S	x		x		
	840							x		
4	1003									
	998	R	S	S	S	x				
	804					x			x	
5	1044									
	903	S	S	S	S					x
	814									
6	983					x		x		
	822	R	R	S	R	x		x	x	
	803					x		x	x	x
7	943					x				
	939	R	S	S	S					
	867									
8	801									
	806	S	S	S	S					
	810									x
	H37Rv	S	S	S	S					
	CIBIN:UMF:15:99	R	R	R	R	x		x	x	

Apartados A, B, C, and D, corresponden a perfil de susceptibilidad de fármacos a Isoniazida, Rifampicina, Etambutol Y Pirazinamida

ANEXO B

Tabla A2. Concentración mínima inhibitoria determinada por ensayos de microdilución con resarzurina
REMA para isoniazida, rifampicina y etambutol en aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

ID Aislados	INH	RIF	EMB
801	R (≥1µg/mL)	S (0.125µg/mL)	R (16µg/mL)
803	R (1µg/mL)	R (≥2µg/mL)	R (32µg/mL)
804	R (≥1µg/mL)	R (≥2µg/mL)	R (≥32µg/mL)
806	R (≥1µg/mL)	R (≥2µg/mL)	R (8µg/mL)
810	R (≥1µg/mL)	R (0.5µg/mL)	R (8µg/mL)
813	R (≥1µg/mL)	S (0.25µg/mL)	R (≥32µg/mL)
814	R (≥1µg/mL)	R (≥2µg/mL)	R (16µg/mL)
822	S (≤0.031 µg/mL)	S (≤0.062 µg/mL)	S (≤1 µg/mL)
840	R (0.5/1µg/mL)	NR	R (≥32µg/mL)
852	R (≥1µg/mL)	S (0.25µg/mL)	R (≥32µg/mL)
867	R (≥1µg/mL)	S (0.25µg/mL)	R (8µg/mL)
903	R (≥1µg/mL)	S (0.25µg/mL)	R (8µg/mL)
918	R (0.25µg/mL)	S (0.125µg/mL)	S (2µg/mL)
929	S (≤0.031 µg/mL)	S (≤0.062 µg/mL)	S (≤1 µg/mL)
939	R (≥1µg/mL)	R (≥2µg/mL)	NR
943	R (≥1µg/mL)	R (≥2µg/mL)	R (32µg/mL)
983	S (≤0.031 µg/mL)	S (≤0.062 µg/mL)	S (≤1 µg/mL)
986	R (≥1µg/mL)	R (≥2µg/mL)	R (32µg/mL)
998	S (0.125µg/mL)	R (0.5µg/mL)	R (16µg/mL)
1003	R (≥1µg/mL)	S (0.25µg/mL)	S (4µg/mL)
1007	R (0.5µg/mL)	R (≥2µg/mL)	R (16µg/mL)
1025	R (≥1µg/mL)	S (0.25µg/mL)	R (16/32µg/mL)
1044	R (≥1µg/mL)	S (0.25µg/mL)	R (16/32µg/mL)
1068	R (≥1µg/mL)	S (≤0.062 µg/mL)	S (4µg/mL)

INH, isoniazida; RIF, rifampicina; EMB, etambutol. R, resistente; S, susceptible; NR no reproducible.

Las concentraciones probadas fueron las siguientes: INH=0.031, 0.062, 0.125, 0.25, 0.5 µg/mL se considera resistente si MIC >0.125µg/mL RIF=0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 µg/mL se considera resistente si MIC >0.25 µg/mL EMB = 1, 2, 4, 8, 16, 32 µg/mL se considera resistente si MIC >4 µg/mL

RESUMEN BIOGRÁFICO

Laura Adiene González Escalante

Candidata para el Grado de

Doctor en Ciencias con especialidad en Microbiología

Tesis: EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* Y *lipF* COMO POSIBLES MARCADORES DE FENOTIPO DE RESISTENCIA A FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis*.

Campo de Estudio: Microbiología.

Datos Personales: Nacida en Monclova Coahuila el 12 de Mayo de 1985.
Hija de Ing. José Alfredo González Garza y Lic. Martha Eneida Escalante García.

Educación:

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2007 como Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

En el año 2011 se obtuvo el grado de Maestría en Ciencias con Acentuación en Microbiología por parte de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Artículo publicado en la revista
FEM Microbiology Letters (2015) número 362, fnv194

RESEARCH LETTER – Pathogens & Pathogenicity

Differential expression of putative drug resistance genes in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates

Laura González-Escalante^{1,2}, Katia Peñuelas-Urquides¹,
Salvador Said-Fernández³, Beatriz Silva-Ramírez⁴
and Mario Bermúdez de León^{1,*}

¹Departamento de Biología Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, 64720, Nuevo León, México, ²Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, San Nicolás de los Garza, 66451, Nuevo León, México, ³Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Medicina, Monterrey, 64460, Nuevo León, México and ⁴Departamento de Inmunogenética, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, 64720, Nuevo León, México

*Corresponding author: Calle 2 de abril 501, esq. San Luis Potosí, Col. Independencia, CP 64720, Monterrey, Nuevo León, México. Tel/Fax: +81-8190-4035; E-mail: mario.bermudez@imss.gob.mx

One sentence summary: Looking for 'hallmarks' to differentiate between drug-sensitive and drug-resistant microbes, we found a protein potentially involved with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.

Editor: Andre Klier

ABSTRACT

Understanding drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* requires an integrated analysis of strain lineages, mutations and gene expression. Previously, we reported the differential expression of *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* and *lipF* genes in a sensitive *M. tuberculosis* strain and in a multidrug-resistant clinical isolate. Here, we have evaluated the expression of these genes in 24 clinical isolates that belong to different lineages and have different drug resistance profiles. *In vitro*, growth kinetics analysis showed no difference in the growth of the clinical isolates, and thus drug resistance occurred without a fitness cost. However, a quantitative reverse transcription PCR analysis of gene expression revealed high variability among the clinical isolates, including those with similar drug resistance profiles. Due to the complexity of gene regulation pathways and the wide diversity of *M. tuberculosis* lineages, the use of gene expression as a molecular signature for drug resistance is not straightforward. Therefore, we recommend that the expression of *M. tuberculosis* genes be performed individually, and baseline expression levels should be verified among several different clinical isolates, before any further applications of these findings.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; drug resistance; gene expression; clinical isolates; first-line drugs; tuberculosis

INTRODUCTION

Mycobacterium tuberculosis is the main agent of tuberculosis (TB) of which approximately 9 million new cases are diagnosed worldwide each year (WHO 2014). In 2006, the World Health Or-

ganization (WHO) announced a 'Stop TB' plan that aimed to dramatically reduce the global burden of TB by 2015. However, drug resistance has remained a major impediment. In 2013, the incidence of new multidrug-resistant TB cases was 3.5%. The challenge of treating multidrug-resistant TB cases is also

accentuated in under-developed countries, which have higher incidence rates and poor treatment schemes (WHO 2014).

One way to address drug resistance is to understand the molecular mechanisms that are involved. The introduction of mutations in specific genes, as well as the introduction of mutations throughout the genome, represents one potential mechanism (Farhat et al. 2013). However, when we previously sequenced clinical multidrug-resistant isolates to identify the mutations most commonly associated with resistance to first-line drugs, no correlation between the mutations and the drug resistance phenotypes was identified (Gonzalez-Escalante, unpublished results).

In addition to the thickness of the cell wall, other intrinsic mechanisms of drug resistance in *M. tuberculosis* involve changes in gene expression. For example, drug resistance has been linked to the expression of putative efflux pump genes (Machado et al. 2012; Liu and Xie 2014) and to regulation of the MtrAB signal transduction system (Nguyen et al. 2010). When analysis of gene expression in *M. tuberculosis* has been conducted with long-term *in vitro* studies, high reproducibility has been reported with controlled experimental conditions (James et al. 2002). However, Gao et al. (2005) reported a variation in expression of genes with important functions among strains grown under identical conditions. Thus, individual analyses of constitutively expressed and regulated genes by other reliable molecular techniques is recommended (Gao et al. 2005).

Knowledge of the complete genome of *M. tuberculosis* could allow a better comprehension of mechanisms of action of antituberculosis drugs through the study of gene expression as a result of drug exposure (Betts et al. 2003; Boshoff et al. 2004; Butcher 2004) as well as an approach to the drug resistance mechanisms acquired by certain strains and possible drug targets (Fu 2006; Jiang et al. 2008). Considering the importance and urgent need of understanding the phenomena of drug resistance, transcriptomes of the H37Rv strain, sensitive to all of the currently used first-line drugs for *M. tuberculosis*, and a multidrug-resistant isolate were compared to identify differences in gene expression (Penuelas-Urquides et al. 2013). Genes involved in the metabolism of macromolecules and other cellular processes were found to be differentially expressed. To determine whether these differences existed among other isolates, and whether they were related to drug resistance, the aim of this study was to evaluate the gene expression profiles of *M. tuberculosis* clinical isolates with different genetic backgrounds and phenotypic drug resistance profiles.

MATERIALS AND METHODS

Isolate selection criteria

Clinical isolates were obtained from the Northeast Biomedical Research Center of the Mexican Social Security Institute. The clinical isolates were selected based on their phenotypic susceptibility profiles to first-line drugs (isoniazid, rifampicin, ethambutol and pyrazinamide), determined with the BACTEC MIGT 960 system (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). These isolates were divided into eight groups with three isolates in each group. All of the isolates selected were previously genotyped by spoligotyping, RFLP-IS6110 (restriction fragment length polymorphism) and MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeats) (Penuelas-Urquides et al. 2014) and this allowed us to select the genotypes most frequently identified in the study area. The susceptible refer-

ence strain, H37Rv, and a multidrug resistant clinical isolate, CIBIN:UMF:15:99, were used as reference.

Culture conditions

Mycobacterium tuberculosis colonies were streaked onto Lowenstein-Jensen slants and were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 2–3 weeks. When typical colonies were observed, suspensions were prepared by taking a loopful of cultures aside into tubes containing 3 mL of sterile water and five to seven glass beads (diameter, 3 mm). The tubes were vortexed at maximum speed for 1 min. After the tubes were allowed to settle for 5 min, 150 µL from each of the suspensions was inoculated into individual tubes containing 3 mL of Middlebrook 7H9 broth (Becton Dickinson) enriched with a 10% OADC (oleic, albumin, dextrose, catalase) supplement (Becton Dickinson). These tubes were incubated at 37°C in 5% CO₂ and were agitated every second day until the cultures reached a turbidity of 1 McFarland unit. These cultures were used as inocula for further experiments.

Growth kinetics of the clinical isolates

Growth kinetics of the *M. tuberculosis* clinical isolates were analysed to identify when the logarithmic growth phases occurred. Briefly, a 150 µL aliquot from each culture grown to 1.0 McFarland unit was inoculated into 3 mL of fresh Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% OADC. Liquid cultures were grown at 37°C in 5% CO₂ for 30 days. Every other day, the cultures were agitated and the turbidities were measured with a PhoenixSpec nephelometer (Becton Dickinson). This assay was performed in triplicate for each clinical isolate in parallel with reference strains.

Total RNA extraction

Total RNA was obtained from liquid cultures of *M. tuberculosis* clinical isolates and strains during log growth phase. Briefly, triplicate cultures of each isolate were combined (9.45 mL) into a 50 mL conical tube and were centrifuged at 2570 × *g* for 20 min at 4°C to obtain a bacterial cell pellet. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 800 µL of TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). TRIzol reagent contains guanidine isothiocyanate. Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. Briefly, each mycobacterial suspension was incubated at room temperature for 20 min and then was transferred to a Fast Prep tube containing B matrix. Then, the tube was agitated with a Fast Prep-24 instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) three times for 20 s, and the tubes were placed on ice for 5 min between agitations. After the tubes were centrifuged at 15 294 × *g* for 3 min at 4°C, each supernatant was transferred to a new tube and 200 µL of chloroform was added. Each sample was mixed by inversion and incubated at room temperature for 3 min. Iso-propanol (500 µL) was then added to each tube. An RNA pellet was recovered by centrifugation at 12 000 × *g* for 10 min at 4°C and was washed with 1 mL of 70% ethanol. After the washed pellet was resuspended in 30 µL of nuclease-free water, total RNA was quantified by spectrophotometry readings at 260 nm and 280 nm. An aliquot of each total RNA sample was also subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide (Promega, Madison, WI, USA) to verify RNA integrity.

Reverse transcription and quantitative real-time PCR

From 1 µg of total RNA, cDNA was obtained using a SuperScript kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The integrity of each cDNA sample was assessed by amplifying the constitutively expressed *rrs* gene. Quantitative real-time PCR was performed using Universal TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), primers, and TaqMan probes for the *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* and *lipF* genes, which have been analysed previously (Penuelas-Urquides et al. 2013). For the quantitative analysis subsequently performed, constitutive expression of the *rrs* gene was used for normalization. Relative quantification was performed according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method described by Livak and Schmittgen (2001). Assays were performed in 96-well plates with technical triplicates, biological duplicates and negative controls.

Statistical analysis

The Kruskal–Wallis *H*-test was used to compare the growth kinetics of the clinical isolates. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare gene expression and phenotypic profile results. A *P*-value less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Mycobacterium tuberculosis clinical isolates that were previously genotyped (Penuelas-Urquides et al. 2014) were grouped according to their phenotypic susceptibility profile to first-line drugs (Table 1). To establish kinetic growth curves and to obtain total RNA in log phase, both the clinical isolates and reference strains were cultivated for 30 days and the growth kinetics were recorded every other day (Fig. 1). The growth kinetics for all of the isolates were similar, including those of the reference strains. Moreover, sustained growth was observed over the 30 day monitoring period for all of the groups. Correspondingly, although the strain 1025 in Group 1 grows at a slower rate, a statistical analysis showed no significant differences among the cultures ($P > 0.05$).

In our previous study, expression of the *esxG*, *esxH*, *infA*, *groES*, *rpmI*, *rpsA* and *lipF* genes was compared between the H37Rv strain and the CIBIN:UMF:15:99 clinical isolate (Penuelas-Urquides et al. 2013). Therefore, we also evaluated the expression of these genes in the clinical isolates obtained for the present study that represented different lineages (Penuelas-Urquides et al. 2014) and exhibited different drug resistance profiles (Table 1). Gene expression was evaluated during the log phase for all of the clinical isolates and reference strains. Differences in gene expression were observed for most of the genes that were evaluated between the isolates, although the statistical analyses performed showed the differences were not significant ($P > 0.05$).

The *esxG* and *esxH* genes exhibited similar expression profiles, with higher levels of expression detected in clinical isolates 986 (Family T1, Group 1), 929 (Family H3, Group 3), 998 (Family X1, Group 4) and 983 (Family H3, Group 6). However, lower levels of *esxG* expression (less than 50% with respect to the H37Rv strain) were observed in the 1007 (Family LAM3, Group 1), 852 (Family T2–T3, Group 2), 813 (Family EAI2–Manilla, Group 2), 803 (Family T1, Group 6), 810 (Family X3, Group 8) and 806 (Family LAM3, Group 8) clinical isolates. Lower levels of *esxH* expression were only observed in clinical isolate 943 (Family LAM9, Group 7).

Table 1. *Mycobacterium tuberculosis* isolates grouped according to their phenotypic drug susceptibility.

Group	Isolate	Family	INH	RIF	EMB	PZA
1*	1025	N/A				
	1007	LAM3	R	R	R	R
	986	T1				
2*	918	T2–T3				
	852	T2–T3	R	R	S	R
	813	EAI2–Manilla				
3*	1068	X1				
	929	H3	R	R	S	S
	840	H1				
4*	1003	H3				
	998	X1	R	S	S	S
	804	LAM3				
5*	1044	X1				
	903	X1	S	S	S	S
	814	X2				
6	983	H3				
	822	S	R	R	S	R
	803	T1				
7	943	LAM9				
	939	X1	R	S	S	S
	867	T2				
8	801	LAM3				
	806	T1	S	S	S	S
	810	X3				
References	H37Rv	H37Rv	S	S	S	S
	CIBIN:UMF:15:99	X1	R	R	R	R

N/A, not assigned; INH, isoniazide; RIF, rifampicin; EMB, ethambutol; PZA, pyrazinamide; R, resistant; S, susceptible. *These groups were also resistant to streptomycin.

Higher levels of *infA* expression were only observed in clinical isolate 929 (Family H3, Group 3), and higher levels of *lipF* expression were observed in clinical isolates 929 and 998. Interestingly, *lipF* expression (less than 50% with respect to the H37Rv strain) was reduced in the majority of the isolates (18/24). In addition, reduced levels of *rpmI* expression (less than 50% with respect to the H37Rv strain) were observed in clinical isolates 1025, 852, 813, 943, 939 and 810 (belonging to Families T2–T3, EAI2–Manilla, LAM9, X1, X3 and not assigned, respectively, and to Groups 1, 2, 7 and 8). Increased levels of *rpmI* expression were not detected in any of the isolates examined.

Higher levels of *groES* expression were observed in clinical isolates 929, 903, 983 and 939, whereas lower expression levels (less than 50% with respect to the H37Rv strain) were observed in clinical isolates 1025, 1068, 1044, 943 and 810. Similarly, higher levels of *rpsA* expression were detected in clinical isolates 998 and 983, and lower levels of expression were observed in clinical isolates 1025, 1044, 943, 867 and 810.

One-way ANOVA was performed to compare gene expression among the groups. Isolates that were grouped based on their sensitivity versus resistance to the drugs tested were compared, while the MDR isolates were compared with the non-MDR isolates. In all of the comparisons, no significant differences were observed (Fig. 2).

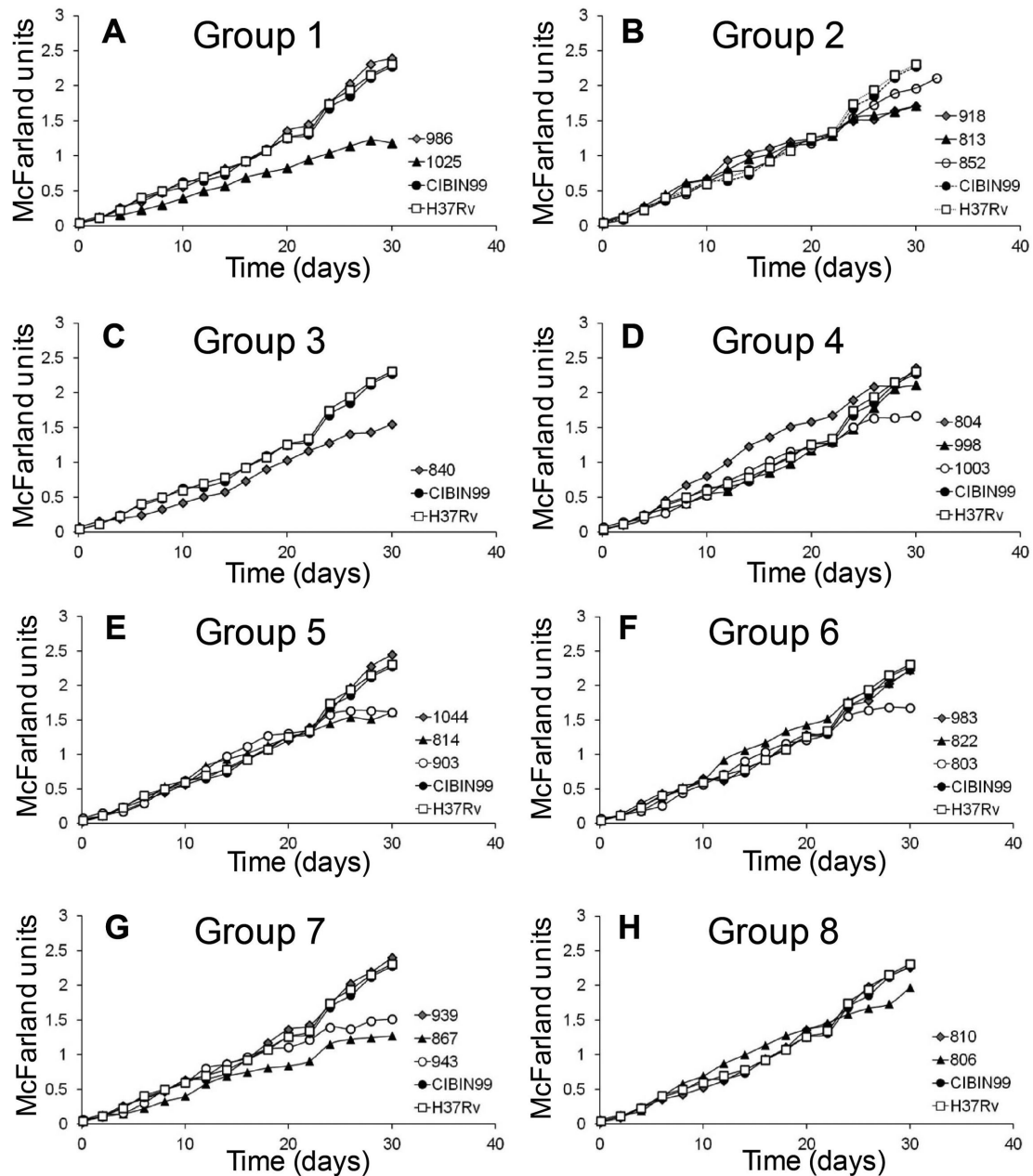


Figure 1. Growth curves of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates grouped by phenotypic drug resistance profile. Growth kinetics were recorded every two days during 30 days. Clinical isolates were grouped as shown in Table 1. The reference strains H37Rv and CIBIN:UMF:15:99 were included in each analysis.

DISCUSSION

When *M. tuberculosis* is exposed to a host environment, its carbon flux is redirected and its replication and metabolic rate is slowed (Baek, Li and Sasseti 2011). This slow replication rate may contribute to the intracellular survival of this pathogen and its drug resistance (Helguera-Repetto et al. 2014). In the present study, there were no significant differences in the *in vitro* growth kinetics that were determined for the *M. tuberculosis* clinical isolates examined, including the drug-resistant isolates and the susceptible H37Rv strain.

Similarly, Gagneux et al. (2006) previously demonstrated that *M. tuberculosis* can develop drug resistance without a fitness cost (Gagneux et al. 2006). However, Bhattar et al. (2012) found dif-

ferences in the growth rates of drug-resistant versus susceptible strains of *M. tuberculosis*, and these differences may have been lineage specific (Bhattar et al. 2012). Drug resistance and altered growth rates have been associated with gene mutations. For example, rifampicin-resistant strains with mutations in *rpoB* were found to grow slower than susceptible wild-type strains in competitive growth assays (Mariam et al. 2004). However, in the present study, all of the rifampicin-resistant clinical isolates with mutations in *rpoB* (González-Escalante et al., unpublished results) displayed growth kinetics that were similar to those of the susceptible strain. It is possible that differences in the experimental conditions and growth media between these studies account for the contradictory findings.

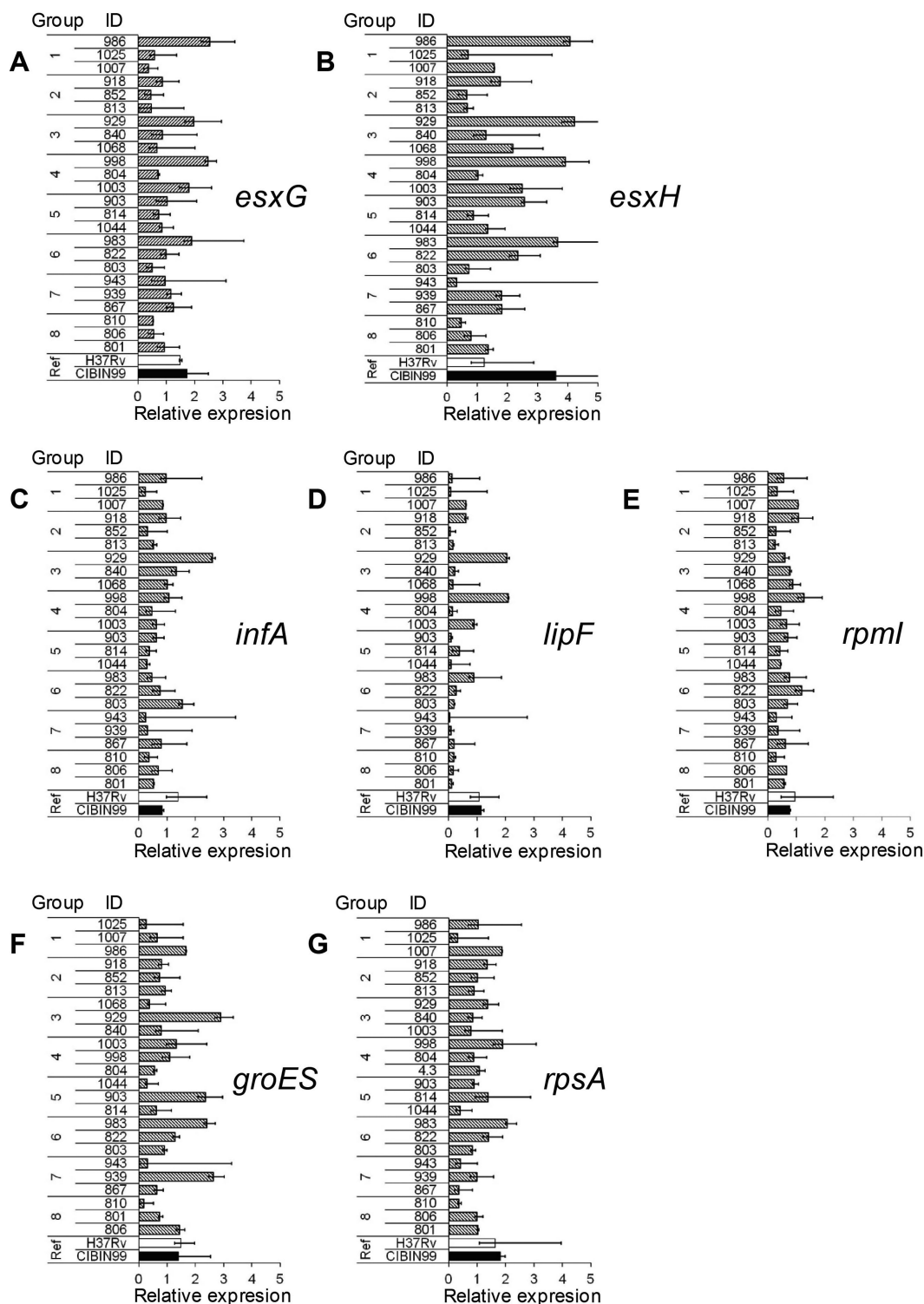


Figure 2. Expression analysis of *esxG*, *esxH*, *infA*, *lipF*, *rpmI*, *groES* and *rpsA* genes in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates grouped by different phenotypic drug resistance profile. The panels show the relative expression for each gene performed by RT-qPCR. Groups and isolate ID are indicated at the left of each graph. Data depicted show relative gene expression normalized with *rrs* expression (calibrator).

The pathogenic success of *M. tuberculosis* is attributed to its ability to switch to complex transcriptional programs in response to environmental stimuli, such as intracellular infection, starvation, stress and exposure to anti-tuberculosis drugs, as demonstrated by transcriptome analyses (Kendall et al. 2004).

This dynamic gene expression program allows *M. tuberculosis* to survive by adjusting to new metabolic requirements (Butcher 2004; Fu 2006; Waddell and Butcher 2007; Fontan et al. 2008; Wei et al. 2013). Transcriptional regulation in *M. tuberculosis* involves approximately 200 transcription factors (Peterson et al.

2014), including DNA binding proteins, RNA-degradation machinery (Rustad et al. 2014) and other non-DNA binding factors that interact with sigma subunits to repress or activate transcription (Hu et al. 2014). Moreover, the expression of a number of genes in *M. tuberculosis* is affected by methylation (Shell et al. 2013). Analysing the expression of genes and differential expression patterns in a variety of individual *M. tuberculosis* strains, greater insights into this complex system can be obtained.

In vitro studies of *M. tuberculosis* have shown that drug resistance increases during the stationary growth phase (Tudo et al. 2010). Because gene expression in *M. tuberculosis* depends on both the growth phase and growth conditions (Gao et al. 2005), total RNA was extracted from log phase cells to avoid differential gene expression that would be altered as a result of metabolic adaptation to a non-replicating growth phase. Furthermore, the genes that we chose to evaluate were previously found to be differentially expressed in the transcriptomes of the susceptible H37Rv strain and a multidrug resistant clinical isolate (Penuelas-Urquides et al. 2013). Consequently, we hypothesized that these genes may be involved in drug resistance.

Under the same controlled growth conditions, high variability in the expression of the genes evaluated was observed. Variability in the expression of the *esxG*, *esxH*, *infA*, *rpmI*, *rpsA* and *groES* genes among the *M. tuberculosis* clinical isolates, including the biological replicates, revealed that *M. tuberculosis* gene expression is highly sensitive. However, the unique genetic background of each isolate may also be a factor (Table 1). These results highlight the need for gene expression to be evaluated among individual strains, as previously proposed by Gao et al. (2005).

Our results show that *esxG* and *esxH* have similar expression patterns evidencing that they are co-regulated; this is because they are co-transcribed as part of the same operon (Roback et al. 2007). *lipF* has been found to affect cell wall composition, and its expression may enhance the resistance of mycobacteria to acid stress and improve their survival *in vivo*. In the present study, the isolates that expressed low levels of *lipF* grew well *in vitro* (Richter and Saviola 2009). *RpsA* has been identified as a target of pyrazinoic acid, which is the active form of the first-line drug pyrazinamide (PZA) (Jureen et al. 2008). It has been hypothesized that PZA resistance is caused by mutations in *rpsA*, or by overexpression of the *RpsA* protein (Shi et al. 2011). However, in the present study, no correlation between *rpsA* expression and phenotypic resistance to the first-line drugs examined was observed. Relative gene expression was also analysed by normalizing the gene expression levels with the levels of *rrs* expression. This method has been used in other studies, and in multiple *M. tuberculosis* strains, *rrs* expression has been found to be relatively stable (Lam et al. 2008; Penuelas-Urquides et al. 2013). However, *rrs* may be subject to regulation, although there is no evidence to indicate that *rrs* expression is involved in drug resistance mechanisms.

Studies of gene expression in *M. tuberculosis* are important for gaining a better understanding of how *M. tuberculosis* adapts to adverse conditions, such as exposure to anti-tuberculosis drugs. However, the complex transcriptional regulation and wide diversity of lineages that characterize *M. tuberculosis* make it difficult to use gene expression as a molecular signature for drug resistance. Therefore, we recommend that the expression of *M. tuberculosis* genes should be analysed individually, and baseline expression levels should be verified among several different clinical isolates, before proposing any further applications of the findings.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are in debt with Mrs Ana María Garza Sánchez for her secretarial assistance. The technical assistance of M. V. Z. Patricia Flores Montiel, from Laboratorio Central Regional del Norte, S. A. de C. V., is gratefully acknowledged. We thank Lic. Paola Álvarez Cabello for her accounting assistance.

FUNDING

This work was supported by Instituto Mexicano del Seguro Social (grant number FIS/IMSS/PROT/G12/1108) for M.B.L. L.G.E. was supported by CONACyT (graduate fellowship no. 226992) and by Instituto Mexicano del Seguro Social (fellowship no. 2010-184).

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Baek SH, Li AH, Sasseti CM. Metabolic regulation of mycobacterial growth and antibiotic sensitivity. *PLoS Biol* 2011;9:e1001065.
- Betts JC, McLaren A, Lennon MG, et al. Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thioamycin-, and triclosan-treated *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2903-13.
- Bhatter P, Chatterjee A, D'Souza D, et al. Estimating fitness by competition assays between drug susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* of predominant lineages in Mumbai, India. *PLoS one* 2012;7:e33507.
- Boshoff HI, Myers TG, Copp BR, et al. The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *J Biol Chem* 2004;279:40174-84.
- Butcher PD. Microarrays for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2004;84:131-7.
- Farhat MR, Shapiro BJ, Kieser KJ, et al. Genomic analysis identifies targets of convergent positive selection in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Genet* 2013;45:1183-9.
- Fontan P, Aris V, Ghanny S, et al. Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection. *Infect Immun* 2008;76:717-25.
- Fu LM. Exploring drug action on *Mycobacterium tuberculosis* using affymetrix oligonucleotide genechips. *Tuberculosis* 2006;86:134-43.
- Gagneux S, Long CD, Small PM, et al. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2006;312:1944-6.
- Gao Q, Kripke KE, Saldanha AJ, et al. Gene expression diversity among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Microbiology* 2005;151:5-14.
- Helguera-Repetto AC, Chacon-Salinas R, Cerna-Cortes JF, et al. Differential macrophage response to slow- and fast-growing pathogenic mycobacteria. *BioMed Res Int* 2014;2014:916521.
- Hu Y, Morichaud Z, Perumal AS, et al. *Mycobacterium RbpA* cooperates with the stress-response sigmaB subunit of RNA polymerase in promoter DNA unwinding. *Nucleic Acids Res* 2014;42:10399-408.
- James BW, Bacon J, Hampshire T, et al. *In vitro* gene expression dissected: chemostat surgery for *Mycobacterium tuberculosis*. *Comp Funct Genomics* 2002;3:345-7.
- Jiang X, Zhang W, Zhang Y, et al. Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium*

- tuberculosis by real-time reverse transcription PCR. *Microb Drug Resist* 2008;**14**:7–11.
- Jureen P, Werngren J, Toro JC, et al. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemoth* 2008;**52**:1852–4.
- Kendall SL, Rison SC, Movahedzadeh F, et al. What do microarrays really tell us about *M. tuberculosis*? *Trends Microbiol* 2004;**12**:537–44.
- Lam TH, Yuen KY, Ho PL, et al. Differential *fadE28* expression associated with phenotypic virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Pathogenesis* 2008;**45**:12–7.
- Liu H, Xie J. Comparative genomics of *Mycobacterium tuberculosis* drug efflux pumps and their transcriptional regulators. *Crit Rev Eukar Gene* 2014;**24**:163–80.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method. *Methods* 2001;**25**:402–8.
- Machado D, Couto I, Perdigao J, et al. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS one* 2012;**7**:e34538.
- Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, et al. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemoth* 2004;**48**:1289–94.
- Nguyen HT, Wolff KA, Cartabuke RH, et al. A lipoprotein modulates activity of the MtrAB two-component system to provide intrinsic multidrug resistance, cytokinetic control and cell wall homeostasis in *Mycobacterium*. *Mol Microbiol* 2010;**76**:348–64.
- Penuelas-Urquides K, Gonzalez-Escalante L, Villarreal-Trevino L, et al. Comparison of gene expression profiles between pansensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Microbiol* 2013;**67**:362–71.
- Penuelas-Urquides K, Martinez-Rodriguez HG, Enciso-Moreno JA, et al. Correlations between major risk factors and closely related *Mycobacterium tuberculosis* isolates grouped by three current genotyping procedures: a population-based study in northeast Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2014;**109**:814–9.
- Peterson EJ, Reiss DJ, Turkarslan S, et al. A high-resolution network model for global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:11291–303.
- Richter L, Saviola B. The *lipF* promoter of *Mycobacterium tuberculosis* is upregulated specifically by acidic pH but not by other stress conditions. *Microbiol Res* 2009;**164**:228–32.
- Roback P, Beard J, Baumann D, et al. A predicted operon map for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res* 2007;**35**:5085–95.
- Rustad TR, Minch KJ, Ma S, et al. Mapping and manipulating the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptome using a transcription factor overexpression-derived regulatory network. *Genome Biol* 2014;**15**:502.
- Shell SS, Prestwich EG, Baek SH, et al. DNA methylation impacts gene expression and ensures hypoxic survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens* 2013;**9**:e1003419.
- Shi W, Zhang X, Jiang X, et al. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2011;**333**:1630–2.
- Tudo G, Laing K, Mitchison DA, et al. Examining the basis of isoniazid tolerance in nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* using transcriptional profiling. *Future Med Chem* 2010;**2**:1371–83.
- Waddell SJ, Butcher PD. Microarray analysis of whole genome expression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Mol Med* 2007;**7**:287–96.
- Wei J, Guo N, Liang J, et al. DNA microarray gene expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* when exposed to osthole. *Pol J Microbiol* 2013;**62**:23–30.
- WHO. *Global Tuberculosis Report 2014*. Geneva: World Health Organization, 2014.

**Manuscrito enviado a publicación a la
Brazilian Journal of Infectious Diseases**

Submission Confirmation

ees.bjid.0.37333f.de96c247@eesmail.elsevier.com en nombre de Brazilian Journal of Infectious Diseases [...]

Para: [Mario Abelardo Bermudez De Leon](#)

martes, 09 de febrero de 2016 01:04 p.m.

Dear Dr. Mario Bermúdez de León,

We have received your article "Discordance between phenotypic drug-resistance profiles and mutations associated with drug resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Northeastern Mexico" for consideration for publication in Brazilian Journal of Infectious Diseases.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/bjid/>
2. Enter these login details:
Your username is: distro71

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Brazilian Journal of Infectious Diseases

Manuscript Number: BJID-D-16-00106

Title: Discordance between phenotypic drug-resistance profiles and mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northeastern Mexico

Article Type: Original

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; mutations; drug resistance; clinical isolates; first-line drugs; tuberculosis

Corresponding Author: Dr. Mario Bermúdez de León,

Corresponding Author's Institution: Instituto Mexicano del Seguro Social, Department of Molecular Biology

First Author: Laura González-Escalante

Order of Authors: Laura González-Escalante; Katia Peñuelas-Urquides; Beatriz Silva-Ramírez; Salvador Said-Fernández; Alberto Morales-Loredo ; José Antonio Enciso-Moreno; Mario Bermúdez de León

Abstract: Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) has emerged as a worldwide health problem. Drug sensitivity tests (DSTs) are considered the gold standard to determine resistance; however, these methods are time consuming, delaying accurate identification of drug-resistant MTB strains. Mutation analyses have been conducted to intent to determine faster the MTB resistance profile. The goal of this study was to correlate the phenotypic profiles of eight groups of MTB clinical isolates, from different lineages, with mutations in genes associated with first-line drug resistance. DSTs were performed using liquid cultures and microdilution assays. Sequencing of the *katG*, *rpoB*, *embB*, and *pncA* genes and the *inhA* regulatory region was carried out using high-fidelity enzymes. The majority (58%) of isoniazid-resistant isolates showed a mutation at codon 315 of the *katG* gene, and 10% showed a mutation on the *inhA* promoter. All rifampicin-resistant isolates harbored a mutation on codons 526 and 531 of the *rpoB* gene and 75% of ethambutol-resistant isolates had a mutation on codon 306 of the *embB* gene. Only thirty percent of pyrazinamide-resistant isolates had mutations on the *pncA* gene. These data show that mutations in clinical isolates, epidemiologically related, in Northeastern Mexico do not necessarily predict the phenotypic drug resistance profile

Suggested Reviewers: Erick Swensson
esn@ssi.dk

Nicola Zetola
nzetola@gmail.com

Antonios Maniatis
anm@otenet.gr

Marcelo Miyata

marcelo.miyatabr@yahoo.com.br

February 8th, 2015

Carlos Brites, MD, PhD,
Editor in Chief

Dear Dr. Brites,

The purpose of this letter is to put into your consideration the manuscript entitled **Discordance between phenotypic drug-resistance profiles and mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northeastern Mexico** by González-Escalante and others to be published as a research article in your prestigious journal.

Our study presents data about the lack of correlation in genes associated with drug-resistance in *M. tuberculosis*, except to that for rifampicin, with the phenotype shown in clinical isolates. This information could have strong implications in the development and use of rapid molecular assays, which identify mutations in genes evaluated in our study, to predict drug-resistance.

The manuscript has been reviewed and approved by all co-authors. The work here presented has not been previously published and is not under consideration for publication elsewhere in any language.

We hope our manuscript reaches your standards to be published in the Brazilian Journal of Infectious Diseases.

Sincerely,

Dr. Mario Bermúdez de León
Corresponding author

Discordance between phenotypic drug-resistance profiles and mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northeastern Mexico

Laura González-Escalante,^a Katia Peñuelas-Urquides,^b Beatriz Silva-Ramírez,^c Salvador Said-Fernández,^d Alberto Morales-Loredo,^e José Antonio Enciso-Moreno,^f Mario Bermúdez de León,^{b#}

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

^bDepartamento de Biología Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México.

^cDepartamento de Inmunogenética, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México.

^dUniversidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Medicina, Monterrey, Nuevo León, México.

^eUniversidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Centro de Desarrollo de Agronegocios, General Escobedo, Nuevo León, México.

^fUnidad de Investigación Médica de Zacatecas, Instituto Mexicano del Seguro Social, Zacatecas, Zacatecas, México.

Running title: Discordance of phenotype and mutations of *M. tuberculosis*

Address correspondence to Dr. Mario Bermúdez de León, mario.bermudez@imss.gob.mx

Calle 2 de abril 501, esq. San Luis Potosí, Col. Independencia, C.P. 64720, Monterrey, Nuevo León, México Phone and Fax: +(81)8190-4035.

1
2
3
4 **Discordance between phenotypic drug-resistance profiles and mutations associated**
5
6 **with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Northeastern**
7
8 **Mexico**
9

10
11 Laura González-Escalante,^a Katia Peñuelas-Urquides,^b Beatriz Silva-Ramírez,^c Salvador
12
13 Said-Fernández,^d Alberto Morales-Loredo,^e José Antonio Enciso-Moreno,^f Mario
14
15 Bermúdez de León,^{b#}
16
17

18
19 ^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, San
20
21 Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
22

23
24 ^bDepartamento de Biología Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste,
25
26 Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México.
27

28
29 ^cDepartamento de Inmunogenética, Centro de Investigación Biomédica del Noreste,
30
31 Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México.
32

33
34 ^dUniversidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Medicina, Monterrey, Nuevo
35
36 León, México.
37

38
39 ^eUniversidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Centro de Desarrollo de Agronegocios,
40
41 General Escobedo, Nuevo León, México.
42

43
44 ^fUnidad de Investigación Médica de Zacatecas, Instituto Mexicano del Seguro Social,
45
46 Zacatecas, Zacatecas, México.
47

48
49
50 Running title: Discordance of phenotype and mutations of *M. tuberculosis*
51
52

53
54
55 # Address correspondence to Dr. Mario Bermúdez de León, mario.bermudez@imss.gob.mx
56
57
58 Calle 2 de abril 501, esq. San Luis Potosí, Col. Independencia, C.P. 64720, Monterrey,
59
60 Nuevo León, México Phone and Fax: +(81)8190-4035.
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **Abstract**

2 Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) has emerged as a worldwide health
3 problem. Drug sensitivity tests (DSTs) are considered the gold standard to determine
4 resistance; however, these methods are time consuming, delaying accurate identification of
5 drug-resistant MTB strains. Mutation analyses have been conducted to intent to determine
6 faster the MTB resistance profile. The goal of this study was to correlate the phenotypic
7 profiles of eight groups of MTB clinical isolates, from different lineages, with mutations in
8 genes associated with first-line drug resistance. DSTs were performed using liquid cultures
9 and microdilution assays. Sequencing of the *katG*, *rpoB*, *embB*, and *pncA* genes and the
10 *inhA* regulatory region was carried out using high-fidelity enzymes. The majority (58%) of
11 isoniazid-resistant isolates showed a mutation at codon 315 of the *katG* gene, and 10%
12 showed a mutation on the *inhA* promoter. All rifampicin-resistant isolates harbored a
13 mutation on codons 526 and 531 of the *rpoB* gene and 75% of ethambutol-resistant isolates
14 had a mutation on codon 306 of the *embB* gene. Only thirty percent of pyrazinamide-
15 resistant isolates had mutations on the *pncA* gene. These data show that mutations in
16 clinical isolates, epidemiologically related, in Northeastern Mexico do not necessarily
17 predict the phenotypic drug resistance profile.

18
19 **Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; mutations; drug resistance; clinical isolates; first-
20 line drugs; tuberculosis.

21

22 Introduction

23 Tuberculosis (TB) remains a worldwide health concern. In 2013, the World Health
24 Organization reported 9 million new cases of TB, and mortality reached about 1.5 million
25 per year (1) . In Mexico, 16,080 cases of pulmonary TB were reported in 2013, of which
26 1,060 cases were located in the northeastern state of Nuevo León (2). Traditional TB
27 treatment consists of the first-line drugs ethambutol, pyrazinamide, isoniazid, and
28 rifampicin (3). A main problem in the treatment and control of TB is the resistance of
29 *Mycobacterium tuberculosis* to anti-TB drugs. The mechanisms by which mycobacteria
30 acquire resistance are not completely understood and enhanced by inappropriate treatment
31 schemes and poor compliance (4). *M. tuberculosis* strains that develop resistance at least to
32 isoniazid and rifampicin are classified as multidrug resistant (MDR) (5). According to the
33 WHO, less than 5% of the estimated global burden of MDR *M. tuberculosis* has been
34 detected (6). Prompt detection of drug-resistant strains is crucial for the prescription of
35 efficacious TB treatments.

36 Drug resistance can be the result of mutations accumulated along the genome. Punctual
37 mutations in some genes are of particular interest due to their roles in drugs' mechanisms of
38 action (7-9). For example, mutations on the *katG* gene, which codifies a catalase-
39 peroxidase (10), and the *inhA* gene (11), which codifies a protein involved in fatty acid
40 synthesis, can induce resistance to isoniazid. Rifampicin binds to the β subunit of RNA
41 polymerase, encoded by the *rpoB* gene; mutations in the 81-bp short region of *rpoB* are
42 strongly associated with resistance to rifampicin (12). Ethambutol interferes with
43 biosynthesis of the mycobacterial cell wall, and mutations in the *embB* gene have been
44 found in ethambutol-resistant isolates (13, 14). Pyrazinamide is a prodrug that is activated
45 by the mycobacterial enzyme pyrazinamidase encoded in the *pncA* gene. Mutations on the

1
2
3
4 46 *pncA* gene have been related to pyrazinamide resistance (15). However, to establish new
5
6 47 diagnostic tools based on mutation analysis, significant correlations between mutations and
7
8 48 drug resistance in *M. tuberculosis* clinical isolates must be verified. Recent studies carried
9
10 49 out in Mexico have identified clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with
11
12 50 mutations in *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *embB* or *pncA* genes (16, 17). Here, we aimed to
13
14 51 sequence the genes or regulatory region associated with first-line drug resistance in order to
15
16 52 identify mutations and define their correlations with phenotypic drug resistance of *M.*
17
18 53 *tuberculosis* clinical isolates representatives of the most common families identified in
19
20 54 Northeastern Mexico.
21
22
23
24
25
26
27
28

29 56 **Material and methods**

30 57 *Strain selection criteria and culture conditions*

31 58 Twenty four clinical isolates of *M. tuberculosis* from Northeastern Mexico, deposited and
32
33 59 maintained at the Centro de Investigación Biomédica del Noreste repository of the Mexican
34
35 60 Social Security Institute, were used in this study. All of the selected isolates were
36
37 61 previously genotyped by spoligotyping, RFLP-IS6110 (Restriction Fragment length
38
39 62 Polymorphism) and MIRUVNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable
40
41 63 Number Tandem Repeats) (18) and this allowed to select the isolates most frequently
42
43 64 identified in Northeastern Mexico. For controls, we included the *M. tuberculosis* H37Rv
44
45 65 strain and the CIBIN:UMF:15:99 MDR clinical isolate (19). The drug susceptibility of each
46
47 66 isolate was tested at least twice using the BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson,
48
49 67 Sparks, MD, USA) and Resazurin microtiter assays (REMA) (20). Bacterial isolates were
50
51 68 selected and grouped according to drug sensitivity by BACTEC MGIT 960 including when
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 69 possible isolates with a different phylogenetic background. The control strains and isolates
5
6 70 were cultured in Lowenstein-Jensen slants at 37° C with 5% CO₂ for 3 – 4 weeks.
7
8

9
10 71
11 72 ***Genomic DNA isolation***

12 73 Genomic mycobacterial DNA was isolated from cultures grown without antibiotic selection
13
14 74 using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (21) . The purity and
15
16 75 concentration of DNA were estimated using a spectrophotometer (Nanodrop; Thermo
17
18 76 Scientific, Wilmington, DE, USA) at a wavelength of 260/280 nm. DNA integrity was
19
20 77 assessed by electrophoresis in 1% agarose gels stained with ethidium bromide (Invitrogen).
21
22

23 78 ***PCR assays and DNA sequencing***

24
25
26 79 Five genes [*katG*, *inhA* (promoter), *embB*, *rpoB*, and *pncA*] were selected for mutation
27
28 80 analyses. Genomic DNA from clinical isolates was used as the template in polymerase
29
30 81 chain reaction (PCR) assays conducted with high-fidelity DNA polymerase (Phusion[®];
31
32 82 Finnzymes, Espoo, Finland or *Pfu* Ultra[®]; Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the
33
34 83 manufacturer's instructions. Each PCR reaction mixture had a final volume of 25 µL and
35
36 84 contained an enzyme-specific buffer, 0.2 mM each dNTP, 0.625 U enzyme, 125 ng each
37
38 85 specific primer, and 60 ng genomic DNA. Previously described primer sequences and
39
40 86 annealing temperatures were used with some modifications (Table 1). PCR products were
41
42 87 visualized by 1% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining to confirm
43
44 88 amplicon size (Table 1). PCR products were purified using GeneClean (MP Biomedicals,
45
46 89 Solon, OH, USA) or Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega, San Luis
47
48 90 Obispo, CA, USA). For sequencing, PCR products were labeled using the BigDye[®]
49
50 91 Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
51
52 92 according to the manufacturer's instructions. Briefly, 100 ng forward or reverse primer, 4
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

93 μL BigDye terminator reagent, 4 μL BigDye buffer, and nuclease-free water were mixed
94 (20-μL final volume) and set up in a Veriti[®] thermocycler (Applied Biosystems) at 94°C
95 for 5 min, followed by 34 cycles of 94°C for 30 s, 50°C for 15 s and 60°C for 4 min. The
96 labeled products were precipitated with absolute ethanol, 0.125 M EDTA, and 3 M sodium
97 acetate, and washed twice with 70% ethanol. Pellets were resuspended in 10 μL formamide
98 and incubated at 95°C for 2 min and wet ice for 5 min before automatic sequencing in a
99 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems). Data were displayed using Data Collection
100 software (ver. 3.0; Applied Biosystems). To identify mutations in genes, SeqScape software
101 (ver. 2.5; Applied Biosystems) was used to compare fragments with the H37Rv genomic
102 sequence (accession number NC_000962.2). Isolates showing no clearly defined mutation
103 site were sequenced at least twice.

104 ***Statistical analysis***

105 The kappa coefficient was used to statistically compare results from the drug resistance
106 assays determined by either BACTEC MGIT 960 or REMA. For association analysis
107 among mutated or wild-type genes, we performed crosstab and Fisher’s exact test, and
108 significant differences were defined at $P < 0.05$.

111 **Results**

112 Although clinical isolates were selected based on drug susceptibility profiles according to
113 BACTEC MGIT 960, the prior genotyping by IS6110-RFLP, MIRU-VNTR and
114 spoligotyping allowed us to select representatives isolates that had different phylogenetic
115 background and were representative of Northeastern Mexico (18). Eight groups (each with
116 three clinical isolates) with different drug susceptibility patterns were obtained (Table 2).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

117 Samples in group 1 and the CIBIN:UMF:15:99 clinical isolate were resistant to all drugs
118 evaluated, whereas samples in group 8 and the H37Rv strain were susceptible to all drugs.
119 Each of the remaining groups showed resistance to at least one drug (Table 2).
120 To establish the minimum inhibitory concentration (MIC) for isoniazid, rifampicin, and
121 ethambutol in all resistant isolates, we performed the REMA method (Supplementary Fig.
122 1S). The REMA results were compared with the BACTEC MGIT 960 profiles and kappa
123 statistics were calculated (Table 3). The correlations between BACTEC MGIT 960 and
124 REMA results for isoniazid and ethambutol resistance were moderate ($\kappa = 0.58$ and $\kappa =$
125 0.41 , respectively), whereas the correlation for rifampicin resistance was low ($\kappa = 0.33$). To
126 evaluate whether mutations in specific genes are responsible for the drug resistance patterns
127 observed in clinical isolates, we sequenced four genes and one regulatory region (Table 4)
128 that are the primary genomic regions reported to be associated with drug resistance. In
129 these sequences we looked for previously identified mutations that confer resistance to
130 first-line drugs, and in addition we observed several synonymous mutations along
131 sequenced regions in some clinical isolates (data not shown).
132 We screened the *katG* gene and the promoter region of the *inhA* gene, both of which are
133 related to isoniazid resistance. Mutations in codon 315 (Ser→Thr/Asn) of the *katG* gene
134 were found in 11 of 19 (58%) isoniazid-resistant clinical isolates. Mutations were also
135 present in positions -15 (C→T) and -8 (T→G) of the *inhA* promoter in another 2 of 19
136 (10.5%) isoniazid-resistant isolates. Sequencing of the hotspot region (81 bp) of the *rpoB*
137 gene, which is involved in rifampicin resistance, revealed mutations in codons 526 and 531
138 of *rpoB* gene in 100% of 13 clinical isolates with rifampicin resistance. Three of four (75%)
139 clinical isolates with ethambutol resistance were associated with a mutation in *embB* gene,
140 namely in codon 306 (Met→Ile) of this gene. We found three mutations at positions 46,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

141 135, and 146 (A insertion, Thr→Ala, and Ala→Val, respectively) by analyzing the
142 complete *pncA* gene, which encodes the pyrazinamidase enzyme, in 3 of 10 (30%) clinical
143 isolates with pyrazinamide resistance (Table 4).

144 The susceptibility profiles of the clinical isolates evaluated and the mutations found in the
145 *katG*, *rpoB*, *embB*, and *pncA* genes and the *inhA* promoter are shown in Table 5. Some
146 clinical isolates with drug resistance (*i.e.*, isolates 804, 939, and 943) showed no mutation
147 in any gene analyzed. Other isolates showed mutations associated to drug resistant
148 according to their phenotypic resistance, but some of these showed drug resistance without
149 mutation at known sites (*i.e.*, isolates 986, 1025, 813, 918, 1068, 804, 803, 822, 939, and
150 943). Three of 22 (14%) samples (isolates 1003, 822, and 983) harbored the mutation on
151 the *embB* gene that confers resistance, but were susceptible to ethambutol. Two of 16
152 (12.5%) clinical isolates (isolates 903 and 810) were pyrazinamide sensitive and had
153 mutations on the *pncA* gene. Surprisingly, the MDR clinical isolate CIBIN:UMF:15:99
154 showed no mutation in the complete sequence of the *pncA* gene, although it is
155 pyrazinamide resistant. Although some mutations were found on the *pncA* gene, most were
156 synonymous and did not alter the amino acid sequence (data not shown).

157 Some clinical isolates, considered epidemiologically related by a previous characterization,
158 had different phenotypic susceptibility to first-line drugs (*i.e.*, isolates 986 and 806, 929 and
159 1003, 998 and 903). Even when the isolates of the same cluster shared the same
160 susceptibility profile, the presence of mutations was not similar between them (*i. e.*, isolates
161 852 and 918). These results evidence that the grouping of i) clinical isolates with similar
162 phylogenetic background (18) and ii) identical drug resistance profile are not associated to
163 mutations found in samples from Northeastern Mexico.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

164 In order to test whether mutations in drug resistance genes occur concomitantly we carried
165 out a crosstab and a Fisher's exact test, as an association index (Fig. 1). We found that
166 mutations in the *katG* and *rpoB* genes are associated (Fisher's statistic value, $P < 0.05$).
167 However, in this study, the rest of the mutated genes did not show significant associations
168 among them. Isoniazid-resistant clinical isolates carried mutations in the *katG* or *inhA* gene
169 promoter, but did not carry both of these mutations simultaneously.

171 Discussion

172 There are several well-accepted methods to establish drug resistance profile in *M.*
173 *tuberculosis* clinical isolates. In this study we choose the most used as BACTEC MGIT 960
174 system and the REMA method. When comparing these two methods, the kappa statistics
175 showed only a moderate to low correlation for isoniazid, ethambutol, and rifampicin
176 resistance. This discrepancy in reproducibility between the DST and REMA methods has
177 been reported in other studies (22), and may be the result of differences in volume or
178 incubation time (23). As a result of the high variability and lack of reproducibility in the
179 REMA method we selected the BACTEC MGIT 960 system as reference, which has
180 excellent levels of sensitivity and specificity when compared to other methods (24),
181 The mutations evaluated in this study have been described in isolates from many regions of
182 the world, and suggests that drug resistance in *M. tuberculosis* is acquired vertically as a
183 result of evolutionary pressure in contrast to other pathogenic bacteria (25). It has been
184 reported that codon 315 of *katG* gene and the position -15 in *inhA* promoter can detect
185 isoniazid resistance in the majority of resistant isolates (26). The low degree of correlation
186 between isoniazid resistance and mutations in the *katG* gene observed in this study stand in
187 contrast to the 92.3% association reported by Abdelaal *et al.* (2009) (27), but they are closer

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

188 (83%) to a recent study carried out in Mexico (16); however, we have noted variability in
189 such percentiles among studies (27-29).
190 The low incidence (10%) of mutations in the *inhA* promoter in our samples is in agreement
191 with several previous reports (28-30). These mutations have not been reported previously in
192 isoniazid-sensitive *M. tuberculosis* strains, and they demonstrate the ability to confer drug
193 resistance. Remarkably, we did not find simultaneous mutations in the *katG* gene and *inhA*
194 promoter in the same clinical isolates, which has been reported by Hazbon *et al.* (31).
195 Although some rifampicin resistant clinical isolates in the Mexican population do not have
196 *rpoB* gene mutations (17), all clinical isolates examined in this study had a mutation on
197 codons 526 and 531, which are located in the 81 base pair hotspot region of the *rpoB* gene.
198 This consistent association has led to the development of several rapid diagnostic kits that
199 can predict the rifampicin resistance of *M. tuberculosis* clinical isolates based on a
200 screening for mutations in this hotspot region (for example, the Xpert MTB/RIF test) (32).
201 Some studies have highlighted the high genetic variability of *M. tuberculosis* clinical
202 isolates from Mexico, and they suggest that use of molecular tests should be preceded by a
203 careful characterization of the most frequent mutations found in the area (33).
204 Four of 26 *M. tuberculosis* strains were ethambutol resistant, but only three harbored the
205 mutation on codon 306 of the *embB* gene. By contrast, three ethambutol-susceptible clinical
206 isolates showed the mutation in codon Met306Ile. This mutation has been associated with a
207 lower ethambutol minimum inhibitory concentration lower than reported for Met306Val or
208 Met306Leu (20 vs. 40 µg/mL) (8). Considering our results and previous descriptions of
209 *embB* gene mutations in ethambutol-sensitive strains of *M. tuberculosis* (34), as well as a
210 low association rate in ethambutol-resistant isolates (13), we recommend that this indicator
211 be considered with caution. The Met306Ile mutation in *embB* gene has previously been

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

212 related to isoniazid and rifampicin resistance (31, 35), and we identified six isoniazid-
213 resistant isolates with a mutation on codon 306. A mutation on embB306 could result in *M.*
214 *tuberculosis* strains that have different a cell wall permeability, which changes their
215 susceptibility to other drugs (36-38).

216 The nucleotide sequence for the *pncA* gene is highly variable, and multiple single-
217 nucleotide polymorphisms and mutations have been reported for this gene (15, 39-44).
218 Some mutations in the *pncA* gene are specific of geographical regions; for example, an
219 insertion in position 147, which has a concordance with rifampicin and isoniazid resistance,
220 has been reported in Mexico (45). Many of the other nucleotide changes in *pncA* gene are
221 related to pyrazinamide resistance, and some authors have reported association rates of
222 75% to 97% (39, 44). In the present study, we found pyrazinamide resistance associated
223 with mutations on the *pncA* gene in only 30% of strains analyzed. The occurrence of these
224 mutations corresponds to amino acids found in the L2 domain of the active site of the
225 enzyme (46) and neighboring sequences.

226 Some mutations in *M. tuberculosis* are more likely to appear together. The finding that
227 some drug-resistant clinical isolates did not contain characteristic mutations in genes that
228 have been associated with drug resistance suggests the presence of unknown genome
229 mutations in these drug-resistant strains, as well as in other genes or regulatory sequences.
230 Peñuelas-Urquides *et al.* (2013) found the different genes were expressed in transcriptomes
231 between the H37Rv strain and the MDR CIBIN:UMF:15:99 clinical isolate (21), revealing
232 that other genes could be involved in drug resistance in *M. tuberculosis*. These differences
233 could also be explained by a mechanism of epigenetic regulation of the acquisition of drug
234 resistance (47-49).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

235 A limitation of this study could be the small number of clinical isolates. However, we
236 examined a representative group from different phylogenetic clusters to provide evidence
237 that the absence or presence of characteristic drug-resistance mutations in Mexican *M.*
238 *tuberculosis* strains is not entirely reliable for early diagnosis, except for mutations in the
239 hotspot region of the *rpoB* gene.

240 During the sequencing analysis, we observed two peaks in the same position for the some
241 isolates (data not shown). This can be evidence of a heterogeneous population in the same
242 clinical isolate. When we observed two peaks in the same position for a widely reported
243 mutation, we considered the isolate as a mutant and likely heteroresistant. However, using
244 sequencing is a limited tool to identify heteroresistance because it requires more than 10%
245 of cells in a culture to be drug resistant in order to be detected. In contrast, the BACTEC
246 MGIT 960 system can detect as few as 1% of drug resistant cells in a heterogeneous
247 population of *M. tuberculosis* (50).

248 The presence of mutations, commonly found in many isolates of *M. tuberculosis*, was not
249 always consistent with their phenotypic drug-resistance profile, in clinical isolates from
250 Northeastern Mexico. These results indicate that other mutations or regulatory mechanisms
251 are involved in the drug resistance found in these strains.

252

253 **Funding**

254 This work was supported by Instituto Mexicano del Seguro Social (Grant Number
255 FIS/IMSS/PROT/G12/1108) for MBL. LGE was supported by CONACyT (Graduate
256 fellowship No. 226992) and by Instituto Mexicano del Seguro Social (Fellowship No.
257 2010-184).

258

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

259 **Conflict of interest**

260 No competing financial interests exist.

261

262 **Acknowledgments**

263 Authors thank to Mrs. Ana María Garza Sánchez for her outstanding secretarial assistance.

264 Also, we thank to M.V.Z. Patricia Flores Montiel, from Laboratorio Central Regional del

265 Norte, S.A. de C.V., for LJ media preparation.

266

267 **References**

268 1. WHO. Global tuberculosis report 2014. World Health Organization. 2014.
269 2. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. Casos
270 Nuevos de Tuberculosis Pulmonar - Estados Unidos Mexicanos, 1990-2013:
271 <http://cenaprece.salud.gob.mx>; 2014 [
272 3. Coll P. [Drugs with activity against Mycobacterium tuberculosis]. Enfermedades
273 infecciosas y microbiología clínica. 2003;21(6):299-307; quiz 8, 26.
274 4. Udhwadia ZF, Amale RA, Ajbani KK, Rodrigues C. Totally drug-resistant
275 tuberculosis in India. Clinical Infectious Diseases. 2012;4(54):579-81.
276 5. Zager EM, McNerney R. Multidrug-resistant tuberculosis. BMC infectious diseases.
277 2008;8:10.
278 6. WHO. Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant
279 and extensively drug-resistant tuberculosis by 20152011. Available from:
280 www.who.int/tb/publications/2011/mdr_report.
281 7. Jain A, Dixit P. Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what
282 is next? Journal of biosciences. 2008;33(4):605-16.
283 8. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent
284 resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tubercle and lung disease : the
285 official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease.
286 1998;79(1):3-29.
287 9. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to
288 isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. Respiratory
289 research. 2001;2(3):164-8.
290 10. Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradzky KF, Salas-Castillo SP, Ghiladi RA.
291 Isoniazid-resistance conferring mutations in Mycobacterium tuberculosis KatG: catalase,
292 peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. Protein science : a publication of
293 the Protein Society. 2010;19(3):458-74.
294 11. Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, et
295 al. Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

296 in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from
297 tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC microbiology*. 2009;9:39.

298 12. Zaczek A, Brzostek A, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Dziadek J. Genetic
299 evaluation of relationship between mutations in *rpoB* and resistance of *Mycobacterium*
300 *tuberculosis* to rifampin. *BMC microbiology*. 2009;9:10.

301 13. Brossier F, Veziris N, Aubry A, Jarlier V, Sougakoff W. Detection by GenoType
302 MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol
303 in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of clinical*
304 *microbiology*. 2010;48(5):1683-9.

305 14. Srivastava S, Musuka S, Sherman C, Meek C, Leff R, Gumbo T. Efflux-pump-
306 derived multiple drug resistance to ethambutol monotherapy in *Mycobacterium*
307 *tuberculosis* and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of ethambutol. *The Journal*
308 *of infectious diseases*. 2010;201(8):1225-31.

309 15. Jureen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene
310 mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.
311 2008;52(5):1852-4.

312 16. Bocanegra-Garcia V, Garza-Gonzalez E, Cruz-Pulido WL, Guevara-Molina YL,
313 Cantu-Ramirez R, Gonzalez GM, et al. Molecular assessment, drug-resistant profile, and
314 spacer oligonucleotide typing (spoligotyping) of *Mycobacterium tuberculosis* strains from
315 Tamaulipas, Mexico. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2014;28(2):97-103.

316 17. Bolado-Martinez E, Perez-Mendoza A, Alegria-Morquecho FM, Candia-Plata Mdel
317 C, Aguayo-Verdugo Mdel R, Alvarez-Hernandez G. [DNA mutations associated to
318 rifampicin or isoniazid resistance in *M. tuberculosis* clinical isolates from Sonora, Mexico].
319 *Salud publica de Mexico*. 2012;54(2):167-70.

320 18. Penuelas-Urquides K, Martinez-Rodriguez HG, Enciso-Moreno JA, Molina-Salinas
321 GM, Silva-Ramirez B, Padilla-Rivas GR, et al. Correlations between major risk factors and
322 closely related *Mycobacterium tuberculosis* isolates grouped by three current enotyping
323 procedures: a population-based study in northeast Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo*
324 *Cruz*. 2014;109(6):814-9.

325 19. Molina-Salinas GM, Ramos-Guerra MC, Vargas-Villarreal J, Mata-Cardenas BD,
326 Becerril-Montes P, Said-Fernandez S. Bactericidal activity of organic extracts from
327 *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of medical*
328 *research*. 2006;37(1):45-9.

329 20. Luna-Herrera J, Martinez-Cabrera G, Parra-Maldonado R, Enciso-Moreno JA,
330 Torres-Lopez J, Quesada-Pascual F, et al. Use of receiver operating characteristic curves to
331 assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of
332 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *European journal of clinical microbiology*
333 *& infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical
334 *Microbiology*. 2003;22(1):21-7.

335 21. Penuelas-Urquides K, Gonzalez-Escalante L, Villarreal-Trevino L, Silva-Ramirez
336 B, Gutierrez-Fuentes DJ, Mojica-Espinosa R, et al. Comparison of gene expression profiles
337 between pansensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*.
338 *Current microbiology*. 2013;67(3):362-71.

339 22. Leonard B, Coronel J, Siedner M, Grandjean L, Caviedes L, Navarro P, et al. Inter-
340 and intra-assay reproducibility of microplate Alamar blue assay results for isoniazid,
341 rifampicin, ethambutol, streptomycin, ciprofloxacin, and capreomycin drug susceptibility

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

342 testing of Mycobacterium tuberculosis. Journal of clinical microbiology.
343 2008;46(10):3526-9.

344 23. Miyata M, Pavan FR, Sato DN, Marino LB, Hirata MH, Cardoso RF, et al.
345 Comparison of resazurin microtiter assay performance and BACTEC MGIT 960 in the
346 susceptibility testing of Brazilian clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis to four
347 first-line drugs. Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for
348 Microbiology]. 2013;44(1):281-5.

349 24. Kontos F, Maniati M, Costopoulos C, Gitti Z, Nicolaou S, Petinaki E, et al.
350 Evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system for the susceptibility testing of
351 Mycobacterium tuberculosis to first-line drugs: a multicenter study. Journal of
352 microbiological methods. 2004;56(2):291-4.

353 25. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Harris SR,
354 et al. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. Genome research.
355 2012;22(4):735-45.

356 26. Jagielski T, Bakula Z, Roeske K, Kaminski M, Napiorkowska A, Augustynowicz-
357 Kopec E, et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in multidrug-
358 resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. The Journal of antimicrobial
359 chemotherapy. 2014;69(9):2369-75.

360 27. Abdelaal A, El-Ghaffar HA, Zaghoul MH, El Mashad N, Badran E, Fathy A.
361 Genotypic detection of rifampicin and isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis
362 strains by DNA sequencing: a randomized trial. Annals of clinical microbiology and
363 antimicrobials. 2009;8:4.

364 28. Baker LV, Brown TJ, Maxwell O, Gibson AL, Fang Z, Yates MD, et al. Molecular
365 analysis of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from England and
366 Wales reveals the phylogenetic significance of the *ahpC* -46A polymorphism.
367 Antimicrobial agents and chemotherapy. 2005;49(4):1455-64.

368 29. Chaoui I, Sabouni R, Kourout M, Jordaan AM, Lahlou O, Elouad R, et al. Analysis
369 of isoniazid, streptomycin and ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis
370 isolates from Morocco. Journal of infection in developing countries. 2009;3(4):278-84.

371 30. Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, et al.
372 Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant Mycobacterium
373 tuberculosis isolates obtained in Brazil. Antimicrobial agents and chemotherapy.
374 2004;48(9):3373-81.

375 31. Hazbon MH, Motiwala AS, Cavatore M, Brimacombe M, Whittam TS, Alland D.
376 Convergent evolutionary analysis identifies significant mutations in drug resistance targets
377 of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008;52(9):3369-
378 76.

379 32. Zetola NM, Shin SS, Tumedi KA, Moeti K, Ncube R, Nicol M, et al. Mixed
380 Mycobacterium tuberculosis complex infections and false-negative results for rifampin
381 resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. Journal of
382 clinical microbiology. 2014;52(7):2422-9.

383 33. Zenteno-Cuevas R, Cuevas-Cordoba B, Enciso A, Enciso L, Cuellar A. Assessing
384 the utility of three TaqMan probes for the diagnosis of tuberculosis and resistance to
385 rifampin and isoniazid in Veracruz, Mexico. Canadian journal of microbiology.
386 2012;58(3):318-25.

387 34. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Narvskaya O. Detection of *embB306*
388 mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

389 Northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. *Journal of clinical*
390 *microbiology*. 2002;40(10):3810-3.

391 35. Jain A, Mondal R, Srivastava S, Prasad R, Singh K, Ahuja RC. Novel mutations in
392 *emb B* gene of ethambutol resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: a preliminary
393 report. *The Indian journal of medical research*. 2008;128(5):634-9.

394 36. Safi H, Fleischmann RD, Peterson SN, Jones MB, Jarrahi B, Alland D. Allelic
395 exchange and mutant selection demonstrate that common clinical *embCAB* gene mutations
396 only modestly increase resistance to ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*.
397 *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):103-8.

398 37. Safi H, Sayers B, Hazbon MH, Alland D. Transfer of *embB* codon 306 mutations
399 into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol,
400 isoniazid, and rifampin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(6):2027-34.

401 38. Starks AM, Gumusboga A, Plikaytis BB, Shinnick TM, Posey JE. Mutations at
402 *embB* codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in
403 *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(3):1061-6.

404 39. Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *European*
405 *journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European
406 Society of Clinical Microbiology. 2005;24(11):711-20.

407 40. Jonmalung J, Prammananan T, Leechawengwongs M, Chairprasert A. Surveillance
408 of pyrazinamide susceptibility among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*
409 isolates from Siriraj Hospital, Thailand. *BMC microbiology*. 2010;10:223.

410 41. McCammon MT, Gillette JS, Thomas DP, Ramaswamy SV, Rosas, II, Graviss EA,
411 et al. Detection by denaturing gradient gel electrophoresis of *pncA* mutations associated
412 with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United
413 States-Mexico border region. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(6):2210-7.

414 42. Mphahlele M, Syre H, Valvatne H, Stavrum R, Mannsaker T, Muthivhi T, et al.
415 Pyrazinamide resistance among South African multidrug-resistant *Mycobacterium*
416 *tuberculosis* isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(10):3459-64.

417 43. Sheen P, Mendez M, Gilman RH, Pena L, Caviedes L, Zimic MJ, et al. Sputum
418 PCR-single-strand conformational polymorphism test for same-day detection of
419 pyrazinamide resistance in tuberculosis patients. *Journal of clinical microbiology*.
420 2009;47(9):2937-43.

421 44. Zimic M, Sheen P, Quiliano M, Gutierrez A, Gilman RH. Peruvian and globally
422 reported amino acid substitutions on the *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase
423 suggest a conserved pattern of mutations associated to pyrazinamide resistance. *Infection,*
424 *genetics and evolution* : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in
425 *infectious diseases*. 2010;10(2):346-9.

426 45. Cuevas-Cordoba B, Xochihua-Gonzalez SO, Cuellar A, Fuentes-Dominguez J,
427 Zenteno-Cuevas R. Characterization of *pncA* gene mutations in pyrazinamide-resistant
428 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Mexico. *Infection, genetics and evolution* :
429 *journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*.
430 2013;19:330-4.

431 46. Du X, Wang W, Kim R, Yakota H, Nguyen H, Kim SH. Crystal structure and
432 mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry*.
433 2001;40(47):14166-72.

434 47. Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, et al.
435 *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

436 substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nature genetics*.
437 2013;45(7):784-90.
438 48. Niemann S, Koser CU, Gagneux S, Plinke C, Homolka S, Bignell H, et al. Genomic
439 diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium*
440 tuberculosis with identical DNA fingerprints. *PloS one*. 2009;4(10):e7407.
441 49. Smith T, Wolff KA, Nguyen L. Molecular biology of drug resistance in
442 *Mycobacterium tuberculosis*. *Current topics in microbiology and immunology*.
443 2013;374:53-80.
444 50. Folkvardsen DB, Svensson E, Thomsen VO, Rasmussen EM, Bang D, Werngren J,
445 et al. Can molecular methods detect 1% isoniazid resistance in *Mycobacterium*
446 tuberculosis? *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(5):1596-9.
447

Table 1

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer name	Nucleotide Sequence (3'-5')	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)	Reference
<i>katG</i>	Tb87 Tb86	GTTGTCCCATTTTCGTCGGGG GAAACAGCGGCGCTGATCGT	55	210	El-Sayed Zaki and Goda, 2007
<i>inhA</i> (promoter)	inhAP3 inhAP5	CGCAGCCAGGGCCTCGCTG CTCCGGTAACCAGGACTGA	57	246	Chaoui <i>et al.</i> , 2009
<i>embB</i>	embBF embBR	TGATATTCGGCTTCCTGCTC ACCGCTCGATCAGCACATAG	60	417	El-Sayed Zaki and Goda, 2007
<i>rpoB</i>	Forward Reverse	ATCAACATCCGGCCGGTGGT TACACCGACAGCGAGCCGAT	57	257	Mariam <i>et al.</i> , 2004
<i>pncA</i>	F1 R3 F2 R4	GCGCACACAATGATCGGTGG GTCGGTCATGTTCGCGATCG ATCAGCGACTACCTGGCCGA TGCTTGCGGCGAGCGCTCCA	60	526 521	Endoh <i>et al.</i> , 2002

Table 2. Groups of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates and the reference strains according to their susceptibility to first-line drugs by BACTEC MGIT 960.

Group	Drug susceptibility profile			
	INH	RIF	EMB	PZA
1	R	R	R	R
2*	R	R	S	R
3	R	R	S	S
4*	R	S	S	S
5*	S	S	S	S
6	R	R	S	R
7	R	S	S	S
8	S	S	S	S
H37Rv	S	S	S	S
CIBIN:UMF:15:99	R	R	R	R

INH, isoniazid; RIF, rifampicin; EMB, ethambutol; PZA, pyrazinamide

R, resistant; S, susceptible

* These groups also were streptomycin resistant

Table 3. Concordance between BACTEC MGIT 960® and Resazurine Microtiter Assay (REMA) in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates.

		BACTEC MGIT 960										
		INH			κ	RIF			κ	EMB		κ
		R	S	R		S	R	S				
REMA	R	14	6	0.58	3	7	0.33	3	14	0.41		
	S	4	0		9	5		0	7			

INH, isoniazid; RIF, rifampicin; EMB, ethambutol

R, resistant; S, susceptible

κ , kappa statistics

Table 4 Mutations found in drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates

Drug resistance profile	n	Gene	Codon Position	Change		No. of Isolates (%)	
				Nucleotide	Amino acid		
INH	19	<i>katG</i>	315	AGC→ACC	SER→THR	10(52.63)	
				AGC→AAC	SER→ASN	1(5.26)	
		<i>pInhA</i>	C-15 ¹ T-8 ¹	C→T T→G	N/A	1(5.26) 1(5.26)	
RIF	13	<i>rpoB</i>	526	CAC→TAC	HIS→TYR	1(7.7)	
				CAC→GAC	HIS→ASP	1(7.7)	
				CAC→TGC	HIS→CYS	1(7.7)	
				CAC→CCC	HIS→PRO	1(7.7)	
				531	TCG→TGG	SER→TRP	1(7.7)
					TCG→TTG	SER→LEU	8(61.5)
EMB	4	<i>embB</i>	306	ATG→ATA	MET→ILE	3(75)	
PZA	10	<i>pncA</i>	46	A insertion	Out-of-frame	1(10)	
			135	ACC→GCC	THR→ALA	1(10)	
			146	GCG→GTC	ALA→VAL	1(10)	

INH, isoniazid; RIF, rifampicin; EMB, ethambutol; PZA, pyrazinamide

N/A, Not applicable

¹On inhA promoter, coordinates are with respect to transcription start site

Table 5. Association between drug-resistance profile and mutations found in *M. tuberculosis* clinical isolates

Group	Isolate ID	Drug-resistance profile				Genes				
		INH	RIF	EMB	PZA	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>rpoB</i>	<i>embB</i>	<i>pncA</i>
1	986							×		
	1007	R	R	R	R	×		×	×	×
	1025							×	×	
2*	813						×	×		
	852	R	R	S	R	×		×		×
	918					×		×		
3	840						×	×		
	929	R	R	S	S	×		×		
	1068							×		
4*	804									
	998	R	S	S	S	×				
	1003					×			×	
5*	814									
	903	S	S	S	S					×
	1044									
6	803					×		×		
	822	R	R	S	R	×		×	×	
	983					×		×	×	×
7	867					×				
	939	R	S	S	S					
	943									
8	806									
	801	S	S	S	S					
	810									×
H37Rv		S	S	S	S					

CIBIN:UMF:15:99	R	R	R	R	×	×	×
-----------------	---	---	---	---	---	---	---

INH, isoniazid; RIF, rifampicin; EMB, ethambutol; PZA, pyrazinamide.

R, resistant; S, susceptible.

× means presence of mutations on this gene or regulatory sequence.

* These groups also were streptomycin resistants.

Fig. 1 Concordance among single mutations found in *M. tuberculosis* clinical isolates

<i>inhA</i>	Mut	2								n=26	
	WT	24									
<i>katG</i>	Mut	0	11	11							
	WT	2	13	15							
<i>rpoB</i>	Mut	2	11	8	3	13					
	WT	0	13	3	12	13					
<i>embB</i>	Mut	0	6	5	1	5	1	6			
	WT	2	18	6	14	8	12	20			
<i>pncA</i>	Mut	0	5	3	2	3	2	1	4	5	
	WT	2	19	8	13	10	11	5	16	21	
Gene		Mut	WT	Mut	WT	Mut	WT	Mut	WT	Mut	WT
		<i>inhA</i>		<i>katG</i>		<i>rpoB</i>		<i>embB</i>		<i>pncA</i>	

Mut, mutated; WT, wild type.